

Wielonarządowe następstwa akumulacji toksyn mocznicowych

Wzrost kumulacji toksycznych metabolitów w przebiegu niewydolności nerek może być przyczyną zróżnicowanych i często trudnych do interpretacji objawów klinicznych. W warunkach prawidłowych nerkowy filtr kłębuszkowy oczyszcza organizm z cząsteczek o masie cząsteczkowej do 58 kDa. Zróżnicowany skład i stężenie w osoczu substancji zatrzymanych w organizmie zależy z jednej strony od obniżenia filtracji kłębuszkowej lub metabolizmu nerkowego, z drugiej natomiast dotyczy składników swoiście powiązanych z procesami metabolicznymi, funkcją i uszkodzeniem różnych typów komórek i narządów nie-nerkowych. Udowodnienie toksyczności tych składników i wyjaśnienie ich powiązań z wielonarządowymi objawami klinicznymi podlega ścisłym kryteriom, dotyczącym ustalenia ich budowy, charakterystyki biologicznej oraz roli w rozwoju procesów patologicznych. We współczesnej diagnostyce laboratoryjnej brakuje odpowiednich wskaźników dla oceny pełnego obrazu złożonej toksyczności składników mocznicowych zakumulowanych w przebiegu kolejnych etapów niewydolności nerek. Wylania się pilna potrzeba poszukiwania bardziej swoistych w porównaniu z mocznikiem i kreatyniną parametrów, dostarczających logicznych podstaw dla nowych działań terapeutycznych skutecznie zabezpieczających lub spowalniających wielonarządowe uszkodzenia wywołane obecnością tych toksyn. W przedstawionej pracy zaprezentowano podejmowane próby klasyfikacji trucizn mocznicowych, z uwzględnieniem ich właściwości chemicznych, udziału w procesach patofizjologicznych oraz lokalizacji narządowej ich tworzenia a także przeanalizowano zasady ustalania ich toksyczności. Fakty zaprezentowane w tej pracy wyraźnie pokazują, że do chwili obecnej została wyjaśniona zaledwie niewielka część tych problemów.

(NEFROL. DIAL. POL. 2015, 19, 81-86)

Multi-organ consequences of uraemic compound accumulation

Increased accumulation of toxic metabolites in the course of renal dysfunction may cause various clinical symptoms which frequently are difficult to interpret. In health, renal glomerular filtration clears particles with the molecular weight of up to 58 kDa from the blood. Diverse plasma composition and concentration of the retained products is due to reduced glomerular filtration or renal metabolism while some compounds are specifically associated with particular metabolic processes, and the impaired function and damage of different non-renal cell types and organs. Proving the toxicity of such compounds and explaining their relationship to multi-organ clinical symptoms must satisfy strict criteria employed to determine the parameters of their structure and biological characteristics as well as their role in the development of pathological processes. In contemporary laboratory diagnostics there are no suitable markers for use in comprehensive evaluation of complex toxicity of uraemic compounds accumulated in successive stages of developing renal dysfunction. Novel parameters are needed, more specific than urea and creatinine, to provide a sound basis for treatments which would effectively protect against or slow down multiple organ injury caused by uraemic toxins. This study presented a classification of uraemic compounds, based on their chemical properties, role in pathophysiological processes and the organs where they are formed and discuss the principles of determining their toxicity. It may be concluded that up to now only a fraction of these issues has been elucidated.

(NEPROL. DIAL. POL. 2015, 19, 81-86)

Ostra niewydolność nerek (Acute Kidney Injury – AKI) i przewlekła choroba nerek (PChN) prowadząca do niewydolności narządu związane są z nadmierną kumulacją wielu potencjalnie toksycznych metabolitów. Zatrzymane substancje mogą być określane jako toksyny jedynie wtedy kiedy przy pomocy uznanych standardów zostanie udowodnione ich toksyczne oddziaływanie na biologiczne funkcje organizmu. Uzy-

skanie takich informacji stwarza podstawę do obiektywnego potwierdzenia powiązań między zróżnicowanymi i często trudnymi do interpretacji objawami klinicznymi a stężeniem tych substancji w materiałach biologicznych, uzupełnienia brakujących ogniw patofizjologicznych między progresywnym uszkodzeniem nerek a utratą funkcji narządów nie-nerkowych oraz wyłonienia nowych specyficznych diagnostycznie i

Barbara LISOWSKA-MYJAK
Ewa SKARŻYŃSKA

Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik:
Prof. dr hab. Grażyna Nowicka

Słowa kluczowe:

- toksyny mocznicowe
- niewydolność nerek

Key words:

- uremic toxins
- renal dysfunction

Praca została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2011/01/B/NZ7/00648

Adres do korespondencji:
Dr hab. Barbara Lisowska-Myjak
Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
e-mail: basia.myjak@interia.pl

narządowo wskaźników przydatnych w rutynowej diagnostyce klinicznej. Zarysowują się także indywidualne grupy ryzyka jak dzieci, kobiety w ciąży, chorzy przewlekłe leczeni, pacjenci z chorobami wątroby, chorobami sercowo-naczyniowymi, pacjenci po przeszczepach narządów, u których kontrola nad rodzajami i stężeniem metabolitów organicznych prowokujących dodatkowe, niezwiązane z podstawowym rozpoznaniem objawy kliniczne staje się priorytetowym celem diagnostycznym [1-9].

Obraz kliniczny wywołany przez akumulację w organizmie substancji prawidłowo wydalanych do moczu nazywany jest zespołem mocznicowym. Mimo, że objawy kliniczne zespołu mocznicowego ustalono już dekady temu wiedza na temat pochodzenia, budowy chemicznej i składu zatrzymanych w organizmie substancji endogennych odpowiedzialnych za te zmiany pozostaje ciągle niekompletna. Wskazuje się na 2 źródła trucizn w przebiegu niewydolności nerek, których obecność i stężenie mogą decydować o intensywności objawów klinicznych. Pierwsze jest wynikiem obniżenia filtracji kłębuszkowej lub metabolizmu nerkowego, drugie natomiast efektem uszkodzenia nienerkowych organów, obejmującym szeroki zakres składników swoiście powiązanych z procesami metabolicznymi i funkcją różnych typów komórek i narządów [3-6, 9-11].

W ostatnich latach dzięki nowoczesnym technikom badawczym pojawiły się nowe perspektywy rozwiązywania złożonego problemu identyfikacji, określenia budowy chemicznej, właściwości biologicznych oraz ustalenia metod analitycznych dla oznaczenia stężeń zatrzymanych składników mocznicowych. Rozpoznanie toksyczności zarówno indywidualnych składników jak i ich paneli oraz próba zrozumienia niejasnych objawów klinicznych jako efektu ich wielonarządowego działania są na razie na etapie rozwiązywania. Głównym celem strategicznym uzyskania tych informacji jest znalezienie skutecznej terapii dla przeciwdziałania toksycznym efektem trucizn mocznicowych na różnych etapach AKI i PChN [1,5].

Metody segregacji składników mocznicowych

Liczna i ciągle zwiększająca się grupa składników mocznicowych nasuwa potrzebę ich klasyfikacji zgodnie z ich właściwościami. Składniki różnią się między sobą budową chemiczną, rozpuszczalnością w wodzie, zdolnością przyłączania do białka, ciężarem cząsteczkowym, łatwością ich usuwania w czasie dializy, właściwościami biologicznymi i rolą w powiązaniu z objawami klinicznymi. Ich stężenie w osoczu waha się od kilku pikomoli/L (dla interleukin) do mikromoli/L (dla kwasu fenylooctowego). Najwyższą masą cząsteczkową wyróżnia się orozomukoid (kwaśnia α 1- glikoproteina) [5,6,12-14]. W poszukiwaniach podstaw do dalszej, bardziej szczegółowej klasyfikacji składników można brać pod uwagę podobieństwo ich struktur chemicznych, wspólną funkcję biologiczną lub narządową albo lokalizację anatomiczną.

Klasyfikacja składników mocznicowych wg EUTox [5,6,14-16]

W oparciu o 85 publikacji z lat 1968-2002 oceniających więcej niż 500 000 pacjentów grupa badawcza EUTox (European Uremic Toxin Work Group) utworzyła listę substancji z prawdopodobną lub z udowodnioną aktywnością biologiczną, których akumulacja w organizmie jest efektem schyłkowej niewydolności nerek. Podział tych składników na 3 grupy uwzględnia masę cząsteczkową, zdolność do przyłączania się do białka oraz możliwość ich usuwania z organizmu przez dializę:

- małe (masa cząsteczkowa <500Da) rozpuszczalne w wodzie (Low Molecular Weight Water Soluble Uremic Toxins), łatwo usuwane z tożyska naczyniowego w przebiegu dializy. Składniki te mogą występować w formie wolnej rozpuszczalnej w wodzie lub przyłączają się do białek osocza, co może zmieniać zarówno ich podstawową funkcję jak i białka transportującego. Najbardziej popularne z nich to: ADMA (asymetryczna dimetyloarginina), kreatyna, kreatynina, kwas hialuronowy, guanidyna, guanidyno-octan, guanidynobursztynian, szczawiany, SDMA (symetryczna dimetyloarginina), mocznik, kwas moczowy.

- składniki mocznicowe przyłączone do białek (protein-bound solutes) - mimo, że większość składników z tej grupy ma masę cząsteczkową mniejszą niż 500 Da, uznaje się je jako „trudne do usunięcia” przez dializę ze względu na ich zdolność do łączenia się z białkami. Głównymi składnikami tej grupy są: AGEs (advanced glycation end products - końcowe produkty zaawansowanej glikacji), kwas karboksy metylo-propylo furanpropionowy, cytokiny, interleukiny, TNF- α (tumor necrosis factor- α), dwumetyloguanidyny, kwas hipurowy, homocysteina, kwas indolo-3-octowy, glukuronid indoksyli, siarczan indoksyli (indoxylsulfate - IS), kwas kinurenowy, kinurenina, leptyna, związki fenolowe, siarczan p-krezylu (p-cresylsulfate- pCS), glukuronid p-krezylu, siarczan fenolu, glukuronid fenolu, kwas fenylooctowy, kwas chinolinowy, białko wiążące retinol.

- składniki o masie cząsteczkowej większej niż 500 Da (middle molecules) - więcej niż 50 składników przyczynowo powiązanych z powstawaniem i rozwojem wielu procesów patofizjologicznych m.in. adiponektyna, cystatyna C, leptyna, motylina, orozomukoid, α 1-mikroglobulina, endotelina, grelina, osteokalcyna, ANP (przedsionkowy peptyd natriuretyczny), prolaktyna, białko wiążące retinol, β 2-mikroglobulina, cholecytokinina, wazoaktywny peptyd jelitowy.

Klasyfikacje składników mocznicowych z uwzględnieniem podobieństwa budowy chemicznej [5,8,15]

- *Guanidyny* (pochodne mocznika). Należą tu: kwas α -keto- δ -guanidinowalerianowy, α -N-acetyloarginina, ADMA, arginina, kwas β -guanidinopropionowy, kreatyna, kreatynina, kwas γ -guanidynomastowy, guanidyna, kwas guanidyno-octowy, kwas guanidynobursztynowy, metyloguanidyna, SDMA, taurocyamina. Mimo, że składniki guanidynowe należą do *small water-soluble compounds* o podobnej do mocznika i kreatyniny charakterystyce fizykochemicznej, dla wielu z

nich udowodniono istotnie większą objętość dystrybucji w porównaniu z mocznikiem, co może wpływać na obniżenie ich efektywnego usuwania z organizmu.

Pochodne purynowe: cytydyna, hipokantyna, ksantyna, kwas moczowy

Pochodne pirymidynowe: tymina, kwas orotowy, orotydyna, urydyna

Metylowe pochodne amin: metyloamina, dwumetyloamina, trimetyloamina

P o c h o d n e f e n y l o w e : 2-metoksyrozorcynol, fenol, hydroksychinon, p-krezol

Pochodne indolowe: kinurenina, indolo-3-octan, kwas kinureninowy, melatonina, IS, kwas chinolinowy.

Końcowe produkty zaawansowanej glikacji (Advanced glycation end products -AGEs) jako przykład klasyfikacji zatrzymanych składników mocznicowych wg ich źródła metabolicznego [5,9]

AGEs są efektem chemicznej reakcji łańcuchowej po początkowym procesie glikacji. Wzrost ich stężenia w organizmie powiązany z indukacją procesów biochemicznych (stres oksydacyjny) oraz z powstawaniem wielu chorób (głównie przewlekłych chorób zapalnych). Składniki te mogą być absorbowane z jelita lub tworzone w organizmie w wyniku procesów metabolicznych. Duże cząsteczki AGE nie mogą być filtrowane w kłębuszkach nerkowych. W wyniku proteolizy wewnątrzkomórkowej powstają peptydy AGE i AGE-free adducts (AGE przyłączone do pojedynczych aminokwasów), które uwolnione do osocza mogą być łatwo wydalane z moczem. Produkty rozpadu AGE są bardziej agresywne w ich toksycznym oddziaływaniu niż natywne postaci AGEs. Według EUTox następujące składniki należące do tej grupy związków zostały zakwalifikowane jako potencjalne toksyny: 3-dezoksyglukoza, fruktozylizyna, glioksal, metyloglioksal, N ϵ -karboksymetylolizyna (CML), N ϵ -karboksyetylizyna (CEL), pen-tozydina. Niedostateczna eliminacja AGEs w kolejnych etapach niewydolności nerek może prowadzić do ich akumulacji w organizmie. Pacjenci z łagodnym uszkodzeniem nerek bez konieczności dializy wykazują 5-krotny wzrost, leczeni dializą otrzewnową 18-krotny a hemodializą 40-krotny wzrost stężenia AGE-free adducts w stosunku do wartości prawidłowych. Indywidualna ocena dwóch głównych przedstawicieli AGEs free adducts - CML i CEL u pacjentów z PChN wykazała wprawdzie niską ich toksyczność w stężeniach mocznicowych, jednak dobrze teoretycznie uzasadniony udział AGEs w ważnych dla fizjologii procesach, wskazuje na konieczność systematycznej analizy nie tylko wybranych przedstawicieli, ale raczej paneli AGEs nagromadzonych w organizmie w przebiegu niewydolności nerek.

Składniki mocznicowe produkowane w jelicie jako przykład klasyfikacji wg lokalizacji narządowej ich tworzenia [11,15,17,18]

Izolowana przestrzeń jelita ułatwia identyfikację, charakteryzację i opracowanie metod terapeutycznych dla zahamowania produkcji i wchłaniania toksycznych dla or-

ganizmu składników dostarczonych do jelita z pokarmem i/lub tworzonych wewnątrz jelita przez bakterie. Wiedzę o roli jelita grubego dla produkcji toksyn mocznicowych uzyskano poprzez porównanie ich jakościowego i ilościowego składu w osoczu między pacjentami hemodializowanymi z zachowanym i usuniętym jelitem grubym. Zidentyfikowano składniki występujące wyłącznie u pacjentów z jelitem grubym, w tym wiele specyficznych składników mocznicowych, których źródłem są bakterie. Charakterystyka dużej części z nich jest obecnie niemożliwa ze względu na brak porównywalnych dla nich wzorców w dostępnych bazach danych. Dotychczas wyłoniono 2 ugrupowania chemiczne charakterystyczne dla substancji produkowanych przez bakterie jelita grubego: pochodne indolu (IS, glukuronid indoksyli, 5-hydroksyindol, kwas indolo-3-propionowy) i fenolu (pCS, glukuronid p-krezolu, siarczan fenylu, glukuronid fenylu, alfa-N-fenylacetyl-L-glutamina, fenylpropionylglicyna, cynamoylglicyna, siarczan 4-etylofenylu, kwas hipurowy). Aktywność biologiczną składników mocznicowych pochodzących z jelita grubego powiązano zarówno z wpływem na funkcję nerek jak odległych narządów nie-nerkowych (wątroba, mózg, śródbłonek) [10,11,19,20].

Składniki mocznicowe powiązane z funkcją śródbłonna naczyń [1,5,12]

Funkcje biologiczne składników mocznicowych powiązano z następującymi powszechnymi mechanizmami dysfunkcji śródbłonna [13,21,22]:

1. wzmocnienie objawów miażdżycy - w tym: aktywacja leukocytów (*poходne guanidyny, AGEs, pCs, polifosforany dinukleotydowe, IS*), wzrost adhezji komórek śródbłonna (*IS, VCAM-1 - vascular cell adhesion molecule-1*), migracji i proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń (*IS, AGEs*), destabilizacji blaszki miażdżycowej (*czynnik von Willebrand, trombomodulina, inhibitor aktywatora plazminogenu 1, metaloproteinazy*), obniżenie biodostępności tlenu azotu (*ADMA, AGEs, stres oksydacyjny, mikrocząsteczki śródbłonna naczyniowego*)
2. rozwój sztywności tętnic (*ADMA, AGEs, stres oksydacyjny*)
3. zwapnienie naczyń (*fosforany nieorganiczne, reaktywne formy tlenu, TNF- α , leptyna*)
4. nieprawidłowa naprawa naczyń (*IS, niektóre pochodne guanidyny*).

Składniki mocznicowe powiązane z procesami stanu ostrej fazy [11,17,23-27]

Należą tu składniki powiązane z uogólnioną odpowiedzią zapalną u pacjentów z obniżoną funkcją nerek. Zaburzona funkcja nerek może zwiększać odpowiedź zapalną w odpowiedzi na obniżony klirens nerkowy składników biorących udział w procesach antyoksydacyjnych, przeciwzapalnych, rozszerzających naczynia a które w prawidłowych warunkach ulegają filtracji w kłębuszkach nerkowych (ciężar cząsteczkowy <58 kD), w tym cytokiny prozapalne, orozomukoid, neopteryna i kalcytonina. Wzrasta ilość dowodów potwierdzających wpływ nieprawidłowej funkcji bariery jelitowej i potencjalnych toksyn produkowanych w jelicie (fenole, indole) lub wchłanianych z

pokarmem (AGEs) na rozwój stanu zapalnego. Obniżona funkcja nerek może także wpływać na poziom wielu białek ostrej fazy z dużymi masami cząsteczkowymi (CRP, α_2 -macroglobulina, fibrynogen, mieloperoksydaza) bezpośrednio lub pośrednio powiązanych z zapaleniem.

U pacjentów z PChN proces zapalny może być ściśle powiązany z przyspieszonym rozwojem miażdżycy, niedożywieniem i anemią poprzez różne mechanizmy. Zapalenie odgrywa kluczową rolę w pośredniczeniu progresji zmian PChN w odpowiedzi na infekcyjne i nie-infekcyjne uszkodzenie nerek. Wzrost stężenia wskaźników zapalenia przepowiada niekorzystne następstwa u pacjentów ze schyłkową niewydolnością i przewlekłym uszkodzeniem nerek.

Zaprezentowane klasyfikacje nie dostarczają wiedzy na temat toksyczności zatrzymanych składników. Jak dotychczas nie istnieje skuteczna metoda dla takiej ich charakterystyki.

Strategia ustalenia toksyczności zatrzymanych składników

Tylko dla kilku składników udało się potwierdzić ich właściwości odpowiadające ścisłej definicji toksyn mocznicowych. Nie wyklucza to jednak potencjalnej toksyczności innych zatrzymanych substancji oraz możliwości ich wykorzystania jako parametrów laboratoryjnych dla jakościowej i ilościowej oceny efektów klinicznych wynikających z zahamowania filtracji nerkowej. Wobec zwiększającej się ilości informacji literaturowych o nowych toksynach mocznicowych zarysowują się pytania i problemy dotyczące ustalenia zasad porównywania ich właściwości na podstawie wyników pochodzących z oddalonych ośrodków badawczych.

Mocznik i kreatynina należą do wspólnej grupy składników niskocząsteczkowych (*Low Molecular Weight Water Soluble Uremic Toxins*) i są najpopularniejszymi toksynami wykorzystywanymi w diagnostyce laboratoryjnej dla oceny niewydolności nerek. Termin „uremia” historycznie odnosi się do wzrostu stężenia mocznika w surowicy, jako najobficiej występującego składnika, rutynowo stosowanego dla oceny skuteczności dializy. Kreatynina natomiast jest jedynym spośród wszystkich zatrzymanych w organizmie składników mocznicowych, który we współczesnej praktyce klinicznej jest podstawą oceny biochemicznych/biologicznych a, co we współczesnej praktyce oznacza toksycznych efektów niewydolności nerek. Paradoksalnie, w odróżnieniu od wielu innych potencjalnych toksyn, zaledwie kilka publikacji dostarczyło informacji o zdolności mocznika lub kreatyniny do indukowania niekorzystnych efektów biochemicznych i fizjologicznych. Przy takim założeniu wątpliwości budzi dotychczasowa interpretacja diagnostyczna równań eGFR (estimated Glomerular Filtration Rate) na bazie pomiaru stężenia kreatyniny w surowicy zarówno dla wyznaczenia kolejnych etapów jak i aktywności niewydolności nerek. Zebrane dowody świadczą, że wartość e-GFR słabo i w sposób zróżnicowany koreluje z obecnością i aktywnością składników mocznicowych o udowodnionych właściwościach toksycznych. Współcześnie obowiązujące

kryteria bazujące jedynie na ocenie e-GFR w oparciu o stężenie kreatyniny w surowicy wydają się zatem niejasne i niewystarczające dla uzasadnienia decyzji o rozpoczęciu dializy [2,6,8,10,14,17,18].

W ciągu ostatniej dekady zidentyfikowano wiele nieznanych dotąd składników mocznicowych, które powiązano ze specyficznymi mechanizmami patofizjologicznymi. Strategia ustalenia ich toksyczności wymaga jednak zachowania ostrożności i przestrzegania wyraźnych wytyczonych następujących zasad [3-8,14,16-18,22,24-26,28]:

Badanie in vitro efektów biologicznych wywołanych przez kandydatów na toksyny mocznicowe są podstawą do ich dalszej selekcji poprzez pogłębione badania epidemiologiczne i kliniczne. Podkreśla się potrzebę adaptacji specyficznych modeli biologicznych, reprezentujących dysfunkcję określonych komórek, jak leukocytów dla oceny zmienionych procesów obronnych lub stresu oksydacyjnego, komórek śródbłonna dla chorób sercowo-naczyniowych, komórek mięśni gładkich dla oceny progresji miażdżycy, hepatocytów dla zaburzonego metabolizmu, fibroblastów dla procesów włóknienia, osteoblastów dla osteodystrofii nerkowej. Jeśli to możliwe należy używać komórek ludzkich, natomiast wybór modeli zwierzęcych należy ograniczać do gatunków, u których wcześniej udowodniono możliwość śledzenia procesów biologicznych odnoszących się do człowieka.

Dobór metod analitycznych jest podstawowym warunkiem umożliwiającym porównanie wyników stężenia analizowanych substancji toksycznych w różnych materiałach biologicznych *in vitro* i *in vivo* oraz między odległymi laboratoriami. Dla ilościowego pomiaru składników wykorzystano wiele technik izolacji i detekcji, w tym metody chromatograficzne (chromatografia jonowymienna, gazowa, HPLC), spektrofotometria, fluorymetria, chemiluminescencja, nefelometria, radioimmunometria, rezonans magnetyczny i spektrometrię mas. Metodyka oznaczeń powinna być odpowiednio czuła dla badanych składników, możliwa do powtórzenia w różnych ośrodkach a zakresy ilościowych pomiarów ściśle określone i analizowane z wielką ostrożnością w odniesieniu do różnych populacji.

Proteomika i genomika są cennymi narzędziami badawczymi nie tylko dla oceny znanych składników mocznicowych ale także dla poszukiwania i identyfikacji dotychczas nierozpoznanych substancji z ich potencjalnym wpływem na wybrane procesy chorobowe i funkcje narządów.

Metabolity potencjalnych składników mocznicowych mogą być przyczyną ich zmienionej toksyczności o innej niż wyjściowa aktywności biologicznej. Przykładem jest p-krezol tworzony przez bakterie jelitowe z tyrozyny i fenyloalaniny, który jest inhibitorem funkcji leukocytów, natomiast siarczan p-krezolu indukuje leukocyty do produkcji wolnych rodników, wykazując aktywność prozapalną.

Zdolność i/lub potencjalna kompartmentacja składników mocznicowych do przyłączania się do białek oraz proporcje między ilością frakcji wolnej i połączonej z

białkami mogą modyfikować toksyczność składników mocznicowych. Dotychczasowa problematyka powiązana z toksycznością składników połączonych z białkami skupia się przede wszystkim na trudnościach ich eliminacji przy użyciu powszechnych technik dializacyjnych.

Badanie eksperymentalne z wykorzystaniem 12 składników udowodniło różnice w proporcji ich połączenia z białkami. IS, pCS i CMPF (kwas 3-carboksy-4-methyl-5-propyl-2-furanopropionowy) nie mogły być skutecznie usunięte przez dializę ze względu na ich wysoki stopień powiązania z białkami. Powstaje pytanie, czy toksyczność tych samych składników pozostających w ich wolnych i związanych z białkami postaciach różni się oraz jaka jest ich rola jako parametrów laboratoryjnych? U pacjentów z PChN zdolność albuminy surowiczej do wiązania różnych substancji jest obniżona odpowiednio do kolejnych etapów niewydolności nerek i akumulacji składników mocznicowych przyłączonych do albuminy. Rozważa się wiele mechanizmów odpowiedzialnych za takie spostrzeżenia, w tym hipalbuminemię, akumulację substancji endogennych wykazujących kompetycję w stosunku do miejsca przyłączania do albuminy lub zmiany konformacyjne w cząsteczce albuminy.

Ilościowa ocena zdolności transportowej albuminy (Albumin-binding capacity) może być cennym narzędziem laboratoryjnym dla oceny akumulacji wolnych składników mocznicowych w osoczu. Albumina jest ważnym białkiem transportowym dla nierozpuszczalnych w wodzie leków i toksyn. Więcej niż 90% składników mocznicowych w osoczu jest transportowane po przyłączeniu do albuminy, ale część przyłączona pozostaje w szybkiej, silnej ale odwracalnej równowadze z częścią wolną. Najlepiej poznanymi składnikami mocznicowymi przyłączonymi do albuminy są IS i siarczan p-krezylu, które nie tylko krążą w ustroju nie-kowalencyjnie przyłączone do tego białka, ale konkurują o to samo miejsce przyłączenia [22].

Toksyczne współdziałanie zatrzymanych składników mocznicowych

Zatrzymane składniki mocznicowe w przebiegu uszkodzenia nerek mogą wykazywać wzajemne wielokierunkowe oddziaływanie [10,16,18]:

- rozpuszczalne guanidyny są odpowiedzialne za tworzenie TNF-alfa i IL-6 (dwa składniki z grupy *middle molecules*)

- IS indukuje tworzenie wolnych rodników w komórkach kanalików nerkowych i komórkach mezangialnych kłębuszka aktywując ścieżkę NF kappaB

- na wzrost ADMA może mieć wpływ zahamowanie enzymu DDAH (dimethylarginine dimethylaminohydrolase) przez hiperhomocystynemię (*protein-bound compound*). Obniżenie homocystynemii może wpływać zarówno na poziom DDAH jak i ADMA

- SDMA i jej strukturalny analog ADMA (dwa składniki *small water-soluble compounds*) wykazują podobny efekt biologiczny hamowania syntezy tlenu azotu, aczkolwiek przez inne mechanizmy działania

- *In vitro* siarczan p-krezylu indukuje

leukocyty do produkcji wolnych rodników, zwiększając swoją aktywność po dodaniu glukuronidu p-krezylu aczkolwiek sam glukuronid p-krezylu nie ma wpływu na ten proces.

Czy istnieje jeden idealny parametr czy raczej panel parametrów dla oceny toksyczności zatrzymanych składników?

W warunkach prawidłowych nerkowy filtr kłębuszkowy oczyszcza organizm z cząstek o ciężarze do 58 kDa. Wszystkie substancje zatrzymane w organizmie w wyniku zaburzonej funkcji nerek są kandydatami na toksyny mocznicowe. Warunki jakie powinna spełniać zatrzymana substancja przed zakwalifikowaniem jej do toksyn [2,4,5,8,10]:

1. precyzyjnie zidentyfikowana budowa i skład chemiczny z ustaloną metodyką oznaczenia ilościowego w płynach biologicznych

2. udowodniony istotny statystycznie wzrost stężenia w płynach biologicznych lub tkankach pacjentów z niewydolnością nerek w porównaniu ze zdrowymi

3. potwierdzone powiązania aktywności biologicznej z objawami klinicznymi przy pomocy badań *in vivo*, *ex vivo* lub w badaniach *in vitro*

4. ustalony związek między intensywnością wzrostu stężenia we krwi lub tkankach a specyficznymi objawami klinicznymi

Wyjaśnienia wymagają następujące pytania:

1. *Które toksyny mocznicowe i w jakim zakresie stężeń odpowiadają za podobną rolę patofizjologiczną w uszkodzeniu narządów?*

Przykładem jest udział wielu toksyn mocznicowych w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. IS i pCS należą wprawdzie do tej samej klasy składników według EUTox i pochodzą z jednakowego źródła ich syntezy, jakim są bakterie jelitowe, wykazują jednak różny mechanizm i zakres wpływu na rozwój chorób sercowo-naczyniowych [8]. Rodzi się pytanie, czy substancje te dostarczają podobnych, dublujących się i konkurujących między sobą informacji diagnostycznych czy raczej dopełniają się, pogłębiając wiedzę poprzez różnicowanie odmiennych ścieżek biologicznych? Odpowiedź wymaga klasyfikacji zatrzymanych składników zgodnie z ich znaczeniem patofizjologicznym a nie tylko ich budową chemiczną. Nasuwa się także wyraźna potrzeba wyznaczenia granicznych stężeń nie tylko dla toksycznego działania pojedynczych składników ale także ustalenie ilościowej granicy dla sumy stężeń różnych substancji zaangażowanych w ten sam proces patologiczny. Poszukiwanie nowych składników mocznicowych i łączenie ich w panele zaangażowane we wspólne procesy patofizjologiczne otwiera nowe możliwości wyjaśnienia nieznanych dotychczas powiązań biologicznych i narządowych w diagnozowaniu specyficznych rozpoznaw klinicznych.

2. *Czy ocena zaburzenia funkcji określonego narządu w przebiegu niewydolności nerek jest możliwa w oparciu o oznaczenie jednego składnika mocznicowego czy raczej należy wykorzystać ich panel?*

Toksyczność narządowa nie jest prostym jednoznaczny objawem patologicznym

spowodowanym jedną toksyną mocznicową, ponieważ w tym samym czasie nie tylko jeden, ale kilka zatrzymanych składników może się wpisywać w te same procesy biologiczne i metaboliczne. W przebiegu niewydolności nerek prawie każdy narząd jest objęty toksycznym oddziaływaniem zatrzymanych składników mocznicowych. Związek taki udowodniono dla: układu sercowo-naczyniowego (*miażdżyca, arterioskleroza, obniżenie funkcji rozkurczowej, hiper/hipotensja, zapalenie osierdzia*), systemu nerwowego (*zaburzenie koncentracji, skurcze, otępienie, depresja, zmęczenie, bóle głowy, osłabienie, zapalenie wielonerwowe, obniżenie towarzyskości, zespół niespokojnych nóg, zaburzenie snu, letarg*), układu hematologicznego i krzepnięcia (*anemia, krwawienie, nadkrzepliwość*), układu immunologicznego (*nieadekwatne tworzenie przeciwciał, stymulacja zapalenia, podatność na nowotwory, podatność na infekcje*), endokrynologicznego (*dyslipidemie, nietolerancja glukozy, zatrzymanie wzrostu, hiperparatyroidyzm, hipogonadyzm, impotencja, obniżone libido*), chorób kości (*adynamiczna choroba kości, uszkodzony metabolizm kalcytriolu, wieloogniskowa dysplazja włóknista kości, demineralizacja kości, osteoporoza*), skóry (*melanoza, świąd*), układu pokarmowego (*anorexia, dyspepsja, owrzodzenia żołądkowo-jelitowe, czkawka, nudności, wymioty, zapalenie trzustki*), oddechowego (*zapalenie opłucnej, rozedma płuc, zespół bezdechów sennych*).

Selekcja składników zaangażowanych w procesy uszkodzenia śródbłonka naczyń wykazuje, że należą one zarówno do *small water-soluble compounds* (ADMA, kwas guanidyno-octowy, metyloguanidyna), *protein-bound molecules* (AGE, polifosforany dinukleotydowe, homocysteina, IS, p-CS, kwas feniloctowy) jak i *middle molecules* (leptyna, TNF- α). Wyłonienie spośród nich skutecznych laboratoryjnych markerów diagnostycznych lub ich panelu wymaga ustalenia między nimi priorytetów dotyczących zarówno ich stężeń w materiałach biologicznych jak i aktywności biologicznej oraz efektywności w diagnozowaniu kolejnych etapów uszkodzenia śródbłonka [2,5].

Trucizny mocznicowe jako markery uszkodzenia narządów

Dane literaturowe zgodnie potwierdzają hipotezę o udziale zakumulowanych trucizn mocznicowych w procesie rozpoczęcia i rozwoju ostrej i przewlekłej dysfunkcji nerek. Składniki te poprzez uszkodzenie komórek kanalików aktywują progresję uszkodzenia nerek, a wzrost ich stężeń przyspiesza utratę funkcji nerek, szklwienie kłębuszków i uszkodzenie miąższu nerek [20,29].

Podjęmowane są próby wyjaśnienia roli zatrzymanych toksyn mocznicowych w przebiegu niewydolności nerek dla wywołania zaburzonej funkcji innych odległych narządów:

- **oś nerka - układ sercowo naczyniowy:** rozpoznanie kliniczne zespołu sercowo-naczyniowego dotyczy 5 typów różnych interakcji między przewlekłym lub ostrym zaburzeniem serca lub nerek a ostrą lub przewlekłą dysfunkcją drugiego narządu. Lepsze zrozumienie roli endogennych trucizn mocznicowych jako prawdopodobnych

czynników odpowiedzialnych za wzajemną zależność chorób nerek i chorób sercowo-naczyniowych jest niezbędne dla opracowania strategii efektywnego postępowania terapeutycznego w tej licznej grupie pacjentów z wysokim ryzykiem śmiertelności [5,6,8,9,12,13,19,21].

- **oś nerka - wątroba:** dla obu tych narządów wspólnym zadaniem biologicznym jest usuwanie toksycznych składników z organizmu. Rozwój ostrej i przewlekłej niewydolności nerek powiązany z przewlekłymi chorobami wątroby (zespół nerkowo-wątrobowy typu 1 i typu 2) aczkolwiek patogeneta tej interakcji nie jest znana. Wśród możliwych czynników bierze się pod uwagę rolę toksyn mocznicowych zaangażowanych w procesie rozszerzenia naczyń, obniżenia oporności układu naczyniowego, czego efektem jest hipoperfuzja nerkowa. Utratę funkcji nerek u pacjentów z marskością powiązano z pogorszeniem prognozowania u tych pacjentów [30,31].

- **oś nerka - śluzówkowa bariera jelitowa:** dysbioza z dodatkową eliminacją kreatyniny przez ścianę jelita jest powszechnym objawem w przebiegu CKD. Zaburzona funkcja bariery jelitowej spowodowana uszkodzeniem *tight junction* w śluzówce może być przyczyną przemieszczania się zarówno nienaruszonych bakterii jak i ich fragmentów i bioproduktów w poprzek bariery śluzówkowej do krążenia. Stała aktywność odporności immunologicznej może pomóc w wyjaśnieniu utrzymującego się uogólnionego zapalenia w przebiegu CKD [15,17,25,32-34].

- **oś nerka - mózg:** akumulacja trucizn mocznicowych może powodować bezpośrednie uszkodzenie neuronów, z rozwojem objawów klinicznych dotyczących zaburzeń poznawczych w przebiegu PChN oraz encefalopatii w schyłkowej niewydolności nerek [35].

- **oś nerka - płuca:** udowodniono rolę toksyn mocznicowych w przebiegu AKI, wykazując ich wpływ na dysfunkcję płuc, podatność na uszkodzenie płuc lub na obie sytuacje kliniczne [36].

Metody przeciwdziałania toksyczności trucizn mocznicowych

W dotychczasowej praktyce wskazuje się na dwa główne kierunki działań terapeutycznych [1,10,11,16,18,37]:

1. rozwój bardziej efektywnych metod usuwania z organizmu toksyn mocznicowych

2. działania farmakologiczne zmierzające do obniżenia wewnątrzjelitowej produkcji i wchłaniania toksyn mocznicowych pochodzących z jelita grubego poprzez :

- **wpływ na wzrost i metabolizm bakterii jelitowych** (podawanie probiotyków, prebiotyków, antybiotyków)

- **modyfikację diety** - poprzez obniżenie podaży białka z pokarmem i konsekwentnie zmniejszenie ilości dostarczanych aminokwasów dla produkcji toksyn przez bakterie jelitowe

- **zapobieganie zaparciom** – skrócenie czasu tranzytu aminokwasów przez jelito grube ograniczające ich wykorzystanie przez bakterie jelitowe

- **leczenie sorbentami** – adsorpcja prekursorów toksyn mocznicowych w jeli-

cie zabezpiecza przed ich powstawaniem i akumulacją (sorbent AST-120).

Podsumowanie

We współczesnej diagnostyce laboratoryjnej brakuje wskaźników dla oceny pełnego obrazu złożonej toksyczności trucizn mocznicowych zakumulowanych w przebiegu kolejnych etapów niewydolności nerek. Wylania się pilna potrzeba poszukiwania bardziej swoistych w porównaniu z mocznikiem i kreatyniną parametrów, dostarczających logicznych podstaw dla nowych działań terapeutycznych, skutecznie zabezpieczających lub spowalniających wielonarządowe uszkodzenia. Udowodnienie toksyczności składników mocznicowych i wyjaśnienie ich powiązań z objawami klinicznymi podlega ścisłym kryteriom ich chemicznej i biologicznej charakterystyki oraz ustalenia roli w procesach patofizjologicznych. Badania te mogą stać się także źródłem licznych dodatkowych obserwacji wzbogacających współczesną wiedzę na temat fizjologicznych i patologicznych wielonarządowych powiązań metabolicznych. Fakty zaprezentowane w tej pracy wyraźnie pokazują, że do chwili obecnej została wyjaśniona zaledwie niewielka część tych problemów. Należy mieć nadzieję, że rozwój dalszych badań zapoczątkowanych przez Europejską Grupę Badawczą EUTox będzie kontynuowane i realizowane w wielu ośrodkach naukowych, a uzyskane wyniki gromadzone według ściśle określonych zasad dostarczą nowych wartościowych wniosków dla praktyki klinicznej.

Piśmiennictwo

1. Eloit S, Schepers E, Barreto DV, Barreto FC, Liabeuf S. et al: Estimated glomerular filtration rate is a poor predictor of concentration for a broad range of uremic toxins. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011; 6: 1266-1273.
2. Glorieux G, Schepers E, Vanholder RC: Uremic toxins in chronic renal failure. *Contributions Sec Biol Med Sci.* 2007; 28: 173-204.
3. Herget-Rosenthal S, Glorieux G, Jankowski J, Jankowski V: Uremic toxins in acute kidney injury. *Semin Dial.* 2009; 22: 445-448.
4. Liabeuf S, Druke TB, Massy ZA: Protein-bound uremic toxins: new insight from clinical studies. *Toxins* 2011; 3: 911-919.
5. Vanholder R, Baurmeister U, Brunet P, Cohen G, Glorieux G. et al: A bench to bedside view of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19: 863-870.
6. Vanholder R, Glorieux G, De Smet R, Lameire N, for the European Uremic Toxin Work Group (EUTox): New insights in uremic toxins. *Kidney Int.* 2003; 63: S6-S10.
7. Vanholder R, Laecke SV, Glorieux G: What is new in uremic toxicity? *Pediatr Nephrol.* 2008; 23: 1211-1221.
8. Vanholder R, Meert N, Schepers E, Glorieux G: Uremic toxins: do we know enough to explain uremia? *Blood Purif.* 2008; 26: 77-81.
9. Zhu J, Yang K, Jing Y, Du R, Zhu Z. et al: The effects of low-dose Nepsilon -(carboxymethyl)lysine (CML) i Nepsilon -(carboxyethyl)lysine (CEL), two main glycation free adducts considered as potential uremic toxins, on endothelial progenitor cell function. *Cardiovasc Diabetol.* 2012; 11: 90-99.
10. Meijers BKI, Evenepoel P: The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression. *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 26: 759-761.
11. Meyer TW, Hosetter TH: Uremic solutes from colon microbes. *Kidney Int.* 2012; 81: 949-954.
12. Brunet P, Gondouin B, Duval-Sabatier A, Dou L, Cerini C. et al: Does uremia cause vascular dysfunction? *Kidney Blood Press Res.* 2011; 34: 284-290.

13. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J. et al: Normal and pathological concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23: 1258-1270.
14. Yavuz A, Tetta C, Ersoy FF, D'Intini V, Ratanarat R, et al: Uremic toxins: a new focus on old subject. *Semin Dial.* 2005; 18: 303-211.
15. Aronov PA, Luo FJG, Plummer NS, Quan Z, Holmes S, et al: Colonic contribution to uremic solutes. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22: 1769-1776.
16. Neirynek N, Vanholder R, Schepers E, Eloit S, Pletinck A, Glorieux G: An update on uremic toxins. *Int Urol Nephrol.* 2013; 45: 139-150.
17. Hauser AB, Stingham AEM, Gonçalves SM, Buchares S, Pecoits-Filho R: A gut feeling on endotoxemia: causes and consequences in chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract.* 2011; 118:c165-c172.
18. Neirynek, Glorieux G, Schepers E, Pletinck A, Dhondt A, Vanholder R: Review of protein-bound toxins, possibility for blood purification therapy. *Blood Purif.* 2013; 35 (Suppl. 1): 43-50.
19. Goh CY, Vizzi G, De Cal M, Ronco C: Cardiorenal syndrome: complex series of combined heart/kidney disorders. *Contrib Nephrol.* 2011; 174: 33-45.
20. Lisowska-Myjak B: Serum and urinary laboratory markers in acute kidney injury. *Blood Purif.* 2010; 29: 357-365.
21. Chan EJ, Dellsperger KC: Cardiorenal syndrome: the clinical cardiologists perspective. *Cardiorenal Med.* 2011; 1: 13-22.
22. Klammt S, Wojak HJ, Mitzner A, Koball S, Rychly J. et al: Albumin-binding capacity (ABIC) is reduced in patients with chronic kidney disease along with accumulation of protein-bound uremic toxins. *Nephrol Dial Transplant.* 2012; 27: 2377-2383.
23. Cohen G, Raupachova J, Hörl WH: The uremic toxin phenylacetic acid contributes to inflammation by priming polymorphonuclear leucocytes. *Nephrol Dial Transplant.* 2013; 28: 421-429.
24. Panichi V, Migliori M, De Pietro S, Taccola D, Bianchi AM. et al: C reactive protein in patients with chronic renal diseases. *Renal Fail.* 2001; 23: 551-562.
25. Sun CY, Hsu HH, Wu MS: P-cresol sulfate and indoxyl sulfate induce similar cellular inflammatory gene expression in cultured proximal renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2013; 28: 70-78.
26. Tesch G: Review: Serum and urine biomarkers of kidney disease: a pathophysiological perspective. *Nephrology* 2010; 15: 609-616.
27. Vaziri ND, Yuan J, Rahimi A, Ni Z, Said H, Subramanian VS: Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation. *Nephrol Dial Transplant.* 2012; 27: 2686-2693.
28. Itoh Y, Ezawa A, Kikuchi K, Suruta Y, Niwa T: Protein-bound uremic toxins in hemodialysis patients measured by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and their effects on endothelial ROS production. *Anal Bioanal Chem.* 2012; 403: 1841-1850.
29. Satoh M, Hayashi H, Watanabe M, Ueda K, Yamato H. et al: Uremic toxins overload accelerates renal damage in a rat model of chronic renal failure. *Nephron Exp Nephrol.* 2003; 95: e111-e118.
30. Lhotta K: Beyond hepatorenal syndrome: glomerulonephritis in patients with liver disease. *Semin Nephrol.* 2002; 22: 302-308.
31. Wadei HM, Mai ML, Ahsan N, Gonwa TA: Hepatorenal syndrome: pathophysiology and management. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006; 1: 1066-1079.
32. Andersen HJ, Andersen K, Stecher B: The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int.* 2013; 83:1010-1016.
33. Peng YS, Lin YT, Hung KY, Wang SM: Effects of indoxyl sulfate on adherens junctions of endothelial cells and the underlying signaling mechanisms. *J Cell Biochem.* 2012; 113: 1034-1043.
34. Vaziri ND: CKD impairs barrier function and alters microbial flora of the intestine: a major link to inflammation and uremic toxicity. *Curr Opin Nephrol*

Hypertens. 2012; 21: 587-592.

35. **Bugnicourt JM, Godefroy O, Chillon JC, Choukroun G, Massy ZA:** Cognitive disorders and dementia in CKD: the neglected kidney-brain axis. *J Am Soc Nephrol.* 2013; 24: 353-363.
36. **Rabb H, Wang Z, Nemoto T, Hotchkiss J, Yokota N, Soleimani M:** Acute renal failure leads to dysregulation of lung salt and water channels. *Kidney Int.* 2003; 63: 600-606.
37. **Vitetta L, Gobe G:** Uremia and chronic kidney disease: The role of the gut microflora and therapies with pro-and prebiotics. *Mol Nutr Food Res.* 2013; 57: 824-832.