

## БАРЬЕРНЫЕ СВОЙСТВА ЭПИТЕЛИЯ КИШКИ В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ НЕФРОПАТИИ

© 2025 г. А. А. Федорова<sup>1</sup>, М. О. Пятченков<sup>2</sup>, Е. А. Дмитриева<sup>1</sup>,  
Е. А. Калашников<sup>3</sup>, Г. Т. Иванова<sup>3</sup>, А. Г. Марков<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: a.markov@spbu.ru

Поступила в редакцию 04.07.2025 г.

После доработки 06.08.2025 г.

Принята к публикации 06.08.2025 г.

В работе исследовано влияние 5/6 нефрэктомии на барьерные свойства тощей и толстой кишки крыс в длительном послеоперационном периоде (два, четыре и шесть месяцев). Показано, что у животных с дисфункцией почки развивалась прогрессирующая азотемия, гипернатриемия и гиперкалиемия, увеличивались уровни уремических токсинов (триметиламин и триметиламин-N-оксид) и артериальное давление. Через два месяца после нефрэктомии в тощей кишке наблюдалось снижение тока “короткого замыкания” и повышение парацеллюлярной проницаемости для флуоресцеина натрия, однако трансэпителиальное сопротивление (ТЭС) не изменялось. В толстой кишке на этом сроке отмечалось повышение ТЭС и проницаемости при снижении тока “короткого замыкания”. На четвертом месяце у тощей кишки сохранялись морфологические изменения ворсинок и крипт, но барьерная функция стабилизировалась за счет компенсаторного повышения уровня окклюдина и снижения клаудина-1. В толстой кишке сохранялась повышенная проницаемость без значимых изменений в уровне изученных белков плотных контактов. Через шесть месяцев после нефрэктомии различия в проницаемости и содержании белков плотных контактов по сравнению с контролем нивелировались, хотя морфологические нарушения эпителия сохранялись. Результаты проведенного исследования показывают способность кишечного эпителия восстанавливать свойства кишечного барьера после проведенной нефрэктомии.

*Ключевые слова:* почка, нефрэктомия, кишка, кишечный барьер, плотные контакты, клаудины

**DOI:** 10.7868/S2658655X25110101

### ВВЕДЕНИЕ

Многие висцеральные органы находятся между собой в функциональном взаимодействии, которое может реализовываться двумя основными способами. К первому относится выделение в кровь физиологически активных веществ, содружественно

изменяющих функции одного или нескольких органов. Так, например, специализированные клетки кишечника и атипичные кардиомиоциты секретируют в кровь глюкагон-подобный пептид 1 и натрийуретический гормон соответственно, оказывающие влияние на функции почки [1, 2]. К другому варианту взаимовлияния можно отнести поступление в кровь при деятельности какого-либо органа различных продуктов метаболизма или токсинов, которые могут вызывать дисфункцию других висцеральных органов.

Почка является гомеостатическим органом, который участвует в регуляции водного и электролитного баланса, кислотно-щелочного равновесия, артериального давления, а также в выведении продуктов обмена и лекарственных препаратов [3]. Нарушение работы почек приводит к значимым изменениям в ионном составе, задержке метаболитов в плазме крови, изменениям в системной гемодинамике и возникновению уремии. Так, при уремии, вызванной хронической почечной недостаточностью, в плазме крови накапливается большое количество продуктов метаболизма, таких как мочевина, мочевая кислота, аммиак и другие токсичные соединения. Накопленные в крови вещества разносятся по всему организму и могут оказывать влияние, в том числе повреждающее, на другие органы, вызывая местное и впоследствии системное воспаление [4–6].

В этом плане интерес представляет изменение функций кишечного барьера кишки при нарушении функций почек. Это обусловлено тем, что эпителиальные клетки кишки имеют рецепторы и переносчики для метаболитов и токсинов, образующихся в почке [7–9]. Следовательно, нормальное функционирование кишечника может быть нарушено при нарушении метаболического профиля плазмы крови или при повышении уровня уремических токсинов. Кроме прямого влияния на функции кишечного эпителия, существуют процессы, усиливающие патофизиологическое звено взаимодействия почки и кишки через включение в этот процесс микробиоты кишки. В полость кишки из плазмы крови при помощи специализированных белков-транспортеров эпителия переносится мочевина, которая является источником азота для микрофлоры кишки [10]. При хронической почечной недостаточности, вызывающей повышение мочевины в плазме крови, наблюдается одновременно увеличение этого соединения в кишке. В просвете кишки мочевина гидролизуется микробной уреазой с образованием аммиака, что приводит к изменению pH и росту патогенной микрофлоры [6]. В свою очередь, увеличение патогенных микроорганизмов ведет к увеличению уровня уремических токсинов, которые, проникая через стенку кишечника, попадают в кровоток, способствуя возникновению оксидативного стресса и воспаления в самой почке [4, 5]. Выяснение конкретных физиологических и молекулярных механизмов влияния дисфункции почек на проницаемость кишечного барьера остается актуальной задачей физиологии висцеральных систем.

Осуществление барьерных функций и избирательного транспорта в тканях и органах относится к жизненно необходимым процессам, обеспечивающим нормальное функционирование организма. Ключевым комплексом, регулирующим межклеточную проницаемость для ионов, воды и органических соединений, и играющим основную роль в поддержании барьерных функций тканей, является комплекс белков плотных контактов. Основными молекулярными компонентами плотных контактов являются интегральные белки плазматической мембраны – белки семейства клаудина, обеспечивающие селективный транспорт ионов и воды, а также белки семейства MARVEL – трицеллюлин и окклюдин, которые обеспечивают парацеллюлярный транспорт макромолекул [11]. Клаудины, в свою очередь, разделяют на две большие группы в соответствии с их свойствами – снижающие (клаудин-1, -3, -4, -5, -6 и т.д.) и увеличивающие (клаудин-2 и -15) межклеточную проницаемость [12]. Разнообразные сочетания этих белков и изменение их уровней определяют барьерные свойства тканей органов, а также их функции [13]. Изучение молекулярных аспектов,

лежащих в основе барьерных свойств тканей, в частности эпителия кишки, является приоритетной задачей клеточной физиологии.

Валидной моделью для изучения влияния хронической почечной недостаточности на функцию эпителиального барьера кишки является метод 5/6 нефрэктомии у животных [9]. При его использовании снижается функциональная способность почек поддерживать гомеостаз внутренней среды организма, что выражается, в частности, в повышении мочевины в плазме крови [5]. Накопление мочевины в просвете кишки вызывает воспаление, которое приводит к изменению в содержании белков плотных контактов и впоследствии к увеличению проницаемости кишки [4]. На сегодняшний день известно, что через два месяца после нефрэктомии происходят изменения в содержании белков плотных контактов, а также проницаемости тонкой и толстой кишки [14, 15]. Возможно, увеличение продолжительности времени после нефрэктомии приведет к дальнейшему ухудшению тканевого барьера кишки. Однако отсутствуют данные о влиянии нефрэктомии на барьерные свойства кишки через длительные послеоперационные периоды. Этот подход имеет еще один важный аспект – изучение этой научной проблемы может помочь определить критический временной интервал, в течение которого развивается дисфункция кишки. Ответ на этот вопрос позволит прогнозировать необходимые профилактические или лечебные мероприятия у людей с развивающейся дисфункцией почки. Таким образом, цель данной работы состояла в изучении влияния 5/6 нефрэктомии и развития почечной дисфункции на барьерные свойства тощей и толстой кишки крысы через два, четыре и шесть месяцев после ее проведения.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Экспериментальные животные и схема эксперимента.* В экспериментах использовали самцов крыс Вистар массой 180–200 г ( $N = 40$  (здесь и далее  $N$  – количество животных,  $n$  – количество измерений)) (ЦКП “Биоколлекция” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН). Животных содержали в клетках по четыре особи при фиксированной температуре и стандартном освещении (12 ч свет : 12 ч темнота). Животные получали стандартный рацион питания и воду *ad libitum*.

*Дизайн эксперимента.* Для моделирования хронической нефропатии использовали двухмесячных крыс Вистар массой тела 180–200 г ( $N = 34$ ). Чтобы индуцировать хроническую почечную недостаточность, у крыс под общей анестезией (Золетил-100 (Virbac, Франция)) путем хирургического вмешательства удалили 5/6 объема почечной массы. Нефрэктомию проводили в два этапа по стандартной методике (5). Сначала удаляли 2/3 объема левой почки, а через неделю полностью удалялась правая почка. В качестве контроля использовали группу животных, которым проводили ложную операцию без иссечения почек. Перед операцией крыс осматривали, взвешивали, измеряли артериальное давление (АД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС). Для измерения АД и ЧСС крыс помещали в специальную камеру, фиксировали на специальном держателе, подключали к хвосту крысы датчик тонометра и манжетный электроманометр ELEMA (Швеция). Животным после каждого этапа нефрэктомии вводили Ветбидин-3 в дозе 15000 ЕД на кг массы тела животного. После операции крысы находились в помещении, в специальных клетках под наблюдением до выхода из наркоза. Животным вводили 5 мл физиологического раствора для предотвращения обезвоживания. Операционный шов ежедневно обрабатывался дезинфицирующим раствором и осматривался. Швы снимались через неделю после операции. Наблюдение за животными было ежедневным в течение всего послеоперационного периода. Через два, четыре и шесть месяцев после операции крыс декапитировали и получали образцы тканей и крови для дальнейшего анализа.

*Биохимические методы.* Пробы крови собирали в вакуумные пробирки с активатором свертывания, отстаивали при комнатной температуре в течение двух часов, после чего центрифугировали при ускорении 500 RCF (Multi-Spin MSC-3000, Biosan, Латвия). Уровни креатинина, мочевины и электролитов в сыворотке крови определялись с помощью автоматического биохимического анализатора (Mindray BS-120, Mindray, Китай).

Определение уровня триметиламина (ТМА) и триметиламин-N-оксида (ТМАО) в сыворотке крови выполняли методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием системы Shimadzu-8060 в сочетании с жидкостным хроматографом “Shimadzu LC-30AD” (Shimadzu, Япония). Хроматографическое разделение проводили с использованием ВЕНILIC Waters Acquity UPLC (колонка размером 1.7 мкм, 2.1 × 100 мм), при температуре 600 °С и скорости потока 0.35 мл/мин.

*Электрофизиология.* Исследование барьерных функций ткани толстой и тощей кишки проводили в камере Уссинга, которая с обеих сторон заполнялась раствором Кребса–Рингера по 5 мл (состав в ммоль/л: 119 NaCl; 5 KCl; 1.2 MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O; 25 NaHCO<sub>3</sub>; 0.4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O; 1.6 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 1.2 CaCl<sub>2</sub>) и оксигенировали карбогеном (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Температура камеры составляла 38 °С. В камере Уссинга регистрировали ток “короткого замыкания” (ток КЗ) и трансэпителиальное сопротивление (ТЭС), отражающие интенсивность активного транспорта и барьерные свойства эпителия соответственно.

Образцы ткани для Вестерн-блоттинга были заморожены при –80 °С, а также зафиксированы в 10%-ном забуференном формалине для проведения световой микроскопии и иммуногистохимии.

*Световая микроскопия.* После отмытки от 10%-ного забуференного формалина образцы проводили через ряд спиртов возрастающей концентрации для обезвоживания и заключали в парафин по стандартной методике. Полученные с помощью микротомы Leica RM2265 (Leica, Германия) срезы толщиной 5 мкм монтировали на предметные стекла и окрашивали гематоксилин-эозином. Оценку гистологической структуры ткани проводили на инвертированном световом микроскопе фирмы Leica DMI 6000 (Leica, Германия). Морфометрический анализ изображений проводили с помощью программы ImageJ (NIH, США).

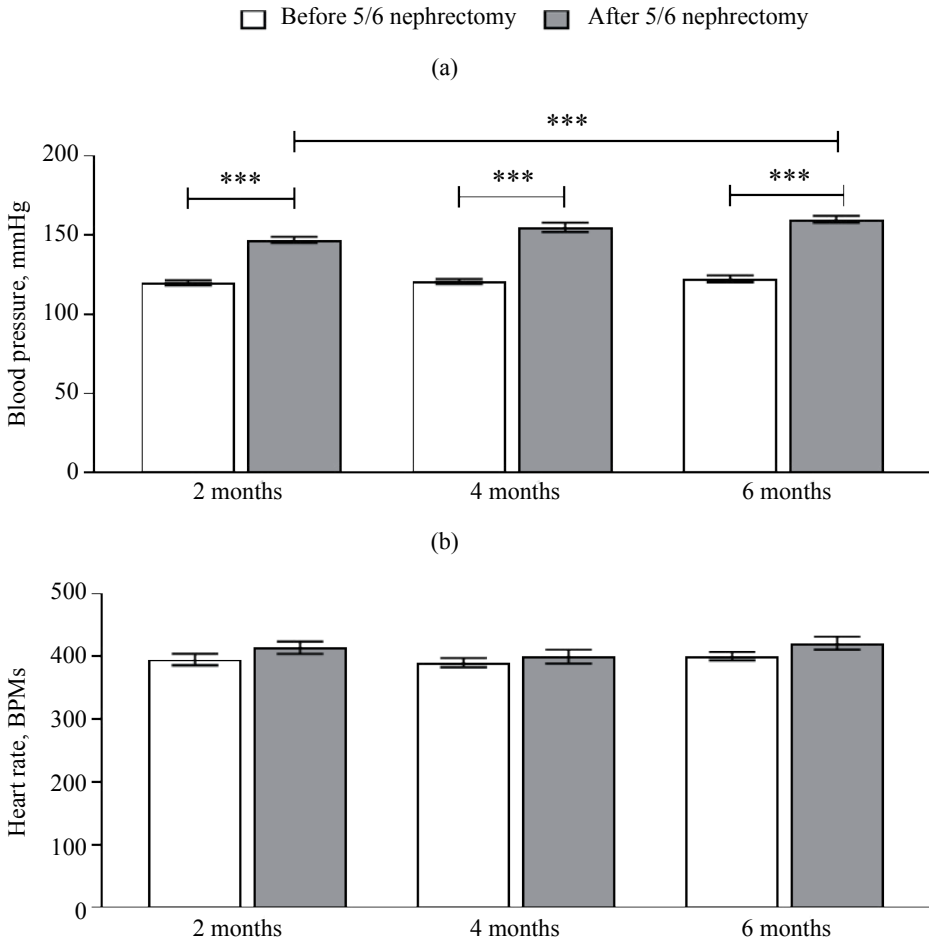
*Вестерн-блоттинг.* Анализ уровня белков плотных контактов тощей и толстой кишки крыс был проведен с использованием метода вестерн-блоттинга в модификации Stain-Free [16]. Электрофорез проводили в 10%-ном полиакриламидном геле. Электроперенос выполняли полусухим методом с использованием PVDF-мембраны. После блокировки в 5%-ном растворе обезжиренного сухого молока использовали кроличьи первичные антитела против клаудина-1 и -2, окклюдина и трицеллюлина (1 : 1000, Invitrogen, США); вторичные антитела козы антикроличьи, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 2000, Cell Signaling, США). Детекцию сигнала белков интереса выполняли с использованием ChemiDoc MP+ (Bio-Rad, США). Обработку результатов проводили в программе ImageLab 6.1 (Bio-Rad, США). Уровень клаудинов был нормализован на общий белок в том же образце. Уровень белков в контрольных группах принят за 100 %.

Данный этап работы был выполнен с использованием оборудования Ресурсного центра “Развитие молекулярных и клеточных технологий” СПбГУ.

*Статистическая обработка результатов исследований.* Оценку достоверности экспериментальных данных выполняли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (Two-way ANOVA) с апостериорным тестом Тьюки и U-критерия Манна–Уитни (для групп с ненормальным распределением) в программе GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad, США). Нормальность распределения проверяли с помощью теста Шапиро–Уилка. Уровень достоверности  $p < 0.05$  принимали как статистически значимый. Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка состояния крыс после нефрэктомии. Двухфакторный дисперсионный анализ был проведен для оценки влияния нефрэктомии через два, четыре, шесть месяцев на АД и ЧСС. Наблюдалось значительное влияние послеоперационного периода на АД на уровне  $p < 0.05$  для всех трех условий [ $F(2,24) = 4.030$ ,  $p = 0.0310$ ]. Сравнение с использованием апостериорного теста Тьюки показало, что у животных через два месяца после нефрэктомии АД увеличивалось с  $120 \pm 2$  ( $N = 7$ ) до  $147 \pm 2$  мм рт. ст. ( $N = 7$ ,  $p < 0.001$ ) (рис. 1а). Через четыре месяца после нефрэктомии АД увеличивалось со  $121 \pm 2$  ( $N = 6$ ) до  $155 \pm 3$  мм рт. ст. ( $N = 6$ ,  $p < 0.001$ ). Через шесть месяцев после нефрэктомии у опытных крыс АД выросло с  $123 \pm 2$  ( $N = 6$ ) до  $160 \pm 2$  мм рт. ст. ( $N = 6$ ,  $p < 0.001$ ) (рис. 1а). Одновременно с этим достоверных изменений ЧСС на всех этапах послеоперационного периода обнаружено не было (рис. 1б).



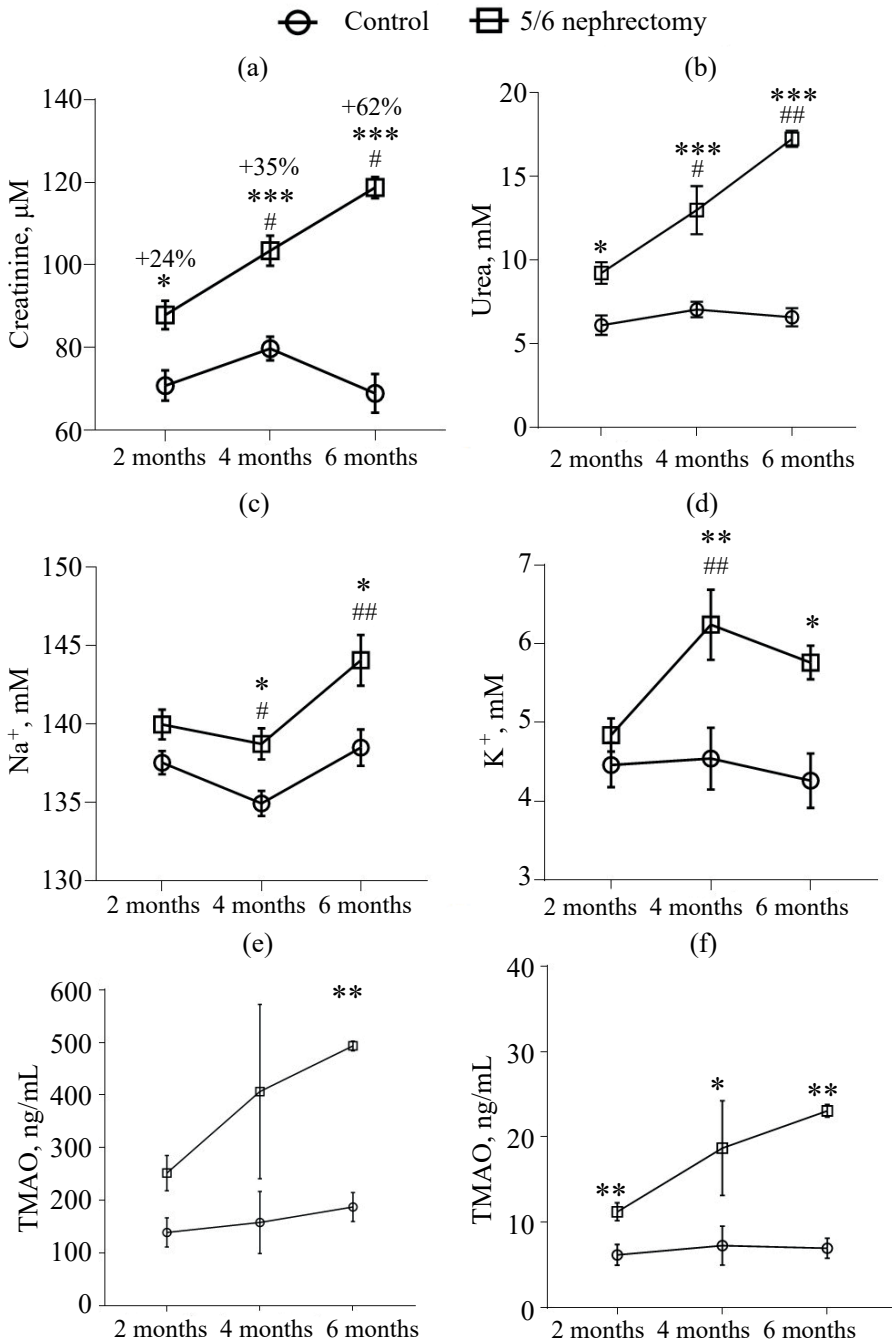
**Рис. 1.** Изменение артериального давления и частоты сердечных сокращений у крыс через два, четыре и шесть месяцев после 5/6 нефрэктомии. (а) – Артериальное давление крыс, (б) – частота сердечных сокращений. \*\*\* –  $p < 0.001$ . Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки. mmHg – мм рт. ст., BPMs – удары в минуту. Количество животных –  $N$  (см. текст).

*Изменение биохимических показателей и концентрации электролитов в сыворотке крови.* Для оценки изменений биохимических маркеров почечной дисфункции был проведен двухфакторный дисперсионный анализ. Наблюдалось значительное влияние постоперационного периода на биохимические маркеры почечной дисфункции для трех послеоперационных периодов креатинина [ $F(2,24) = 11.99, p = 0.0002$ ] (рис. 2а), мочевины [ $F(2,24) = 12.23, p = 0.0002$ ] (рис. 2б). Сравнение с использованием апостериорного теста Тьюки показало через два месяца после операции повышение уровня креатинина с  $70 \pm 4$  ( $N = 5$ ) в контрольной группе до  $88 \pm 3$  мкМ в опытной группе ( $N = 5, p < 0.05$ ), а мочевины – с  $6 \pm 0.5$  до  $9 \pm 0.6$  мМ ( $N = 5, p < 0.05$ ). Через четыре месяца после нефрэктомии креатинин увеличивался с  $79 \pm 3$  мкМ контрольной группы до  $103 \pm 4$  мкМ опытной группы ( $N = 5, p < 0.05$ ), мочевина с  $7 \pm 0.5$  мМ в контрольной группе до  $13 \pm 1$  мМ в опытной группе ( $N = 5, p < 0.05$ ). Через шесть месяцев уровень креатинина увеличился до  $118 \pm 3$  мкМ ( $N = 5, p < 0.05$ ), а мочевины – до  $17 \pm 0.5$  мМ ( $N = 5, p < 0.05$ ). В контрольной группе достоверных изменений ни креатинина, ни мочевины не было обнаружено.

Параллельно с нарастанием азотемии наблюдалось развитие электролитных нарушений. Двухфакторный дисперсионный анализ не выявил статистически значимого влияния временного периода после нефрэктомии на уровень натрия [ $F(2,24) = 1.052, p = 0.3649$ ] (рис. 2с) и калия [ $F(2,24) = 2.367, p = 0.1153$ ] (рис. 2д). Сравнение с использованием апостериорного теста Тьюки не показало достоверных изменений электролитного баланса через два месяца после нефрэктомии. Через четыре месяца данный тест показал достоверное повышение уровня натрия со  $134.9 \pm 0.8$  мМ в контроле до  $138.7 \pm 1$  в опытной группе ( $N = 5, p < 0.05$ ) и калия с  $4.5 \pm 0.4$  до  $6.2 \pm 0.4$  мМ ( $N = 5, p < 0.05$ ). Через шесть месяцев после нефрэктомии оставался повышенным в сравнении с контролем уровень как калия до  $5.7 \pm 0.2$  мМ ( $N = 5, p < 0.01$ ), так и натрия до  $144.7 \pm 1$  мМ ( $N = 5, p < 0.01$ ).

С использованием двухфакторного дисперсионного анализа также анализировали влияние послеоперационного периода на уровни ТМАО [ $F(2,19) = 1.051, p = 0.3690$ ] (рис. 2е) и ТМА [ $F(2,19) = 2.771, p = 0.0879$ ] (рис. 2ф). В опытной группе концентрация ТМАО через два месяца после операции составила  $251 \pm 33$  нг/мл, через четыре месяца –  $406 \pm 165$  нг/мл, а к шестому месяцу достигла  $493 \pm 9$  нг/мл, и при сравнении показателей второго и шестого месяцев с использованием апостериорного теста Тьюки выявлено достоверное повышение ( $N = 5, p < 0.01$ ). Аналогичная динамика наблюдалась у ТМА, концентрация которого в опытной группе при сравнении с использованием апостериорного теста Тьюки достоверно увеличилась с  $11 \pm 1$  нг/мл через два месяца до  $23 \pm 0.7$  нг/мл через шесть месяцев ( $N = 5, p < 0.01$ ). В контрольной группе уровень ТМАО и ТМА сохранялся стабильным.

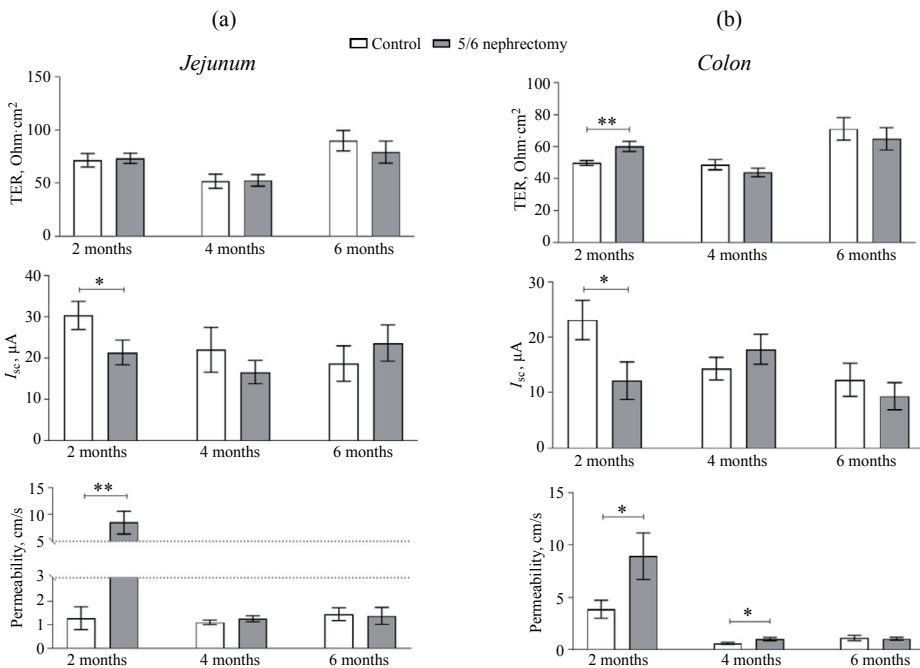
*Оценка барьерных функций тощей и толстой кишки.* Для оценки влияния 5/6 нефрэктомии на барьерные функции тощей и толстой кишки через два, четыре и шесть месяцев проводили двухфакторный дисперсионный анализ. В тощей кишке статистически значимого влияния временного периода на величину трансэпителиального сопротивления (ТЭС) не выявили (рис. 3а). При сравнении с использованием апостериорного теста Тьюки не обнаружили достоверных отличий между показателями опытной (количество сегментов ткани = 19) и контрольной группы (количество сегментов ткани = 20) ( $73 \pm 5$  Ом·см<sup>2</sup> vs.  $72 \pm 6$  Ом·см<sup>2</sup>). Также двухфакторный дисперсионный анализ показал отсутствие статистически значимого влияния временного периода на величину тока КЗ [ $F(2, 92) = 1.645, p = 0.1987$ ], однако сравнение с использованием апостериорного теста Тьюки выявило его достоверное снижение с  $30 \pm 3$  мкА в контроле до  $21 \pm 3$  мкА ( $p < 0.05$ ) в опытной группе. Одновременно с этим дисперсионный анализ показал значительное влияние послеоперационного периода на величину парацеллюлярной проницаемости для флуоресцеина натрия [ $F(2,62) = 16.20, p < 0.0001$ ]. Через два месяца при использовании апостериорного теста Тьюки показано достоверное



**Рис. 2.** Биохимические и электролитные показатели крови крыс в динамике развития нефропатии. Концентрации креатинина (а), мочевины (б), ионов  $\text{Na}$  (с), ионов  $\text{K}$  (д), ТМАО (е), ТМА (ф) через два, четыре и шесть месяцев после нефрэктомии. \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$  по сравнению с контролем, # –  $p < 0.05$ , ## –  $p < 0.01$  по сравнению с предыдущим послеоперационным периодом. Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки. ТМАО – триметиламин-N-оксид, ТМА – триметиламин. Количество животных –  $N$  (см. текст).

увеличение проницаемости ( $p < 0.01$ ). Через четыре и шесть месяцев после операции в тощей кишке не было выявлено значимых изменений ТЭС, тока КЗ и парацеллюлярной проницаемости в опытной группе (количество сегментов ткани = 17) по сравнению с контролем (количество сегментов ткани = 18).

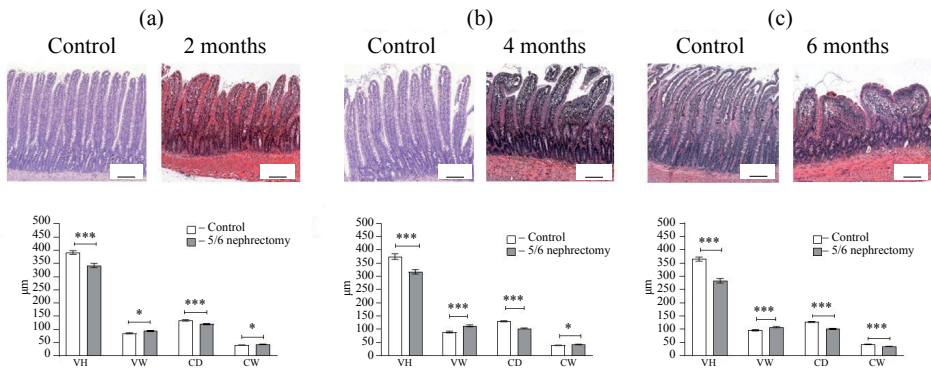
В толстой кишке двухфакторный дисперсионный анализ показал отсутствие достоверного влияния послеоперационного периода на величину ТЭС [ $F(2,93) = 2.387, p = 0.0975$ ] (рис. 3b) и значимое – на величину тока КЗ [ $F(2,94) = 3.132, p = 0.0482$ ]. Сравнение величин ТЭС с использованием апостериорного теста Тьюки через два месяца после операции выявило значимое увеличение с  $50 \pm 2 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$  (количество сегментов ткани = 17) в контрольной группе до  $60 \pm 3 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$  (количество сегментов ткани = 18,  $p < 0.01$ ) и одновременно с этим – снижение тока КЗ с  $23 \pm 4 \text{ мкА}$  в контроле до  $12 \pm 1 \text{ мкА}$  в опытной группе (количество сегментов ткани = 18,  $p < 0.05$ ). Через четыре месяца после нефрэктомии не было обнаружено изменения ТЭС и тока КЗ в опытной группе по сравнению с контролем. Применение двухфакторного дисперсионного анализа выявило значительное влияние на парацеллюлярную проницаемость [ $F(2,62) = 5.000, p = 0.0097$ ], апостериорный тест Тьюки показал достоверное увеличение через два месяца с  $3.9 \pm 0.9 \text{ см/с}$  в контрольной группе до  $9 \pm 2.3 \text{ см/с}$  в опытной ( $p < 0.05$ ). Через четыре месяца проницаемость возросла с  $0.6 \pm 0.1 \text{ см/с}$  в контроле до  $1 \pm 0.2 \text{ см/с}$  ( $p < 0.05$ ) в опыте. Через шесть месяцев после операции достоверных различий величины ТЭС, тока КЗ и парацеллюлярной проницаемости между контрольной (количество сегментов ткани = 17) и опытной (количество сегментов ткани = 18) группами обнаружено не было.



**Рис. 3.** Электрофизиологические характеристики (ТЭС и ток КЗ) и парацеллюлярная проницаемость для флуоресцина натрия тощей (а) и толстой (б) кишки через два, четыре и шесть месяцев после нефрэктомии. \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$  по сравнению с контролем. Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки. TER – трансэпителиальное сопротивление,  $I_{sc}$  – ток “короткого замыкания”. n – количество измерений (см. текст).



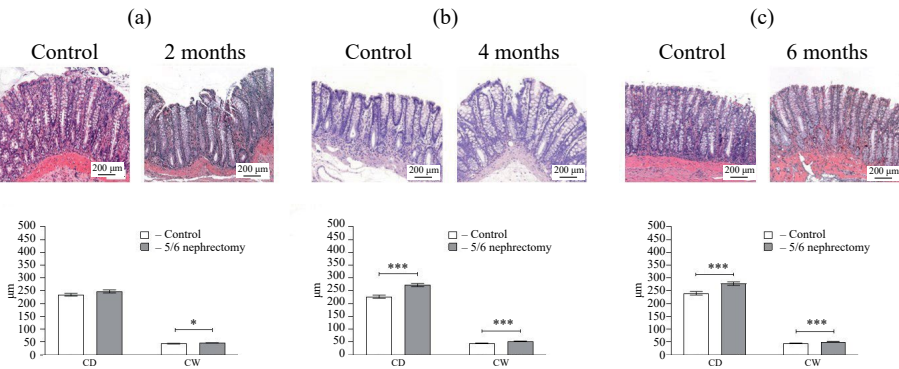
**Гистоморфометрические изменения.** На светооптическом уровне строение стенки тощей кишки крыс всех контрольных групп соответствовало нормальным параметрам – структурированные гистологические слои, сохранная целостность слизистой оболочки, четко идентифицируемые нормально распределенные ворсинки и крипты (соотношение длина ворсинки к глубине крипты 4 : 1), сохраненная популяция бокаловидных клеток, отсутствие признаков воспаления и фиброза. Гистологическое исследование выявило значительное влияние 5/6 нефрэктомии на морфологию тощей кишки крыс на каждом этапе эксперимента. Уже через два месяца наблюдения у опытных животных по сравнению с контролем обнаруживалось значимое уменьшение высоты ворсинок ( $342 \pm 7$  vs  $391 \pm 7$  мкм,  $n = 40$ ,  $p < 0.001$ , U-критерий Манна–Уитни) и глубины крипт ( $120 \pm 3$  vs  $135 \pm 3$  мкм,  $p < 0.001$ , U-критерий Манна–Уитни) с одновременным увеличением их толщины (для ворсинок:  $94 \pm 3$  vs  $86 \pm 2$  мкм,  $p < 0.05$ , U-критерий Манна–Уитни; для крипт:  $44 \pm 1$  vs  $41 \pm 1$  мкм,  $p < 0.05$ , U-критерий Манна–Уитни) (рис. 4а). Через четыре месяца значения исследованных параметров также значимо отличались от контроля: высота ворсинки тощей кишки –  $317 \pm 8$  vs  $374 \pm 11$  мкм ( $n = 40$ ,  $p < 0.001$ , U-критерий Манна–Уитни); толщина ворсинок –  $113 \pm 4$  vs  $90 \pm 3$  мкм ( $p < 0.001$ , U-критерий Манна–Уитни); глубина крипт –  $103 \pm 2$  vs  $130 \pm 2$  мкм ( $p < 0.001$ , U-критерий Манна–Уитни); ширина крипт –  $42 \pm 1$  vs  $40 \pm 1$  мкм ( $p < 0.05$ , U-критерий Манна–Уитни) (рис. 4б). Через шесть месяцев после операции высота и толщина ворсинок у крыс с 5/6 нефрэктомией значимо уменьшились – на 11% и 4%, глубина и ширина крипт также уменьшилась на 2% и 19% ( $n = 40$ ,  $p < 0.001$ , U-критерий Манна–Уитни) (рис. 4с).



**Рис. 4.** Гистологическое строение и морфометрические параметры тощей кишки крыс через два, четыре и шесть месяцев после 5/6 нефрэктомии. Масштабная линейка – 200 мкм. \* –  $p < 0.05$ , \*\*\* –  $p < 0.001$  по сравнению с контролем. U-критерий Манна–Уитни. (а) – Высота и ширина ворсинок, а также глубина крипт через два месяца после нефрэктомии; (б) – через четыре месяца; (с) – через шесть месяцев. VH (Villus Height) – высота ворсинки, VW (Villus Width) – ширина ворсинки, CD (Crypt Depth) – глубина крипты, CW (Crypt Width) – ширина крипты;  $n$  – количество измерений (см. текст)

Толстая кишка контрольных животных имела типичное строение: эпителий образует многочисленные плотно расположенные кишечные крипты с широким просветом. Воздействие уремии на толстую кишку крыс с 5/6 нефрэктомией, прежде всего, затрагивало эпителиальный слой. На поздних стадиях также отмечались неравномерная гипертрофия мышечной оболочки и отек стенки кишки. Сравнительный морфометрический анализ на втором месяце эксперимента выявил достоверные различия между группами только по показателю ширины крипт (рис. 5а), который в опытной группе составил  $47 \pm 1$  мкм,

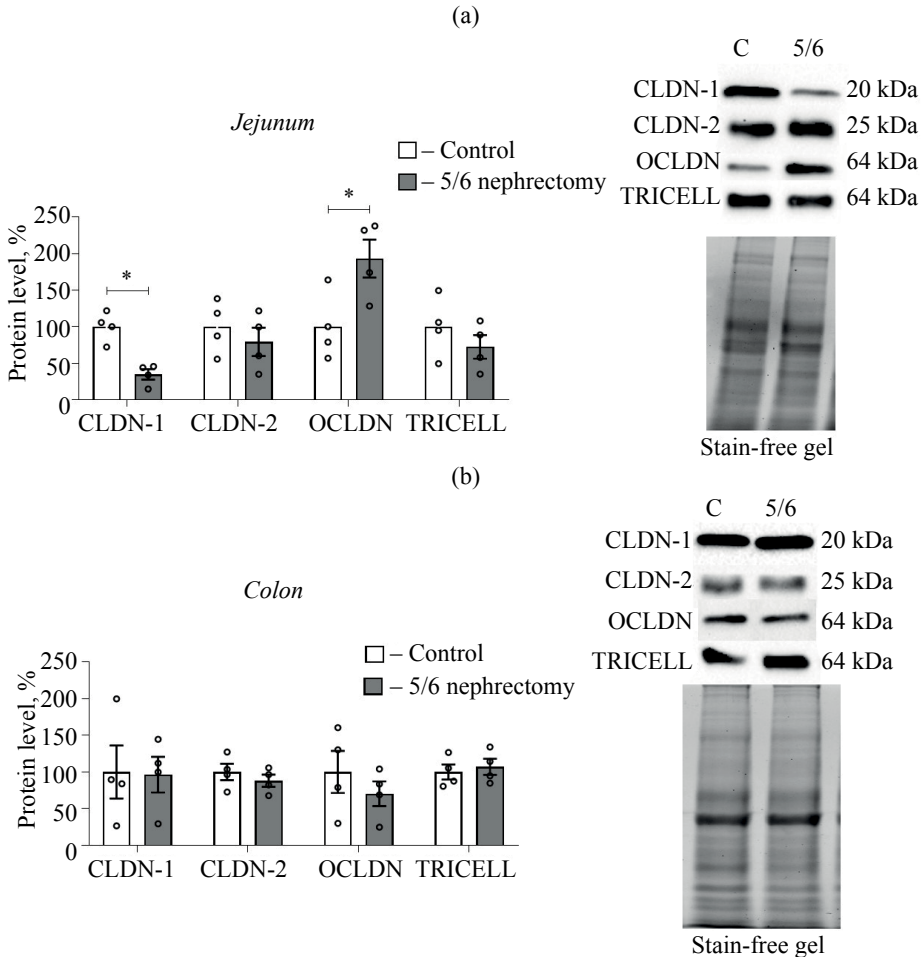
а в контрольной –  $44 \pm 1$  мкм ( $n = 40, p < 0.05$ , U-критерий Манна–Уитни). При этом различий по показателю глубины крипт обнаружено не было. При длительности в четыре месяца после операции значимые различия отмечались уже по обоим показателям (рис. 5b). Как глубина ( $273 \pm 5$  vs  $228 \pm 6$  мкм,  $p < 0.001$ , U-критерий Манна–Уитни), так и ширина крипт ( $53 \pm 1$  vs  $45 \pm 1$  мкм,  $p < 0.001$ , U-критерий Манна–Уитни) у нефрэктомированных животных были значимо больше, чем у контрольных. На шестом месяце эксперимента средняя глубина крипт толстой кишки у крыс в модельной группе увеличилась до  $278 \pm 7$  мкм, а их ширина – до  $51 \pm 1$  мкм, что также было значительно выше по сравнению с группой контроля (рис. 5c). По сравнению с предыдущим периодом изменение глубины и ширины крипт у крыс с 5/6 нефрэктомией было несущественным.



**Рис. 5.** Гистологическое строение и морфометрические параметры толстой кишки крыс через два, четыре и шесть месяцев после 5/6 нефрэктомии. Масштабная линейка – 200 мкм. \* –  $p < 0.05$ , \*\*\* –  $p < 0.001$  по сравнению с контролем. U-критерий Манна–Уитни. (a) – Глубина и ширина крипт через два месяца после нефрэктомии; (b) – через четыре месяца; (c) – через шесть месяцев. CD (Crypt Depth) – глубина крипты, CW (Crypt Width) – ширина крипты;  $n$  – количество измерений (см. текст).

*Уровень белков плотных контактов.* Методом вестерн-блоттинга в образцах тощей и толстой кишки крыс оценивали уровень клаудина-1 (CLDN-1) и -2 (CLDN-2), окклюдина (OCLDN) и трицеллюлина (TRICELL). Исследование проводили только у крыс через четыре и шесть месяцев после операции, так как ранее Vaziri с соавт. с помощью вестерн-блоттинга подробно охарактеризовали изменения молекулярного состава плотных контактов у крыс через два месяца после 5/6 нефрэктомии, показав значимое снижение уровня клаудина-1, окклюдина и ZO-1 в тощей, подвздошной и толстой кишке крыс [15, 17].

С помощью денситометрии было установлено, что у крыс через четыре месяца после 5/6 нефрэктомии в тощей кишке снижался уровень клаудина-1 по сравнению с соответствующим контролем ( $N = 4, p < 0.05$ , U-критерий Манна–Уитни), который относится к подтипу белков, усиливающих барьерные свойства эпителия. Одновременно с этим достоверно повышалось содержание окклюдина ( $N = 4, p < 0.05$ , U-критерий Манна–Уитни), который влияет на проницаемость кишечного эпителия для макромолекул (рис. 6a). Вероятнее всего, именно за счет такого компенсирующего эффекта проницаемость тощей кишки крыс с длительностью послеоперационного периода в четыре месяца не повышалась относительно контроля. В толстой кишке этих же опытных крыс содержание клаудина-1, -2, окклюдина и трицеллюлина статистически значимо не отличалось от показателей контрольных животных (рис. 6b). Исходя из этого, наблюдаемая в этой группе повышенная проницаемость могла быть обусловлена изменением экспрессии других белков.

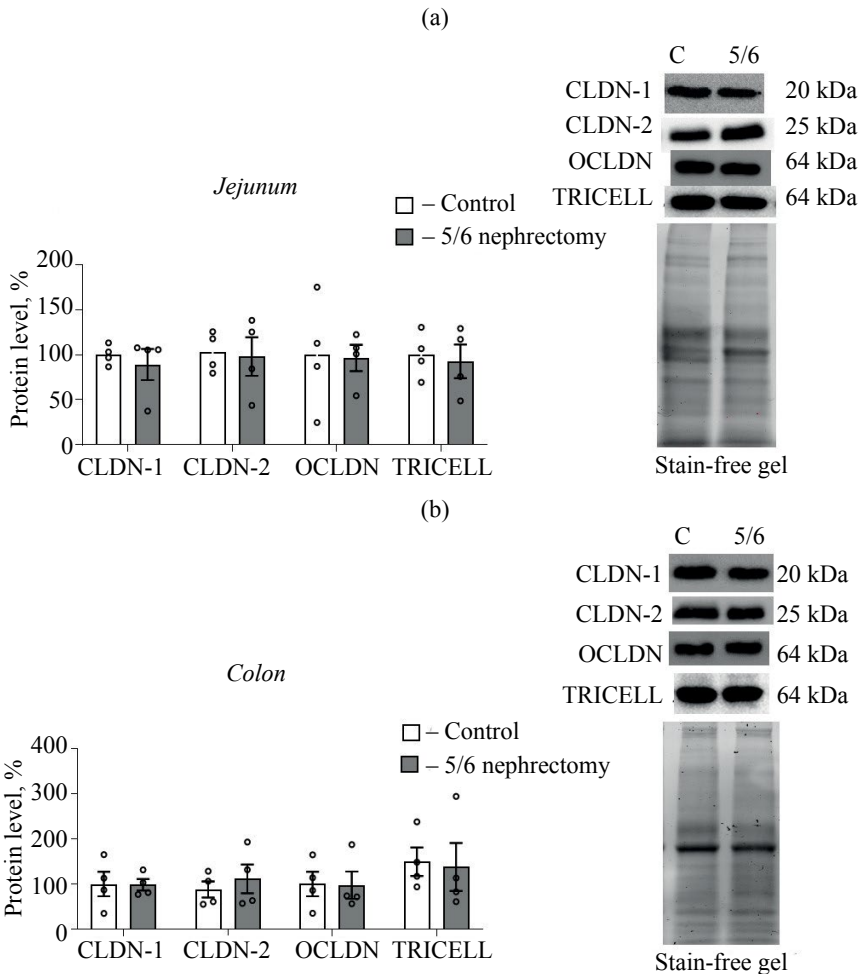


**Рис. 6.** Уровень белков плотных контактов в тощей (а) и толстой (б) кишке крыс через четыре месяца после 5/6 нефрэктомии. Справа представлены оригинальные иммуноблоты и контроль загрузки. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с контролем. U-критерий Манна–Уитни; количество животных –  $N$  (см. текст).

Через шесть месяцев после 5/6 нефрэктомии различий в содержании исследуемых белков плотных контактов в тощей и толстой кишке между опытной и контрольной группами не наблюдалось, что объясняет отсутствие различий по показателям проницаемости, ранее обнаруженное у этих животных (рис. 7а, б).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Главной задачей данного исследования было выяснение клеточно-молекулярных изменений тканевого барьера кишки при ограничении гомеостатической функции почек. Для решения этой задачи была выбрана модель создания почечной недостаточности путем субтотального удаления ткани почек у крысы (5/6 нефрэктомия) [18]. Предыдущие исследования в этом направлении немногочисленны и до настоящего



**Рис. 7.** Уровень белков плотных контактов в тощей (a) и толстой (b) кишке крыс через шесть месяцев после 5/6 нефрэктомии. Справа представлены оригинальные иммуноблоты и контроль загрузки. Количество животных – N (см. текст).

времени выполнялись у экспериментальных животных только при длительности почечной недостаточности в два месяца. Динамическая оценка морфофункциональных изменений кишечника при моделировании прогрессирования почечной недостаточности ранее не проводилась.

Изменение электролитного баланса, концентрации креатинина, мочевины, ТМАО и ТМА свидетельствовали о развитии почечной дисфункции. Одним из характерных признаков развития хронической почечной недостаточности в данной модели является повышение артериального давления вследствие гиперактивации ренин-ангiotензин-альдостероновой системы [18]. Во все периоды после нефрэктомии артериальное давление увеличивалось, что подтверждает адекватность выбранной модели и условий проведения эксперимента.

Использование электрофизиологических и молекулярно-биологических методов, выполненных через два, четыре и шесть месяцев после субтотальной нефрэктомии, позволило получить детальное представление о морфофункциональных изменениях

эпителия тощей и толстой кишки в условиях прогрессирующей почечной недостаточности. Результаты проведенного эксперимента показали, что на фоне сохраняющихся изменений морфологических параметров слизистой оболочки повышенная проницаемость тощей кишки наблюдается только через два месяца после вмешательства. Нарушение барьерной функции толстой кишки сохраняется до четырех месяцев. При длительности почечной недостаточности в шесть месяцев функциональные параметры кишечного эпителия опытных крыс не отличались от контрольных.

Полученные результаты не подтверждают выдвинутую гипотезу о прогрессивном ухудшении тканевого барьера кишки при почечной недостаточности. Обсуждая полученные результаты, необходимо отметить, что повышение уровня креатинина у животных при длительности после операции в два месяца составило 24%, в четыре месяца – 35%, в шесть месяцев – 62% по сравнению с контролем. Таким образом, использованная модель соответствует прогрессированию хронической почечной недостаточности у людей в диапазоне от легкой к умеренно выраженной почечной недостаточности [19]. На этой стадии еще сохранен относительно нормальный состав кишечной микробиоты и не так сильно проявляется негативное воздействие и других факторов, что объясняет возможность функциональной адаптации кишечного эпителия к уремии. При этом, по данным вестерн-блоттинга, у нефрэктомированных крыс отмечалась нормализация уровня белков плотных контактов, которая, вероятно, и лежала в основе наблюдаемых компенсаторных изменений.

Можно считать, что период в два месяца отражает острую реакцию кишки на изменение функций почек. Это подтверждают и работы других авторов. У крыс с 5/6 нефрэктомией через два месяца было показано снижение образования основного компонента кишечной слизи муцина 2. Обнаруженные изменения ассоциировались со значительным снижением уровня клаудина-1, ZO-1 и ИЛ-10 [20]. Следует отметить, что повышенная проницаемость кишечной стенки может служить защитным механизмом при гиперволемии, характерной для прогрессирующей почечной недостаточности. Так, Freige с соавт. оценивали секрецию воды и электролитов ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ) в толстой кишке крыс на 3-й, 7-й и 14-й день после субтотальной нефрэктомии. Важно отметить, что изучаемые показатели секреции изменялись пропорционально объему крови и уровню центрального венозного давления. Таким образом, гиперволемия была основной причиной секреторной диареи, наблюдаемой в данном исследовании [21].

Период в четыре и шесть месяцев характеризуется постепенным восстановлением функций эпителия. Молекулярно-клеточные механизмы этого процесса пока не изучены. В качестве важного потенциального медиатора этих защитных реакций в первую очередь необходимо рассматривать короткоцепочечные жирные кислоты, продуцируемые микробиотой [22, 23]. Известно, что эти соединения восстанавливают кишечный барьер, усиливая его через изменение уровня клаудинов в плотных контактах эпителия [24]. Однако секвенирование ДНК бактериальных колоний в фекалиях 5/6 нефрэктомированных мышей показало снижение микробного разнообразия с относительным увеличением разновидностей кластридий и уменьшением лактобацилл [25]. Эти данные не позволяют считать, что короткоцепочечные жирные кислоты являются фактором восстановления кишечного барьера.

В литературе имеются данные, указывающие на связь между уровнем  $Na,K$ -АТФазы и изменениями кишечной микробиоты, существенной при дисфункции почек [26]. Проведенное нами ранее исследование установило функциональную связь между  $Na,K$ -АТФазой и клаудином-1 [27], что позволяет выдвинуть предположение о включении этого молекулярного компонента в восстановление свойств эпителия кишки после длительного периода после нефрэктомии.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали способность кишечного эпителия на ранних стадиях почечной недостаточности компенсировать повышенную проницаемость кишечника, вызванную острым снижением функции почек.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (М. О. П., А. Г. М., А. А. Ф.), сбор данных (А. А. Ф., М. О. П., Е. А. Д., Е. А. К., Г. Т. И.), обработка данных (А. А. Ф., М. О. П., Е. А. Д., Е. А. К., Г. Т. И.), написание и редактирование манускрипта (А. Г. М., М. О. П., А. А. Ф.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственных заданий ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (ПТНИ № 1021062411784-3-3.1.8, Рег. № НИОКТР 124020100111-7 и № 1021062411787-0-3.1.8)

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям этического комитета по животным Санкт-Петербургского государственного университета. Протокол эксперимента одобрен этическим комитетом в области исследований на животных Санкт-Петербургского государственного университета (протокол № 131-03-5 от 13 декабря 2017 г.) и этической комиссией Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 06/03).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Marina AS, Kutina AV, Shakhmatoba EI, Natochin YV* (2017) Involvement of Glucagon-Like Peptide-1 in the Regulation of Selective Excretion of Sodium or Chloride Ions by the Kidneys. *Bull Exp Biol Med* 162(4): 436–440.  
<https://doi.org/10.1007/s10517-017-3634-0>
2. *Ellison DH, Felker GM* (2017) Diuretic Treatment in Heart Failure. *N Engl J Med* 377(20): 1964–1975.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1703100>
3. *Yeh TH, Tu KC, Wang HY, Chen JY* (2024) From Acute to Chronic: Unraveling the Pathophysiological Mechanisms of the Progression from Acute Kidney Injury to Acute Kidney Disease to Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci* 25(3): 1755.  
<https://doi.org/10.3390/ijms25031755>
4. *Inagi R* (2015) The gut-kidney connection in advanced chronic kidney disease. *Kidney Res Clin Pract* 34(4): 191–193.  
<https://doi.org/10.1016/j.krcp.2015.08.007>
5. *Kujal P, Vernerová Z* (2008) 5/6 nephrectomy as an experimental model of chronic renal failure and adaptation to reduced nephron number. *Cesk Fysiol* 57(4): 104–109.
6. *Пятченков МО, Марков АГ, Румянцев АШ* (2022) Структурно-функциональные нарушения кишечного барьера и хроническая болезнь почек. Обзор литературы. Часть I. *Нефрология* 26(1): 10–26. [*Pyatchanov MO, Markov AG, Rumyantsev ASH* (2022) Structural and functional disorders of the intestinal barrier and chronic kidney disease. Literature review. Part I. *Nefrologiya* 26(1): 10–26. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.36485/1561-6274-2022-26-1-10-26>
7. *Inoue H, Kozłowski SD, Klein JD, Bailey JL, Sands JM, Bagnasco SM* (2005) Regulated expression of renal and intestinal UT-B urea transporter in response to varying urea load. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(2): F451–F458.  
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00376.2004>

8. *Collins D, Walpole C, Ryan E, Winter D, Baird A, Stewart GJ* (2011) UT-B1 mediates transepithelial urea flux in the rat gastrointestinal tract. *J Membr Biol* 239(3): 123–130.  
<https://doi.org/10.1007/s00232-010-9331-9>
9. *Yano H, Tamura Y, Kobayashi K, Tanemoto M, Uchida S* (2014) Uric acid transporter ABCG2 is increased in the intestine of the 5/6 nephrectomy rat model of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 18(1): 50–55.  
<https://doi.org/10.1007/s10157-013-0806-8>
10. *Walpole C, McGrane A, Al-Mousawi H, Winter D, Baird A, Stewart G* (2018) Investigation of facilitative urea transporters in the human gastrointestinal tract. *Physiol Rep* 6(12): e13826.  
<https://doi.org/10.14814/phy2.13826>
11. *Schneeberger EE, Lynch RD* (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286(6): C1213–C1228.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00558.2003>
12. *Citi S, Fromm M, Furuse M, González-Mariscal L, Nusrat A, Tsukita S, Turner JR* (2024) A short guide to the tight junction. *J Cell Sci* 137(9): jcs261776.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.261776>
13. *Markov AG, Aschenbach JR, Amasheh S* (2015) Claudin clusters as determinants of epithelial barrier function. *IUBMB Life* 67(1): 29–35.  
<https://doi.org/10.1002/iub.1347>
14. *Cahyawati PN, Satriyasa BK* (2021) Subtotal Nephrectomy as a Model of Chronic Kidney Disease: A Systematic Review. *Ind J Public Health Res Dev* 12(3): 150–157.  
<https://doi.org/10.37506/ijphrd.v12i3.16058>
15. *Vaziri ND, Yuan J, Nazertehrani S, Ni Z, Liu SM* (2013) Chronic Kidney Disease Causes Disruption of Gastric and Small Intestinal Epithelial Tight Junction. *Am J Nephrol* 38: 99–103.  
<https://doi.org/10.1159/000353104>
16. *Maloy A, Alexander S, Andreas A, Nyunoya T, Chandra D* (2022) Stain-Free total-protein normalization enhances the reproducibility of Western blot data. *Anal Biochem* 654: 114840.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114840>
17. *Lau WL, Liu SM, Pahlevan S, Yuan J, Khazaeli M, Ni Z, Chan JY, Vaziri ND* (2015) Role of Nrf2 dysfunction in uremia-associated intestinal inflammation and epithelial barrier disruption. *Dig Dis Sci* 60(5): 1215–1222.
18. *Chaszczewska-Markowska M, Sagan M, Bogunia-Kubik K* (2016) The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) – physiology and molecular mechanisms of functioning. *Adv Hyg Exp Med* 70: 917–927.  
<https://doi.org/10.5604/17322693.1218180>
19. *Lim BJ, Yang HC, Fogo AB* (2014) Animal models of regression/progression of kidney disease. *Drug Discov Today Dis Models* 11: 45–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2014.06.003>
20. *Gonzalez A, Krieg R, Massey HD, Carl D, Ghosh S, Gehr TWB, Ghosh SS* (2019) Sodium butyrate ameliorates insulin resistance and renal failure in CKD rats by modulating intestinal permeability and mucin expression. *Nephrol Dial Transplant* 34(5): 783–794.  
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfy238>
21. *Freire E, Albuquerque J, Leal I, Santos C, Lima J, Santos J, Mota A, Silva J* (2019) Effect of chronic renal dysfunction on the permeability of the colon to water and electrolytes: experimental study in rats. *Braz Arch Dig Surg* 32(4): e1472.  
<https://doi.org/10.1590/0102-672020190001e1472>
22. *Peng L, Li Z, Green RS, Holzman IR, Lin J* (2009) Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr* 139(9): 1619–1625.  
<https://doi.org/10.3945/jn.109.104638>
23. *Chun J, Toldi G* (2022) The Impact of Short-Chain Fatty Acids on Neonatal Regulatory T Cells. *Nutrients* 14(18): 3670.  
<https://doi.org/10.3390/nu14183670>
24. *Yan H, Ajuwon KM* (2017) Butyrate modifies intestinal barrier function in IPEC-J2 cells through a selective upregulation of tight junction proteins and activation of the Akt signaling pathway. *PLoS One* 12(6): e0179586.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179586>

25. Yang J, Lim SY, Ko YS, Lee HY, Oh SW, Kim MG, Cho WY, Jo SK (2019) Intestinal barrier disruption and dysregulated mucosal immunity contribute to kidney fibrosis in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 34(3): 419–428.  
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfy172>
26. Zhu J, Li X, Deng N, Peng X, Tan Z (2022) Diarrhea with deficiency kidney-yang syndrome caused by adenine combined with Folium senna was associated with gut mucosal microbiota. *Front Microbiol* 13: 1007609.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1007609>
27. Markov AG, Fedorova AA, Kravtsova VV, Bikmurzina AE, Okorokova LS, Matchkov VV, Cornelius V, Amasheh S, Krivoi II (2020) Circulating Ouabain Modulates Expression of Claudins in Rat Intestine and Cerebral Blood Vessels. *Int J Mol Sci* 21(14): 5067.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21145067>

### **Barrier Properties of the Intestinal Epithelium in the Dynamics of Nephropathy Progression**

**A. A. Fedorova<sup>a</sup>, M. O. Pyatchenkov<sup>b</sup>, E. A. Dmitrieva<sup>a</sup>, E. A. Kalashnikov<sup>c</sup>,  
G. T. Ivanova<sup>c</sup>, and A. G. Markov<sup>a, c, \*</sup>**

<sup>a</sup>*Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*

<sup>b</sup>*S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia*

<sup>c</sup>*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: a.markov@spbu.ru*

The study investigated the effect of 5/6 nephrectomy on the barrier properties of the rats jejunum and colon in the long postoperative period (two, four and six months). It was shown that animals with kidney dysfunction developed progressive azotemia, hypernatremia and hyperkalemia, as well as increased levels of uremic toxins (TMAO and TMA), accompanied by an increase in blood pressure. Two months after nephrectomy, a decrease in short-circuit current and an increase in paracellular permeability were observed in the jejunum, but the transepithelial resistance (TER) did not change. In the colon at this time, an increase in TER and permeability to sodium fluorescein was noted with a decrease in short-circuit current. At the fourth month, the jejunum retained morphological changes in villi and crypts, but the barrier function stabilized due to a compensatory increase in occludin levels with a decrease in claudin-1. Increased permeability remained in the colon without significant changes in the expression of the studied proteins of tight junctions. Six months after nephrectomy, differences in permeability and protein content of tight junctions were leveled compared with the control, although morphological disorders of the epithelium persisted. The results of the study show the potential for restoring the intestinal barrier within six months after the nephrectomy.

*Keywords:* kidney, nephrectomy, intestine, intestinal barrier, tight junctions, claudins