

## STRESZCZENIE

W związku z rozwojem cywilizacyjnym i wydłużeniem życia człowieka coraz więcej czynników wpływa niekorzystnie na funkcjonowanie nerek. Jako przewlekłą chorobę nerek (PChN) definiuje się wieloobjawowy zespół chorobowy, który polega na nieodwracalnym uszkodzeniu/ zmniejszeniu liczby nefronów z powodu pierwotnych bądź wtórnych procesów chorobowych zachodzących w miąższu nerki. Z powodu braku metod do przewidywania ryzyka progresji choroby, jak też deficytu dokładnych biomarkerów do prognozowania postępu PChN, badania związane z rozpoznaniem PChN stanowią wyzwanie kliniczne. Poszukiwanie metod wczesnej diagnostyki jest kluczowe dla rozwoju metod prewencyjnych czy skutecznej terapii towarzyszących powikłań w przebiegu PChN.

Badania metabolomiczne i proteomiczne umożliwiają poszukiwanie markerów biologicznych, które byłyby patognomiczne dla danej choroby już w jej wczesnym stadium, pozwalając na szybkie wkroczenie z profilaktyką u chorego. Identyfikacja takich analitów poszerzyłaby wiedzę na temat mechanizmów chorobowych. W niniejszej rozprawie doktorskiej oznaczono kilka metabolitów, których zmiany stężenia w osoczu/ erytrocytach mogłyby wiązać się z dysfunkcją nerek u pacjentów z różnym stopniem zaawansowania PChN za pomocą chromatografu cieczonego Acquity UHPLC sprzężonego ze spektrometrem masowym Xevo G2 Q-TOF firmy Waters.

Celem badań była ocena uszkodzenia nerek u pacjentów na podstawie oznaczenia w osoczu metabolitów związanych z arginina, tj.: asymetryczną dimetyloargininą (ADMA); symetryczną dimetyloargininą (SDMA); dimetyloargininą (DMA); arginina oraz cytrulina oraz zmodyfikowanie metody pozwalającej na oznaczenie w erytrocytach metabolitów związanych z NAD takich jak: dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD) - formy utlenionej; dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH) - formy zredukowanej; mononukleotydu kwasu nikotynowego (NAMN); mononukleotydu  $\beta$ -nikotynamidu (NMN); dinukleotydu adeninowego kwasu nikotynowego (NAAD); kwasu nikotynowego (NA); nikotynamidu (NAM).

Badania przeprowadzono na grupie 48 pacjentów z PChN (16 dziewcząt i 32 chłopców) leczonych w Klinice Nefrologii Pediatricznej i Stacji Dializ Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Grupa kontrolna składała się z 33 zdrowych osób (19 dziewcząt i 14 chłopców). Wiek badanej populacji wahał się od 3 do 18 lat. Średnia wieku dla wszystkich osób badanych wynosiła  $11 \text{ lat} \pm 4,72$  i była nieznacznie wyższa u pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej. Wszyscy badani spełnili kryteria włączenia, tj.: wiek: 3-18 lat, zdiagnozowanie PChN o różnym stopniu zaawansowania; wyrażenie zgody na udział w badaniu. Do badań nie włączono osób, które nie spełniły ww. kryteriów oraz u których rozpoznano inną ostrą chorobę zapalną i/lub nieprawidłowość oddziałującą na przebieg procedury badawczej. W celu dokładnej analizy GFR służył do podziału grupy badawczej na grupę kontrolną z GFR powyżej  $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$  (grupa I),  $n=33$ ; GFR  $60-89 \text{ ml/min/1,73m}^2$  – grupa II,  $n=15$ ; GFR  $30-59 \text{ ml/min/1,73m}^2$  – grupa III,  $n=16$ ; GFR  $15-29 \text{ ml/min/1,73m}^2$  – grupa IV,  $n=8$ ; GFR poniżej  $15 \text{ ml/min/1,73m}^2$  – grupa NZ (leczenie nerkozastępcze),  $n=9$ .

Do badań metabolitów NO (arginina, ADMA, SDMA, cytrulina, DMA) wykorzystano opracowaną w naszym zespole w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu metodę jednoczesnej ekstrakcji acetonitrylem i upochadniania chlorkiem benzoilu. Umożliwiła ona na analizę wszystkich związków oraz rozdział chromatograficzny izomerów strukturalnych jakimi są ADMA i SDMA. Dzięki zastosowaniu odpowiedniego stężenia/ czasu eluentów fazy ruchomej w trakcie rozdziału chromatograficznego udało się oddzielić poszczególne metabolity argininy. Metoda ta może być stosowana z powodzeniem w rutynowych klinicznych/diagnostycznych laboratoriach. Dodatkowymi korzyściami z jej zastosowania jest oszczędność czasu koniecznego do przygotowania/prowadzenia badań oraz zmniejszenie kosztów niezbędnych do wykonania analizy.

Analiza statystyczna wykonanych wyników badań pokazała, że chore dzieci różniły się dziewięcioma statystycznie istotnie wynikami w porównaniu do grupy kontrolnej (tj. stężeniem wapnia, DMA, GFR, SDMA, cytruliny, kreatyniny, mocznika, oraz ADMA). Różnice istotne statystycznie dla pacjentów i kontroli związane są głównie z wynikami podstawowych badań laboratoryjnych wykonywanych w trakcie PChN. W przypadku metabolitów przemian NO w większości oznaczanych parametrów występują różnice istotne statystycznie między grupą badaną i grupą kontrolną. Dla metabolitów

związanych z nukleotydami nie występowały różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą kontrolną i badaną. Dodatkowo zauważono, że różnice między stadiami PChN u osób badanych występują dla następujących parametrów: kreatynina, GFR, mocznik, ADMA i NAD.

Metoda jednoczesnej analizy dla metabolitów nukleotydów została zmodyfikowana w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Modyfikacja metody w zakresie analizy RBC do pomiaru metabolitów NAD okazała się być skuteczna do oznaczeń ilościowych związków (tzn. NAD, NADH, NA, NAM, NA, NMN, NAMN, NAAD) w specyficznej matrycy jaką są erytrocyty ludzkie. Zaletą metody jest niewielka ilość próbki pacjenta potrzebna do analizy. Do badań wystarczy jedynie 50 µl erytrocytów, a czas analizy jest stosunkowo krótki (13 min) Opracowano odpowiedni gradient do elucji składników w trakcie rozdzału chromatograficznego. Zastosowaniu odpowiedniego stężenia/ czasu eluentów fazy ruchomej w trakcie rozdzału chromatograficznego pozwala na oddzielenie poszczególnych metabolitów nukleotydów.

Analiza statystyczna metabolitów związanych z nukleotydami nie wykazała różnic istotnych statystycznie dla NAD, NA, NAM, NADH, NAAD, NAMN oraz NMN. Stężenia NAD jest nieznacznie niższe dla PChN pacjentów w porównaniu dla grupy kontrolnej, Podobne zależności występują też dla pozostałych nukleotydów. Wyższe stężenia stwierdzono u osób z grupy kontrolnej dla NA, NAAD, NADH, NAMN, NMN. Jedynie w przypadku NAM zaobserwowano niższe stężenia tego związku u osób zdrowych.

Rezultaty uzyskane w wyniku pracy doktorskiej pomagają w lepszym zrozumieniu związków pomiędzy metabolizmem poszczególnych analitów, biorących udział w różnych cyklach biochemicznych oraz rzucają więcej światła na skomplikowany patomechanizm zmian w przewlekłej chorobie nerek. Dalsze badania metaboliczne niewątpliwie przyczynią się do ustalenia biomarkerów PChN w niedługiej przyszłości.

Na podstawie analiz wyciągnięto następujące wnioski:

1. U dzieci z PChN stwierdzono istotny statystycznie wzrost stężenia osoczowych metabolitów NO takich jak DMA, ADMA, SDMA, cytrulina. Stężenie osoczowej argininy było również wyższe u chorych dzieci w stosunku do grupy kontrolnej, jednak bez znaczenia statystycznego.

2. Wraz z zaawansowaniem przewlekłej choroby nerek zauważono tendencję do narastania osoczowych stężeń ADMA, SDMA, DMA, cytruliny, argininy, choć nie zawsze o znaczeniu statystycznym. Najwyższe wartości stężeń (nawet do 2.5-ego wzrostu) wykazano w grupie dzieci leczonych nerkozastępczo z wyjątkiem z wyjątkiem metabolitów SDMA i arginina. W stadium przeddializacyjnym PChN zaobserwowano gwałtowny spadek stężenia analitów: arginina, DMA, cytrulina.
3. Stężenia osoczowej ADMA wykazywały istotną statystycznie ujemną korelację ze stopniem przesączania kłębuszkowego (GFR), co przemawia za jego prognostyczna rolą dla przewlekłej choroby nerek.
4. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy erytrocytarnymi stężeniami metabolitów związanych z nukleotydami (NAD, NADH, NA, NAM, NA, NMN, NAMN, NAAD) u PChN pacjentów a grupą kontrolną.
5. Wraz z zaawansowaniem choroby zauważono tendencję spadkową erytrocytarnych stężeń NAD, NAAD, NADH, NMN, NAMN bez znaczenia statystycznego. W przeddializacyjnym stadium PChN zaobserwowano wzrost stężenia praktycznie wszystkich badanych analitów poza NAM, ale bez cech istotności statystycznej.
6. Badane anality NO pozwoliły spostrzec, że w przeddializacyjnym stadium przewlekłej choroby nerek dochodzi do wielopoziomowych zaburzeń profilu metabolomicznego co niewątpliwie znajduje odzwierciedlenie w stanie klinicznym chorego.
7. Metoda oparta na jednoczesnej ekstrakcji acetonitrylem i upochadniania chlorkiem benzoilu pozwala na rozdział chromatograficzny izomerów strukturalnych jakimi są ADMA i SDMA. Technika ta cechuje się wysoką powtarzalnością pomiarów, dobrą czułością jak i selektywnością. Ponadto może być rekomendowana do badań klinicznych/szpitalnych oraz naukowych.
8. Zaproponowana przez nas modyfikacja metody do pomiaru nukleotydów w zakresie analizy krwinek czerwonych okazała się być skuteczna do oznaczeń ilościowych związków (tzn. NAD, NADH, NA, NAM, NA, NMN, NAMN, NAAD) w specyficznej matrycy jaką są erytrocyty ludzkie.

## SUMMARY

Due to the development of civilization and the prolongation of human life, more and more factors adversely affect the functioning of the kidneys. As a chronic kidney disease (CKD), is defined a multi-symptom syndrome, which consists of irreversibly damaging / decreasing the number of nephrons due to primary or secondary disease processes in the kidney parenchyma. Due to the lack of methods to predict the risk of disease progression, as well as the deficit of accurate biomarkers to predict the progression of CKD, studies related to the diagnosis of CKD are a clinical challenge. The search for early diagnosis methods is crucial for the development of preventive methods or effective therapy accompanying complications in CKD.

Metabolomic and proteomic analysis enable biomarker discovery that would be pathognomic at an early stage for a given disease, allowing for a fast and effective patient's prophylaxis. The identification of such analytes would broaden knowledge about disease mechanisms. In the present dissertation, several metabolites were analysed whose changes in plasma / erythrocyte concentration could be associated with kidney dysfunction in patients with different stages of CKD using the liquid chromatography (UPLC, Waters Acquity mode) coupled to a high-resolution mass spectrometer (Xevo G2-S QTof).

The aim of the study was to assess kidney damage in patients based on the plasma assay of arginine related metabolites, i.e. asymmetric dimethylarginine (ADMA); symmetrical dimethylarginine (SDMA); dimethylarginine (DMA); arginine and citruline and modification of the method allowing the determination in erythrocytes of metabolites associated with NAD such as: nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) - oxidized form; nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) - a reduced form; nicotinic acid mononucleotide (NAMN); mononucleotide  $\beta$ -nicotinamide (NMN); nicotinic acid adenine dinucleotide (NAAD); nicotinic acid (NA); Nicotinamide (NAM).

The study was a group of 48 patients with CKD (16 women and 32 men) treated in the Department of Pediatric Nephrology and the Dialysis of the Medical University in Wroclaw. The control group consists of 33 healthy people (19 women and 14 men). The age of the

population has been studied for half a year and 18 years. The average age was  $11 \text{ lat} \pm 4,72$  and was slightly higher in patients compared to the group. All in all, it is possible to diagnosed CKD with different stages of advancement; a consent to participate in the study. The study did not include people who did not meet the above-mentioned criteria and for whom another active inflammatory disease/ or an abnormality potentially affecting the course of the study have been diagnosed. For accurate analysis, the GFR served to divide the test group into a control group with a GFR above  $90 \text{ ml/ min/ } 1.73 \text{ m}^2$  (group I),  $n = 33$ ; GFR  $60\text{-}89 \text{ ml /min / } 1.73 \text{ m}^2$  - group II,  $n = 15$ ; GFR  $30\text{-}59 \text{ ml/ min / } 1.73 \text{ m}^2$  - group III,  $n = 16$ ; GFR  $15\text{-}29 \text{ ml/min/}1.73 \text{ m}^2$  - Group IV,  $n = 8$ ; GFR below  $15 \text{ ml/ min /}1.73 \text{ m}^2$  - NZ group (renal replacement syndrome),  $n = 9$ .

For the studies of NO metabolites (arginine, ADMA, SDMA, citrulline, DMA), the method of simultaneous extraction with acetonitrile and benzoyl chloride derivatization was developed in our team at the Department of Medical Biochemistry at the Medical University of Wrocław. The method enabled the analysis of all compounds and the chromatographic separation of structural isomers such as ADMA and SDMA. Due to the use of the appropriate concentration /time of the mobile phase eluents during the chromatographic separation, all the arginine metabolites were separated. This method can be used successfully in routine clinical /diagnostic laboratories. Additional benefits of its use are time saving which is necessary to prepare /conduct research and reduction of the costs which are necessary to perform the analysis.

Statistical analysis of the test results showed that the sick children differed in nine statistically significant results compared to the control group (calcium, DMA, GFR, SDMA, citrulline, creatinine, urea, and ADMA concentrations). Differences statistically significant for patients and controls are mainly related to the results of basic laboratory tests performed during treatment of CKD. In the case of the metabolites of NO in the majority of parameters determined there are statistically significant differences between the test group and the control group. There were no statistically significant differences between the control and the test group for the metabolites associated with nucleotides. In addition, it was noted that the differences between subgroups exist for the following parameters: creatinine, GFR, urea, uric acid, ADMA and NAD.

The method of simultaneous analysis for nucleotide metabolites has been modified

in the Department and Department of Medical Biochemistry of the Medical University of Wrocław. The existing methods of nucleotide analysis have been adapted to the QTOF-MS capabilities at the Department of Biochemistry. The run time of a single sample was 13 minutes. The advantage of the method is the small amount of patient sample needed for analysis. Only 50 µl of erythrocytes are needed for testing. An appropriate gradient was elaborated for elution of the components during the chromatographic separation. Application of the appropriate concentration/ time of the mobile phase eluants during the chromatographic separation allows separation of individual nucleotide metabolites. Statistical analysis of the metabolites associated with nucleotides did not show statistically significant differences for NAD, NA, NAM, NADH, NAAD, NAMN and NMN. The NAD concentration is slightly lower for CKD patients compared to the control group. Similar relationships are also found for other nucleotides. Higher concentrations were found in the control group for NA, NAAD, NADH, NAMN and NMN. Only in the case of NAM, lower concentrations of this compound were observed in healthy subjects.

The results of the doctoral thesis help to better understand the relationships between the metabolism of individual analytes, taking part in various biochemical cycles, and shed more light on the complex pathomechanism of changes in chronic kidney disease. Further metabolic studies will undoubtedly contribute to establishing CKD biomarkers in the near future.

## **CONCLUSIONS**

1. In children with CKD, a statistically significant increase in the concentration of plasma NO metabolites such as DMA, ADMA, SDMA, citrulline was found. The concentration of plasma arginine was also higher in children compared to the control group, but not statistically significant.
2. Along with the advancing of chronic kidney disease, there was a tendency to increase plasma concentrations of ADMA, SDMA, DMA, citrulline, and arginine, although not always of statistical significance. The highest concentration values (even up to the 2.5th increase) were demonstrated in the group of children treated with renal replacement therapy except for

the metabolites SDMA and arginine. At the pre-dialysis stage of CKD, a sharp decrease in analyte concentration was observed: arginine, DMA, citrulline.

3. Plasma ADMA concentrations showed statistically significant negative correlation with glomerular filtration rate (GFR), which supports its prognostic role for chronic kidney disease.

4. There were no statistically significant differences between erythrocytes concentrations of nucleotide-related metabolites (NAD, NADH, NA, NAM, NA, NMN, NAMN, NAAD) in CKD patients and control group.

5. With the advancement of the disease, there was a downward trend in erythrocyte concentrations of NAD, NAAD, NADH, NMN, and NAMN with no statistical significance. In the pre-dialysis stage of CKD, an increase in the concentration of virtually all analytes tested outside of NAM was observed, but without statistical significance.

6. NO studies examined allowed to notice that in the pre-dialysis stage of chronic kidney disease there is a multilevel disturbance of the metabolomic profile which is undoubtedly reflected in the patient's clinical condition.

7. The method based on simultaneous extraction with acetonitrile and benzoyl chloride adulteration allows chromatographic separation of structural isomers such as ADMA and SDMA. This technique is characterized by high repeatability of measurements, good sensitivity and selectivity. In addition, it can be recommended for clinical / hospital and scientific research.

8. The modification of the nucleotide measurement method for red blood cell analysis proposed by us has been shown to be effective for quantitative determination of compounds (i.e., NAD, NADH, NA, NAM, NA, NMN, NAMN, NAAD) in a specific matrix that is human erythrocytes.



