

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-207-11-46-59>

Особенности оценки проницаемости кишечного барьера при хронической болезни почек

Пятченков М. О.¹, Власов А. А.¹, Щербаков Е. В.¹, Бельских А. Н.¹, Крюков Е. В.¹, Марков А. Г.²

¹ Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Россия, 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6.

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Россия, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7/9

Для цитирования: Пятченков М. О., Власов А. А., Щербаков Е. В., Бельских А. Н., Крюков Е. В., Марков А. Г. Особенности оценки проницаемости кишечного барьера при хронической болезни почек. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2022;207(11): 46–59. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-207-11-46-59

✉ Для переписки:

Пятченков

Михаил Олегович

pyatchenkovMD@

yandex.ru

vmeda_12@mil.ru

Пятченков Михаил Олегович, к.м.н., старший преподаватель кафедры нефрологии и эфферентной терапии

Власов Андрей Александрович, к.м.н., соискатель 2 кафедры (терапии усовершенствования врачей)

Щербаков Евгений Вячеславович, врач-нефролог

Бельских Андрей Николаевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой нефрологии и эфферентной терапии

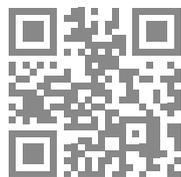
Крюков Евгений Владимирович, д.м.н., профессор, академик РАН, начальник Военно-медицинской академии

Марков Александр Георгиевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой общей физиологии

Резюме

Многочисленные исследования показали, что изменения микробно-тканевого комплекса кишечника являются фактором риска прогрессирования хронической болезни почек (ХБП) до терминальной стадии и, следовательно, потенциальной целью для новых терапевтических вмешательств. Это диктует необходимость разработки и внедрения в повседневную клиническую практику надежных и чувствительных диагностических инструментов оценки проницаемости кишечной стенки. Современные методы секвенирования и мультиомические технологии позволили установить, что больные с ХБП характеризуются специфическим дисбалансом сахаролитической и протеолитической микробиоты, способствующим накоплению многочисленных токсичных продуктов микробного метаболизма, таких как индоксил сульфат, р-крезил сульфат, триметиламин-N-оксид. Прогрессирующее снижение функции почек приводит к компенсаторному поступлению мочевины в желудочно-кишечный тракт. В просвете кишечника мочевины гидролизуется микробной уреазой, образуя большое количество гидроксида аммония, который может вызывать нарушение целостности эпителиального барьера с увеличением кишечной проницаемости для микробных молекул, инициирующих системное воспаление. В качестве экспериментальных подходов к изучению состояния кишечного барьера при ХБП используют оценку электрофизиологических показателей кишечного эпителия и транспорта флуоресцентно меченых веществ в камере Уссинга. Продолжают активно совершенствоваться различные клеточные технологии, которые могут быть полезны для исследования влияния микробиоты на барьерные функции кишечного эпителия. Экспрессию генов и содержание белков плотных контактов оценивают с использованием полимеразной цепной реакции, иммуногистохимических методов и вестерн-блоттинга. При помощи различных молекулярно-биологических методов установлено, что для почечной недостаточности характерно наличие воспалительно-атрофических изменений на всем протяжении желудочно-кишечного тракта, разрушение муцинового слоя, повреждение плотных контактов эпителия с уменьшением содержания клаудина-1, окклюдина и ZO-1, а также снижение трансэпителиального электрического сопротивления. Клинические исследования проницаемости кишечника методами, основанными на экскреции с мочой энтерально введенных сахаров, полимеров полиэтиленгликоля и меченых молекул, свидетельствуют об искажении результатов у больных ХБП, вследствие измененного почечного клиренса. В качестве альтернативы рассматриваются количественное определение в крови бактериальной ДНК и уровня D-лактата. Имеют потенциал для использования в качестве методов оценки барьерной функции кишки идентификация некодирующих микроРНК в крови, конфокальная лазерная эндомикроскопия и импедансная спектроскопия.

EDN: BLYDXK



Ключевые слова: кишечная проницаемость, кишечная микробиота, трансэпителиальный транспорт, хроническая болезнь почек, методы оценки, экспериментальные подходы, биомаркеры, уремические токсины

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.



Features of assessing the intestinal barrier permeability in chronic kidney disease

M. O. Pyatchenkov¹, A. A. Vlasov¹, E. V. Sherbakov¹, A. N. Belskykh¹, E. V. Kryukov¹, A. G. Markov²

¹ Military Medical Academy named after S. M. Kirov, 6 academic Lebedev street, 194044, St. Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg State University, 7–9 Universitetskaj nab., 199034, St. Petersburg, Russia

For citation: Pyatchenkov M. O., Vlasov A. A., Sherbakov E. V., Belskykh A. N., Kryukov E. V., Markov A. G. Features of assessing the intestinal barrier permeability in chronic kidney disease. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2022;207(11): 46–59. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-207-11-46-59

✉ **Corresponding author:**

Mikhail O. Pyatchenkov
pyatchenkovMD@yandex.ru
vmeda_12@mil.ru

Mikhail O. Pyatchenkov, candidate of medical Sciences, senior lecturer in the Department of nephrology and blood purification; *SPIN: 5572–8891, ORCID: 0000–0002–5893–3191*

Andrey A. Vlasov, candidate of medical Sciences, resident of 2nd Therapy department of postgraduate education; *SPIN: 2801–1228, ORCID: 0000–0002–7915–3792*

Evgeniy V. Sherbakov, nephrologist; *SPIN: 6337–6039, ORCID: 0000–0002–3045–1721*

Andrei N. Belskykh, doctor of medical Sciences, Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head of Department of nephrology and blood purification; *ORCID: 0000–0002–0421–3797*

Evgeniy V. Kryukov, doctor of medical Sciences, Professor, Academician of Russian Academy of Sciences, Head of Military Medical Academy; *SPIN: 3900–3441, ORCID: 0000–0002–8396–1936*

Alexander G. Markov, doctor of biological Sciences, Professor, Head of Department of general physiology; *SPIN: 4985–0808, ORCID: 0000–0002–2867–044X*

Summary

Numerous studies have shown that changes in the intestinal microbial-tissue complex are a risk factor for the progression of chronic kidney disease (CKD) to end-stage renal disease and, therefore, a potential target for new therapeutic interventions. Thus, reliable and sensitive diagnostic tools for measuring intestinal permeability in the clinical setting are necessary. Modern genome sequencing and multi-omics technologies have established that patients with CKD are characterized by a specific imbalance between the saccharolytic and proteolytic microbiota, contributing to the accumulation of numerous toxic microbial products, such as indoxyl sulphate, p-cresyl sulphate, trimethylamine-N-oxide. Progressive kidney function decline leads to compensatory urea accumulation in the gastrointestinal tract.

In the intestinal lumen, urea is hydrolyzed by microbial urease, forming a large amount of ammonium hydroxide, which may be accompanied by disruption of the epithelial barrier integrity with an increase in intestinal permeability for microbial molecules that initiate systemic inflammation. Experimental approaches to studying the intestinal barrier in CKD include the assessment of electrophysiological parameters of the intestinal epithelium and the transport of fluorescently labelled tracers in the Ussing chamber. Actively improving various cell-based in vitro methods, which may be useful for studying the effect of microbiota on the barrier functions of the intestinal epithelium. Gene expression and protein content of tight junctions are estimated using polymerase chain reaction, immunohistochemical methods and Western blotting. Using various biomolecular methods, it was found that renal failure is characterized by the presence of inflammatory and atrophic changes throughout the gastrointestinal tract, destruction of the mucin layer, damage to tight junctions with a decrease in the amount of claudine-1, occludin and ZO-1 as well as a decrease in transepithelial electrical resistance. Clinical examination of intestinal permeability by methods based on the urine excretion of orally administered sugars, polyethylene glycol polymers and labelled tracers indicate a distortion of the results in patients with CKD due to altered renal clearance. Alternatively, quantitative determination of bacterial DNA and D-lactate levels in the blood is considered. Identification of serum non-coding microRNAs, confocal laser endomicroscopy and impedance spectroscopy have the potential to be used as methods for assessing intestinal barrier function.

Keywords: intestinal permeability, intestinal microbiota, transepithelial transport, chronic kidney disease, methodology, experimental approaches, biomarkers, uremic toxins

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Введение

ХБП – это персистирующее в течение трех или более месяцев поражение почек вследствие действия различных этиологических факторов, анатомической основой которого является процесс

замещения нормальных структур соединительной тканью, приводящий к его дисфункции [1]. Распространенность ХБП среди взрослого населения, по различным оценкам, составляет от 10

до 15%. Таким образом, во всем мире около 850 миллионов человек страдают различными нефропатиями [2,3]. Не удивительно, что лечение этих больных требует значительных финансовых затрат даже в самых развитых странах мира [4].

Критерии диагноза ХБП:

1. наличие любых клинических признаков, указывающих на повреждение почек и персистирующих не менее трех месяцев и/или;
2. снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) <60 мл/мин/1,73 м², сохраняющееся в течение трех и более месяцев, вне зависимости от наличия других признаков повреждения почки/или;
3. наличие признаков необратимых структурных изменений почек, выявленных однократно при прижизненном морфологическом исследовании органа или при его визуализации [5].

Лица с ХБП предрасположены к повышенному риску заболеваемости (кардиоваскулярная патология, минерально-костные и нутриционные нарушения, анемия, метаболический ацидоз, нервно-психические заболевания), что влечет за собой непропорционально высокие показатели госпитализации, а также снижение качества жизни [6]. Многие из этих состояний опосредованы системным воспалением и оксидативным стрессом, чему в значительной степени способствуют индуцированные уремией количественные и качественные изменения состава и метаболической активности кишечной микробиоты. Сопутствующие нарушения структуры эпителиального барьера кишечника облегчают проникновение бактерий

и многочисленных продуктов микробного происхождения в системный кровоток, что играет немаловажную роль в дальнейшем прогрессировании ХБП и связанных с ней осложнений. Эта двусторонняя взаимосвязь поддерживает концепцию о том, что изучение микробиоты кишечника, наряду с другими компонентами кишечного барьера, в скором времени может лечь в основу нового направления в профилактике и лечении ХБП [7].

Особый интерес к синдрому повышенной эпителиальной проницаемости кишки, как важному модулятору течения и исходов ХБП, диктует необходимость располагать надежными методами его оценки у этой категории больных. К настоящему времени разработано немало диагностических подходов, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Важно понимать, что функция почек влияет на результаты большинства подобных тестов. Именно поэтому многие исследования, в которых оценивалась проницаемость кишечника, исключали пациентов с ХБП, чтобы избежать погрешностей в выводах, связанных со снижением СКФ. Таким образом, несмотря на актуальность обсуждаемой проблемы, методы объективной оценки патогенетической взаимосвязи в оси «кишечник-почка» крайне ограничены. В настоящей статье рассматриваются современные подходы к изучению барьерных свойств и проницаемости стенки кишки. Обсуждаются преимущества и ограничения каждого из используемых методов у больных с ХБП. Кроме того, представлен обзор клинических и экспериментальных исследований, подтверждающих наличие взаимосвязи между почечной недостаточностью и повышенной проницаемостью кишечника.

Кишечный барьер. Строение и функции

Нормально функционирующий неповрежденный кишечный барьер выполняет две основные функции, одна из которых заключается в предотвращении переноса люминальных микроорганизмов и вредных веществ, таких как эндотоксины, антигены и пищеварительные ферменты из просвета кишки во внутреннюю среду. С другой стороны, он действует как полупроницаемый фильтр, позволяющий избирательно поглощать необходимые организму питательные вещества, электролиты, витамины и воду. Реализация этих сложных разнонаправленных задач достигается скоординированным взаимодействием основных компонентов кишечного барьера [8].

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 тонком и толстом кишечнике муцин 2 (MUC2) является наиболее распространенным гликопротеином, секретруемым бокаловидными клетками. Примечательно, что слизь тонкого кишечника представлена только одним слоем, в то время как толстая кишка имеет два слоя: наружный рыхлый слой, колонизированный ком-

менсальными бактериями, и внутренний плотный слой, практически лишенный микроорганизмов [9].

С функциональной точки зрения наиболее важным компонентом кишечного барьера является кишечный эпителий. Самообновление эпителиальных 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 (лизосома, дефензинов, кателицидинов и др.), которые накапливаются в слое слизи, способствуя ее бактерицидной активности [10].

Парацеллюлярные пространства между соседними клетками герметизированы плотными контактами (ПК), регулируемыми 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: ZO-1, ZO-2 и ZO-3) белки ПК осуществляют механическое соединение клеток эпителия, его функциональную поляризацию, а также выполняют роль регуляторов межклеточного транспорта [11]. Ниже ПК находятся адгезионные контакты, необходимые для восстановления эпителия, а также десмосомы, поддерживающие его стабильность [12].

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 фолликулы, покрытые специ-

ализированным фолликул-ассоциированным эпителием, характерной чертой которого являются микроскладчатые клетки (М-клетки), обеспечивающие захват, транспорт, процессинг и презентацию антигенных структур [13].

Комменсальная флора, состоящая из сотен триллионов бактерий, вирусов и одноклеточных эукариот, в современном представлении также является неотъемлемым компонентом кишечного барьера. Она участвует в различных процессах, таких как расщепление и усвоение питательных веществ, выработка витаминов и гормонов, развитие иммунной системы, защита от колонизации патогенами. 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 [14].

Другие структуры, такие как кровеносные сосуды, слой гладкомышечных клеток и компоненты энтеральной нервной системы поддерживают структурно-функциональную целостность кишечного барьера, регулируя специфические защитные реакции слизисто-эпителиальной оболочки в случаях ее повреждения [15].

Современная концепция кишечной проницаемости

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 [16].

Кишечный барьер 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-специфические различия. Около 90% всех веществ всасывается в тонком кишечнике. 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, чем барьер тонкой кишки [17]. Отличия в проницаемости наблюдаются и на клеточном уровне. В тонкой кишке промежутки

между соседними энтероцитами увеличивается с 4–5 Å на кончике ворсинки до более чем 20 Å у основания крипты [18]. Различные члены одного и того же семейства белков, формирующих ПК, могут оказывать различное 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 [19].

Неповрежденный кишечный барьер предотвращает проникновение пищевых антигенов, патогенных микробов и их эндотоксинов в организм человека, в то время как его дезинтеграция 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) [20]. 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 желудочно-кишечного тракта, но и других органов и систем [21]. Установлено, что у пациентов с болезнью Крона кишечная гиперпроницаемость, диагностированная во время клинической ремиссии, является предиктором будущего рецидива заболевания [22]. 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 [23]. Модуляция нарушенной барьерной функции и проницаемости кишечника при помощи диетических вмешательств, включая стратегии манипулирования

микробиотой, считается актуальной целью для новых терапевтических и профилактических методов лечения некоторых патологий [24]. Эти факты подтверждают актуальность разработки и совершенствования методов, направленных на оценку морфофункциональных характеристик кишечного барьера.

Методы оценки барьерной функции и проницаемости кишечной стенки

Общепризнанной классификации методов оценки структуры и функции кишечного барьера 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*). Многие современные методы изучения кишечной проницаемости 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.

Ex vivo

В 1950-х годах датский биолог Ганс Уссинг с коллегами разработал 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 NaCl 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 и значение разности потенциалов позволяли рассчитать трансэпителиальное сопротивление, которое обратно пропорционально показателю проницаемости изучаемой ткани. [26]. Эти фундаментальные исследования проложили путь к современным моделям трансэпителиального транспорта, включая открытие Na⁺/K⁺-АТФазного насоса [27]. Исследователи активно использовали камеру Уссинга для изучения других слизистых, включая респираторный эпителий, кишечник и мочевой пузырь. Именно так был раскрыт патогенез муковисцидоза. При мониторинге ионного

In vitro

Высокоинформативным инструментом в области изучения проницаемости кишечного эпителия являются различные клеточные линии (Caco-2, HT-29, SK-CO15 и T84). Иммутизированные (опу-

Понимание фундаментальных основ каждого метода имеет важное значение для оценки их преимуществ и ограничений. Учитывая, что почки играют ключевую роль в поддержании гомеостаза внутренней среды организма благодаря регулируемому выведению избыточной жидкости, электролитов, органических соединений, а также токсичных продуктов жизнедеятельности, изучение особенностей функционирования пищеварительной системы в условиях почечной недостаточности, является чрезвычайно интересным и актуальным направлением научных и клинических исследований [25].

транспорта через эпителий дыхательных путей было показано, что секреция ионов хлора снижалась у этих пациентов вследствие нарушения функционирования трансмембранного регулятора проводимости (CFTR), мутации в гене которого приводят к развитию заболевания [28].

Камера Уссинга также предполагает возможность оценки транспорта флуоресцентно меченых маркерных веществ, которые добавляют 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 этих веществ является специфичным признаком нарушенной проницаемости. Важно понимать, что парацеллюлярный поток малых маркерных молекул часто будет отражаться аналогичными изменениями в трансэпителиальном сопротивлении, но эти показатели не всегда могут быть связаны, поскольку они представляют разные транспортные характеристики эпителиального барьера [29]. Метод камеры 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.

холевые) клетки человека быстро растут в монослои с последующей спонтанной дифференцировкой, обеспечивая идеальную систему для экспериментальных исследований. Клетки вы-

ращиваются 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 [30].

Несмотря на то, что отдельные клеточные линии могут детально повторять структуру эпителия, полноценное моделирование их функций невозможно без нейрогуморальных стимулов и связи с иммунными клетками. Для создания более реалистичных моделей *in vitro*, имитирующих взаимодействие различных типов клеток в ткани, было создано несколько двойных и тройных ко-культур [31]. 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. I. Lozoaya-Agullo и соавт. (2017) разработали тройную ко-культуру, включающую линии Сасо-2 и НТ29, с добавлением В-клеток Raji (линия клеток, полученная из В-лимфоцитов большого лимфомой Беркитта) и показали, что присутствие М-клеток может влиять на транспорт лекарств через кишечный барьер [32].

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 образцах крови из брыжеечной или воротной вены. 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

Недавние достижения привели к разработке новой клеточной модели, так называемых кишечных органоидов, полученных из стволовых клеток эпителия кишечника. Эти 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 [33].

Методы оценки проницаемости *in vitro* имеют ряд преимуществ по сравнению с другими подходами. Среди них можно выделить:

1. решение этических процессов умерщвления животных;
2. снижение времени и затрат на проведение научных работ;
3. получение результатов в сопоставимых и строго контролируемых условиях;
4. возможность изучения молекулярных и клеточных процессов, которые лежат в основе физиологических реакций, исключая влияния многих системных и тканевых факторов, которые часто не подлежат оценке;
5. возможность трансфекции гена в клетку и работа на линии клеток с измененным уровнем исследуемых белков.

in vivo. Кроме того, скорость трансэпителиального транспорта соединений можно тщательно контролировать в отношении их концентрации, pH, 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 [34].

Молекулярно-биологические методы

Активно внедряющиеся во второй половине 20 века молекулярные и гистологические подходы существенно расширили знания о нормальной структуре и физиологии кишечного барьера и особенностях его повреждения при различных патологиях. Электронная микроскопия и другие способы морфологической оценки позволили выявить ранее неизученные 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 проницае-

мости различных элементов межклеточных контактов, авторы воспользовались способностью гемоглобина концентрироваться в почечных канальцах. Гемоглобин, вводимый внутривенно или внутрибрюшинно, 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 прослеживалась плотная масса гемоглобинсодержащего фильтрата вплоть до уровня ПК. Аналогичные наблюдения были сдела-

ны 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 [35, 36].

В 1998 году M. Furuse и соавт., 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 [37]. 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 [38].

В настоящее время для оценки экспрессии генов и содержания белков ПК чаще всего используют иммуногистохимию, вестерн-блоттинг и полимеразную цепную реакцию (ПЦР). 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 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 [15].

Нарушения целостности кишечного барьера при ХБП

Именно методики *ex vivo*, *in situ* и *in vitro* внесли наибольший вклад в имеющиеся на сегодняшний день знания об особенностях повреждения кишечного барьера при ХБП. D. Goldstein и соавт. (1981) одними из первых продемонстрировали структурные изменения слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки у больных с умеренной и тяжелой почечной недостаточностью. Гистологические аномалии были представлены неравномерным распределением и уменьшением длины ворсинок и крипт Либержюна [39]. Данные, полученные N. Vaziri и соавт. (1985) при аутопсийном исследовании 78 пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе, показали наличие хронического воспаления, распространяющегося по всему желудочно-кишечному тракту от пищевода до толстой кишки [40]. Последующие работы M. Magnusson и соавт. (1990, 1991) подтвердили наличие повышенной проницаемости кишечной стенки у животных и людей с ХБП, путем определения содержания в моче перорально введенных полиэтиленгликолей с большой молекулярной массой [41, 42].

Учитывая роль ПК, как ключевого структурно-функционального компонента эпителиального барьера, наблюдаемое увеличение кишечной проницаемости при почечной недостаточности может быть связано именно с их дисфункцией. Чтобы проверить эту гипотезу N. Vaziri и соавт. (2012) в серии исследований определили уровень и локализацию белков ПК в ткани толстой кишки крыс с ХБП, вызванной аденин-индуцированным тубулоинтерстициальным нефритом и субтотальной нефрэктомией. Авторы обнаружили заметное снижение содержания клаудина-1, окклюдина и ZO-1 в экспериментальной группе по сравнению со здоровыми животными. Уменьшение количества протеинов сопровождалось нормальной или повышенной экспрессией их мРНК, указывающей на посттранскрипционный или посттрансляционный механизм. При микроскопическом исследовании выявленные изменения характеризовались выраженным утолщением стенки толстой кишки, вызываемым отеком, а также лимфоцитарной инфильтрацией собственной пластинки [43]. Позже аналогичные отклонения были обнаружены по

всему желудочно-кишечному тракту, включая желудок, тощую и подвздошную кишку [44]. В другой работе A. Gonzalez и соавт. (2019) выявили у крыс с 5/6 нефрэктомией почти 50% снижение содержания муцина, показав тем самым, что изменения не ограничиваются эпителием, а также затрагивают слизистый слой [45].

С целью уточнения механизмов индуцированных уремией дефектов эпителиального барьера N. Vaziri и соавт. (2012) в экспериментах *in vitro* инкубировали монослой эпителиальных клеток толстой кишки человека (клеточная линия T84) в средах, содержащих пре- и постдиализную плазму больных с терминальной почечной недостаточностью, а также плазму здоровых лиц. Воздействие на клетки плазмы пациентов до диализа привело к заметному снижению экспрессии белков ПК и трансэпителиального электрического сопротивления, что указывало на повышение проницаемости. При этом степень повреждения эпителиального барьера была значительно менее выражена в клетках, подвергнутых воздействию плазмы больных после диализа [46]. Предположение о том, что веществом, вызывающим данные изменения, является мочевины, было подтверждено добавлением к плазме этих больных имитирующей присутствие микробной флоры уреазы, которая резко усиливала действие мочевины, приводя к выраженному 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. Следовательно, накапливающаяся в просвете кишки мочевины гидролизует микробной уреазой до бикарбоната и аммиака ($\text{CO}[\text{NH}_2]_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$), с последующим образованием едкого гидроксида аммония ($\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4\text{OH}$). Эта реакция приводит к повреждению эпителия, а также стимулирует приток лейкоцитов, что запускает второй механизм, посредством которого местное воспаление и выработка цитокинов индуцируют дезинтеграцию

белков ПК. [47]. Взятые вместе, эти наблюдения показали, что повышение содержания в организме некоторых диализируемых уремических

In vivo

Накопленные экспериментальные данные, подтверждающие тот факт, что синдром «дырявой кишки» является важным модулятором ХБП, закономерно послужили стимулом к разработке неинвазивных методов его диагностики, доступных в повседневной клинической практике. J. Fordtran и соавт. (1967) сыграли важную роль в разработке идеи методики [48], но именно I. Menzies в 1974 г. первым предложил использовать олигосахариды для оценки проницаемости кишечника. Авторы впоследствии сформулировали концепцию принципа дифференциальной экскреции с мочой перорально вводимых маркерных веществ [49]. Первоначально для этих целей применяли лактулозу, различные полимеры полиэтиленгликоля, ⁵¹Cr-этилендиаминтетрауксусной кислоты (⁵¹Cr-EDTA) и ^{99m}Tc-диэтилентриаминопентаацетат (^{99m}Tc-DTPA). 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 кровообращении 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 (лактоза, 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 тонком кишечнике, чем изолированное измерение олигосахаридов. Для оценки проницаемости толстой кишки обычно используют неподвергающиеся бактериальной деградации сукралозу и эритрит, в то время 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 в сочетании с масс-спектрометрией, что, наряду с отсутствием стандартизированных протоколов данного метода, является ограничением для более широкого внедрения данного метода в повседневную клиническую практику [22].

продуктов, таких как мочевины, по крайней мере, частично ответственно за нарушения целостности эпителиального барьера кишечника при ХБП.

В экспериментальных моделях на животных тесты на проницаемость также 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 [34].

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 M-клетки Пейеровых бляшек), так как большие молекулы и бактериальные клетки, могут проникать через кишечный эпителий только при его выраженном повреждении или воспалении слизистой оболочки [16].

Вследствие измененного почечного клиренса сахарозных маркеров, сравнение проницаемости кишечника между испытуемыми с почечной недостаточностью и без нее с помощью этого метода некорректно. Это было подтверждено в работе M.vanNieuwenhoven и соавт. (2000), 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 [50]. 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 обоих сахаров может быть различным [51]. 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, J. Wong и соавт. (2019) была разработана чувствительная методика на основе жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией, позволяющая проводить измерения концентрации сахаров не в моче, а в плазме крови. Достоверное сравнение проницаемости кишечника между контрольной группой и пациентами, находящимися на гемодиализе, также оказалось невозможным из-за сильного влияния функции почек на сывороточный уровень сахаров. В то же время не было обнаружено существенных различий в индексе абсорбции сахаров между диализными и недиализными днями. Таким образом, сама процедура гемодиализа, по-видимому, не приводит к резким изменениям проницаемости кишечника [52].

Биомаркеры повышенной проницаемости кишечника

Как *ex vivo*, *in vitro*, *in situ*, так и прямые тесты *in vivo* оценки проницаемости кишечника 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 Core региону эндотоксина, липополисахарид-связывающий белок, короткоцепочечные жирные кислоты, D-лактат, фекальный бутират, бактериальный гемолизин и другие). В качестве маркеров повышенной проницаемости также рассматриваются повышенные уровни белков, которые являются компонентами кишечного барьера (зонулин, клаудин, интестинальный белок, связывающие жирные кислоты (I-FABP), цитруллин, глутатион S-трансфераза и другие) [31]. К сожалению, 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. Также, непрямые методы дают мало информации о точном механизме и/или локализации нарушений проницаемости кишечника и поэтому их нельзя рекомендовать в качестве замены прямых тестов на проницаемость, описанных выше [23].

Данные о содержании биомаркеров проницаемости кишечника в популяции больных ХБП ограничены, а результаты исследований часто противоречат друг другу. Метаанализ 15 отчетов, посвященных неинвазивным методам оценки проницаемости кишечника, 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 [53]. Между тем остается открытым вопрос об источнике этих продуктов в системной циркуляции, особенно среди пациентов на заместительной почечной терапии. К. Shi и соавт. (2014) методом пиросеквенирования и амплификации бактериальной рДНК подтвердили наличие бактерий в плазме крови 12 из 52 гемодиализных больных.

Большинство микроорганизмов, обнаруженных в крови, соответствовали кишечной флоре [54]. В исследовании М. Bossola и соавт. (2009) 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 биоопленка на поверхности катетера. Однако анализ последовательностей ампликонов показал схожие профили микроорганизмов в обеих группах и указывал на их кишечное происхождение [55]. Необходимо отметить, что в приведенных исследованиях ни в одном из образцов крови, полученных от здоровых добровольцев, не была идентифицирована бактериальная ДНК.

Особой группой биомаркеров проницаемости являются уремические токсины микробного происхождения. Индуцированные уреимией изменения состава кишечной микробиоты способствуют повышенному образованию соединений, таких как индоксил сульфат, p-крезил сульфат и триметиламин-N-оксид. Многочисленные исследования показали, что накопление этих веществ может играть значимую роль в прогрессировании почечной недостаточности и развитии различных осложнений, связанных с ХБП. Точное определение содержания уремических токсинов в биологических жидкостях пока возможно только с помощью хроматографии и масс-спектрометрии, что во многом препятствует более широкому изучению их патогенных эффектов [56].

Недавно было показано, что некодирующие микроРНК (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 функции, регулируя ключевые факторы транскрипции [57]. Механизмы, посредством которых эти микроРНК модулируют стабильность и преобразование матричных РНК, продолжают изучаться. Тем не менее, они имеют потенциал для использования в качестве биомаркеров барьерной функции кишки.

Методы исследования кишечной микробиоты

В желудочно-кишечном тракте здорового взрослого человека обитает более 100 триллионов микробных клеток (как аэробных, так и анаэробных), составляющих микробиоту кишечника [58]. Бактерии являются наиболее распространенными кишечными микроорганизмами (>50 типов, или филумов), большинство из которых принадлежит к родам *Firmicutes* и *Bacteroidetes* (в совокупности 90%), а также *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*

и *Proteobacteria*. В меньшей степени присутствуют вирусы, грибы и археи. Каждый вид бактерий колонизирует определенную нишу, поэтому их состав вдоль кишечного тракта существенно отличается. Хотя на разнообразии микробиоты влияют пол, возраст, этническая принадлежность, национальность, регион проживания, курение, диета, потребление алкоголя и многие другие факторы, большинство здоровых людей имеют схожий видовой

состав кишечных бактерий [59]. Симбиотическая микрофлора играет ключевую роль в поддержании гомеостаза организма, влияя на процессы, связанные с перевариванием и всасыванием нутриентов, синтезом и биотрансформацией питательных веществ, подавлением колонизации патогенами, моторикой кишечника, развитием и активацией иммунной системы. Механизмы, лежащие в основе защитного действия микробиоты на кишечный барьер, включают в себя стимуляцию обновления эпителиальных клеток, повышение секреции слизи и антимикробных пептидов, изменение структуры белков ПК, выработку короткоцепочечных жирных кислот и бактерицидных веществ [60].

В последние несколько лет изучение состава и функций микробиоты кишечника получили значительное распространение при широком круге заболеваний, причем не только кишечных, но и системных [61]. 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, высокоинформативные технологии MALDI-TOF масс-спектрометрии и секвенирования с биоинформационным анализом. Наиболее часто используемым в настоящее время подходом для идентификации и классификации видов бактерий является ПЦР-амплификация и дальнейшее секвенирование области (или нескольких) гена 16S рибосомальной РНК (16S рРНК) [62]. 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 исследования основных механизмов, с помощью которых микробиом человека влияет на здоровье и развитие заболеваний [63].

Дисбактериоз при ХБП

Кроме нарушения целостности слизисто-эпителиального барьера, почечная недостаточность также приводит к специфическим качественным и количественным изменениям кишечной микробиоты. Одни из первых работ в этом направлении показали, что у пациентов с ХБП наблюдается чрезмерная колонизация двенадцатиперстной и тощей кишки аэробными ($\sim 10^6$ клеток/мл) и анаэробными ($\sim 10^7$ клеток/мл) бактериями в сравнении со здоровыми лицами [64]. Большинство последующих исследований также было сосредоточено на изучении популяции больных с терминальной стадией почечной недостаточности. N. Vaziri и соавт. (2013) продемонстрировали значительные различия в обилии 190 микробных операционных таксономических единиц, принадлежащих к 23 семействам бактерий, у диализных больных и здоровых добровольцев. Содержание *Lactobacillaceae* и *Prevotellaceae* у лиц с ХБП значительно снижалось, а количество энтеробактерий и анаэробных видов энтерококков было увеличено в 100 раз [65]. J. Wong и соавт. (2014) выявили у этой категории пациентов значительное расширение семейств бактерий, обладающих уреазой, уриказой, ферментами, образующими уремиические токсины индол и р-крезол, а также сокращение семейств бактерий, синтезирующих бутират [66]. Среди бактерий, доминирующих у больных с терминальной стадией ХБП, также можно выделить индол-продуцирующую *Alistipes shahii* [67]; главный продуцент р-крезола – *Clostridium difficile* [68]; *Eggerthella lenta* [69], разлагающую полифенолы до предшественников гиппуровой кислоты (бензойной или 4-гидроксibenзойной кислот), а также *Fusobacterium nucleatum*, участвующую в образовании индола и фенола [70]. Z. Ren и соавт. (2020) проанализировали микробиоту кишечника у людей на различных додиализных стадиях ХБП и обнаружили, что обилие *Thalassospira*, *Akkermansia* и *Ruminococcaceae incertae sedis* увеличивается по

мере снижения СКФ. Более того, повышенное содержание *Akkermansia* положительно коррелировало с уровнями мочевины и креатинина [71]. Полученные результаты позволяют предположить, что именно эти бактерии тесно связаны с выработкой уремиических токсинов и могут иметь важное физиологическое значение для возникновения и прогрессирования ХБП. Следует подчеркнуть, что большинство работ в этом направлении являлись ретроспективными и были проведены на небольших выборках пациентов с различной этиологией ХБП, что, возможно, является одной из главных причин неоднородности полученных результатов. В одном из немногочисленных систематических обзоров J. Zhao и соавт. (2021) проанализировали данные 25 исследований, в которых приняли участие в общей сложности 1436 пациентов с ХБП и 918 здоровых лиц. Было показано, что для больных с додиализными стадиями почечной недостаточности характерно обилие *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Escherichia_Shigella*, *Desulfovibrio* и *Streptococcus*, а также пониженное содержание *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Pyramidobacter*, *Prevotellaceae_UCG-001* и *Prevotella_9*. Вместе с тем, у лиц на заместительной терапии функции почек содержание *Proteobacteria*, *Streptococcus* и *Fusobacterium* также было повышено, в то время как количество *Prevotella*, *Coprococcus*, *Megamonas* и *Faecalibacterium* снижалось. Изменения состава микробиоты у этих больных сопровождалось более высокими концентрациями триметиламин-N-оксида, р-крезил сульфата и более низким содержанием короткоцепочечных жирных кислот [72]. Дальнейшие исследования с использованием современных диагностических методов в различных популяциях больных с ХБП должны расширить наше понимание об особенностях их кишечной микробиоты, что может помочь расшифровать основные патогенетические механизмы взаимодействия кишечника и почек.

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 желудочно-кишечном тракте, 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 соответствует определенный pH, 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 [73].

На сегодняшний день одним из основных препятствий для более широкого использования методов компьютерного моделирования является отсутствие достаточно большой базы данных с точной информацией. 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 (например, роль белков-переносчиков, наличие слизи, моторики и др.) [74]. Возможно, именно поэтому в доступной литературе отсутствует информация о применении данного подхода у больных с тяжелыми нарушениями функции почек.

Другие перспективные методы оценки кишечной проницаемости

Новые технологии, такие как конфокальная лазерная эндомикроскопия, предоставляют многообещающие возможности для оценки эпителиальной оболочки кишечника *in vivo*. После внутривенного введения флуоресцеина, используемого в качестве контрастного агента, увеличение межворсинчатых пространств, выпадение клеток, дефекты проницаемости сосудов, разрывы эпителия и утечка флуоресцеина в просвет кишечника могут быть визуализированы с помощью конфокального зонда, оснащенного лазером. Нарушения целостности кишечного барьера, обнаруженные с помощью этого метода, могут предсказывать рецидивы у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника в стадии клинико-эндоскопической ремиссии [75]. 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* [76].

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 [19]. 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 [77]. К. Nakagawa и соавт. (2020) 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* [78]. Данных о применении вышеописанных методов у больных с ХБП в доступной литературе нами не найдено. Между тем, учитывая высокую распространенность гастроинтестинальных симптомов, они могли бы предоставить ценную информацию о структурно-функциональных особенностях кишечного барьера у этой категории больных.

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 [79]. Ведутся исследования в области создания гуманизированных животных моделей, в геном которых интегрированы определенные человеческие гены. Данный метод может обеспечить альтернативный подход к пониманию физиологической функции кишки, а также возможность смоделировать варианты реагирования на различные патологические стимулы, в том числе характерные для почечной недостаточности [80].

Заключение

На сегодняшний день существуют различные инструменты и методы оценки барьерных свойств и проницаемости кишечника, которые характеризуют состояние отдельных компонентов этой сложной системы. 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 конфокальной лазерной эндомикроскопии функциональными показателями импедансной спектроскопии, морфологическим анализом биоптатов слизистой кишки или демонстрацией наличия бактериальной ДНК в крови методом ПЦР является, на наш взгляд, наиболее информативным и всеобъемлющим подходом для больных с тяжелым нарушением функции почек. 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 кишечного барьера у больных с ХБП.

Литература | References

- Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2013;3:1–150.
- Jager K., Kovesdy C., Langham R. et al. A single number for advocacy and communication-worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. *Nephrology, dialysis, transplantation.* 2019;34(11):1803–1805. doi: 10.1093/ndt/gfz174.
- GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 2020;395(10225):709–733. doi: 10.1016/S0140–6736(20)30045–3.
- Xie Y., Bowe B., Mokdad A. H. et al. Analysis of the Global Burden of Disease study highlights the global, regional, and national trends of chronic kidney disease epidemiology from 1990 to 2016. *Kidney international.* 2018;94(3):567–581. doi: 10.1016/j.kint.2018.04.011.
- Clinical recommendations. Chronic kidney disease (CKD). *Nephrology (Saint-Petersburg).* 2021;25(5):10–82. (In Russ.)
Клинические рекомендации. Хроническая болезнь почек (ХБП). *Нефрология.* 2021;25(5):10–82.
- Thomas R., Kanso A., Sedor J. Chronic kidney disease and its complications. *Prim Care.* 2008;35(2):329–vii. doi: 10.1016/j.pop.2008.01.008.
- Vaziri N., Zhao Y., Pahl M. Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms, consequences and potential treatment. *Nephrology, dialysis, transplantation.* 2016;31(5):737–746. doi: 10.1093/ndt/gfv095.
- Thoo L., Noti M., Krebs P. Keep calm: the intestinal barrier at the interface of peace and war. *Cell Death Dis.* 2019;10(11):849. doi: 10.1038/s41419–019–2086-z.
- Yang S., Yu M. Role of Goblet Cells in Intestinal Barrier and Mucosal Immunity. *J Inflamm Res.* 2021;14:3171–3183. doi: 10.2147/JIR.S318327.
- Okumura R., Takeda K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp Mol Med.* 2017;49(5): e338. doi: 10.1038/emm.2017.20.
- Markov A., Aschenbach J., Amasheh S. The epithelial barrier and beyond: claudins as amplifiers of physiological organ functions. *IUBMB Life.* 2017;69(5):290–296. doi: 10.1002/iub.1622.
- Groschwitz K., Hogan S. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(1):3–22. doi: 10.1016/j.jaci.2009.05.038.
- Sakhon O., Ross B., Gusti V. et al. M cell-derived vesicles suggest a unique pathway for trans-epithelial antigen delivery. *Tissue Barriers.* 2015;3(1–2): e1004975. doi: 10.1080/21688370.2015.1004975.
- Takiishi T., Fenero C., Câmara N. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers.* 2017;5(4): e1373208. doi: 10.1080/21688370.2017.1373208.
- Bischoff S., Barbara G., Buurman W. et al. Intestinal permeability—a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* 2014;14:189. doi: 10.1186/s12876–014–0189–7.
- Hollander D., Kaunitz J. The “Leaky Gut”: Tight Junctions but Loose Associations? *Dig Dis Sci.* 2020;65(5):1277–1287. doi: 10.1007/s10620–019–05777–2.
- Garcia-Hernandez V., Quiros M., Nusrat A. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1397(1):66–79. doi: 10.1111/nyas.13360.
- Fihn B., Sjöqvist A., Jodal M. Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: effects

- of glucose transport. *Gastroenterology*. 2000;119(4):1029–1036. doi: 10.1053/gast.2000.18148.
19. Markov A., Veshnyakova A., Fromm M. et al. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J Comp Physiol B*. 2010;180(4):591–598. doi: 10.1007/s00360-009-0440-7.
 20. Camilleri M. Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. *Gut*. 2019;68(8):1516–1526. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318427.
 21. Simanenkov V., Maev I., Tkacheva O. et al. Syndrome of increased epithelial permeability in clinical practice. Multidisciplinary National Consensus. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(1):2758. doi: 10.15829/1728-8800-2021-2758.
 22. Grootjans J., Thuijls G., Verdam F. et al. Non-invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut. *World J Gastrointest Surg*. 2010;2(3):61–69. doi: 10.4240/wjgs.v2.i3.61.
 23. Boirivant M., Amendola A., Butera A. et al. A transient breach in the epithelial barrier leads to regulatory T-cell generation and resistance to experimental colitis. *Gastroenterology*. 2008;135(5):1612–1623.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2008.07.028.
 24. Galipeau H., Verdu E. The complex task of measuring intestinal permeability in basic and clinical science. *Neurogastroenterol Motil*. 2016;28(7):957–965. doi: 10.1111/nmo.12871.
 25. Pyatchenkov M., Markov A., Rumyantsev A. Structural and functional intestinal barrier abnormalities and chronic kidney disease. Literature review. Part I. *Nephrology (Saint-Petersburg)*. 2022;26(1):10–26. (In Russ.) doi: 10.36485/1561-6274-2022-26-1-10-26
Пятченков М., Марков А., Румянцев А. Структурно-функциональные нарушения кишечного барьера и хроническая болезнь почек. Обзор литературы. Часть I. *Нефрология* 2022;26(1):10–26. doi: 10.36485/1561-6274-2022-26-1-10-26.
 26. Ussing H., Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand*. 1951;23(2–3):110–127. doi: 10.1111/j.1748-1716.1951.tb00800.x.
 27. Skou J. Nobel Lecture. The identification of the sodium pump. *Bio sci Rep*. 1998;18(4):155–169. doi: 10.1023/a:1020196612909.
 28. Riordan J., Rommens J., Kerem B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245(4922):1066–1073. doi: 10.1126/science.2475911.
 29. Thomson A., Smart K., Somerville M. et al. The Using chamber system for measuring intestinal permeability in health and disease. *BMC Gastroenterol*. 2019;19(1):98. doi: 10.1186/s12876-019-1002-4.
 30. Balimane P., Chong S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discov Today*. 2005;10(5):335–343. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03354-9.
 31. Schoultz I., Keita A. The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells*. 2020;9(8):1909. doi: 10.3390/cells9081909.
 32. Lozoya-Agullo I., Araújo F., González-Álvarez I. et al. Usefulness of Caco-2/HT29-MTX and Caco-2/HT29-MTX/Raji B Coculture Models To Predict Intestinal and Colonic Permeability Compared to Caco-2 Monoculture. *Mol Pharm*. 2017;14(4):1264–1270. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b01165.
 33. Nakamura T. Recent progress in organoid culture to model intestinal epithelial barrier functions. *Int Immunol*. 2019;31(1):13–21. doi: 10.1093/intimm/dxy065.
 34. Stappaerts J., Brouwers J., Annaert P., Augustijns P. In situ perfusion in rodents to explore intestinal drug absorption: challenges and opportunities. *Int J Pharm*. 2015;478(2):665–681. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.11.035.
 35. Farquhar M., Palade G. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*. 1963;17(2):375–412. doi: 10.1083/jcb.17.2.375.
 36. Herrmann J., Turner J. Beyond Ussing's chambers: contemporary thoughts on integration of transepithelial transport. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016;310(6):C423–C431. doi: 10.1152/ajpcell.00348.2015.
 37. Furuse M., Fujita K., Hiiragi T. et al. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*. 1998;141(7):1539–1550. doi: 10.1083/jcb.141.7.1539.
 38. Wang W., Uzzau S., Goldblum S., Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci*. 2000;113 Pt 24:4435–4440. doi: 10.1242/jcs.113.24.4435.
 39. Goldstein D., Horowitz R., Petit S. et al. The duodenal mucosa in patients with renal failure: response to 1,25(OH)2D3. *Kidney Int*. 1981;19(2):324–331. doi: 10.1038/ki.1981.23.
 40. Vaziri N., Dure-Smith B., Miller R., Mirahmadi M. Pathology of gastrointestinal tract in chronic hemodialysis patients: an autopsy study of 78 cases. *Am J Gastroenterol*. 1985;80(8):608–611.
 41. Magnusson M., Magnusson K., Sundqvist T., Denneberg T. Increased intestinal permeability to differently sized polyethylene glycols in uremic rats: effects of low- and high-protein diets. *Nephron*. 1990;56(3):306–311. doi: 10.1159/000186158.
 42. Magnusson M., Magnusson K., Sundqvist T., Denneberg T. Impaired intestinal barrier function measured by differently sized polyethylene glycols in patients with chronic renal failure. *Gut*. 1991;32(7):754–759. doi: 10.1136/gut.32.7.754.
 43. Vaziri N., Yuan J., Rahimi A. et al. Subramanian VS. Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(7):2686–2693. doi: 10.1093/ndt/gfr624.
 44. Vaziri N., Yuan J., Nazertehrani S. et al. Chronic kidney disease causes disruption of gastric and small intestinal epithelial tight junction. *Am J Nephrol*. 2013;38(2):99–103. doi: 10.1159/000353764.
 45. Gonzalez A., Krieg R., Massey H. et al. Sodium butyrate ameliorates insulin resistance and renal failure in CKD rats by modulating intestinal permeability and mucin expression. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(5):783–794. doi: 10.1093/ndt/gfy238.
 46. Vaziri N., Goshtasbi N., Yuan J. et al. Uremic plasma impairs barrier function and depletes the tight junction protein constituents of intestinal epithelium. *Am J Nephrol*. 2012;36(5):438–443. doi: 10.1159/000343886.
 47. Vaziri N., Yuan J., Norris K. Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2013;37(1):1–6. doi: 10.1159/000345969.
 48. Fordtran J., Rector F., Locklear T., Ewton M. Water and solute movement in the small intestine of patients with sprue. *J Clin Invest*. 1967;46:287–298.

49. Menzies I. Absorption of intact oligosaccharide in health and disease. *Biochem Soc Trans.* 1974;2:1040–1046.
50. van Nieuwenhoven M., de Swart E., van Eijk H. et al. Effects of pre- and post-absorptive factors on the lactulose/rhamnose gut permeability test. *Clin Sci (Lond).* 2000;98(3):349–353. doi: 10.1042/cs19990274.
51. Hallemeesch M., Lamers W., Soeters P., Deutz N. Increased lactulose/rhamnose ratio during fluid load is caused by increased urinary lactulose excretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;278(1):G83–88. doi: 10.1152/ajpgi.2000.278.1.G83.
52. Wong J., Lenaerts K., Meesters D. et al. Acute haemodynamic changes during haemodialysis do not exacerbate gut hyperpermeability. *Biosci Rep.* 2019;39(4):BSR20181704. doi: 10.1042/BSR20181704.
53. Terpstra M., Singh R., Geerlings S., Bemelman F. Measurement of the intestinal permeability in chronic kidney disease. *World J Nephrol.* 2016;5(4):378–388. doi: 10.5527/wjn.v5.i4.378.
54. Shi K., Wang F., Jiang H. et al. Gut bacterial translocation may aggravate microinflammation in hemodialysis patients. *Dig Dis Sci.* 2014;59(9):2109–2117. doi: 10.1007/s10620-014-3202-7.
55. Bossola M., Sanguinetti M., Scribano D. et al. Circulating bacterial-derived DNA fragments and markers of inflammation in chronic hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(2):379–385. doi: 10.2215/CJN.03490708.
56. Kim S., Song I. The clinical impact of gut microbiota in chronic kidney disease. *Korean J Intern Med.* 2020;35(6):1305–1316. doi: 10.3904/kjim.2020.411.
57. Peck B., Sincavage J., Feinstein S. et al. miR-30 Family Controls Proliferation and Differentiation of Intestinal Epithelial Cell Models by Directing a Broad Gene Expression Program That Includes SOX9 and the Ubiquitin Ligase Pathway. *J Biol Chem.* 2016;291(31):15975–15984. doi: 10.1074/jbc.M116.733733.
58. Sender R., Fuchs S., Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016;14(8):e1002533. doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
59. Qin J., Li R., Raes J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59–65. doi: 10.1038/nature08821.
60. Ashida H., Ogawa M., Kim M. et al. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nat Chem Biol.* 2011;8(1):36–45. doi: 10.1038/nchembio.741.
61. Laudes M., Geisler C., Rohmann N. et al. Microbiota in Health and Disease-Potential Clinical Applications. *Nutrients.* 2021;13(11):3866. doi: 10.3390/nu13113866.
62. Knight R., Vrbanac A., Taylor B. et al. Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(7):410–422. doi: 10.1038/s41579-018-0029-9.
63. Daliri E., Ofosu F., Chelliah R. et al. Challenges and Perspective in Integrated Multi-Omics in Gut Microbiota Studies. *Biomolecules.* 2021;11(2):300. doi: 10.3390/biom11020300.
64. Simenhoff M., Dunn S., Zollner G. et al. Biomodulation of the toxic and nutritional effects of small bowel bacterial overgrowth in end-stage kidney disease using freeze-dried *Lactobacillus acidophilus*. *Miner Electrolyte Metab.* 1996;22(1-3):92–96.
65. Vaziri N., Wong J., Pahl M. et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int.* 2013;83(2):308–315. doi: 10.1038/ki.2012.345.
66. Wong J., Piceno Y., DeSantis T. et al. Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD. *Am J Nephrol.* 2014;39(3):230–237. doi: 10.1159/000360010.
67. Hugon P., Ramasamy D., Lagier J. et al. Non contiguous-finished genome sequence and description of *Alistipesobesi* sp. nov. *Stand Genomic Sci.* 2013;7(3):427–439. doi: 10.4056/signs.3336746.
68. Dawson L., Stabler R., Wren B. Assessing the role of p-cresol tolerance in *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol.* 2008;57(Pt 6):745–749. doi: 10.1099/jmm.0.47744-0.
69. Wang X., Yang S., Li S. et al. Aberrant gut microbiota alters host metabolome and impacts renal failure in humans and rodents. *Gut.* 2020;69(12):2131–2142. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319766.
70. Moco S., Martin F., Rezzi S. Metabolomics view on gut microbiome modulation by polyphenol-rich foods. *J Proteome Res.* 2012;11(10):4781–4790. doi: 10.1021/pr300581s.
71. Ren Z., Fan Y., Li A. et al. Alterations of the Human Gut Microbiome in Chronic Kidney Disease. *Adv Sci (Weinh).* 2020;7(20):2001936. doi: 10.1002/adv.202001936.
72. Zhao J., Ning X., Liu B. et al. Specific alterations in gut microbiota in patients with chronic kidney disease: an updated systematic review. *Ren Fail.* 2021;43(1):102–112. doi: 10.1080/0886022X.2020.1864404.
73. Shohin I., Ramenskaya G. Methods of forecasting of the intestinal permeability of medicinal substances with the use of computer simulation. *Journal Biomed.* 2011;1(2):35–40. (in Russ.).
Шохин И. Е. Раменская Г. В. Методы прогнозирования кишечной проницаемости лекарственных веществ с применением компьютерного моделирования. *Биомедицина.* 2011;1(2):35–40.
74. Balimane P., Chong S., Morrison R. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000;44(1):301–312. doi: 10.1016/s1056-8719(00)00113-1.
75. Buda A., Hatem G., Neumann H. et al. Confocal laser endomicroscopy for prediction of disease relapse in ulcerative colitis: a pilot study. *J Crohns Colitis.* 2014;8(4):304–311. doi: 10.1016/j.crohns.2013.09.005.
76. Mutha P., Fasullo M., Chu S. et al. Correlation of Probe-Based Confocal Laser Endomicroscopy (pCLE) and Mucosal Integrity Testing (MIT) with Epithelial Barrier Function and Presence of Gastroesophageal Reflux Disease (GERD). *Dig Dis Sci.* 2021. doi: 10.1007/s10620-021-06980-w.
77. Patel D., Higginbotham T., Slaughter J. et al. Development and Validation of a Mucosal Impedance Contour Analysis System to Distinguish Esophageal Disorders. *Gastroenterology.* 2019;156(6):1617–1626. doi: 10.1053/j.gastro.2019.01.253.
78. Nakagawa K., Hara K., Fikree A. et al. Patients with dyspepsia have impaired mucosal integrity both in the duodenum and jejunum: in vivo assessment of small bowel mucosal integrity using baseline impedance. *J Gastroenterol.* 2020;55(3):273–280. doi: 10.1007/s00535-019-01614-5.
79. Snouwaert J., Brigman K., Latour A. et al. An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science.* 1992;257(5073):1083–1088. doi: 10.1126/science.257.5073.1083.
80. Zhou L., Dey C., Wert S. et al. Correction of a lethal intestinal defect in a mouse model of cystic fibrosis by human CFTR. *Science.* 1994;266(5191):1705–1708. doi: 10.1126/science.7527588.