

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Małgorzata Wilusz

Ocena profilu kwasów tłuszczowych u pacjentów
po przeszczepie serca lub nerki

Promotor: Prof. dr hab. Krystyna Sztefko

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii Klinicznej,
Instytutu Pediatrii, Collegium Medicum, Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. Krystyna Sztefko

Kraków, 2018

Pragnę podziękować wszystkim, bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać.

Przede wszystkim Mojej Pani Promotor, Profesor Krystynie Sztefko, za opiekę merytoryczną oraz okazane wsparcie.

Dziękuję współautorom oraz wszystkim osobom zaangażowanym w uzyskanie materiału do badań oraz pomoc w badaniach będących podstawą publikacji składających się na niniejszą rozprawę doktorską.

Dziękuję Mężowi za pomoc, zrozumienie i bezustanną motywację w dążeniu do celu.

Spis treści

1.	Wykaz skrótów/ Abbreviations	1
2.	Wstęp	2
3.	Cel pracy	6
4.	Wyniki badań	7
5.	Wnioski	11
6.	Schematy przeprowadzonych badań wraz z wynikami uzyskanymi na poszczególnych etapach.....	12
7.	Streszczenie	15
8.	Introduction.....	16
9.	Aim.....	19
10.	Results	20
11.	Conclusions.....	24
12.	Schemes of conducted tests with the results obtained at individual stages	25
13.	Abstract	28
14.	Załączniki / Appendices	29

1. Wykaz skrótów/ Abbreviations

SFA – Saturated Fatty Acids; Kwasy tłuszczowe nasycone

MUFA – Monounsaturated Fatty Acids; Kwasy tłuszczowe jednonienasycone

PUFA – Polyunsaturated Fatty Acids; Kwasy tłuszczowe wielonienasycone

TNF α – Tumor Necrosis Factor; Czynn timer martwicy nowotworu

IL10 – Interleukin-10; Intrleukina 10

CsA – Cyclosporine; Cyklosporyna A

Tac – Tacrolimus; Takrolimus

LDL – Low-density lipoprotein; Lipoproteina o małej gęstości

HDL – High-density lipoprotein; Lipoproteina o dużej gęstości

eGFR – Estimated glomerular filtration rate; Szacunkowy współczynnik filtracji kłębuszkowej)

EET – Epoxyeicosatrienoic acids; Kwasy epoksy-eikozatrienowe

HTR – Heart Transplant Recipients; Pacjenci po przeszczepie serca

RTR – Renal Transplant Recipients; Pacjenci po przeszczepie nerki

2. Wstęp

Rozprawę doktorską pt.:

„Ocena profilu kwasów tłuszczowych u pacjentów po przeszczepie serca lub nerki”

stanowią cztery publikacje naukowe:

[A] **Wilusz M**, Sztefko K; *Kwasy tłuszczowe u pacjentów po transplantacji narządów*; Journal of Laboratory Diagnostics, Diagn Lab 2015; 51(1): 37-42.

[B] **Wilusz M**, Wasilewski G, Przybyłowski P, Janik L, Bugajska J, Sztefko K; *Effect of Immunosuppressive Therapy on the Serum Fatty Acids of Phospholipids Fraction in Patients After Heart Transplantation*; Transplantation Proceedings, 46, 2825 – 2829 (2014).

[C] **Wilusz M**, Cieniawski D, Bugajska J, Berska J, Ignacak E, Bętkowska-Prokop A, Kuźniewski M, Sułowicz S, Sztefko K; *Effects of Immunosuppressive Drugs on Serum Fatty Acids of Phospholipids Fraction in Renal Transplant Recipients*; Transplantation Proceedings, 48, 1616 – 1622 (2016).

[D] **Wilusz M**, Cieniawski D, Wasilewski G, Kuźniewski M, Sułowicz W, Sztefko K; *Fatty acids profile in patients after heart or renal transplantation who developed metabolic complications*; Advances in Medical Sciences Volume 63 (No.2), September 2018.

Kwasy tłuszczowe stanowią nie tylko źródło energii, lecz będąc głównym składnikiem błony komórkowej, wpływają na jej płynność oraz przepuszczalność [B7; B8; B9]. Ponadto, pełnią ważną rolę w regulacji takich procesów jak: acylacja i sortowanie białek, aktywacja enzymów i receptorów błonowych, proliferacja i różnicowanie komórek. Ze względu na rodzaj oraz liczbę wiązań pomiędzy atomami węgla, kwasy tłuszczowe dzielą się na: kwasy tłuszczowe nasycone (Saturated Fatty Acids; SFA), jednonienasycone (Monounsaturated Fatty Acids; MUFA) oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe (Polyunsaturated Fatty Acids; PUFA). Wśród kwasów wielonienasyconych wyróżnia się kwasy tłuszczowe szeregu n-3 (PUFA n-3) oraz szeregu n-6 (PUFA n-6).

Praca doktorska dotyczy oceny profilu kwasów tłuszczowych u pacjentów po przeszczepie serca lub nerki, a jej wyniki mają w znacznym stopniu charakter poznawczy. W artykule przeglądowym [A] przedstawiono podstawowe informacje na temat rodzaju kwasów tłuszczowych oraz ich przemian metabolicznych, ze szczególnym uwzględnieniem roli i znaczenia kwasów tłuszczowych u pacjentów po przeszczepach narządów [A23; A24; A36; A45; A46; A51]. Przedstawiono zarówno niekorzystny, jak i korzystny wpływ kwasów tłuszczowych na funkcjonowanie organizmu. Niekorzystny wpływ związany jest m.in. z ich negatywnym wpływem na funkcję śródbłonna, szczególnie w sytuacji wzmożonej produkcji cytokin prozapalnych, powstawania rodników tlenowych oraz obniżonej obrony antyoksydacyjnej [A17]. Na przykład, jednoczesna podaż kwasu linolowego oraz TNF α do linii komórkowych powoduje, że znacznie częściej ulegają one apoptozie [A18]. Utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych to istotny mechanizm w patogenezie m.in. miażdżycy oraz waskulopatii allograftu [A13; A16]. Należy podkreślić, że komplikacje sercowo – naczyniowe stanowią najczęstszą przyczynę zgonów u pacjentów po przeszczepach narządów [A11; A12; A13]. Zaburzenie metabolizmu kwasów tłuszczowych obserwowane jest także w cukrzycy, która często rozwija się po transplantacji, zwłaszcza u osób leczonych tacrolimusem [A11]. Niekorzystny wpływ na organizm człowieka mają kwasy tłuszczowe nasycone oraz kwasy należące do szeregu PUFA n-6, znane z działania prozapalnego. Ponadto, kwasy tłuszczowe PUFA n-6 stymulują procesy zakrzepowe, alergiczne oraz proliferację komórek [A10; C18; C19]. Korzystny wpływ kwasów tłuszczowych wykazują natomiast kwasy szeregu PUFA n-3 poprzez swoje działanie przeciwzapalne, przeciwzakrzepowe, hipotensyjne [B7; B8; B10; C15; C16; C17]. Znany jest także ich korzystny wpływ na funkcję śródbłonna [A43; A44]. Jednak w warunkach stresu oksydacyjnego i utleniania wolnorodnikowego, z kwasów wielonienasyconych PUFA n-3, powstają nadtlenki lipidowe, które działają toksycznie na komórki [A37; A38]. U osób po przeszczepie serca, poddanych suplementacji kwasami PUFA n-3, stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy wzrostem stężenia kwasu C20:5 w surowicy a stężeniem TNF α , przy jednoczesnym spadku IL10 oraz witaminy E [A41]. Podobny wzrost TNF α po suplementacji kwasami PUFA n-3 obserwowany był u osób z zaawansowaną chorobą wieńcową oraz u osób z grupy wysokiego ryzyka rozwoju miażdżycy [A42].

Bardzo trudno jest dokonać analizy publikacji naukowych, których przedmiotem są kwasy tłuszczowe w różnych sytuacjach klinicznych. Wynika to z faktu, że właściwości kwasów tłuszczowych, ich metabolizm i wpływ na różne narządy mogą być odmienne, nawet jeżeli analizuje się jednorodną z punktu widzenia chemicznego grupę kwasów. Wydaje się, że trafniejsze jest wnioskowanie o roli kwasów tłuszczowych uwzględniając ich indywidualne stężenie, a nie operując całkowitym stężeniem kwasów tłuszczowych lub sumą stężeń kwasów nasyconych lub nienasyconych. Ponadto, metabolizm kwasów tłuszczowych może przebiegać nieprawidłowo w procesie B-oksydacji, co prowadzi do sytuacji, w której kwas może zacząć działać toksycznie na komórki. Trudność w ocenie różnych publikacji polega także na tym, że przedmiotem badań są grupy pacjentów cechujących się różnymi jednostkami chorobowymi, a także stosującymi różne diety lub suplementację kwasami n-3.

Dotychczas opublikowano niewiele prac oceniających kwasy tłuszczowe u osób po zabiegach transplantacji. Jest to specyficzna grupa chorych m.in. z tego powodu, że pacjenci po przeszczepie muszą do końca życia przyjmować leki immunosupresyjne, a także bardzo często leki hipolipemiczne oraz hipotensyjne. Najczęściej stosowanymi po przeszczepach lekami immunosupresyjnymi są cyklosporyna (CsA) oraz tacrolimus (Tac). Stosowanie tych leków związane jest z ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych: z literatury wiadomo, że u osób leczonych CsA częściej dochodzi do rozwoju hipercholesterolemii, hipertriglicerydemi oraz stwierdza się u nich wyższe stężenie cholesterolu frakcji LDL i niższy poziom cholesterolu frakcji HDL niż u pacjentów stosujących Tac [A11; A12; A14; A15]. Brak jest publikacji dotyczących wpływu tych leków immunosupresyjnych na profil kwasów tłuszczowych u chorych po przeszczepie. W nielicznych artykułach można znaleźć dane dotyczące kwasów tłuszczowych w kontekście zaburzeń metabolicznych lub funkcji nerek u chorych po przeszczepach. Podjęcie badań podstawowych dotyczących kwasów tłuszczowych wydaje się być zasadne, ponieważ poznanie profilu kwasów tłuszczowych u osób po transplantacji może być podstawą do opracowania bardziej zindywidualizowanej diety w zależności od rodzaju przeszczepionego narządu, rodzaju stosowanego leku, bądź współwystępowania metabolicznych zaburzeń potransplantacyjnych.

Hipoteza badawcza:

Profil kwasów tłuszczowych u chorych po przeszczepie zależy od rodzaju przeszczepionego narządu, stosowanego leku immunosupresyjnego, zaburzeń metabolicznych i funkcji nerki.

3. Cel pracy

Celem niniejszej pracy była ocena profilu kwasów tłuszczowych w surowicy krwi u osób po przeszczepie serca lub nerki.

Cele szczegółowe obejmowały ocenę profilu kwasów tłuszczowych w zależności od:

- a) rodzaju przeszczepionego narządu,
- b) stosowanego leku immunosupresyjnego,
- c) profilu lipidowego,
- d) współistniejącej cukrzycy,
- e) wartości GFR.

4. Wyniki badań

W pracach [B] oraz [C] przedstawiono wyniki oceny profilu kwasów tłuszczowych u osób po przeszczepie serca lub nerki w zależności od rodzaju stosowanego leku immunosupresyjnego. Jako leki immunosupresyjne stosowano CsA albo Tac, które nie były zmieniane w trakcie leczenia. Do badań włączono także osoby zdrowe, nie poddawane zabiegowi transplantacji, które stanowiły grupy kontrolne. U pacjentów po przeszczepie serca zaobserwowano różnice w profilu kwasów tłuszczowych, zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej, jak również pomiędzy pacjentami leczonymi różnymi lekami immunosupresyjnymi [B - tabela 1; B - Rycina 1 lub Schemat 1A i 1B]. Największe różnice dotyczyły stężeń: kwasu nasyconego C24, kwasu C22:6 (n-3) oraz kwasów: C20:2 (n-6) i C20:4 (n-6), których poziom był znacznie wyższy u osób po przeszczepie serca w porównaniu do grupy kontrolnej. Suma kwasów PUFA n-6 oraz suma wszystkich kwasów: nasyconych i nienasyconych u chorych po przeszczepie serca, leczonych CsA i Tac, była podobna jak w grupie kontrolnej. Z kolei suma PUFA n-3 była wyższa u pacjentów po przeszczepie serca w porównaniu do kontroli, a także wyższa u osób stosujących CsA w porównaniu do osób stosujących Tac. Ponadto pacjenci leczeni CsA mieli wyższe stężenie kwasu C18:3, a także wyższą sumę kwasów nasyconych i sumę wszystkich kwasów tłuszczowych w porównaniu do osób leczonych Tac. Nie zaobserwowano żadnych statystycznie istotnych różnic w profilu kwasów tłuszczowych u osób po przeszczepie nerki w zależności od rodzaju stosowanego leku [C – Tabela 2 lub Schemat 1A]. Różnice wykazano tylko pomiędzy grupą kontrolą a pacjentami po transplantacji nerki, którzy mieli wyższe stężenie kwasów C12, C18, C18:2, sumy kwasów nasyconych oraz sumy wszystkich kwasów tłuszczowych [C - tabela 2 lub Schemat 1B]. Stosunek stężenia kwasów wielonienasyconych PUFA n-6 do wielonienasyconych PUFA n-3, był podobny u osób po przeszczepie nerki i u osób zdrowych. Natomiast znacznie niższą wartość tego stosunku, zaobserwowano u pacjentów po przeszczepie serca w stosunku do kontroli, niezależnie od rodzaju zastosowanego leku.

Profil kwasów tłuszczowych został także porównany, w zależności od rodzaju przeszczepionego narządu. Ze względu na małą ilość osób po przeszczepie serca leczonych CsA, analizę przeprowadzono tylko dla pacjentów otrzymujących Tac. Pacjenci po przeszczepie serca mieli niższe stężenie kwasu C20:5 (n-3), wyższy poziom kwasu C20+C18:3

oraz wyższy stosunek kwasów n-6/n-3 w porównaniu do osób po przeszczepie nerki [D - rycina 1 lub Schemat 2].

Następnie w analizie uwzględniono obecność zaburzeń metabolicznych, takich jak cukrzyca oraz hiperlipidemia. Zaobserwowane różnice występują niezależnie od współistniejących zaburzeń metabolicznych. Dotyczą one stężenia kwasów: C20:5, C20+C18:3, których poziom u pacjentów po przeszczepie serca był wyższy niż u pacjentów po przeszczepie nerki oraz stosunku PUFA n-6/PUFA n-3, który był niższy. Wydaje się, że metabolizm kwasów tłuszczowych: C20:5 oraz C20+C18:3 jest inny u pacjentów po przeszczepie serca i nerki [D - rycina 2 lub Schemat 2].

W grupie pacjentów po przeszczepie nerki wyodrębniono 3 podgrupy: osoby z cukrzycą potransplantacyjną, osoby z hiperlipidemią oraz osoby bez zaburzeń metabolicznych. Pytanie: czy zaburzenia w metabolizmie kwasów tłuszczowych mają wpływ na rozwój insulinooporności oraz cukrzycy, czy też sytuacja jest odwrotna: konsekwencją cukrzycy lub insulinooporności są zaburzenia w metabolizmie kwasów tłuszczowych, pozostaje otwarte. Część badaczy potwierdza istnienie zależności pomiędzy stężeniem poszczególnych kwasów tłuszczowych a ryzykiem wystąpienia cukrzycy lub insulinooporności [D29; D30; D31]. Uważa się, że zaburzenie metabolizmu kwasów tłuszczowych zwiększa ryzyko wystąpienia insulinooporności, zaś rozwijająca się insulinooporność prowadzi do jeszcze większego zaburzenia metabolizmu kwasów tłuszczowych [D5]. Niektóre z badań nie potwierdzają istnienia związku pomiędzy ryzykiem rozwoju zaburzeń węglowodanowych a zmianami w profilu kwasów tłuszczowych [D32]. Dotychczas nie prowadzono także tego typu badań u osób po zabiegach transplantacji. Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej, w grupie osób po przeszczepie nerki, wskazują na podobny profil kwasów tłuszczowych u osób z cukrzycą i osób bez cukrzycy lub hiperlipidemii [D – rycina 3 lub Schemat 2]. Różnice istotne statystycznie wykazano natomiast pomiędzy profilem kwasów tłuszczowych pacjentów po przeszczepie nerki z hiperlipidemią a profilem osób bez zaburzeń metabolicznych. Pacjenci z hiperlipidemią mieli znacznie wyższe stężenie kwasów nasyconych: C16 oraz C24 oraz sumy nasyconych kwasów tłuszczowych. Charakteryzowało ich także, wyższe stężenie kwasów n-6: C20:2, C20:4, sumy PUFA n-6 i sumy wszystkich kwasów tłuszczowych [D – rycina 3 lub Schemat 2]. Wydaje się więc, że zaburzenie metabolizmu kwasów tłuszczowych towarzyszy

innym zaburzeniom lipidowym. Badania prowadzone przez Zhao Q, i wsp. wskazują na to, że u pacjentów z hiperlipidemią dochodzi do zaburzenia kilku szlaków metabolicznych, co prowadzi m.in. do wzrostu stężenia kwasu C18:2 oraz kwasu C20:4 i jego metabolitów takich jak kwasy epoxy-eikozatrienowe (EET; epoxyeicosatrienoic acids) [D25]. Sugeruje się, że stężenia kwasów C18:2, C20:4 oraz EET mogą stanowić wczesne markery zaburzeń lipidowych [D25].

Przeprowadzono także analizę zależności pomiędzy wartością eGFR a stężeniem poszczególnych kwasów tłuszczowych zarówno u pacjentów po przeszczepie serca, jak i u pacjentów po przeszczepie nerki leczonych Tac. Grupa pacjentów po przeszczepie serca charakteryzowała się statystycznie istotnie niższą wartością eGFR w porównaniu do osób po przeszczepie nerki. Zaskakującym wynikiem był negatywny trend pomiędzy stężeniem kwasów: C16:1, C18:3 a wartością eGFR, obserwowany u pacjentów po przeszczepie serca [D - rycina 4 lub Schemat 3]. Dane literaturowe wskazują na ochronną rolę kwasów C16:1 oraz C18:3 dla prawidłowej funkcji nerki. Kwas oleinowy oraz palmitooleinowy niwelują efekt lipotoksyczny wywołany przez kwasy nasycone, głównie przez kwas palmitynowy oraz jego metabolity [D5]. Znany jest także korzystny wpływ suplementacji kwasami PUFA n-3 dla prawidłowej pracy nerki [D8; D9; D38]. Zaobserwowana ujemna korelacja może wskazywać na zaburzony metabolizm kwasów tłuszczowych w nerce u pacjentów po przeszczepie serca. Wiadomym jest, że w warunkach obniżonej B-oksydacji kwas oleinowy, który w normalnych warunkach działa ochronnie na nerki, zaczyna wykazywać efekt toksyczny na komórki [D2; D5]. Brak jest tego typu danych dla kwasu C18:3, jednak możliwe, że dochodzi do podobnego zaburzenia sposobu jego działania. W przeciwieństwie do powyższych wyników, u pacjentów po przeszczepie nerki stwierdzono pozytywny trend pomiędzy stężeniem kwasów: C16:1, C18:1 oraz C20:5 a wartością eGFR [D - rycina 4 lub Schemat 3]. Uzyskane rezultaty wskazują na inną rolę kwasów tłuszczowych w utrzymaniu prawidłowej funkcji nerki u pacjentów po przeszczepie serca i nerki.

U pacjentów po przeszczepie nerki wykonano analizę korelacji pomiędzy stężeniem kwasów tłuszczowych a wartością eGFR w zależności od obecności zaburzeń metabolicznych, a także w zależności od rodzaju leku immunosupresyjnego. U pacjentów leczonych CsA stwierdzono ujemną korelację pomiędzy stężeniem nasyconych kwasów tłuszczowych a eGFR oraz

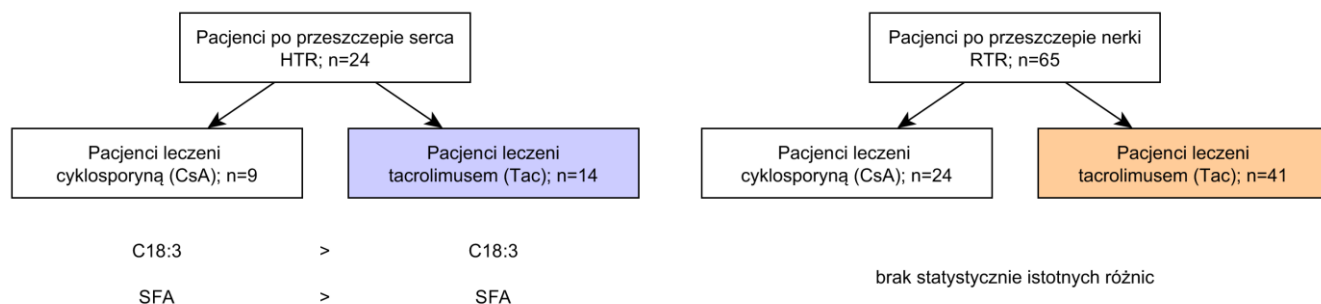
ujemny trend pomiędzy stężeniem PUFA n-6 a eGFR i MUFA a eGFR [C – rycina 1 lub Schemat 3]. U pacjentów po przeszczepie nerki, leczonych tacrolimusem także zaobserwowano ujemny trend pomiędzy PUFA n-6 a eGFR; natomiast w przeciwieństwie do osób leczonych CsA, nie stwierdzono żadnej zależności pomiędzy SFA a eGFR, zaś pomiędzy MUFA a eGFR zaobserwowano dodatni trend [C – rycina 1 lub Schemat 3]. U osób bez zaburzeń metabolicznych nie stwierdzono żadnej korelacji pomiędzy stężeniem kwasów tłuszczowych a wartością eGFR. Dodatnią, istotną statystycznie korelację wykazano pomiędzy poziomem kwasów: C20:5, C22:6, PUFA n-3 oraz stosunkiem PUFA n6/PUFA n3 a wartością eGFR u osób z cukrzycą lub z hiperlipidemią [D - rycina 5 lub Schemat 3]. Nie wiadomo czy obserwowane wyniki związane są z pewnym mechanizmem kompensacji organizmu, mającym prowadzić do wzrostu poziomu kwasów PUFA n-3, czy raczej jest to konsekwencja zaburzonego metabolizmu kwasów tłuszczowych. Biorąc pod uwagę rozbieżności w publikacjach naukowych dotyczące właściwości i roli kwasów PUFA n-3 obydwie hipotezy mogą być prawdziwe.

5. Wnioski

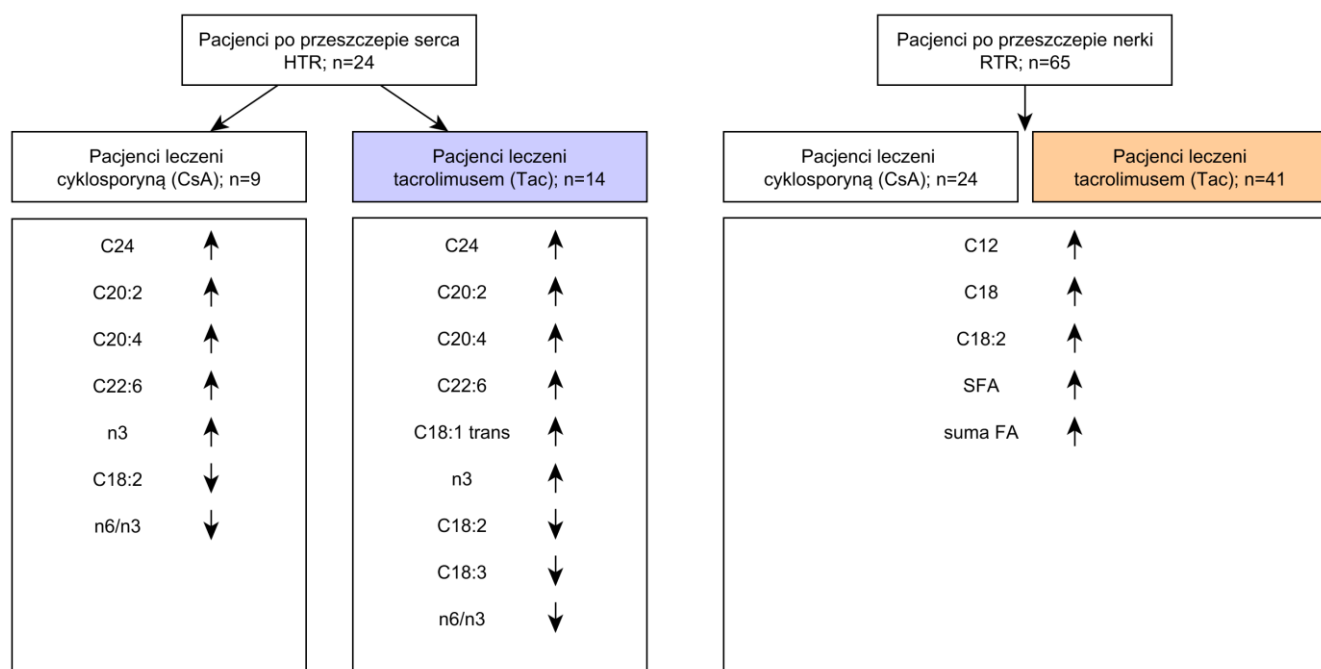
1. Metabolizm kwasów tłuszczowych osób po przeszczepie serca lub nerki jest inny niż metabolizm kwasów tłuszczowych osób zdrowych.
2. Profil kwasów tłuszczowych osób po przeszczepie serca lub nerki zależy od rodzaju przeszczepionego narządu, a u pacjentów po przeszczepie serca także od rodzaju leku immunosupresyjnego.
3. Różnice w profilu kwasów tłuszczowych u pacjentów po przeszczepie serca i nerki dotyczące stężenie kwasów C20:5 oraz C20+C18:3 nie zależą od obecności zaburzeń metabolicznych.
4. Podobny profil kwasów tłuszczowych u pacjentów po przeszczepie nerki, leczonych Tac, z cukrzycą i bez zaburzeń metabolicznych neguje udział kwasów tłuszczowych w powstaniu cukrzycy potransplantacyjnej u tych chorych.
5. U pacjentów po przeszczepie nerki, leczonych Tac, u których stwierdzono hiperlipidemię, metabolizm kwasów tłuszczowych nasyconych oraz kwasów n-6 jest inny niż u pacjentów bez zaburzeń metabolicznych.
6. Kwasy tłuszczowe są istotne dla prawidłowej funkcji nerek, a ich rola zależy od rodzaju kwasu tłuszczowego i jest inna u pacjentów po przeszczepie serca i pacjentów po przeszczepie nerki.

6. Schematy przeprowadzonych badań wraz z wynikami uzyskanymi na poszczególnych etapach

Schemat 1A. Różnice w stężeniu kwasów tłuszczowych u pacjentów po przeszczepie serca i nerki w zależności od rodzaju leku immunosupresyjnego¹



Schemat 1B. Różnice w stężeniu kwasów tłuszczowych u pacjentów po przeszczepie serca lub nerki w porównaniu do grupy kontrolnej¹

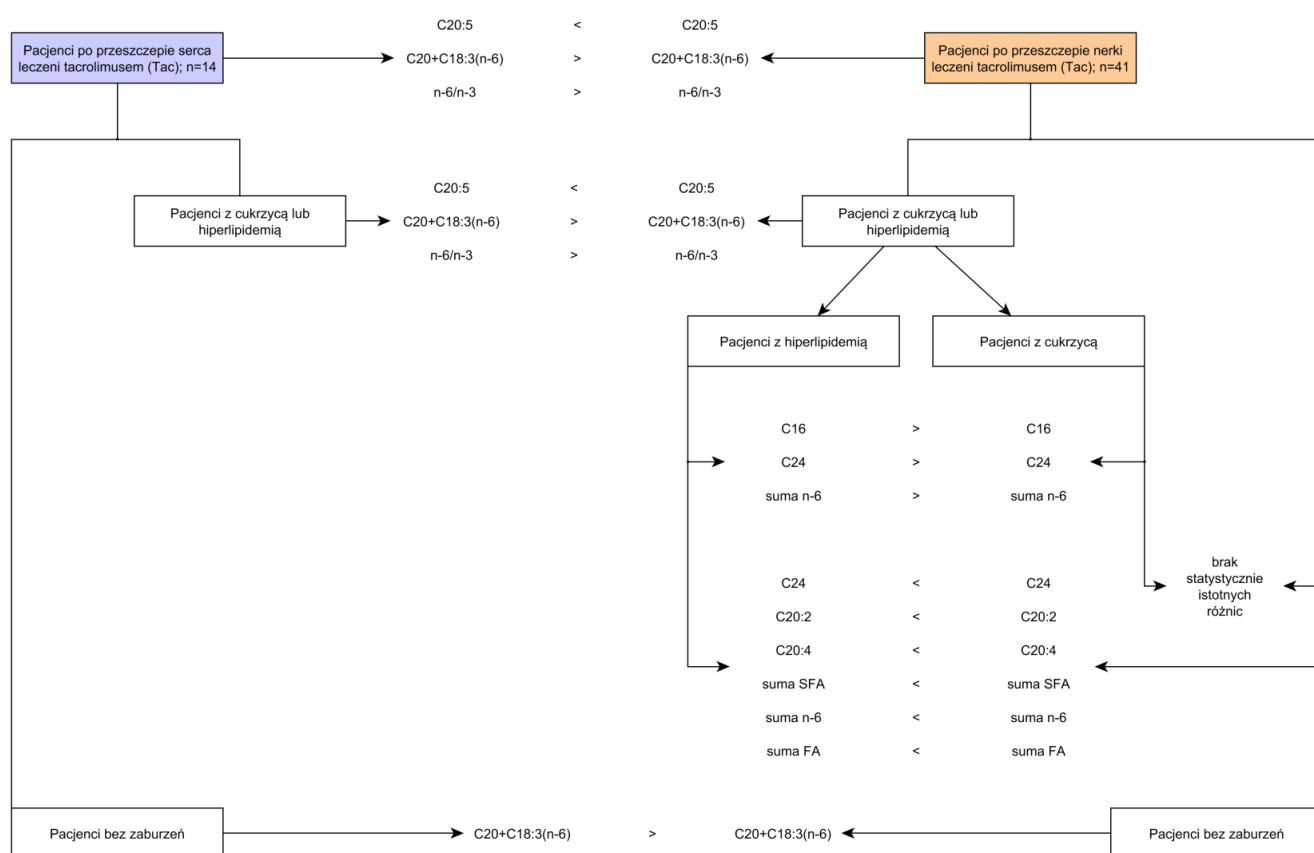


[1] Wyniki opublikowane w pracach:

[B] Wilusz M, Wasilewski G, Przybyłowski P, Janik L, Bugajska J, Sztefko K; Effect of Immunosuppressive Therapy on the Serum Fatty Acids of Phospholipids Fraction in Patients After Heart Transplantation; Transplantation Proceedings, 46, 2825 – 2829 (2014).

[C] Wilusz M, Cieniawski D, Bugajska J, Berska J, Ignacak E, Bętkowska-Prokop A, Kuźniewski M, Sułowicz S, Sztefko K; Effects of Immunosuppressive Drugs on Serum Fatty Acids of Phospholipids Fraction in Renal Transplant Recipients; Transplantation Proceedings, 48, 1616 – 1622 (2016).

Schemat 2. Różnice w kwasach tłuszczowych u pacjentów po przeszczepie serca lub nerki leczonych Tac w zależności od rodzaju przeszczepionego narządu oraz w zależności od obecności lub braku potransplantacyjnych zaburzeń metabolicznych^[1].

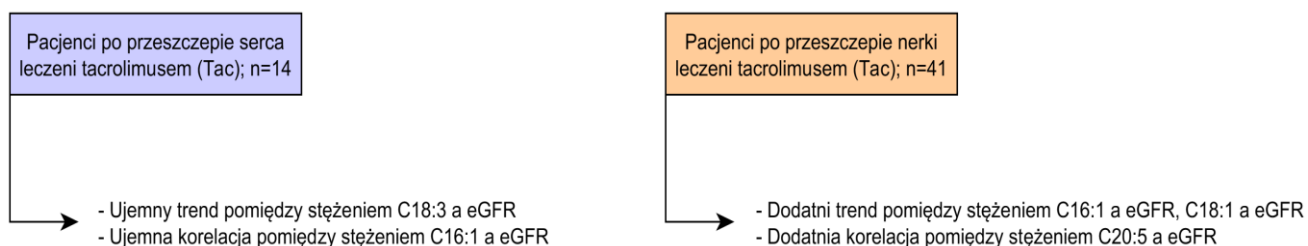


[1] Wyniki opublikowane w pracy:

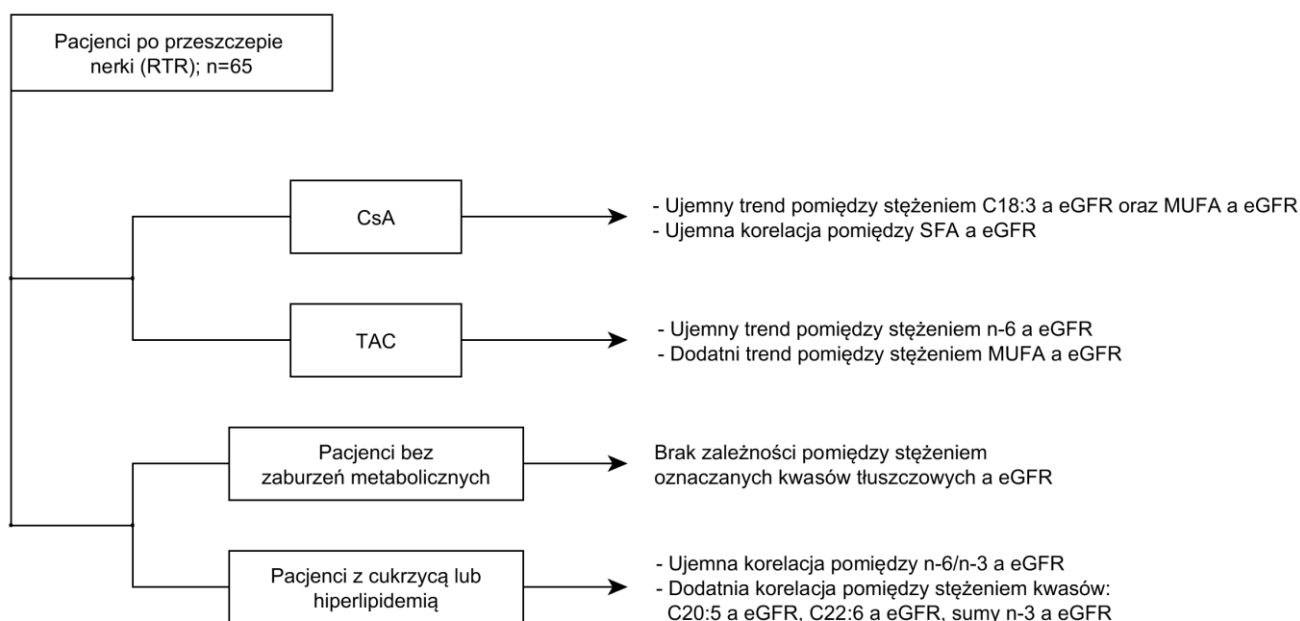
[D] Wilusz M, Cieniawski D, Wasilewski G, Kuźniewski M, Sułowicz W, Sztéfko K; Fatty acids profile in patients after heart or renal transplantation who developed metabolic complications; Advances in Medical Sciences Volume 63 (No.2), September 2018.

Schemat 3. Zależność pomiędzy stężeniem kwasów tłuszczowych a wartością eGFR

a) Zależność pomiędzy stężeniem kwasów tłuszczowych a eGFR u pacjentów po przeszczepie serca lub nerki ^{1 [D]}



b) Zależność pomiędzy stężeniem kwasów tłuszczowych u pacjentów po przeszczepie nerki a eGFR, w zależności od rodzaju stosowanego leku immunosupresyjnego^{1[C]} oraz obecności lub braku obecności potransplantacyjnych zaburzeń metabolicznych^{1[D]}.



[1] Wyniki opublikowane w pracach:

[C] Wilusz M, Cieniawski D, Bugajska J, Berska J, Ignacak E, Bętkowska-Prokop A, Kuźniewski M, Sułowicz S, Sztéfko K; Effects of Immunosuppressive Drugs on Serum Fatty Acids of Phospholipids Fraction in Renal Transplant Recipients; Transplantation Proceedings, 48, 1616 – 1622 (2016).

[D] Wilusz M, Cieniawski D, Wasilewski G, Kuźniewski M, Sułowicz W, Sztéfko K; Fatty acids profile in patients after heart or renal transplantation who developed metabolic complications; Advances in Medical Sciences Volume 63 (No.2), September 2018.

7. Streszczenie

Celem pracy była ocena profilu kwasów tłuszczowych, frakcji fosfolipidów, u pacjentów po przeszczepie serca lub nerki, w zależności od: rodzaju leku immunosupresyjnego, przeszczepionego narządu, zaburzeń metabolicznych oraz funkcji nerki. W skład rozprawy doktorskiej wchodziły cztery publikacje naukowe. Artykuł poglądowy, zawiera informacje na temat rodzaju oraz roli kwasów tłuszczowych. Badane grupy stanowiły: 23 osoby po przeszczepie serca (9 leczonych cyklosporyną (CsA); 14 leczonych tacrolimusem (Tac)) oraz 65 osób po przeszczepie nerki (24 leczonych CsA; 41 leczonych Tac). Do badania włączono także 25 osób zdrowych, niepoddanych transplantacji, które utworzyły grupy kontrolne. Stężenie kwasów tłuszczowych oznaczono metodą chromatografii gazowej. Uzyskane wyniki potwierdzają, że profil kwasów tłuszczowych pacjentów po przeszczepie jest inny niż u osób zdrowych. Ponadto, u pacjentów po przeszczepie serca profil kwasów tłuszczowych zależy od rodzaju stosowanego leku immunosupresyjnego. U pacjentów po przeszczepie nerki, leczonych Tac, u których stwierdzono hiperlipidemię, metabolizm kwasów tłuszczowych nasyconych oraz kwasów n-6 jest inny niż u pacjentów bez zaburzeń metabolicznych. Z kolei analiza korelacji pomiędzy stężeniem kwasów tłuszczowych a eGFR, wykazała, że kwasy tłuszczowe są istotne dla prawidłowej funkcji nerek, a ich rola zależy od rodzaju kwasu tłuszczowego.

8. Introduction

The doctoral dissertation "Evaluation of the fatty acid profile in patients after heart or kidney transplantation" consists of four scientific publications:

[A] **Wilusz M**, Sztefko K; *Kwasy tłuszczowe u pacjentów po transplantacji narządów*; Journal of Laboratory Diagnostics, Diagn Lab 2015; 51(1): 37-42

[B] **Wilusz M**, Wasilewski G, Przybyłowski P, Janik L, Bugajska J, Sztefko K; *Effect of Immunosuppressive Therapy on the Serum Fatty Acids of Phospholipids Fraction in Patients After Heart Transplantation*; Transplantation Proceedings, 46, 2825 – 2829 (2014).

[C] **Wilusz M**, Cieniawski D, Bugajska J, Berska J, Ignacak E, Bętkowska-Prokop A, Kuźniewski M, Sułowicz S, Sztefko K; *Effects of Immunosuppressive Drugs on Serum Fatty Acids of Phospholipids Fraction in Renal Transplant Recipients*; Transplantation Proceedings, 48, 1616 – 1622 (2016).

[D] **Wilusz M**, Cieniawski D, Wasilewski G, Kuźniewski M, Sułowicz W, Sztefko K; *Fatty acids profile in patients after heart or renal transplantation who developed metabolic complications*; Advances in Medical Sciences Volume 63 (No.2), September 2018.

Fatty acids are not only a source of energy. As one of main components of the cell membrane they affect its fluidity and permeability [B7; B8; B9]. In addition, fatty acids play a very important role in the regulation of protein acylation and sorting, enzyme and membrane receptor activation, cell proliferation and differentiation. Depending on the type and number of bonds between carbon atoms, the fatty acids are divided into: saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids; MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFAs). The polyunsaturated fatty acids could be further classified into n-3 fatty acids (n-3 PUFAs) and the n-6 series (n-6 PUFAs).

This thesis focuses on the assessment of fatty acid profile in patients after heart or kidney transplantation, and its results are predominantly of a cognitive nature.

The review article [A] presents a systematic review of the published data on the type of fatty acids and their metabolic changes, with an emphasis on the role and importance of fatty acids in patients after organ transplants [A23; A24; A36; A45; A46; A51]. Both, unfavorable and beneficial effects have been discussed. The unfavorable effects are related to the adverse influence of fatty acids on endothelial function; especially, in the situation of increased production of proinflammatory cytokines, oxygen radicals and reduced antioxidant defense [A17]. For example, simultaneous administration of linoleic acid and TNF α enhances cell apoptosis [A18]. Oxidation of polyunsaturated fatty acids is one of the mechanisms in the pathogenesis of atherosclerosis and vasculopathy of the allograft [A13; A16]. It should be emphasized that cardiovascular complications are the most common cause of death in patients after organ transplants [A11; A12; A13]. The disturbance of fatty acid metabolism is also observed in diabetes, which often develops after transplantation, especially in patients treated with tacrolimus [A11]. Saturated fatty acids and acids belonging to the n-6 PUFA series, known for their pro-inflammatory activity, have an adverse effect on the processes in the body. Moreover, PUFA n-6 fatty acids stimulate thrombotic, allergic responses and cell proliferation [A10; C18; C19]. In contrast, the acids of the n-3 PUFA series have anti-inflammatory, antithrombotic, hypotensive properties [B7; B8; B10; 15; C16; C17]. Furthermore, their beneficial effect on endothelial function is also well known [A43; A44]. However, under oxidative stress and free radical oxidation, polyunsaturated PUFA n-3 fatty acids form lipid peroxides that act toxic to cells [A37; A38]. In patients after heart transplantation, supplemented with n-3 PUFAs, a positive correlation was found between the increase in C20:5 serum concentration and TNF α concentration, while IL10 and vitamin E decreased [A41]. Similarly, the increase in TNF α after supplementation with n-3 PUFAs was observed in patients with advanced coronary disease and in patients at risk of developing atherosclerosis [A42].

It is very difficult to perform the analysis of scientific publications about fatty acids in various clinical situations, due to the fact that the properties of fatty acids, their metabolism and effects on various organs may be different, even if we analyze a homogeneous group of acids from the chemical point of view. Most likely, a better approach involves deducing the role of fatty acids, taking into account their individual concentration, and not using the total fatty acid concentration or the sum of saturated or unsaturated acids. In addition, fatty acid

metabolism may not proceed properly in the β -oxidation process, which leads to a situation where the acid may become toxic to cells. The difficulty in carrying out a proper assessment is also related to the fact that the subject of research is a heterogeneous group of patients, frequently on different diets, possibly with n-3 supplementation. The beneficial effect of supplementation with n-3 acids depends also on the concentration of these acids.

So far, several articles have been published regarding fatty acids in transplant patients. This is a specific group of patients, because of the fact that they need to take immunosuppressants, and often hypolipemic and hypotensive drugs too, for the rest of their lives. The most commonly used immunosuppressive drugs are cyclosporin and tacrolimus. The administration of these drugs is associated with the risk of complications: many studies have shown that CsA patients are more likely to develop hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and have higher LDL cholesterol and lower HDL cholesterol levels than those using Tac [A11; A12; A14; A15].

To our best knowledge, there are no publications on the influence of these immunosuppressive drugs on the fatty acid profile in transplant patients. In a few articles, one can find data on fatty acids in the context of metabolic disorders or renal function in transplant patients. Undertaking research on fatty acids seems to be justified, because it will inform about the profile of fatty acids in transplant patients, which will guide a more individualized diet depending on the type of organ transplant, the type of drug used, or the presence of metabolic post-transplant disorders.

Research hypothesis:

The profile of fatty acids in transplant patients depends on the organ, the immunosuppressive drug used, metabolic disorders and kidney function.

9. Aim

The primary aim of this study was to assess the fatty acid profile in serum of patients after heart or kidney transplantation.

Secondary objectives included the assessment of the fatty acid profile depending on:

- a) type of transplanted organ,
- b) the immunosuppressive drug used,
- c) lipid profile,
- d) diabetes,
- e) GFR values.

10. Results

Articles [B] and [C] present the results of fatty acid profile assessment in people after heart or kidney transplantation depending on the type of immunosuppressive drug used. Either CsA or Tac was used, and the immunosuppressant was not changed during the treatment. The levels of FA were compared with a control group - healthy people, who did not undergo transplantation. In patients after heart transplantation significant differences in the fatty acid profile were observed, both in comparison to the control group as well as between patients treated with different immunosuppressive drugs [B - Table 1; B - Figure 1 or Schemes 1A and 1B].

The biggest differences were noted for the following fatty acids: C24, C22:6 (n-3), C20:2 (n-6) and C20:4 (n-6). Their levels were significantly higher in people after heart transplantation compared to the control group. The sum of n-6 PUFAs, and the sum of all saturated and unsaturated acids in cardiac transplant patients treated with CsA and Tac, were similar to those in the control group. As far as n-3 PUFAs are concerned, their sum was higher in heart transplant patients compared to control group, and higher in those using CsA as compared to those using Tac. In addition, patients treated with CsA had a higher concentration of C18:3, as well as, a higher total of saturated acids and a sum of all fatty acids compared to those treated with Tac. No statistically significant differences were observed in the fatty acid profile in kidney transplant patients depending on the type of drug used [C – Table 2 or Scheme 1A]. Differences were found only between the control group and patients after kidney transplantation, who had a higher concentration of C12, C18, C18:2 acids, sums of saturated acids and sum of all fatty acids [C - Table 2 or Scheme 1B]. The ratio of polyunsaturated PUFA n-6 to polyunsaturated PUFA n-3 was similar in kidney transplant recipients and in the control group. However, a much lower value of this ratio was observed in patients after heart transplantation in relation to the control, regardless of the type of drug used.

The fatty acid profile has also been investigated, depending on the type of organ transplant. Due to the limited number of heart transplant patients treated with CsA, the analysis was performed only for patients receiving Tac. Heart transplant patients had a lower concentration of C20:5 (n-3), higher C20 + C18:3 level and higher n-6 /n-3 ratio, as compared to kidney transplant recipients [D - Figure 1 or Scheme 2].

Subsequently, the analysis included the presence of metabolic disorders, such as diabetes and hyperlipidemia. The observed differences were not related to the metabolic disorders. The concentration of fatty acids: C20:5, C20 + C18:3, were lower in heart transplant patients than in patients after kidney transplantation, while the ratio of n-6 PUFA / n-3 PUFA was higher. In result, one might conclude that the metabolism of C20:5 and C20+C18: 3 is different in patients after heart and kidney transplantation [D - Figure 2 or Scheme 2].

In the group of kidney transplant patients, three subgroups were distinguished: people with post-transplant diabetes, people with hyperlipidemia and people without metabolic disorders. The question, whether disturbances in fatty acid metabolism affect the development of insulin resistance and diabetes or whether the situation is reverse: the consequence of diabetes or insulin resistance are disturbances in fatty acid metabolism, remains open. Some researchers confirm the existence of a relationship between the concentration of individual fatty acids and the risk of diabetes or insulin resistance [D29; D30; D31]. It is believed that the disorder of fatty acid metabolism increases the risk of insulin resistance, and the developing insulin resistance leads to an even greater disturbance of fatty acid metabolism [D5]. Some of the studies do not confirm the relationship between the risk of developing carbohydrate disorders and changes in the fatty acid profile [D32]. So far, this type of research has not been conducted in people after transplant surgery. The results presented in this dissertation, in the group of kidney transplant recipients, indicate a similar fatty acids profile in patients with diabetes and in the ones without diabetes or hyperlipidemia [D - Figure 3 or Scheme 2]. However, statistically significant differences were found between the fatty acid profile in patients after kidney transplantation with hyperlipidemia and the patients without metabolic disorders. Patients with hyperlipidemia had a significantly higher concentration of saturated fatty acids: C16 and C24, and the sum of saturated fatty acids. They also had higher concentration of n-6 acids: C20:2, C20:4, sum of n-6 PUFA and sum of all fatty acids [D - Figure 3 or Scheme 2]. Therefore, it is highly probable that the disorder in fatty acid metabolism is accompanied by other lipid disorders. Research conducted by Zhao Q, et al. indicate that in case of patients with hyperlipidemia, several metabolic pathways are disturbed, which leads to increase in the concentration of C18:2, C20:4 and its metabolites,

such as epoxyeicosatrienoic acids (EET) [D25]. It is suggested, that concentrations of C18:2, C20:4 and EET may be early markers of lipid disorders [D25].

An investigation into the relationship between the eGFR value and the concentration of individual fatty acids in both heart transplant patients and patients after kidney transplantation treated with Tac was also carried out. Patients after heart transplantation had lower eGFR values, as compared to the ones after kidney transplantation. A negative trend between the levels of C16:1, C18:3 and eGFR, observed in patients after heart transplantation was a surprising outcome of the analysis [D - Figure 4 or Scheme 3]. Data found in scientific literature indicate the protective role of C16:1 and C18:3 acids in normal kidney function. Oleic and palmitoleic acids eliminate the lipotoxic effect caused by saturated acids, mainly by palmitic acid and its metabolites [D5]. The beneficial effect of n-3 PUFA supplementation for normal kidney function is also known [D8; D9; D38]. The observed negative correlation may indicate a disturbed fatty acids metabolism in the kidney in patients after heart transplantation. It is a well-known fact that in case of decreased β -oxidation, oleic acid, which under normal conditions protects the kidneys, becomes toxic to cells [D2; D5]. Even though there is no such information published for C18:3 acid, it is possible that there is a similar disturbance in its mode of action. In contrast, a positive relationship between C16:1, C18:1, C20:5 levels and the eGFR value was observed in case of kidney transplant recipients [D - Figure 4 or Scheme 3]. The obtained results indicate a different role of fatty acids in maintaining normal kidney function in patients after heart and kidney transplantation.

In patients after kidney transplantation, a correlation analysis was performed between fatty acid concentration and eGFR value, depending on the presence of metabolic disorders and the type of immunosuppressive drug used. In case of patients treated with CsA, a negative correlation between the concentration of saturated fatty acids and eGFR was observed. As for the concentration of PUFA n-6 versus eGFR, and MUFA versus eGFR, a negative trends were apparent [C- Figure 1 or Scheme 3]. As far as, renal transplant recipients treated with tacrolimus are concerned, a negative trend was also observed between PUFA n-6 and eGFR; however, in contrast to patients treated with CsA, no relationship was found between SFA and eGFR, and a positive trend was observed between MUFA and eGFR [C- Figure 1 or Scheme 3].

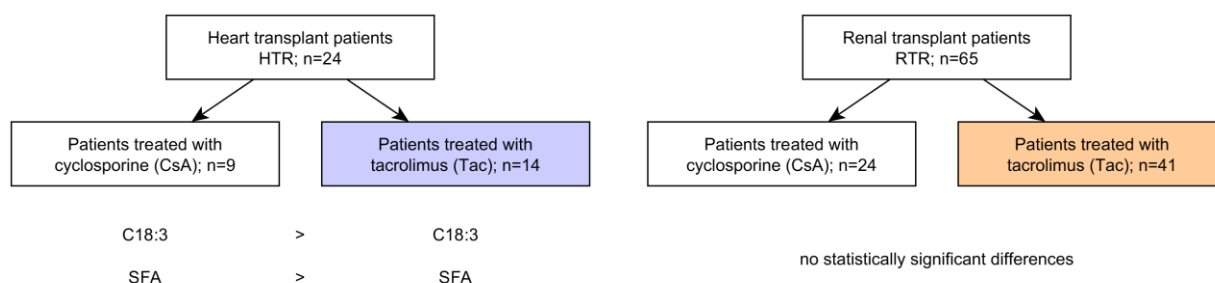
In patients after kidney transplantation, treated with Tac, without metabolic disorders, no correlation was found between fatty acid concentrations and eGFR. A positive, statistically significant correlation, however, was discovered between C20:5, C22:6, PUFA n-3, PUFA n6/PUFA n3 ratio and the value of eGFR in patients with diabetes or hyperlipidemia [D - Figure 5 or Scheme 3]. It is not clear whether the observed results are related to a certain body's compensation mechanism which leads to an increase in the level of n-3 PUFAs, or whether it is a consequence of disturbed fatty acid metabolism. Given the discrepancies in scientific publications regarding the properties and role of n-3 PUFAs, both hypotheses can be true.

11. Conclusions

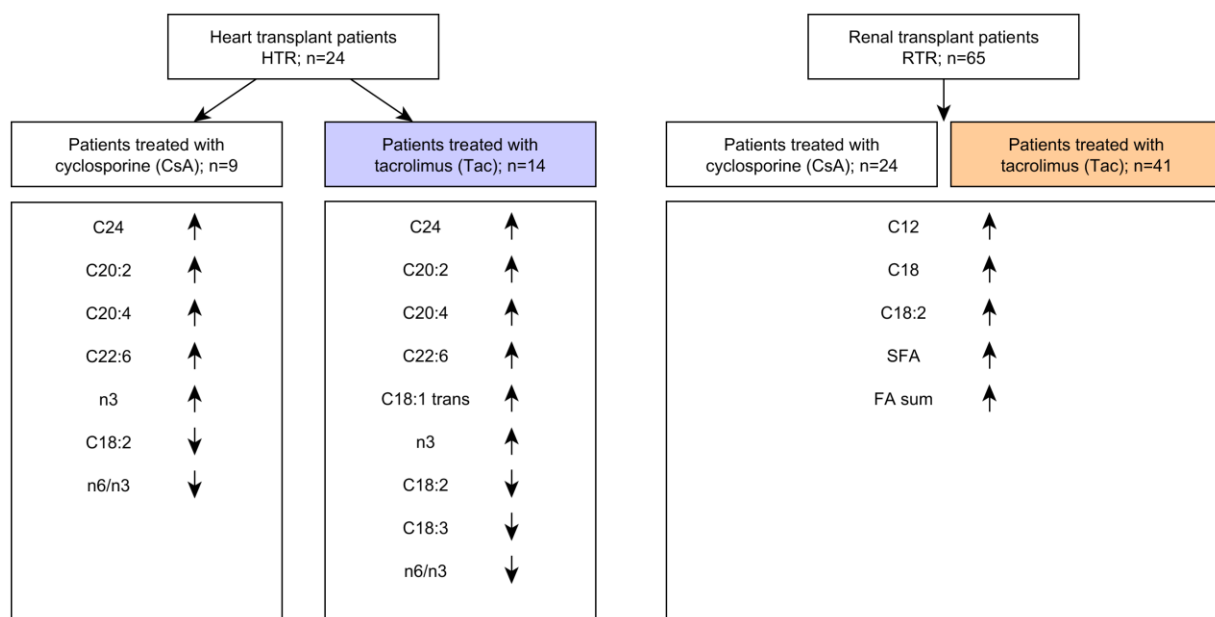
1. The metabolism of fatty acids in patients after heart or kidney transplants is different from the metabolism of fatty acids in healthy people.
2. The fatty acid profile in patients after heart or kidney transplantation depends on the type of transplanted organ, and - in case of patients after heart transplantation - also on the type of immunosuppressive drug.
3. Differences in the fatty acid profile in heart and kidney transplant recipients regarding C20:5 and C20 + C18:3 levels do not depend on the presence of metabolic disorders.
4. A similar profile of fatty acids in patients after kidney transplants, treated with Tac, with diabetes and without metabolic disorders, negates the participation of fatty acids in the formation of post-transplant diabetes in these patients.
5. In kidney transplant patients with hyperlipidemia treated with Tac, the metabolism of saturated fatty acids and n-6 fatty acids is different than in patients without metabolic disorders.
6. Fatty acids are important for the proper kidney function and their role depends on the type of fatty acid, and is different in patients after heart transplantation and kidney transplant patients.

12. Schemes of conducted tests with the results obtained at individual stages

Scheme 1A. Differences in fatty acids concentrations in heart and kidney transplant patients depending on the type of immunosuppressive drug¹



Scheme 1B. Differences in fatty acids concentrations in patients after heart or kidney transplantation compared to the control group¹

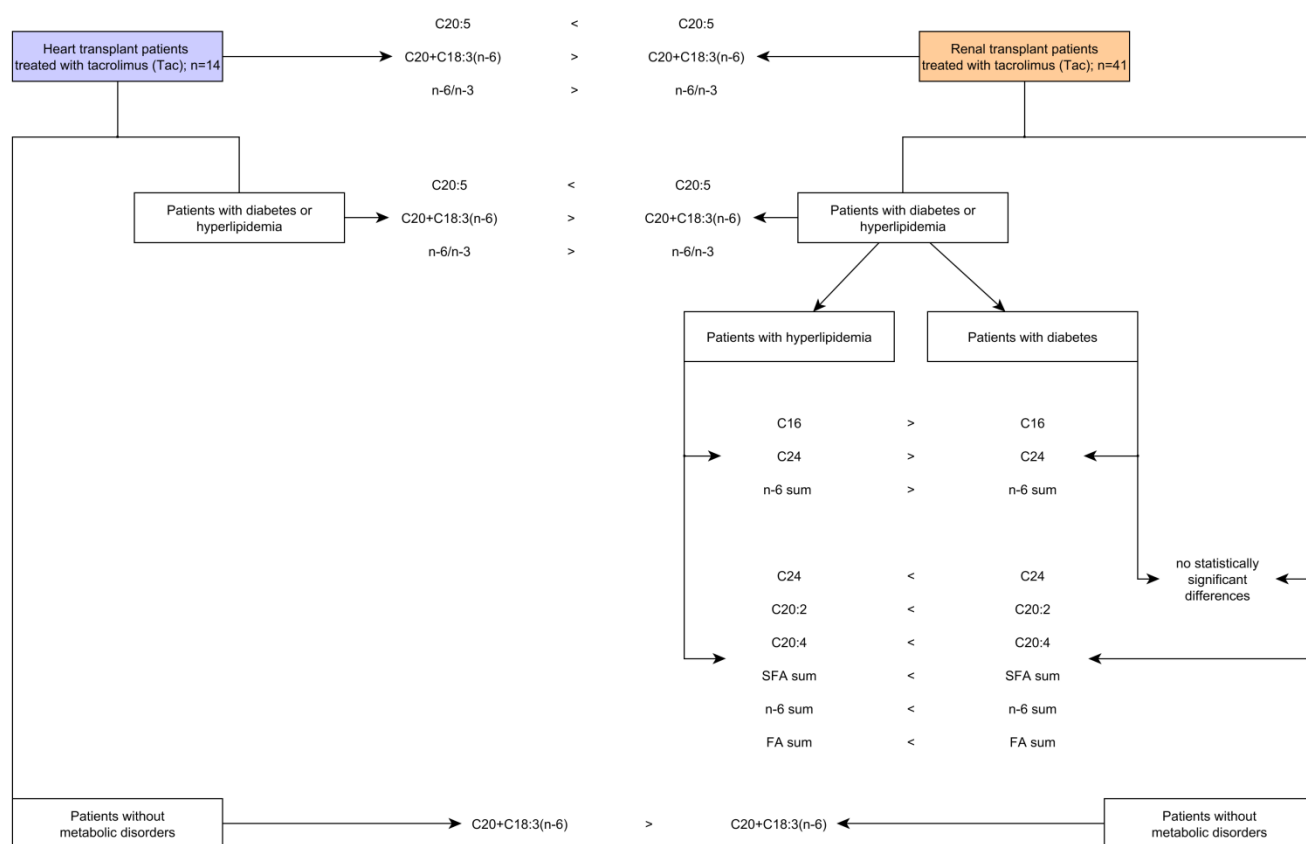


[1] The results were published in articles:

[B] Wilusz M, Wasilewski G, Przybyłowski P, Janik L, Bugajska J, Sztéfko K; Effect of Immunosuppressive Therapy on the Serum Fatty Acids of Phospholipids Fraction in Patients After Heart Transplantation; Transplantation Proceedings, 46, 2825 – 2829 (2014).

[C] Wilusz M, Cieniawski D, Bugajska J, Berska J, Ignacak E, Bętkowska-Prokop A, Kuźniewski M, Sułowicz S, Sztéfko K; Effects of Immunosuppressive Drugs on Serum Fatty Acids of Phospholipids Fraction in Renal Transplant Recipients; Transplantation Proceedings, 48, 1616 – 1622 (2016).

Scheme 2. Differences in fatty acids concentrations in patients after heart or kidney transplantation, treated with Tac, depending on the type of organ transplanted, and depending on the presence or absence of post-transplanted metabolic disorders [1].

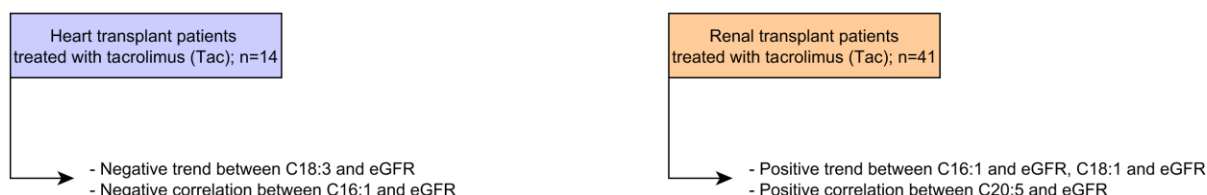


[1] The results were published in articles:

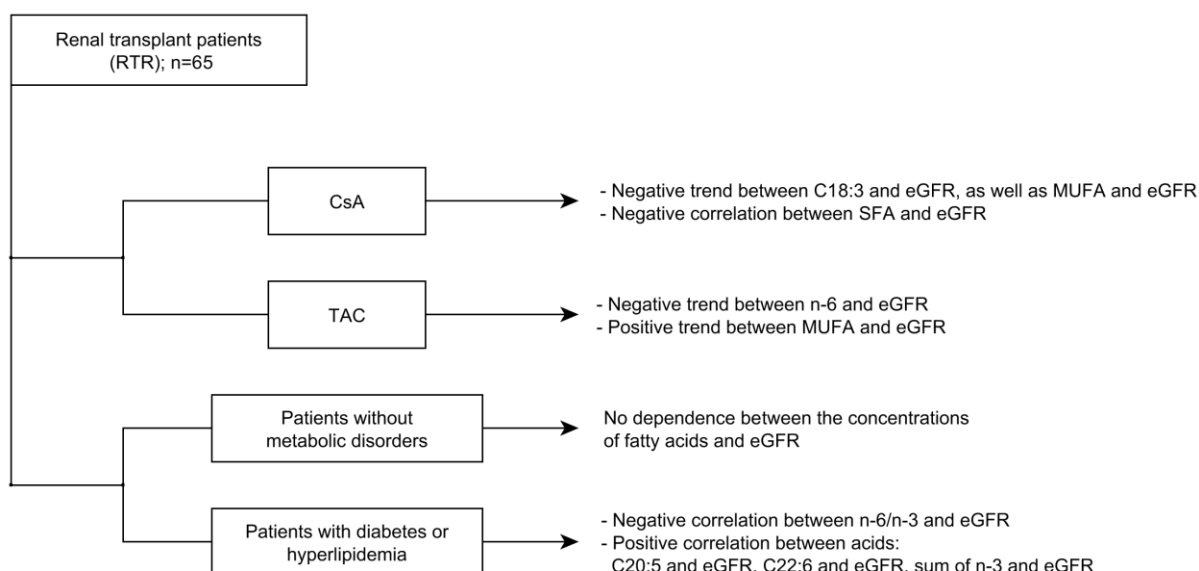
[D] Wilusz M, Cieniawski D, Wasilewski G, Kuźniewski M, Sułowicz W, Sztefko K; Fatty acids profile in patients after heart or renal transplantation who developed metabolic complications; Advances in Medical Sciences Volume 63 (No.2), September 2018.

Scheme 3. The relationship between the concentrations of the fatty acids and the value of GFR

a) Relationship between fatty acids concentrations and eGFR in heart and kidney transplant patients ^{1 [D]}



b) Relationship between fatty acids concentrations, in kidney transplant patients, and eGFR depending on the type of immunosuppressant used ^{1[C]} and the presence or absence of post-transplant metabolic disorders ^{1[D]}.



[1] The results were published in articles:

[C] Wilusz M, Cieniawski D, Bugajska J, Berska J, Ignacak E, Bętkowska-Prokop A, Kuźniewski M, Sułowicz S, Sztefko K; Effects of Immunosuppressive Drugs on Serum Fatty Acids of Phospholipids Fraction in Renal Transplant Recipients; Transplantation Proceedings, 48, 1616 – 1622 (2016).

[D] Wilusz M, Cieniawski D, Wasilewski G, Kuźniewski M, Sułowicz W, Sztefko K; Fatty acids profile in patients after heart or renal transplantation who developed metabolic complications; Advances in Medical Sciences Volume 63 (No.2), September 2018.

13. Abstract

The aim of the study was to assess the fatty acids profile in phospholipid fractions, in patients after heart or kidney transplantation, depending on: the type of immunosuppressive drug, transplanted organ, metabolic disorders and kidney function. The doctoral dissertation consists of four scientific publications. The review article, contains information about the type and role of fatty acids. The study included: 23 heart transplant patients (9 treated with cyclosporine (CsA), 14 treated with tacrolimus (Tac)) and 65 kidney transplant recipients (24 treated with CsA, 41 treated with Tac). The study also included 25 healthy, non-transplanted individuals who set up control groups. The concentration of fatty acids was determined by gas chromatography. The obtained results confirm that the fatty acid profile of patients after transplantation is different than in healthy people. In addition, in patients after heart transplantation, the fatty acid profile depends on the type of immunosuppressant used. In kidney transplant patients, treated with Tac, with hyperlipidemia, the metabolism of saturated fatty acids and n-6 acids is different than in patients without metabolic disorders. In turn, the analysis of the correlation between fatty acid concentration and eGFR, showed that fatty acids are essential for normal kidney function, and their role depends on the type of fatty acid.

14. Załączniki / Appendices

Załącznik 1 / Appendix 1 (PRACA A / PAPER A):

Wilusz M, Sztefko K; *Kwasy tłuszczowe u pacjentów po transplantacji narządów*; Journal of Laboratory Diagnostics, Diagn Lab 2015; 51(1): 37-42

Załącznik 2 / Appendix 2 (PRACA B / PAPER B)

Wilusz M, Wasilewski G, Przybyłowski P, Janik L, Bugajska J, Sztefko K; *Effect of Immunosuppressive Therapy on the Serum Fatty Acids of Phospholipids Fraction in Patients After Heart Transplantation*; Transplantation Proceedings, 46, 2825 – 2829 (2014).

Załącznik 3 / Appendix 3 (PRACA C / PAPER C)

Wilusz M, Cieniawski D, Bugajska J, Berska J, Ignacak E, Bętkowska-Prokop A, Kuźniewski M, Sułowicz S, Sztefko K; *Effects of Immunosuppressive Drugs on Serum Fatty Acids of Phospholipids Fraction in Renal Transplant Recipients*; Transplantation Proceedings, 48, 1616 – 1622 (2016).

Załącznik 4 / Appendix 4 (PRACA D / PAPER D)

Wilusz M, Cieniawski D, Wasilewski G, Kuźniewski M, Sułowicz W, Sztefko K; *Fatty acids profile in patients after heart or renal transplantation who developed metabolic complications*; Advances in Medical Sciences Volume 63 (No.2), September 2018.

Załącznik 1 / Appendix 1 (PRACA A / PAPER A)

Wilusz M, Sztefko K; *Kwasy tłuszczowe u pacjentów po transplantacji narządów*;
Journal of Laboratory Diagnostics, Diagn Lab 2015; 51(1): 37-42.

Punktacja MNiSW: 10.000

Ministry of Science and Higher Education Score: 10.000

Załącznik 2 / Appendix 2 (PRACA B / PAPER B)

Wilusz M, Wasilewski G, Przybyłowski P, Janik L, Bugajska J, Sztefko K; *Effect of Immunosuppressive Therapy on the Serum Fatty Acids of Phospholipids Fraction in Patients After Heart Transplantation*; Transplantation Proceedings, 46, 2825 – 2829 (2014).

IF = 0.982

Punktacja MNiSW: 15.000

Ministry of Science and Higher Education Score: 15.000

Załącznik 3 / Appendix 3 (PRACA C / PAPER C)

Wilusz M, Cieniawski D, Bugajska J, Berska J, Ignacak E, Bętkowska-Prokop A, Kuźniewski M, Sułowicz S, Sztefko K; *Effects of Immunosuppressive Drugs on Serum Fatty Acids of Phospholipids Fraction in Renal Transplant Recipients*; Transplantation Proceedings, 48, 1616 – 1622 (2016).

IF = 0.908

Punktacja MNiSW: 15.000

Ministry of Science and Higher Education Score: 15.000

Załącznik 4 / Appendix 4 (PRACA D / PAPER D)

Wilusz M, Cieniawski D, Wasilewski G, Kuźniewski M, Sułowicz W, Sztefko K;
Fatty acids profile in patients after heart or renal transplantation who developed metabolic complications; Advances in Medical Sciences Volume 63 (No.2), September 2018.

IF = 1.364

Punktacja MNiSW: 15.000

Ministry of Science and Higher Education Score: 15.000