

# Уремические токсины в крови больных с терминальной стадией почечной недостаточности при дисбиозе кишечника

**Uremic toxins in blood of end stage renal disease patients with dysbiosis of digestive tract**

**A. V. Sivkov, V.N. Sinyukhin,  
S. V. Arzumanov, E.A. Stesyuk,  
T.A. Korobova**

Numerous molecules, which are either excreted or metabolized by the kidneys, accumulate in patients with chronic kidney disease (CKD). These uremic retention molecules, contributing to the syndrome of uremia, may be classified according to their site of origin, that is: endogenous metabolism, microbial metabolism, or exogenous intake. Phenolic compounds such as phenylacetic acid, phenol, and p-cresol are generated by the partial breakdown of tyrosine and phenylalanine by a wide range of intestinal obligate or facultative anaerobes, including the genera *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Bifidobacterium*, and especially *Clostridium*. It is well known that probiotics can modify intestinal microbiota and thus provide clinical benefit for healthy individuals. However, their effect on patients with renal disease has not been fully studied. 18 patients undergoing hemodialysis (HD) treatment three times a week were enrolled in the study. Dysbiosis in feces of patients was detected by conventional culture-based methods. Serum p-cresol levels were measured by a protocol with a modification of HPLC method of Niwa. The results showed that HD patients without dysbiosis had the serum p-cresol level of about 26,5±6.7 mcml/l, while patients with high serum p-cresol levels of 53,5±15,5 mcml/l had > 10<sup>5</sup> colony-forming units (CFU) of *Clostridium* per gram of stool. Probiotic treatment appeared to have reduced the serum p-cresol level to 15.6±5.1 mcml/l. This preliminary study demonstrates that HD patients with dysbiosis have high serum levels of p-cresol, and that probiotic treatment can reduce the serum level of this compound.

**А.В. Сивков, В.Н. Синюхин, С.В. Арзуманов, Е.А. Стецюк,  
Т.А. Коробова**

ФГБУ «НИИ урологии» Минздрава России

**Н**арушение функции почек является результатом сбоя в работе системы внутрипочечного метаболизма, что сопровождается снижением гломерулярной фильтрации, тубулярной секреции и реабсорбции. Это приводит к накоплению в организме больного целого ряда токсических соединений, которые оказывают влияние на все жизненно важные органы. Сердечно-сосудистые и инфекционные осложнения – это основные причины тяжелого течения хронической болезни почек, возникающие в результате воздействия токсических соединений на организм пациента [1]. В последнее время принято считать, что токсины, которые в больших количествах вырабатываются бактериальной флорой кишечника и не выводятся у больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН), проникают в кровоток и оказывают большое влияние на течение этого заболевания. В основном это конечные продукты гликирования, фенолы и индолы [2]. Появились сообщения, которые свидетельствуют, что бактериальная нагрузка и конечные продукты метаболизма кишечной флоры являются звеном патогенеза хронической болезни почек [3,4], а живые культуры пробиотиков обладают большим потенциалом при лечении хронических заболеваний [5]. Последние данные по анализу микробной микрофлоры кишечника показали наличие в ней трех доминантных энтеротипов, которые можно охарактеризовать как виды *Bacteroides*, *Prevotella* и *Ruminococcus* [3, 4] Установлено, что состав микро-

биоты кишечника в значительной степени зависит от потребляемой пищи и окружающей среды и может меняться в течение 24 часов в зависимости от преобладающих компонентов пищевого рациона. В желудочно-кишечном тракте млекопитающих микробиота взаимодействует с организмом хозяина через поверхность слизистой кишечника и очень чувствительна к внешним и внутренним воздействиям, которые могут вызвать нарушения во внутреннем гомеостазе кишечника. Показано, что ее состав и метаболическая активность могут привести как к благотворному влиянию на организм хозяина (например, выработка витаминов), так и оказать губительное воздействие путем образования токсических продуктов [3].

У больных с почечной недостаточностью высокая метаболическая нагрузка на желудочно-кишечный тракт в результате жизнедеятельности бактерий, неправильного питания и влияния окружающей среды приводит к сбою в работе энтероцитарного барьера и повышению содержания токсических соединений в организме хозяина [6, 7, 8].

Предшественники уремических токсинов образуются в результате ферментации бактериями таких аминокислот, как фенилаланин, тирозин и триптофан. Это приводит к образованию пара-крезола (р-крезол), фенола, индола, которые после прохождения через кишечник и печень попадают в кровоток или в виде материнской субстанции или в виде конъюгатов (р-крезол сульфата, р-крезол глюкуронида, фенил сульфата,

фенил глюкуронида, индол сульфата, индол глюкуронида) [8-13]. Эти соединения обладают провоспалительным эффектом – стимулируют лейкоцитоз и дисфункцию эндотелия [14-17]. Установлено, что длительное течение дисбактериоза кишечника и воспалительных процессов желудочно-кишечного тракта приводит к перенасыщению ткани почек уремическими токсинами, тяжелому течению хронической болезни почек и сокращению промежутка времени до наступления терминальной стадии почечной недостаточности [17-20]. Следует признать наличие взаимосвязи между провоспалительными реакциями в желудочно-кишечном тракте, дисбиозом кишечника и течением хронической болезни почек [20].

Гемодиализ не способен обеспечить эффективную элиминацию тех уремических токсинов, которые связаны с белком, например, р-крезола и индоксил сульфата. Содержание этих соединений в крови коррелирует со смертностью больных на гемодиализе [21]. Больше всего это касается р-крезола, повышенное содержание которого в организме больного с терминальной ХПН ассоциируется с инфекцией, сердечно-сосудистыми заболеваниями, смертностью [22, 23, 24].

Торможение процесса выработки уремических токсинов является одним из эффективных путей снижения их концентрации в крови больных на гемодиализе. В этом отношении наиболее эффективны пробиотики, влияющие на организм больного, пребиотики, включающие в себя полисахариды, усиливающие рост полезных для организма кишечных бактерий, синбиотики – комбинацию пребиотиков и пробиотиков, которые все вместе нормализуют внутрикишечную экологическую нишу и уменьшают концентрацию токсичных продуктов жизнедеятельности бактерий [25,26]. Nomoto K. считает, что применение синбиотиков, пробиотиков и пребиотиков при различных заболеваниях, включая хроническую болезнь почек в ее терминальной стадии, эффективно улучшает внут-

реннюю среду кишечника и, как следствие этого, тормозит процессы ведущие к интоксикации организма [27].

В последнее время появились данные о том, что в терминальной стадии хронической болезни почек наблюдается выраженное изменение флоры именно толстого кишечника и фекальной флоры, что также приводит к синдрому избыточного бактериального роста в тонком кишечнике [28, 29, 30, 31]. Дисбиоз при ХПН связан с целым рядом причин: повышением уровня мочевины и поступлением ее в толстый кишечник, что заканчивается ее гидролизом уреазой микрофлоры и выделением большого количества аммония, изменением рН среды в кишечнике и возникновением энтероколита. В результате толстый кишечник становится основным путем выделения оксалатов, а употребление фосфат-связывающих препаратов значительно изменяют внутреннюю среду всего кишечника. Все это создает условия преимущественного роста для таких бактерий, как клостридии, синтезирующих р-крезол. Keddis MT. et al. считают, что повышенные количества этого микроорганизма очень часто встречается у больных с хронической болезнью почек, находящихся на гемодиализе, что может привести к инфекции, вызванной этим возбудителем, увеличению количества осложнений и смертности [32].

Целью настоящего исследования было изучение взаимосвязи содержания уремического токсина р-крезола в крови больных с терминальной стадией почечной недостаточности, находящихся на гемодиализе, при дисбиозе кишечника на фоне применения пробиотиков и без них.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Количественное определение р-крезола проводилось по модифицированному методу Niwa [33]: к 1 мл сыворотки крови больного добавлялось 100 мклитров дистиллированной воды. Проба затем закислялась до рН 1,0 М раствором соляной кислоты и насыщалась 1,0 г хлористого натрия.

После этого проводилась экстракция пробы в этилацетат 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 фирмы Fennigan 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.

Посев кала на микрофлору проводился по стандартной культуральной микробиологической методике [34]. Выделялись следующие микроорганизмы: бифидобактерии, лактобактерии, клостридии, патогенные энтеробактерии, кишечная палочка (типичная, лактозонегативная, гемолитическая), энтерококки, золотистый стафилококк, другие неферментирующие грамотрицательные бактерии, *pseudomonas aeruginosa* дрожжеподобные грибы типа *Candida*.

В исследование вошли 18 пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности, которые проходили терапию в отделении оперативной нефрологии и пересадки почки ФГБУ «НИИ урологии» Минздрава России. Статистическая достоверность результатов оценивалась по критерию Стьюдента с помощью программы «Статистика».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У больных, находящихся на гемодиализе, при посеве кала которых, выявлен высокий титр клостридий ( $> 10^5$  КОЕ), концентрация р-крезола в сыворотке крови была  $53,5 \pm 15,5$  мкмоль/литр. При нормальном

титре клостридий ( $<10^5$ ) его содержание составляло  $26,5 \pm 6,7$  мкмоль/литр, а у больных, постоянно принимающих пробиотики (линекс по 2 капсулы 3 раза в день), –  $15,6 \pm 5,1$  мкмоль/литр (рис.1) У всех трех групп больных титры остальных видов микроорганизмов в были в пределах нормальных показателей, что согласуется с ранее опубликованными данными, согласно которым при посеве кала на твердые питательные среды не было выявлено достоверной разницы по основным видам микроорганизмов между больными на гемодиализе и группой здоровых людей [35]. Полученные нами данные показывают, что содержание р-крезола в сыворотке

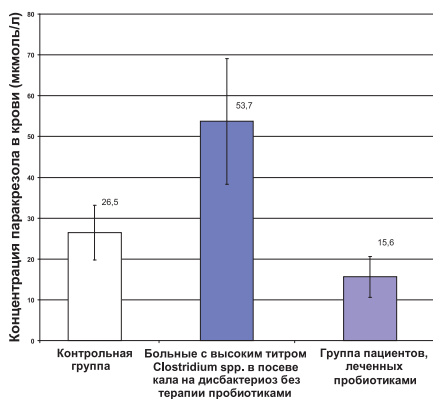


Рис 1. Концентрация паракрезола в сыворотке крови больных с терминальной стадией ХПН при дисбиозе кишечника и при приеме пробиотиков.

крови у больных с терминальной стадией ХПН в значительной степени зависит от титра клостридий в желудочно-кишечном тракте. Это согласуется с литературными данными. Установлено, что фенольные соединения такие, как фенолуксусная кислота, фенол, р-крезол образуются из фенилаланина и тирозина целым рядом облигатных и факультативных анаэробов, обитающих в кишечнике и включающих Bacteroides, Lactobacillus, Enterobacter, Bifidobacterium. Подавляющая часть этих веществ вырабатывается Clostridium. Однако процесс разложения ароматических аминокислот микрофлорой кишечника имеет свои пределы. С термодинамической точки зрения он плохо протекает в отсутствие неорганический акцепторов электронов и может происходить преимущественно в аэробных условиях, когда моно- и диоксигеназы инкорпорируют молекулярный кислород в продукты различных реакций, что наблюдается при ХПН. В связи с этим при терминальной стадии ХПН в кишечнике создаются идеальные условия для обитания этих видов микроорганизмов [32, 36, 37]. Согласно нашим данным у больных с терминальной ХПН,

принимающих пробиотики, отмечается снижение концентрации р-крезола. Это может быть только в том случае, когда пробиотики каким-то образом вмешиваются в процесс синтеза или выведения р-крезола. Действительно, в литературе появились данные о том, что лактобактерии способны по неизвестному механизму связывать или метаболизировать р-крезол [38], а в опытах in vitro установлено, что инкубация р-крезола и фенола с Streptococcus thermophilus KB06, Lactobacillus acidophilus KB20, Bifidobacterium longum KB71 снижает содержание этих соединений [39]. Показано, что применение у больных на гемодиализе препарата Lebenin, содержащего молочнокислые бактерии приводит к снижению концентрации уремиических токсинов [35]. Все это в определенной степени подтверждает полученные нами результаты.

Таким образом, полученные результаты говорят о том, что высокая концентрация р-крезола в сыворотке крови больных с терминальной стадией почечной недостаточности может свидетельствовать о наличии у больного дисбиоза кишечника. Применение пробиотиков снижает содержание этого уремиического токсина. ■

## Резюме:

При терминальной стадией почечной недостаточности в крови больных накапливается большое количество веществ, которые не выводятся почками. Эти соединения носят название уремиических токсинов и их можно проклассифицировать в зависимости от места их происхождения как продукты эндогенного метаболизма, метаболизма микробов или экзогенной природы. Фенольные соединения такие, как фенилуксусная кислота, фенол, паракрезол накапливаются в организме в результате метаболизма тирозина или фенилаланина целым рядом облигатных или факультативных анаэробов, включающих представителей рода Bacteroides, Lactobacillus, Enterobacter, Bifidobacterium и особенно Clostridium. Известно, что пробиотики нормализуют внутрикишечную микрофлору и оказывают благоприятный эффект на состояние практически здоровых субъектов. Это действие практически не изучено на больных с заболеваниями почек. В настоящее исследование вошли 18 больных, находящихся на лечении гемодиализом (3 раза в неделю). Состояние дисбиоза диагностировалось стандартными микробиологическими культуральными методиками. Концентрация паракрезола определялась методом жидкостной хроматографии по модифицированному методу Niwa. Было показано, что у больных без дисбиоза кишечника его содержание в сыворотке крови составляло  $26,5 \pm 6,7$  мкмоль/л. У больных с высоким содержанием паракрезола ( $53,6 \pm 15,5$  мкмоль/л) был выявлен дисбиоз кишечника с большим титром клостридий в кале, превышающим  $10^5$  колоний образующих единиц (КОЕ) на грамм материала. Лечение пробиотиками уменьшало уровень паракрезола до  $15,6 \pm 5,1$  мкмоль/л.

Таким образом, содержание паракрезола повышено в сыворотке крови больных, находящихся на гемодиализе при наличии дисбиоза кишечника. Лечение пробиотиками уменьшает концентрацию этого соединения.

**Ключевые слова:** хроническая почечная недостаточность, уремические токсины, дисбактериоз кишечника.

**Key words:** chronic renal failure, uremic toxins, intestinal dysbiosis.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wen CP, Cheng TY, Tsai MK, Chang YC, Chan HT, Tsai SP, Chiang PH, Hsu CC, Sung PK, Hsu YH, Wen SF. All-cause mortality attributable to chronic kidney disease: A prospective cohort study based on 462 293 adults in Taiwan. // *Lancet*. 2008. Vol. 371. P.2173–2182.
2. 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. Vol. 57. P. 824–832.
3. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, Lewis JD. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. // *Science*. 2011. Vol.334. P. 105–108.
4. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. // *Nature*. 2011. Vol. 473. P.174–180.
5. Vitetta L, Alford H. The pharmacobiotic potential of the gastrointestinal tract micro-biometabolome-probiotic connect: A brief commentary.// *Drug Dev Res*. 2013. Vol. 74. P.353–359.
6. Zheng X, Zhao A, Xie G, Chi Y, Zhao L, Li H, Wang C, Bao Y, Jia W, Luther M, Su M, Nicholson JK, Jia W. Melamine-induced renal toxicity is mediated by the gut microbiota. // *Sc. Transl Med*. 2013. Vol. 5, N 172. P 172ra22.
7. Fasano A. Toxins and the gut: Role in human disease.// *Gut*. 2002. Vol. 50, Suppl. 3. P. 9–14.
8. Bengmark S. Gut microbiota, immune development and function.// *Pharmacol Res*. 2013. Vol. 69. P.87–113.
9. Stecher B, Maier L, Hardt WD. Blooming' in the gut: How dysbiosis might contribute to pathogen evolution. // *Nat Rev Microbiol*. 2013. Vol. 11. P. 277–284.
10. Cani PD, Delzenne NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. // *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007. Vol. 10. P. 729–734.
11. Macfarlane GT, Macfarlane S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. // *JAOAC Int*. 2012. Vol. 95. P. 50–60.
12. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, Clark W, Cohen G, De Deyn PP, Deppisch R, Descamps-Latscha B, Henle T, Jörres A, Lemke HD, Massy ZA, 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.
13. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, Argiles A. European Uremic Toxin Work Group. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. // *J Am Soc Nephrol*. 2012. Vol. 23. P. 1258–1270.
14. Charney DI, Walton DF, Cheung AK. Atherosclerosis in chronic renal failure.// *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993. Vol. 2. P. 876–882.
15. Schepers E, Meert N, Glorieux G, Goeman J, Van der Eycken J, Vanholder R. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. // *Nephrol Dia Transplant*. 2007. Vol. 22. P. 592–596.
16. Motojima M, Hosokawa A, Yamato H, Muraki T, Yoshioka T. Uremic toxins of organic anions up-regulate PAI-1 expression by induction of NF-kappaB and free radical in proximal tubular cells. // *Kidney Int*. 2003. Vol 63. P.1671–1680.
17. Dou L, Bertrand E, Cerini C, Faure V, Sampol J, Vanholder R, Berland Y, Brunet P. The uremic solutes p-cresol and indoxylsulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. // *Kidney Int*. 2004. Vol. 65. P. 442–451.
18. Vitetta L, Briskey D, Hayes E, Shing C, Peake J. A review of the pharmacobiotic regulation of gastrointestinal inflammation by probiotics, commensal bacteria and prebiotics. // *Inflammopharmacology*. 2013. Vol. 20. P. 251–266.
19. Anders HJ, Andersen K, Stecher B. The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease.// *Kidney Int*. 2013. Vol. 83, P. 1010–1016.
20. Hida M, Aiba Y, Sawamura S, Suzuki N, Satoh T, Koga Y. Inhibition of the accumulation of uremic toxins in the blood and their precursors in the feces after oral administration of lebenin, a lactic acid bacteria preparation, to uremic patients undergoing hemodialysis. // *Nephron*. 1996. Vol. 74. P. 349–355.
21. Jourde-Chiche N, Dou L, Cerini C, Dignat-George F, Vanholder R, Brunet P. Protein-bound toxins—update 2009. // *Semin Dial*. 2009. Vol. 22. P. 334–339.
22. 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. P. 470–478.
23. Meijers BK, Bammens B, De Moor B, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Evenepoel P. Free p-cresol is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients.// *Kidney Int*. 2008. Vol.73. P. 1174–1180
24. Bammens B, Evenepoel P, Keuleers H et al. Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients.// *Kidney Int*. 2006. Vol. 69. P. 1081–1087.
25. Fooks LJ, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. // *Br J Nutr*. 2002. Vol. 88. P.39–49.
26. de Vrese M, Schrezenmeier J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. // *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2008. Vol. 111. P. 1–66.
27. Nomoto K. Prevention of postoperative microbial infection by synbiotics.// *Indian J Exp Biol*. 2008. Vol. 46. P. 557–561.
28. Ranganathan N, Friedman EA, Tam P, Rao V, Ranganathan P, Dheer R. Probiotic dietary supplementation in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease: a 6-month pilot scale trial in Canada. // *Curr Med Res Opin*. 2009. Vol. 25. P.1919–1930.
29. F. Fukuuchi, M. Hida, Y. Aiba, Y. Koga, M. Endoh, K. Kurokawa, H. Sakai. Intestinal bacteria-derived putrefactants in chronic renal failure.// *Clin Exp Nephrol*. 2002. Vol. 6. P. 99–104.
30. Vaziri ND, Wong J, Pahl M, Piceno YM, Yuan J, DeSantis TZ, Ni Z, Nguyen TH, Andersen GL. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. // *Kidney Int*. 2013. Vol. 83. P. 308–315.
31. Wang IK, Lai HC, Yu CJ, Liang CC, Chang CT, Kuo HL, Yang YF, Lin CC, Lin HH, Liu YL, Chang YC, Wu YY, Chen CH, Li CY, Chuang FR, Huang CC, Lin CH, Lin HC. Real-Time PCR Analysis of the Intestinal Microbiotas in Peritoneal Dialysis Patients. // *Appl Environ Microbiol*. 2012. Vol.78, 4. P.1107–1112 P. 1107–1112.
32. Keddis MT, Khanna S, Noheria A, Baddour LM, Pardi DS, Qian Q. Clostridium difficile Infection in Patients With Chronic Kidney Disease.// *Mayo Clin Proc*. 2012. Vol.87. N 11. P.1046–1053.
33. Niwa T. Phenol and p-cresol accumulated in uremic serum measured by HPLC with fluorescence detection. // *Clin Chem*. 1993. Vol. 39. P. 108–111.
34. Fan K, Morris AJ, Reller LB. Application of rejection criteria for stool cultures for bacterial enteric pathogens. // *J Clin Microbiol*. 1993. Vol.31. P. 2233–2235.
35. Hida M, Aiba Y, Sawamura S, Suzuki N, Satoh T, Koga Y. Inhibition of the accumulation of uremic toxins in the blood and their precursors in the feces after oral administration of Lebenin, a lactic acid bacteria preparation, to uremic patients undergoing hemodialysis. // *Nephron*. 1996. Vol.74, N2. P. 349–55
36. Evenepoel P, Meijers BK, Bammens BRM, Verbeke K. Uraemic toxins originating from colonic microbial metabolism. // *Kidney Int*. 2009. Vol. 76. P.12–19.
37. Cummings JH. Fermentation in the human large intestine: evidence and implications for health. // *Lancet*. 1983. Vol. 1. P.1206–1209.
38. Nowak A, Libudzisz Z. Ability of intestinal lactic bacteria to bind or/and metabolise phenol and p-cresol. // *Ann Microbiol*. 2007. Vol. 57, N3. P 329–335.
39. Marczely J, Dheer R, Ranganathan P, Patel B, Ranganathan N, Friedman EA. Probiotic Formulation in Vitro Effect on Phenol and p-Cresol Levels. // *J Am Soc Nephrol*. 2004. Vol.15. P. 112A F-PO212.