

## Nový přístup k výzkumu v oblasti uremických toxinů – charakteristika a klasifikace dosud známých molekul

Vanholder R, de Smet R, Glorieux G et al: Review on uremic toxins: classification, concentration and interindividual variability. *Kidney Int* 2003;63:1934-1943.

**P**ráce je další z publikací pracovní skupiny EUTox (viz dále) a tentokrát je jejím cílem poskytnout výčet a biochemickou charakteristiku látek, o nichž je známo, že se při selhání ledvin v organismu retinují. Jde tedy vlastně o jakýsi „slovník“ uremických toxinů, první svého druhu.

Autoři obecně v této i ve svých předchozích publikacích rozlišují dva pojmy: „uremic retention solute“, což je označení pro látky, které se akumulují, avšak není pro ně prokázán přímý toxický účinek na organismus, a „uremic toxins“, což jsou ty látky, které se nejen retinují, ale negativně ovlivňují biologické funkce organismu. Předkládaná práce není experimentální, ale je vlastně metaanalýzou publikovaných dat, nevyjadřuje se k uremické toxicitě, ale výhradně ke koncentracím jednotlivých látek v organismu. K parametrům, které jsou popisovány a diskutovány, patří molekulová hmotnost dané látky, její fyziologická koncentrace ( $C_n$ ), průměrná ( $C_u$ ) a maximální ( $C_{max}$ ) koncentrace při selhání ledvin, odvozené hodnoty  $C_u/C_n$  (násobek zvýšení koncentrace při selhání ledvin) a  $C_{max}/C_u$  (pro posouzení rozmezí koncentrací při selhání ledvin).

Celkem je charakterizováno 90 sloučenin. Jsou rozděleny do tří podskupin: malé molekuly (molekulová hmotnost < 500) rozpustné ve vodě, tj. bez vazby na proteiny, molekuly vážící se na proteiny (bez závislosti na molekulové hmotnosti sloučeniny) a do třetí skupiny jsou zařazeny látky s molekulovou hmotností vyšší než 500.

Celkem 68 popisovaných sloučenin má relativní molekulovou hmotnost nižší než 500, ale z nich je téměř třetina vázána na proteiny, tj. jejich kinetika a odstraňování během hemodialýzy je zcela odlišné než odstraňování např. močoviny či kreatininu. Jen dvě sloučeniny, vázané na proteiny, mají větší molekulovou hmotnost. Na druhou stranu, dvanáct sloučenin má relativní molekulovou hmotnost vyšší než 12 000.

Práce nehodnotí anorganické, stopové prvky ani molekuly vyšší než 60 000, např. lipoprotein (a), zabývá se pouze organickými sloučeninami do hmotnosti albuminu (tedy do té hmotnosti, nad kterou už nejsou látky filtrovány nativními ledvinami).

Charakteristika jednotlivých látek podle výše uvedeného rozdělení je podrobně prezentována ve třech tabulkách, jsou vždy uvedeny zmíněné tři koncentrace ( $C_n$ ,  $C_u$ ,  $C_{max}$ ), dále molekulová hmotnost a zařazení molekuly do chemické skupiny. Pro sloučeniny s vazbou na proteiny je uvedena vždy celková, nikoli volná (nenavázaná) frakce.

První tabulka ukazuje 45 látek rozpustných ve vodě a současně s malou molekulovou hmotností (do 500). Patří sem ribonukleosidy (1-methyladenosin, pseudouridin aj.), guanidiny (ADMA = asymetrický dimethylarginin, kreatinin, kreatin aj.), polyoly (arabitol, mannitol aj.), puriny (hypoxantin, xantin aj.), pyrimidiny (uridin, thymin aj.) a je zastoupen též jeden peptid ( $\beta$ -lipotropin). Převažují guanidiny (celkem 14 sloučenin).

Tabulka 2 sumarizuje data u solutů vázaných na proteiny, těch je 25. Patří sem fenoly, AGE (3-deoxyglukoson, fructosolysin, glyoxal, methylglyoxal, pentosidin aj.), indoly, peptidy, polyamidy a hippuráty (zejména kyselina hippurová). Dále sem patří homocystein a sloučenina CMPF, známá svým potenciálem interferovat s vazbou léků na proteiny. Relativní molekulová hmotnost těchto sloučenin je ve dvaceti dvou případech do 500, tři sloučeniny mají molekulovou hmotnost větší, a to i dost výrazně (například pentosidin téměř 3000).

Ve třetí tabulce jsou uvedeny středně molekulární látky (relativní hmotnost 500–12 000) a látky s molekulovou hmotností nad 12 000 (avšak nedosahující hmotnosti 60 000, tj. hmotnosti albuminu). Zcela převažují peptidy (leptin, adrenomedulin, parathormon, neuropeptid Y, cystatin C aj.), zastoupeny jsou i některé cytokiny.

Další tabulky analyzují vybrané závislosti či naopak rozpory v nálezech. Tabulka 4 uvádí tři látky, u nichž byl v literatuře zjištěn velký rozpor v uváděných průměrných koncentracích (tj. v hodnotách  $C_u$ ), tj. není u nich shoda, jaké koncentrace vlastně lze při selhání ledvin očekávat (jedná se o ADMA, IL-6, 3-deoxyglukoson). Přitom například retence ADMA může mít velký klinický důsledek (ADMA je faktor potencující hypertenzi, uvažuje se o něm jako o jednom z možných vysvětlení tzv. rezistentní hypertenze na ultrafiltraci u dialyzovaných pacientů).

Tabulka 5 se týká poměru  $C_u/C_n$ . Pro ilustraci – tento poměr je pro močovinu kolem čtyř (normální koncentrace močoviny u zdravých osob je přibližně 8 mmol/l, koncentraci močoviny před dialýzou zvolme 32 mmol/l,  $32/8 = 4$ ). Avšak v tabulce je uvedeno 20 solutů, kde je poměr mezi obvyklou koncentrací při selhání ledvin a fyziologickou koncentrací vyšší než 15 (to je, jako by koncentrace močoviny v krvi při selhání ledvin byla 120 mmol/l a více!). Takto vysoký stupeň retence při selhání ledvin dosahuje například kyselina hippurová (patřící do skupiny látek vážících se na proteiny a interferujícími s vazbou léků, jiným popisovaným důsledkem její akumulace je porucha me-

tabolismu glukózy), dále methylquanidin, indoxylsulfát, p-kresol, mannitol, pentosidin a další. Současně jsou v tabulce uvedeny látky s poměrem menším než 2,5, tj. ty, u nichž je akumulace relativně méně kvantitativně vyjádřena (patří sem například kyselina močová, neuropeptid Y aj.). Autoři připomínají, že biologický efekt nemusí být se stupněm retence v korelaci a též zmiňují, že akumulace, resp. výsledná koncentrace látek v krvi při selhání ledvin není dána jen chybějící eliminací, ale jsou i jiné faktory, které koncentraci retinovaných solutů ovlivňují – pohlaví, genetická predispozice, nutrice, vliv prostředí aj.

Další tabulka (tab. 6) uvádí molekuly s nejvyšším poměrem mezi  $C_{\max}/C_u$ . Tento poměr ukazuje, zda se vyskytují velké rozptyly mezi jednotlivými sledovanými soubory, resp. jednotlivými pacienty. Pro látky s vysokým poměrem lze předpokládat negausovské rozložení v hodnotách shledávaných při urémii. I zde je třeba mít na paměti, že výsledná koncentrace odráží nejen společný faktor selhání ledvin, ale individuálně proměnný faktor příjmu (dietní zvyklosti), prostředí (ovlivnění koncentrací některých látek například kouřením aj.) a zejména genetickou výbavou (ilustrativním příkladem je ovlivnění metabolismu homocysteinu geneticky a též dostupností určitých vitaminů).

Poslední tabulka se zabývá výhledem problematiky a potřebou pro další výzkum. Přináší seznam molekul, jimž je třeba věnovat pozornost v budoucnu. V předchozích tabulkách nejsou zmíněny buď proto, že není známa/není publikována jejich uremická koncentrace a/nebo jejich retence při selhání ledvin dosud nebyla zcela prokázána. Patří k nim například fragmenty  $\beta_2$ -mikroglobulinu, AOPP (produkty pokročilé glykace proteinů) a řada dalších.

V kontextu prezentovaného „slovníku“ uremických toxinů autoři diskutují nejen další potřebu výzkumu na poli biochemie, ale souběžně nutnost hledání nových strategií, jak látky retinované při selhání ledvin z organismu při mimotělní eliminaci odstranit. Sledování účinnosti stávajících rutinních klinických hemopurifikačních procedur (nejčastější z nich je hemodialýza) je sice na jednu stranu matematicky propracované, ale na druhou stranu veškerá tato sofistikovaná kritéria (Kt/V a další) jsou založena na kinetice empiricky vybraných látek, patřících do malých molekul bez vazby na proteiny, tudíž snadno přecházejících z krve přes dialyzační membránu. Jejich toxicita je spíše malá, pro organismus jsou škodlivější jiné látky. Ty jsou však vázány na proteiny, a tudíž jejich kinetika při klasické hemodialýze (ale i hemofiltraci) je zcela jiná a stávající procedury je eliminují z organismu jen parciálně, nedostatečně.

## KOMENTÁŘ

**Prof. MUDr. Sylvie Sulková, DrSc.**

*Práce je psána velmi přehledně a sledování tabulek umožní velmi dobré pochopení tématu.*

*Ještě před více než 10 lety byl pojem „uremická toxicita“ jen v obecném povědomí. Chromatograficky či jinak byly sice analyzovány frakce o „střední molekule“, které v experimentech jevíly různé toxické vlivy na sledované systémy, ale jednotlivé molekuly bylo těžké identifikovat.*

*Dnes je v tomto směru výzkum mnohem dál, a to nejen zásluhou rozvoje technologie, ale soustředěné a velmi kvalifikované a koordinované práce skupiny výzkumníků.*

*V roce 1998 se Evropská společnost pro umělé orgány (ESAO) rozhodla iniciovat „working groups“, pracovní skupiny pro vybrané oblasti problematiky umělých orgánů. V říjnu 1999 byla v návaznosti na tuto iniciativu ustavena skupina „Uremic toxins working group“ (EUTox), která od roku 2000 pracuje jako společná aktivita akademických a univerzitních výzkumníků (v čele s prof. Vanholderem z Gentu, jehož pracoviště se výzkumem uremické toxicity zabývá dlouhou řadu let) spolu s nejvýznamnějšími průmyslovými představiteli (Baxter Healthcare, Bellco, Fresenius Medical Care, Gambro a Membrane).*

*Pracovní skupina již v roce 2001 publikovala mimořádně zajímavý a významný článek s názvem „Uremic toxicity: present state of the art“ (Vanholder et al., 2001), v němž prezentuje podrobný a srozumitelný přehled současných znalostí a nárys dalšího zaměření. Jsou zde charakterizovány jednotlivé molekuly, jejich biochemická charakteristika, biologická povaha, zvažovaná či prokázaná toxicita při akumulaci a dále i možnosti či omezení při odstraňování z organismu při dialýze a dalších eliminačních metodách.*

*Obdobně publikovala skupina (či její autoři) několik dalších prací, které jsou již cíleně zaměřeny na eliminaci během dialýzy či na patofyziologický efekt jejich akumulace.*

*Předložená práce je dalším stupněm – jak uvedeno, jde o jakýsi „slovník“. Lze z něho získat pozoruhodné detailní informace, ale zejména vzhledem do složitosti a komplexity problematiky. Autorům se dle mého mínění podařilo, aby tento vzhled byl snadno stravitelný a přitom dostatečně odborný a navíc zajímavý. A ještě poznámka – skupina EUTox svou aktivitou ukazuje ještě na jiný faktor, zobecnitelný bez ohledu na výzkumné zaměření. Ukazuje totiž, jak vynikajících výsledků lze dosáhnout propojenou a sofistikovanou spoluprací akademické oblasti na jedné straně a průmyslu na straně druhé.*

*Doposud byly uremické toxiny/retenční molekuly sledovány izolovaně. Nyní se náhled mění a stává se komplexním. Uremická toxicita je sice stále víc prozkoumána, ale základním závěrem nových poznatků je potřeba pokračovat ve výzkumu, neboť ke komplexní znalosti je ještě daleká cesta.*

*Další a detailnější informace je možno získat na webové stránce „working group“ EUTox: <http://uremic.toxins.org>*

## Literatura

- Dhondt A, Vanholder R, van Biesen W, et al. The removal of uremic toxins. *Kidney Int* 2000;58(Suppl 7):47-59.
- Lessafer G, de Smet R, Lameire N, et al. Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:50-57.
- Leypoldt JK, Cheung AK, Carroll CE, et al. Effect of dialysis membranes and modelle molekule removal on chronic hemodialysis patient survival. *Am J Kidney Dis* 1999;33:349-355.
- Vanholder R, de Smet R. Pathophysiologic effects of uremic retention solutes. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1815-1823.
- Vanholder R, de Smet R. Pathophysiologic effects of uremic retention solutes. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1815-1823.
- Vanholder R, Argilés A, Baumeister U, et al. Uremic toxicity: present state of the art. *Int J Artif Org* 2001;24:695-725.
- Vanholder R, Glorieux G, Lameire N. The other side of the coin: impact of toxin generation and nutrition on the uremic syndrome. *Semin Dial* 2002;15:311-314.

## Dokladů pro poškození tubulů a intersticia ledvin v důsledku proteinurie přibývá

*Nakajima H, Takenaka M, Kaimori J-Y, et al. Activation of the signal transducer and activator of transcription signaling pathway in renal proximal tubular cells by albumin. J Am Soc Nephrol 2004;15:276-285.*

*Brunskill NJ. Albumin signals the coming of age of proteinuric nephropathy. J Am Soc Nephrol 2004;15:504-505.*

**P**roteinurie je u pacientů s chronickým glomerulárním onemocněním nezávislým rizikovým faktorem progrese chronické renální insuficience (Peterson et al., 1995; Ruggenti et al., 1998). V původní Brennerově teorii byla proteinurie chápána jen jako nepřímý ukazatel intraglomerulárního tlaku a pokles proteinurie při terapii inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu byl interpretován jako doklad účinku těchto léků na intraglomerulární tlak. Histologické studie ale ukázaly, že progrese chronické renální insuficience lépe než se závažností glomerulárních změn koreluje s tíží změn tubulointersticiálních. Bylo tedy třeba vysvětlit, jakým mechanismem se přenáší glomerulární poškození na tubulointersticiu. Experimentální studie přispěly ke vzniku představy, že proteiny filtrované ve zvýšené míře v glomerulech stimulují při zpětné resorpci buňky proximálního tubulu k produkci např. cytokinů s následným zánětem a fibrózou renálního intersticia. Redukce proteinurie by tak měla mít příznivý účinek na progresi chronického renálního onemocnění i bez ovlivnění intraglomerulárního tlaku.

V komentované studii Nakajima et al. studovali vliv albuminu na kulturu myších buněk proximálního tubulu. Prokázali, že albumin stimuluje v buňkách proximálního tubulu aktivaci transkripčních faktorů Stat 1 a 5, která byla zřejmě zprostředkována reaktivními formami kyslíku, které vznikají v buňkách proximálního tubulu působením membránově vázané NADPH oxidázy. Ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku může v buňkách proximálního tubulu přispívat

také snížená aktivita antioxidačních enzymů, např. katalázy či glutathionperoxidázy.

Experimentální studie již v minulosti prokázaly, že albumin v buňkách proximálního tubulu aktivuje různé proteiny, které hrají důležitou roli v intracelulární signalizaci, např. proteinkinázu aktivovanou mitogeny, kinázu c-jun a proteinkinázu C. Mechanismus, jímž albumin aktivuje tyto systémy, však dosud není jasný a interakce albuminu s membránovými proteiny, které se podílejí na jeho zpětné resorpci v proximálním tubulu (cubilin, megalin), zřejmě albuminem indukovanou aktivaci intracelulárních mediátorů plně nevysvětluje. Albumin kromě aktivace transkripčních faktorů z rodiny Stat aktivuje v buňkách proximálního tubulu také transkripční faktor NF-κB. Aktivace transkripčního faktoru NF-κB je pak následována produkcí „koktejlu“ chemokinů, cytokinů, adhezních molekul a molekul extracelulární matrix (např. MCP-1, RANTES, IL-8, PAF, PDGF, TGF-β, endotelinu, fibronektinu, kolagenu), které stimulují infiltraci renálního intersticia monocyty/makrofágy, změnu fenotypu tubulárních buněk na buňky mesenchymální a zvýšenou tvorbu vaziva. Nedávno bylo také prokázáno (Klissic et al., 2003), že albumin stimuluje aktivitu proteinu, který vyměňuje na apikální membráně sodné ionty a protony (NHE-3, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3). Stimulace zpětné resorpce sodných iontů albuminem v proximálním tubulu by mohla nejen přispět k vysvětlení retence sodíku u nefrotického syndromu, ale také k vysvětlení vztahu mezi proteinurií a hypertenzí.

Komentovaná studie přikládá další kamínek k pochopení mechanismů vlivu albuminurie na rozvoj tubulointersticiální fibrózy a progrese chronické renální insuficience tím, že pomáhá vysvětlit (zatím chybějící článek), tj. jakým mechanismem (stimulací produkce reaktivních forem kyslíku) aktivuje albumin v buňkách proximálního tubulu intracelulární mediátory. Přesnější pochopení těchto mechanismů může pochopitelně vést k nalezení účinných forem léčby proteinurických nefropatií a zpomalení (či zastavení) progrese chronické renální insuficience.

## KOMENTÁŘ

**Prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc.**

*Experimentální studii působení albuminu na produkci reaktivních forem kyslíku v buňkách proximálního tubulu jsem vybral jako příklad významu základního výzkumu pro terapii renálních chorob. V současné éře funkční genomiky a proteomiky přibývá informací o vlivu různých patofyziologických podnětů, mediátorů nebo léků na transportní procesy a intracelulární děje v buňkách jednotlivých segmentů nefronu. Současné studium exprese velkého počtu (tisíců) genů a (minimálně stovek) proteinů (a jejich posttranslačních modifikací) povede jistě v krátké době k zásadnímu pokroku v pochopení patogeneze většiny nemocí včetně nemocí ledvin.*