

Mgr Paulina Świeboda

Tytuł pracy: „Model zwierzęcy hiperoksalurii indukowanej zwiększoną podażą hydroksyproliny w diecie”.

Promotor: Dr hab. Rafał Filip

Streszczenie

Hiperoksaluria jest stanem chorobowym charakteryzującym się wydalaniem zwiększonej ilości szczawianów w moczu. Sole kwasu szczawowego są ubocznym produktem metabolizmu wydalanych w ponad 90% przez nerki. W układzie moczowym najczęściej występują złogi zbudowane ze szczawianu wapnia. Obecnie stosowane metody profilaktyki i leczenia kamicy moczowej mają ograniczoną skuteczność, dlatego też szczególnie istotna wydaje się potrzeba opracowania zwierzęcego modelu łagodnej odwracalnej hiperoksalurii, który dałby możliwość testowania nowych metod leczenia.

Głównym celem pracy było wytworzenie i sprawdzenie zwierzęcego modelu hiperoksalurii oraz kamicy szczawianowej nerek, wywołanych nadmiernym podawaniem hydroksyproliny (HP) w diecie, będącej fizjologicznym prekursorem szczawianu.

Drugorzędowym celem była ocena wpływu doustnej terapii dekarboksylazą szczawianową na zmniejszenie ilości szczawianów w moczu, zapobieganie hiperoksalurii i formacji kryształów szczawianu wapnia oraz powstawaniu złogów w nerkach świń, poddanych działaniu HP.

W przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystano model świni, który został wybrany ze względu na podobieństwo anatomiczne oraz fizjologiczne nerek świń z ludzkimi.

Model opracowano przy wykorzystaniu standardowej paszy wzbogaconej o HP. HP, jeden z głównych aminokwasów tworzących kolagen, jest metabolizowana w hepatocytach do kwasu pirogronowego i kwasu glikolowego, prekursora szczawianu. Wykorzystana w eksperymencie dekarboksylaza szczawianowa jest enzymem, który może być stosowany w leczeniu hiperoksalurii. Enzym ten ma wysokie powinowactwo do szczawianów i bierze udział w rozkładzie szczawianów do bardziej rozpuszczalnych produktów: dwutlenku węgla (CO₂) i kwasu mrówkowego (HCOOH).

Dla zrealizowania celów badania, przeprowadzono dwa doświadczenia. W trakcie trwania doświadczeń w wybranych punktach czasowych pobierano próbki: krwi, kału i moczu w celu określenia stężenia oraz dobowego wydalania szczawianów. Stałemu monitoringowi podlegała również masa ciała zwierząt, spożycie paszy oraz wody.

W doświadczeniu pierwszym w celu wytworzenia hiperoksalurii, 12 świniom podawano HP w diecie, w zróżnicowanych dawkach od 1 do 4% , w stosunku do dziennej porcji paszy. Dawka dzienna paszy była przeliczana raz w tygodniu, po zważeniu świń i wynosiła 2% aktualnej masy ciała. Po okresie adaptacji rozpoczęto podawanie HP. Przez 7 dni podawano wzrastające dawki HP od 1 do 3% zaś kolejne 14 dni 4% HP. W 27 dniu

eksperymentu dokonano podziału świń na dwie grupy: HP(+), która nadal indukowana była 4% HP przez kolejne 2 tygodnie oraz HP(-), której wycofano HP z diety.

Stwierdzono stopniowy wzrost dobowego wydalania szczawianów w moczu zwierząt w miarę zwiększania dawek HP. Istotny wzrost zaobserwowano po 10 dniach przyjmowania paszy wzbogaconej o 4% HP, w 23 dniu doświadczenia wyniósł on odpowiednio $77,21 \pm 78,69$ mg/24h w grupie HP(+) i $78,15 \pm 94,53$ mg/24h w grupie HP(-). Podczas okresu usuwania HP z diety poziom szczawianów wydalanych w moczu w grupie HP(-) istotnie zmniejszył się, osiągając poziom $19,11 \pm 10,48$ mg/24 ($p < 0,05$), natomiast w grupie HP(+) istotnie wzrósł do $116,48 \pm 55,34$ mg/24 ($p < 0,05$) pod koniec eksperymentu. Stężenia szczawianów w osoczu zwierząt z grupy HP(+) wzrosły z $0,026 \pm 0,016$ mmol/l do $0,059 \pm 0,038$ mmol/l ($p > 0,05$). Natomiast w grupie HP(-) poziom ten zmienił się z $0,027 \pm 0,017$ mmol/l na $0,033 \pm 0,015$ mmol/l i był o połowę niższy w porównaniu do grupy HP(+) ($p > 0,05$). Po zakończeniu eksperymentu w trakcie badań sekcyjnych dokonano makroskopowej oceny nerek, w trakcie której wykazano, że nerki świń z grupy HP(+) były powiększone, na przekroju z widocznymi zwłóknieniami i torbielami. Ponadto widoczne były różnej wielkości złogi szczawianu wapnia. W grupie HP(-) nie odnotowano widocznych złogów a zaobserwowane zmiany morfologiczne (zwłóknienie, torbiele) były istotnie mniej wyrażone w porównaniu do grupy HP(+).

Na podstawie analizy wyników przeprowadzonego doświadczenia można wnioskować, że podniesienie zawartości HP w diecie świń do 4% przez okres 4 tygodni skutecznie wywołuje hiperoksalurię co objawia się wzrostem stężenia szczawianów w moczu i surowicy oraz indukuje powstawanie złogów szczawianu wapnia w nerkach. Zwierzęta modelowe wykazywały prawidłową dynamikę przyrostu masy ciała, spożycia wody i paszy oraz wydalanie moczu co pozwala stwierdzić, że dobrana dawka HP była odpowiednio wysoka by wywołać pożądany efekt rozwinięcia hiperoksalurii ale jednocześnie charakteryzowała się niską toksycnością. Obniżenie wydalania szczawianów z moczem oraz częściowa regresja zmian morfologicznych w nerkach widoczne po 2 tygodniach od wycofania suplementowania HP sugeruje odwracalność wytworzonego modelu, który wykorzystano w trakcie następnego eksperymentu.

W doświadczeniu drugim, zwierzętom z indukowaną hiperoksalurią podawano enzym dekarboksylazę szczawianową w celu oceny jego wpływu na wydalanie szczawianów z moczem, a tym samym na możliwość zapobiegania rozwojowi i przeciwdziałanie kamicy nerkowej. Do badania wykorzystano 20 świń.

Po okresie adaptacji do klatek, dietę świń wzbogacono odpowiednią dawką HP, rozpoczynając od 1% do 4% HP. Paszę wzbogaconą o 4% HP podawano zwierzętom do 36 dnia doświadczenia. W 37 dniu badania świnie, podzielono na trzy grupy badawcze: grupę kontrolną, której zaprzestano podawania 4% HP z paszą do końca doświadczenia, grupę HP(+) której podawano paszę o zawartości 4% HP do końca trwania badania oraz grupę OxDc której oprócz 4% HP w paszy podawano enzym dekarboksylazę szczawianową. W grupie OxDc enzym podawany był 5 razy dziennie przez 12 kolejnych dni.

Zaobserwowano, że po odstawieniu 4% HP w grupie kontrolnej ilość szczawianów wydalanych w moczu spadła i osiągnęła wartość $26,04 \pm 7,28$ mg/24h w próbie 8 ($p < 0,05$). Niski poziom szczawianów w moczu w tej grupie utrzymywał się do końca trwania doświadczenia. W grupie HP(+) poziom dobowego wydalania szczawianów w końcowym

etapie badania istotnie wzrósł osiągając poziom $96,63 \pm 44,63$ mg/24h ($p < 0,05$). W grupie OxDc po podaniu enzymu ilość szczawianów w moczu, zmierzona w próbie 7, spadła z $77,45 \pm 44,33$ mg/24h do $63,41 \pm 27,18$ mg/24h w próbie 8. Niższy poziom szczawianów w moczu w grupie OxDc w porównaniu do grupy HP(+) był wyraźnie widoczny, jednak nie wykazano istotności statystycznej ($p > 0,05$). Porównano również stężenia szczawianów w osoczu ($\mu\text{mol/l}$) świń nie karmionych i karmionych przed sekcją. Najniższe stężenie szczawianów w osoczu odnotowano w grupie kontrolnej zarówno u zwierząt nie karmionych ($11,5 \pm 4,4$ $\mu\text{mol/l}$) jak i karmionych ($10,5 \pm 5,2$ $\mu\text{mol/l}$) przed sekcją. W grupie OxDc stężenie szczawianów u zwierząt nie karmionych ($19,4 \pm 0,2$ $\mu\text{mol/l}$) jak i karmionych ($19,3 \pm 1,3$ $\mu\text{mol/l}$) przed sekcją było niższe niż w grupie HP(+) (nie karmione: $22,2 \pm 7,8$ $\mu\text{mol/l}$, karmione: $23,7 \pm 1,3$ $\mu\text{mol/l}$).

Ostatniego dnia doświadczenia dokonano oceny makroskopowej nerek zwierząt na podstawie której stwierdzono, że zmiany zwłóknieniowe i obecność złogów szczawianów wapnia były mniej liczne w grupie kontrolnej i OxDc w porównaniu do grupy HP(+).

Analiza zawartości szczawianów w 100g treści pokarmowej pobranej z poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego wykazała wysoką zawartość szczawianów w jelicie krętym przy jednoczesnej niskiej ich zawartości w dalszych odcinkach okrężnicy zwierząt karmionych przed sekcją w grupie OxDc, co może świadczyć o obecności bakterii metabolizujących szczawiany.

Na podstawie przeprowadzonych analiz oraz makroskopowych obserwacji posekcyjnych, można przypuszczać że doustna terapia dekarboksylazą szczawianową przyniosła zamierzone efekty. Osiągnięto stan hiperoksalurii w grupie HP(+) zaś w grupach kontrolnej i OxDc wykazano spadek dobowego wydalania szczawianów z moczem przy jednoczesnym obniżeniu ich stężenia w surowicy co pozwala przypuszczać, że enzym spełnia swoją rolę w ograniczaniu rozwoju kamicy nerkowej.

Biorąc pod uwagę podobieństwa funkcjonalne i morfologiczne, uzyskane wyniki z obydwu doświadczeń wskazują na możliwość wykorzystania wytworzonego świńskiego modelu hiperoksalurii do badań nad nowymi metodami w zakresie profilaktyki i leczenia hiperoksalurii i kamicy nerkowej ludzi.

Abstract

Hyperoxaluria is a condition characterized by increased excretion of oxalate in the urine. Salts of oxalic acid are a by-product of the metabolism and are excreted by the kidneys in more than 90%. The most common urinary deposits are composed of calcium oxalate. Currently used methods for the prevention and treatment of urolithiasis have limited effectiveness, and there is therefore a need to develop an animal model of reversible mild hyperoxaluria, which would present the opportunity to test new methods of treatment, which is especially important.

The main purpose of this study was to establish and verify the animal model of hyperoxaluria and oxalate nephrolithiasis, caused by an excessive administration of hydroxyproline (HP) in the diet, which is a physiological precursor of oxalate.

The secondary objective was to evaluate the effect of the oral therapy of oxalate decarboxylase, and to discover whether it will reduce urinary oxalate excretion, prevent

hyperoxaluria and calcium oxalate crystals formation, and the accumulation of deposits in the kidneys of HP challenged pigs.

In the presented experiment we used a swine model which was chosen because of the anatomical and physiological similarities in the structure of kidneys in pigs and humans.

A reversible model of hyperoxaluria was developed using a standard feed enriched with HP. HP, a component amino acid of collagen, is metabolised to pyruvic acid and glycolic acid, the precursor of the oxalate in hepatocytes. Oxalate decarboxylase used in the experiment is an enzyme that can be used for treating hyperoxaluria. Oxalate decarboxylase has high affinity for oxalate and participates in the degradation of the oxalates into more soluble products: carbon dioxide (CO₂) and formic acid (HCOOH).

Two experiments were conducted to achieve the purpose of the study, during which samples of blood, feces and urine were taken at proper time points to determine concentration and daily excretion of oxalates. The body weights of piglets, drinking water intake and feed intake were continuously monitored. In the first experiment, 12 pigs were administered HP in the diet, in doses varying from 1 - 4%, compared to the daily dose of feed, to produce hyperoxaluria. The daily dose of feed was calculated once a week, after weighing pigs, and ranged 2% of body mass. HP was administered after adaptation period. HP concentration in the diet was increased during the 7 days of experiment from 1 - 3% HP; in the subsequent 14 days, 4% of HP was administered. On day 27 of the experiment, the pigs were divided into 2 groups: HP(+) treated with 4% HP for next 2 weeks, and HP(-) treated with a standard HP free diet.

A gradual increase in the daily urinary oxalates excretion was demonstrated during increasing doses of HP during the challenge period. Significant increases were observed after 10 days of administration 4% HP, on day 23 of the experiment, this was 77.21 ± 78.69 mg/24h in HP(+) group and, respectively, 78.15 ± 94.53 mg/24h in the HP(-) group. During the HP removal period, the level of urinary oxalates in the HP(-) group significantly decreased to the level of 19.11 ± 10.48 mg/24 ($p < 0.05$), while in the HP(+) group it significantly increased to 116.48 ± 55.34 mg/24 ($p < 0.05$) at the end of the experiment.

The concentrations of plasma oxalates in animals from the HP(+) group increased from 0.026 ± 0.016 mmol/l to 0.059 ± 0.038 mmol/l ($p > 0.05$), while in the HP(-) group the level changed from 0.027 ± 0.017 mmol/l to 0.033 ± 0.015 mmol/l and was lower by half in comparison with the HP(+) group ($p > 0.05$).

After the experiment, during autopsy, macroscopic assessment of the kidney demonstrated that kidneys from the HP(+) group were enlarged in cross-section, with visible fibrosis and cysts; various sizes of calcium oxalate deposits were also visible. In the HP(-) group there were no visible deposits, and morphological changes (fibrosis, cysts) were significantly less expressed vs. the HP (+) group.

Based on the results, it can be concluded that increasing the dose of HP to 4% in the pigs diet for 4 weeks caused hyperoxaluria, which resulted in an increase in the concentration of urine oxalates and plasma oxalates, and induced the formation of calcium oxalate deposits in the kidneys. The animals showed normal weight gain, water and feed intake and urine excretion, which demonstrated that the chosen dose of HP was sufficiently high to develop a hyperoxaluria, and simultaneously characterized by low toxicity. Reduction of urinary oxalate excretion and partial regression of morphological changes in the kidneys seen after 2

weeks of HP free diet suggests reversibility of the model. Such a model was used in the next experiment.

In the second experiment, the animals with induced hyperoxaluria were administered with oxalate decarboxylase enzyme to evaluate its effect on the excretion of urinary oxalate, and the possibility of preventing the development of urolithiasis. Twenty pigs were used in the experiment.

After adaptation to the cages, the diet of the pigs was enriched with an appropriate dose of HP, beginning with 1% - 4% of HP. Feed enriched with 4% HP was administered until day 36 of the experiment. On day 37 of the study, the pigs were divided into 3 groups: a control group, which had 4% HP withdrawn from the diet, an HP(+) group which had feed administered containing 4% HP until the end of the study and an OxDc group with a diet contained 4% HP and oxalate decarboxylase enzyme. In the OxDc group, the enzyme was administered 5 times per day for next 12 days.

It was observed that after withdrawal of 4% HP in the control group the level of excreted urinary oxalates decreased to 26.04 ± 7.28 mg/24h in sample 8 ($p < 0.05$). The low level of urinary oxalates in this group remained until the end of the experiment. In the HP(+) group in the final stage of the study, the level of daily excreted urinary oxalates significantly increased to 96.63 ± 44.63 mg/24h ($p < 0.05$). In the OxDc group after administration of the enzyme, urinary oxalates present in sample 7 decreased from 77.45 ± 44.33 mg/24 to 63.41 ± 27.18 mg/24h in sample 8. The lower level of urine oxalates in the OxDc group, compared with the HP(+) group was clearly visible, but there was no statistical significance ($p > 0.05$).

The levels of plasma oxalates ($\mu\text{mol/l}$) were also compared between fasted and fed pigs before autopsy. The lowest level of plasma oxalates were observed in the control group, both in fasted (11.5 ± 4.4 $\mu\text{mol/l}$) and fed animals (10.5 ± 5.2 $\mu\text{mol/l}$) before autopsy. In the OxDc group, the level of oxalates in fasted animals (19.4 ± 0.2 $\mu\text{mol/l}$) and fed animals (19.3 ± 1.3 $\mu\text{mol/l}$) before autopsy was lower than in the HP(+) group (fasted: 22.2 ± 7.8 $\mu\text{mol/l}$, fed: 23.7 ± 1.3 $\mu\text{mol/l}$).

On the last day of the experiment, macroscopic assessment of animals kidneys confirmed that the fibrotic changes and the presence of calcium oxalate deposits were less numerous in the control and OxDc group, in comparison with the HP(+) group.

Analysis of oxalate content in 100g of chyme taken from various sections of the gastrointestinal tract showed a high concentration of oxalate in the ileum, with a simultaneous low concentration in the following sections of colon from animals in the OxDc group fed before autopsy. This may indicate the presence of bacteria metabolizing oxalate.

Based on the analysis conducted and macroscopic observations, it can be assumed that oral therapy with oxalate decarboxylase produced the intended results. The state of hyperoxaluria was achieved in the HP(+) group. Decrease of daily urinary oxalate excretion was shown in both the control and OxDc groups, while simultaneously reducing the level of plasma oxalates. This suggests that the enzyme limits the development of urolithiasis.

Considering the functional and morphological similarities, the results obtained from both experiments suggest the possibility of using a porcine model of hyperoxaluria to investigate new methods of prevention and treatment of hyperoxaluria and nephrolithiasis in humans.