

Mgr Blanka Katarzyna Seklecka

Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Badania in vitro i in vivo (model zwierzęcy Sus strofa domesticus) nad zastosowaniem enzymu dekarboksylazy szczawianowej (OXDC) do obniżenia poziomu szczawianów w krwi*”

Promotor rozprawy: Prof. dr hab. n. med. Stefan Grzegorz Pierzynowski

STRESZCZENIE

W chwili obecnej żadna forma dializy nie eliminuje odpowiednich ilości szczawianów z organizmu, co prowadzi do konieczności wykonania transplantacji nerek. Transplantacja powinna minimalizować niekorzystne objawy związane z wysokim stężeniem szczawianów we krwi / hiperoksalemii, jednak dane Europejskiego Rejestru Transplantacyjnego, wskazują na fakt, że czas przeżycia izolowanego przeszczepu nerki u osób z hiperoksalemią jest stosunkowo krótki. Po 3 latach od przeszczepu funkcjonuje tylko 23% przeszczepów od dawców żywych i jedynie 17% narządów pobranych od zmarłych.

Wyjściem z tej sytuacji jest złożona transplantacja nerki i wątroby, której to dysfunkcja powoduje hiperoksalemię. Wyprzedzający przeszczep wątroby, tzn. przy jeszcze zachowanej funkcji nerek jest przedmiotem kontrowersji. Przeszczep jedynie fragmentu wątroby, traktowany jako substytucja enzymatyczna, nie przynosi żadnego efektu, ponieważ wątroba pacjenta jest w dalszym ciągu źródłem nadprodukcji kwasu szczawowego i jego intensywnego wydalania z moczem.

Ponadto w trakcie choroby produkowane przez organizm szczawiany odkładają się w innych tkankach. W przedoperacyjnym przygotowaniu pacjentów do złożonej transplantacji wątroby i nerki można zwiększyć częstość zabiegów hemodializ aby przed transplantacją usunąć jak najwięcej kwasu szczawowego. Jednak to postępowanie w dalszym ciągu eliminuje zbyt małą ilość kwasu szczawowego i przetransplantowana nerka ulega nefrokalcynozie na skutek mobilizacji szczawianów zdeponowanych w innych tkankach.

Proponowane rozwiązanie problemu, polega na zastosowaniu kombinacji leczenia nerkozastępczego i eliminacji szczawianów obecnych w dializacie poprzez zastosowanie enzymu dekarboksylazy szczawianowej (*oxalate decarboxylase* OXDC). Oczekiwany efekt to obniżenie stężenia szczawianów w osoczu i utrzymywanie go na stosunkowo niskim poziomie minimalizujący odkładanie się ich w innych tkankach.

W celu określenia minimalnej dawki OXDC, która może znacząco zmniejszać stężenie szczawianów w surowicy krwi, wykonano badania *in vitro*. Doświadczenie pokazało, że stosując wysokie stężenie enzymu sięgające 30mg/cm³ można zredukować stężenie szczawianów w surowicy nawet o 60% w czasie jednej godziny. W oparciu o te wyniki stworzono model dializy otrzewnowej *in vitro*. Eksperyment udowodnił, że dodanie do dializatu enzymu dekarboksylazy szczawianowej, znacznie zwiększa redukcję szczawianów w krwi. Po 6 godzinach inkubacji, stężenie szczawianów w surowicy zmniejszyło się o 83 % (z 104 μmol/dm³ do 18 μmol/dm³).

Na potrzeby doświadczeń *in vivo* stworzono model zwierzęcy na świni (*Sus scrofa domestica*) pozwalający na wprowadzanie dożylnie roztworu szczawianu sodu oraz wykonanie dializy otrzewnowej. Jeden cykl dializy otrzewnowej wykonanej u świń usunął 20 % całkowitej ilości szczawianu we krwi. Po dodaniu do dializatu enzymu OXDC usunięto 40% szczawianów z krwi. Rezultat eksperymentu sugeruje, że aktywna dializa z zastosowaniem enzymu dekarboksylazy szczawianowej usuwa więcej szczawianów z krwi niż dializa tradycyjna.

Na podstawie powyższych wyników można wnioskować, że zastosowanie kombinacji leczenia nerkozastępczego i eliminacji szczawianów obecnych w dializacie poprzez dodatek enzymu dekarboksylazy szczawianowej przyniesie efekt w postaci obniżenia stężenia szczawianów w osoczu i utrzymywania go na stosunkowo niskim poziomie minimalizującym odkładanie się ich w innych tkankach.

ABSTRACT

Currently no form of dialysis eliminates the appropriate amounts of the oxalates from the body, which leads to the necessity of performing the kidney transplantation.

Transplantation should minimise the adverse effects related to the high concentration of the oxalates in the blood / hyperoxalemia, however, the data presented by the European Transplant Registry indicate the fact, that the time of surviving the isolated kidney transplant in people with hyperoxalemia is relatively short. After three years following the transplantation, works only 23% of the transplants from the living donors and only 17% of the organs taken from the deceased function.

Complex transplantation of the kidney and liver whose dysfunction causes hyperoxalemia constitutes the way out of this situation. Preceding liver transplantation, i.e. with the preserved renal function is an issue of controversy. The transplant of the part of the liver, without removing the own one, treated as an enzymatic substitution does not bring any effect since the own sick liver is still as source of the overproduction of the oxalic acid and its excessive excretion via urine.

Furthermore, during the illness the oxalates produced by the body are deposited in other tissues. In the preoperative process of preparing patients for complex transplantation of the liver and kidney it is possible to increase the frequency of hemodialysis procedures to remove as much of the oxalic acid as possible before the transplantation. However, this procedure still eliminates too small amounts of the oxalic acid and pre-transplanted kidney undergoes nephrocalcinosis as a result of mobilization of the oxalates deposited in other tissues.

Suggested solution to the problem consists in applying the combination of the renal replacement therapy and eliminating the oxalates present in dialysis by using the enzyme of oxalate decarboxylase (OXDC). The anticipated effect is decreased concentration of the oxalates in the plasma and maintaining it at a relatively low level minimising the its deposition in other tissues.

In order to determine the minimal dose of OXDC that can significantly decrease the concentration of the oxalates in the blood serum, in vitro tests were performed. The experiment has confirmed that using the high concentration of the enzyme reaching 30 mg/cm³ it is possible to reduce the concentration of the oxalates in the serum even by 60% during one hour. On the basis of these results the in vitro model of the peritoneal dialysis has

been created. The experiment has proved that adding oxalate decarboxylase to the dialysate of the enzyme of oxalate decarboxylase considerably increases reduction of the oxalates in the blood. After 6 hours following the incubation the concentration of the oxalates in the serum decreased from 83% (from 104 $\mu\text{mol/dm}^3$ to 18 $\mu\text{mol/dm}^3$).

For the purpose of in vivo tests the animal model using a pig (*Sus scrofa domesticus*) allowing for intravenous administration of the solution of the sodium oxalate and performing the peritoneal dialysis. A single cycle of the peritoneal dialysis performed in pigs removed 20% of the total amount of the oxalate in the blood. After adding the enzyme of oxalate decarboxylase to the dialysate 40% of the oxalates were removed from the blood. The result of the experiment suggests that active dialysis with the application of the enzyme of oxalate decarboxylase removes more oxalates from the blood than the traditional dialysis.

On the basis of the above results we can conclude that the application of combination of the renal replacement therapy and elimination of the oxalates present in dialysate by adding the enzyme of oxalate decarboxylase will bring an effect in the form of lowering the concentration of the oxalates in the plasma and maintaining it at a relatively low level minimizing the deposition of the oxalates in other tissues.