Karolina Dąbrowska

Uszkodzenie wątroby związane z żywieniem pozajelitowym i wpływ żywienia pozajelitowego na poziom stresu oksydacyjnego przewlekle żywionych pacjentów

Parenteral nutrition associated liver disease and the effect of parenteral nutrition on oxidative stress levels of chronically fed patients

Rozprawa doktorska na stopień doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki o zdrowiu
przedkładana Radzie Dyscypliny Nauk o Zdrowiu
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor: **Dr hab. n med. Jacek Sobocki, prof. CMKP**

Warszawa, 2023

Streszczenie

Wstęp

Żywienie pozajelitowe (PN – ang. parenteral nutrition) jest rodzajem terapii żywieniowej ratującej życie, polegającej na dożylnej podaży składników odżywczych takich jak aminokwasy, glukoza, lipidy, elektrolity, witaminy, pierwiastki śladowe i woda pacjentom, którzy nie są w stanie zaspokoić potrzeb doustnie lub/i dojelitowo. Do najczęstszych stanów klinicznych będących bezpośrednim wskazaniem do zastosowania żywienia dożylnego należą: zespół krótkiego jelita, wysokie przetoki jelitowe, choroba Leśniowskiego-Crohna, choroby nowotworowe z towarzyszącą niedrożnością przewodu pokarmowego. Jednym z najczęściej występujących powikłań metabolicznych żywienia pozajelitowego jest dysfunkcja wątroby. Przy długotrwałym prowadzeniu żywienia pozajelitowego często wzrasta poziom enzymów wątrobowych: fosfatazy alkalicznej – ALT i aminotransferazy asparaginowej – AST. Jednym z głównych powikłań u dorosłych pacjentów jest powolnie postępujące stłuszczeniowe zapalenie wątroby prowadzące do zwłóknienia i marskości.

Podstawowym substratem energetycznym mieszaniny żywieniowej są emulsje lipidowe. Dostarczają one pacjentowi niezbędnych kwasów tłuszczowych, jednakże to właśnie one mogą powodować wystąpienie choroby wątroby związanej z żywieniem pozajelitowym (PNALD – ang. parenteral nutrition-associated liver disease). Peroksydacja lipidów jest złożoną reakcją wolnorodnikową inicjowaną przez reaktywne formy tlenu (ROS – ang. reactive oxygen species), w wyniku której powstają wodoronadtlenki lipidowe oraz wtórne produkty ich rozkładu, w tym toksyczne aldehydy. Stres oksydacyjny spowodowany jest brakiem równowagi między produkcją ROS, a zdolnością organizmu do detoksykacji reaktywnych związków pośrednich lub naprawy powstałych uszkodzeń.

Aktywacji makrofagów wątrobowych i generowanie wytwarzania IL1-β, TNF-α, a także innych cytokin prozapalnych, ROS i mediatorów zapalnych, sprzyjają zmiany w mikroflorze jelitowej, zwiększona absorpcja drobnoustrojów, a także epizody bakteriemii związane z PN. W związku z tym mogą wystąpić uszkodzenia błon, białek, DNA i RNA, mogące powodować zwiększenie przepuszczalności błony śluzowej jelit i toksyczny dla hepatocytów wzrost stężenia kwasów żółciowych. Pogłębiające się

uszkodzenie tkanki wątroby jest konsekwencją tych szlaków komórkowych i molekularnych.

Wewnętrzny szlak śmierci komórki może być indukowany oddziaływaniem ROS na retikulum endoplazmatyczne, błony mitochondrialne i lizosomy oraz przez proces peroksydacji lipidów powodujący wzrost ROS w surowicy.

Nie określono czynników predykcyjnych uszkodzenia wątroby i innych narządów w wyniku żywienia pozajelitowego. Uszkodzenia oksydacyjne mogą być jednym z podstawowych mechanizmów dysfunkcji wątroby związanych z PN. Postawiliśmy hipotezę, że pacjenci otrzymujący żywienie pozajelitowe mieliby zwiększony poziom stresu oksydacyjnego. Zróżnicowanie czynników, które byłyby związane ze zmianami stężenia wskaźników wątroby we krwi, mogłoby pozwolić na poprawę planowania leczenia żywieniowego i uniknięcie wystąpienia powikłań.

Niniejsza rozprawa doktorska składa się z trzech prac: artykułu przeglądowego podsumowującego stan wiedzy na temat PNALD i dwóch publikacji oryginalnych. Łączna liczba punktów ministerialnych wynosi 200, natomiast łączy współczynnik Impact Factor – 7,584.

Cel pracy

Celem rozprawy doktorskiej było omówienie mechanizmów przyczyniających się do dysfunkcji wątroby podczas stosowania PN oraz potencjalne metody profilaktyki, a także ocena aktywności aminotransferaz, jako markera dysfunkcji wątroby. Dokonano również analizy korelacji stężeń aminotransferaz wątrobowych: AST i ALT w zależności od tempa zużycia tlenu w mitochondriach płytek krwi ze stopniem stresu oksydacyjnego indukowanego przez emulsje lipidowe u pacjentów przewlekle żywionych pozajelitowo, będących pod opieką ośrodka referencyjnego.

Materiał i metody

Na niniejszą rozprawę doktorską składa się cykl trzech prac – jednej poglądowej, omawiającej zagadnienia związane z zaburzeniami pracy wątroby związanymi z żywieniem pozajelitowym (publikacja 2) i dwóch prac oryginalnych: badanie retrospektywne oceniające wykorzystanie poziomu aktywności aminotransferaz wątrobowych, jako wskaźnika dysfunkcji wątroby (publikacja 1) i badanie kohortowe (publikacja 3), w którym zbadano korelację stężeń AST i ALT w zależności od tempa

zużycia tlenu w mitochondriach płytek krwi i poziom stresu oksydacyjnego u pacjentów przewlekle żywionych pozajelitowo.

Publikacja 1.

Grupę badaną stanowili wszyscy pacjenci (N=251, 140 kobiet i 111 mężczyzn) objęci procedurą żywienia pozajelitowego w warunkach domowych (HPN – ang. home parenteral nutrition) w ośrodku referencyjnym w Polsce na dzień 31 grudnia 2012 r., zgodnie z raportem NFZ. Przeprowadzona została kompleksowa analiza dokumentacji medycznej pacjentów z okresu 9 lat (grudzień 2012 – grudzień 2021). Ocenie poddano następujące parametry: skład mieszaniny żywieniowej, a także wyniki badań krwi: poziom bilirubiny całkowitej w osoczu, aktywność aminotransferaza alaninowa (ALT) i aminotransferaza asparaginianowa (AST), czas standaryzowany, czynnik protrombiny (międzynarodowy współczynnik znormalizowany INR) i albuminy surowicy.

Grupa 251 pacjentów (łącznie 630 537 dni żywienia pozajelitowego) została podzielona na trzy grupy w zależności od stanu klinicznego na dzień 31 grudnia 2021 r.: grupa 0 – pacjenci, którzy zmarli, grupa 1 – pacjenci, którzy zostali odstawieni od żywienia pozajelitowego z powodu odzyskania autonomii przewodu pokarmowego, grupa 2 – pacjenci nadal otrzymujący domowe żywienie pozajelitowe. Grupa 2 została dodatkowo podzielona na podgrupy: 2A – chorzy bez cech PNALD, 2B – chorzy z cechami PNALD.

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu SPSS. Uzyskano podstawowe analizy opisowe. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami obliczono stosując testy U Mann-Whitney'a oraz Kruskala-Wallisa. Hipotezę zerową dla każdej analizy zweryfikowano uznając istotny statystycznie poziom $p < 0,05$.

Publikacja 2.

W pracy poglądowej przeanalizowano piśmiennictwo dotyczące PNALD i na tej podstawie przedstawione zostały mechanizmy rozwoju PNALD i strategii terapeutycznych.

Publikacja 3.

Grupę badaną stanowiło 86 pacjentów (43 kobiety i 43 mężczyzn) żywionych pozajelitowo w warunkach domowych, od których podczas rutynowej wizyty

w ośrodku żywienia pozajelitowego pobrano surowicę krwi w celu wykonania badań kontrolnych, w tym morfologii i aktywności enzymów wątrobowych (AST, ALT) oraz wyizolowano mitochondria z płytek krwi i określono stopień ich uszkodzenia za pomocą testu zużycia tlenu. Wynik porównano z grupą kontrolną 86 zdrowych osób, odżywiających się doustnie.

Badania prowadzono za pomocą dwóch metod: tradycyjną – z użyciem zestawu odczynników firmy Sysmex według instrukcji producenta i aparatu Sysmex XN-200. Ponadto z płytek krwi wyizolowano mitochondria i ich stopień uszkodzenia określono metodą Oznaczenia Zużycia Tlenu przy użyciu Agilent (USA) Zestawy MitoXpresIntra, które wykorzystują sondy fluorescencyjne na bazie porfiryn do pomiaru zużycie tlenu cząsteczkowego w mitochondriach w czasie rzeczywistym. Genomowy DNA wyizolowano z pełnej krwi i strawiono Fpg (glikozylaza formamidopirymidyno-DNA) zgodnie z zaleceniami producenta (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu pakietu oprogramowania STATISTICA™ ver. 13.3 (TIBCO Software Inc. Palo Alto, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Uzyskano podstawowe analizy opisowe. Test t-Studenta wykorzystano do określenia statystycznie istotnej różnicy między średnich w dwóch niezależnych próbach. Hipoteza zerowa została odrzucana i zaakceptowana alternatywna hipoteza, gdy wartość $p < 0,05$.

Wyniki

Publikacja 1.

Na podstawie podwyższonego poziomu bilirubiny całkowitej (=> 1,5 mg/dl) w osoczu, zdiagnozowano u 11 pacjentów żywionych pozajelitowo, co daje częstość zapadalności na poziomie 8,3%/9 lat. U 5 z 11 pacjentów z tej grupy obraz USG wątroby wykazywał umiarkowane powiększenie i cechy stłuszczenia. U żadnego z pacjentów objętych analizą nie wystąpiła schyłkowa niewydolność wątroby w przebiegu PNALD. W trakcie badania zmarło 63 pacjentów. U 61 pacjentów przyczyna zgonu była inna niż choroba wątroby. Dwa zgony zostały sklasyfikowane jako przyczyna zgonu związana z chorobą wątroby, ale niezwiązana z PNALD.

Publikacja 2.

Spektrum chorób wątroby związanych z żywieniem pozajelitowym (PNALD) obejmuje zaburzenia aktywności enzymów wątrobowych, stłuszczenie, zwłóknienie i ostatecznie marskość wątroby. Zakłada się, że patofizjologia być wieloczynnikowy. W pracy opisano mechanizmy rozwoju PNALD i możliwości przeciwdziałania.

Publikacja 3.

W badanej grupie zaobserwowano znaczący wzrost wartości AST i ALT o 13,9%. Wzrost poziomów utlenienia mitochondriów płytek krwi, zmierzony przy pomocy testu poboru tlenu, wykryto u 67,04% przypadków. Obserwowano poziom uszkodzeń DNA wynoszący 3,5% lub więcej. Stopień utleniania mitochondriów płytek krwi w tej grupie wynosił 18%, a w grupie badanej wynosił 33%, co oznacza, że wystąpił proces hiperoksji. Wraz z upływem czasu podczas żywienia pozajelitowego w kolejnych latach obserwuje się tendencje do zmniejszenia procentowego uszkodzeń DNA genetycznego i zwiększenia procentowej zawartości tlenu w komórkach. Zaobserwowano, że emulsja lipidowa oparta na oliwie z oliwek powoduje najniższy (średnio 30%) poziom tlenu cząsteczkowego. Jednakże powoduje ona największe (średnio 2,1%) uszkodzenia DNA.

Wnioski

Wyniki przeprowadzonych analiz mogą sugerować, że odpowiednio zbilansowany, zindywidualizowany program żywienia pozajelitowego zmniejsza ryzyko rozwoju PNALD. Same markery ALT mogą być nowymi markerami warstwy oksydacyjnej, na podstawie których możemy oszacować stopień uszkodzenia nie tylko wątroby po prowadzeniu leczenia żywieniowego, ale także indukowane przez nie uszkodzenia mitochondriów. Nie jest jednak jasne, czy żywienie pozajelitowe ma bezpośredni wpływ na uszkodzenia genomowego DNA i poziomy tlenu cząsteczkowego w komórkach w trakcie leczenia. Złożone interakcje między lipidami, a układem odpornościowym mogą nasilać się w trakcie procesu chorobowego i wraz ze stresem oksydacyjnym stanowią ważny czynnik w procesach chorobowych, który wciąż nie jest w pełni poznany. Ważne jest, aby uważnie monitorować pacjentów otrzymujących żywienie pozajelitowe pod kątem wszelkich działań niepożądanych i odpowiednio zarządzać potencjalnym ryzykiem.