

Bartłomiej Grzegorz Kałaska

**Kinureniny a biomechanika i geometria kości
w przewlekłej chorobie nerek u szczura**

**Rozprawa na stopień
doktora nauk farmaceutycznych**

Zakład Farmakodynamiki
Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Promotor:
Prof. dr hab. Dariusz Pawlak

Białystok 2017

Rozprawa finansowana przez Narodowe Centrum Nauki
– numer projektu 2015/19/N/NZ4/01347

7. Streszczenie

Zaburzenia mineralno-kostne u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (PChN), określane jako CKD-MBD mogą prowadzić do samoistnych złamań kości, istotnie pogarszają jakość życia, są powodem kalectwa, a także zwiększonej śmiertelności. Przyczyny CKD-MBD są złożone, i pomimo coraz doskonalszych metod diagnostyki etiopatogeneza wciąż budzi liczne wątpliwości. W ostatnich latach pojawiły się interesujące obserwacje, które wskazują, że serotonina, jeden z metabolitów tryptofanu (TRP), może pełnić ważną rolę w CKD-MBD. Okazało się, że serotonina uwalniana z enterocytów hamuje aktywność osteoblastów i formowanie kości, natomiast pochodząca z ośrodkowego układu nerwowego w sposób pośredni wywołuje całkowicie przeciwne, anaboliczne działanie wobec tkanki kostnej. TRP jest prekursorem nie tylko serotoniny, ale przede wszystkim metabolitów szlaku kinureninowego. Liczne dane wskazują na znaczącą rolę kinureniny (KYN) i jej metabolitów w patogenezie PChN. Brak jest jakichkolwiek informacji dotyczących udziału tych substancji w rozwoju i progresji osteoporozy w przebiegu PChN.

Opisane powyżej dane stały się podstawą do oceny powiązania aktywnych biologicznie produktów degradacji TRP, które powstają w szlaku kinureninowym (KYN i jej bezpośredniego metabolitu – 3-hydroksykinureniny (3HK)) z geometrią i biomechaniką kości w doświadczalnej niewydolności nerek u szczura.

Trzydzieści trzy szczury szczepu Wistar zostały podzielone w sposób losowy na 2 grupy: grupę kontrolną i grupę badaną, którą poddano subtotalnej nefrektomii. Trzy miesiące po zabiegu do badań biochemicznych pozyskano surowicę, natomiast do oceny układu kostnego zwierząt (geometria, biomechanika, gęstość mineralna i ocena histologiczna) pobrano kości piszczelowe. Stężenie TRP oraz jego metabolitów (KYN i 3HK) oznaczono techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej; pomiar stężenia parathormonu (PTH) oraz aktywności markerów obrotu kostnego wykonano komercyjnymi zestawami immunoenzymatycznymi ELISA. Mózg od każdego ze zwierząt został podzielony na 5 regionów (mózdzek, pień mózgu, kora czołowa, podwzgórze i prądkowie), w których następnie oznaczono stężenie TRP, KYN i 3HK. W tkance kostnej określona została także ekspresja genu receptora węglowodorów arylowych (AhR), którego jednym z endogennych ligandów jest kinurenina oraz cytochromu P450 1A1 (CYP1A1) zależnego od AhR.

Zabieg subtotalnej nefrektomii u szczurów skutkował wzrostem stężenia klasycznych wskaźników niewydolnych nerek: kreatyniny i azotu mocznikowego w surowicy. Zmianom tym towarzyszył wzrost stężenia PTH w surowicy oraz łagodna hipokalcemia. U zwierząt po

nefrektomii zaobserwowano obecność licznych osteoklastów w kości beleczkowej i korowej oraz zwiększoną powierzchnię erozji osteoklastycznej kości beleczkowej. Całkowita ilość energii potrzebnej do złamania kości piszczelowej, przednio-tylna średnica warstwy korowej, grubość warstwy korowej, wskaźnik korowy, pole przekroju poprzecznego, wtórny moment bezwładności pola przekroju poprzecznego oraz średnia względna grubość warstwy korowej były istotnie statystycznie wyższe u zwierząt z doświadczalną niewydolnością nerek w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Zabieg subtotalnej nefrektomii u szczurów spowodował wzrost stężenia w surowicy KYN, 3HK oraz stosunku KYN/TRP. We wszystkich badanych częściach mózgu u szczurów z PChN doszło do obniżenia stężenia TRP oraz podwyższenia stężenia KYN a także współczynnika KYN/TRP. Zmianom tym towarzyszył istotny wzrost ekspresji genów AhR i CYP1A1. Stężenie KYN w surowicy korelowało ujemnie z większością ocenianych parametrów biomechanicznych i geometrycznych kości. Z kolei, zmiany stężeń KYN w korze czołowej oraz TRP w podwzgórzu i prążkowie korelowały dodatnio z głównymi parametrami biomechanicznymi i geometrycznymi kości.

Uzyskane wyniki sugerują, że metabolity szlaku kinureninowego mogą pełnić istotną rolę w rozwoju CKD-MBD. Wpływ kinurenin na wytrzymałość kości w indukowanej eksperymentalnie PChN wydaje się być zależny od miejsca ich występowania. Aktywacja ośrodkowych przemian kinurenin, podobnie jak serotoniny, skutkuje nasileniem procesów kościotworzenia, z kolei obwodowy wzrost stężenia kinurenin wykazuje efekt przeciwny wobec struktury kostnej w zwierzęcym modelu PChN. Uzyskane wyniki mogą potencjalnie przyczynić się do lepszego zrozumienia skomplikowanych i dynamicznych mechanizmów osteoporozy towarzyszącej PChN, a także mogą stanowić podstawy do prób rozwoju nowych strategii postępowania w diagnostyce, profilaktyce, jak też terapii zaburzeń mineralno-kostnych towarzyszących upośledzonej funkcji nerek.

8. Streszczenie w języku angielskim

Disturbances in mineral and bone metabolism in patients with chronic kidney disease (CKD) have been classified as a new systemic disorder known as CKD-MBD. CKD-MBD may lead to morbidity, mortality, increased the risk of fractures and decreased the quality of life in CKD patients. Despite increasingly sophisticated diagnostic techniques of CKD-MBD, the etiopathogenesis of this disorder raises many doubts. Recent studies indicate that serotonin, a monoamine synthesized from tryptophan (TRP), may play a potential role in CKD-MBD. Gut-derived serotonin decreases osteoblast activity and bone formation, while brain-derived serotonin exerts opposite influences on bone formation. TRP is the precursor not only to the serotonin but also and primarily to kynurenine metabolites. There are many indications that kynurenine pathway may play a key role in CKD development. However, knowledge on the association between disturbances in the kynurenine pathway and osteoporosis development in CKD is unknown.

The ultimate aim of the doctoral dissertation was to evaluate the association between TRP and its metabolite *via* kynurenine pathway (kynurenine (KYN) and its direct, highly reactive metabolite – 3-hydroxykynurenine (3HK)) and biomechanical and geometrical properties of bone in an experimental model of chronic renal failure in rats.

Thirty-three Wistar rats were randomly divided into two groups: sham-operated and subtotal nephrectomized animals. Three months after surgery, serum samples were obtained for the determination of biochemical parameters and kynurenine pathway metabolites; tibias were collected for bone biomechanical, bone geometrical, bone histological, and bone mass density analysis; brains were removed and divided into 5 regions for the determination of kynurenine pathway metabolites. Parathormone (PTH) and bone turnover biomarkers were determined by ELISA using commercially available colorimetric kits. Serum and brain concentrations of TRP, KYN, and 3HK were determined by high-performance liquid chromatography. The gene expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR) as a physiological receptor for kynurenine and AhR-dependent cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) in the bone tissue was also determined.

Subtotal nephrectomized rats had elevated serum creatinine values and blood urea nitrogen, developed hyperparathyroidism and hypocalcemia. Osteoclast number and the osteoclastic erosion of trabecular bone were elevated in subtotal nephrectomized rats. Work to fracture, anterior-posterior periosteal diameter, wall thickness, cortical index, cross-sectional area, cross-sectional moment of inertia, mean relative wall thickness were

significantly higher after nephrectomy compared to sham. Nephrectomized rats had elevated serum KYN and 3HK concentrations. Subtotal nephrectomized rats also presented significantly higher KYN concentrations and KYN/TRP ratio and significantly lower TRP levels in all studied parts of the brain. Nephrectomized rats also presented higher gene expression of AhR and CYP1A1. Serum KYN concentration correlated inversely with the main parameters of bone biomechanics and bone geometry. On the other hand, KYN in the frontal cortex and TRP in the hypothalamus and striatum correlated positively with the main parameters of bone biomechanics and bone geometry.

In addition to the complex mineral and hormone changes, kynurenine pathway metabolites may play a role in the development of CKD-MBD. The effect of kynurenines on bone metabolism seems to be closely dependent on the site of their occurrence. Intensified central kynurenine turnover, similarly to serotonin, may increase bone formation while intensified peripheral kynurenine turnover may exert different influences on bone formation in rats with CKD. Our results have enriched the understanding of the pathophysiology of CKD-MBD and may open new possibilities for the prevention, diagnosis, and treatment of bone abnormalities in CKD patients.