



**UNIWERSYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Anna Elżbieta Radajewska

**„ Poszukiwanie nowych sposobów protekcji nerek w zespole metabolicznym i uszkodzeniu niedokrwiennie-reperfuzyjnym.**

**Pozytywny efekt działania antyoksydantów.”**

„ Searching for the new methods of kidney protection in metabolic syndrome and ischemia-reperfusion injury. Positive effect of antioxidants.”

**Rozprawa doktorska**

**Doctoral thesis**

**Promotor: dr hab. n. farm. Iwona Bil-Lula, prof. uczelni**

Kierownik Katedry Analizy Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

**Promotor pomocniczy: dr n. farm. Anna Krzywonos-Zawadzka**

Katedra Analizy Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

## **STRESZCZENIE**

Choroby nerek są jednym z wiodących problemów medycznych na świecie i częstym powikłaniem przewlekłych chorób, takich jak: cukrzyca, zaburzenia układu krążenia i choroby serca, układu pokarmowego. Ponadto, uszkodzenie nerek obserwowane jest u pacjentów leczonych z zastosowaniem farmaceutyków o działaniu nefrotokycznym, jak chemoterapia podawana pacjentom onkologicznym. Jak dotąd nie opracowano skutecznej terapii leczenia chorób nerek. Dlatego, istotne jest dokładniejsze poznanie mechanizmów prowadzących do uszkodzenia nerek oraz poszukiwanie sposobów zapobiegania uszkodzeniu nerek lub leczenia chorób nerek.

Stres oksydacyjny jest ważnym czynnikiem uszkadzającym nerki w przebiegu wielu chorób m. in. w zespole metabolicznym (MetS) oraz uszkodzeniu niedokrwiennie-reperfuzyjnym (IRI). Zaburzenie równowagi między produkcją oksydantów i działaniem enzymów, związków i cząsteczek o potencjale antyoksydacyjnym prowadzi do zwiększonej ilości reaktywnych form tlenu (ROS) i azotu (RNS), które uszkadzając komórki prowadzą do ich śmierci. Z tego względu zastosowanie naturalnych lub syntetycznych związków antyoksydacyjnych w celu zmniejszenia szkodliwego działania ROS i RNS może przyczynić się do ochrony nerek narażonych na ich działanie w przebiegu przewlekłych chorób układowych i zmniejszeniu IRI w procesie transplantacji nerki.

Celem prezentowanej rozprawy doktorskiej ocena wpływu działania stresu oksydacyjnego w wybranych patomechanizmach uszkodzenia nerki oraz zbadanie protekcyjnego działania związków antyoksydacyjnych.

Cele szczegółowe przeprowadzonych badań to:

1. Porównanie dostępnych metod przechowywania nerki w procesie transplantacji i najnowszych doniesień na temat udoskonalenia składu płynu perfuzyjnego.

2. Porównanie stężeń markerów stresu oksydacyjnego i uszkodzenia nerek w homogenatach tkankowych nieleczonych szczurów z zespołem metabolicznym i z zespołem metabolicznym leczonych wyciągiem ze skórki granatu.
3. Ocena stężenia markerów uszkodzenia nerki, stresu oksydacyjnego i integralności mitochondrów w grupie nerek pobranych od dawców po śmierci mózgowej (DBD) i od dawców po śmierci sercowej (DCD).
4. Ocena wpływu leku antyoksydacyjnego - Mitoquinone dodawanego do płynu perfuzyjnego na stężenie markerów uszkodzenia nerki, stresu oksydacyjnego i integralność mitochondriów w grupie nerek DCD.
5. Porównanie stężenia białek zaangażowanych w szlak apoptozy (kaspaza 3, 9, Akt i pAkt) w grupach DBD, DCD i DCD + MitoQ.

Badania eksperymentalne prowadzone były na dwóch modelach badawczych: szczurzym modelu MetS *in vivo* i modelu *ex vivo* izolowanej nerki szczurzej, perfundowanej w systemie zimnej maszynowej perfuzji. W badaniach nad zespołem metabolicznym wykorzystano szczury z mutacją w receptorze leptyny leczone, bądź nie leczone, wyciągiem ze skórki granatu (*Punica granatum L.*) i osobniki bez mutacji leczone wyciągiem, które stanowiły grupę kontrolną. W badaniu *ex vivo* izolowane nerki szczurze zostały losowo przydzielone do jednej z trzech grup badanych. Nerki w grupie dawców po śmierci mózgowej (DBD) narażone były na minimalny czas ciepłego niedokrwienia (WIT), nerki w grupie dawców po zatrzymaniu krążenia (DCD) były poddane dłuższemu WIT (30 min), a następnie wszystkie nerki były perfundowane w systemie do zimnej maszynowej perfuzji nerki przez 22 godziny buforem z dodatkiem Mitoquinone (grupa DCD + MitoQ) lub bez leku. W pracach zastosowano testy analityczne do oceny ilościowej stężenia białek, aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz testy fluorymetryczne. Uzyskane wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej.

W celu sprawdzenia dostępnego stanu wiedzy na temat stosowanych metod przechowywania nerek przeznaczonych do zabiegu transplantacji i najnowszych osiągnięć

dotyczących optymalizacji tego procesu dokonano przeglądu literatury. Praca pogładowa przedstawiała obecnie wykorzystywane sposoby przechowywania nerki, które mają zastosowanie w praktyce klinicznej oraz są na etapie badań eksperymentalnych. Początkowo przedstawiono zarys historyczny transplantacji nerek i problem uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego przeszczepianych nerek. Następnie omówiono rodzaje dawców pośmiertnych, a także wskazano jakie są dostępne płyny prezerwacyjne. W dalszej części zaprezentowano sposoby przechowywania nerek z wyszczególnieniem ich zalet i ograniczeń. W ostatniej części omówiono najnowsze doniesienia naukowe skupione na udoskonaleniu przechowywania nerek z wykorzystaniem normotermicznej maszynowej perfuzji i terapii molekularnej oraz komórkowej, również z zastosowaniem mikropęcherzyków pochodzenia komórkowego. Omawiana praca pogładowa, w dogłębny sposób, przedstawiła stosowane metody przechowywania nerki oraz najnowsze kierunki badań w celu poprawy jakości przeszczepianego organu.

Badania eksperymentalne nad uszkodzeniem nerek w przebiegu MetS i działaniem wyciągu z *Punica granatum L.* wskazały, że szczury z zespołem metabolicznym charakteryzuje zwiększony stres oksydacyjny i zmieniona aktywność endogennego układu antyoksydacyjnego, co wpływa na uszkodzenie nerek. Ponadto zastosowane leczenie wyciągiem bogatym w polifenole, w zależności od stężenia, powoduje zmniejszenie stresu oksydacyjnego lub działa prooksydacyjnie. W wyniku zastosowania wyciągu dochodzi również do zmiany aktywności niektórych enzymów antyoksydacyjnych i zmniejszenia uszkodzenia nerek. Uzyskane wyniki wskazują, że wyciąg ze skórki *Punica granatum L.* może znaleźć zastosowanie w protekcji nerek w przebiegu MetS, w celu zapobiegnięcia progresji do ostrego i przewlekłego uszkodzenia nerek.

W dalszym etapie oceniliśmy wpływ stresu oksydacyjnego na transplantowane nerki i zastosowanie Mitoquinone jako suplementu dodawanego do płynu w trakcie trwania zimnej maszynowej perfuzji nerek od dawców DCD. Badania wykazały, że zwiększony stres oksydacyjny i uszkodzenie nerek obecne jest w przypadku nerek DCD w porównaniu do nerek

DBD. Ponadto MitoQ zredukował stres oksydacyjny i uszkodzenie nerek. Dalej oceniliśmy jak czas WIT oraz zastosowane leczenie wpływa na aktywację apoptozy, aktywność oksydazy cytochromu c i integralność mitochondrów. Stężenie białek pro-apoptotycznych: kaspazy 3 i kaspazy 9 było znacząco wyższe w grupie DCD w stosunku do grupy DBD, a zastosowanie MitoQ obniżyło stężenie tych białek. Podobne wyniki uzyskano w badaniu stężenia fosforylowanej formy Akt (p-Akt), zaangażowanej w mechanizm apoptozy, ale także w proces włóknienia nerek. Badania nie potwierdziły istotnych zmian w aktywności oksydazy cytochromu C oraz integralności mitochondriów. Uzyskane wyniki potwierdzają, że nerki DCD są bardziej narażone na stres oksydacyjny, zwiększoną apoptozę i uszkodzenie w porównaniu z nerkami DBD. Ponadto dowiedziono, że MitoQ jest dobrym kandydatem do nefroprotekcji w trakcie przechowywania nerek DCD przed przeszczepieniem z zastosowaniem zimnej maszynowej perfuzji.

Podsumowując, prezentowana rozprawa doktorska potwierdziła istotne znaczenie stresu oksydacyjnego w patomechanizmie uszkodzenia nerek o różnej etiologii. Ponadto, zastosowanie antyoksydantów w protekcji nerek może w znaczący sposób przyczynić się do poprawy jakości transplantowanego organu oraz zahamowaniu progresji uszkodzenia nerek w przebiegu MetS. Przedstawione wyniki mogą być podstawą do opracowania skutecznych terapii z wykorzystaniem antyoksydantów, w celu poprawy życia i zdrowia pacjentów oraz lepszej ochrony nerek w trakcie przechowywania przed zabiegiem transplantacji.

# **ABSTRAKT**

Kidney diseases are one of the leading medical problems in the world and a common complication of chronic diseases such as diabetes, heart and circulatory system disorders and gastrointestinal problems. Moreover, kidney injury is observed in patients treated with nephrotoxic pharmaceuticals, such as chemotherapy for cancer treatment. So far, no effective therapy for the kidney disease has been developed. Therefore, it is important to better understand the mechanisms of kidney damage and to develop therapies that prevent kidney damage and have a positive effect when kidney damage occurs and progresses.

Oxidative stress is an important factor in many diseases that damage kidney, including: in metabolic syndrome (MetS) or ischemia-reperfusion injury (IRI). An imbalance between the production of oxidants and the activity of enzymes, compounds and molecules with antioxidant potential leads to an increased amount of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS). Increased ROS and RNS damage cells and cause their death. Therefore, the use of natural or synthetic antioxidant compounds to reduce the harmful effects of ROS and RNS may protect kidneys in the course of chronic systemic diseases and reduce damage in the process of kidney transplantation.

The aim of the presented doctoral dissertation was to assess renal oxidative stress in metabolic syndrome and ischemia-reperfusion injury in the transplantation process, and the use of antioxidant compounds.

The specific objectives of the research conducted are:

1. Comparison of available kidney storage methods in the transplantation process and the latest reports on improving the composition of the perfusion fluid.
2. Comparison of the concentration of oxidative stress markers and kidney damage in tissue homogenates of untreated rats with metabolic syndrome and those with metabolic syndrome treated with pomegranate peel extract.

3. Assessment of the concentration of markers of kidney damage, oxidative stress and mitochondrial integrity in a group of kidneys collected from donors after brain death (DBD) and from donors after cardiac death (DCD).
4. Assessment of the effect of the antioxidant drug Mitoquinone (MitoQ) added to the perfusion fluid on the concentration of markers of kidney damage, oxidative stress and mitochondrial integrity in the DCD kidney group.
5. Comparison of the concentration of proteins involved in the apoptosis pathway (caspase 3, 9, Akt and pAkt) in the DBD, DCD and DCD + MitoQ groups.

Experimental studies were conducted on research models: an *in vivo* rat model of MetS and an *ex vivo* model of an isolated rat kidney perfused in a cold machine kidney perfusion system. In studies on the metabolic syndrome, rats with a mutation in the leptin receptor were used, treated or not with pomegranate peel extract (*Punica imprezaum L.*), and individuals without the mutation treated with the extract, which constituted the control group. In the *ex vivo* study, isolated rat kidneys were randomly assigned to one of three study groups. Kidneys in the group of donors after brain death (DBD) were exposed to minimal warm ischemia time (WIT), kidneys in the group of donors after circulatory death (DCD) were subjected to longer WIT (30 min). Then all kidneys were perfused in a cold machine perfusion system for 22 hours with a buffer with or without Mitoquinone (DCD + MitoQ group). The work used analytical tests to quantify the concentration of proteins, the activity of antioxidant enzymes and fluorimetric tests. The obtained research results were subjected to statistical analysis.

In order to check the available knowledge about the methods used to store kidneys intended for transplantation and the latest achievements in optimizing this process, a literature review was carried out. The review paper presented the currently used methods of a kidney storage, that are used in the clinic and are at the experimental research stage. Initially, a historical outline of kidney transplantation was presented and the problem of ischemia-reperfusion injury of transplanted kidneys was explained. Then, the types of deceased donors were discussed, and the available

preservation fluids were indicated. The following section presents methods of storing kidneys, detailing their advantages and limitations. The last part discusses the latest scientific reports focused on improving kidney storage using normothermic machine perfusion with the addition of molecular and cellular therapy, as well as using extracellular vesicles. The reviewed work in-depth presented the kidney storage methods used and the latest research directions to improve the quality of the transplanted organ.

Experimental studies on kidney damage in the course of MetS and the effect of *Punica granatum L.* extract indicated that rats with metabolic syndrome are characterized by increased oxidative stress and changed activity of the endogenous antioxidant system, which affects kidney condition. Moreover, the treatment with an extract rich in polyphenols, reduces oxidative stress or has a pro-oxidant effect depends on the concentration. The activity of some antioxidant enzymes also changes, reducing kidney damage. The obtained results indicate that the extract from *Punica granatum L.* peel may be used to protect the kidneys in the course of MetS, in order to prevent the progression to acute and chronic kidney damage.

In a further step, we assessed the impact of oxidative stress on transplanted kidneys and the use of Mitoquinone as a supplement added to the perfusate during cold machine perfusion of kidneys from DCD donors. The study has shown that increased oxidative stress and kidney damage are present in DCD kidneys compared to DBD kidneys. Additionally, MitoQ reduced oxidative stress and kidney damage. We further evaluated how WIT and the treatment influenced apoptosis, an activity of cytochrome c oxidase, and the mitochondrial integrity. The concentration of pro-apoptotic proteins: caspase 3 and caspase 9 was significantly higher in the DCD group compared to the DBD group, and the use of MitoQ reduced the concentration of these proteins. Similar results were obtained when examining the concentration of the phosphorylated form of Akt (p-Akt), which is involved in the mechanism of apoptosis, but also in the process of renal fibrosis. The studies did not confirm significant changes in cytochrome c oxidase activity or mitochondrial integrity. The results confirm that DCD kidneys are more exposed to oxidative



stress, increased apoptosis and damage compared to DBD kidneys. Furthermore, MitoQ has been proven to be a good candidate for nephroprotection during storage of DCD kidneys prior to transplantation using cold machine perfusion.

To sum up, the presented doctoral dissertation confirmed the significant role of oxidative stress in the mechanism of kidney damage to various etiologies. Moreover, the use of antioxidants in kidney protection may significantly contribute to improving the quality of the transplanted organ and inhibiting the progression of kidney damage in the course of MetS. The presented results may be the basis for the development of effective therapies using antioxidants to improve the life and health of patients and better protect the kidneys during storage before transplantation.