

# Уремический токсин паракрезол у больных с терминальной стадией ХПН

## Uremic toxin p-cresol in terminal kidney failure patients

Sivkov A.V., Sinyukhin V.N.,  
Bebeshko E.V.

Uremic toxins accumulate in patients with chronic kidney disease. These molecules may deteriorate the biochemical and physiological dysfunctions that define the uremic syndrome. Earlier studies concentrated on small water soluble and large middle molecules. However, the focus of the clinicians is shifting toward protein-bound uremic toxins recently. Protein-bound uremic toxins, including many kinds of different toxins, have been neglected for a long time and its clinical importance has been demonstrated in recent years. Para-cresol (p-cresol) belongs to the group of protein-bound uremic toxins and accumulates as renal function declines. In vivo, p-cresol exists predominantly as conjugated p-cresol sulfate and p-cresol glucuronide. However, previous reports demonstrated various toxic effects of total p-cresol in vitro. Their emphasis was placed on total p-cresol since the determination methods were based on deproteinization by acidification, leading to the disintegration of conjugates by hydrolysis. It was established that the production of conjugates correlates significantly with synthesis of maternal substance and its total concentration after hydrolysis reflects toxic effect. In our studies for quantification of total p-cresol we used high pressure liquid chromatography method after deproteinization of samples by acidification. It was found that in healthy control a total concentration of p-cresol was  $6.8 \pm 3.4 \mu\text{mol/l}$ . In haemodialysed patients it was  $48 \pm 8.7 \mu\text{mol/l}$ . In septic haemodialysed patients, there was a trend towards higher values ( $78 \pm 9.3 \mu\text{mol/l}$ ). It seems to us that very high concentrations of p-cresol in terminal kidney failure may be useful as a prognostic factor of inflammatory disease.

А.В. Сивков, В.Н. Синюхин, Е.В. Бебешко

НИИ урологии Минздравсоцразвития РФ, Москва

В последние годы научный прогресс и внедрение его достижений в медицинскую науку привели к коренному пересмотру взглядов на патогенез многих заболеваний. Это касается и почечной недостаточности. В настоящее время можно утверждать, что клинические проявления почечной недостаточности в значительной степени определяются накоплением в организме больного большого количества еще не идентифицированных продуктов метаболизма органических соединений, которые в норме выводятся с мочой с помощью активных транспортных механизмов и не удаляются гемодиализом. Поэтому в термин «уремия» нельзя включить только изменения внеклеточного объема жидкости, накопление неорганических ионов и отсутствие в организме больного целого ряда соединений, вырабатываемых в почечной паренхиме и необходимых для нормальной функции. Адекватное восстановление гомеостаза у больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН) происходит только после трансплантации почки, когда восстанавливается выведение уремических токсинов. Следует признать, что с помощью различных терапевтических методов лечения процесс декомпенсации почечной функции замедляется.

К сожалению, стандартные методы оценки функции почек в до-

статочной степени не отражают тяжести метаболических изменений в организме больного. Признаки уремии, типичные для терминальной стадии почечной недостаточности, могут присутствовать и у больных с относительно приемлемой функцией почек. Исследование, проведенное в США на 8 млн больных с почечной недостаточностью, выявило симптомы, характерные для терминальной ХПН, при скорости клубочковой фильтрации в пределах  $60 \text{ мл/мин}/1,73 \text{ м}^2$  [1].

Только относительно небольшой части больных с терминальной стадией ХПН, находящихся на гемодиализе, удастся провести трансплантацию почек. Так, согласно американским данным, в 2004 г. только трети больных с терминальной ХПН удалось провести трансплантацию почек. Некоторые больные находились на диализе десятилетиями, но в среднем их 5-летняя выживаемость составляла 35%, по разным причинам они госпитализировались в стационар дважды в год, а их качество жизни можно оценить как «низкое» [2].

Симптоматика, проявляющаяся у диализных больных, в полной мере не может быть отнесена к классической уремии. У этих больных появилось новое заболевание, которое Depner T.A. очень метко назвал «резидуальным синдромом» [3]. Он включает в себя все недостатки лечения диализного больного: сильные колебания внеклеточного

объема жидкости, продолжительный контакт с бионесовместимыми материалами, неадекватная коррекция электролитного баланса, ацидоз и гиперфосфатемия. Хотя «ризикулярный синдром» – это комплексное понятие, можно с большим основанием утверждать, что в значительной степени его клинические проявления обусловлены накоплением в организме больного продуктов метаболизма органических соединений. Действительно, терапия гемодиализом начинается в тех случаях, когда скорость клубочковой фильтрации составляет только 7% от нормальной, а клиника уремии в полном разгаре. Диализ только уменьшает симптомы уремии и сохраняет жизнь больного, но полностью не решает проблему лечения уремического состояния [3]. С другой стороны, успешная трансплантация почки, которая восстанавливает скорость клубочковой фильтрации в пределах 50% от нормальных величин, приводит к значительному уменьшению выраженности «ризикулярного синдрома» и улучшению качества жизни: восстановлению сна, ментальности, общего физического состояния, сексуальной функции у взрослых и роста у детей [4].

Хотя известно, что растворимые органические соединения, накапливающиеся при уремии, определяют клинику течения заболевания, выделить и идентифицировать то или иное вещество, точно связанное с определенным симптомом, необычайно сложно, так как большое количество симптомов обуславливается наличием большого числа органических соединений. По мнению The European Toxins Working Group развитие хроматографии и масс-спектрометрии только расширяет список определяемых веществ [5]. Структура их весьма разнообразна – это пептиды, гуанидины, фенолы, индолы, алифатические амины, фураны, полиолы, нуклеозиды, дикарбоновые кислоты карбонилы

и.т.д. Пептиды не выводятся при гемодиализе, количество гуанидинов в крови увеличивается у диализного больного и их полное выведение проблематично, алифатические амины имеют большой объем распределения и поэтому их выведение затруднено, полиолы выводятся только после метаболизма в почках, фенолы и фураны прочно связаны с альбумином и их невозможно вывести при диализе. Большинство этих веществ (например, фенолы) образуется при метаболизме пищевых продуктов кишечной флорой или просто поступает в организм в измененном виде.

В последние годы мировое медицинское сообщество всеми способами пытается решить проблему выведения уремических токсинов, находящихся в свободном состоянии в кровотоке. В исследовании НЕМО было показано, что проведение диализной процедуры три раза в неделю не способно вывести низкомолекулярные белки и мочевины [6], их выведение можно увеличить гемодиализацией [7]. Встал вопрос об увеличении продолжительности времени диализа. Этого можно добиться за счет проведения ночных сессий или проведения процедуры шесть раз в неделю. Было установлено, что проведение ночного гемодиализа вызывает увеличение выведения растворенных органических веществ и продолжительности сна [8]. Однако выведение уремических токсинов сильно связанных с белком остается проблематичным. Это связано не с их молекулярным весом, а с тем, что при гемодиализе выводятся вещества, находящиеся в свободном состоянии. Установлено, что некоторые из связанных с белком субстанций, необычайно токсичны и их уровень в крови в несколько раз превосходит уровень веществ, находящихся в свободном состоянии [8]. В этом году в Journal of renal nutrition был опубликован новый список этих соединений. К ним относятся:

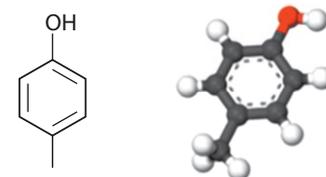


Рисунок 1. Скелетная формула и 3D модель паракрезол

- конечные продукты гликирования, накопление которых стимулирует воспалительную реакцию и вызывает сосудистые заболевания;
- 3-карбокси-4-метил-5-пропил-2-фуран-пропионовая кислота (СМРФ), блокирующая связывание лекарственных веществ с альбумином и вызывающая нейропатию и анемию;
- цитокины, диметилгуанидин, тормозящий активность Са-АТФазы;
- гиппуровая кислота, вызывающая нетолерантность к глюкозе и блокаду связывания лекарств с белком;
- гомоцистеин, накопление которого приводит к возникновению сосудистых заболеваний и детоксификации;
- индол-3-уксусная кислота, обладающая цитотоксичностью и способная вызвать нейропатию. Следует отметить индоксил сульфат, который может снизить функцию цитовидной железы, эндотелия, детоксификацию, блокировать репаративные процессы, реакцию остеобластов на паратгормон и связывание лекарств с белком, стимулировать оксидативный стресс и пролиферацию клеток гладкой мускулатуры и кальцификацию аорты;
- кинуренин и хинолиновая кислота, вызывающие нейропатию;
- фенолуксусная кислота, тормозящая выработку NO. Особое внимание вызывают фенолы, приводящие к дисфункции иммунной системы и нейропатии [9].

Самое большое количество работ, посвященных исследованию уремических токсинов, занимает р-крезол (рисунок 1). Он образуется в кишечнике из тирозина при

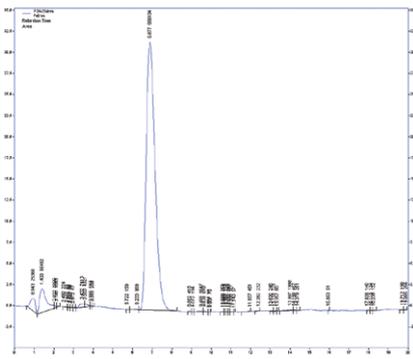


Рисунок 2. Хроматограмма стандартного раствора р-крезола



Рисунок 3. Концентрация паракрезола при нормальной функции почек и терминальной ХПН



Рисунок 4. Концентрация паракрезола у больных с терминальной стадией ХПН на фоне гнойных осложнений в мкмоль/л

участии *Enterobacteria* и *Clostridium perfringens*. Тирозин сначала превращается в 4-гидроксифенилуксусную кислоту или гидроксibenзойную кислоту и при последующем декарбоксилировании – в р-крезол или фенол. Он является предиктором не только сердечно-сосудистой, но и общей летальности у больных с ХПН. Показано, что р-крезол тормозит, вызванный цитокинами, процесс экспрессии молекул адгезии на эндотелии, который является ключевым моментом в защите от бактериальной инфекции, а также образования ROS-активных кислородных соединений с последующей блокадой врожденного иммунитета

и повышения вероятности возникновения гнойных осложнений [10].

**Целью настоящего исследования** было налаживание жидкостно-хроматографического определения р-крезола и измерение его концентраций в крови больных с нормальной функцией почек и при терминальной стадии почечной недостаточности на фоне гнойно-воспалительных осложнений и без них.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Количественное определение р-крезола проводилось по модифицированному методу Niwa [11]. 1 мл сыворотки крови больного закислался до pH = 1M раствором соляной кислоты и насыщался 1,0 г хлористого натрия. После этого проводилась экстракция пробы этилацетатом, и она центрифугировалась при 2000 оборотах в минуту. Различные количества надосадка вводились в хроматограф. Для количественного определения р-крезола была построена калибровочная кривая в пределах концентраций 0-150 мкмоль/л. В качестве стандарта использовался р-крезол фирмы Fluka. Был приготовлен его водный раствор, различные разведения которого прошли стандартную процедуру экстракции. Хроматографирование проходило на жидкостном хроматографе Finnigan Surveyor® фирмы Thermo scientific на колонке BDS Hypersil C18 в системе ацетонитрил-вода (15/75) в изократическом режиме при скорости потока 0,5 мл в минуту. Использовался диодно-матричный детектор, определение проводилось при 280 нм, время удерживания р-крезола составило 7,5 мин. На рисунке 2 представлена хроматограмма стандартного раствора р-крезола.

Основную группу использования составили 9 больных с терминальной стадией почечной недостаточности, которые проходили лечение в отделении оперативной нефрологии и пересадки почки

НИИ урологии. Контрольную группу составили 6 больных с варикоцеле, не имеющие соматических заболеваний. У трех больных основной группы развилось септическое состояние, и у них было проведено повторное определение концентрации р-крезола.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Большое количество данных по концентрации р-крезола в крови больных было получено в семидесятых годах прошлого века. De Smet с соавт. опубликовали данные о концентрации этого соединения у больных с терминальной ХПН, которая составляла в среднем  $108 \pm 53$  мкмоль/л. Наибольший зарегистрированный уровень этого вещества был 248 мкмоль/л [12]. Другие авторы приводят несколько иные результаты. Так, концентрация общего р-крезола у больных на гемодиализе составляла  $89 \pm 49$  мкмоль/л, при этом содержание свободного соединения было  $11 \pm 9$  мкмоль/л. [13]. В работе Niwa [11] у больных с терминальной ХПН эта величина равнялась  $50 \pm 29$  мкмоль/л, на перитонеальном диализе концентрация р-крезола была  $62 \pm 20$  мкмоль/л.

Показано, что *in vivo* р-крезол существует в основном в виде двух почти полностью связанных с альбумином соединений: р-крезол сульфата и глюкоронида, неконъюгированное соединение определяется в очень небольших количествах [14]. Следует отметить, что практически все лабораторные исследования токсикологического профиля этого вещества основаны на методе депротеинизации р-крезола методом ацидификации, что приводит к гидролизу конъюгатов и определению общего р-крезола [15]. Кроме того, установлено, что существует прямая зависимость между продукцией р-крезола и образованием конъюгатов. Считают, что нет принципиальной разницы связан

ли токсический эффект с материнской субстанцией или конъюгатами [15]. В последнее время при мониторинге концентрации *p*-крезола в клинических условиях определяют общую концентрацию этого вещества, полученную после кислотного гидролиза сыворотки крови, а для детектирования соединения применяют диодно-матричный детектор, обладающий большой чувствительностью и дающий возможность значительно упростить процедуру пробоподготовки перед хроматографированием [16]. Мы в своих исследованиях также использовали эту возможность и проводили определение концентрации общего *p*-крезола. Оказалось, что концентрация общего *p*-крезола у больных с нормальной функцией почек составляла  $6,8 \pm 3,4$  мкмоль/л. При терминальной стадии почечной недостаточности она увеличивалась до  $48 \pm 8,7$  мкмоль/л

(рисунок 3). Эти результаты вполне соответствуют приведенным выше литературным данным. У трех больных эта величина была значительно выше и составляла  $78 \pm 9,3$  мкмоль/л, что позволило нам выделить их в отдельную группу. У этих пациентов в последующем, как правило, возникали септические состояния (рисунок 4). Из литературы известно, что *p*-крезол тормозит функцию лейкоцитов [17]. Кроме того, было установлено, что это соединение ингибирует ROS-продукцию у стимулированных лейкоцитов и экспрессию CD 11b на полинуклеарах [18], подавляет, вызванную цитокинами, экспрессию молекул адгезии на эндотелии, что считается ключевым моментом защиты от бактериальных инфекций [19]. Согласно мнению de Carvalho с соавторами (2011) [18] накопление *p*-крезола является прогностическим фактором возникновения ин-

фекционного процесса у больных с ХПН.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В крови больных с терминальной стадией почечной недостаточности определяются высокие концентрации уремического токсина *p*-крезола. Его средняя концентрация у больных с терминальной ХПН на гемодиализе составляла  $48 \pm 8,7$  мкмоль/л. У отдельной группы пациентов она была еще более высокой и равнялась  $78 \pm 9,3$  мкмоль/л. У этой группы пациентов возникло септическое состояние. По-видимому, высокая концентрация *p*-крезола в крови больных с терминальной ХПН может служить прогностическим фактором возникновения гнойных осложнений. Необходимо дальнейшее накопление клинического материала и исследование у этой группы пациентов клеточного и гуморально-го иммунитета. ■

**Ключевые слова:** хроническая почечная недостаточность, уремические токсины, *p*-крезол, жидкостная хроматография.

**Keywords:** chronic kidney failure, uremic toxins, *p*-cresol, liquid chromatography.

## ЛИТЕРАТУРА

- Coresh J., Byrd-Holt D., Astor B.C., Briggs J.P., Eggers P.W., Lacher D.A., Hostetter T.H. Chronic kidney disease awareness, prevalence, and trends among U.S. adults, 1999 to 2000 // J Am Soc Nephrol. 2005. Vol. 16. P. 180-188.
- USRDS 2006 annual data report: atlas of end-stage renal disease in the United States. Bethesda, MD: U.S. Renal Data System, 2006.
- Depner T.A. Uremic toxicity: urea and beyond. // Semin Dial. 2001. Vol. 14. P. 246-251.
- Valderrabano F., Jofre R., Lopez-Gomez J.M. Quality of life in end-stage renal disease patients // Am J Kidney Dis. 2001. Vol. 38. P. 443-464.
- Vanholder R., De Smet R., Glorieux G., Argilés A., Baurmeister U., Brunet P., Clark W., Cohen G., De Deyn P.P., Deppisch R., Descamps-Latscha B., Henle T., Jörres A., Lemke H.D., Massy Z.A., Passlick-Deetjen J., Rodriguez M., Stegmayr B., Stenvinkel P., Tetta C., Wanner C., Zidek W. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability // Kidney Int. 2003. Vol. 63. P. 1934-1943.
- Eknoyan G., Beck G.J., Cheung A.K., Daugirdas J.T., Greene T., Kusek J.W., Allon M., Bailey J., Delmez J.A., Depner T.A., Dwyer J.T., Levey A.S., Levin N.W., Milford E., Ornt D.B., Rocco M.V., Schulman G., Schwab S.J., Teehan B.P., Toto R., Hemodialysis (HEMO) Study Group. Effect of dialysis dose and membrane flux in maintenance hemodialysis // N Engl J Med. 2002. Vol. 347, № 25. P. 2010-2019.
- Canaud B., Morena M., Leray-Moragues H., Chalabi L., Cristol J.P. Overview of clinical studies in hemodiafiltration: what do we need now? // Hemodial Int. 2006. Vol. 10, Suppl 1. P.5-12.
- Hanly P.J., Pierratos A. Improvement of sleep apnea in patients with chronic renal failure who undergo nocturnal hemodialysis // N Engl J Med. 2001. Vol. 344. P. 102-107.
- Vanholder R., Schepers E., Pletinck A., Neiryck N., Glorieux G. An update on protein-bound uremic retention solutes // J Ren Nutr. 2012. Vol. 22, № 1. P. 90-94.
- Dou L., Cerini C., Brunet P., Guilianelli C., Moal V., Grau G., De Smet R., Vanholder R., Sampol J., Berland Y. *p*-cresol, a uremic toxin, decreases endothelial cell response to inflammatory cytokines. // Kidney Int. 2002. Vol. 62, № 6. P. 1999-2009.
- Niwa T. Phenol and *p*-cresol accumulated in uremic serum measured by HPLC with fluorescence detection // Clin Chem. 1993. Vol.39, № 1. P. 108-111.
- De Smet R., David F., Sandra P., Van Kaer J., Lesaffer G., Dhondt A., Lameire N., Vanholder R. A sensitive HPLC method for the quantification of free and total *p*-cresol in patients with chronic renal failure // Clin. chim. Acta. 1998. Vol. 278. P. 1-21.
- Wengle B., Hellström K. Volatile phenols in serum of uraemic patients // Clin Sci. 1972. Vol. 43. P. 493-498.
- De Loor H., Bammens B., Evenepoel P., De Preter V., Verbeke K. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis for measurement of *p*-cresol and its conjugated metabolites in uremic and normal serum // Clin. Chem. 2005. Vol. 51, № 8. P. 1535-1538.
- De Smet R., Van Kaer J., Van Vlem B., De Cubber A., Brunet P., Lameire N., Vanholder R. Toxicity of free *p*-cresol: a prospective and cross-sectional analysis // Clin. Chem. 2003. Vol. 49, № 3. P. 470-478.
- Cheng-Jui Lin, Chih-Kuang Chuang, Hsuan-Liang Liu, Tuen-Jen Wang Han-Hsiang Chen, Fang-Ju Sun and Chih-Jen Wu The serum levels of *p*-cresol and Indoxyl sulfate in different hemodialysis vintage // J Clin Medicine and Research. 2011. Vol. 3, № 8. P. 114-119.
- Vanholder R., De Smet R., Waterloos M.A., Van Landschoot N., Vogel-eere P., Hoste E., Ringoir S. Mechanisms of uremic inhibition of phagocyte reactive species production: characterization of the role of *p*-cresol. // Kidney Int. 1995. Vol. 47. P. 510-517.
- de Carvalho J.T. Jr, Dalboni M.A., Watanabe R., Peres A.T., Goes M.A., Manfredi S.C., Canziani M.E., Cendoroglo G.S., Guimarães-Souza N., Batista M.R., Cendoroglo M. Effects of spermidine and *p*-cresol on polymorphonuclear cell apoptosis and function // Artif Organs. 2011. Vol. 35, № 2. P. 27-32.
- Laetitia Dou, Claire Cerini, Philippe Brunet, Catherine Guilianelli, Valérie Moal, Georges Grau, Rita De Smet, Raymond Vanholder, José Sampol and Yvon Berland. *p*-cresol, a uremic toxin, decreases endothelial cell response to inflammatory cytokines // Kidney International 2002. Vol. 62, P. 1999-2009.