

ПОВЫШЕНИЕ ЦИКЛОФОСФАНОМ ПРОНИЦАЕМОСТИ ТОНКОЙ КИШКИ КРЫС ДЛЯ СОДЕРЖАЩИХСЯ В ЕЁ ПРОСВЕТЕ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ СРЕДНЕЙ МОЛЯРНОЙ МАССЫ

Шефер Т.В., Рейнюк В.Л., Краснов К.А., Ивницкий Ю.Ю.

ФБГУН «Институт токсикологии» ФМБА России, 192019, Санкт-Петербург, ул.

Бехтерева, д. 1, (812) 365-06-80, neugierig@mail.ru

Резюме. Целью исследования была проверка гипотезы о компрометации кишечного барьера при миелоабляционных режимах применения циклофосфана. Оценивали проницаемость тонкой кишки крыс для содержащихся в химусе гидрофильных веществ средней молярной массы. Введение циклофосфана (в/б, 600 мг/кг) повышало уровень таких веществ в портальной крови, интенсифицировало поступление в неё метиленового синего, введённого в желудок, с накоплением красителя в печени. Преимущественно повышалась парацеллюлярная проницаемость слизистой оболочки, что следовало из повышения соотношения концентраций лактулозы и маннитола мочи в тесте с в/ж введением смеси лактулозы и маннитола. Клиническое значение полученных данных определяется возможностью ускоренной транслокации токсичных веществ из просвета тонкой кишки в кровь с усугублением токсического действия циклофосфана.

Ключевые слова: циклофосфан; крысы; кишечный барьер; молекулы средней массы; метиленовый синий; лактулозо-маннитоловый тест

INCREASED PERMEABILITY OF A SMALL INTESTINE TO LUMINAL HYDROPHILIC MEDIUM-SIZED MOLECULES IN CYCLOPHOSPHAMIDE-TREATED RATS

Schäfer T.V., Rejniuk V.L., Krasnov K.A., Ivnitsky J.J.

"Institute of Toxicology," FMBA Russia

Abstract. The subject of the study was the hypothesis of the compromised intestinal barrier as a contributing cause for a high dose cyclophosphamide (CY) acute toxicity. The influence of high dose CY on the permeability of rat small intestine to luminal hydrophilic medium-sized molecules was estimated. The i/p administration of CY (600 mg/kg) resulted in the increased portal blood level of such molecules and increased flux of orally administered methylene blue into the portal system leading to the intense staining of the liver. Paracellular

pathways of increased permeability of mucosa were predominant, judging by the increased [lactulose]/[mannitol] ratio in lactulose-mannitol urine excretion test. The probable enhancement of the translocation of toxic substances from the intestinal lumen into blood, contributing to CY toxicity, determines the clinical relevance of these data.

Keywords: Cyclophosphamide; Rats; Gut barrier; Medium sized molecules; Methylene blue; Lactulose/mannitol test

Введение

Циклофосфан — оксазафосфориновое производное бис-(β-хлорэтил)-амин — применяется для лечения лимфом, лейкозов и некоторых солидных опухолей. Как правило, его суточная доза не превышает 50 мг/кг, отражая компромисс между эффективностью и переносимостью. Минимальная миелоабляционная доза циклофосфана, составляющая для людей 120 мг/кг [1], всё ещё не исключает рецидивы основного заболевания [2]. Возможным решением проблемы является применение циклофосфана в более высоких дозах с последующей пересадкой стволовых кроветворных клеток [3]. При этом роль фактора, лимитирующего продолжительность жизни, переходит от панцитопенического синдрома к другим побочным эффектам циклофосфана — в частности, к острым неврологическим расстройствам. В экспериментах на крысах они проявляются угнетением, тремором, утратой рефлексов и судорогами [4]. У людей сходный синдром (тремор, судороги, дезориентация, утрата сознания), наблюдали при болюсном в/в назначении метил-бис- (β-хлорэтил) амина в дозе 2,5 мг/кг [5].

В связи со способностью азотистых ипритов нарушать функции печени [6] можно предположить, что в формировании описанных симптомов могут участвовать не только циклофосфан и его метаболиты, но также эндогенные токсичные вещества. Ранее мы сообщали об интенсификации поступления аммиака желудочно-кишечного происхождения в общий кровоток при острой интоксикации циклофосфаном [5] и о потенцировании аммиаком, вводимым в желудок, токсического действия циклофосфана на крыс [7]. Подобные эффекты не исключены и для гидрофильных веществ с молярной массой 300—2000 г/моль (веществ средней молярной массы, ВСММ), депонированных в химусе и в слизистой оболочке тонкой кишки. Их уровень в крови возрастает при шоке [8], который относится к числу острых резорбтивных эффектов азотистых ипритов [5]. Мукозит, осложняющий применение циклофосфана [9], увеличивает проницаемость кишечной слизистой оболочки для ВСММ [10, 11], что также указывает на возможность

утечки ВСММ из кишечника в кровь.

Вместе с тем появление некротических клеток в криптах тонкокишечного эпителия, отмечаемое после в/б введения крысам циклофосфана в нейротоксических дозах, не ведёт к утрате криптами морфологической целостности [12]. Поэтому интенсификация поступления ВСММ из просвета тонкой кишки в кровь при миелоабляционных режимах применения циклофосфана остаётся гипотезой, проверка которой была предметом настоящего исследования.

Цель исследования: оценить влияние острого воздействия циклофосфана в миелоабляционной дозе на проницаемость тонкой кишки крыс для содержащихся в её просвете гидрофильных ВСММ.

Материалы и методы

План исследования. Проведено 4 эксперимента.

В 1-м определяли сроки поступления в тонкую кишку растворов, введенных в желудок на фоне острой интоксикации циклофосфаном. Для этого через 1 и 3 ч после введения циклофосфана интактную и получившую циклофосфан крысу помещали в спаренные пластмассовые пеналы и подвергали рентгенологическому исследованию.

Во 2-м эксперименте оценивали влияние циклофосфана на поток метиленового синего (МС), вводимого в желудок в качестве модельного ВСММ, из просвета тонкой кишки в портальную кровь. Через 1, 2 или 3 ч после введения МС и циклофосфана отбирали пробы крови из воротной вены краниальнее впадения *v. pylorica* для определения МС и других гидрофильных ВСММ.

В 3-м эксперименте оценивали влияние циклофосфана на накопление в печени МС после в/ж введения красителя. Для этого анализировали изменение окраски печени через 3 ч после введения животным циклофосфана и (или) МС.

В 4-м эксперименте осуществляли сравнительную оценку влияния циклофосфана на проницаемость слизистой оболочки тонкой кишки для гидрофильных веществ средней и малой молярной массы путём проведения лактулозо-маннитолового теста [13].

Животные. Исследования проводили на самцах беспородных крыс-альбиносов массой 153—215 г, приобретённых в питомнике Рапполово АМН РФ. В течение суток перед использованием в эксперименте животных не кормили при неограниченном доступе к воде. Крыс распределяли по экспериментальным группам методом жеребьёвки.

Лекарственные средства и порядок их применения. Официальный препарат циклофосфана (АО «Биохимик») растворяли в дистиллированной воде *ex tempore* и вводили в/б однократно в дозе 600 мг/кг (3,3 ЛД₅₀) Введение циклофосфана в этой дозе

вело к анорексии, медленно прогрессирующим атаксии, сомноленции и ступору, отчётливо проявлявшимся через 3 ч; средняя продолжительность жизни, предварительно установленная для крыс этой же серии, составила 17,5 ч. Контрольные животные вместо циклофосфана получали воду. МС (АО «Ленреактив») вводили в/ж в дозе 100 мг/кг в виде водного раствора, тотчас после циклофосфана. Сульфат бария (АО «Химический завод им. Карпова») вводили в/ж в виде свежеприготовленной 35%-ной водной суспензии, тотчас после циклофосфана. За 2 мин до лапаротомии животных наркотизировали в/б введением тиопентала натрия (75 мг/кг). Перечисленные препараты вводили в объёме 10 мл/кг. Лактулозу и D-маннитол (Sigma-Aldrich) вводили в/ж в виде раствора (33 г лактулозы и 25 г D-маннитола в 1 л воды) в объёме 20 мл/кг тотчас после циклофосфана.

Рентгенологическое исследование проводили с использованием цифрового рентгеновского аппарата Siemens Iconos R200. Желудок и тонкую кишку контрастировали суспензией сульфата бария, как указано выше.

Определение содержания МС и других гидрофильных ВСММ в портальной крови. Кровь депротеинировали 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты. В супернатанте спектрофотометрически определяли МС (при длине волны 670 нм), а также оценивали суммарное содержание ВСММ по площади под графиком зависимости оптической плотности пробы от длины волны при 238, 254, 260, 280 и 310 нм [14].

Накопление МС в печени количественно оценивали по параметрам цвета и яркости фотографического изображения печени, подвергнутого обработке с помощью компьютерной программы Adobe Photoshop CS3. Вскрытую брюшную полость животных фотографировали камерой Panasonic DMC-LZ8 при освещении двумя флуоресцентными лампами мощностью по 20 Вт с цветовой температурой 6400 К, расположенными на расстоянии 30 см. Баланс белого цвета устанавливали по листу белой бумаги SvetoCopy плотностью 80 г/м². Применяли настройки: светочувствительность матрицы, эквивалентная 100 ISO, выдержка 0,067 с, диафрагма 5,6. Далее печень извлекали и снова фотографировали в указанных условиях. Изображение печени контурировали с помощью инструмента «магнитное лассо» с последующим применением фильтра «average blur». Цветовые параметры силуэта печени записывали с помощью цветовых систем «Lab» и «HSB». При последующем статистическом анализе использовали такие параметры, как яркость, соотношение оттенков красный-зелёный и синий-жёлтый (система «Lab»); тон и яркость («HSB»).

Выполнение лактулозо-маннитолового теста. Тотчас после введения циклофосфана животным вводили в желудок смесь растворов лактулозы и D-маннитола,

после чего помещали их в метаболические камеры Nalgene. В течение 4 ч асептически собирали мочу, 100 мкл которой высушивали в струе азота при комнатной температуре и растворяли в избытке бис-триметилсилилацетамида (30 мг), после чего оставляли на 30 мин при 40°C. Раствор разводили дихлорметаном до 100 мкл и исследовали методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) на аппарате Shimadzu GCMS-QP2010 Plus. Объем вводимых в аппарат проб составлял 1 мкл. Применяли фенилсиликоновую колонку Equity-5 длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм. Температура испарителя составляла 280°C; носителем служил гелий (1 мл/мин). Режим хроматографического разделения предусматривал начальную температуру 150°C (4 мин), конечную температуру 300°C и скорость повышения температуры 10°C/мин. Концентрацию маннитола и лактулозы в моче определяли по величине площади под пиками хроматограмм триметилсилиловых производных этих углеводов путём сравнения с хроматограммами калибровочной смеси. Для её приготовления 100 мкл водного раствора, содержащего маннитол и лактулозу (по 0,1 мг/мл) обрабатывали, как указано выше для проб мочи.

Статистическая обработка результатов исследования. Для оценки влияния вводимых веществ на содержания метаболитов в крови и окрашивание печени использовали факторный дисперсионный анализ. Значимость различий средних величин оценивали с помощью теста наименьших значимых различий Фишера [15].

Результаты

После введения циклофосфана поступление в портальную систему МС, введённого в желудок, интенсифицировалось. Через 3 ч его содержание в портальной крови было в 2,6 раза, а эндогенных ВСММ — в 1,2 раза большим, чем у крыс, не получавших циклофосфан (рисунок 1).

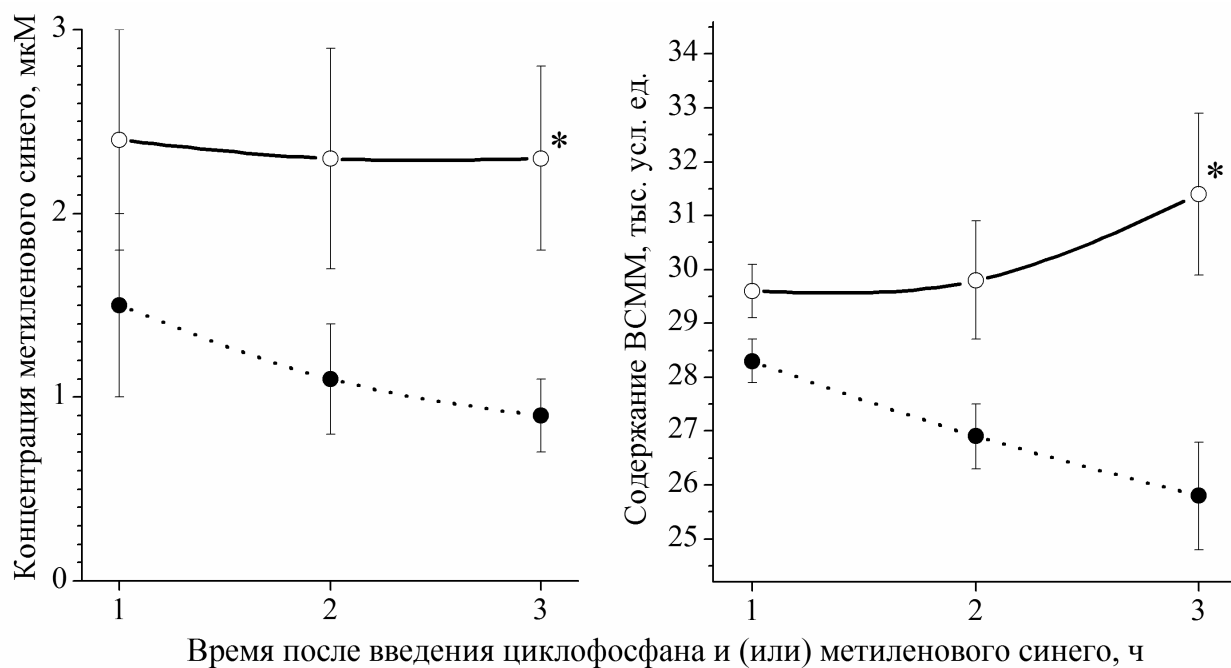


Рисунок 1. Содержание метиленового синего и веществ средней молярной массы в портальной крови крыс ($M \pm m$, $n = 6$) после введения циклофосфана и метиленового синего.

Тёмные кружки: животные, получавшие только метиленовый синий; светлые кружки: животные, получавшие циклофосфан и метиленовый синий.

* — значимое различие с крысами, получавшими только метиленовый синий, $p \leq 0,05$.

Судя по результатам рентгенологического исследования, количество красителя, находившегося в это время в тонкой кишке получивших и не получавших циклофосфан крыс, было сопоставимым (рисунок 2).

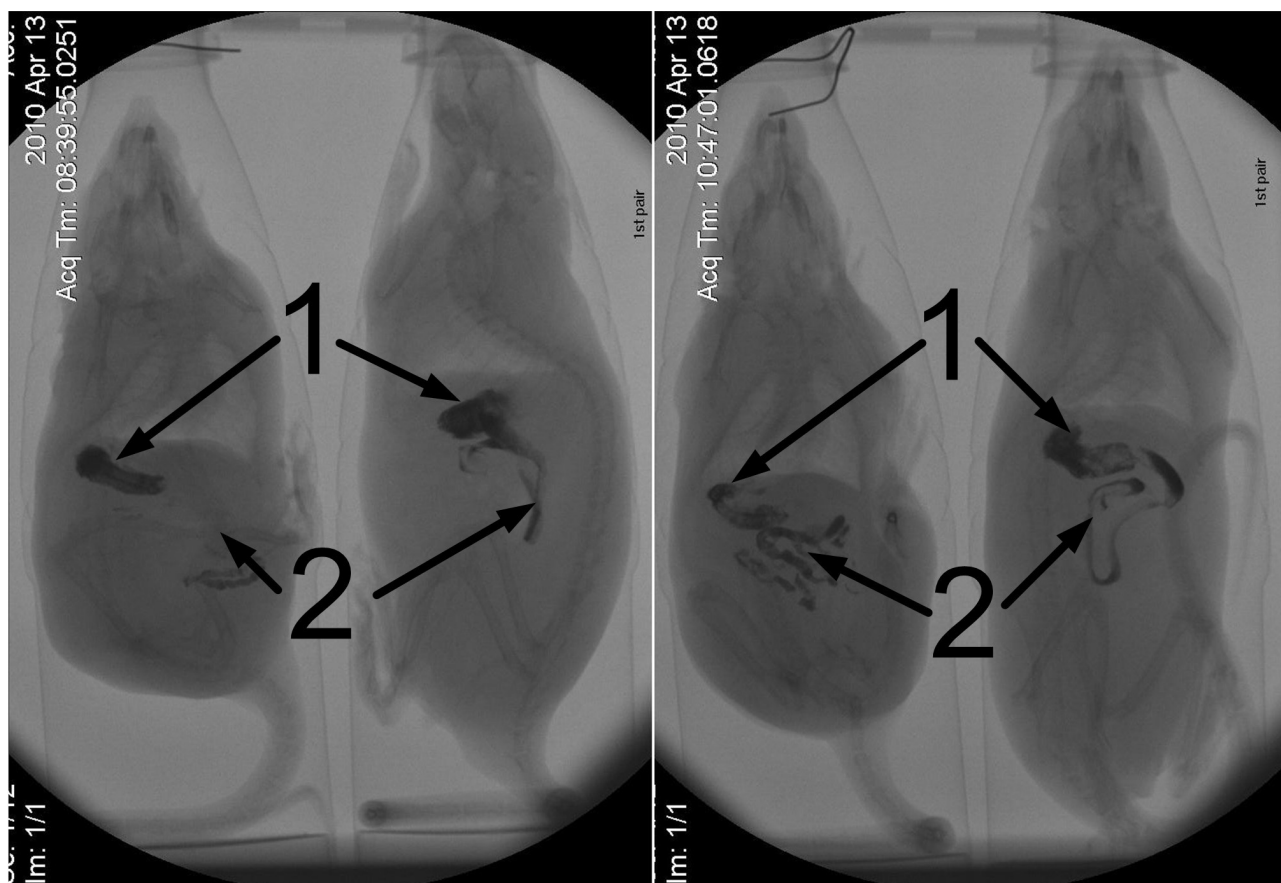


Рисунок 2. Влияние циклофосфана на скорость продвижения рентгеноконтрастного вещества из желудка в тонкую кишку.

Левое окно — 1 ч, правое окно — 3 ч после введения сульфата бария.

В каждом окне слева — интактная крыса, справа — крыса, получившая циклофосфан.

Стрелками показаны: 1 — желудок; 2 — тонкая кишка

У животных, получивших МС на фоне введения циклофосфана, печень окрашивалась более интенсивно, чем у крыс, получавших только МС (рисунок 3). Справедливость этого тезиса подкреплена результатами статистического анализа параметров окраски силуэта печени через 3 ч после введения препаратов (таблица 1).

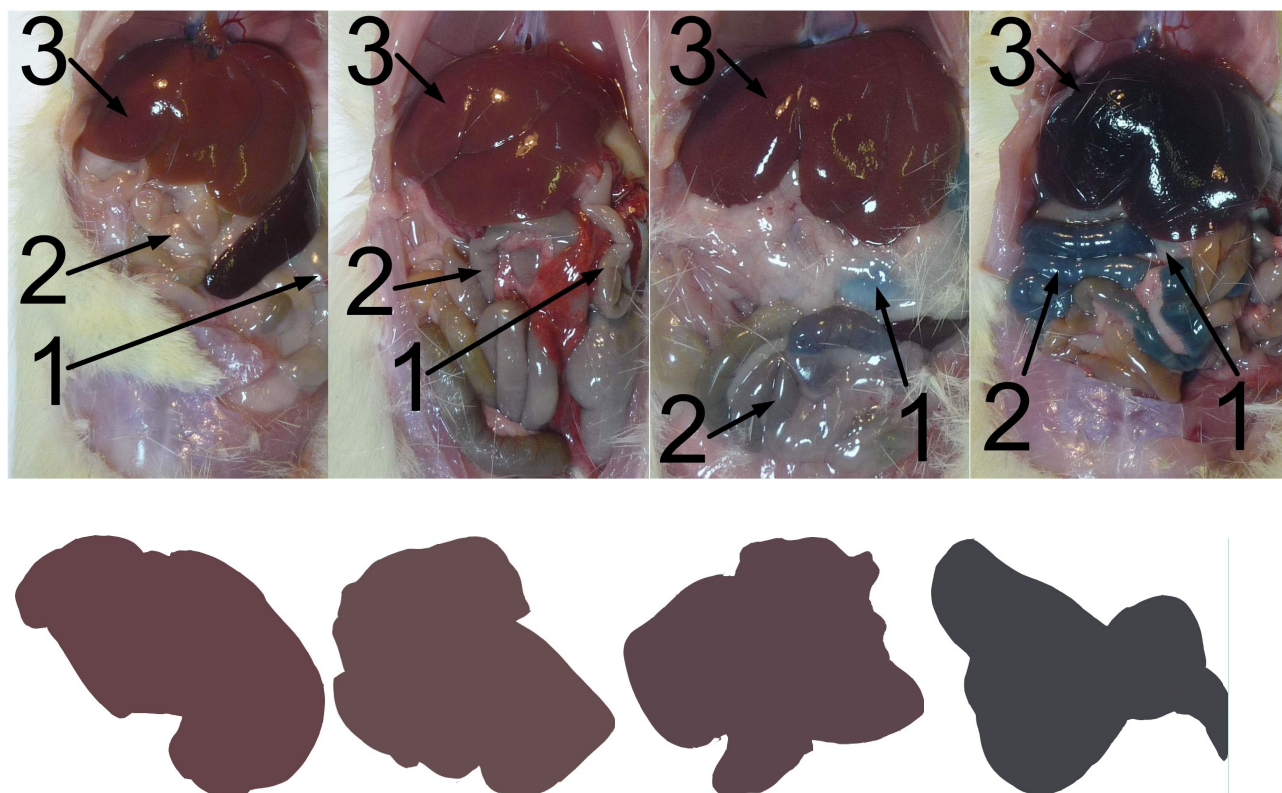


Рисунок 3. Органы брюшной полости и силуэты печени крыс через 3 ч после введения животным циклофосфана и (или) метиленового синего. Слева направо: контроль; циклофосфан; метиленовый синий; циклофосфан + метиленовый синий. Стрелками показаны: 1 — желудок; 2 — тонкая кишка; 3 — печень.

Таблица 1. Окрашивание печени крыс через 3 ч после в/б введения циклофосфана и (или) внутрижелудочного введения метиленового синего, $M \pm m$ ($n = 6$)

Экспериментальная группа	Параметры окраски силуэта печени				
	Система Lab			Система HSB	
	Яркость	Красный-зелёный	Синий-жёлтый	Тон	Яркость
Контроль	$34,0 \pm 1,0$	$14,0 \pm 1,0$	$2,5 \pm 0,5$	$350,0 \pm 1,0$	$40,0 \pm 0,0$
Циклофосфан	$36,5 \pm 0,5^\dagger$	$12,0 \pm 0,1^\dagger$	$2,0 \pm 1,0$	$349,5 \pm 3,5$	$41,0 \pm 0,0^\dagger$
Метиленовый синий	$33,0 \pm 1,0$	$8,0 \pm 3,0^*$	$-2,0 \pm 2,0^*$	$317,5 \pm 24,5$	$35,0 \pm 1,0^*$
Циклофосфан + метиленовый синий	$29,5 \pm 0,5^{*\dagger}$	$0,0 \pm 0,0^{*\dagger}$	$-5,0 \pm 1,0^*$	$221,0 \pm 1,0^{*\dagger}$	$30,5 \pm 1,5^{*\dagger}$

Значимое различие с (*) контрольной группой; (†) группой «Метиленовый синий», $p \leq 0,05$.

На фоне действия циклофосфана концентрация лактулозы и маннитола в моче животных, которым эти углеводы были введены в желудок, имела тенденцию к увеличению. У крыс, получавших циклофосфан, коэффициент [Лактулоза]/[Маннитол] был в 2,2 раза выше, чем в контроле (таблица 2).

Таблица 2. Концентрация лактулозы и маннитола в моче крыс после внутрижелудочного введения лактулозы и маннитола на фоне действия циклофосфана, $M \pm m$ ($n = 6$)

Экспериментальная группа	Лактулоза, мкг/мл	Маннитол, мкг/мл	$\frac{[\text{Лактулоза}]}{[\text{Маннитол}]}$
Контроль	84 ± 22	312 ± 105	$0,269 \pm 0,049$
Циклофосфан	335 ± 121	553 ± 155	$0,604 \pm 0,112^*$

(*) значимое различие с контролем, $p \leq 0,05$.

Обсуждение

Однократное введение циклофосфана в дозе 600 мг/кг, незначительно превышавшей миелоабляционный порог для крыс (500 мг/кг [1]), вело к глубокому нарушению барьерной функции тонкой кишки в отношении гидрофильных ВСММ. На это указывало возрастание содержания МС в портальной крови через 3 ч после его введения в желудок (рисунок 1), т. е. в сроки, когда значительная часть красителя содержалась в тонкой кишке, но ещё не достигала толстой (рисунок 2). Портальную кровь отбирали краниальнее впадения *v. pylorica* и *v. lienalis*, поэтому она была разбавлена не содержащей МС кровью, поступавшей из толстой кишки, селезёнки и поджелудочной железы. Из этого следует, что возрастание проницаемости тонкой кишки для МС было более значительным, чем наблюдавшееся 2,6-кратное повышение уровня красителя в портальной крови.

МС, молярная масса которого 320 г/моль, относится к ВСММ. Поэтому можно предположить, что нарушение барьерных свойств тонкой кишки было причастно и к повышению интегрального показателя содержания в портальной крови гидрофильных ВСММ (рисунок 1, правая сторона). Трихлоруксусная кислота, которую применяли для депротенинирования проб крови, осаждает белки, но не пептиды. ВСММ, содержание которых оценивали по поглощению света при длинах волн 238, 254, 260, 280 и 310 нм, являются предположительно олигопептидами, содержащими аминокислоты ароматической и гетероциклической структуры [14]. МС, циклофосфан и его метаболиты не принадлежат к таким веществам. Поэтому полученные данные отражают, по-видимому, интенсификацию поступления в портальную кровь среднемолекулярных пептидов, образующихся в кишечнике.

Возрастание портального потока МС могло быть лишь одним из условий ускоренного накопления этого красителя в печени животных, получавших циклофосфан (рисунок 3, таблица 1). Другим условием могло быть снижение жизнеспособности печёночной ткани. В живых клетках МС под действием НАД(Ф)Н:хиноноксидоредуктазы переходит в лейкоформу [17], поэтому усиленное окрашивание печени могло отражать повреждение циклофосфаном не только тонкой кишки, но и печёночной ткани. Вместе с тем, оно не было проявлением вено-окклюзионной болезни, характерной для 3-й недели острой интоксикации циклофосфаном [18].

Данные рентгенологического исследования (рисунок 1) позволяют исключить желудочно-кишечный стаз из числа возможных причин интенсификации поступления ВСММ из тонкой кишки в портальную кровь. Как следует из результатов проведения лактулозо-маннитолового теста (таблица 2), более вероятным механизмом является нарушение барьерных свойств кишечной стенки. Лактулоза является нерасщепляемым пищеварительными ферментами млекопитающих дисахаридом средней молекулярной массы (342 Да), для которого постулирован парацеллюлярный (сквозь плотные межклеточные контакты) механизм диффузии через слизистую оболочку тонкой кишки. Молекулы малой массы, такие как D-маннитол (182 Да), преодолевают кишечный барьер преимущественно трансцеллюлярно, т. е. через водные поры в плазматических мембранах энтероцитов [19]. Для лактулозы и маннитола предполагается способность экскретироваться с мочой в количествах, пропорциональных кишечной абсорбции [20]. Несмотря на значительное число допущений, необходимых для интерпретации результатов теста, возрастание отношения [Лактулоза]/[Маннитол] в моче крыс, получавших эти вещества на фоне воздействия циклофосфана (таблица 2), отражает нарушение барьерных свойств эпителия слизистой оболочки тонкой кишки предположительно за счёт преимущественного увеличения его парацеллюлярной проницаемости. Такая оценка согласуется с данными [21] о потере тонкой кишкой клудина-3, белка плотных контактов энтероцитов, при моделировании шока, являющегося одним из проявлений острого резорбтивного действия азотистых ипритов [5].

Большинство веществ, содержащихся в химусе, абсорбируется слизистой оболочкой тонкой кишки путём простой диффузии. Можно предположить, что некоторые из них (включая ВСММ) при острой интоксикации алкилирующими веществами вовлекаются в формирование неврологических расстройств, подобно тому как это было показано для аммиака [7] и веществ большой молярной массы — бактериальных полисахаридов и цитокинов [22]. Данная гипотеза относится как к эндогенным

соединениям, так и к веществам, назначаемым внутрь в качестве лекарственных средств; её экспериментальная проверка является предметом дальнейших исследований.

Выводы

1. Введение крысам циклофосфана в нейротоксической дозе 600 мг/кг увеличивало поток гидрофильных веществ средней молярной массы из просвета тонкой кишки в портальную кровь.
2. Нарушение барьерных функций тонкой кишки в отношении веществ средней молярной массы, содержащихся в химусе, было обусловлено увеличением преимущественно парацеллюлярной проницаемости эпителия слизистой оболочки.
3. Клиническое значение полученных данных определяется возможностью вовлечения веществ средней молярной массы, образующихся в кишечнике либо назначаемых перорально в составе лекарственных средств, в формирование проявлений нейротоксичности циклофосфана.

Литература

1. Gupta V., Lazarus H. M., Keating A. Myeloablative conditioning regimens for AML allografts: 30 years later // Bone Marrow Transplantation. — 2003. — Vol. 32. — P. 969—978.
2. Fraiser L. H., Kanekai S., Kehrer J. P. Cyclophosphamide toxicity. Characterizing and avoiding the problem // Drugs. — 1991. — Vol. 42. — P. 781—795.
3. Haioun C., Lepage E., Gisselbrecht C. [et al.] Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis d'Etude des lymphomes de l'Adulte study // J. Clin. Oncol. — 2000. — Vol. 18. — P. 3025—3030.
4. Schäfer T. V., Ivnitsky J. J., Rejniuk V. L. Cyclophosphamide-induced leakage of gastrointestinal ammonia into the common bloodstream in rats // Drug Chem. Toxicol. — 2011. — Vol. 34. — P. 25—31.
5. Clifford P., Bhardwaj B. V., Whittaker L. R. Intensive nitrogen mustard therapy with abdominal aortic occlusion in nasopharyngeal carcinoma // Brit. J. Cancer. — 1965. — Vol. 19. — P. 51—71.
6. De Jonge M. E., Huitema A. D. R., Beijnen J. H., Rodenhuis S. High exposures to bioactivated cyclophosphamide are related to the occurrence of veno-occlusive disease of the liver following high-dose chemotherapy // Brit. J. Cancer.—2006.—Vol. 94. — P. 1226—1230.

7. Ivnitsky J. J., Schafer T.V., Rejniuk V. L. Promotion of the toxic action of cyclophosphamide by digestive tract luminal ammonia in rats // *ISRN Toxicology*. — 2011. — Article ID 450875. — 4 pages. — doi:10.5402/2011/450875.
8. Penn A. H., Hugli T. E., Schmid-Schönbein G. W. Pancreatic enzymes generate cytotoxic mediators in the intestine // *Shock*. — 2007. — Vol. 27. — P. 296—302.
9. Jones J. A., Avritscher E. B., Cooksley C. D. [et al.] Epidemiology of treatment-associated mucosal injury after treatment with newer regimens for lymphoma, breast, lung, or colorectal cancer // *Support Care Cancer*. — 2006. — Vol. 14. — P. 505—515.
10. Karczewski J., Troost F. L., Konings I. [et al.] Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* — 2010. — Vol. 298. — P. G851—G859.
11. Keita Á. V., Söderholm J. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors // *Neurogastroenterol. Motil.* — 2010. — Vol. 22. — P. 718—733.
12. Moore J. V. The ‘gastrointestinal syndrome’ after chemotherapy: inferences from mouse survival time, and from histologically- and clonogenically- defined cell death in intestinal crypts // *Brit. J. Cancer*. — 1986. — Vol. 53. — P. 16—19.
13. Pernet P., Aussel C., Le Boucher J. [et al.] Standardization of the lactulose-mannitol test in rats: application to burn injury // *Eur. Surg. Res.* — 1998. — Vol. 30. — P. 69—76.
14. Малахова М.Я. Метод регистрации эндогенной интоксикации. Пособие для врачей. — СПб.: СПбМАПО, 1995. — 33 с.
15. Юнкеров, В. И., Григорьев С. Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. — СПб.: ВМедА, 2005. — 292 с.
16. Carr M. L., Lerner M. R., Hanas J. S. [et al.] A rat model of syngeneic bone marrow transplantation during breast cancer therapy // *Bone Marrow Transplantation*. — 2003. — Vol. 11. — P. 1037—1041.
17. Wondrak G. T. NQO1-activated phenothiazinum redox cyclers for the targeted bioreductive induction of cancer apoptosis // *Free Radic. Biol. Med.* — 2003. — Vol. 43. — P. 178—190.
18. McDonald G. B., Slattery J. T., Bouvier M. E. [et al.] Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity, and mortality following hematopoietic stem cell transplantation // *Blood*. — 2003. — Vol. 101. — P. 2043—2048.
19. Bjarnason I., MacPherson A., Hollander D. Intestinal permeability: an overview // *Gastroenterology*. — 1995. — Vol. 108. — P. 1566—1581.

20. Derikx J. P., Luyer M. D., Heineman E., Buurman W. A. Non-invasive markers of gut wall integrity in health and disease // World J. Gastroenterol.—2010.—Vol.16.—P.5272—5279.
21. Thuijjs G., Derikx J. P., de Haan J. J. [et al.] Urine-based detection of intestinal tight junction loss // J. Clin. Gastroenterol. — 2010. — Vol. 44. — P. e14—e19.
22. Stone W. L., Qui M., Smith M. Lipopolysaccharide enhances the cytotoxicity of 2-chloroethylethyl sulfide // BMC Cell Biol. — 2003. — Vol. 4. — 7 p. — doi:10.1186/1471-2121-4-1.