

# Фуранкарбоксилловая кислота у больных при терминальной стадии почечной недостаточности: описание методики определения и собственные результаты

**Furancarboxylic acid in patients with terminal renal insufficiency: description of the detection method and own experience**

V.N. Sinyukhin, V.N. Tashlitskiy,  
A.V. Sivkov, S.V. Arzumanov,  
T.A. Korobova

Uremic syndrome is followed by the increase in the concentrations of many substances in blood, which induce different pathological changes and designated as uremia. 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid (furancarboxylic acid, CMPF) is an endogenous metabolite of the fatty acids in the organism, which is a component of dietary phospholipids and was detected in the urine in year 1979. This substance was showed to be accumulated in the blood during the uremia and have a high affinity to albumin preventing its linkage to other substances. This is considered to be the main factor for the reduced binding of medicaments in uremic plasma. Accumulation of the CMPF is considered to induce some pathological changes including anemia, disturbances in the function of thyroid gland and central nervous system due to the blockade of the organic ion transport through hemato-encephalic barrier. Recent data shows the deterioration of active tubular secretion by CMPF. Thus, CMPF could be related to the classic uremic toxins.

The aim of the study was to develop a method for detection of CMPF. After the standard probe processing ultraeffective liquid chromatography was carried out in the lane C18 with positive electrospraying and tandem mass-spectrometry. The limit of the quantitative detection was 0.2 mkg/ml, limit of detection – 0.05 mkg/ml.

This method was tested in 23 serum samples from patients with terminal kidney disease and without it. The collected data correspond to other published studies and showed high concentration of CMPF in patients with terminal kidney disease.

**В.Н. Синюхин<sup>1</sup>, В.Н. Ташлицкий<sup>2</sup>, А.В. Сивков<sup>1</sup>, С.В. Арзуманов<sup>1</sup>, Т.А. Коробова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России

<sup>2</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова

**П**ри нарушении работы почек возникает целый ряд патологических изменений в функциях человеческого организма, сопровождающихся накоплением в организме больных целого ряда эндогенных и экзогенных субстанций (уремических токсинов), которые способны внести дисбаланс в нормальную работу различных органов и систем. Повышение концентрации этих соединений происходит, как правило, за счет уменьшения их почечного клиренса [1, 2, 3].

3-карбокسي-4-метил-5-пропил-2-фуранпропионовая кислота (фуранкарбоксилловая кислота, КМПФ, CMPF) (рис.1) – эндогенный метаболит фурановых жирных кислот в организме человека, входящих в состав пищевых фосфолипидов, был обнаружен в моче человека в 1979 году [4], а затем выделен из крови человека и идентифицирован [5].

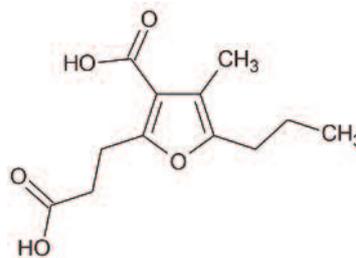


Рис.1. Структура КМПФ с молекулярной массой 240 г/моль

Было установлено, что КМПФ накапливается в крови при уремии и оказывает ингибирующее воздей-

ствие на функцию митохондриального дыхания, имеет высокую степень сродства к альбумину и за счет этого тормозит связывание с ним других веществ. Снижение скорости синтеза белков при терминальной ХПН способствует этому процессу и приводит к тому, что молярное соотношение КМПФ и альбумина может достигать 1:1. Это дает возможность КМПФ заблокировать все области связывания токсинов на альбумине, в результате они остаются в кровотоке в свободном состоянии и оказывают отравляющее воздействие на организм [6].

Ряд авторов считают, что накопление КМПФ вызывает целый ряд патологических состояний, включая анемию [7, 8]; С.Е. Lim и соавт. описали нарушение функции щитовидной железы [9]; М.Е. Costigan и соавт. отметили поражение центральной нервной системы из-за блокады транспорта органических ионов через гемато-энцефалический барьер [10]. Кроме того, это соединение активно вмешивается в процессы выведения лекарственных веществ и тормозит их метаболизм на первой (О-деметилирования) и второй фазах (глутатион-конъюгирования и глюкуронидирования) [11]. Установлено, что оно влияет на метаболизм дигоксина за счет блокады его захвата гепатоцитами [12].

В последнее время появились данные о том, что КМПФ замедляет

процессы активной тубулярной секреции [13]. Показано, что этот уремический токсин накапливается в почечной паренхиме и обладает выраженным прооксидантным эффектом, что приводит к разрушению клеток почечной паренхимы за счет гиперпродукции  $O_2^-$  [14]. Это вещество усиливает рабдомиолизис, вызванный статинами, при терминальной стадии ХПН [15].

Механизмы накопления КМПФ в организме были изучены в фундаментальной работе Y. Tsutsumi и соавт [16]. В опытах на крысах провели изучение фармакокинетики и накопления в органах КМПФ, индоксил сульфата, индолуксусной кислоты и парааминогиппуровой кислоты. Кроме того, исследовали влияния парааминогиппуровой кислоты и тетраэтиламмония на захват КМПФ тканями кортикального слоя почки. В опытах на кусочках почки, вырезанных из кортикального слоя почки крысы, было продемонстрировано, что имеется взаимное торможение захвата между парааминогиппуровой кислотой и КМПФ. Показано, что альфа-кетоглютарат стимулировал захват КМПФ. Было установлено, что КМПФ очень медленно выводится из организма путем уринарной экскреции с активной тубулярной секрецией. На основании опытов захвата КМПФ кусочками паренхимы почки было высказано предположение, что в этом процессе принимает участие анион/дикарбоксилатный переносчик. Кинетика КМПФ характеризовалась очень низкими показателями почечного и билиарного клиренса свободного соединения ( $14,3 \pm 0,6$  и  $0,09 \pm 0,01$  мл/мин /кг, соответственно). Отмечалась высокая степень накопления соединения в почечной паренхиме: величина  $Ct/Cp \geq 0,9$ .

Согласно классическому определению, данному S. Mastry) описанному в работе J. Bergstrom и соавт.), к уремическим токсинам относятся:

- химически идентифицированные структуры, присутствующие в биологических жидкостях и поддаю-

щиеся количественному и качественному определению:

- содержание этих веществ в крови и тканях у уремических больных должно во много раз превышать такие же концентрации у здоровых людей;

- высокое содержание этих веществ в организме должно коррелировать с тяжестью уремических симптомов;

- токсический эффект этих субстанций в диапазонах концентраций, определяемых в тканях уремического больного, должен быть подтвержден в опытах на лабораторных животных и в опытах *in vitro*;

- концентрации, используемые в экспериментах, должны соответствовать таковым у больных с хронической почечной недостаточностью [17].

КМПФ удовлетворяет всем этим требованиям и её можно отнести к классическим уремическим токсинам.

К сожалению, среди всех уремических токсинов до последнего времени наименьшее внимание уделялось токсинам, связанным с белком, которые не выводятся во время стандартного гемодиализа. Кроме того, считалось, что связь с белком не позволяет реализовать токсический эффект этих соединений, так как он обусловлен только свободной фракцией. Работы последних лет показали наличие токсических свойств уремических токсинов и в связанном с белком состоянии [18].

Были начаты исследования по разработке методов выведения этих веществ. Удаление КМПФ является чрезвычайно сложной задачей, так как токсин практически на 100% связан с альбумином и его нужно вытеснить с белка или удалять вместе с ним. Оказалось, что проведение гемодиализа на диализаторе ВК-F с мембраной на основе полиметилметакрилата, которая пропускает белок, позволяет снизить концентрацию КМПФ, и это сопровождается повышением содержания гемоглобина [19]. Проведение в течение 6-ти месяцев преддилюционной гемодиализации также умень-

шает содержание КМПФ [20]. Перитонеальный диализ эффективно снижает концентрацию этого соединения в крови [21].

Задача удаления уремических токсинов из организма больного требует создания универсальных методов их определения. В последнее время стали разрабатываться хромато-масс-спектрометрические методики, позволяющие с большой точностью и чувствительностью одновременно определять большое количество токсинов [22]. Это касается и метода детекции КМПФ, который требуется для разработки метода ее выведения.

Удаление указанного нефротоксина необходимо для приостановки прогрессирования почечной недостаточности. Считают, что это является одной из проблем лечения больных с ХПН [23].

Впервые накопление КМПФ в крови при уремии показали в 1984 году A. Liebich и соавт. [24]. В 1987 году N. Takeda и соавт. провели определение этого вещества в депротенизированной нагретой сыворотке больных с терминальной ХПН хромато-масс-спектрофотометрическим методом. Концентрация этого вещества оказалась равной  $38,6 \pm 11,4$  мг/л [25].

В работе G. Lessafer и соавт. было показано, что до гемодиализа содержание КМПФ в сыворотке больных с ХПН составляло  $1,97 \text{ мг} \pm 1,03 \text{ мг/л}$ , через 240 минут диализа после коррекции на гемоконцентрацию –  $2,25 \pm 1,3$  мг/л [26]. В работе T. Niwa и соавт. эта величина была  $41 \pm 18,3$  мкг/мл до диализа и  $48,4 \pm 21,3$  мкг/мл – после [27]. Тогда как в работе N. Meert и соавт. она составила  $0,49$  ( $0,26-0,77$ ) мг/дл до гемодиализа и  $0,48$  ( $0,33-0,88$ ) мг/дл – после него [16].

Различие по количественному содержанию в крови КМПФ у различных исследователей связано не только с разной чувствительностью и специфичностью применяемых методов, но и с различным состоянием водного и белкового баланса у больных с терминальной ХПН. ■

Кроме того, комбинированная лекарственная терапия может привести к вытеснению КМПФ с белка и выведению из организма во время гемодиализа. В связи с этим целью исследования стала разработка современного масс-спектрометрического метода количественного определения КМПФ и определение ее содержания в крови у больных на гемодиализе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Объекты исследования и реактивы.

Образец исследуемого вещества – 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid (фуранкарбоксилловая кислота) получено от компании SAYMAN CHEMICAL COMPANY (Cat 10007133 Lot 0417135-3 (500ug).

Для анализа методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией были использованы бидистиллированная вода (Milli-Q, Millipore Advantage A10, Франция), ацетонитрил (HPLC-gradient grade, Panreac, Испания). Остальные реактивы были приобретены в Aldrich, Sigma, Acros, Lancaster (класс чистоты не ниже «химически чистый»).

**Количественное определение** в сыворотке крови. В пластиковую про-

бирку емкостью 1,5 мл помещали 500 мкл образца сыворотки крови, добавляли 1 мл ацетонитрила, тщательно перемешивали и центрифугировали 20 мин при 14000 об/мин. Отбирали 750 мкл супернатанта в пластиковую пробирку вместимостью 1,5 мл, добавляли 250 мкл воды, тщательно перемешивали, переносили в хроматографическую вials и делали необходимое количество инъекций. В качестве стандарта использовали раствор КМПФ в 50% этаноле с концентрацией 100 нг/мл.

Хроматографирование проводили на системе из ультраэффективного жидкостного хроматографа и тандемного масс-спектрометра, состоящей из хроматографа Acquity (Waters, США) и тандемного квадрупольного MS-детектора TQD (Waters, США). Типичная хроматограмма CMPF представлена на рис. 2.

Аналізу подвергали 11,2 мкл (полная петля) разбавленного раствора образца на колонке 0,21 x 5,0 см Acquity BEH C18 (1,7 мкм) при 35°C и скорости потока 0,5 мл/мин с использованием следующих элюентов: А – 20 мМ раствор муравьиной кислоты в воде и В – 20 мМ раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле по градиентной программе: 50-100% В (1 мин), 100-50% В (0,1 мин),

50-50% В (0,9 мин). Основные параметры MS-детектора: режим электрораспыления: позитивный (ES+); рабочий режим: мониторинг реакций заданных ионов (MRM); температура источника ионов: 120°C; температура испарения: 450°C; напряжение на конусе: 20 В; напряжение на капилляре: 3,0 кВ; скорость потока газа столкновений (аргон): 0,18 мл/мин; переходы сканирования: 223,28>71,04 с энергией столкновения 32 эВ, 223,28>139,08 с 22 эВ и 223,28>188,16 с 10 эВ.

На рис. 3 А приведен масс-спектр вещества КМПФ, содержащий молекулярный ион [M+H]<sup>+</sup> с отношением массы к заряду 223, полученный при электроспрей-ионизации в режиме регистрации позитивных ионов. Спектр фрагментации молекулярного иона 223 при соударении с атомами аргона с энергией 22 эВ приведен на рис 3 Б.

Сбор и обработку данных проводили с помощью программы Mass-Lynks (Waters, США). Концентрацию CMPF рассчитывали исходя из отношения площади пика на хроматограмме испытуемого раствора к площади пика на хроматограмме стандарта с учетом разбавления при пробоподготовке и концентрации вещества в растворе стандарта.

Линейность соблюдалась до концентрации в крови 20 мкг/мл, предел количественного определения (LOQ) составил 0,2 мкг/мл в крови, предел обнаружения (LOD) – 0,05 мкг/мл, что сопоставимо с такими же показателями, полученными на таком же оборудовании при определении уремических ток-

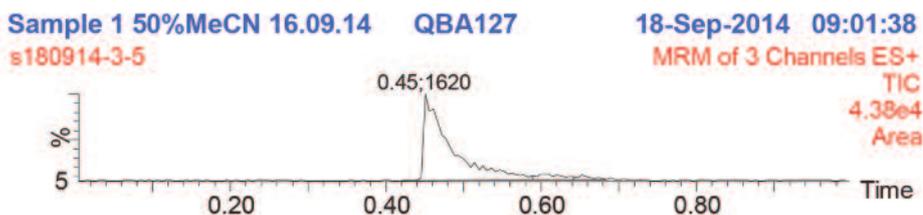


Рис.2. УЭЖХ-хроматограмма (ультра эффективная жидкостная хроматография) образца после стандартной пробоподготовки, полученная MRM-методом (реакции заданных ионов)

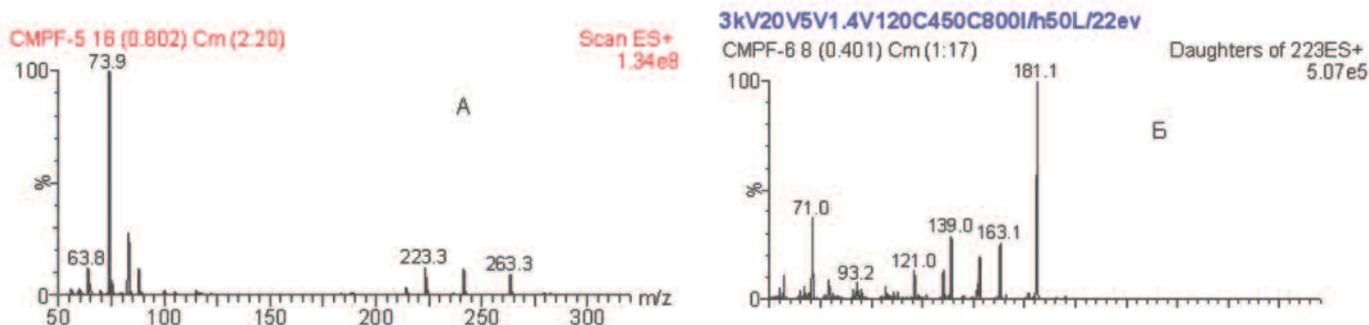


Рис.3. Спектры в режиме регистрации позитивных ионов и спектр фрагментации иона 223

синов, включая КМПФ, в 2012 году Y. Itoh и соавт. [20] и в 2013 году J. Boelaert и соавт. [26].

В качестве иллюстрации возможности метода и выяснения концентрационного диапазона КМПФ у больных с терминальной ХПН и здоровых лиц была изучена ее концентрация у 12 больных с хронической болезнью почек 5D стадии, находив-

шихся в отделении сосудистой хирургии и пересадки почек на стандартном гемодиализе и 11 больных без почечной патологии. Концентрация КМПФ у людей без патологии почек была  $0,098 \pm 0,029$  мкг/мл у больных с терминальной ХПН она составляла  $2,38 \pm 1,5$  мкг/мл, что согласуется с данными полученными в 2009 году N. Meert и соавт. [18].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан хромато-масс-спектрометрический метод определения КМПФ с пределом количественного определения 0,2 мкг/мл крови и пределом обнаружения 0,05 мкг/мл. Установлено, что этот уремический токсин накапливается в крови больных с терминальной ХПН. ■

## Резюме:

Уремический синдром сопровождается повышением концентрации в крови целого ряда соединений, вызывающих многообразные патологические изменения, которые принято называть уреимией. 3-карбокси-4-метил-5-пропил-2-фуранпропионовая кислота (фуранкарбоксиловая кислота, КМПФ, СМРФ) – эндогенный метаболит фурановых жирных кислот в организме человека, входящих в состав пищевых фосфолипидов, была обнаружена в человеческой моче в 1979 году. Было установлено, что это соединение накапливается в крови при уремии и имеет высокую степень сродства к альбумину и за счет этого тормозит связывание с ним других веществ. Считают, что оно является основным фактором, уменьшающим уровень связывания лекарственных соединений в уремической плазме. Считают, что накопление КМПФ вызывает целый ряд патологических состояний, включая анемию, нарушение функции щитовидной железы и центральной нервной системы из-за блокады транспорта органических ионов через гемато-энцефалический барьер. В последнее время появились данные о том, что КМПФ замедляет процессы активной тубулярной секреции. Таким образом, КМПФ можно отнести к классическим уремическим токсинам.

Целью настоящего исследования была разработка метода определения КМПФ. После стандартной пробоподготовки ультраэффективная жидкостная хроматография (UPLC) образца проводилась на колонке C18 с последующим позитивным электрораспылением и тандемной масс-спектрометрией. Предел количественного определения составлял 0,2 мкг/мл, предел детектирования – 0,05 мкг/мл.

Метод апробирован на 23 образцах сыворотки крови, полученных от больных с терминальной ХПН и без нее. Полученные данные согласуются с данными других исследователей и показали более высокие концентрации КМПФ у больных с терминальной ХПН.

**Ключевые слова:** терминальная почечная недостаточность, уремия, уремические токсины, фуранкарбоксиловая кислота, определение, диагностические тесты.

**Key words:** terminal kidney disease, uremia, uremic toxins, furancarboxylic acid, detection, test system.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Синюхин В.Н., Е.А. Стецюк, С.В. Арзуманов. Роль связанных с белком уремических токсинов в патогенезе хронической почечной недостаточности. // Экспериментальная и клиническая урология. 2013. N 1. С.30-34
2. Сивков А.В., Синюхин В.Н., Арзуманов С.В., Стецюк Е.А., Коробова Т.А. Уремические токсины в крови больных с терминальной стадией почечной недостаточности при дисбиозе кишечника. // Экспериментальная и клиническая урология. 2014. N 2. С.94-97
3. Niwa T. Organic acids and the uremic syndrome: protein metabolite hypothesis in the progression of chronic renal failure. // Semin Nephrol. 1996. Vol.16, N 6. P. 167-168. Spittler M, Spittler G. Separation and characterization of acidic urine constituents (author's translation). // J Chromatogr. 1979. Vol.164, N 3. P. 253-317
4. Pfordt J, Thoma H, Spittler G. Identifizierung, strukturabklärung und synthese bisher unbekannte urofuransäuren im menschlichen bult. // Liebigs Ann Chem. 2006. Vol. 181, N 12. P.2298-2308 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jlac.198119811217/pdf>
5. Niwa T, Takeda N, Maeda K, Shibata M, Tatematsu A. Accumulation of furancarboxylic acids in uremic serum as inhibitors of drug binding. // Clin Chim Acta. 1988. Vol.173, N 2. P.127-138.
6. Sakai T, Takadate A, Otagiri M. Characterization of binding site of uremic toxins on human serum albumin. // Biol Pharm Bull. 1995. Vol. 18, N 12. P.1755-1761.
7. Costigan MG, Yaqoob M, Lindup WE. Effects of haemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis on the plasma clearance of an albuminbound furan dicarboxylic acid. // Nephrol Dial Transplant. 1995. Vol.10, N 5. P.648-652.
8. Lim CF, Bernard BF, de Jong M, Docter R, Krenning EP, Hennemann G. A furan fatty acid and indoxyl sulfate are the putative inhibitors of thyroxine hepatocyte transport in uremia. // J Clin Endocrinol Metab. 1993. Vol.76, N 2. P.318-324
9. Costigan MG, Callaghan CA, Lindup WE. Hypothesis: is accumulation of a furan dicarboxylic acid (3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid) related to the neurological abnormalities in patients with renal failure? // Nephron. 1996. Vol. 73, N 2. P.169-173.
10. Walters R, Nicholls P, Lindup WE. Effect of three toxins on various pathways of hepatic drug metabolism in vitro. // J Pharm Pharmacol. 1995. Vol. 47. P.1091-1092
11. Tsujimoto M, Kinoshita Y, Hirata S, Otagiri M, Ohtani H, Sawada Y. Effects of uremic serum and uremic toxins on hepatic uptake of digoxin. // Ther Drug Monit. 2008. Vol.30, N 5. P.576-582
12. Henderson SJ, Lindup WE. Renal organic acid transport: uptake by rat kidney slices of a furan dicarboxylic acid which inhibits plasma protein binding of acidic ligands in uremia. // J Pharmacol Exp Ther. 1992. Vol.263, N 1. P.54-60.
13. Yohei M, Yasunori Iwao, Katsumi Mera, Hiroshi Watanabe, Daisuke Kadowaki, Yu Ishima, Victor Tuan Giam Chuang, Keizo Sato, Masaki Otagiri, Toru Maruyama. A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoate induces cell damage to proximal tubular cells via the generation of a radical intermediate. // Biochemical Pharmacol. 2012. Vol. 84, N 9. P. 1207-1214
14. Uchiyama H, Tsujimoto M, Shinmoto T, Ogino H, Oda T, Yoshida T, Furukubo T, Izumi S, Yamakawa T, Tachiki H, Minegaki T, Nishiguchi K. Uremic Toxins Enhance Statin-Induced Cytotoxicity in Differentiated Human Rhabdomyosarcoma Cells. // Toxins. 2014. Vol.6, N 9. P.2612-2625.
15. Tsutsumi Y, Deguchi T, Takano M, Takadate A, Lindup WE, Otagiri M. Renal Disposition of a Furan Dicarboxylic Acid and Other Uremic Toxins in the Rat. // J Pharmacol Exp Ther. 2002. Vol. 303, N 2. P.880-887
16. Bergstrom J, Furst P. Uremic toxins. // Kidney Int Suppl. 1978. Vol. 8. P. 9-12.
17. Jourde-Chiche N, Dou L, Cerini C, Dignat-George F, Vanholder R, Brunet P. Protein-bound toxins – update 2009. // Semin Dial. 2009. Vol.22, N 4. P.334-339.
18. Niwa T. Removal of protein-bound uremic toxins by haemodialysis. // Blood Purif. 2013. Vol.35. Suppl 2. P.20-25.
19. Meert N, Beerenhout Ch, Schepers E, Glorieux G, Kooman J, Vanholder R. Evolution of protein-bound uremic solutes during predilution haemofiltration. // J Nephrol. 2009. Vol. 22, N 3. P. 352-357
20. Niwa T, Yazawa T, Kodama T, Uehara Y, Maeda K, Yamada K. Efficient Removal of Albumin-Bound Furancarboxylic Acid, an Inhibitor of Erythropoiesis, by Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. // Nephron. 1990. Vol. 56, N 3. P.241-245
21. Itoh Y, Ezawa A, Kikuchi K, Tsuruta 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. Vol. 403, N 7. P.1841-1850.
22. Niwa T. Update of uremic toxin research by mass spectrometry. // Mass Spectrom Rev. 2011. Vol.30, N 3. P.510-521.
23. Liebich AM, Pickert A, Tetzchner B. Gaschromatographic and gaschromatographic-mass-spectrophotometric analysis of organic acids in plasma of patients with chronic renal failure. // J Chromatogr. 1984. Vol. 289. P.356-359
24. Takeda N, Niwa T, Tatematsu A, Suzul M. Identification and quantification of protein bound ligand in uremic serum. // 1987. Clin Chem. 1987. Vol.33, N 5. P.682-685
25. Lesaffer G, De Smet R, Lameire N, Dhondt A, Duym P, Vanholder R. Intradialytic removal of protein-bound uremic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane. // Nephrol Dial Transplant. 2000. Vol.15, N 1. P.50-57
26. Niwa T, Yazawa T, Kodama T, Uehara Y, Maeda K, Yamada K. Efficient removal of albumin-bound furancarboxylic acid, an inhibitor of erythropoiesis, by continuous ambulatory peritoneal dialysis. // Nephron. Vol. 1990. Vol. 56, N 3. P.241-245
27. Boelaert J, Lynen F, Glorieux G, Eloit S, Van Landschoot M, Waterloos MA, Sandra P, Vanholder R. A novel UPLC-MS-MS method for simultaneous determination of seven uremic retention toxins with cardiovascular relevance in chronic kidney disease patients. // Anal Bioanal Chem. 2013. Vol.405. N 6. P. 1937-1947