



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

Pracę dedykuję moim Rodzicom i siostrze Agnieszce.

*Składam najserdeczniejsze podziękowania mojej
Pani Promotor dr hab. Iwonie Bil-Lula, prof. uczelni
ze cierpliwość i wyrozumiałość, ciągłą motywację
do dalszej pracy naukowej, wsparcie merytoryczne
i udzielone porady w trakcie kształcenia w Szkole
Doktorskiej i podczas pisania tej pracy.*

*Dziękuję również mojej Promotor Pomocniczej
dr Annie Krzywonos-Zawadzkiej za cenne rady,
pomoc i wsparcie w toku trwania moich studiów.*

SPIS TREŚCI

I STRESZCZENIE	7
II ABSTRAKT	11
III OPIS DOROBKU NAUKOWEGO	15
IV WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO	16
V WYKAZ PUBLIKACJI I DONIESIEŃ NAUKOWYCH	17
1. Publikacje w czasopismach z IF	17
2. Publikacje w czasopismach bez IF	18
3. Rozdział w monografii naukowej.....	18
4. Doniesienia naukowe.....	18
VI POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA	21
1. Projekty naukowe	21
2. Nagrody i wyróżnienia	21
3. Staże naukowe	22
4. Inne aktywności.....	22
VII WSTĘP	23
1. Choroby nerek i transplantacja nerki jako metoda terapeutyczna.....	23
1.1 Ostre uszkodzenie nerek i ostra choroba nerek.....	23
1.2 Przewlekła choroba nerek	25
1.3 Transplantacja nerki jako metoda terapeutyczna	26
2. Stres oksydacyjny	28
3. Uszkodzenie niedorkwienno-reperfuzyjne – mechanizm i wpływ stresu oksydacyjnego ...	30

4. Stres oksydacyjny w zespole metabolicznym	31
5. Budowa, działanie i zastosowanie Mitoquinonu	33
6. Działanie ekstraktu ze skórek granatu	35
VIII CEL I ZAŁOŻENIA PRACY	39
IX MATERIAŁY I METODY	40
X OMÓWIENIE WYNIKÓW PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD	
ROZPRAWY DOKTORSIEJ.....	52
Publikacja 1. Anna Radajewska, Anna Krzywonos-Zawadzka, Iwona Bil-Lula. <i>Recent Methods of Kidney Storage and Therapeutic Possibilities of Transplant Kidney</i>. Biomedicines. 2022 Apr 28;10(5):1013. doi: 10.3390/biomedicines10051013.	53
Publikacja 2. Anna Radajewska, Jakub Szyller, Joanna Niewiadomska, Agnieszka Noszczyk-Nowak, Iwona Bil-Lula. <i>Punica granatum L. Polyphenolic Extract as an Antioxidant to Prevent Kidney Injury in Metabolic Syndrome Rats</i>. Oxid Med Cell Longev. 2023 Jan 5; 2023:6144967. doi: 10.1155/2023/6144967.	60
Publikacja 3. Anna Radajewska, Jakub Szyller, Agnieszka Olejnik, Anna Krzywonos-Zawadzka, Grzegorz Sawicki, Iwona Bil-Lula. <i>Mitoquinone Alleviates Donation after Cardiac Death Kidney Injury during Hypothermic Machine Perfusion in Rat Model</i>; Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 14772. https://doi.org/10.3390/ijms241914772.	63
XI PODSUMOWANIE I WNIOSKI	66
XII WYKAZ SKRÓTÓW I DEFINICJI	68
XIII PIŚMIENNICTWO	73
XIV SPIS RYCIN	79
XV ZAŁĄCZNIKI	80

Załącznik 1. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.	80
Załącznik 2. Oświadczenie autorki rozprawy doktorskiej.....	81
Załącznik 3. Oświadczenia współautorów publikacji.	82
Załącznik 4. Wykaz publikacji i abstraktów potwierdzony przez bibliotekę.	83

I 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 niedokrwienno-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.

II 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.

III OPIS DOROBKU NAUKOWEGO

Swoją pracę naukową rozpoczęłam w 2019 roku na studiach magisterskich, na kierunku analityka medyczna, działając w Studenckim Kole Naukowym Cytometrii Przepływowej i Badań Biomedycznych (SKN nr K174). Moje zainteresowania naukowe dotyczyły chorób nowotworowych oraz nowoczesnych technik hodowli komórkowej 3D. Oprócz wystąpień na zjazdach naukowych, przygotowaliśmy i opublikowaliśmy dwie prace pogładowe, a w 2023 roku także publikację oryginalną. W 2020 roku zostałam przyjęta do Szkoły Doktorskiej, gdzie rozpoczęłam pracę nad swoją rozprawą w Katedrze Analityki Medycznej, Zakładzie Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej. Tematem moich badań są choroby nerek i ich uszkodzenie w procesie transplantacji oraz rola stresu oksydacyjnego w patofizjologii uszkodzenia nerek. W celu zebrania informacji na temat sposobów przechowywania transplantowanej nerki i najnowszych badań w tym temacie, dokonałam przeglądu literatury i opublikowałam pierwszą pracę pt. „*Recent methods of kidney storage and therapeutic possibilities of transplant kidney*” w czasopiśmie *Biomedicines* (2022, vol. 10, nr 5, art.1013). Dalsze badania prowadziłam we współpracy z Katedrą Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Praca skupiała się na uszkodzeniu nerek w przebiegu zespołu metabolicznego. Zebrane wyniki opublikowaliśmy w manuskrypcie pt. „*Punica granatum L. polyphenolic extract as an antioxidant to prevent kidney injury in metabolic syndrome rats*” w czasopiśmie *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2023, vol. 2023, art.6144967) Dzięki finansowaniu z grantu OPUS Narodowego Centrum Nauki (2017/27/B/NZ4/00601), prowadziłam badania nad stresem oksydacyjnym u dawców nerek po śmierci mózgowej i dawców po zatrzymaniu krążenia oraz z dodatkiem leku, Mitoquinone, do płynu perfuzyjnego. Badania opublikowałam w pracy pt.: „*Mitoquinone Alleviates Donation after Cardiac Death Kidney Injury during Hypothermic Machine Perfusion in Rat Model*” w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*

(2023, vol. 24, nr 19, art.14772). Obecnie dalsze prace koncentrują się na wykorzystaniu modelu *in vitro* hodowli organoidów nerkowych w ramach uzyskanego grantu Preludium (2021/41/N/NZ3/01692) „Farmakologiczna ochrona przeszczepianej nerki przed uszkodzeniem niedokrwiennie-reperfuzyjnym”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

IV WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Publikacje włączone do rozprawy doktorskiej	3	10,300	260
Publikacje, których nie włączono do rozprawy doktorskiej	6	23,305	520
Doniesienia zjazdowe w formie streszczeń na konferencjach krajowych	4	-	-
Doniesienia zjazdowe w formie streszczeń na konferencjach międzynarodowych	10	-	-
Razem		33,605	780

V WYKAZ PUBLIKACJI I DONIESIEŃ NAUKOWYCH

1. Publikacje w czasopismach z IF

Lp.	Opis bibliograficzny	IF	Punkty MNIŚW/MEiN
1	Anna Czyż, Magdalena Król, Oskar Przybyszewski, Anna Radajewska , Helena Moreira, Ewa Barg: Transformacje nowotworowe komórek hematopoetycznych u osób z trisomią 21 chromosomu, <i>Postępy Biologii Komórki</i> , 2019, vol. 46, nr. 2, s. 111-127, ISSN 0324-833X, e-ISSN 2080-2218	0,163	20
2	Anna Radajewska , Oskar Przybyszewski, Fathi Emhemmed, Christian D. Muller, Ewa Barg, Helena Moreira: Three dimensional in vitro culture systems in anticancer drug discovery targeted on cancer stem cells, <i>American Journal of Cancer Research</i> , 2021, vol. 11, nr. 10, s. 4931-4946,	5,942	100
3	Anna Radajewska , Anna Krzywonos-Zawadzka, Iwona Bil-Lula: Recent methods of kidney storage and therapeutic possibilities of transplant kidney, <i>Biomedicines</i> , 2022, vol. 10, nr. 5, art.1013 [15 s.], DOI:10.3390/biomedicines10051013	4,700	100
4	Anna Radajewska , Jakub Szyller, Anna Krzywonos-Zawadzka, Agnieszka Olejnik, Grzegorz Sawicki, Iwona Bil-Lula: Mitoquinone alleviates donation after cardiac death kidney injury during hypothermic machine perfusion in rat model, <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 2023, vol. 24, nr. 19, art.14772 [14 s.], DOI:10.3390/ijms241914772	5,600	140
5	Anna Radajewska , Helena Moreira, Dorota Bęben, Oliwia Siwiela, Anna Szyjka, Katarzyna Gębczak, Paulina Nowak, Jakub Frąszczak, Fathi Emhemmed, Christian D. Muller, Ewa Barg: Combination of irinotecan and melatonin with the natural compounds wogonin and celastrol for colon cancer treatment, <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 2023, vol. 24, nr. 11, art.9544 [21 s.], DOI:10.3390/ijms24119544	5,600	140
6	Agnieszka Olejnik, Anna Radajewska , Anna Krzywonos-Zawadzka, Iwona Bil-Lula: Klotho inhibits IGF1R/PI3K/AKT signalling pathway and protects the heart from oxidative stress during ischemia/reperfusion injury, <i>Scientific Reports</i> , 2023, vol. 13, art.20312 [15 s.], DOI:10.1038/s41598-023-47686-5	4,600	140

7	Kamil Rodak, Dorota Bęben, Monika Birska, Oliwia Siwiela, Izabela Kokot, Helena Moreira, Anna Radajewska , Anna Szyjka, Ewa Maria Kratz: Evaluating the neuroprotective potential of caffeinated coffee in the context of aluminum-induced neurotoxicity: insights from a PC12 cell culture model, <i>Antioxidants</i> , 2024, vol. 13, nr. 3, art.342 [21 s.], DOI:10.3390/antiox13030342	7,000	100
Podsumowanie		33,605	740

2. Publikacje w czasopismach bez IF

Lp.	Opis bibliograficzny	Punkty MNiSW/MEiN
1	Anna Radajewska , Jakub Szyller, Joanna Niewiadomska, Agnieszka Noszczyk-Nowak, Iwona Bil-Lula, Punica granatum L. polyphenolic extract as an antioxidant to prevent kidney injury in metabolic syndrome rats, <i>Oxidative Medicine and Cellular Longevity</i> , 2023, vol. 2023, art.6144967 [14 s.], ISSN 1942-0900, e-ISSN 1942-0994, DOI:10.1155/2023/6144967	20
Podsumowanie		20

3. Rozdział w monografii naukowej

Lp.	Opis bibliograficzny	Punkty MNiSW/MEiN
1	Jakub Stecko, Natalia Szymańska, Anna Radajewska , Oliwia Siwiela, Kacper Bębenek: CBD - sensacja czy rewolucja medycyny, Krajewska-Kułak Elżbieta, Łukaszuk Cecylia Regina, Lewko Jolanta, Kułak Wojciech (eds.): <i>Holistyczny wymiar współczesnej medycyny. T.9</i> , Białystok 2022, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, 1290 p., s. 942-961 ISBN 978-83-963859-4-9	20
Podsumowanie		20

4. Doniesienia naukowe

Lp.	Opis bibliograficzny
1	Anna Radajewska , Oskar Przybyszewski, Helena Moreira, Ewa Barg, F. Emhemmed, C.D. Muller: Evaluation of tumor stem cells in LoVo, HT29 and MCF7 cell lines in three-dimensional cell cultures, 4th International Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 09-10.10.2020 r., Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., 279 p., ISBN 978-83-66489-37-0
2	Anna Radajewska , Iwona Bil-Lula, Jakub Szyller, Anna Krzywonos-Zawadzka: Wykorzystanie ciągłej mechanicznej perfuzji nerki szczurzej w hipotermii jako modelu dawcy po śmierci sercowej – metodyka, II. WSML - Wrocławskie Spotkanie Medycyny Laboratoryjnej. Wrocław, 26.03.2021 r., s.25 poz.P15
3	Anna Radajewska , Dorota Bęben, O. Siwiela, Katarzyna Gębczak, Anna Szyjka, F. Emhemmed, M. Nabais, C.D. Muller, Ewa Barg, Helena Moreira: Anticancer potential of

	melatoninin in combination with irinotecan, wogonin or celastrol on sensitive and multidrug resistant colon cancer cells, 24e congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie "Cytométrie 2021". Strasbourg, Francja, 6-8.10.2021 r. Livre des résumés 2021, 158 p.
4	Dorota Bęben, O. Siwiela, Anna Radajewska , Katarzyna Gębczak, J. Oszmiański, F. Emhemmed, M. Nabais, C.D. Muller, Ewa Barg, Helena Moreira: Polyphenol-riche extracts from pomegranate and cistus in the fight against breast cancer, 24e congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie "Cytométrie 2021". Strasbourg, Francja, 6-8.10.2021 r. Livre des résumés 2021, 158 p.
5	Agnieszka Olejnik, Marta Kamińska, Anna Radajewska , Iwona Bil-Lula: Cardiopreventive influence of Klotho protein on antioxidant and anti-apoptotic mechanisms in heart injured by ischemia/reperfusion, Cardiovascular Research, 2022, vol. 118, nr. 2, s.ii58 poz.049, EuroThrombosis & EuroVessels 2022. Lizbona, Portugalia, 20-22.10.2022 r.
6	Kamil Rodak, Anna Radajewska , Dorota Bęben, Monika Biraska, Oliwia Siwiela: Czy codzienne przyzwyczajenia żywieniowe mogą być induktorem chorób, którym towarzyszy mentalne osamotnienie? – badania in vitro neurotoksyczności związków glinu w rozwoju choroby Alzheimerera w aspekcie protekcyjnego działania kofeiny i kawy, VII Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 15.12.2022 r. Książka abstraktów, Wrocław 2022, 53 p.
7	Anna Radajewska , Jakub Szyller, Anna Krzywonos-Zawadzka, Iwona Bil-Lula: Mitoquinone mesylate (MITOQ) as a mitochondria-targeted antioxidant in the treatment of ischemiareperfusion injury during kidney graft perfusion, WorldLab - EuroMedLab Roma 2023. Rzym, Włochy, 21-25.05.2023 r., Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2023, vol. 61, nr. suppl 1, s.S1446 poz.P1360
8	Agnieszka Olejnik, Marta Kamińska, Anna Radajewska , Anna Krzywonos-Zawadzka, Iwona Bil-Lula: Recombinant Klotho protein contributes to antioxidative protection in ischemia/reperfusion injury of the rat heart, WorldLab - EuroMedLab Roma 2023. Rzym, Włochy, 21-25.05.2023 r., Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2023, vol. 61, nr. suppl 1, s.S485 poz.P0399
9	Agnieszka Olejnik, M. Kaminska, Anna Radajewska , Anna Krzywonos-Zawadzka, Iwona Bil-Lula: Cardiopreventive effect of Klotho protein on oxidative stress, inflammation and apoptosis during cardiac ischemia/reperfusion injury, ESC Preventive Cardiology 2023, European Journal of Preventive Cardiology, 2023, vol. 30, nr. suppl 1, i350 poz.11404
10	Kamil Rodak, Dorota Bęben, Monika Biraska, Oliwia Siwiela, Anna Radajewska : Assessing the neuroprotective effects of caffeinated coffee in the context of aluminum-induced neurotoxicity: In-sights from PC12 cell culture model, IX International Students' Conference of Young Medical Researchers. Wrocław, 30.03-01.04.2023 r. Book of abstracts 2023, 65 p., poz. 85
11	Anna Radajewska , Jakub Szyller, Agnieszka Olejnik: Mitoquinone mesylate (MitoQ) has a protective effect on perfused kidney by reducing apoptosis, IX International Students' Conference of Young Medical Researchers. Wrocław, 30.03-01.04.2023 r. Book of abstracts 2023, 65 p., poz. 86
12	Anna Radajewska , Jakub Szyller, Anna Krzywonos-Zawadzka, Agnieszka Olejnik, Iwona Bil-Lula: Mesylan mitochinonu (MitoQ) zmniejsza uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne nerek poddanych zimnej maszynowej perfuzji w procesie transplantacji, Konferencja "Rzeczywistość a innowacje w medycynie laboratoryjnej" wrocławskiego oddziału PTDL współorganizowanej z Katedrą Analityki Medycznej UMW. Szklarska Poręba, 25-26.05.2023 r. Książka streszczeń, Szklarska Poręba 2023, 17 p.

13	Pearl Beesley, Thitinee Vanichapol, Ania Radajewska , Alan J Davidson, Veronika Sander: A hypertrophic, non-proliferative repair response to repeated low-dose cisplatin treatment in organoid tubules, RBK – Rebuilding the Kidney Meeting. Filadelfia, Stany Zjednoczone, 02-04.11.2023 r.
14	Anna Radajewska, Alina Rak-Pasikowska, Thierry van den Bosch, Martin Hoogduijn, Iwona Bil-Lula: Wykorzystanie ludzkich organoidów nerkowych w badaniach nad uszkodzeniem niedokrwiennie-reperfuzyjnym, XVI Naukowo-Szkoleniowy zjazd Stowarzyszenia Kolegium Medycyny Laboratoryjnej w Polsce. Warszawa, 18-20.04.2024 r. (Wystąpienie ustne)

VI POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA

1. Projekty naukowe

Lp.	Nazwa projektu	Rola
1	Farmakologiczna ochrona przeszczepianej nerki przed uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym. Preludium, Narodowe Centrum Nauki 2022-2025 r., 2021/41/N/NZ3/01692	Kierownik projektu
2	Analiza profilu wybranych cytokin u pacjentów pediatrycznych poddanych immunoterapii z zastosowaniem blinatumomabu lub komórek CAR-T w odniesieniu do potencjalnych powikłań oraz krótko- i długoterminowych wyników leczenia. B/01/06/2021, kierownik projektu: lek. Paweł Marschollek, 2021-2024 r.	Wykonawca projektu
3	Farmakologiczne metody ochrony nerki przeznaczonej do transplantacji przed uszkodzeniem niedokrwienno/reperfuzyjnym - badania na modelu zwierzęcym ex vivo i in vivo, Opus, Narodowe Centrum Nauki, 2018-2023 r., 2017/27/B/NZ4/00601, kierownik projektu: prof. Grzegorz Sawicki	Wykonawca projektu
4	Wpływ antyoksydantów na rozwój uszkodzenia nerek w zespole metabolicznym, Subwencja UMW, SUBK.D010.22.010, kierownik projektu: dr Jakub Szyller, 2022 r.	Wykonawca projektu
5	Wpływ białka Klotho na mechanizmy antyoksydacyjne i antyapoptotyczne w tkance sercowej poddanej niedokrwieniu i reperfuzji, Subwencja UMW, SUBK.D010.22.035, kierownik projektu: dr Agnieszka Olejnik, 2022 r.	Wykonawca projektu
6	Czy codzienne przyzwyczajenia żywieniowe mogą być induktorem chorób, którym towarzyszy mentalne osamotnienie? - badania in vitro neurotoksyczności związków glinu w rozwoju choroby Alzheimera w aspekcie protekcyjnego działania kofeiny i kawy kofeinowej, FAST, GMIN.D270.22.003, kierownik projektu: mgr. Kamil Rodak, 2022 r.	Wykonawca projektu

2. Nagrody i wyróżnienia

Lp.	Nazwa osiągnięcia	Rok
1	Stypendystka programu „Dolnośląscy Liderzy Medycyny wdrożenie zintegrowanego programu podnoszenia kompetencji studentów, doktorantów, kadry dydaktycznej i administracyjnej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu”	2020
2	Nagroda dla Młodych Naukowców na konferencji: 24th annual congress – „Cytométrie 2021” (Strasbourg, Francja) – “Anticancer potential of melatonin in combination with irinotecan, wogonin or celastrol on sensitive and multidrug resistant colon cancer cells”	2021
3	Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (za osiągnięcia w 2021 r.). Nagroda zespołowa drugiego stopnia za publikację.	2022
4	Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (za osiągnięcia w 2022 r.). Nagroda zespołowa drugiego stopnia za publikację.	2023

5	Stypendium European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine na udział w konferencji naukowej EuroMedLab Congress (Rzym, Włochy)	2023
6	Pierwsze miejsce na konferencji XVI Naukowo-Szkoleniowy Zjazd Stowarzyszenia Kolegium Medycyny Laboratoryjnej w Warszawie za wystąpienie pt. „Wykorzystanie ludzkich organoidów nerkowych w badaniach nad uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym.” (Warszawa)	2024
7	Wyróżnienie przyznane przez Dolnośląski Klub Kapitału dla Wybitnych Talentów w konkursie Młode Talenty w kategorii sukces naukowy	2024

3. Staże naukowe

Lp.	Miejsce odbywania stażu	Rok
1	Staż naukowy w Erasmus Medical Center (09.2021 – 02.2022 r.), Wydział Medycyny Chorób Wewnętrznych (Rotterdam, Holandia)	2021/22
2	Staż naukowy w Uniwersytecie w Auckland (06.2023 – 01.2024 r.), Wydział Medycyny Molekularnej i Patofizjologii (Auckland; Nowa Zelandia)	2023/24

4. Inne aktywności

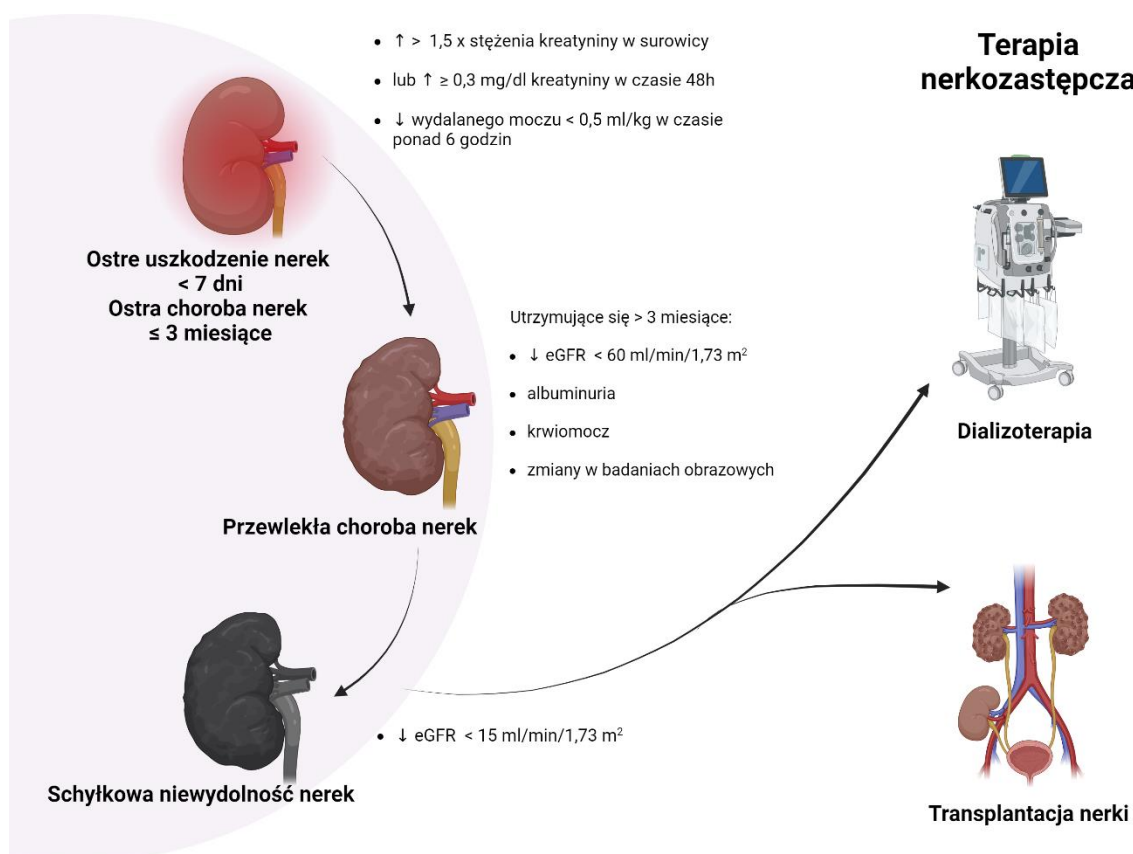
Lp.	Nazwa aktywności	Rok
1	Współorganizacja wydarzenia Work and Science Forum, organizowane przez Krajową Reprezentację Doktoranów (Warszawa, 2021 r.)	2021
2	Współorganizacja konferencji II Wrocławskie Spotkanie Medycyny Laboratoryjnej (Wrocław, 2021 r.)	2021
3	Organizacja zajęć w ramach Dolnośląskiego Festiwalu Nauki dla młodzieży ze szkół licealnych „Krew co w niej pływa i po co?”	2021 i 2022
4	Opiekun naukowy wymian studenckich w ramach projektu Międzynarodowego Stowarzyszenia Studentów Medycyny	2022 i 2023
5	Współorganizacja konferencji IX International Students' Conference of Young Medical Researchers (Wrocław, 2023 r.)	2023
6	Organizacja warsztatów dla szkół licealnych na temat morfologii krwi, serologii grup krwi, obrazu mikroskopowego osadu moczu i badania moczu	2022 i 2023

VII WSTĘP

1. Choroby nerek i transplantacja nerki jako metoda terapeutyczna

1.1 Ostre uszkodzenie nerek i ostra choroba nerek

Ostre uszkodzenie nerek (ang. *acute kidney injury*, AKI) jest definiowane jako nagłe pogorszenie pracy nerek, objawiające się ponad 1,5-krotnym zwiększeniem stężenia kreatyniny w surowicy lub jej wzrostem o przynajmniej 0,3 mg/dl w ciągu 48 godzin oraz spadkiem objętości wydalanego moczu poniżej 0,5 ml/kg w czasie dłuższym niż 6 godzin¹ (ryc. 1).



Rycina 1. Schemat diagnostyki chorób nerek i postępowania w schyłkowej niewydolności nerek.

eGFR - szacowany współczynnik filtracji kłębuszkowej

Do przyczyn AKI należą czynniki powodujące znaczące odwodnienie organizmu, hipotensję, niedotlenienie i anemię, leki nefrotoksyczne, ciężka infekcja i sepsa. Dodatkowo AKI może być następstwem przewlekłych chorób: cukrzycy, choroby nerek, wątroby, serca, układu pokarmowego. AKI rozwija się do 7 dni od zadziałania czynnika uszkadzającego, jednak może przerodzić się w ostrą chorobę nerek (ang. *acute kidney disease*, AKD), a następnie przewlekłą chorobę nerek (ang. *chronic kidney disease*, CKD). Większość przypadków AKI notowana jest u pacjentów hospitalizowanych i wiąże się z wydłużonym pobytem chorego w szpitalu, niekiedy dializami, zwiększonym ryzykiem powikłań i śmierci pacjenta ^{1,2}. Nerki są narządem o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym, dlatego zaburzenia przepływu krwi i stres oksydacyjny są ważnymi czynnikami uszkadzającymi ³. Ponadto, uszkodzenie śródbłonka naczyń i zmiany w budowie glikokaliksu prowadzą do aktywacji komórek endotelialnych, które poprzez zwiększoną ekspresję niektórych markerów powierzchniowych promują aktywację leukocytów i płytek krwi. W konsekwencji dochodzi do zmian zapalnych i pogorszenia sieci mikronaczyń i funkcji nerki ⁴. Może to następnie prowadzić do zmian zwłóknieniowych, poprzez zwiększoną sygnalizację transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- β) ⁵. W odpowiedzi na nasilony stres komórek śródbłonka i komórek nabłonkowych dochodzi do kumulowania się białek o nieprawidłowej strukturze w obrębie siateczki retikulum endoplazmatycznego (ang. *edoplasmatic reticulum*, ER), która aktywuje mechanizmy przywracające homeostazę, jak zwiększenie aktywności białek opiekuńczych, odpowiedzialnych za prawidłowe zwijanie białek i ich degradację ⁶. Jednak przedłużający się stres komórkowy może prowadzić do nadmiernej aktywności ER i w konsekwencji do działania profibrotycznego ⁷. Głównym organellem, odpowiedzialnym za produkcję reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), są mitochondria. Najbardziej narażone na nieprawidłowe działanie mitochondriów, w przebiegu AKI, są komórki kanalików proksymalnych ⁸. Zwiększona wtórnie aktywność ROS prowadzi do uszkodzenia

mitochondrialnego DNA (mtDNA), a także do zmian budowy lipidów i białek, aktywacji mechanizmów śmierci komórkowej i odpowiedzi immunologicznej. Dlatego związki o potencjale antyoksydacyjnym cieszą się obecnie dużym zainteresowaniem w poszukiwaniu nowych terapii AKI. Ponadto, zauważono zwiększoną biogenezę mitochondriów w odpowiedzi na uszkodzenie komórki, dzięki czemu możliwa jest jej regeneracja. Dlatego regulacja procesów biogenezy mitochondriów proponowana jest jako kolejna potencjalna opcja terapeutyczna³.

1.2 Przewlekła choroba nerek

Według klasyfikacji KDIGO (ang. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*), CKD charakteryzuje się upośledzoną filtracją, wyrażoną poprzez obniżenie szacowanego współczynnika filtracji kłębuszkowej (eGFR) poniżej 60 ml/min na 1,73 m² lub obecność widocznych zmian wskazujących na uszkodzenie nerek, takich jak: albuminuria, krwiomocz, zmiany w badaniach obrazowych, utrzymujące się dłużej niż 3 miesiące⁹ (ryc. 1). Spadek eGFR poniżej 15 ml/min na 1,73 m² określany jest mianem schyłkowej niewydolności nerek (ang. *end-stage renal disease*, ESRD) i wymaga wprowadzenia terapii nerkozastępczej⁹. Dokładne przyczyny CKD nie zostały do końca wyjaśnione. Udowodniono, że znacząco wyższe ryzyko CKD występuje u pacjentów otyłych, z cukrzycą, nadciśnieniem tętniczym, przebyłym AKI oraz genetycznymi zaburzeniami dotyczącymi budowy i funkcjonowania nerek⁹⁻¹². Dodatkowo, zwiększonym ryzykiem CKD obarczone są dzieci z niską masą urodzeniową, ze względu na nieprawidłowy rozwój nerek¹¹. Szacuje się, że choroba ta dotyka około 10% światowej populacji i do roku 2040 będzie stanowiła piątą, główną przyczynę zgonów^{9,10}. Nie ma obecnie dostępnych metod terapeutycznych, które przywrócą prawidłową pracę i morfologię zmienionych nerek, jednak zmiany w zakresie diety i sposobu życia mogą spowolnić jej postęp. Zarówno cukrzyca typu 2, jak i nadwaga wiążą się z aktywacją procesów

zapalnych, które prowadzą do zmian hemodynamicznych kłębuszków nerkowych^{13,14}. Zwiększone wydzielanie insuliny prowadzi do nasilenia stresu oksydacyjnego w podocytach, które na swojej powierzchni posiadają receptory dla insuliny¹⁰. Ponadto insulina stymuluje wytwarzanie czynnika TGF- β 1 i kolagenu IV, które przyczyniają się do tworzenia zmian zwłóknieniowych. Dodatkowo dochodzi do zmian stężenia sodu w kanalikach nerkowych, co napędza resorpcję wody, hiperfiltrację, wzrost ciśnienia tętniczego i skutkuje zwiększoną przepuszczalnością dla albumin i uszkodzeniem błony filtracyjnej¹⁰. Zmiany jakie zachodzą u pacjentów otyłych związane są z akumulacją tkanki tłuszczowej i aktywacją procesów zapalnych, które dalej prowadzą do zmian, wcześniej opisanych, w przebiegu cukrzycy: uszkodzenia bariery filtracyjnej i zwłóknienia nerek. Zwiększona retencja sodu jest związana z aktywacją układu renina-angiotensyna-aldosteron poprzez uwalnianie adipokin przez tkankę tłuszczową, wzrost aktywności układu współczulnego i zmiany hemodynamiczne¹⁵. Zmiany zachodzące w przebiegu przewlekłej choroby nerek można podsumować jako utratę prawidłowo funkcjonujących nefronów i ich przerost, nieprawidłową filtrację i zwłóknienie w wyniku nieswoistych procesów gojenia¹¹. CKD wiąże się z wieloma powikłaniami, które dotyczą różnych organów i układów narządów, w tym z chorobami układu krążenia, anemią, zaburzeniami gospodarki mineralnej i układu kostnego, wzrostem ryzyka infekcji, nefropatią obwodową i zaburzeniami poznawczymi oraz niedożywieniem¹⁶.

1.3 Transplantacja nerki jako metoda terapeutyczna

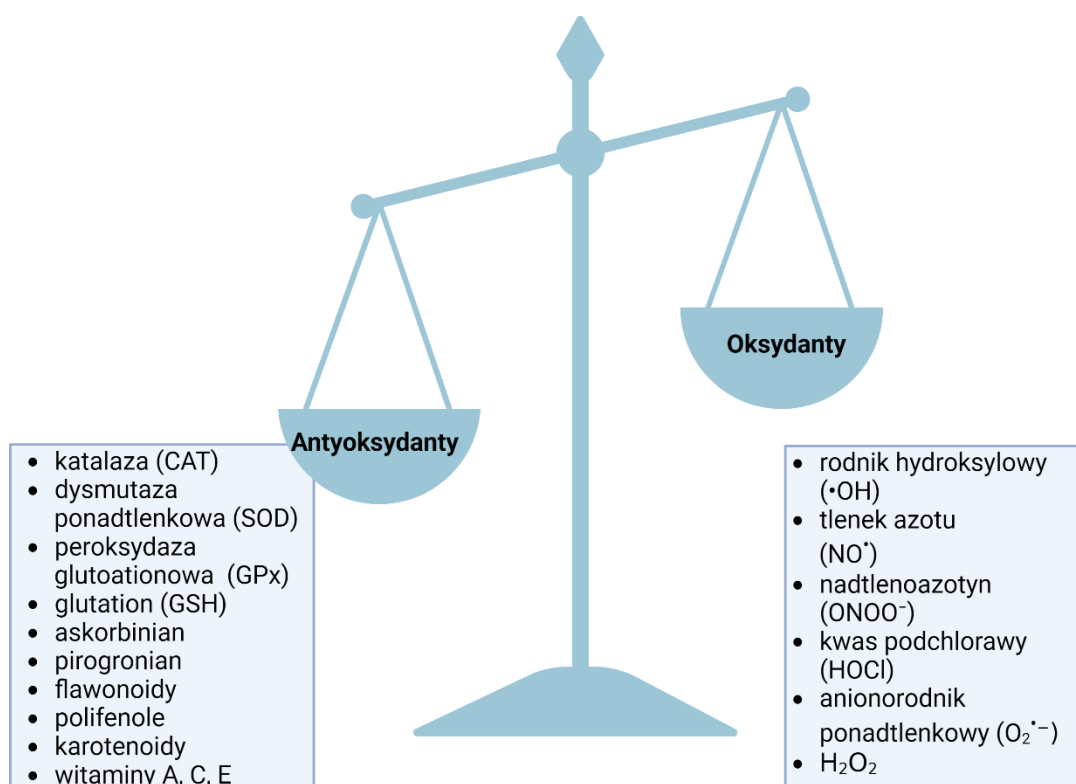
Pacjenci cierpiący z powodu schyłkowej niewydolności nerek poddawani są dializom, celem eliminacji metabolitów. Dializy są prowadzone kilkakrotnie w ciągu tygodnia, co znacząco wpływa na pogorszony komfort życia pacjentów i ich rodzin. Ponadto dializy wiążą się z wieloma poważnymi powikłaniami, włączając zakażenia i zdarzenia sercowo-naczyniowe. Pomimo rozwoju nefrologii, śmiertelność wśród pacjentów dializowanych jest nadal bardzo

wysoka ¹⁷. Inną znaną opcją terapeutyczną jest transplantacja nerki. Pierwszy udany zabieg transplantacji nerki odbył się w Chicago w 1950 r., gdzie lekarz Richard Lawler przeszczepił nerkę od dawcy z podobną grupą krwi co biorca. Pacjentka przeżyła kolejne 5 lat, jednak głównie dzięki funkcji jej własnej, drugiej nerki. Pierwszym polskim lekarzem, który dokonał przeszczepienia nerki od zmarłego dawcy był Jan Nielubowicz w 1965 roku, natomiast rok później Józef Gasiński przeszczepił nerkę od dawcy żywego ¹⁸. Chorzy ze stwierdzoną schyłkową niewydolnością mogą być kwalifikowani do zabiegu transplantacji, pod warunkiem braku przeciwwskazań, takich jak: ciężkie choroby płuc, wątroby, serca, amyloidoza, szpiczak mnogi i postępująca choroba neurodegeneracyjna. Ponadto, rekomenduje się opóźnione podjęcie decyzji o przeszczepieniu w przypadkach: aktywnej choroby nowotworowej, aktywnej infekcji układowej, w niektórych chorobach serca i tętnic, przytarczyc, układu pokarmowego, niedawno przebytego udaru mózgu, czy w przypadku osób chorych psychicznie, uzależnionych lub nieprzestrzegających schematu leczenia ¹⁹. W procesie doboru odpowiedniego dawcy należy potwierdzić zgodność grup krwi AB0 pacjentów, oznaczyć antygeny zgodności tkankowej HLA klasy I, -A,B i II -DR oraz przeprowadzić próbę krzyżową ¹⁸. W procesie leczenia biorca organu musi przyjmować leki immunosupresyjne w celu zapobiegnięcia odrzuceniu przeszczepu. W terapii indukcyjnej, która rozpoczyna się przed, w trakcie lub po przeszczepieniu nerki, wykorzystywane są głównie dwa leki: Bazyliksymab (agonista receptora dla interleukiny 2) lub ATG (globulina antytymocytowa). Następnie wprowadza się terapię złożoną najczęściej z glikokortykosteroidów, antymetabolitów (takich jak azatiopryna, mykofenolan mofetylu, mykofenolan sodu w otoczce dojelitowej), inhibitorów kalcyneuryny (cyklosporyna A lub takrolimus), inhibitorów mTOR (ewerolimus i syrolimus), blokerów kostymulacji limfocytów T (Belatacept). Zgodnie z rekomendacją KDIGO w większości przypadków zalecana jest potrójna terapia z włączeniem inhibitorów kalcyneuryny, kortykosteroidów i antymetabolitów ²⁰. Po pobraniu nerki od dawcy,

narząd zostaje przepłukany w celu usunięcia krwi, a następnie umieszczony w zimnym płynie prezerwacyjnym, najczęściej płynie Belzera (UW – University of Wisconsin) z utrzymaniem temperatury między 0 a 4 °C ²¹. Jest to najczęściej wykorzystywane rozwiązanie ze względu na niski koszt oraz łatwość zastosowania w przypadku nerek pobranych od pacjentów żywych lub zmarłych z powodu śmierci mózgowej (ang. *donation after brainstem death*, DBD) ²². Jednak w przypadku nerek pobieranych od pacjentów po zatrzymaniu krążenia (ang. *donation after circulatory death*, DCD), dawców o rozszerzonych kryteriach (ang. *expanded criteria donor*, ECD) zauważono, że lepszą metodą przechowywania narządu przed przeszczepieniem jest zastosowanie maszynowej perfuzji ²³. Mianem ECD określa się narządy pobrane od pacjentów po śmierci mózgowej powyżej 60 r. ż. lub dawców między 50 a 59 r. ż., których charakteryzowały: nadciśnienie tętnicze w wywiadzie, stężenie kreatyniny w surowicy krwi powyżej 1,5 mg/dl lub których przyczyną śmierci było zdarzenie naczyniowo-mózgowe, na przykład udar niedokrwienny ²⁴. Przeglądy systematyczne potwierdzają, że perfuzja zmniejsza ryzyko opóźnionej funkcji przeszczepu (ang. *delayed graft function*, DGF) ²³.

2. Stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny jest definiowany jako zaburzenie równowagi między produkcją oksydantów a odpowiedzią ze strony układu antyoksydacyjnego, z przewagą powstawania oksydantów (ryc. 2).



Rycina 2. Komponenty układu pro- i antyoksydacyjnego.

W skład systemu antyoksydacyjnego wchodzi enzymy unieczyniające ROS oraz reaktywne formy azotu (ang. *reactive nitrogen species*, RNS) ^{25,26}. W warunkach fizjologicznych ROS i RNS działają jako cząsteczki sygnałowe, jednak ich nadmierna produkcja może prowadzić do aktywacji enzymów proteolitycznych i uszkodzenia struktur komórki. Wyróżniamy dwa mechanizmy stresu oksydacyjnego. Reaktywne formy takie jak: $\cdot\text{OH}$, ONOO^- i HOCl działają bezpośrednio na białka, lipidy i kwasy nukleinowe, prowadząc do ich uszkodzenia lub zmian, takich jak peroksydacja lipidów i karbonylacja białek. Drugim mechanizmem jest niepoprawna sygnalizacja redox. W odpowiedzi na działanie $\text{O}_2^{\cdot-}$ i NO^\cdot dochodzi do produkcji nadtlenu wodoru (H_2O_2) oraz ONOO^- i uwolnienia białkowego żelaza, co dalej może prowadzić do aktywacji czynników transkrypcyjnych oraz peroksydacji lipidów. Nadmierna produkcja ROS i RNS może być spowodowana wewnętrznymi czynnikami oraz zewnętrznym działaniem ²⁶. Zwiększona produkcja reaktywnych form jest zauważalna w komórkach

nowotworowych, w przebiegu niedokrwienia, stanów zapalnych oraz wraz z pogłębianiem się procesów starzenia organizmu²⁷. Wśród prooksydacyjnych czynników zewnętrznych wyróżnia się związki zawarte w dymie papierosowym, niektóre leki, alkohol, rozpuszczalniki przemysłowe, toksyny pokarmowe, metale ciężkie oraz promieniowanie słoneczne i jonizujące²⁷. W skład układu antyoksydacyjnego wchodzi głównie: SOD, CAT i GPx, a także GSH. Ponadto możemy wyróżnić małe nieenzymatyczne cząsteczki działające antyoksydacyjnie: askorbinian i pirogronian²⁵. Dodatkowo, związki o potencjale antyoksydacyjnym takie jak flawonoidy, karotenoidy i polifenole, a także witaminy A, C i E dostarczane są wraz z pokarmem²⁸.

3. Uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne – mechanizm i wpływ stresu oksydacyjnego

Zatrzymanie krążenia krwi w organie powoduje niedokrwienie i szereg zmian metabolicznych w narządach. Przywrócenie krążenia krwi z kolei wiąże się z nagłym dopływem tlenu i nasileniem uszkodzenia oraz aktywacją układu immunologicznego. Zmiany te zostały zdefiniowane jako uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne (ang. *ischemia-reperfusion injury*, IRI), które może być przyczyną AKI, pojawia się w trakcie zabiegów chirurgicznych oraz towarzyszy zabiegowi transplantacji narządów²⁹. W przypadku przeszczepiania narządów fazę niedokrwienia dzieli się na czas ciepłego niedokrwienia (ang. *warm ischemia time*, WIT) oraz czas zimnego niedokrwienia (ang. *cold ischemia time*, CIT). WIT rozpoczyna się w momencie zatrzymania krążenia, w przypadku organów DCD lub w momencie podwiązania i usunięcia nerki przez chirurga. Zanurzenie w zimnym roztworze prezerwacyjnym lub rozpoczęcie zimnej maszynowej perfuzji rozpoczyna etap CIT. Zatrzymanie dostaw tlenu i związków odżywczych prowadzi do indukcji oddychania beztlenowego. Dochodzi do wyczerpania zapasów trifosforanów adenozyne (ang. *adenosine*

triphosphate, ATP), akumulacji metabolitów, co dalej prowadzi do kwasicy i wzrostu osmomolalności komórek. Dysfunkcja pompy sodowo-potasowej oraz pompy sodowo-wapniowej prowadzi do zaburzenia homeostazy jonowej, akumulacji jonów sodu i wapnia w komórce, co napędza napływ wody i obrzęk komórek. Pomimo zmniejszonej dostępności tlenu dochodzi do syntezy ROS, w następstwie zaburzenia pracy mitochondrialnego łańcucha oddechowego, uwolnienia wolnego żelaza z cytochromu P450 oraz dezaktywacji SOD. Zwiększenie poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia powoduje aktywację ważnych proteaz, w tym kalpain (zależnych od wapnia proteaz cysteinowych), które wpływają na zmiany w obrębie cytoszkieletu oraz zmieniają strukturę kinazy białkowej C, fodryny i kaspaz odpowiedzialnych za aktywację śmierci komórki. Pomimo, że hipotermiczne warunki mają na celu zmniejszenie aktywności metabolicznej, w tym również zapotrzebowania komórek na tlen, zmiany związane z niedokrwieniem i niską temperaturą przypominają zmiany zachodzące podczas ciepłego niedokrwienia. Istotny w patomechanizmie WIT anion nadtlenoazotynowy nie bierze udziału w patomechanizmie CIT. W trakcie trwania CIT dochodzi także do zmian cytoszkieletu komórki. Śmierć komórek kanalików proksymalnych zachodzi z znacznym stopniem w procesie nekrozy^{21,30}.

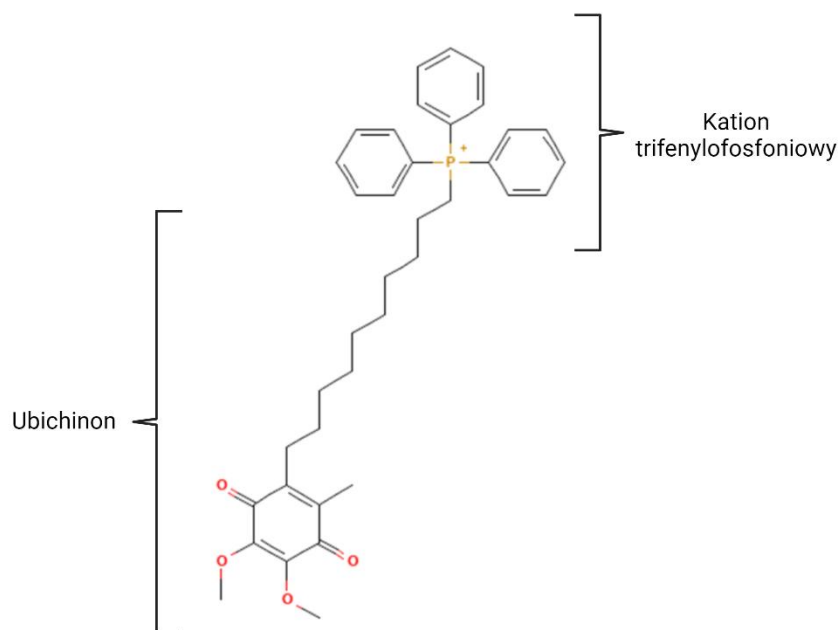
4. Stres oksydacyjny w zespole metabolicznym

Zespół metaboliczny (ang. *metabolic syndrome*, MetS) definiuje się jako współistnienie: otyłości, insulinooporności, podwyższonego ciśnienia tętniczego krwi, zaburzeń gospodarki lipidowej (hipertriglicydemia, obniżenie stężenia HDL w surowicy) i węglowodanowej (hiperglikemia na czczo)^{31,32}. Zgodnie z wytycznymi National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III, zespół metaboliczny charakteryzuje spełnienie przynajmniej trzech kryteriów: obwód talii powyżej 102 cm u mężczyzn i 88 cm u kobiet, stężenie triglicerydów przekraczające 150 mg/dl, HDL poniżej 40 mg/dl w przypadku

mężczyzn i 50 mg/dl w przypadku kobiet, ciśnienie skurczowe ≥ 130 mmHg lub rozkurczowe ≥ 85 mmHg lub przyjmowanie leków na nadciśnienie, stężenie glukozy na czczo przekraczające 100 mg/dl lub przyjmowanie leków na cukrzycę³³. MetS jest poważnym problemem krajów rozwiniętych, co potwierdza badanie przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych, gdzie kryteria diagnostyczne spełniało 35,1% badanych Amerykanów i 34,3% badanych Amerykanek w latach 2011 – 2016³³. Zespół metaboliczny należy do czynników ryzyka rozwoju miażdżycy, chorób układu krążenia, chorób nerek, udaru mózgu i cukrzycy typu 2. U otyłych mężczyzn z insulinopornością lub stwierdzonym MetS zauważa się zwiększony stres oksydacyjny. Możliwe, że zaburzenia produkcji ROS dotyczą wczesnego etapu patofizjologii rozwoju MetS, ale także jego progresji i powikłań^{32,34}. Markery stanu zapalnego, takie jak interleukina 6 (IL-6) i wysokoczułe białko C-reaktywne (ang. *high-sensitivity C-reactive protein*, hs-CRP) są dodatnio skorelowane ze wzrostem stresu oksydacyjnego u pacjentów z zespołem metabolicznym. Ponadto aktywność enzymów antyoksydacyjnych takich jak: SOD, CAT i GPX jest istotnie mniejsza u pacjentów z MetS w porównaniu do grupy kontrolnej - zdrowych osób niespełniających kryteriów diagnostycznych MetS³⁴. Wzrost stężenia wolnych kwasów tłuszczowych (ang. *free fatty acids*, FFAs) w surowicy krwi i hiperglikemia skutkują aktywacją kinazy białkowej C. Prowadzi to do fosforylacji oksydazy NADPH (NOX), aktywacji oksydaz mitochondrialnych, za pośrednictwem endoteliny-1, indukcji NOX poprzez sygnalizację MAPK-p38. W konsekwencji dochodzi do uszkodzenia śródbłonna w następstwie nadmiernej produkcji ROS i RNS. Zarówno FFAs i oxLDL mogą być przyczyną dysfunkcji mitochondriów i aktywacji apoptozy poprzez zaburzoną fosforylację oksydacyjną i produkcję ROS w komórkach śródbłonna i kardiomyocytach³⁵.

5. Budowa, działanie i zastosowanie Mitoquinonu

Mitochondria są organellami odpowiedzialnymi za produkcję energetyczną komórki oraz utrzymanie homeostazy oksydacyjno-redukcyjnej. Ponadto odgrywają ważną rolę w sygnalizacji metabolicznej, m.in.: biosyntezie hemu, cyklu Krebsa, β -oksydacji kwasów tłuszczowych, utrzymaniu homeostazy jonów wapnia, termogenezie, proliferacji i aktywacji śmierci komórkowej na drodze apoptozy³⁶. Rola mitochondrium w patogenezie chorób i dysfunkcji nerek została poparta wieloma badaniami³⁷. Zarówno ostre, jak i przewlekłe stany chorobowe nerek mogą wpływać na zaburzenie integralności podwójnej błony mitochondriów i mitochondrialnego DNA (mtDNA). Ponadto zauważono zmiany w molekularnej kontroli tworzenia i degradacji mitochondriów oraz zaburzenia ich homeostazy, które obejmują stres oksydacyjny i aktywację apoptozy³⁷. Mitochondria są głównym ośrodkiem powstawania ROS, które fizjologicznie biorą udział w sygnalizacji komórkowej. W sytuacjach patologicznych, gdzie dochodzi do gwałtownego wzrostu wolnych rodników, biorą one udział w niszczeniu struktur komórkowych i materiału genetycznego, w tym mtDNA, które ze względu na swoją strukturę i brak histonów jest szczególnie narażone na degradację^{38,39}. Z tego względu coraz większe zainteresowanie badaczy budzą związki o charakterze antyoksydantów, działających bezpośrednio na mitochondria, w tym Mitoquinone (MitoQ). Błona zewnętrzna mitochondrium charakteryzuje się negatywnym ładunkiem, przez co nie wszystkie antyoksydanty z łatwością przechodzą do wnętrza organellum. MitoQ składa się z lipofilowego trifenylfosfoniowego (TPP) kationu i ubichinonu o właściwościach przeciwutleniających (ryc. 3).



Rycina 3. Wzór strukturalny Mitoquinone ⁴⁰

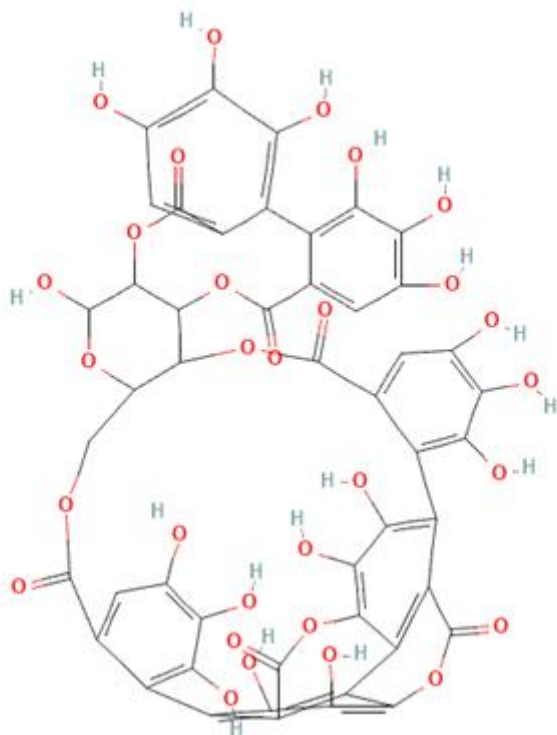
Dzięki obecności kationu TPP możliwa jest łatwa penetracja błony mitochondrium i akumulacja całej cząsteczki leku wewnątrz mitochondriów. Badania wykazały, że działanie przeciwoksydacyjne MitoQ jest około kilkaset razy bardziej efektywnie niż standardowych antyoksydantów ⁴¹. Cząsteczka ubichinonu zostaje zaktywowana przez kompleks II, znajdujący się w wewnętrznej błonie mitochondrium, co pozwala na neutralizację reaktywnych form tlenu i ponowne przejście do formy zredukowanej, posiadającej potencjał przeciwutleniający ⁴². Dzięki temu zachowana jest wysoka skuteczność MitoQ. MitoQ wykazywał pozytywne działanie w przypadku septycznego osłabienia funkcji przepony ⁴³. Sepsa prowadzi do osłabienia skurczów przepony, zmniejszenia produkcji ATP i stymulowanego przez ADP zużycia tlenu. Podanie MitoQ poprawiało stan i aktywność metaboliczną mięśni przepony. Ponadto zauważono większą zawartość łańcuchów ciężkich miozyny w homogenatach tkankowych w grupie leczonej MitoQ, gdzie sepsa znacząco obniżała ich zawartość.

Wykorzystanie MitoQ w terapii chorób nerek zostało zbadane na wielu modelach, jednak nie wszystkie badania wykazały skuteczność terapii ⁴⁴, dlatego niezbędne jest dokładne zbadanie tego antyoksydantu. IRI może być przyczyną rozwoju AKI. Do IRI nerek może dojść w sytuacji wstrząsu, zabiegów chirurgicznych z podwiązaniem aorty, częściowej nefrektomii i zatrzymania krążenia ⁴⁵. W następstwie dochodzi do zwiększonego stresu oksydacyjnego, który jest ważnym elementem rozwoju AKI. Podanie MitoQ myszom na 15 minut przez indukcję niedokrwienia (45 min obustronnej okluzji naczyń nerki) spowodowało znaczne zmniejszenie stężenia kreatyniny we krwi po 24 godzinach reperfuzji ⁴⁶. Ponadto zaobserwowano zmniejszenie się stężenia karbonylowanych białek, które są markerem stresu oksydacyjnego, po zastosowaniu MitoQ. Wzrost uszkodzonego mtDNA, charakterystycznego dla uszkodzenia mitochondrii, jest obserwowane w fazie reperfuzji, głównie w jej późniejszym etapie. MitoQ zmniejszył stężenie uszkodzonego mtDNA po reperfuzji. Pozytywny efekt zastosowania MitoQ został potwierdzony także na świńskim modelu przeszczepienia nerki ^{47,48}. MitoQ dodany do płynu prezerwacyjnego zwiększył aktywność kompleksu II i III łańcucha oddechowego, zmniejszył uszkodzenie komórek kanalików w korze i zewnętrznych obszarach rdzenia nerek przechowywanych przez 48 godzin, jednak nie zauważono zmian w głębszych partiach rdzenia ⁴⁷.

6. Działanie ekstraktu ze skórek granatu

Granat (*Punica granatum L.*) jest owocem pochodzącym z Iranu, ale hodowanym w różnych regionach świata. Swoją popularność zyskał dzięki wyjątkowym walorom smakowym, a także ze względu na zawartość wielu substancji bioaktywnych, zarówno w części jadalnej owocu, jak i innych partiach, w skórcie granatu. Wśród związków o potencjale terapeutycznym wyróżnia się związki fenolowe, które wykazują działanie przeciwutleniające. Związki fenolowe dzielimy na flawonoidy, kwasy fenolowe i taniny, różniące się elementami

strukturalnymi łączącymi pierścienie benzenowe i liczbą przyłączonych grup hydroksylowych ⁴⁹. Elagitaniny (należące do tanin), zawarte w skórce granatu, to między innymi kwas garbnikowy, punikalina, punikalagina i kwas elagowy. Punikalagina (ryc. 4) jest związkiem dominującym, stanowiącym około 70% wszystkich występujących elagitanin w skórce granatu ⁵⁰.



Rycina 4. Wzór strukturalny punikalaginy ⁵¹

Wyciąg ze skórki granatu (WSG) wykazuje działanie przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe oraz przeciwoksydacyjne ⁴⁹. Flawonoidy wyizolowane ze skórki granatu działają hamująco na cyklooksygenazę (COX) i lipooksygenazę (LOX), kluczowe enzymy wykazujące aktywność w reakcji immunologicznej. Oba enzymy odpowiadają za metabolizm kwasu arachidonowego, prowadząc do powstania prostaglanyn i tromboksanu (COX) oraz leukotrienów (LOX), biorących udział w reakcjach zapalnych i alergicznych ⁵². Udowodniono, że WSG działa ochronnie na wątrobę i nerki w terapii

z wankomycyną. Markery uszkodzenia wątroby (ALP, AST i ALT) oraz nerki (mocznik, kwas moczowy i kreatynina) były znacząco wyższe w surowicy szczurów leczonych wankomycyną. WSG stosowany w terapii łączonej z antybiotykiem lub stosowany przed rozpoczęciem terapii obniżył aktywność enzymów wątrobowych, a leczenie wstępne spowodowało obniżenie wartości mocznika i kwasu moczowego. Ponadto zaobserwowano, że wankomycyna przyczynia się do zwiększonego stresu oksydacyjnego – zmniejszenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych: GSH, CAT i SOD oraz wzrostu syntezy malondialdehydu (MDA), markera peroksydacji lipidów. Podanie WSG spowodowało zwiększenie aktywności GSH, SOD i CAT oraz obniżenie stężenia MDA. WSG zredukowało wzrost stężenia białka C-reaktywnego, po podaniu wankomycyny, co wskazuje na właściwości przeciwzapalne⁵³. Etanolowy ekstrakt z *Punica granatum L.* zmniejszył także stres oksydacyjny w tkance sercowej wywołany przez doksorubicynę i miał działanie kardioprotekcyjne. WSG bogaty w związki fenolowe wiąże i redukuje ponadtlenki w tkance sercowej⁵⁴. Podanie WSG szczurom z zespołem metabolicznym powodowało wzrost stężenia białkowych grup tiolowych (-SH) w sercu, które mają zdolność neutralizacji wolnych rodników tlenowych, a podanie ekstraktu w dawce 100 mg/kg m.c. spowodowało zmniejszenie całkowitego statusu oksydacyjnego (ang. *total oxidative status*; TOS)⁵⁵. Działanie nefroprotecyjne wyciągu z *Punica granatum L.* zostało zbadane na zwierzęcym modelu ostrego, toksycznego uszkodzenia nerek po podaniu cisplatyny. Wysoka dawka WGS skutkowała zmniejszeniem stężenia kreatyniny w surowicy krwi i azotu mocznika (ang. *blood urea nitrogen*, BUN), które były podwyższone w grupie leczonej samą cisplatyną. Dodatkowo, stężenie czynnika martwicy nowotworu alfa (ang. *tumor necrosis factor*, TNF- α) w surowicy zmniejszyło się po podaniu ekstraktu, a badanie histopatologiczne potwierdziło zwiększoną integralność strukturalną kanalików nerkowych i brak cech stanu zapalnego, w momencie leczenia cisplatyną i wyciągiem w dawce 200 mg/kg m.c.⁵⁶. Ekstrakt z *Punica granatum L.* podawany szczurom z cukrzycą indukowaną streptozotocyną powodował

wzrost aktywności lub utrzymanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych takich jak: SOD, CAT, reduktazy glutationowej (ang. *glutathione reductase*; GR), S-transferazy glutationowej (ang. *glutathione-S-transferase*; GST) oraz GPX w nerkach i wątrobie, w porównaniu do grupy kontrolnej bez cukrzycy. Podanie 20 mg/kg m.c. ekstraktu powodowało znaczący wzrost całkowitej zdolności przeciwutleniającej w surowicy (ang. *serum total anti-oxidant capacities*; TAC) oraz zmniejszenie peroksydacji lipidów w porównaniu do nieleczonego szczurów z cukrzycą⁵⁷.

VIII CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

Cel główny: Ocena wpływu działania stresu oksydacyjnego w wybranych patomechanizmach uszkodzenia nerki oraz zbadanie protekcyjnego działania związków antyoksydacyjnych.

Cele szczegółowe:

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 + Mitoquinone.

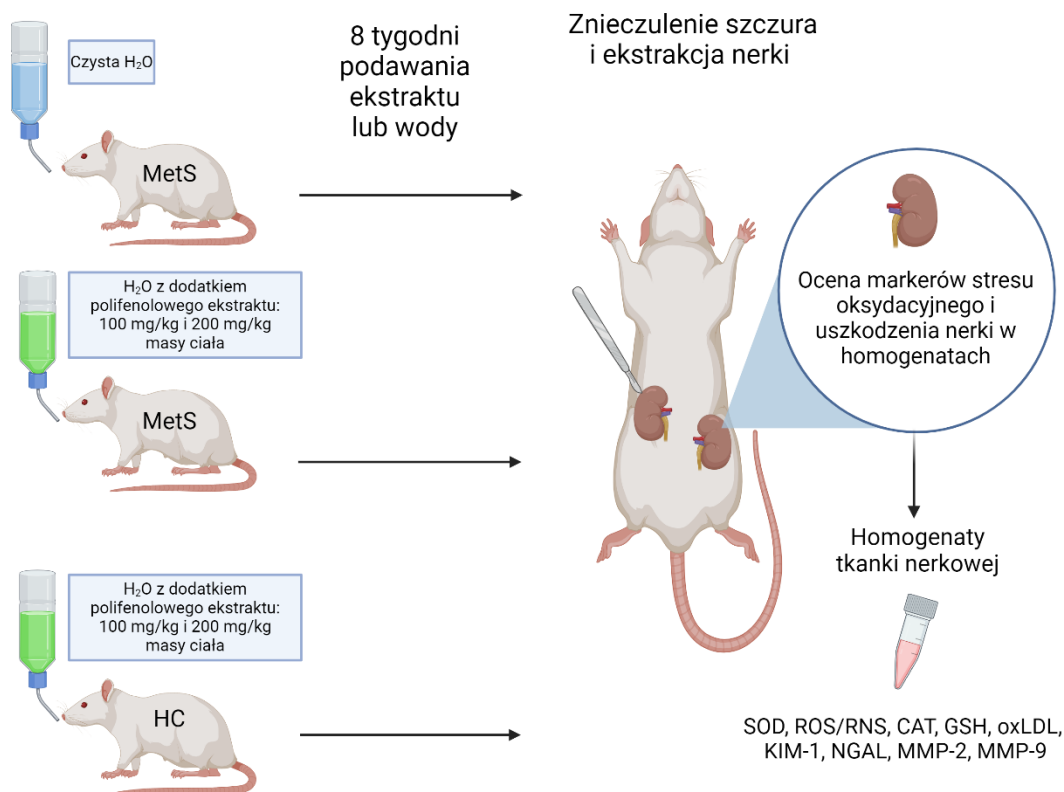
IX MATERIAŁY I METODY

Badania eksperymentalne zostały przeprowadzone z wykorzystaniem dwóch modeli badawczych:

1. szczurzego modelu zespołu metabolicznego;
2. izolowanych nerek szczurzych – perfundowanych przy użyciu systemu do zimnej perfuzji maszynowej.

1. Szczurzy model uszkodzenia nerki w zespole metabolicznym. Badania *in vivo*

W modelu uszkodzenia nerki w przebiegu zespołu metabolicznego wykorzystano dorosłe samce szczurów Zucker Diabetic Fatty (ZDF-Lep^{fa}/Crl), które otrzymano z Sulzfeld (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Niemcy GmbH). Zwierzęta podzielono na pięć grup, po sześć szczurów w każdej (ryc. 5). Wszystkie zwierzęta były poddane tej samej diecie (Purina LabDiet 5008, Charles River Laboratories, USA). Grupę kontrolną (MetS-kontrola) stanowiły szczury z mutacją zmiany sensu receptora leptyny (ZDF fa/fa). Grupę badaną stanowiły zwierzęta z mutacją w genie receptora leptyny (ZDF fa/fa), otrzymujące ekstrakt polifenolowy ze skórek owoców granatu zmieszany z wodą w dawce 100 lub 200 mg/kg masy ciała (MetS+100 lub MetS+ 200). Dwie grupy zdrowych szczurów bez MetS (ZDF fa/+) otrzymywały ekstrakt w takich samych dawkach (HC+100 i HC+200). Wodę z ekstraktem podawano przez sondę żołądkową przez 8 tygodni. Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu (Uchwała nr. 53/2017).



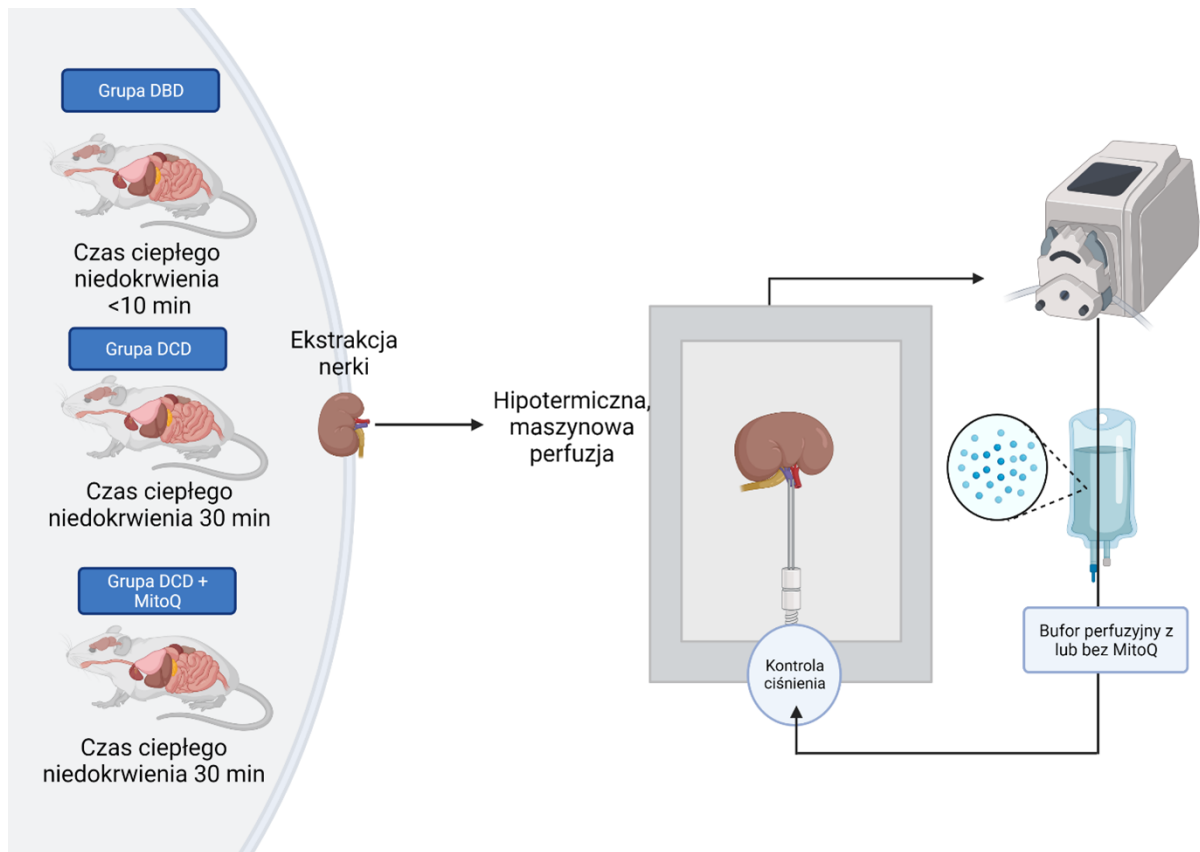
Rycina 5. Schemat badania z wykorzystaniem szczurów MetS i HC pojoynych wyciągiem ze skórki granatu lub wodą.

MetS – zespół metaboliczny, HC – osobniki zdrowe, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa, ROS/RNS – reaktywne formy tlenu i azotu, CAT – katalaza, GSH – glutation, oxLDL - utlenione formy lipoprotein o małej gęstości, KIM-1 - cząsteczka uszkodzenia nerek 1, NGAL - lipokalina związana z żelatynazą neutrofilów, MMP-2 – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 2, MMP-9 – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 9.

2. Uszkodzenie niedokrwienne izolowanych szczurzych nerek. Zimna maszynowa perfuzja nerek. Badania *ex vivo*

W modelu uszkodzenia niedokrwiennego, podczas przechowywania nerki przed transplantacją, wykorzystano izolowane nerki szczurze samców szczurów rasy Wistar (o wadze 300-350 g). Zwierzęta zakupiono w Centrum Badań Medycznych im. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Dwa samce w klatce trzymano w kontrolowanej temperaturze (22±2 °C), wilgotności (55% +/- 10%), cyklu światło/ciemność (12/12 godzin) oraz z nieograniczonym dostępem do pokarmu i wody. Wszystkie procedury doświadczalne

na zwierzętach zostały zatwierdzone przez lokalną Komisję Etyki Doświadczeń na Zwierzętach w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Opieka i wykorzystanie zwierząt doświadczalnych było prowadzone zgodnie z zaleceniami dotyczącymi opieki i wykorzystania zwierząt doświadczalnych, wydanymi przez Polskiego Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Zwierzęta podzielono losowo na grupy badawcze. Szczury znieczulono buprenorfiną (0,05 mg/kg masy ciała, podanie dootrzewnowe) i uszpioło pentobarbitem sodu (0,5 ml/kg masy ciała), a następnie szybko usunięto serce zwierzęcia. Nerkę prawą natychmiast wyizolowano, zakaniulowano przez tętnicę nerkową i podłączono do systemu perfuzyjnego w warunkach hipotermii (4-5 °C) (Single Channel Perfusion System, EMKA Technologies, Paryż, Francja) (grupa DBD) lub podwiązano na 30 minut z zachowaniem kontrolowanej temperatury (37 °C) w celu naśladowania dawcy przeszczepu DCD, a następnie wycięto, zakaniulowano przez tętnicę nerkową i podłączono do systemu perfuzyjnego w warunkach hipotermii (4-5 °C) (grupy eksperymentalne: DCD i DCD + MitoQ) (ryc. 6 i 7). Nerki perfundowano przez godzinę buforem perfuzyjnym z heparyną w celu wypłukania komórek krwi, a następnie bufor zastąpiono 100 ml świeżego buforu perfuzyjnego z mesylanem mitoquinonu (grupa DCD + MitoQ) lub bez MitoQ (grupa DBD i DCD). Bufor perfuzyjny oparto na buforze Krebsa-Henseleita (pH = 7.4; 118 mmol/L NaCl, 4,7 mmol/L KCl, 1,2 mmol/L KH₂PO₄, 1,2 mmol/L MgSO₄, 3,0 mmol/L CaCl₂, 25 mmol/L NaHCO₃, 11 mmol/L glukozy oraz 0,5 mmol/L EDTA) z dodatkiem albuminy. Nerkę perfundowano zimnym buforem (4-5 °C) przez 22 godziny ze stałą szybkością przepływu (0,12 ml/min), aby utrzymać ciśnienie w zakresie 50-120 mmHg. Dane wyjściowe systemu monitorowania rejestrowano za pomocą oprogramowania IOX2 (EMKA Technologies, Paryż, Francja).



Rycina 6. Schemat badania perfuzji nerek ex vivo.

DBD - dawcy po śmieci mózgowej, DCD – dawcy po zatrzymaniu krążenia, MitoQ – Mitoquinone.



Rycina 7. Zdjęcie przedstawiające nerkę szczurzą perfundowaną w systemie do zimnej maszynowej perfuzji.

3. Przygotowanie homogenatów tkankowych z wyekstrahowanych szczurzych nerek

Mrożona tkanka nerkowa została wykorzystana do przygotowania homogenatu tkankowego przy użyciu moździerza i tłuczka, w ciekłym azocie. Następnie przygotowany homogenat został poddany dalszej homogenizacji. Do około 100 mg sproszkowanej tkanki dodano 400 μ l buforu do homogenizacji (50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 3,1 mmol/L sacharoza, 1 mmol/L ditiotretitol, 10 mg/ml leupeptyny, 10 mg/ml sojowego inhibitora trypsyny, 2 mg/ml aprotyniny i 0,1% Triton X-100), a następnie próbki poddano trzem cyklom mrożenia (w ciekłym azocie) i rozmrażania (w 37 °C). Po ostatnim cyklu rozmrażania próbki umieszczono na lodzie i homogenizowano mechanicznie. Homogenaty odwirowano (10 000 x g, 4 °C przez 10 minut lub 15 minut), pobrano supernatant i zamrożono (- 80 °C) do dalszych analiz biochemicznych.

4. Przygotowanie ekstraktu ze skórki granatu

Polifenolowy ekstrakt został sporządzony ze skórek *Punica granatum L.* (odmiana Mollar de Eche) pochodzących z Hiszpani. Wysuszone skórki owoców granatu ekstrahowano i reekstrahowano dwukrotnie 50% etanolem. Otrzymany materiał został zagęszczony na wyparce rotacyjnej (Rotavapor, Buchi Labortechnik AG, Szwajcaria) w łaźni wodnej w temperaturze 40 °C. Ekstrakt adsorbowano na żywicy Amberlite XAD-16 (Brenntag, Essen, Niemcy), a następnie po odparowaniu etanolu zebrano frakcję i suszono w piecu próżniowym SPT-200 (Zeamil, Kraków, Polska).

5. Ocena i analiza składu związków polifenolowych zawartych w otrzymanym ekstrakcie

Ekstrakt ze skórek granatu rozpuszczono w MeOH/H₂O/kwas askorbinowy (30 : 68 : 1 v/v/m) z dodatkiem 1% mieszaniny 37% kwasu chlorowodorowego i następnie przeprowadzono separację chromatograficzną na aparacie ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). System jest wyposażony w detektor z matrycą fotodiodową (PDA; Waters Corporation, Milford, MA) sprzężony z kwadrupolową spektrometrią masową w czasie przelotu (QTOF-MS, Waters, Manchester, Wielka Brytania), z jonizacją przez elektrorozpylanie (ESI) jako źródłem działającym w trybach jonów ujemnych i dodatnich z widmami uzyskanymi w zakresie mas od m/z 100 do 1800. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono przy użyciu kolumn UPLC BEH C18 (1,7 μm, 2,1 mm × 100 mm; Waters Corporation, Milford, USA). Do elucji zastosowano natężenie przepływu fazy ruchomej wynoszące 0,42 ml/min w całym gradiencie. Jako fazy ruchome zastosowano wodę (zakwaszoną 0,1% kwasem mrówkowym, 1:1) i acetonitryl z 0,1% kwasem mrówkowym (odpowiednio A i B). Gradient rozpoczęto od 99% A w warunkach izokratycznych przez 1 minutę, następnie zastosowano 11-minutowy gradient liniowy od 1% do 40% B. Wartość B zwiększono do 100% po 12–14 minutach i na koniec przywrócono do warunków początkowych (99% A) na 2 minuty w ramach etapu ponownego równoważenia. Optymalna

wstrzyknięta objętość wynosiła 10 μ L. Eksperymenty QTOF-MS przeprowadzono w trybie negatywnym przed i po fragmentacji. Poszczególne polifenole charakteryzowano na podstawie czasu retencji i masy cząsteczkowej. Doświadczenia z fragmentacją wywołaną kolizjami przeprowadzono przy użyciu argonu jako gazu kolizyjnego. Optymalne wartości parametrów UPLC i QTOF-MS przyjęły napięcie kapilary i stożka odpowiednio 2500 V i 30 V. Temperaturę kapilary ustawiono na 300 °C, a temperaturę podgrzewacza źródła na 100 °C, przy szybkości przepływu gazu suszącego (azotu) wynoszącej 300 L/h.

6. Ocena aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w homogenatach tkankowych

Całkowitą aktywność dysmutazy miedziowo-cynkowej (SOD1) mierzono w homogenatach tkankowych za pomocą zestawu Superoxide Dismutase Assay Kit (nr kat. 706002, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA), który wykorzystuje sól tetrazolową do wykrywania rodników ponadtlenkowych przy użyciu oksydazy ksantynowej i hipoksantyny. Przygotowane wcześniej homogenaty rozcieńczono 100-krotnie i postępowano zgodnie z zaleceniami w teście. Zmierzono absorbancję przy długości fali 450 nm (Spark Multimode Microplate Reader, Tecan Trading AG, Szwajcaria). Aktywność SOD1 w próbkach określono na podstawie krzywej wzorcowej, sporządzonej przy użyciu oczyszczonego enzymu SOD1 z erytrocytów bydlęcych. Jednostkę aktywności SOD1 definiuje się jako ilość enzymu potrzebną do katalizy dysmutacji 50% dostępnych rodników ponadtlenkowych. Aktywność SOD1 wyrażono w U/ml, a następnie przeliczono na miligramy białka całkowitego obecnego w homogenatach i wyrażono jako U/mg białka.

7. Ocena aktywności katalazy w homogenatach tkankowych

Aktywność katalazy w homogenatach nerek oznaczono metodą spektrofotometryczną Aebi w świetle ultrafioletowym (UV) ⁵⁸. Próbkę homogenatów rozcieńczono 501-krotnie (10 μ l próbki zmieszano z 5 ml buforu fosforanowego i trzymano na lodzie). Bufor

sodowo-potasowy (50 mM, pH 7,4) przygotowano przez rozpuszczenie 6,81 g KH_2PO_4 (nr kat. 117420202, Chempur, Polska) i 8,90 g Na_2HPO_4 (nr kat. 117992801, Chempur, Polska) w 1000 ml wody destylowanej. Roztwory mieszano w proporcji 1: 1,5 (objętości). Do kuwety kwarcowej, zawierającej 1000 μl rozcieńczonego homogenatu nerki, dodano 500 μl 20 mM H_2O_2 w buforze fosforanowym i odczytano spadek absorbancji przy 240 nm przez 30 sekund w spektrofotometrze (UV-Vis Double Beam HALO DB-20 Spektrofotometr, Dynamica GmbH, Szwajcaria). Roztwór 20 mM H_2O_2 został świeżo przygotowany z 3% H_2O_2 (Galfarm, Polska) i standaryzowany przy użyciu molowego współczynnika ekstynkcji ($\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ przy 240 nm). Roztwór ten wykorzystano do określenia aktywności CAT. Wszystkie próbki oceniano w trzech powtórzeniach. Jedna jednostka CAT rozkłada 1,0 mikromola nadtlenu wodoru na tlen i wodę na minutę przy pH 7,0 i temperaturze 25 °C przy stężeniu substratu nadtlenu wodoru 20 mM.

8. Ocena stężenia glutationu w homogenatach tkankowych

Do pomiaru stężenia glutationu w nerkach szczurzych wykorzystano zestaw o nazwie Glutathione Assay Kit (nr kat. 703002, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Próbki rozcieńczono 100-krotnie. W wyniku reakcji między grupami sulfhydryłowymi GSH i odczynnikiem Ellmana (DTNB, kwas 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoesowy) powstaje żółty produkt, kwas 5-tio-2-nitrobenzoesowy (TNB). Absorbancję TNB zmierzono przy użyciu spektrofotometru (Spark Multimode Microplate Reader, Tecan Trading AG, Szwajcaria) przy długości fali 410 nm. Stężenie GSH wyrażono w $\mu\text{M}/\text{mg}$ białka.

9. Ocena stresu oksydacyjnego w izolowanych nerkach i w organoidach nerkowych

W celu dokonania oceny stresu oksydacyjnego w tkance nerkowej zmierzono całkowitą zawartość ROS/RNS w próbkach, używając testu OxiSelect™ in Vitro ROS/RNS Assay Kit (Cell Biolabs, San Diego, USA). W obecności ROS/RNS odczynnik

dichlorodihydrofluoresciny DiOxyQ zostaje utleniony do silnie fluorescencyjnej 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny. Odczytu fluorescencji dokonano przy fali długości 480 nm (wzbudzenie) i 530 nm (emisja) za pomocą czytnika mikroplątek (Spark Multimode, Tecan Trading AG, Szwajcaria). Odczytana fluorescencja była proporcjonalna do stężenia ROS/RNS, a wyniki zostały znormalizowane względem białka całkowitego i wyrażone w nM/ μ g białka.

10. Pomiar stężenia utlenionej formy LDL w tkance nerkowej

Ocenę stężenia utlenionej formy LDL w homogenatach nerek dokonano przy użyciu komercyjnego testu ELISA (numer kat. E0527r, Human OxLDL ELISA Kit, EIAab Science Inc., Wuhan, Chiny). Na płytkę wstępnie pokrytą przeciwciałem anti-oxLDL naniesiono próbki oraz przeciwciała specyficzne dla antygeny, skoniugowane z biotyną, a następnie dodano awidynę skoniugowaną z peroksydazą chrzanową. Kolejno do każdej studzienki dodano 3,3,5,5-tetrametylobenzydynę (TMB). Reakcję enzym-substrat zatrzymano poprzez dodanie roztworu kwasu siarkowego. Absorbancję uzyskanego produktu zmierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm (Spark Multimode Microplate Reader, Tecan Trading AG, Szwajcaria). Stężenie oxLDL wyrażono w ng/mg białka.

11. Ocena stężenia metaloproteinaz tkankowych MMP-2 i MMP-9 w izolowanej nerce

Stężenia MMP-2 i MMP-9 w homogenatach nerek zmierzono za pomocą ilościowego testu Quantikine ELISA dla całkowitej MMP-2 i szczyrzej całkowitej MMP-9 (Total MMP-2 Quantikine ELISA Kit, kat. MMP200; Rat Total MMP-9 Quantikine ELISA Kit, kat. RMP900 R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) zgodnie z instrukcjami producenta. Absorbancję zmierzono przy długości fali 450 nm przy pomocy spektrofotometru (Spark Multimode Microplate Reader, Tecan Trading AG, Szwajcaria). Stężenie MMP-2 i MMP-9 obliczono na podstawie krzywej wzorcowej i wyrażono w jednostce ng/mg białka.

12. Pomiar stężenia markerów uszkodzenia nerki: lipokalina związanej z żelatyną neutrofilii (ang. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*; NGAL) i KIM-1 w tkance nerkowej

Stężenia NGAL i KIM-1 w homogenatach nerek zmierzono za pomocą ilościowego testu ELISA dla NGAL i KIM-1 (NGAL numer kat. E1388r ; KIM-1 numer kat. E0785r, EIAab Science Inc., Wuhan, Chiny) zgodnie z instrukcjami producenta. Absorbancję zmierzono przy długości fali 450 nm przy pomocy spektrofotometru (Spark Multimode Microplate Reader, Tecan Trading AG, Szwajcaria). Stężenie NGAL i KIM-1 obliczono na podstawie krzywej wzorcowej i wyrażono w jednostce ng/mg białka.

13. Ocena całkowitego stężenia białka

Całkowite stężenie białka w materiale badanym (homogenaty tkankowe i supernatant komórkowy) oznaczono za pomocą metody Bradforda ⁵⁹ stosując odczynnik Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (kat. 5000006, Bio-Rad).

14. Izolacja mitochondriów

Do wyizolowania nienaruszonych mitochondriów z tkanki nerkowej wykorzystano zestaw Minute™ Mitochondria Isolation Kit for Muscle Tissues/Cultured Muscle Cells (kat. MM-038, Invent Biotechnologies, Plymouth, USA). Około 30 µg rozdrobnionej tkanki i kulek dysocjacyjnych umieszczono na powierzchni wkładu filtra. Następnie dodano gotowy bufor i roztarto powstałą pastę na filtrze. Kolejno przeprowadzono w sumie czterokrotne wirowanie w celu uzyskania osadu frakcji mitochondrialnej. Mitochondria rozpuszczono w 50 µl buforu do homogenizacji i zmierzono całkowite stężenie białka.

15. Określenie aktywności oksydazy cytochromu C i integralności błony zewnętrznej mitochondrii

Aktywność oksydazy cytochromu C i integralność zewnętrznej błony mitochondriów zmierzono w izolowanych mitochondriach za pomocą testu oksydazy cytochromu C (kat. CYTOCOX1, Sigma-Aldrich). Cytochrom C jest ditiotreiolem i jest utleniany przez oksydazę cytochromu c. Różnica współczynników ekstynkcji ($\Delta\epsilon_{mM}$) między zredukowanym i utlenionym cytochromem c wynosi 21,84 przy fali o długości 550 nm. Zredukowany ferrocycyochrom c jest utleniany w dwufazowej reakcji przez oksydazę cytochromu C z początkowym wybuchem aktywności. Absorbancję przy długości fali 550 nm zmierzono w reakcji kinetycznej po 5 sekundach i 60 sekundach reakcji. Aktywność oksydazy cytochromu C została wyrażona w jednostkach arbitralnych i znormalizowana względem białka całkowitego w próbce wyizolowanych mitochondriów – U/mg białka. Integralność zewnętrznej błony mitochondriów jest reprezentowana jako aktywność mitochondrialnej oksydazy cytochromu c w obecności i nieobecności detergentu n-dodecyl- β -D-maltozydu. Obliczono stosunek pomiarów próbek z dodatkiem detergentu i bez detergentu w celu wyrażenia integralności zewnętrznej błony mitochondrialnej. Integralność zewnętrznej błony mitochondrii wyrażono jako procent mitochondriów z nieuszkodzoną błoną zewnętrzną.

16. Pomiar stężenia kaspazy 3 i kaspazy 9 w homogenatach nerek

Stężenie kaspazy 3 i kaspazy 9 zmierzono w homogenatach nerkowych zgodnie z instrukcją producenta testu ELISA (Rat Caspase 3, kat. E1648Ra, zestaw CASP3 ELISA; Rat Caspase 9, kat. E1898Ra, zestaw CASP9 ELISA, BT Lab, Birmingham, Wielka Brytania). Zmierzono absorbancję proporcjonalną do stężenia kaspaz w próbce przy długości fali 450 nm przy użyciu spektrofotometru (Spark Multimode Microplate Reader, Tecan Trading AG, Szwajcaria). Uzyskane stężenie znormalizowano względem białka całkowitego w próbce i wyrażono w jednostce ng/mg białka.

17. Ocena stężenia całkowitego białka Akt i fosforyzowanej formy Akt (p-Akt)

Całkowitą zawartość Akt w homogenacie nerki określono za pomocą testu ELISA (kat. PEL-Akt-S473-T-2, RayBio® Human, Mouse and Rat Phospho-AKT (Ser473); Total AKT ELISA Kit), a stężenie fosforyzowanej formy Akt (Ser473) określono za pomocą Rat Phospho-AKT(S473) ELISA Kit (kat. E2452Ra, BT Lab), zgodnie z zaleceniami producentów testu. Stężenie fosfo-Akt zostało znormalizowane względem białka całkowitego w próbce. Następnie obliczono stosunek fosfo-Akt do całkowitego Akt, celem odzwierciedlenia stężenia aktywnej formy Akt.

18. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została przeprowadzona w programie GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California USA). Do oceny normalności rozkładu zastosowano test Shapiro-Wilka. W celu wykonania analizy zmiennych pomiędzy dwoma grupami zastosowano test t studenta (dla prób niezależnych o rozkładzie normalnym) lub test Mann-Whitney'a (dla prób niezależnych o rozkładzie nie spełniającym założeń rozkładu normalnego). Do porównania trzech grup badanych zastosowano test jednostronny ANOVA (dla prób niezależnych o rozkładzie normalnym) lub nieparametryczny odpowiednik – test Kruskala-Wallis'a (dla prób niezależnych niespełniających kryteriów rozkładu normalnego), a następnie wykonano test post hoc – dla testów parametrycznych wykonano test Tukey'a, natomiast w przypadku testów nieparametrycznych wykonano test Dunn'a w celu porównania pomiędzy grupami badanymi. Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,05$. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią \pm standardowy błąd pomiaru (ang. *standard error of measurement*, SEM).

X OMÓWIENIE WYNIKÓW PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSIEJ

Rozprawa doktorska składała się z cyklu trzech powiązanych tematycznie prac (dwie oryginalne i jedna pogładowa). Prace zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym posiadających Impact Factor i/lub punkty MEiN. Łączny współczynnik Impact Factor cyklu wynosi 10,300. Publikacje wchodzące w skład rozprawy dotyczą metod ochrony nerki w zespole metabolicznym i podczas transplantacji, z podkreśleniem potencjału terapii antyoksydacyjnej. Poniżej przedstawiono krótkie podsumowanie wyników zaprezentowanych w pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Omawiane publikacje umieszczono w formie załącznika 1.

Publikacja 1. Anna Radajewska, Anna Krzywonos-Zawadzka, Iwona Bil-Lula. *Recent Methods of Kidney Storage and Therapeutic Possibilities of Transplant Kidney.* Biomedicines. 2022 Apr 28;10(5):1013. doi: 10.3390/biomedicines10051013.

IF = 4.700, MEiN = 100 pkt

Każdego roku z powodu przewlekłej choroby nerek oraz schyłkowej niewydolności nerek umiera kilkaset tysięcy chorych. Transplantacja nerki jest jednym ze sposobów terapeutycznych, która w znaczący sposób poprawia komfort życia dializowanych pacjentów. Nerka pobrana od biorcy jest narażona na uszkodzenie związane z zatrzymaniem krążenia (niedokrwienie) i ponownym przywróceniem przepływu krwi (reperfuzja) w organizmie biorcy. Pobrany organ jest następnie przechowywany w warunkach hipotermicznych w celu zmniejszenia aktywności metabolicznej i ochrony nerki. Jednak długotrwałe utrzymywanie się niska temperatura jest czynnikiem uszkadzającym. W pracy przedstawiliśmy dotychczasowe osiągnięcia w zakresie ochrony nerki przed przeszczepieniem oraz rozwiązania terapeutyczne zaproponowane przez naukowców, mające zmniejszyć skutki IRI oraz zwiększenie puli dostępnych organów.

Na początku pracy krótko omówiono temat transplantacji nerek jako rozwiązania terapeutycznego. Przedstawiono opis rozwoju transplantologii nerek oraz wykorzystania perfuzji maszynowej do poprawy kondycji przechowywanych nerek.

Część główną rozpoczęto od opisanie dotychczas poznanych mechanizmów w patofizjologii uszkodzenia niedokrwiennego-reperfuzyjnego przechowywanego organu. Niedokrwienie związane z zatrzymaniem krążenia powoduje zmniejszenie ilości dostępnego tlenu i związków odżywczych, co prowadzi do zmian biochemicznych oraz indukuje śmierć komórek. W następstwie uruchomione oddychanie beztlenowe skutkuje zmniejszeniem

produkcji ATP i inaktywacją pompy sodowo-potasowej. W początkowej fazie dochodzi do inaktywacji SOD, która fizjologicznie wykazuje działanie antyoksydacyjne. Inaktywacja SOD prowadzi do wzrostu stężenia ROS, a dalej uszkodzenia mitochondriów i aktywacji szlaków śmierci komórkowej. Dochodzi do akumulacji produktów oddychania beztlenowego – kwasu mlekowego, który powoduje kwasicę komórkową. Dochodzi do zaburzeń jonowych, takich jak akumulacja jonów sodu i wody wewnątrz komórki i wzrost wewnątrzkomórkowego wapnia. Wapń może następnie aktywować proteazy, które dodatkowo uszkodzają nerkę i aktywują produkcję ROS. Następnie krótko opisano różne typy śmierci komórkowej: apoptozę, nekrozę i autofagię. Zarówno apoptoza, jak i nekroza mogą prowadzić do aktywacji mechanizmów zapalnych. Autofagia odgrywa ważną rolę w utrzymaniu życia komórek, jednak długi okres IRI może powodować, że autofagia będzie etapem śmierci komórki. Aktywacja mechanizmów zapalnych na etapie reperfuzji może prowadzić do odpowiedzi immunologicznej, poprzez wydzielanie chemoatraktantów i cytokin zapalnych. Aktywowane są mechanizmy swoistego i wrodzonego układu odpornościowego. Dochodzi do aktywacji genów kodujących prozapalne cytokiny, prezentacji antygenów przez komórki dendrytyczne i aktywacji komórek T układu odpornościowego, która może się odbywać poprzez związanie z antygenem, ale także poprzez aktywację ze strony ROS.

W kolejnym akapicie opisano zagadnienie rozszerzonych kryteriów przeszczepienia nerki. Dawniej grupę pośmiertnych dawców stanowili jedynie pacjenci DBD. Obecnie w wielu krajach dopuszcza się przeszczepienie organu DCD, a także organy od tak zwanych dawców o rozszerzonych kryteriach przeszczepienia, do których zalicza się dawców w wieku 50-60 lat, z nadciśnieniem tętniczym i stężeniem kreatyniny w surowicy powyżej 1,5 mg/dL. Pozwala to na zwiększenie liczby dostępnych organów do transplantacji, jednak niesie zwiększone ryzyko DGF. Ponadto organy od dawców DCD są związane z wydłużonym czasem ciepłego

niedokrwienia (który jest czynnikiem mogącym prowadzić do DGF), jednak są mniej narażone na wpływy składu hormonów i zapalenia niż nerki DBD.

W dalszej części pracy omówiono badania nad opracowaniem płynu prezerwacyjnego oraz porównano różne sposoby przechowywania nerki, zaczynając od statycznej hipotermii organu, po maszynową perfuzję w warunkach hipo-, subnormo- i normotermicznych. Początkowo celem badań z zakresu transplantologii było opracowanie odpowiedniego płynu prezerwacyjnego czy perfuzyjnego. W 1969 roku Collins i współpracownicy zaproponowali bufor, który umożliwiał przechowywanie nerki w hipotermii do 30 godzin. Po kilku latach dokonano modyfikacji i stworzono płyn o nazwie Euro-Collins. Kilka lat później, w 1980 roku, na Uniwersytecie w Wisconsin stworzono płyn o nazwie UW, który do dzisiaj jest wykorzystywany w transplantologii. Obecnie dostępnych jest wiele preparatów zarówno typu wewnątrzkomórkowego (o niskim stężeniu Na^+ i wysokim K^+) i zewnątrzkomórkowego, takich jak: Collins Solution, UW, HTK (roztwór histydyna-tryptofan-ketoglutaran), Celsior, HC-A (hipertoniczna adenina cytrynianowa) and IGL-1 (Instytut Georges Lopez-1). Preparaty są wzbogacone środkami zapobiegającymi obrzękowi komórki, antyoksydantami oraz substratami do produkcji ATP. Badania wykazały, że szybsze działanie, w doprowadzeniu organu do odpowiednio niskiej temperatury, miały preparaty UW i PS, natomiast HTK wykazywał się najmniejszą skutecznością. Porównano również preparaty wykorzystywane w perfuzji takie jak UW i Blezer czy MPS. Obecnie najczęściej wykorzystywanym płynem do perfuzji nerki jest KPS-1, który bazuje na znanym UW i zawiera między innymi syntetyczny koloid. Inne kryteria ustalono dla płynów wykorzystywanych do normotermicznej perfuzji maszynowej, gdzie niezbędne jest dostarczenie tlenu. Początkowo wykorzystywano preparat krwinek czerwonych i świeżo mrożone osocze. Jednak ze względu na ryzyko przenoszenia zakażeń oraz reakcji immunologicznej zaproponowano nowy preparat, który zawiera sztuczne

transportery tlenu, tzw. Hemopure (spolimeryzowany nośnik tlenu na bazie hemoglobiny bydlęcej, ang. *a polymerized bovine hemoglobin-based oxygen carrier*, HBOC).

Zimne statyczne przechowywanie organu ma najdłuższą historię i jest nadal stosowane, ze względu na niski koszt i nieskomplikowaną procedurę. Temperatura powinna być utrzymywana między 4 °C a 8 °C. Pozwala to na utrzymanie niskiej aktywności metabolicznej komórek i niskie zużycie ATP. Jednak technika ta często obciążona jest zbyt wolnym obniżaniem temperatury organu lub zbyt niską temperaturą, nawet poniżej 2 °C, co wpływa negatywnie na narząd. CS jest dobrym rozwiązaniem dla organów DBD i tych krótko przechowywanych. W przypadku nerek DCD wykazano znaczny wzrost ryzyka pierwotnej niewydolności nerki (ang. *primary non-function*, PNF) (9% vs. 1-2% przy dawcach DBD) oraz DGF (22–84% DCD i 7–25% DBD), kiedy nerki były przechowywane statycznie.

Perfuzja maszynowa została opracowana i opisana przez Carrel'a i Lindbergh'a w 1935 roku. Perfuzja pozawala na utrzymanie stałego przepływu płynu przez nerkę i dostarczenie do niej związków odżywczych oraz leków. Urządzenie do zimnej maszynowej perfuzji (ang. *hypothermic machine perfusion*, HMP), stosowane w praktyce klinicznej, składa się z komory z lodem i zakaniulowanym organem, pompy, czujników ciśnienia i przepływu oraz pułapki na pęcherzyki powietrza. Hipotermia umożliwia spowolnienie ważnych reakcji biochemicznych, przez co zmniejsza zapotrzebowanie energetyczne komórek. Obecnie znanych jest wiele maszyn do HMP w tym: LifePort® (Organ Recovery System, Itasca, Illinois) i Waters RM3® kidney perfusion system (Rochester, Minnesota). Pomimo wyższego kosztu związanego z użyciem HMP zauważalne są dodatkowe korzyści z wykorzystania urządzenia, w tym zmniejszenie przypadków DGF i PNF (szczególnie w przypadku nerek DCD), możliwość pobierania próbek i ich analizy w trakcie trwania perfuzji. Ponadto możliwe jest utrzymanie tumoru naczyń krwionośnych i zapobieganie kumulacji toksyn i metabolitów. Negatywnym skutkiem HMP mogą być zmiany cytoszkieletu komórkowego i utrata

fosfolipidów powierzchniowych. Przeanalizowana literatura nie wskazuje jednoznacznie czy pulsacyjna zimna maszynowa perfuzja (ang. *pulsatile cold machine perfusion*, PP) bardziej efektywnie chroni organ przed uszkodzeniem w stosunku do niepulsacyjnej metody HMP. Jednak PP wykazuje, bliższe fizjologicznemu, parametry przepływu płynu przez nerkę w sposób pulsacyjny. Metaanaliza wykazała, że w przypadku dawców pośmiertnych znacząco zmniejszyły się przypadki DGF, kiedy stosowano pulsacyjną zimną maszynową perfuzję w porównaniu do CS. Zmniejszyła się również częstość PNF, jednak jedynie w przypadku DBD. Jednak nie zauważono istotnej różnicy w zakresie stężenia kreatyniny lub klirensu kreatyniny po 3 miesiącach od przeszczepienia. Atutem zimnej maszynowej perfuzji jest możliwość wprowadzenia dodatkowego leczenia organu w trakcie perfuzji. Wykazano, że takie środki jak doksycyklina czy dehydrogenaza aldehydowa-2 mogą zmniejszyć negatywne skutki niedokrwienia, co widoczne było w badaniu stężenia markerów uszkodzenia m.in. NGAL i dehydrogenazy mleczanowej (ang. *lactate dehydrogenase*, LDH) oraz wskaźników nasilenia stresu oksydacyjnego i procesów zapalnych.

Kolejną odmianą maszynowej perfuzji jest subnormotermiczna perfuzja (SNMP), która bazuje na utrzymywaniu organu w temperaturze między 20 °C a 25 °C. Pozwala to na ograniczenie zmian strukturalnych organu w porównaniu do warunków hipotermicznych. Ponadto zmniejszone jest zużycie ATP i uszkodzenie mitochondriów w porównaniu do NMP. Dodatkową przewagą jest brak konieczności zapewnienia nośników tlenu, jak w przypadku NMP. Przeprowadzono badania z wykorzystaniem SNMP do stopniowego ogrzewania organu po zimnym statycznym przechowywaniu. Wykorzystanie SNMP przez 3 godziny zwiększyło klirens kreatyniny i mocznika oraz poprawiło kondycję mitochondriów. Jednak wykorzystanie perfuzji do powolnego zwiększenia temperatury do warunków normotermicznych prawdopodobnie wymaga użycia nośników tlenu. Zauważono wyższy GFR i zwiększoną resorpcję sodu (marker funkcji kanalików nerkowych), kiedy HBOC było wykorzystywane

jako płyn perfuzyjny, w porównaniu do perfuzji bez nośników tlenu. Jednak niektóre badania z wykorzystaniem SNMP wskazują na jej negatywne skutki lub brak efektu.

Normotermiczna perfuzja pozwala na wyeliminowanie lub zmniejszenie wpływu czasu zimnego niedokrwienia, który jest jednym z czynników ryzyka DGF. W trakcie perfuzji z wykorzystaniem preparatów zawierających nośniki tlenu, możliwe jest zachowanie odpowiedniej wymiany gazowej. Ponadto możliwa jest lepsza kontrola funkcji nerki, ponieważ warunki przechowywania przypominają warunki wewnątrz organizmu. Normotermia zapewnia prawidłowe dostarczenie leków do perfundowanego organu. Pierwsze badania kliniczne nad NMP wskazywały na bezpieczeństwo tej techniki i zmniejszenie odsetka przypadków DGF, kiedy NMP było prowadzone po CS przez godzinę przed zabiegiem transplantacji. Godzina perfuzji metodą NMP, po wcześniejszym statycznym przechowywaniu nerki, pozwoliła na uzyskanie fizjologicznego przepływu. Badania pilotażowe wykonane na ludzkich nerkach odrzuconych w procesie transplantacji wykazały, że NMP pozwoliło na przywrócenie prawidłowych parametrów funkcji nerek, prawidłowy wygląd, przepływ i produkcję moczu. Przeszczepione nerki zachowywały prawidłowe funkcje po okresie 3 miesięcy od zabiegu. Kolejne badania z programu *Eurotransplant Senior Program* wskazywały na bezpieczeństwo stosowania NMP i ponownie mniejszy odsetek DGF. Obecnie prowadzone są intensywne badania nad lepszymi technikami obrazowania do oceny funkcjonowania perfundowanego organu oraz nad bezpieczeństwem użycia NMP.

Na podstawie przeglądu literatury wskazano kierunki badań z wykorzystaniem NMP. Przeszczepienie organu wiąże się z dożywotnim podawaniem leków immunosupresyjnych biorcy, które jest obciążające i niesie ryzyko wielu powikłań. Jednym z badanych trendów w transplantologii jest wykorzystanie dojrzałych, multipotentnych komórek progenitorowych (ang. *multipotent adult progenitor cells*, MAPC) oraz mezenchymalnych komórek zrębu (ang. *mesenchymal stromal cells*, MSC), które wykazują działanie przeciwzapalne

i immunomodulujące. Podanie MAPC lub MSC w trakcie perfuzji NMP może przynieść pozytywny efekt po przeszczepieniu, taki jak zmniejszenie produkcji cytokin prozapalnych i wzrost cytokin przeciwzapalnych. Jednak badania wskazują, że podane MSC kumulują się w świetle naczyń włosowatych kłębuszków nerkowych. Kolejną proponowaną terapią z wykorzystaniem NMP jest dodanie do płynu perfuzyjnego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących np. z komórek macierzystych (ang. *extracellular vesicles*, EV). Wcześniejsze badania wykazały pozytywny efekt podania EV w modelach AKI i CKD. EV zawierają w swoim wnętrzu liczne lipidy, białka, mRNA i microRNA i mogą służyć także jako nowe biomarkery uszkodzenia i funkcji nerki, dzięki analizie mikropęcherzyków pochodzenia nerkowego. Badania nad podaniem EV w trakcie perfuzji były prowadzone w warunkach hipotermicznych i wykazały pozytywny efekt na kondycję nerki. Spekulujemy, że warunki normotermiczne mogłyby przynieść lepsze rezultaty i na pewno jest to kierunek warty zbadania. Normotermiczna perfuzja maszynowa była wykorzystywana do badania skuteczności terapii molekularnych. Małe cząsteczki oligonukleotydów z powodzeniem mogą być podawane w połączeniu z NMP, bez konieczności użycia wektorów, ze względu na zbliżone do fizjologicznych warunki, w których pobierany jest lek.

Podsumowując, praca stanowi przegląd literatury na temat obecnie dostępnych metod przechowywania nerki w procesie transplantacji i najnowsze doniesienia w obszarze prowadzonych badań nad ulepszeniem procesu przechowywania i perfuzji narządu. Przedstawiono także interesujące doniesienia na temat terapii z wykorzystaniem znanych leków, antyoksydantów, terapii komórkowej oraz molekularnej. Dodatkowo przedstawiono prawdopodobne kierunki rozwoju i wykorzystania różnych technik maszynowej perfuzji, w zależności od przypadku medycznego.

Publikacja 2. Anna Radajewska, Jakub Szyller, Joanna Niewiadomska, Agnieszka Noszczyk-Nowak, Iwona Bil-Lula. *Punica granatum L. Polyphenolic Extract as an Antioxidant to Prevent Kidney Injury in Metabolic Syndrome Rats.* Oxid Med Cell Longev. 2023 Jan 5; 2023:6144967. doi: 10.1155/2023/6144967.

MEiN = 20 pkt

Nadwaga i związane z nią zaburzenia metaboliczne są uznawane za chorobę cywilizacyjną dwudziestego pierwszego wieku. MetS, nazywany również zespołem insulinooporności, jest czynnikiem ryzyka wielu chorób, w tym AKI i CDK. W przebiegu MetS zauważa się zwiększoną ilość FFAs, które następnie poddawane są estryfikacji do triglicerydów i wydzieleniu przez wątrobę w postaci lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (ang. *very low-density lipoproteins* VLDL). Ponadto MetS wiąże się ze zwiększoną produkcją ROS, które utleniają LDL, powodują uszkodzenia śródbłonna, agregację płytek i aktywację czynników prozapalnych. Może to wpływać na uszkodzenie organów, w tym nerek. MetS jest uznawany jako predyktor wczesnej dysfunkcji nerek. Związki o właściwościach antyoksydacyjnych zmniejszają stężenie ROS i mogą przyczynić się do ochrony nerek w przebiegu MetS. Z tego względu postanowiłam zbadać wpływ polifenolowego ekstraktu ze skórek granatu, który zawiera związki o potencjale antyoksydacyjnym, na uszkodzenie nerki w przebiegu MetS.

W badaniach wykorzystano szczurzy model zespołu metabolicznego, którym przez 8 tygodni podawano ekstrakt ze skórek granatu. Dorosłe szczury płci męskiej Zucker Diabetic Fatty posiadają mutację zmiany sensu w genie receptora leptyny (ZDF fa/fa). Grupę kontrolną stanowiły osobniki z mutacją (ZDF fa/fa), którym podawano czystą wodę bez ekstraktu. Grupy badane stanowiły osobniki z mutacją (ZDF fa/fa), którym podawano ekstrakt w stężeniu odpowiednio 100 lub 200 mg/kg masy ciała. Grupę zdrowych osobników stanowiły szczury bez mutacji w genie receptora leptyny (ZDF fa/+), które otrzymywały ekstrakt w tych samych

stężeniach tj. 100 lub 200 mg/kg masy ciała. Następnie pobrano pośmiertnie nerki i poddano je analizom.

W pracy wykazano istotny wpływ MetS na uszkodzenie nerek i stopień nasilenia stresu oksydacyjnego w tym organie. Ponadto zauważono pozytywne działanie polifenolowego ekstraktu ze skórek granatu na redukcję stresu oksydacyjnego i aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Aktywność SOD była mniejsza w grupie badanej, której podawano ekstrakt i najniższa w grupie zdrowych osobników pojęnych ekstraktem. Ponadto niska dawka ekstraktu (100 mg/kg masy ciała) spowodowała znaczną redukcję stężenia reaktywnych form tlenu i azotu w tkance. Wysoka dawka powodowała znacząco wyższe wartości ROS/RNS, co może być spowodowane prooksydacyjnym działaniem wysokich stężeń ekstraktu. Udowodniono, że aktywność CAT jest wyższa u osobników leczonych ekstraktem w porównaniu do grupy nieleczonych osobników MetS. Nie wykazano zmiany w stężeniu GSH (pomiędzy grupą MetS a grupą MetS + ekstrakt). Jednak osobniki z mutacją, którym podawano ekstrakt wykazywały wyższe stężenie GSH niż zdrowe osobniki pojęne ekstraktem. Stężenie KIM-1, które jest markerem uszkodzenia nerek, było znacznie niższe w przypadku zdrowych osobników w porównaniu do grupy badanej MetS + ekstrakt. Wskazuje to na istotny wpływ zespołu metabolicznego w procesie uszkodzenia nerek. Zauważono niższe stężenie KIM-1 w grupie MetS + ekstrakt w porównaniu do nieleczonych MetS, jednak różnica nie była istotna statystycznie. Stężenie utlenionej formy LDL (oxLDL) było znacząco wyższe u osobników MetS + ekstrakt w porównaniu do zdrowych osobników (HC + ekstrakt). Ponadto wysokie stężenie ekstraktu spowodowało istotny wpływ na stężenie oxLDL u chorych osobników (grupy MetS). Może to mieć znaczenie w procesie powstawania komórek piankowatych i blaszki miażdżycowej, a w konsekwencji w uszkodzeniu kłębuszków nerkowych. Oceniono także wpływ ekstraktu na stężenie metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMP-2 i MMP-9), które mają wpływ na progresję choroby nerek i ich włóknienie. Nasze badanie wskazało

znacząco wyższe stężenie MMP-2 w tkance nerkowej szczurów MetS + 200 mg/kg m.c. w porównaniu do zdrowych odpowiedników (HC + 200 mg/kg m.c.). Może to być sygnał ostrzegawczy progresji zmian u szczurów z zespołem metabolicznym, jednak wymaga to poszerzenia badań.

Podsumowując, badania zaprezentowane w niniejszej publikacji wskazują, że zespół metaboliczny może wpływać na zwiększony stres oksydacyjny w tkance nerkowej, a w konsekwencji uszkodzenie nerek. Wykazaliśmy, że ekstrakt z *Punica granatum L.* może mieć działanie antyoksydacyjne i prooksydacyjne, w zależności od stężenia. Przyjmowanie ekstraktu ze skórek granatu może obniżać stężenie wolnych rodników i modyfikować wewnętrzny system enzymów antyoksydacyjnych. Sugerujemy, że *Punica granatum L.* może być wykorzystywany jako potencjalny środek leczniczy w przebiegu zespołu metabolicznego, w kontekście ochrony nerek przed AKI i progresji choroby.

Publikacja 3. Anna Radajewska, Jakub Szyller, Agnieszka Olejnik, Anna Krzywonos-Zawadzka, Grzegorz Sawicki, Iwona Bil-Lula. *Mitoquinone Alleviates Donation after Cardiac Death Kidney Injury during Hypothermic Machine Perfusion in Rat Model*; Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 14772. <https://doi.org/10.3390/ijms241914772>.

IF = 5.600, MEiN = 140 pkt.

Schyłkowa niewydolność nerek jest finalnym etapem progresji przewlekłej choroby nerek i wymaga natychmiastowej interwencji medycznej. Pacjenci cierpiący na ESRD są poddawani leczeniu nerkozastępczemu, dializoterapii lub transplantacji nerki, która ze względu na poprawę jakości życia pacjentów oraz zmniejszoną śmiertelność w porównaniu do długoletnich dializ, jest uznawana za preferowaną metodę leczenia. W wielu krajach dozwolona jest obecnie transplantacja nerek od dawców DCD oraz ECD, co pozwala na zwiększenie puli dostępnych organów, jednak wykazano, że nerki od dawców DCD są bardziej narażone na skutki IRI oraz w konsekwencji PNF oraz DGF. IRI rozpoczyna się w momencie zatrzymania przepływu krwi w transplantowanej nerce, czyli WIT. CIT rozpoczyna się umieszczeniem organu w zimnym buforze do prezerwacji nerki. Reperfuzja, czyli ponowne przywrócenie krążenia w nerce przeszczepionej do organizmu biorcy, wiąże się z postępowaniem uszkodzenia nerki, czego częściową przyczyną jest produkcja zwiększonej ilości ROS. Obecnie nerki DCD są poddawane HMP, co pozwala na eliminację toksycznych metabolitów oraz umożliwia wprowadzenie dodatkowej terapii w trakcie trwania perfuzji. Stres oksydacyjny jest uznawany za ważny czynnik uszkadzający w przebiegu transplantacji. Stres oksydacyjny powoduje fragmentację DNA oraz uwolnienie cytochromu C do cytoplazmy, co aktywuje apoptozę. Wykazano, że niski poziom stresu oksydacyjnego i apoptozy koreluje

z lepszym funkcjonowaniem przeszczepu nerki. W celu zmniejszenia stresu oksydacyjnego podczas HMP wykorzystaliśmy lek MitoQ, silny antyoksydant działający bezpośrednio na mitochondria – główne źródło ROS. MitoQ ma postać lipofilowego kationu, który przenika przez podwójną błonę mitochondriów, a zawarte w jego strukturze ugrupowanie ubichinonowe jest aktywowane do ubichinolu przez kompleks II, który redukuje ROS i wraca do postaci zredukowanej, wykazując wysoką aktywność antyoksydacyjną.

W omawianej publikacji numer 3 wykorzystano szczurzy model badawczy (szczury rasy Wistar, płci męskiej). Nerki zostały pobrane pośmiertnie, przepłukane i perfundowane buforem Krebsa z dodatkiem albuminy przez 22 godziny. Płyn perfuzyjny został wzbogacony w MitoQ, w przypadku grupy badanej z lekiem. Szczury zostały randomowo zaklasyfikowane do jednej z trzech grup: nerki DBD, nerki DCD i nerki DCD z dodatkiem MitoQ. Nerki DBD zostały pobrane i zakaniulowane w najkrótszym możliwym czasie po ustaniu krążenia (poniżej 10 min), gdzie tak jak w przypadku dawców DBD czas ciepłego niedokrwienia jest bardzo krótki. Nerki DCD pobrano i zakaniulowano, a następnie utrzymywano w kontrolowanej temperaturze 37 °C przez 30 minut, w celu odwzorowania dawców po śmierci spowodowanej ustaniem krążenia, z odpowiednio wydłużonym WIT. Nerki zostały podłączone do systemu perfuzyjnego i perfundowane przez 22 godziny w warunkach hipotermii (4 °C), a po upływie tego czasu, natychmiast umieszczone w ciekłym azocie i przechowywane w -80 °C do dalszych analiz. Z pobranej tkanki przygotowano homogenaty tkankowe i przeprowadzono oznaczenia, takie jak całkowite stężenie białka, stężenie KIM-1, ROS/RNS, kaspazy 3 i 9, stężenie p-Akt i Akt. Następnie z części zamrożonej tkanki wyizolowano mitochondria i przetestowano aktywność oksydazy cytochromu C oraz określono procent mitochondriów z nieuszkodzoną błoną komórkową, co określono mianem integralności mitochondriów.

Wykazano ochronne działanie MitoQ na nerki DCD poddane zimnej, maszynowej perfuzji. Nerki DCD wykazywały zwiększone stężenie markerów uszkodzenia (KIM-1), stresu

oksydacyjnego (ROS/RNS) i apoptozy (kaspaza 3 i kaspaza 9) w porównaniu z nerkami DBD. Dodatek MitoQ zmniejszył stężenie wymienionych parametrów do poziomu wykazanego w homogenatach tkankowych nerek DBD. Ponadto zbadane stężenie aktywnej formy Akt oraz stosunku formy aktywnej do całkowitego stężenia Akt był znacząco wyższy w nerkach DCD w porównaniu do DBD, a MitoQ obniżył ten stosunek. Wykazano, że Akt działa hamująco na aktywność kaspazy 9 i 3, wykazuje więc działanie promujące przeżycie komórki, może być również powiązane z progresją choroby i rozwojem zwłóknienia w CKD. W naszym badaniu nie potwierdziliśmy znaczących różnic w aktywności oksydazy cytochromu C oraz integralności mitochondriów pomiędzy badanymi grupami.

Podsumowując wykazano, że wydłużony czas ciepłego niedokrwienia wpływa negatywnie na nerkę, promując uszkodzenie perfundowanej nerki przed procesem transplantacji. Ponadto MitoQ jest dobrym kandydatem do poprawy kondycji nerek DCD poddanych zimnej maszynowej perfuzji.

XI PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Stres oksydacyjny jest ważnym czynnikiem uszkadzającym w przebiegu chorób nerek. Obserwowane jest zwiększone stężenie oksydantów i zmieniona aktywność enzymów antyoksydacyjnych w przebiegu zespołu metabolicznego. Ponadto nasilony stres oksydacyjny występuje w przypadku nerek pobranych od dawców DCD. Dlatego poszukiwanie nowych form terapii jest niezwykle ważne zarówno w kontekście prewencji rozwoju chorób nerek, jak i zmniejszenia powikłań związanych z przeszczepieniem nerki.

W niniejszej rozprawie doktorskiej zaprezentowano wyniki badań potwierdzające tezę, że stres oksydacyjny jest istotnym czynnikiem uszkadzającym nerki w przebiegu zespołu metabolicznego i w procesie transplantacji nerki. Ponadto, zastosowanie związków o potencjale antyoksydacyjnym pozwala na zmniejszenie stresu oksydacyjnego i uszkodzenia. Zespół metaboliczny jest rosnącym problemem w krajach rozwiniętych i jest związany z siedzącym trybem życia, połączonym z konsumpcją wysoko kalorycznych posiłków, z niską zawartością błonnika. Ponadto MetS przyczynia się do rozwoju chorób stanowiących poważne zagrożenie dla życia, takich jak: choroby sercowo-naczyniowe, udar mózgu i uszkodzenie nerek. Przedstawione w rozprawie badania potwierdziły, że w przebiegu MetS dochodzi do zmian w obrębie układu antyoksydacyjnego i wzrostu stężenia reaktywnych form tlenu i azotu, co może przyczynić się do uszkodzenia nerek i rozwoju AKI oraz CKD. Dalszym powikłaniem CKD może być konieczność wprowadzania terapii nerkozastępczej w schyłkowej fazie niewydolności nerek. Jednocześnie, badanie wskazuje na ochronne działanie niskiego stężenia wyciągu ze skórki granatu, bogatego w polifenole, ze względu na właściwości antyoksydacyjne.

Drugim aspektem rozprawy był stres oksydacyjny w uszkodzeniu niedokrwiennie-reperfuzyjnym w przebiegu transplantacji nerek. Przedstawiono obecnie stosowane techniki przechowywania nerki w procesie transplantacji i ich ograniczenia. Pomimo rozwoju

transplantologii i szerokiej gamy komercyjnych płynów prezerwacyjnych i perfuzyjnych, nadal istotne jest udoskonalenie sposobu przechowywania nerki narażonej na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne. Jednym z komponentów uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego jest nasilony stres oksydacyjny, szczególnie w fazie reperfuzji. Opisane w rozprawie badania wskazują na zwiększony poziom ROS i RNS w perfundowanych nerkach od dawców DCD w porównaniu do nerek DBD. Dodatkowo wykazano, że nerki DCD są bardziej narażone na zwiększoną aktywację apoptozy i w konsekwencji uszkodzenie. Prezentowane wyniki potwierdzają skuteczne działanie leku antyoksydacyjnego, Mitoquinone, dodawanego do płynu perfuzyjnego w grupie nerek DCD. MitoQ obniżył stężenie reaktywnych form tlenu i azotu, kaspazy 3 i 9 – enzymów biorących udział w apoptozie komórki, oraz markerów uszkodzenia nerki i białka Akt.

Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

- zwiększona aktywność oksydacyjna komórek nerki wpływa na pogorszenie stanu narządu w przebiegu zespołu metabolicznego i w nerkach pobranych do transplantacji,
- zastosowanie związków antyoksydacyjnych w postaci naturalnych związków (wyciąg ze skórki granatu) oraz syntetycznych środków farmakologicznych (MitoQ) wiąże się z redukcją nasilonego stresu oksydacyjnego i działaniem nefroprotekcijnym.

XII WYKAZ SKRÓTÓW I DEFINICJI

Skrót	Definicja
•OH	rodnik hydroksylowy
AKD	(ang. acute kidney disease), ostra choroba nerek
AKI	(ang. acute kidney injury), ostre uszkodzenie nerek
ALP	fosfataza alkaliczna
ALT	aminotransferaza alaninowa
AST	aminotransferaza asparaginianowa
ATG	globulina antytymocytowa
ATP	(ang. adenosine triphosphate), trójfosforanu adenozyne
BUN	(ang. blood urea nitrogen), azot mocznika
Ca ²⁺	jony wapnia
CAT	(ang. catalase), katalaza
CIT	(ang. cold ischemia time), czas zimnego niedokrwienia
CKD	(ang. chronic kidney disease), przewlekła choroba nerek
COX	cyklooksygenaza
CS	(ang. cold static storage), zimne statyczne przechowywanie organu
DBD	(ang. donor after brainstem death), dawcy po śmierci mózgowej
DCD	(ang. donor after circulatory death), dawcy po zatrzymaniu krążenia
DGF	(ang. delayed graft function), opóźnione podjęcie funkcji przeszczepu
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
DTNB	kwask 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoesowy
ECD	(ang. expanded Criteria Donor), dawcy o rozszerzonych kryteriach

eGFR	(ang. estimated glomerular filtration rate), szacowany współczynnik filtracji kłębuszkowej
ER	(ang. endoplasmic reticulum), retikulum endoplazmatyczne
ESRD	(ang. end-stage renal disease, ESRD), schyłkowa niewydolność nerek
ESI	elektrozpylanie
EV	(ang. extracellular vesicles), pęcherzyki zewnątrzkomórkowe
FFAs	(ang. free fatty acids), wolne kwasy tłuszczowe
GFR	(ang. glomerular filtration rate), współczynnik filtracji kłębuszkowej
GPX	(ang. glutathion peroxidase), peroksydaza glutationowa
GR	(ang. glutathione reductase), reduktaza glutationowa
GSH	(ang. glutathione), glutation
GST	(ang. glutathione-S-transferase), S-transferaza glutationowa
H ₂ O ₂	nadtlenek wodoru
HBOC	(ang. polymerized bovine hemoglobin-based oxygen carriers), polimeryzowany nośnik tlenu na bazie hemoglobiny bydlęcej
HC	(ang. healthy control), zdrowa kontrola
HDL	(ang. high density lipoprotein), lipoproteina o wysokiej gęstości
HIV	(ang. human immunodeficiency virus), ludzki wirus niedoboru odporności
HKT	płyn perfuzyjny, roztwór histydyny-tryptofanu-ketoglutaranu
HMP	(ang. hypothermic machine perfusion), zimna maszynowa perfuzja
HOCl-	kwask podchlorawy
hs-CRP	(ang. high-sensitivity C-reactive protein), wysokoczułe białko C-reaktywne
IGL-1	płyn perfuzyjny z organizacji Instytut Georges Lopez-1
IL-6	interleukina 6

iPSC	(ang. induced pluripotent stem cell) indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste
IRI	(ang. ischemia/reperfusion injury), uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne
KDIGO	(ang. Kidney Disease: Improving Global Outcomes), Choroby nerek: poprawa globalnych wyników
KH ₂ PO ₄	diwodorofosforan potasu
KIM-1	(ang. kidney injury molecule 1), cząsteczka uszkodzenia nerek 1
KPS-1	(ang. Kidney Perfusion Solution 1), płyn do perfuzji nerki 1
LDH	(ang. lactate dehydrogenase), dehydrogenaza melczanowa
LDL	(ang. low-density lipoproteins), lipoproteiny o małej gęstości
LOX	lipooksygenaza
MAPC	(ang. multipotent adult progenitor cells), multipotentne dorosłe komórki progenitorowe
MDA	malondialdehyd
MetS	(ang. metabolic syndrom), zespół metaboliczny
microRNA	(ang. micro ribonucleic acid), małe cząsteczki kwasu rybonukleinowego
MitoQ	mesylan mitochinonu
MMP-2	(ang. matrix metalloproteinase 2), metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 2
MMP-9	(ang. matrix metalloproteinase 9), metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 9
mRNA	(ang. messenger ribonucleic acid), matrycowy kwas rybonukleinowy
MSC	(ang. mesenchymal stromal cells), mezenchymalne komórki zrębu
mtDNA	mitochondrialne DNA
Na ₂ HPO ₄	wodorofosforan sodu
NGAL	(ang. neutrophil gelatinase-associated lipocalin), lipokalina związanej z żelatynazą neutrofilów

NMP	(ang. normothermic machine perfusion), normotermiczna perfuzja maszynowa
NO•	tlenek azotu
O ₂ • ⁻	anionorodnik ponadtlenkowy
ONOO-	nadtlenoazotyn
oxLDL	utlenione formy lipoprotein o małej gęstości
PNF	(ang. primary non-function), pierwotna niewydolność przeszczepu
PP	(ang. pulsatile cold machine perfusion), pulsacyjna zimna maszynowa perfuzja
QTOF-MS	kwadrupolowa spektrometria masowa czasu przelotu
ROS	(ang. reactive oxygen species), reaktywne formy tlenu
ROS/RNS	(ang. reactive oxygen/nitrogen species), reaktywne formy tlenu i azotu
SEM	(ang. standard error of measurement), standardowy błąd pomiaru
SNMP	(ang. subnormothermic machine perfusion), subnormotermiczna perfuzja maszynowa
SOD	(ang. manganese superoxide dismutase), dysmutaza ponadtlenkowa manganu
SOD1	dysmutaza miedziowo-cynkowa
TAC	(ang. serum total anti-oxidant capacities), całkowita zdolność przeciwutleniająca
TGF-β	transformujący czynnik wzrostu beta
TMB	3,3,5,5-tetrametylobenzodyna
TNB	kwask 5-tio-2-nitrobenzoesowy
TNF-α	(ang. tumor necrosis factor), czynnik martwicy nowotworów alfa
TOS	(ang. total oxidative status), całkowity status oksydacyjny
TPP	kation trifenylofosfoniowy
UPLC	(ang. Ultra-Performance Liquid Chromatography), ultrasprawa chromatografia cieczowa
UV	światło ultrafioletowe
UW	płyn prezerwacyjny University of Wisconsin

VLDL	(ang. very low-density lipoproteins), lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości
WIT	(ang. warm ischemia time), czas ciepłego niedokrwienia
WSG	wyciąg ze skórki granatu
ZDF	szczury rasy Zucker Diabetic Fatty z mutacją zmiany sensu w receptorze leptyny

XIII PIŚMIENNICTWO

1. Ronco, C. & et al. Acute kidney injury. *The Lancet* **394**, 1949–1964 (2019).
2. Kellum, J. A. *et al.* Acute kidney injury. *Nat. Rev. Dis. Primer* **7**, 1–17 (2021).
3. Zuk, A. & Bonventre, J. V. Acute Kidney Injury. *Annu. Rev. Med.* **67:1**, 293–307 (2016).
4. Basile, D. P. *et al.* Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **281**, F887–F899 (2001).
5. Molitoris, B. A. Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis. *J. Clin. Invest.* **124**, 2355–2363 (2014).
6. Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 89–102 (2012).
7. Pallet, N. *et al.* Endoplasmic reticulum stress: an unrecognized actor in solid organ transplantation. *Transplantation* **88**, 605 (2009).
8. Li, Z. *et al.* The pathological role of damaged organelles in renal tubular epithelial cells in the progression of acute kidney injury. *Cell Death Discov.* **8**, 1–12 (2022).
9. Kalantar-Zadeh, K. *et al.* Chronic kidney disease. *The Lancet* **398**, 786–802 (2021).
10. Abdul Wahab, R. *et al.* Recent advances in the treatment of patients with obesity and chronic kidney disease. *Ann. Med.* **55**, 2203517 (2023).
11. Romagnani, P. *et al.* Chronic kidney disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* **3**, 1–24 (2017).
12. Chawla, L. S. & Kimmel, P. L. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney Int.* **82**, 516–524 (2012).
13. Wahba, I. M. & Mak, R. H. Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2**, 550 (2007).
14. Saulnier, P.-J. & Bjornstad, P. Renal hemodynamic changes in patients with type 2 diabetes and their clinical impact. *Presse Médicale* **52**, 104175 (2023).

15. Zhang, X. & Lerman, L. O. Obesity and renovascular disease. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **309**, F273–F279 (2015).
16. Yang, M. *et al.* Complications of Progression of CKD. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **18**, 400–405 (2011).
17. Himmelfarb, J. *et al.* The current and future landscape of dialysis. *Nat. Rev. Nephrol.* **16**, 573–585 (2020).
18. Cierpka, L. D. Transplantacja nerki. in *Transplantacje narządowe: podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy w trakcie specjalizacji* (ed. Cierpka Lech Daniel) Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach 50–53 (2011).
19. Chadban, S. J. *et al.* KDIGO Clinical practice guideline on the evaluation and management of candidates for kidney transplantation. *Transplantation* **104**, S11 (2020).
20. Neuwirt, H. *et al.* Immunosuppression after renal transplantation. *Memo - Mag. Eur. Med. Oncol.* **12**, 216–221 (2019).
21. Kosieradzki, M. & Rowiński, W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant. Proc.* **40**, 3279–3288 (2008).
22. Hosgood, S. A. *et al.* Advances in kidney preservation techniques and their application in clinical practice. *Transplantation* **105**, e202 (2021).
23. Deng, R. *et al.* Machine perfusion versus cold storage of kidneys derived from donation after cardiac death: a meta-analysis. *PLOS ONE* **8**, e56368 (2013).
24. Filiopoulos, V. & Boletis, J. N. Renal transplantation with expanded criteria donors: Which is the optimal immunosuppression? *World J. Transplant.* **6**, 103–114 (2016).
25. Demirci-Çekiç, S. *et al.* Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **209**, 114477 (2022).
26. Forman, H. J. & Zhang, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 689–709 (2021).

27. Liguori, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging* **13**, 757–772 (2018).
28. Li, S. *et al.* Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. *Food Sci. Hum. Wellness* **3**, 110–116 (2014).
29. Salvadori, M. *et al.* Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J. Transplant.* **5**, 52–67 (2015).
30. Chen, C.-C. *et al.* Ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation. *Front. Biosci.* **7**, 134–154 (2015).
31. Dobrowolski, P. *et al.* Zespół metaboliczny – nowa definicja i postępowanie w praktyce. Stanowisko PTNT, PTLO, PTL, PTH, PTMR, PTMSŻ, Sekcji Prewencji i Epidemiologii PTK, „Klubu 30” PTK oraz Sekcji Chirurgii Metabolicznej i Bariatrycznej TChP. *Lek. POZ* **8**, (2022).
32. Roberts, C. K. & Sindhu, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.* **84**, 705–712 (2009).
33. Hirode, G. & Wong, R. J. Trends in the prevalence of metabolic syndrome in the United States, 2011-2016. *JAMA* **323**, 2526–2528 (2020).
34. Chen, S.-J. *et al.* Relationships between inflammation, adiponectin, and oxidative stress in metabolic syndrome. *PLOS ONE* **7**, e45693 (2012).
35. Vona, R. *et al.* Biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome and associated diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, e8267234 (2019).
36. Duann, P. & Lin, P.-H. Mitochondria damage and kidney disease. in *Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Medicine* (ed. Santulli, G.) 529–551 (Springer International Publishing, Cham, 2017).

37. Eirin, A. *et al.* The emerging role of mitochondrial targeting in kidney disease. in *Pharmacology of Mitochondria* (eds. Singh, H. & Sheu, S.-S.) 229–250 (Springer International Publishing, Cham, 2017).
38. Williamson, J. *et al.* The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ, attenuates exercise-induced mitochondrial DNA damage. *Redox Biol.* **36**, 101673 (2020).
39. Lobb, I. *et al.* Hydrogen sulfide protects renal grafts against prolonged cold ischemia–reperfusion injury via specific mitochondrial actions. *Am. J. Transplant.* **17**, 341–352 (2017).
40. PubChem. Mitoquinone. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11388332>. Dostęp: 27.03.2024 r.
41. Smith, R. A. J. *et al.* Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5407–5412 (2003).
42. James, A. M. *et al.* Interaction of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ with phospholipid bilayers and ubiquinone oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* **282**, 14708–14718 (2007).
43. Supinski, G. S. *et al.* Mitoquinone mesylate (MitoQ) prevents sepsis-induced diaphragm dysfunction. *J. Appl. Physiol.* **131**, 778–787 (2021).
44. Gottwald, E. M. *et al.* The targeted anti-oxidant MitoQ causes mitochondrial swelling and depolarization in kidney tissue. *Physiol. Rep.* **6**, e13667 (2018).
45. Chatauret, N. *et al.* Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury. *Prog. En Urol.* **24**, S4–S12 (2014).
46. Dare, A. J. *et al.* Protection against renal ischemia–reperfusion injury in vivo by the mitochondria targeted antioxidant MitoQ. *Redox Biol.* **5**, 163–168 (2015).
47. Parajuli, N. *et al.* MitoQ blunts mitochondrial and renal damage during cold preservation of porcine kidneys. *PLoS ONE* **7**, e48590 (2012).

48. Hamed, M. *et al.* Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates ischaemia–reperfusion injury in kidney transplantation models. *Br. J. Surg.* **108**, 1072–1081 (2021).
49. Singh, B. *et al.* Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. *Food Chem.* **261**, 75–86 (2018).
50. Cerdá, B. *et al.* Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur. J. Nutr.* **42**, 18–28 (2003).
51. PubChem. Punicalagin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44584733>. Dostęp: 27.03.2024 r.
52. S., S., K., S. & James, J. A novel chalcone derivative from *Punica granatum* peel inhibits LOX/COX enzyme activity. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **7**, 593–597 (2018).
53. El Bohi, K. M. *et al.* The efficiency of pomegranate (*Punica granatum*) peel ethanolic extract in attenuating the vancomycin-triggered liver and kidney tissues injury in rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **28**, 7134–7150 (2021).
54. Patel, I. B. *et al.* *Punica granatum* peel extract ameliorates doxorubicin induced cardiotoxicity. *Anal. Chem. Lett.* **9**, 835–844 (2019).
55. Niewiadomska, J. *et al.* *Punica granatum* L. extract shows cardioprotective effects measured by oxidative stress markers and biomarkers of heart failure in an animal model of metabolic syndrome. *Antioxidants* **12**, 1152 (2023).
56. Karwasra, R. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory potential of pomegranate rind extract to ameliorate cisplatin-induced acute kidney injury. *Food Funct.* **7**, 3091–3101 (2016).
57. Althunibat, O. Y. *et al.* Protective role of *Punica granatum* L. peel extract against oxidative damage in experimental diabetic rats. *Process Biochem.* **45**, 581–585 (2010).
58. Aebi, H. Catalase. in *Methods of enzymatic analysis (second edition)* (ed. Bergmeyer, H. U.) 673–684 (Academic Press, 1974).

59. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).

XIV SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat diagnostyki chorób nerek i postępowania w schyłkowej niewydolności nerek.	23
Rycina 2. Komponenty układu pro- i antyoksydacyjnego.	29
Rycina 3. Wzór strukturalny Mitoquinone	34
Rycina 4. Wzór strukturalny punikalaginy	36
Rycina 5. Schemat badania z wykorzystaniem szczurów MetS i HC pojonych wyciągiem ze skórki granatu lub wodą.	41
Rycina 6. Schemat badania perfuzji nerek ex vivo.	43
Rycina 7. Zdjęcie przedstawiające nerkę szczurzą perfundowaną w systemie do zimnej maszynowej perfuzji.	44

XV ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 1. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.



Review

Recent Methods of Kidney Storage and Therapeutic Possibilities of Transplant Kidney

Anna Radajewska, Anna Krzywonos-Zawadzka and Iwona Bil-Lula *

Department of Medical Laboratory Diagnostics, Division of Clinical Chemistry and Laboratory Hematology, Faculty of Pharmacy, Wrocław Medical University, Borowska 211A, 50-556 Wrocław, Poland; anna.radajewska@student.umw.edu.pl (A.R.); anna.krzywonos-zawadzka@umw.edu.pl (A.K.-Z.)

* Correspondence: iwona.bil-lula@umw.edu.pl; Tel.: +48-71-784-0628

Abstract: Kidney transplantation is the standard procedure for the treatment of end-stage renal disease (ESRD). During kidney storage and before implantation, the organ is exposed to damaging factors which affect the decline in condition. The arrest of blood circulation results in oxygen and nutrient deficiency that lead to changes in the cell metabolism from aerobic to anaerobic, damaging organelles and cell structures. Currently, most kidney grafts are kept in a cold preservation solution to preserve low metabolism. However, there are numerous reports that machine perfusion is a better solution for organ preservation before surgery. The superiority of machine perfusion was proved in the case of marginal donor grafts, such as extended criteria donors (ECD) and donation after circulatory death (DCD). Different variant of kidney machine perfusions are evaluated. Investigators look for optimal conditions to protect kidneys from ischemia-reperfusion damage consequences by examining the best temperature conditions and comparing systems with constant or pulsatile flow. Moreover, machine perfusion brings additional advantages in clinical practice. Unlike cold static storage, machine perfusion allows the monitoring of the parameters of organ function, which gives a real possibility to make a decision prior to transplantation concerning whether the kidney is suitable for implantation. Moreover, new pharmacological therapies are sought to minimize organ damage. New components or cellular therapies can be applied, since perfusion solution flows through the organ. This review outlines the pros and cons of each machine perfusion technique and summarizes the latest achievements in the context of kidney transplantation using machine perfusion systems.

Keywords: machine perfusion; kidney transplantation; kidney graft



Citation: Radajewska, A.; Krzywonos-Zawadzka, A.; Bil-Lula, I. Recent Methods of Kidney Storage and Therapeutic Possibilities of Transplant Kidney. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1013. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051013>

Academic Editor: Gener Ismail

Received: 17 March 2022

Accepted: 25 April 2022

Published: 28 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Chronic kidney disease (CKD) might lead to end-stage renal disease. In 2017, 1.2 million people died because of chronic kidney disease [1]. There are two therapeutic options for ESRD, namely dialysis and transplantation. The development of organ preservation is indisputably a big advantage of medicine and transplantology. The main goal of the customarily used method (hypothermia) is to suppress the metabolism and reduce ATP depletion. Increasing the pool of organs for transplantation is still an important objective because of the long waiting list for organ transplants [2]. With the increase in the number of patients qualified for transplantation, scientists are forced to find a way to increase the organ pool. Currently, it is possible to obtain a kidney from a living donor, after brain death and after cardiac death. There is also a group of donors called extended criteria donors that are approved to be organ donors. This change was a big step for transplantology, but it is also a challenge for clinicians and scientists to ensure the best function of the organ. The composition of a storage fluid and the preservation method seem to be crucial. One of the first preservation solutions used for cold static storage was plasma and later, cryoprecipitate plasma (CPP). The problem with the possibility of disease transmission was the reason for the production of a commercial product supporting organ preservation.

The construction of machine perfusion devices and the development of a constant perfusion method were significant in the case of donation after cardiovascular determination of death. It is known that DCD organs are more prone to ischemia-reperfusion injury (IRI). IRI is the main cause of delayed graft function (DGF) or primary nonfunction (PNF) of the graft. That is why a new method of preservation, in combination with solution composition, should be considered [3–6]. According to the study of Opelz et al., during the years 1995–2005, machine perfusion constituted only 2.0–3.4% of all preserved kidneys [5]. Fortunately, the popularity of machine perfusion is increasing, so we can expect that it will completely supersede cold static storage (CSC) of the kidney [7]. The standardization of machine perfusion methods and the improvement of perfusing solutions should be the next step.

2. What Occurs in the Kidney during the Storage?

After organ removal from a donor's body and before transplantation, a graft needs to be stored for different periods of time. The duration of organ preservation is proportional to the time of ischemia and the degree of the damage that occurs. Ischemia results in oxygen and nutrition deficiency and promotes cell apoptosis or necrosis. Inside the cell, numerous biochemical changes occur. Anaerobic respiration is promoted, which leads to adenosine triphosphate (ATP) depletion and inactivation of the Na^+/K^+ ATPase pump. ATP is rapidly transformed into hypoxanthine, which can be subsequently metabolized because of anaerobic conditions (Figure 1). The first phase of ATP depletion is associated with the inactivation of manganese superoxide dismutase (SOD). Because of the inhibition of its antioxidative properties, mitochondria are destroyed by reactive oxygen species (ROS), and some apoptotic pathways are launched. Moreover, lactate dependent ATP production leads to acidosis because of lactic acid accumulation inside the cell and interstitium. These conditions affect lysosome membranes and hydrolase leaking, destroying cell membrane structure [8,9]. Because of the Na^+/K^+ ATPase failure, increasing intracellular Na^+ ion concentration and water accumulation yield edema. Further, Ca^{2+} accumulation is caused by $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pump arrest. High amounts of calcium activate calcium-dependent proteases, such as calpains (active after reperfusion), and initiate reactive oxygen species production [8,10]. These changes are proportional to the time of ischemia duration. Due to IR, injured cells activate different types of cell death: apoptosis, necrosis or autophagy. Apoptosis is determined by caspase complex activation and can be classified as a self-limiting death program. It was thought that apoptosis is less immunogenic than necrosis, but ATP release might attract phagocytes and initiate inflammation. Necrosis, on the other hand, is initiated by cellular swelling and membrane breakage. Injured cells stimulate the immune system, infiltration of the neutrophils and a cytokine cascade reaction. Autophagy is a genetically regulated process in which cells start to digest organelles and intracellular proteins inside their own lysosomes, which can be considered as a temporary survival mechanism. However, prolonged ischemia time might result in the cellular death process rather than in survival action [10]. When the blood flow is restored, white blood cells release cytokines and chemoattractant, which injures endothelial and tubular epithelial cells [9]. During the immune response, the activation of both pathways of the innate and adaptive immune system are observed. The transcription of nuclear factor kinase B, by activating toll-like receptors, leads to the transcriptional activation of inflammatory genes. Dendritic cells have a crucial role in immune response. They present an antigen to T cells and might activate the complement system. Usually, T cells are activated by binding with antigens; however, it has been shown that they might be activated by ROS. In the pathophysiology of the immune system response in the case of kidney transplantation, CD4^+ lymphocytes are of particular importance. During cold preservation, there is increased expression of P-selectin, ICAM-1 and MHC class II antigen on renal endothelial and proximal tubular cells before CD4^+ T-cell infiltration. Increased expression of the MHC class II antigen is associated with release of interleukin 2 (IL-2) and interferon gamma (INF- γ). This suggests an innate connection and an adaptive immune system in the immune reaction [11].

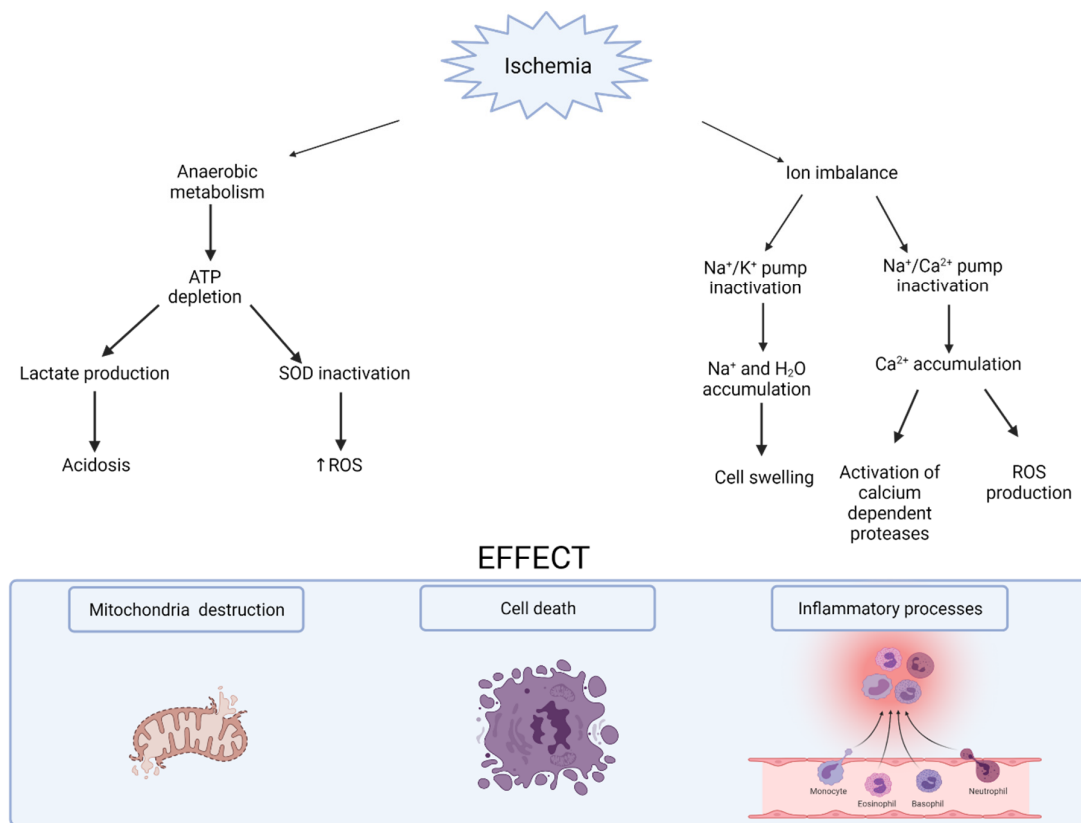


Figure 1. The effect of ischemia on cell metabolism. Legend: SOD—superoxide dismutase; ATP—adenosine 5'-triphosphate; ROS—reactive oxygen species.

3. Expanded Criteria in Kidney Graft Transplantation

There is still increasing disproportion between organs available for transplantation and the number of waiting recipients (Table 1) [12,13]. Previously, kidney transplants were carried out after the donor's brain stem death. Currently, neurosurgery is more effective, and we can observe the reduction of postsurgical trauma. This fact caused the need to expand the criteria for organs that can be used [12]. Eventually, new criteria for donors were approved and included ECD and DCD. For the ECD group, one can obtain grafts from deceased donors over sixty, or 50–60-year-old donors with two other criteria: arterial hypertension, creatine levels over 1.5 mg/dL and DCD grafts [14]. The overriding standard is the organ's condition. This means that broad structural lesions, functional disorders or active infection of the organ does not allow it to be used during transplantation [15]. DGF is a common condition occurring after renal transplantation. It enlarges the risk of transplant rejection in the future and requires the implementation of hemodialysis, which also increases the total cost and affects the patient's quality of life [16]. Studies have shown that DCD grafts are associated with a higher risk of DGF compared to kidneys recovered after brain death donation (DBD), likely because of extended warm ischemic time [17], although a DCD kidney is less likely to affect the hormonal and inflammatory milieu than a DBD kidney [18]. However, in both cases, kidneys are exposed to ischemia during preservation, causing injuries that might be an important factor leading to DGF or graft rejection. This necessitates the improvement of graft storage to stop destructive processes from occurring during cold ischemia time [19].

Table 1. Kidney transplant and waiting patient statistics for 2018 and 2019 [13]. Those 2018 and 2019 data are based on the Global Observatory on Donation and Transplantation (GODT) data, produced by the WHO-ONT collaboration. Legend: DCD—donors after circulatory death; DBD—donors after brain death; WL—waiting list.

Country	Poland		Germany		USA		UK		Australia		Brazil	
Year	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019
Total kidney transplants	946	983	2291	2132	22,003	24,273	3642	3649	1135	1095	5975	6298
Deceased kidney transplants	906	931	1653	1612	15,561	17,406	2608	2627	897	857	4942	5227
Actual DBD	494	503	955	932	8589	9152	1000	964	400	376	3529	3767
Actual DCD	4	1	n/d	n/d	2133	2718	619	689	154	172	n/d	n/d
Total number of patients active on the WL during whole year	2745	2747	10,616	10,325	88,595	96,830	9072	8984	1979	2027	33,201	36,371
Waiting list (Patients awaiting a transplant—only active candidates—on 31/12/201_)	1196	1165	7526	7148	60,901	60,566	5000	5030	982	1076	22,736	25,146
Patients who died while on the WL during the whole year	73	75	453	387	3934	3754	283	240	6	n/d	1402	2156

4. Preservation Solutions

At the beginning of transplantology development, researchers and clinicians were focused mainly on the improvement of surgical techniques, immunosuppression and finally, appropriate storage and obtaining the best preservation solution [19–21]. In 1969, Collins et al. obtained a preservation solution that was able to maintain the cold storage of kidney grafts for up to 30 h [22]. A few years later, the solution was modified to better protect the graft from prolonged ischemia injury. The new solution was called Euro-Collins. In the 1980s, the University of Wisconsin (UW) solution was released to the market, and it is still used to preserve abdominal organs. It is an intracellular fluid (ICF)-type solution with a low Na⁺ and high K⁺ concentration. This maintains the appropriate ion environment and helps to avoid cellular edema [22,23]. Currently, we can find many commercial preservation solutions, such as the Collins Solution, UW, HTK (histidine-tryptophan-ketoglutarate solution), Celsior, HC-A (Hypertonic citrate adenine) and IGL-1 (Institute Georges Lopez-1). Among them, there are intra- and extracellular solutions [21]. Perfusate solution contains multiple ingredients that maintain the good condition of the kidney. To prevent interstitial edema, hydroxyethyl starch is added; moreover, preservation solutions are enriched with glutathione as an antioxidant, as well as adenosine and phosphate to stimulate ATP production [24]. Schreinemachers et al. have compared three well-known preservation solutions [25]. The immediate cooling down of a graft is necessary to slow down the metabolism. According to the study, HTK solution showed the least effectiveness, and UW and PS solutions worked faster. For the appropriate washout of red blood cells, it was thought that the preservation solution should present colloid as one of the ingredients, and it should also have low viscosity. This shows the advantage of the PS over the rest. Additionally, the histological analysis of the tissue indicated that the highest edema was observed for the group washed out in HTK. This explains the fact that kidneys after HTK washout gained weight, in contrast to kidneys in PS and UW [25]. The advancement in the production of appropriate solutions was also achieved for mechanical perfusion. The comparison of UW solution and Belzer MPS solution showed that UW solution better protected DCD grafts exposed to 75 min of warm ischemia [26]. Better protection was noticeable with machine perfusion compared to simple cold static storage for both solutions. However, there was no distinction between MPS and UW when the warm ischemia time

(WIT) was up to 60 min; the significant difference was stated for 75 min of WIT. The MPS solution was not effective enough, as high serum creatine values were found, and the animal survival was 25% (while for 60 min of WIT, the survival was 100%). The UW solution protected grafts more successfully. The serum creatinine values were lower than for the MPS solution, and animal survival was significantly higher—86% [26]. Presently, the most widely used preservation solution for the machine perfusion of kidneys is KPS-1. This solution is a variation of the UW solution and contains, among other ingredients, gluconate as a main anion and hydroxyethyl starch (HES), a synthetic colloid [27]. For normothermic machine perfusion (NMP), solutions must contain the ingredient that allows oxygen to be carried. For this reason, the red blood cells (RBC) and fresh frozen plasma (FFP) were used for NMP at the beginning [27,28]. However, the problem with the potential risk of infection and immune reaction of RBC led to the search for a new solution. Furthermore, we observe the red blood cells deficiency in the biobanks [29]. As an alternative to blood products, an artificial oxygen carrier was put into service. A polymerized bovine hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC), called Hemopure, has parameters of oxygen exchange similar to RBC, is less immunogenic and can be used for NMP [30,31]. The comparison of RBC and HBOC was carried out for 6 h NMP perfusion of a kidney graft [31]. The results of blood flow, urine production, creatinine clearance and oxygen consumption were similar for both oxygen carriers [31]. A similar effect was obtained for liver perfusion [32]. This suggested that HBOC might be effectively used as a substitute for RBC for NMP.

5. Cold Static Storage

Cold static storage as a graft preservation method has the longest history in transplantation, and it is still the most common strategy for kidney transplants. It seems to be the most cost efficient and easiest way to provide hypothermal environments. For many years, the main goal was to create the best preservation solution to protect cells from ionic instability, edema, the toxic impact of ROS and risks. Low temperature during the hypothermic organ preservation is significant and should be established between 4 and 8 °C [33]. Unfortunately, this classic technique of cold preservation usually does not secure accurate conditions, because the temperature drops down under 2 or even 0 °C. Besides, the cooling process can run too slowly to be protective. While 4–8 °C maintains cellular metabolism at a low level, ensuring high energetic ATP savings, temperatures under 2 °C might lead to protein denaturation and damage of the cell structure [33,34]. Cold static storage is effective in short-term preservation and in conjunction with DBD and living donor organs. Since the expanded criteria for donors were approved, the classic preservation method is no longer adequate. It was found that CS-stored organs from DCD had higher rates of primary non-function of up to 9%, compared to only 1–2% in cases of donation after brain death. Similar situations occurred in delayed graft function: 22–84% (DCD) and 7–25% (DBD) [34,35]. This yields the conclusion that researchers and clinicians need to obtain better storage methods to reduce ischemia effects and increase the pool of organs available for transplantation [34].

6. Machine Perfusion

The history of dynamic organ preservation started in 1935, when Carrel and Lindbergh invented and described the first machine for organ perfusion [36]. Since that time, the idea has grown, and currently, different devices are produced for various techniques, starting with HMP, followed by SNMP and ending with NMP. Machine perfusion allows for the maintenance of the flow and supply of the perfusion solution with the pharmacological and biological components used as an IRI therapy (Table 2). The clinically used device for HMP contains of a chamber for ice and the cannulated organ, a pump and sensors (pressure sensor and flow sensor) and the bubble trap (Figure 2) [37].

Table 2. Comparison of different machine perfusion techniques. Legend: HMP—hypothermic machine perfusion; SNMP—subnormothermic machine perfusion; NMP—normothermic machine perfusion; KPS®—Kidney Perfusion Solution; BELZER MPS® UW—BELZER MPS® solution.

Parameter	Machine Perfusion Method		
	HMP	SNMP	NMP
Temperature range	2–8 °C	20–25 °C	37 °C
Perfusion solution (examples) [22,23,29–31]	- KPS® - BELZER MPS® UW machine perfusion solution	- BELZER MPS® UW machine perfusion solution - solution with oxygen carrier (natural and artificial ex. (HBOC)-201)	- Solution with oxygen carrier (natural and artificial ex. (HBOC)-201)
Equipment specifications [37–42]	- ORS (organ recovery system) LifePort - RM3 Kidney Perfusion System (Water Medical System) - Organ Assist, Groningen, the Netherlands - Waves IGL (Lissieu, France)	- Organ Assist, Groningen, The Netherlands- Modified RM3 Kidney Perfusion System (Water Medical System)	- Organ Assist (XVIVO), Groningen, the Netherlands - PerKidney®, San Giovanni in Persiceto, Italy - Ark system EBERS, Zaragoza, Spain
Oxygen	No/Yes (for most devices, it is possible to use oxygen)	Yes	Yes
Advantages	- reduction of cellular metabolism - reduction of ATP depletion - reduction of neutrophil and platelet activity - possibility to obtain perfusate sample for constant graft monitoring - possibility for drug administration - collection of waste products	- mitochondrial injury minimalization - decreased ATP depletion - minimalization of the vacuolization and cell necrosis - possibility of using the SNMP as a resuscitation platform for graft - possibility for drug administration and graft monitoring - collection of waste products - no compulsion to use oxygen carriers to provide gas exchange	- similar nutrition and oxygen level as in vivo condition - possibility to control graft function - adequate drug uptake when administrated - reduction of free radical mediated damage - possibility of using the NMP as a resuscitation platform for graft - collection of waste products
Disadvantages	- some cytoskeletal changes - induction of stress protein - increased ROS production after reoxygenation - loss of cellular phospholipids - the inability to accurately assess certain activities of the organ: urine production	- do not fully protect the graft from reperfusion injury - impairment of the physiological functions of the organ (in case of liver transplantation, decreased bile production)	- high level of ATP depletion - high metabolism level - high cost of a perfusion solution - risk of infection (while blood-based solution is used)

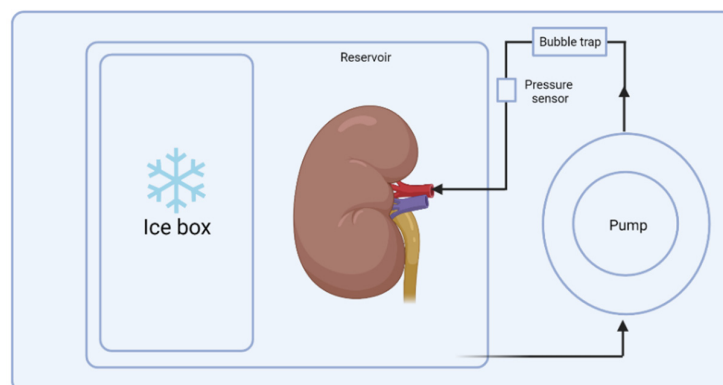


Figure 2. The scheme of hypothermic machine perfusion of a kidney.

6.1. Hypothermic Machine Perfusion and Pulsatile Cold Machine Perfusion

Hypothermic machine perfusion has a long history, and many investigations have been completed. Currently, transplant clinics utilize two main types of perfusion machines: LifePort® (Organ Recovery System, Itasca, Illinois) and the Waters RM3® kidney perfusion system (Rochester, Minnesota) [43]. Since ischemia injury occurs during organ storage before transplantation, it is crucial to reduce it. The concept of using hypothermia is the basis for both the CS and HMP techniques (pulsatile and non-pulsatile perfusion). Hypothermia changes cellular metabolism and slows down the majority of biochemical reactions, thus decreasing energy demand. HMP additionally reduces the activity of the neutrophils and platelets during reperfusion, so the inflammatory response is decreased [7]. Cell depolarization, which is an effect of anoxia and ischemia, can be limited by pharmacological prevention and/or cooling down the graft. Special perfusion fluids have been developed. The addition of some chemical substances, such as glutathione, may control the production of free radicals due to its free radical scavenger properties. The ion imbalance during ischemia causes cellular edema. The clinically used solution maintains appropriate ion levels. Admittedly, HMP is related to higher machine cost; however, prospective economic benefits redeem it. The reduction of DGF and PNF incidents, as well as a higher percentage of one-year graft survival, reduce the total cost of hospitalization and dialysis. Machine perfusion facilitates samples collection and hence, the reliable functional and conditional control of the perfused organs. Constant flow removes toxic and metabolic products and provides good patency of the vascular bed. However, the disadvantages are cytoskeletal changes and the induction of stress proteins or the loss of cellular phospholipids [44–46]. Prolonged hypothermia might lead to the destruction of the organ structure [47,48]. However, HMP and its modification, pulsatile cold machine perfusion, (PP) have positive effects on kidney grafts. PP seems to be a more physiological option because it reflects better blood flow in the vessels. It has been shown that vascular endothelium reacts to mechanical stimuli, including flow-dependent vasoprotective genes, such as Krüppel-like Factor 2 (KLF2) that regulate the endothelial transcription of genes connected with inflammatory, innate immunity and vascular tone. The transcription is much lower during cold static storage. KLF2 positively regulates endothelial nitric oxide synthase (eNOS), consequently leading to the production of nitric oxide (NO), which is responsible for vascular conductance during reperfusion [49]. Moreover, animal models showed that there was no significant difference for the two techniques (HMP and PP) when the pulsatile mode was used. However, nonpulsatile treatment had no renoprotective effect, while pulsatile did have a good impact on a porcine graft [49]. It is speculated that PP perfusion reduces the risk of HCV transmission [50]. According to Matsuoka's research, kidneys subjected to PP procedures had around a 10% lower rate of DGF than CS kidneys, but there was no significant difference in the case of primary nonfunction. At the same time, the DGF frequency was higher in CS grafts, while a later percentage of rejection (after 6 months and after one year) was almost at the same level between CS and PP [24]. Kwiatkowski et al. observed that the early graft function of CS and PP was similar as well, as was the rate of acute rejection (within 6 months). DGF occurred more frequently in case of CS storage, and there was more often a need for patient dialysis after transplantation (CS = 50% vs. PP = 25%) and after long term observation. The biopsy of kidneys confirmed that chronic rejection and interstitial fibrosis frequently result in cold storage grafts [50]. The meta-analysis performed by Arcos et al. indicated that there was less incidence of DGF in all type of grafts from cadaver donors in the PP group. Nevertheless, there was no significant difference between the PP and CS methods in terms of creatinine or creatinine clearance levels after the 3rd month. Furthermore, PP decreased the PNF phenomenon level, but only in reference to the DBD studies [14]. Additionally, researches on pharmacological protection during kidney perfusion are conducted [48,51]. Moser et al. proved that the administration of doxycycline (an inhibitor of matrix metalloproteinases) to the perfusion solution (KPS-1) reduced kidney injury. Markers of injury, such as NGAL concentration and LDH activity, were significantly decreased [48]. Lin et al. suggested that aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) might mitigate kidney IRI [51].

They also confirmed that HMP is more efficient than CS in protecting the kidney graft. ALDH2 takes part in metabolizing aldehydes in the mitochondria and lipid peroxides, as well as resists ROS production [52]. Moreover, the investigated groups, HMP + Alda-1 (agonist) and HMP + CYA (inhibitor), have allowed for the examination of the protective effect of ALDH2. The expression of mRNA and the proteins ALDH2 were the highest after Alda-1 addition. Consequently, the lowest levels of markers of oxidative stress, injury and inflammation were observed for the HMP + Alda-1 group and the highest for the HMP + CYA group. The study indicated that the ALDH2-Akt-mTOR pathway may be a therapeutic target to protect kidneys from IRI [51].

6.2. Subnormothermic Machine Perfusion

The second machine-perfusion technique, subnormothermic machine perfusion (SNMP), is based on temperature settings under normothermia conditions. The temperature is between 20 and 25 °C. This is another suggestion for controlling cellular metabolism and protecting organ structures against damages arising from cold preservation [53]. Compared to NMP, lower temperatures can minimize mitochondrial injury and reduce the rate of depletion of ATP and the rate of energy changing. Unfortunately, liver transplant studies have shown that the reduction of glutathione was higher using this method, and that hepatocytes cells could not produce glutathione, probably because of the massive accumulation of cytotoxic 5-oxoproline. This may lead to metabolic acidosis and hemolytic anemia and threaten the rejection of the transplanted liver [54]. A big advantage of SNMP seems to be that there is no need to use oxygen carriers to provide gas exchange, such as the supplementation of perfusion fluid with red blood cells (RBC) or artificial substitutes. This reduces costs, as well as rising potassium levels when RBC is added [53,55,56]. During SNMP, higher pressure can be used compared to HMP, and the endothelial and vascular impairment is not observed [57]. It has been demonstrated that subnormothermic conditions might show an advantage over hypothermic storage and perfusion. Parameters such as creatinine clearance (lower in HMP) and γ GT (the lowest in SNMP group) correlate positively with the kidney injury [57]. Schoop et al. subjected tissue to SNMP for 3 h after cold storage and right before reperfusion. The aim of this study was to document if the gradual heating of a graft has a positive effect on the functional parameters of the kidney. After SNMP, creatinine and urea clearance were significantly higher. It was noticed that the mitochondrial recovery was better after a short-term of SNMP treatment than in a control group and the oxygen consumption was higher. The conclusion was that controlled rewarming might have a positive impact on graft function [58]. It has been proven that gradual rewarming has a positive impact on graft viability, comparing to sudden temperature change from hypothermia to normothermia [59]. However, gradual rewarming is associated with the supplementation of oxygen carriers, which must be artificial due to the hemolysis of red blood cells used for NMP [60]. Mahboub et al. showed that the gradual rewarming of the kidney graft with HBOC after 2 h of CS improved its viability and function. The higher GFR and ultrafiltrate production had been noticed when HBOC was applied. Moreover, the reabsorption of sodium (the parameter of renal tubular function) was superior for the HBOC group compared to the control group (rewarming without oxygen carriers) [61]. One of the main problems with HMP is the time-related vascular resistance increase. It has been shown that subnormothermic conditions might be a solution to this problem, without exposing the graft to higher metabolism. Comparisons of CS and SNMP suggested that after 120 min of storage/perfusion, the vacuolization was lower in the case of SNMP, as was the necrosis. It was observed that during CS, the necrosis had been extensive, while SNMP protected the organ, and there had been only isolated necrosis in a liver study [56]. However, the protective effect of subnormothermia is still uncertain [62]. Adams et al. have compared one hour of machine perfusion after 23h of CS, using both a normothermic (37 °C) condition and with the temperature lower than normothermia (32 °C—which is not the temperature normally used in SNMP). The protective effect was observed for NMP, but not for SNMP. The creatinine clearance was lower for SNMP than the control group

(without machine perfusion) and NMP. Renal damage was greater for the subnormothermic group than for the others (higher level of LDH and AST). This study suggested that only normothermic conditions are able to improve graft function after cold storage [62]. Subnormothermic and normothermic machine perfusion are proposed as recovery techniques to be utilized after cold preservation. The positive effect on liver grafts were reported in the preliminary study [63]. Ciria et al. maintained DCD grafts in a hypothermic condition and after prolonged CIT, used SNMP as a recovery method. It was shown that the rise of temperature supported graft efficiency improvement. They postulated to use devices with adjustable temperature settings (between 4 °C and 37 °C) to obtain a better condition of marginal grafts [63]. The SNMP might also reduce mitochondrial damage and free radical production [64].

6.3. Normothermic Machine Perfusion

The kidney outside the human body is exposed to damage associated with a lack of oxygen and nutrition. The degree of injury is associated with the time of storage before transplantation, called cold ischemic time (CIT). Since CIT is known as an independent risk factor for DGF and graft failure, it is important to reduce it. NMP, with the use of specific perfusates based on natural or artificial oxygen carriers, can provide appropriate nutrition levels and gas exchange. Kidney function can be monitored during machine perfusion when the condition is the closest to the condition of the human body. Additionally, normothermia ensures the adequate uptake of specific substances and drugs administered to perfusate fluid during machine perfusion [65]. Early studies on a short period (60 min) of NMP, right before the ECD kidney transplantation, decreased DGF. There was no incident of PNF, and the graft survival after 12 months was similar for study and control groups (CS kidneys) [66]. The results of this first human clinical study proved that NMP might be considered safe and probable. It has been shown that NMP provides better early graft and rapid tubular function [67]. Urbanellis et al. compared three techniques of kidney preservation [67]. After 30 min of warm ischemia, kidneys were perfused (HMP or NMP) or immersed in the cold preservation solution for 16 h. The renal flow and intrarenal vascular resistance were measured in real time. NMP kidneys had lower resistance results, and the blood flow progressively increased during 16 h of perfusion. The creatinine clearance was impaired in both CS and HMP compared to NMP. The fractional excretion of sodium (the marker of tubular function) was the lowest in the case of NMP. However, injury markers (NGAL and TUNEL staining) were increased only for CS kidneys, as was the histopathological damage score. This suggests that normothermic machine perfusion can protect kidney grafts from injury and improve the initial functioning of the transplant [67]. Kathis et al. compared different times of NMP applied after CS or right after warm ischemia [68]. It was shown that the flow rate reached physiological levels after 1 h of rewarming, and the intrarenal resistance decreased during NMP. The creatinine and blood urea nitrogen level (BUN) were significantly lower for the 16 h NMP group (NMP after warm ischemia without previous CS), and a smaller concentration of the serum NGAL level was decreased in groups of 16 h and 8 h in the NMP compared to control group (16 h of CS) [68]. In the pilot study of Hosgood et al., normothermic machine perfusion was used for the resuscitation of previously rejected grafts for transplantation. Research has shown that two kidneys that could not have been used because of inadequate in situ perfusion, after normothermic machine perfusion, were good enough for transplantation. The kidneys changed appearance from purple colored (signifying the damage of organ) to natural pink, the level of renal blood flow increased and a large volume of urine was produced. After this procedure, kidneys were transported in ice and transplanted. The kidneys had initial graft function and had a good level of renal function 3 months after surgery [69]. Another pilot study of 2 h of NMP of kidneys from the Eurotransplant Senior Program (ESP) confirmed the safety of this procedure. The study compared, among others, the DGF and PNF rates, creatinine levels and eGFR of the NMP kidney group, and both the ESP patient and the contralateral kidneys as a control group. DGF incidents were less frequent for the NMP

group, although there were limitations of the study, such as a small sample size and no statistical differences between the study group and the control. The main conclusion was that the NMP technique is safe for the ESP group, and the kidney function after NMP was similar to that after using the standard procedure (HMP and cold storage). In the future, NMP may show the possibility of improving the storage technique with IRI therapy and the constant monitoring of relevant biomarkers of viability [2]. Studies have proven that NMP is a safe technique, and even a short period of normothermic perfusion might improve kidney function. It is important that this effect be observed before transplantation, and then it can be used to successfully resuscitate grafts. The investigation for additional graft repair methods is one of the main goals. Centers all over the world are focused on refining the NMP technology to define the ideal time of kidney normothermic perfusion and the best composition of perfusing fluid. First, solutions for NMP were based on packets of RBC and fresh frozen plasma, obtained from a local blood bank. Later, there were attempts to use a hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC)-201. It is possible that NMP conditioning by itself can reduce IRI and at the same time, it might be a good platform for additional treatment [70,71]. The magnetic resonance imaging (MRI) used for the evaluation of NMP kidney perfusion indicated the differences between the distribution of perfusate flow inside the kidney. This suggests that the establishment of good imaging techniques might be necessary to evaluate the kidney before transplantation [72]. Still, NMP should be carefully investigated in the case of marginal donors to increase the safety of this procedure and establish one well-described protocol for transplantation centers worldwide. It seems to be crucial to substitute previously detected viability markers with imaging of actual perfusion flow and distribution inside the organ.

7. Novel Possibilities for the Treatment of Low-Quality Grafts and Immune-Response Modulation via NMP

Normothermic machine perfusion is the youngest technique for the storage of kidney graft and currently, the most carefully investigated. The advantage of this method were previously mentioned, and in this paragraph, we want to sum up new studies on NMP as a platform for kidney preconditioning. The greatest benefit of NMP is probably that this platform might, in the future, allow provide additional treatment for poor-quality grafts. Because of the physiological temperature and oxygen carriers, it is easier to predict cellular metabolism and drug uptake.

One of the major problems, in addition to ischemia-reperfusion injury, is that the immune response is partly downregulated by immunosuppressive drugs. However standard therapy is burden for a patient. Therefore, one of the current trends, in combination with normothermic machine perfusion, is cell-based therapy with multipotent adult progenitor cells (MAPC) and mesenchymal stromal cells (MSC) [73–78]. Both show anti-inflammatory and immunomodulatory effects and thanks to low levels of MHC II and MHC I molecules and costimulatory molecules, they are thought to be safe for the graft recipient [78]. Several studies were driven with MAPC or MSC obtained from different tissues, usually bone marrow and adipose tissue [79]. Pool et al. conducted NMP using a porcine graft while human MSCs were infused. They proved that it is possible to detect the living MSCs inside the kidney graft, but this is limited to the lumen of glomerular capillaries. There were no hemodynamics changes in the graft; however, the distribution of MSCs inside the well-perfused kidney were very diverse and hard to predict [74]. Thompson et al. described an immunomodulatory effect and a decrease of IRI markers, such as urine concentration of NGAL, and higher urine output after MAPCs infusion during human kidney NMP [77]. Besides, they noted a lower level of pro-inflammatory cytokine IL-1 β and an increase in IL-10, known as an anti-inflammatory cytokine. The activity of indolamine-2, 3-dioxygenase (IDO), which modulates the effective T cells response, was also significantly higher for the NMP + MAPC group compared to the NMP control group. Similar to the results of other researchers, the staining of MAPC and kidney sections showed the increased concentration of MAPCs within the glomeruli [77]. Another study with MSCs derived from adipose

(A-MSc) and bone marrow (BN-MSc) tissue showed similar results in the context of injury markers, as shown previously, such as higher levels of IL-6 and IL-8 cytokines for MScs groups, and did not detect significant differences between the A-MSc and BM-MSc infused groups [76]. The secretion of IL-6 and IL-8 were observed only when the kidney was connected to the circuit, and the MScs alone did not produce the mentioned interleukins. Therefore, the production of interleukin is stimulated by the injured graft. However, the origin of this product is not clearly defined; it is possible that the MSc produced interleukin, or that the kidney cells produced it upon contact with the MScs [76]. Another cell-based therapy currently being investigated is the use of stem cell-derived extracellular vesicles (EV). EVs are secreted by cells and they take part in cellular communication because they carry small molecules like mRNA, miRNA, proteins and lipids [80]. The ability to modulate an immune response and tissue repair has been proved on AKI and CKD models of kidney injury [81]. So far, the utilization of EVs as a therapy in the context of NMP was noted for liver graft perfusion, with a satisfactory effect [82]. Kidney-derived EVs are mostly studied as novel biomarkers [80]. The possibility of EVs application during machine perfusion was studied by groups using hypothermic oxygenated machine perfusion, and they proved that even without a perfect condition of vesicles for cellular uptake (low temperature), the endocytosis occurred, and the condition of the discarded human ECD kidney significantly improved [83]. We speculate that the positive effect may be even more noticeable with NMP. Normothermic machine perfusion has been proposed as a good platform for molecular therapy to deliver small RNA fragments like microRNA antagonists [84]. MicroRNAs are non-coding oligonucleotides which, by binding to specific fragments of messenger RNA (mRNA), lead to the degradation or inhibition of the translation of that mRNA. Moreover, microRNA and other RNA-type products are small enough to be taken and filtered by the glomerulus. However, this kind of therapy is challenging because in the past, it required the delivery of small oligonucleotide encapsulated in the viral vector or small vehicles with cationic charge. However, NMP allows for the retention of physiological temperature and drug uptake; therefore, it is possible to deliver gymnotic, or naked, oligonucleotides. This method is cheaper and has less side effects. Thompson et. all used NMP to deliver an antagomir targeting mir-24-3p and recorded the positive effect on protective gene expression, such as heme oxygenase-1 and sphingosine-1-phosphate receptor 1. Besides, the tracking of the antagomir provides information about its localization in the tubular epithelial cells and endothelial cells. This confirmed the suggestion that small oligonucleotides can be used for the improvement of the condition of tubular cells, which are the most vulnerable to ischemia reperfusion injury [84].

8. Conclusions

The history of kidney transplantation can be dated to 1954, when the first successful transplants was carried out by American clinicians. Since that time, many changes have taken place in transplantology [85]. All this effort is supposed to lead to better organ preservation, the reduction in a ischemia-reperfusion injury and the possible extension of the time that the graft can remain outside the body. Machine perfusion was detected as a suitable method to reduce the risk of DGF and PNF, especially with DCD grafts [44–46,50]. Moreover, the constant control of graft function is possible during perfusion and, additionally, NMP allows for the control of the actual values of some parameters, thanks to the maintenance of physiological temperature. The technique of NMP or SNMP might also be a way for the preconditioning of the organ before transplantation by gradually increasing its temperature [63]. It is required to refine machine perfusion and elaborate repeatable rules for the procedure to create better standards for transplantology. Currently, hypothermic machine perfusion is recommended for DCD grafts in many countries. We follow this opinion, since the positive effects of HMP have been well-documented. We believe it might be the best technique for long-term organ storage, but the possibility of additional treatment should be taken into consideration to prevent distress caused by subsequent reoxygenation and rewarming. In our opinion, in the future, NMP techniques might be

perfect to modify the immune system of the perfused graft if the cellular or EV therapies are proven to be safe. It would be possible to support subsequent immunosuppressive therapy at the stage of perfusion of the isolated organ. That might be extremely advantageous for ECD grafts, especially from donors already affected with immune or hormonal irregularity. Moreover, it is possible that in the future, the best kidney graft preservation method will be the combination of all three perfusion techniques, with gradual rewarming and oxygenation with the therapy “on pump.” For now, the biggest challenge is to optimize known preservation systems to make them low cost, safe and more effective. Understanding the physiopathology of IRI will allow researchers to obtain a solution containing inhibitors for enzymes and processes that might cause cell damage. All these will allow better protection of the graft and increase the pool of organs in order to increase the rate of transplantations.

Author Contributions: A.R.: main author of the article, author of tables and figures; A.K.-Z.: author of the article, corrector of the language; I.B.-L.: author of the article, corrector of the language, editor of the article. All authors have read and agreed to the journal’s authorship statement and policy. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This review was supported by the National Science Centre, Poland, grant no. 2017/27/B/NZ4/00601.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Carney, E.F. The impact of chronic kidney disease on global health. *Nat. Rev. Nephrol.* **2020**, *16*, 251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Rijkse, E.; de Jonge, J.; Kimenai, H.J.A.N.; Hoogduijn, M.J.; de Bruin, R.W.F.; van den Hoogen, M.W.F.; IJzermans, J.N.M.; Minnee, R.C. Safety and feasibility of 2 h of normothermic machine perfusion of donor kidneys in the Eurotransplant Senior Program. *BJS Open* **2021**, *5*, zraa024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Abecassis, M.; Bartlett, S.T.; Collins, A.J.; Davis, C.L.; Delmonico, F.L.; Friedewald, J.J.; Hays, R.; Howard, A.; Jones, E.; Leichtman, A.B.; et al. Kidney Transplantation as Primary Therapy for End-Stage Renal Disease: A National Kidney Foundation/Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF/KDOQI™) Conference. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **2008**, *3*, 471–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Southard, J.H.; Belzer, F.O. Organ Preservation. *Annu. Rev. Med.* **1995**, *46*, 235–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Opelz, G.; Döhler, B. Multicenter Analysis of Kidney Preservation. *Transplantation* **2007**, *83*, 247–253. [[CrossRef](#)]
6. Tonelli, M.; Wiebe, N.; Knoll, G.; Bello, A.; Browne, S.; Jadhav, D.; Klarenbach, S.; Gill, J. Systematic Review: Kidney Transplantation Compared With Dialysis in Clinically Relevant Outcomes. *Am. J. Transplant.* **2011**, *11*, 2093–2109. [[CrossRef](#)]
7. Petrenko, A.; Carnevale, M.; Somov, A.; Osorio, J.; Rodríguez, J.; Guibert, E.; Fuller, B.; Froghi, F. Organ Preservation into the 2020s: The Era of Dynamic Intervention. *Transfus. Med. Hemotherapy* **2019**, *46*, 151–172. [[CrossRef](#)]
8. Salvadori, M.; Rosso, G.; Bertoni, E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J. Transplant.* **2015**, *5*, 52–67. [[CrossRef](#)]
9. Ponticelli, C. Ischaemia-reperfusion injury: A major protagonist in kidney transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2014**, *29*, 1134–1140. [[CrossRef](#)]
10. Degenhardt, K.; Mathew, R.; Beaudoin, B.; Bray, K.; Anderson, D.; Chen, G.; Mukherjee, C.; Shi, Y.; Gélinas, C.; Fan, Y.; et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **2006**, *10*, 51–64. [[CrossRef](#)]
11. Philipponnet, C.; Aniot, J.; Garrouste, C.; Kemeny, J.-L.; Heng, A.-E. Ischemia reperfusion injury in kidney transplantation. *Medicine* **2018**, *97*, e13650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Summers, D.M.; Johnson, R.J.; Allen, J.; Fuggle, S.V.; Collett, D.; Watson, C.J.; Bradley, J.A. Analysis of factors that affect outcome after transplantation of kidneys donated after cardiac death in the UK: A cohort study. *Lancet* **2010**, *376*, 1303–1311. [[CrossRef](#)]
13. European Region. GODT. Available online: <http://www.transplant-observatory.org/european-region/> (accessed on 22 March 2021).
14. Martínez Arcos, L.; Fabuel Alcañiz, J.J.; Gómez Dos Santos, V.; Burgos Revilla, F.J. Functional Results of Renal Preservation in Hypothermic Pulsatile Machine Perfusion Versus Cold Preservation: Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Transplant. Proc.* **2018**, *50*, 24–32. [[CrossRef](#)]

15. López-Navidad, A.; Caballero, F. Extended criteria for organ acceptance. Strategies for achieving organ safety and for increasing organ pool. *Clin. Transplant.* **2003**, *17*, 308–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Stevenson, R.P.; Shapter, O.; Aitken, E.; Stevenson, K.; Shiels, P.G.; Kingsmore, D.B. Has the Expansion in Extended Criteria Deceased Donors Led to a Different Type of Delayed Graft Function and Poorer Outcomes? *Transplant. Proc.* **2018**, *50*, 3160–3164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Heylen, L.; Jochmans, I.; Samuel, U.; Tiekens, I.; Naesens, M.; Pirenne, J.; Sprangers, B. The duration of asystolic ischemia determines the risk of graft failure after circulatory-dead donor kidney transplantation: A Eurotransplant cohort study. *Am. J. Transplant.* **2018**, *18*, 881–889. [[CrossRef](#)]
18. Evenson, A.R. Utilization of kidneys from donation after circulatory determination of death. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **2011**, *16*, 385–389. [[CrossRef](#)]
19. Summers, D.M.; Watson, C.J.E.; Pettigrew, G.J.; Johnson, R.J.; Collett, D.; Neuberger, J.M.; Bradley, J.A. Kidney donation after circulatory death (DCD): State of the art. *Kidney Int.* **2015**, *88*, 241–249. [[CrossRef](#)]
20. Latchana, N.; Peck, J.R.; Whitson, B.A.; Henry, M.L.; Elkhammas, E.A.; Black, S.M. Preservation solutions used during abdominal transplantation: Current status and outcomes. *World J. Transplant.* **2015**, *5*, 154–164. [[CrossRef](#)]
21. Chen, Y.; Shi, J.; Xia, T.C.; Xu, R.; He, X.; Xia, Y. Preservation Solutions for Kidney Transplantation: History, Advances and Mechanisms. *Cell Transplant.* **2019**, *28*, 1472–1489. [[CrossRef](#)]
22. Collins, G.M.; Bravo-Shugarman, M.; Terasaki, P.I. KIDNEY PRESERVATION FOR TRANSPORTATION: Initial Perfusion and 30 Hours' Ice Storage. *Lancet* **1969**, *294*, 1219–1222. [[CrossRef](#)]
23. Jing, L.; Yao, L.; Zhao, M.; Peng, L.; Liu, M. Organ preservation: From the past to the future. *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, *39*, 845–857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Matsuoka, L.; Shah, T.; Aswad, S.; Bunnapradist, S.; Cho, Y.; Mendez, R.G.; Mendez, R.; Selby, R. Pulsatile Perfusion Reduces the Incidence of Delayed Graft Function in Expanded Criteria Donor Kidney Transplantation. *Am. J. Transplant.* **2006**, *6*, 1473–1478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Schreinemachers, M.C.J.M.; Doorschodt, B.M.; Florquin, S.; Tolba, R.H. Comparison of Preservation Solutions for Washout of Kidney Grafts: An Experimental Study. *Transplant. Proc.* **2009**, *41*, 4072–4079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lindell, S.L.; Compagnon, P.; Mangino, M.J.; Southard, J.H. UW Solution for Hypothermic Machine Perfusion of Warm Ischemic Kidneys. *Transplantation* **2005**, *79*, 1358–1361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Fuller, B.; Froggi, F.; Davidson, B. Organ preservation solutions: Linking pharmacology to survival for the donor organ pathway. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **2018**, *23*, 361–368. [[CrossRef](#)]
28. op den Dries, S.; Karimian, N.; Sutton, M.E.; Westerkamp, A.C.; Nijsten, M.W.N.; Gouw, A.S.H.; Wiersema-Buist, J.; Lisan, T.; Leuvenink, H.G.D.; Porte, R.J. Ex vivo normothermic machine perfusion and viability testing of discarded human donor livers. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transplant. Surg.* **2013**, *13*, 1327–1335. [[CrossRef](#)]
29. De Vries, Y.; Matton, A.P.M.; Nijsten, M.W.N.; Werner, M.J.M.; van den Berg, A.P.; de Boer, M.T.; Buis, C.I.; Fujiyoshi, M.; de Kleine, R.H.J.; van Leeuwen, O.B.; et al. Pretransplant sequential hypo- and normothermic machine perfusion of suboptimal livers donated after circulatory death using a hemoglobin-based oxygen carrier perfusion solution. *Am. J. Transplant.* **2019**, *19*, 1202–1211. [[CrossRef](#)]
30. Elliott, T.R.; Nicholson, M.L.; Hosgood, S.A. Normothermic kidney perfusion: An overview of protocols and strategies. *Am. J. Transplant.* **2021**, *21*, 1382–1390. [[CrossRef](#)]
31. Aburawi, M.M.; Fontan, F.M.; Karimian, N.; Eymard, C.; Cronin, S.; Pendexter, C.; Nagpal, S.; Banik, P.; Ozer, S.; Mahboub, P.; et al. Synthetic hemoglobin-based oxygen carriers are an acceptable alternative for packed red blood cells in normothermic kidney perfusion. *Am. J. Transplant.* **2019**, *19*, 2814–2824. [[CrossRef](#)]
32. Laing, R.W.; Bhogal, R.H.; Wallace, L.; Boteon, Y.; Neil, D.A.H.; Smith, A.; Stephenson, B.T.F.; Schlegel, A.; Hübscher, S.G.; Mirza, D.F.; et al. The Use of an Acellular Oxygen Carrier in a Human Liver Model of Normothermic Machine Perfusion. *Transplantation* **2017**, *101*, 2746–2756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Michel, S.G.; LaMuraglia II, G.M.; Madariaga, M.L.L.; Anderson, L.M. Innovative cold storage of donor organs using the Paragonix Sherpa Pak™ devices. *Heart Lung Vessel.* **2015**, *7*, 246–255. [[PubMed](#)]
34. McLaren, A.J.; Friend, P.J. Trends in organ preservation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* **2003**, *16*, 701–708. [[CrossRef](#)]
35. Metcalfe, M.S.; Butterworth, P.C.; White, S.A.; Saunders, R.N.; Murphy, G.J.; Taub, N.; Veitch, P.S.; Nicholson, M.L. A case-control comparison of the results of renal transplantation from heart-beating and non-heart-beating donors. *Transplantation* **2001**, *71*, 1556–1559. [[CrossRef](#)]
36. Talbot, D.; D'Alessandro, A.; Muiesan, P. *Organ Donation and Transplantation after Cardiac Death*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2009; ISBN 978-0-19-921733-5.
37. Organ Recovery Systems|Organ Preservation Products. Organ Recovery Systems. Available online: <https://www.organ-recovery.com/> (accessed on 7 January 2022).
38. Institut Georges Lopez. Available online: <https://groupe-igl.com/pt/home-2/> (accessed on 12 April 2022).
39. RM3 KIDNEY PERFUSION SYSTEM—Waters Medical Systems. Available online: <https://wtrs.com/rm3-kidney-perfusion-system/> (accessed on 12 April 2022).

40. Aferetica PerLife®. Aferetica. Available online: <https://www.aferetica.com/en/therapeutical-solutions/perlife-tm/> (accessed on 12 April 2022).
41. EBERS Medical Technology SL. Available online: <https://ebersark.life/> (accessed on 12 April 2022).
42. XVIVO-Extending Horizons in Organ Transplantation. Available online: <https://www.organ-assist.nl/> (accessed on 12 April 2022).
43. Lindell, S.L.; Muir, H.; Brassil, J.; Mangino, M.J. Hypothermic Machine Perfusion Preservation of the DCD Kidney: Machine Effects. *J. Transplant.* **2013**, *2013*, 802618. Available online: <https://www.hindawi.com/journals/jtrans/2013/802618/> (accessed on 19 November 2020). [[CrossRef](#)]
44. Taylor, M.J.; Baicu, S.C. Current state of hypothermic machine perfusion preservation of organs: The clinical perspective. *Cryobiology* **2010**, *60*, S20–S35. [[CrossRef](#)]
45. Jochmans, I.; O’Callaghan, J.M.; Pirenne, J.; Ploeg, R.J. Hypothermic machine perfusion of kidneys retrieved from standard and high-risk donors. *Transpl. Int.* **2015**, *28*, 665–676. [[CrossRef](#)]
46. Moers, C.; Smits, J.M.; Maathuis, M.-H.J.; Treckmann, J.; van Gelder, F.; Napieralski, B.P.; van Kasterop-Kutz, M.; van der Heide, J.J.H.; Squifflet, J.-P.; van Heurn, E.; et al. Machine Perfusion or Cold Storage in Deceased-Donor Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 7–19. [[CrossRef](#)]
47. Krzywonos-Zawadzka, A.; Franczak, A.; Moser, M.A.J.; Olejnik, A.; Sawicki, G.; Bil-Lula, I. Pharmacological Protection of Kidney Grafts from Cold Perfusion-Induced Injury. *BioMed Res. Int.* **2019**, *2019*, 9617087. Available online: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/9617087/> (accessed on 13 November 2020). [[CrossRef](#)]
48. Moser, M.A.J.; Sawicka, K.; Sawicka, J.; Franczak, A.; Cohen, A.; Bil-Lula, I.; Sawicki, G. Protection of the transplant kidney during cold perfusion with doxycycline: Proteomic analysis in a rat model. *Proteome Sci.* **2020**, *18*, 3. [[CrossRef](#)]
49. Gallinat, A.; Fox, M.; Lüer, B.; Efferz, P.; Paul, A.; Minor, T. Role of Pulsatility in Hypothermic Reconditioning of Porcine Kidney Grafts by Machine Perfusion After Cold Storage. *Transplantation* **2013**, *96*, 538–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kwiatkowski, A.; Wszola, M.; Kosieradzki, M.; Danielewicz, R.; Ostrowski, K.; Domagała, P.; Lisik, W.; Fesołowicz, S.; Michalak, G.; Trzebicki, J.; et al. The early and long term function and survival of kidney allografts stored before transplantation by hypothermic pulsatile perfusion. A prospective randomized study. *Ann. Transplant.* **2009**, *14*, 14–17. [[PubMed](#)]
51. Lin, D.; Xiang, T.; Qiu, Q.; Leung, J.; Xu, J.; Zhou, W.; Hu, Q.; Lan, J.; Liu, Z.; Zhong, Z.; et al. Aldehyde dehydrogenase 2 regulates autophagy via the Akt-mTOR pathway to mitigate renal ischemia-reperfusion injury in hypothermic machine perfusion. *Life Sci.* **2020**, *253*, 117705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Zhang, T.; Zhao, Q.; Ye, F.; Huang, C.-Y.; Chen, W.-M.; Huang, W.-Q. Alda-1, an ALDH2 activator, protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats via inhibition of oxidative stress. *Free Radic. Res.* **2018**, *52*, 629–638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Obara, H.; Morito, N.; Matsuno, N.; Yoshikawa, R.; Gouchi, M.; Otani, M.; Shonaka, T.; Takahashi, H.; Enosawa, S.; Hirano, T.; et al. Optimum Perfusate Volume of Purified Subnormothermic Machine Perfusion for Porcine Liver Donated After Cardiac Death. *Transplant. Proc.* **2018**, *50*, 2830–2833. [[CrossRef](#)]
54. Karimian, N.; Raigani, S.; Huang, V.; Nagpal, S.; Hafiz, E.O.A.; Beijert, I.; Mahboub, P.; Porte, R.J.; Uygun, K.; Yarmush, M.; et al. Subnormothermic Machine Perfusion of Steatotic Livers Results in Increased Energy Charge at the Cost of Anti-Oxidant Capacity Compared to Normothermic Perfusion. *Metabolites* **2019**, *9*, 246. [[CrossRef](#)]
55. Nösser, M.; Gassner, J.M.G.V.; Moosburner, S.; Wyrwal, D.; Claussen, F.; Hillebrandt, K.H.; Horner, R.; Tang, P.; Reutzel-Selke, A.; Polenz, D.; et al. Development of a Rat Liver Machine Perfusion System for Normothermic and Subnormothermic Conditions. *Tissue Eng. Part A* **2020**, *26*, 57–65. [[CrossRef](#)]
56. Gringeri, E.; Bonsignore, P.; Bassi, D.; D’Amico, F.E.; Mescoli, C.; Polacco, M.; Buggio, M.; Luisetto, R.; Boetto, R.; Noaro, G.; et al. Subnormothermic machine perfusion for non-heart-beating donor liver grafts preservation in a Swine model: A new strategy to increase the donor pool? *Transplant. Proc.* **2012**, *44*, 2026–2028. [[CrossRef](#)]
57. Hoyer, D.P.; Gallinat, A.; Swoboda, S.; Wohlschläger, J.; Rauen, U.; Paul, A.; Minor, T. Subnormothermic machine perfusion for preservation of porcine kidneys in a donation after circulatory death model. *Transpl. Int.* **2014**, *27*, 1097–1106. [[CrossRef](#)]
58. Schopp, I.; Reissberg, E.; Lüer, B.; Efferz, P.; Minor, T. Controlled Rewarming after Hypothermia: Adding a New Principle to Renal Preservation. *Clin. Transl. Sci.* **2015**, *8*, 475–478. [[CrossRef](#)]
59. Gallinat, A.; Lu, J.; von Horn, C.; Kathes, M.; Ingenwerth, M.; Paul, A.; Minor, T. Transplantation of Cold Stored Porcine Kidneys After Controlled Oxygenated Rewarming. *Artif. Organs* **2018**, *42*, 647–654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Benedetti, M.; De Caterina, R.; Bionda, A.; Gardinali, M.; Cicardi, M.; Maffei, S.; Gazzetti, P.; Pistolessi, P.; Vernazza, F.; Michelassi, C. Blood-artificial surface interactions during cardiopulmonary bypass. A comparative study of four oxygenators. *Int. J. Artif. Organs* **1990**, *13*, 488–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Mahboub, P.; Aburawi, M.; Karimian, N.; Lin, F.; Karabacak, M.; Fontan, F.; Tessier, S.N.; Markmann, J.; Yeh, H.; Uygun, K. The efficacy of HBOC-201 in ex situ gradual rewarming kidney perfusion in a rat model. *Artif. Organs* **2020**, *44*, 81–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Adams, T.D.; Patel, M.; Hosgood, S.A.; Nicholson, M.L. Lowering Perfusate Temperature From 37 °C to 32 °C Diminishes Function in a Porcine Model of Ex Vivo Kidney Perfusion. *Transplant. Direct* **2017**, *3*. [[CrossRef](#)]
63. Ciria, R.; Ayllon-Teran, M.D.; González-Rubio, S.; Gómez-Luque, I.; Ferrín, G.; Moreno, A.; Sánchez-Frías, M.; Alconchel, F.; Herrera, C.; Martín, V.; et al. Rescue of Discarded Grafts for Liver Transplantation by Ex Vivo Subnormothermic and Normothermic Oxygenated Machine Perfusion: First Experience in Spain. *Transplant. Proc.* **2019**, *51*, 20–24. [[CrossRef](#)]

64. Okamura, Y.; Hata, K.; Tanaka, H.; Hirao, H.; Kubota, T.; Inamoto, O.; Kageyama, S.; Tamaki, I.; Yermek, N.; Yoshikawa, J.; et al. Impact of Subnormothermic Machine Perfusion Preservation in Severely Steatotic Rat Livers: A Detailed Assessment in an Isolated Setting. *Am. J. Transplant.* **2017**, *17*, 1204–1215. [[CrossRef](#)]
65. Hosgood, S.A.; van Heurn, E.; Nicholson, M.L. Normothermic machine perfusion of the kidney: Better conditioning and repair? *Transpl. Int.* **2015**, *28*, 657–664. [[CrossRef](#)]
66. Nicholson, M.L.; Hosgood, S.A. Renal Transplantation After Ex Vivo Normothermic Perfusion: The First Clinical Study. *Am. J. Transplant.* **2013**, *13*, 1246–1252. [[CrossRef](#)]
67. Urbanellis, P.; Hamar, M.; Kathis, J.M.; Kollmann, D.; Linares, I.; Mazilescu, L.; Ganesh, S.; Wiebe, A.; Yip, P.M.; John, R.; et al. Normothermic Ex Vivo Kidney Perfusion Improves Early DCD Graft Function Compared With Hypothermic Machine Perfusion and Static Cold Storage. *Transplantation* **2020**, *104*, 947–955. [[CrossRef](#)]
68. Kathis, J.M.; Cen, J.Y.; Chun, Y.M.; Echeverri, J.; Linares, I.; Ganesh, S.; Yip, P.; John, R.; Bagli, D.; Mucsi, I.; et al. Continuous Normothermic Ex Vivo Kidney Perfusion Is Superior to Brief Normothermic Perfusion Following Static Cold Storage in Donation After Circulatory Death Pig Kidney Transplantation. *Am. J. Transplant.* **2017**, *17*, 957–969. [[CrossRef](#)]
69. Hosgood, S.A.; Saeb-Parsy, K.; Hamed, M.O.; Nicholson, M.L. Successful Transplantation of Human Kidneys Deemed Untransplantable but Resuscitated by Ex Vivo Normothermic Machine Perfusion. *Am. J. Transplant.* **2016**, *16*, 3282–3285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. DiRito, J.R.; Hosgood, S.A.; Tietjen, G.T.; Nicholson, M.L. The future of marginal kidney repair in the context of normothermic machine perfusion. *Am. J. Transplant.* **2018**, *18*, 2400–2408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Matton, A.P.M.; Burlage, L.C.; van Rijn, R.; de Vries, Y.; Karangwa, S.A.; Nijsten, M.W.; Gouw, A.S.H.; Wiersema-Buist, J.; Adelmeijer, J.; Westerkamp, A.C.; et al. Normothermic machine perfusion of donor livers without the need for human blood products. *Liver Transplant.* **2018**, *24*, 528–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Schutter, R.; Lantinga, V.A.; Hamelink, T.L.; Pool, M.B.F.; van Varsseveld, O.C.; Potze, J.H.; Hillebrands, J.-L.; van den Heuvel, M.C.; Dierckx, R.A.J.O.; Leuvenink, H.G.D.; et al. Magnetic resonance imaging assessment of renal flow distribution patterns during ex vivo normothermic machine perfusion in porcine and human kidneys. *Transpl. Int.* **2021**, *34*, 1643–1655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Sierra Parraga, J.M.; Rozenberg, K.; Eijken, M.; Leuvenink, H.G.; Hunter, J.; Merino, A.; Moers, C.; Møller, B.K.; Ploeg, R.J.; Baan, C.C.; et al. Effects of Normothermic Machine Perfusion Conditions on Mesenchymal Stromal Cells. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Pool, M.; Eertman, T.; Sierra Parraga, J.; 't Hart, N.; Roemeling-van Rhijn, M.; Eijken, M.; Jespersen, B.; Reinders, M.; Hoogduijn, M.; Ploeg, R.; et al. Infusing Mesenchymal Stromal Cells into Porcine Kidneys during Normothermic Machine Perfusion: Intact MSCs Can Be Traced and Localised to Glomeruli. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Laing, R.W.; Stubblefield, S.; Wallace, L.; Roobrouck, V.D.; Bhogal, R.H.; Schlegel, A.; Boteon, Y.L.; Reynolds, G.M.; Ting, A.E.; Mirza, D.F.; et al. The Delivery of Multipotent Adult Progenitor Cells to Extended Criteria Human Donor Livers Using Normothermic Machine Perfusion. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1226. [[CrossRef](#)]
76. Pool, M.B.F.; Vos, J.; Eijken, M.; van Pel, M.; Reinders, M.E.J.; Ploeg, R.J.; Hoogduijn, M.J.; Jespersen, B.; Leuvenink, H.G.D.; Moers, C. Treating Ischemically Damaged Porcine Kidneys with Human Bone Marrow- and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells During Ex Vivo Normothermic Machine Perfusion. *Stem Cells Dev.* **2020**, *29*, 1320–1330. [[CrossRef](#)]
77. Thompson, E.R.; Bates, L.; Ibrahim, I.K.; Sewpaul, A.; Stenberg, B.; McNeill, A.; Figueiredo, R.; Girdlestone, T.; Wilkins, G.C.; Irwin, E.A.; et al. Novel delivery of cellular therapy to reduce ischaemia reperfusion injury in kidney transplantation. *Transplantation* **2021**, *21*, 1402–1414.
78. Kovacovics-Bankowski, M.; Streeter, P.R.; Hewett, E.; Van't Hof, W.J.; Deans, R.J.; Maziarz, R.T. Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPC) Are Immunoprivileged and Demonstrate Immunosuppressive Properties on Activated T Cell Population. *Blood* **2005**, *106*, 5227. [[CrossRef](#)]
79. Porada, C.D.; Zanjani, E.D.; Almeida-Porada, G. Adult Mesenchymal Stem Cells: A Pluripotent Population with Multiple Applications. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **2006**, *1*, 365–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Ashcroft, J.; Leighton, P.; Elliott, T.R.; Hosgood, S.A.; Nicholson, M.L.; Kosmoliaptsis, V. Extracellular vesicles in kidney transplantation: A state-of-the-art review. *Kidney Int.* **2022**, *101*, 485–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Corrêa, R.R.; Juncosa, E.M.; Masereeuw, R.; Lindoso, R.S. Extracellular Vesicles as a Therapeutic Tool for Kidney Disease: Current Advances and Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Rigo, F.; De Stefano, N.; Navarro-Tableros, V.; David, E.; Rizza, G.; Catalano, G.; Gilbo, N.; Maione, F.; Gonella, F.; Roggio, D.; et al. Extracellular Vesicles from Human Liver Stem Cells Reduce Injury in an Ex Vivo Normothermic Hypoxic Rat Liver Perfusion Model. *Transplantation* **2018**, *102*, e205. [[CrossRef](#)]
83. Rampino, T.; Gregorini, M.; Germinario, G.; Pattonieri, E.F.; Erasmi, F.; Grignano, M.A.; Bruno, S.; Alomari, E.; Bettati, S.; Asti, A.; et al. Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stromal Cells Delivered during Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion Repair Ischemic/Reperfusion Damage of Kidneys from Extended Criteria Donors. *Biology* **2022**, *11*, 350. [[CrossRef](#)]
84. Thompson, E.R.; Sewpaul, A.; Figueiredo, R.; Bates, L.; Tingle, S.J.; Ferdinand, J.R.; Situmorang, G.R.; Ladak, S.S.; Connelly, C.M.; Hosgood, S.A.; et al. MicroRNA antagonist therapy during normothermic machine perfusion of donor kidneys. *Am. J. Transplant.* **2022**, *22*, 1088–1100. [[CrossRef](#)]
85. Sobiak, J. Przeszczepianie narządów i komórek krwiotwórczych—rys historyczny. *Now. Lek.* **2011**, *80*, 157–161. (In Polish)

Research Article

Punica granatum L. Polyphenolic Extract as an Antioxidant to Prevent Kidney Injury in Metabolic Syndrome Rats

Anna Radajewska ¹, Jakub Szyller ¹, Joanna Niewiadomska,²
Agnieszka Noszczyk-Nowak ² and Iwona Bil-Lula ¹

¹Division of Clinical Chemistry and Laboratory Hematology, Department of Medical Laboratory Diagnostics, Faculty of Pharmacy, Wrocław Medical University, Borowska 211A, 50-556 Wrocław, Poland

²Department of Internal Medicine and Clinic of Diseases of Horses, Dogs and Cats, Faculty of Veterinary Medicine, University of Environmental and Life Sciences, Grunwaldzki Square 47, 50-366 Wrocław, Poland

Correspondence should be addressed to Iwona Bil-Lula; iwona.bil-lula@umw.edu.pl

Received 19 August 2022; Revised 21 November 2022; Accepted 28 November 2022; Published 5 January 2023

Academic Editor: Fatma M. El-Demerdash

Copyright © 2023 Anna Radajewska et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction. Obesity and metabolic syndrome (MetS) constitute a rapidly increasing health problem and contribute to the development of multiple comorbidities like acute and chronic kidney disease. Insulin resistance, inappropriate lipolysis, and excess of free fatty acids (FFAs) are associated with glomerulus hyperfiltration and atherosclerosis. The important component of MetS, oxidative stress, is also involved in the destabilization of kidney function and the progression of kidney injury. Natural polyphenols have the ability to reduce the harmful effect of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS). Extract derived from *Punica granatum* L. is rich in punicalagin that demonstrates positive effects in MetS and its associated diseases. The aim of the study was to investigate the effect of bioactive substances of pomegranate peel to kidney damage associated with the MetS. **Methods.** In this study, we compared biomarkers of oxidative stress in kidney tissue of adult male Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats with MetS and healthy controls that were treated with *Punica granatum* L. extract at a dose of 100 or 200 mg/kg. Additionally, we evaluated the effect of polyphenolic extract on kidney injury markers and remodeling. The concentration of ROS/RNS, oxLDL, glutathione (GSH), kidney injury molecule-1 (KIM-1), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2, MMP-9), and the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured. **Results.** The data showed significant differences in oxidative stress markers between treated and untreated MetS rats. ROS/RNS levels, oxLDL concentration, and SOD activity were lower, whereas CAT activity was higher in rats with MetS receiving polyphenolic extract. After administration of the extract, markers for kidney injury (NGAL, KIM-1) decreased. **Conclusion.** Our study confirmed the usefulness of pomegranate polyphenols in the treatment of MetS and the prevention of kidney damage. However, further, more detailed research is required to establish the mechanism of polyphenol protection.

1. Introduction

Metabolic syndrome (MetS) and obesity are an epidemic and are huge medical problems throughout the world. About one-third of US adults suffer from MetS [1]. In Europe, MetS has in general a 24.3% prevalence (23.9% in men and 24.6% in women) that increases with age (3.7% in people aged 20–29 years to >30% in those 70 years and older) [2]. MetS, also known as insulin resistance syndrome or syndrome X, is a cluster of risk factors for the development of renal disease,

atherosclerotic cardiovascular disease, type 2 diabetes mellitus, and stroke [3–6]. It is defined as glucose intolerance, hypertension, dyslipidemia, and central (intra-abdominal) obesity with insulin resistance and a proinflammatory state [7–9]. MetS is present if three or more of the following criteria are met: waist circumference over 102 cm (40 inches, men) or 89 cm (35 inches, women), blood pressure over 130/85 mmHg, fasting triglyceride level over 150 mg/dL, fasting high-density lipoprotein (HDL) cholesterol level less than 40 mg/dL (men) or 50 mg/dL (women), and fasting

blood sugar above or equal 100 mg/dL [8]. Obesity (especially visceral) plays an important role in the complex pathomechanism of MetS and raises the risk of chronic kidney disease (CKD) by 4-fold [10]. The most widely accepted hypothesis for the underlying pathophysiology of MetS is that insulin resistance is a consequence of visceral obesity, inappropriate lipolysis, excess of free fatty acids (FFAs), and the action of adipokines [11]. FFAs are produced during the hydrolysis of fats and released from adipose tissue during lipolysis. The insulin resistance of adipose tissue impairs the insulin-mediated inhibition of lipolysis, leading to an increase in circulating FFAs that subsequently inhibit the effects of insulin. Lipids and FFAs accumulation in the muscle and insulin resistance result in a reduction in glycogen synthesis and glucose transport due to the inhibition of insulin-dependent glucose uptake. The liver esterifies the fatty acids to triglycerides and secretes them as very low-density lipoproteins (VLDLs). Additionally, fatty acids promote the increased production of glucose and lipogenesis. In the setting of insulin resistance, the rate of lipolysis will increase, resulting in increased fatty acid production [11, 12]. Insulin resistance also causes an increase in serum viscosity which contributes to an increased risk of cardiovascular diseases [12]. Also, there is a positive correlation between fat accumulation, oxidative stress, and inflammation. Obesity and insulin resistance are associated with increased activity of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase leading to the production of reactive oxygen species (ROS) [13]. ROS have many effects related to LDL oxidation, endothelial damage, platelet aggregation, and activation of proinflammatory factors, which initiate a vicious cycle of chronic inflammation, endothelial damage, and fibroblast proliferation that further contributes to the development of hypertension, dyslipidemia, diabetes, and cardiovascular diseases [14]. Patients with MetS have a 2–3 fold higher risk of increased albumin excretion [15]. Thus, MetS is an important predictor of early renal dysfunction [16]. This information provides an essential rationale to verify whether components of MetS can prevent the development and progression of renal damage. CKD is a significant public health problem and is one of the major risk factors for cardiovascular disease (e.g., acute myocardial infarction, heart failure, and arrhythmias) and premature death [17, 18]. MetS may also contribute to the development of acute kidney injury (AKI) [19]. AKI is defined as a sudden decrease in kidney function. It is a broad clinical syndrome encompassing various etiologies, including specific kidney diseases and nonspecific conditions (e.g., toxic injury and ischemia) as well as extrarenal pathology. Criteria for AKI include an increase in serum creatinine (sCr) by $\geq 50\%$ within 7 days, an increase in sCr by ≥ 0.3 mg/dL ($26.5 \mu\text{mol/L}$) within 2 days, or oliguria for ≥ 6 hours [20]. The major signaling pathways involved in AKI, among others, are the renin-angiotensin-aldosterone (RAA) axis, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), transforming growth factor beta (TGF- β), NF- κ B, hypoxia inducing factor (HIF1 α), and oxidative stress similar to MetS [21]. Oxidative stress and lipid peroxidation, characteristics for MetS, correlate with the biomarkers of glomerular and tubular damage in AKI and are the main pathophysiological factor in the

initiation and progression of AKI through depletion of proximal renal tubular antioxidant capacity and induction of free radicals, leading to tubular and epithelial cell dysfunctions [22]. ROS may also influence hemodynamics and inflammation. Inflammatory process and infiltrating leukocytes with high levels of NADPH oxidase activity represent a further source of superoxide during AKI [23]. A role of xanthine oxidase activity in AKI has also been suggested, but the results are not conclusive. Oxidative stress as a consequence of mitochondrial dysfunction and mitochondrial electron transport chain dysfunction during MetS, may represent significant source of ROS contributing to AKI. Also, hypoxic environment reduces renal SOD expression and increases sensitivity to AKI [23].

Adipose tissue is not only a fat reservoir, but it is also a site of adiponectin, leptin, resistin, angiotensin-II (ANG-II), TNF- α , and TGF- β production [24]. The pathophysiology of CKD during the course of MetS is very complex, and the relationship is bidirectional. Injury of podocytes, an increase in glomerular size, and sclerosis of the mesangium are early and key manifestations of MetS and nephropathy in rat models [25]. In humans, obesity is associated with CKD, glomerulomegaly, and proteinuria, which is the first clinical symptom [19, 20, 24–26]. Obesity-related increases in renal tubular sodium reabsorption, hyperfiltration (associated with increased blood pressure), sympathetic nervous system activation, hyperleptinemia, hyperinsulinemia, fatty acids levels, ANG-II, and baroreceptor reflex alterations result in kidney damage and reduced glomerular filtration rate (GFR) [26–28]. An excess of fatty acids leads to a compensatory increase in oxidation and release of lipid peroxidation products [29, 30]. These compounds can lead to apoptosis and fibrosis [31, 32]. Systemic oxidative stress is considered to be the most important underlying pathophysiologic mechanism of MetS. Thus, oxidative stress can be an important link between MetS and kidney damage.

Polyphenols, derived from plants, represent a very large group of at least 10,000 different compounds that possess aromatic rings, one or more ligand groups, and antioxidant properties [33, 34]. Polyphenols can reduce fat deposition via the γ -adiponectin pathway [35], reduce the prevalence of coronary heart disease [36], significantly improve fasting insulinemia, decrease the homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), and reduce the levels of blood glucose and hemoglobin HbA1c [37]. In the kidneys, polyphenols reduce glomerular mesangial matrix dilation and fibrosis [38], inflammatory factors in diabetic and obese nephropathy [39], urea, creatinine, and plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) levels in rats with CKD [40]. They reduce the excretion of albumin in urine and increase creatinine clearance in rats with MetS [41]. The natural bioactive compounds can also prevent the development of AKI [42]. Oxidative stress also regulates the expression of matrix metalloproteinases (MMPs). Many studies have shown a significant relationship between polyphenols and the inhibition of MMPs [43–45]. MMPs are involved in the remodeling of the extracellular matrix and play an important role in renal diseases, including CKD and AKI. Taking into account the pathophysiological mechanisms of MetS and MetS-associated renal diseases,

polyphenols are considered to be a very interesting potential protective and/or therapeutic candidate. Hence, the purpose of this research is the determination of the effect of polyphenolic extract from pomegranate peel on kidney damage in MetS.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Animals. Adult male Zucker Diabetic Fatty (ZDF-Leprfa/Crl) rats were obtained from Sulzfeld (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH). The animals were divided into five groups of six rats each (Figure 1). All animals were fed the same diet (Purina LabDiet 5008, Charles River Laboratories, USA). The control group (MetS-Control) was rats with a leptin receptor missense mutation (ZDF fa/fa). The study group consisted of individuals with a mutation in the leptin receptor gene (ZDF fa/fa) and received polyphenol extract from pomegranate fruit peels mixed with water at a dose of 100 or 200 mg/kg body weight (MetS+100 or MetS+200). Two groups of healthy rats without MetS (ZDF fa/+) received the extract in the same doses (HC+100 and HC+200). The water with the extract was administered through a gastric tube for 8 weeks. The study was approved by the Ethics Committee for Experiments on Animals at the Ludwik Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wroclaw, Poland (Resolution 53/2017).

2.2. Kidney Isolation. Rats were sedated using a mixture of intramuscular anesthetics as follows: ketamine at a dose of 60 mg/kg and medetomidine at a dose of 0.3 mg/kg at week 8 of the experiment. The rats were euthanized via intraperitoneal injection of pentobarbital. The kidneys were rapidly excised from the animals. Organs were weighed and frozen in liquid nitrogen before preparing the homogenates.

2.3. Preparation of Kidney Homogenates. Frozen rat kidneys were crushed using a mortar and pestle in liquid nitrogen. Then, the kidneys underwent three cycles of freezing (in liquid nitrogen) and thawing (at 37°C) in a homogenization buffer (50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 3.1 mmol/L sucrose, 1 mmol/L dithiothreitol, 10 mg/mL leupeptin, 10 mg/mL soybean trypsin inhibitor, 2 mg/mL aprotinin, and 0.1% Triton X-100). After that, the kidney tissue was homogenized mechanically in an ice-cold homogenization buffer. The homogenate was centrifuged (10000 × g at 4°C for 15 minutes). Supernates were collected and stored at -80°C for further biochemical experiments.

2.4. Plant Material and Extract Preparation. Pomegranate (*Punica granatum L.*) is a rich source of polyphenols (mainly punicalagin) and has been widely used in traditional medicine. The polyphenolic extract was prepared from *Punica granatum L.* peels (cultivar Mollar de Eche) delivered from Spain. Dried peels of pomegranate fruit were extracted and reextracted twice with 50% ethanol. The obtained material was concentrated by a rotary evaporator (Rotavapor, Buchi Labortechnik AG, Switzerland) in a water bath at 40°C. Subsequently, the extract was adsorbed using Amberlite

XAD-16 (Brenntag, Essen, Germany) resin, and after ethanol evaporation, the collected fraction was dried in an SPT-200 (Zeamil, Krakow, Poland) vacuum oven.

2.5. Identification and Quantification of Phenolic Compounds Using the LC-PDA-MS QTOF and UPLC-PDA Methods. Previously obtained polyphenol extracts from pomegranate peel were dissolved in MeOH/H₂O/ascorbic acid (30:68:1 v/v/m) with 1% of a 37% hydrochloric acid mixture and performed on the ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) system equipped with a photodiode array detector (PDA; Waters Corporation, Milford, MA) coupled to a quadrupole time-of-flight-mass spectrometry (QTOF-MS, Waters, Manchester, UK) with electrospray ionization (ESI) as a source operating in negative and positive ion modes with spectra acquired over a mass range from m/z 100 to 1800. Chromatographic separation was performed using UPLC BEH C18 columns (1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm; Waters Corporation, Milford, USA). A mobile phase flow rate of 0.42 mL/min throughout the gradient was used for elution. Water (acidified with 0.1% formic acid, v/v) and acetonitrile with 0.1% formic acid were used as mobile phases (A and B, respectively). The gradient was started with 99% of A in isocratic conditions for 1 minute, then an 11-minute linear gradient of 1% to 40% of B was applied. The B was increased to 100% at 12 to 14 minutes, and finally, returned to the initial conditions (99% of A) for 2 min as the reequilibration step. The optimal injected volume was 10 μL. QTOF-MS experiments were performed in negative mode before and after fragmentation. Individual polyphenols were characterized by retention times and molecular masses. Collision-induced fragmentation experiments were performed using argon as the collision gas. The optimum values of the UPLC and QTOF-MS parameters were a capillary and cone voltage of 2500 V and 30 V, respectively. The capillary temperature was set to 300°C and the source heater temperature at 100°C with a drying gas (nitrogen) flow rate of 300 L/h. The results are presented in Table 1.

2.6. Measurement of Total Protein Concentration. The concentration of total protein in the kidney homogenates was measured by the Bradford method using Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad) and a Spark Multimode Microplate Reader (Tecan Trading AG, Switzerland). Bovine serum albumin (BSA, heat shock fraction, ≥98%, Sigma-Aldrich) served as the protein standard.

2.7. Assessment of Superoxide Dismutase Activity. Total copper-zinc superoxide dismutase activity (SOD1) was measured in tissue homogenates with the help of the Superoxide Dismutase Assay Kit (Item no. 706002, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA), which uses tetrazolium salt for detection of superoxide radicals. It is produced using xanthine oxidase and hypoxanthine. Collected homogenates were diluted 100-fold and assayed following the assay protocol. Absorbance was measured at 450 nm (Spark Multimode Microplate Reader, Tecan Trading AG, Switzerland). All measurements were performed in duplicate. Units of SOD1

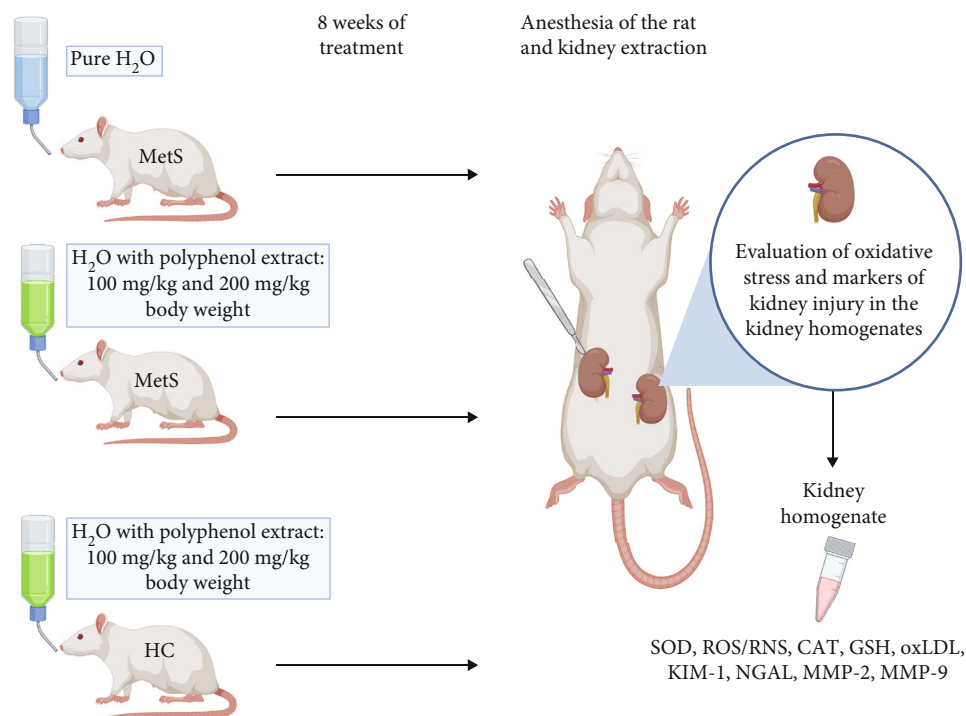


FIGURE 1: Scheme of the experiment, created with <http://BioRender.com/>.

TABLE 1: Mass spectrometry (MS) characteristics and the content of phenolic compounds in pomegranate peel extract. Ranked by retention time (Rt).

Rt	MS [M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS [M-H] ⁻ (m/z)	Name of compound	Polyphenol content
1.67	331	271/169	Galloyl-glucose	2.00 ± 0.03
1.73	781	721/601	Punicalin α/A	3.11 ± 0.06
2.02	1083	611/331/146	HHDP-gallagyl-hexoside (punicalagin)	4.20 ± 0.09
2.12	1083	781/622/301	Punicalagin isomer	14.82 ± 1.04
2.33	933	631/450/301	Ellagitannin	4.71 ± 0.40
2.87	1083	781/301	HHDP-gallagyl-hexoside (punicalagin)	93.91 ± 2.05
3.12	1085	907/783/301	Ellagic acid derivative	2.49 ± 0.53
3.69	1083	781/301	HHDP-gallagyl-hexoside (punicalagin)	157.0 ± 2.65
3.89	799	301	Granatin A	4.74 ± 0.32
5.08	783	481/301	Ellagitannin	25.86 ± 1.53
6.20	1085	933/301	Digalloyl-gallagyl-hexoside	10.37 ± 0.65
6.25	783	481/301	Ellagitannin	13.51 ± 0.99
6.38	463	301	Ellagic acid-hexoside	33.63 ± 1.23
6.89	951	907/635/301	Galloyl-HHDP-DHHDP-hex (granatin B)	2.68 ± 0.11
			Total (mg/g dw)	373.05

activity were calculated from a standard curve using purified bovine erythrocyte SOD1 enzyme. The activity of SOD1 was expressed in U/mL. One unit of SOD1 activity is defined as the amount of enzyme needed to dismutase 50% of available superoxide radicals. The activity of SOD1 in kidney homogenate was converted to milligrams of total protein and expressed as U/mg protein.

2.8. Determination of Catalase Activity. Catalase (CAT) activity in kidney homogenates was determined by the ultraviolet (UV) spectrophotometric method of Aebi. Each sample of tissue lysate was diluted 501-fold (10 μL sample was mixed with 5 mL of phosphate buffer and kept on ice). A sodium, potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4), was prepared by dissolving 6.81 g of KH₂PO₄ (Cat. no.

117420202, Chempur, Poland) and 8.90 g of Na_2HPO_4 (Cat. no. 117992801, Chempur, Poland) in 1000 mL of distilled water. The solutions were mixed using the proportion of 1 : 1.5 (v/v). In a quartz cuvette containing 1000 μL of diluted kidney homogenate, 500 μL of 20 mM H_2O_2 in phosphate buffer was added, and the decrease in absorbance was read at 240 nm for 30 seconds in a spectrophotometer (UV-Vis Double Beam HALO DB-20 Spectrofotometer, Dynamica GmbH, Switzerland). The 20 mM H_2O_2 solution was freshly prepared from 3% H_2O_2 (Galfarm, Poland) and standardized using a molar extinction coefficient ($\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 240 nm). This solution was used to determine CAT activity. All samples were assessed in triplicate. One unit of CAT will decompose 1.0 micromole of hydrogen peroxide to oxygen and water per minute at a pH of 7.0 and temperature of 25°C with a hydrogen peroxide substrate concentration of 20 mM.

2.9. Determination of Glutathione Concentration. A Glutathione (GSH) Assay Kit (Item no. 703002, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) was used to measure GSH levels in kidney homogenate. The reaction between sulfhydryl groups of GSH and Ellman's reagent (DTNB, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid) results in the yellow-colored product 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB). Samples were diluted 100-fold. The absorbance of TNB was measured at 410 nm using a microplate reader (Spark Multimode Microplate Reader, Tecan Trading AG, Switzerland). All measurements were performed in duplicate. The GSH concentration was expressed in $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein.

2.10. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Kidney Homogenates. The OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit (Cell Biolabs, San Diego, USA) was used to determine the oxidative stress in kidney homogenates. The assay measures total ROS and RNS, including hydrogen peroxide (H_2O_2), nitric oxide (NO), peroxy radical (ROO^\bullet), and peroxynitrite anion (ONOO^-), using a fluorogenic probe, dichlorodihydrofluorescein DiOxyQ (DCFH-DiOxyQ). The probe was primed with a quench removal reagent for the highly reactive DCFH form. In this reactive state and in the presence of ROS and RNS, the DCFH is rapidly oxidized to the highly fluorescent 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF). Fluorescence intensity is proportional to total ROS/RNS levels within the sample. The total ROS/RNS level was normalized to the total protein concentration.

2.11. Oxidized LDL (OxLDL) Concentration. OxLDL concentrations in tissue homogenates were determined using the ELISA method (Item no. E0527r, Human OxLDL ELISA Kit, EIAab Science Inc., Wuhan, China). Analysis was conducted in duplicate. The microplate was precoated with an anti-oxLDL antibody. Samples were added to the wells with a biotin-conjugated antibody preparation specific for the antigen, and then, avidin conjugated to horseradish peroxidase was added. Then, a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) was added to each well. The enzyme-substrate reaction was terminated by the addition of a sulphuric acid solution. The color change was measured spectrophotometrically at a

wavelength of 450 nm (Spark Multimode Microplate Reader, Tecan Trading AG, Switzerland). The oxLDL concentration was expressed in ng/mg protein.

2.12. MMP-2 and MMP-9 Concentrations in Kidney Homogenates. MMP-2 and MMP-9 concentrations in kidney homogenates were measured using quantitative Quantikine ELISA Assay for Total MMP-2 and Rat Total MMP-9 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. MMP-2 and MMP-9 were immobilized with monoclonal antibodies specific to the protein and were detected with the use of an anti-Total-MMP-2 and anti-Total-MMP-9 polyclonal antibody conjugated to streptavidin-horseradish (HRP) peroxidase. Next, TMB substrate solution was added to the reaction. As a stop solution, sulphuric acid was used. The minimum detectable dose of the test was 0.033 ng/mL for MMP-2 and 0.013 ng/mL for MMP-9.

2.13. NGAL in Kidney Homogenates. NGAL concentrations in kidney homogenates were measured using the quantitative ELISA Assay for NGAL (EIAab Science Inc., Wuhan, China) according to the manufacturer's instructions. NGAL immobilized with a monoclonal antibody specific to this protein was detected using a biotin-conjugated anti-NGAL polyclonal antibody. Then, avidin conjugated to horseradish peroxidase was added. Next, TMB substrate solution was added to develop the reaction. As a stop solution, sulphuric acid was used. The minimum detectable dose of the test was 0.460 ng/mL.

2.14. Kidney Injury Molecule-1 Concentration. Kidney injury molecule-1 (KIM-1) concentrations in kidney homogenates were measured using the quantitative ELISA Assay for KIM-1 (EIAab Science Inc., Wuhan, China) according to the manufacturer's instructions. Similar to the NGAL assay, KIM-1 was immobilized with a monoclonal antibody specific to this protein and was detected with the use of a biotin-conjugated anti-NGAL polyclonal antibody. Then, avidin conjugated to horseradish peroxidase was added. Next, TMB substrate solution was added to develop the reaction. As a stop solution, sulphuric acid was used. The minimum detectable dose of the test was 0.089 ng/mL.

2.15. Statistical Analysis. The experimental data were analyzed using GraphPad Prism 8.0.1 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA). The Shapiro-Wilk normality test was used to assess the normality of variance changes. The Student's *t*-test or Mann-Whitney *U* test was used for comparisons between two groups of measurement data. Results were expressed as mean \pm SEM, and a *p* value of < 0.05 was regarded as statistically significant.

3. Results

3.1. The Influence of Polyphenolic Extract on Oxidative Status in Kidney Tissue. Pomegranate peel polyphenols have a pronounced effect on the activity of SOD (Figure 2) and the concentration of ROS/RNS in kidney tissue (Figure 3). SOD activity in the kidneys of rats receiving 100 mg/kg

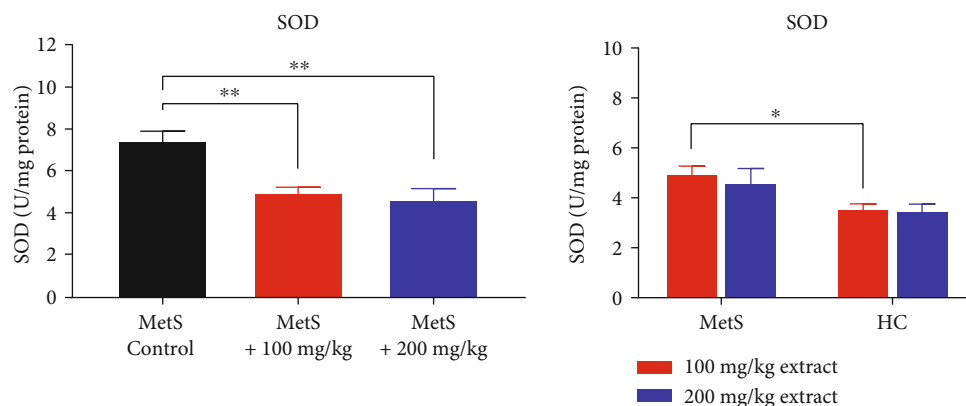


FIGURE 2: SOD activity in kidney tissue (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

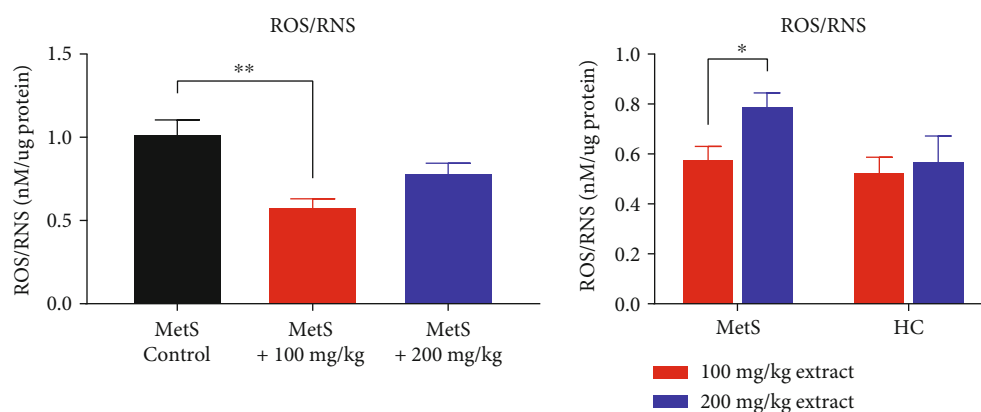


FIGURE 3: ROS/RNS concentration in kidney tissue (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

and 200 mg/kg of polyphenolic extract was significantly lower than in subjects with MetS and receiving a standard diet (4.89 ± 0.80 U/mg, $p = 0.0087$ and 4.53 ± 1.41 , $p = 0.0043$ vs. 7.38 ± 1.21 U/mg, respectively). There were no differences between the doses. Healthy animals receiving the extract in identical doses had lower SOD activities than animals with a mutation in the leptin gene treated with polyphenols; however, the difference was statistically significant only in the group receiving 100 mg/kg of extract (3.51 ± 0.51 U/mg vs. 4.89 ± 0.80 U/mg, $p = 0.015$ and 3.44 ± 0.64 U/mg vs. 4.53 ± 1.41 , $p = 0.420$ for 200 mg/kg of polyphenols, respectively). This indicates that the polyphenolic extract (200 mg/kg and 100 mg/kg) significantly reduces SOD activity.

Lower extract doses led to a significant reduction in ROS/RNS concentration (Figure 3) (0.58 ± 0.11 nM/ μ g vs. 1.03 ± 0.18 nM/ μ g, $p = 0.008$). The dose of 200 mg/kg reduced the ROS/RNS concentration, but the reduction was greater at the lower dose (0.79 ± 0.12 nM/ μ g vs. 1.03 ± 0.18 nM/ μ g, $p = 0.055$). No differences in ROS/RNS concentrations were found between healthy and MetS animals after the use of polyphenols (0.53 ± 0.12 nM/ μ g vs. 0.58 ± 0.11 nM/ μ g, $p = 0.421$ for HC+100 vs. MetS+100 and 0.57 ± 0.22 nM/ μ g vs. 0.79 ± 0.12 nM/ μ g, $p = 0.222$ for HC+200 vs. MetS+200). MetS rats had significantly higher kidney ROS/RNS concentrations (0.79 ± 0.12 nM/ μ g vs. $0.58 \pm$

0.11 nM/ μ g, $p = 0.039$) after using the higher dose of the extract. This shows that a low dose of the extract has an antioxidant effect, and a high dose may have prooxidative properties.

CAT activity was higher in rats with MetS receiving polyphenolic extract than in animals only with MetS, but only subjects in the MetS+100 group had a borderline value of statistical significance (3.62 ± 0.93 kU/mg vs. 2.79 ± 0.61 kU/mg, $p = 0.051$ for MetS+100 group and 3.31 ± 0.86 kU/mg vs. 2.79 ± 0.61 kU/mg, $p = 0.421$ for MetS+200 group, Figure 4). There was no significant difference in CAT activity at the polyphenol doses between MetS and healthy animals (3.62 ± 0.94 kU/mg and 3.90 ± 0.29 kU/mg for MetS+100 vs. HC+100, $p = 0.609$ and 3.31 ± 0.86 kU/mg and 3.51 ± 0.85 kU/mg for MetS+200 vs. HC+200, $p = 0.547$). However, there is a tendency for decreased CAT activity after using a higher dose of the extract.

No differences in GSH concentrations were found after polyphenol administration in MetS animals (12.17 ± 4.69 μ M/mg vs. 12.42 ± 2.09 μ M/mg, $p = 0.548$ and 12.15 ± 1.41 μ M/mg vs. 12.42 ± 2.09 μ M/mg, $p = 0.841$ for 100 mg/kg and 200 mg/kg of polyphenols, respectively, Figure 5). In the group of animals treated with polyphenols, a lower concentration of GSH was observed in healthy rats compared to animals with MetS after the use of the extract at a dose of 100 mg/kg (8.82 ± 2.10 μ M/mg vs. 12.17 ± 4.69 μ M/mg, $p = 0.151$) and a statistically significant lower concentration of

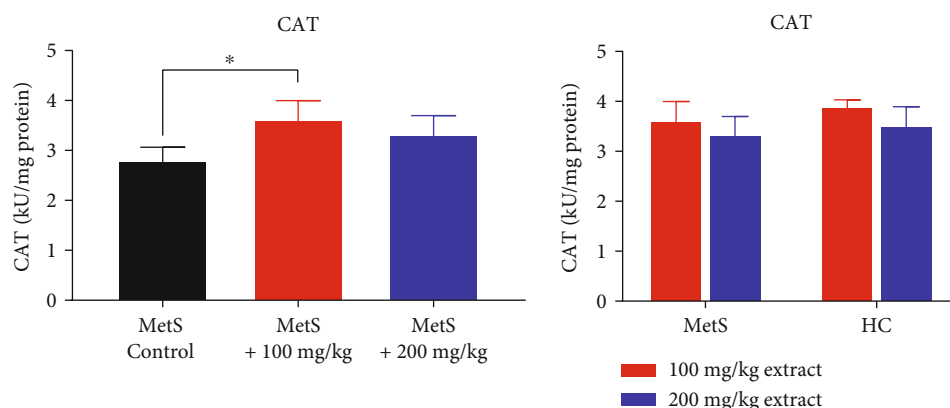


FIGURE 4: CAT activity in kidney tissue (* $p < 0.05$).

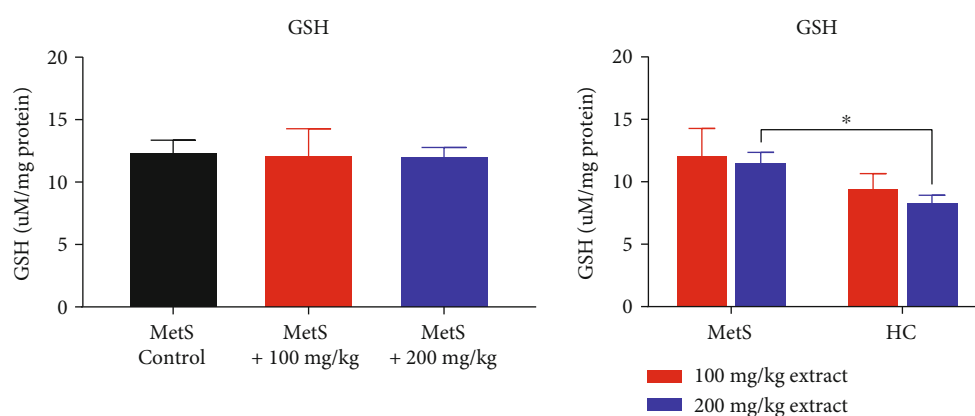


FIGURE 5: GSH concentration in kidney tissue (* $p < 0.05$).

GSH at the dose of 200 mg/kg ($8.36 \pm 1.25 \mu\text{M}/\text{mg}$ vs. $12.15 \pm 1.41 \mu\text{M}/\text{mg}$, $p = 0.016$).

3.2. The Influence of Polyphenolic Extract on Lipid Peroxidation. Polyphenolic extract at a dose of 200 mg/kg significantly decreased the concentration of oxLDL in animals with MetS ($36.77 \pm 3.62 \text{ ng}/\text{mg}$ vs. $58.49 \pm 20.62 \text{ ng}/\text{mg}$, $p = 0.016$, Figure 6). However, this effect was not observed at the dose of 100 mg/kg ($50.63 \pm 26.98 \text{ ng}/\text{mg}$ vs. $58.49 \pm 20.62 \text{ ng}/\text{mg}$, $p = 0.662$). Significant differences were also observed between healthy animals receiving the extract and those with MetS. Healthy rats had significantly lower oxLDL concentrations ($18.04 \pm 2.29 \text{ ng}/\text{mg}$ vs. $50.63 \pm 26.98 \text{ ng}/\text{mg}$, $p = 0.009$ for HC+100 vs. MetS+100 and $22.06 \pm 7.24 \text{ ng}/\text{mg}$ vs. $36.77 \pm 3.62 \text{ ng}/\text{mg}$, $p = 0.016$ for HC+200 vs. MetS+200).

3.3. The Influence of Polyphenolic Extract on KIM-1 and NGAL. Polyphenol extract did not lower the concentration of kidney damage markers (KIM-1 and NGAL) in MetS kidneys. However, the level of KIM-1 was higher in the MetS group. There were no statistically significant changes in the concentration of KIM-1 in rats treated with the polyphenol extract compared to the untreated group (Figure 7). However, there was a trend in the reduction of KIM-1 concentration for both doses of the extract ($75.54 \pm 33.98 \text{ ng}/\text{mg}$ vs. $134.54 \pm 93.23 \text{ ng}/\text{mL}$, $p = 0.310$ for MetS+100 vs. MetS-

Control and $73.92 \pm 22.85 \text{ ng}/\text{mL}$ vs. $134.54 \pm 93.23 \text{ ng}/\text{mL}$, $p = 0.421$ for MetS+200 vs. MetS-Control). Healthy animals from the HC+100 group had a significantly lower concentration of KIM-1 than those in the MetS+100 group ($28.26 \pm 7.04 \text{ ng}/\text{mg}$ vs. $73.92 \pm 22.85 \text{ ng}/\text{mL}$, $p = 0.032$).

Pomegranate peel extract did not significantly change the concentration of NGAL, regardless of the dose ($101.67 \pm 48.40 \text{ ng}/\text{mg}$ vs. $119.88 \pm 46.09 \text{ ng}/\text{mg}$, $p = 0.691$ MetS+100 vs. MetS-Control and $97.77 \pm 13.62 \text{ ng}/\text{mg}$ vs. $119.88 \pm 46.09 \text{ ng}/\text{mg}$, $p = 0.841$ for MetS+200 vs. MetS-Control, Figure 7). Healthy animals have a slightly lower concentration of NGAL, especially in the HC+100 group.

3.4. The Influence of Polyphenolic Extract on MMPs. The administration of polyphenol extract to MetS animals did not affect the concentrations of MMP-2 and MMP-9 in kidney tissue (Figure 8). Only healthy rats had a lower concentration of MMP-2 compared to MetS animals receiving an extract dose of 200 mg/kg ($1.04 \pm 0.14 \text{ ng}/\text{mg}$ vs. $1.43 \pm 0.03 \text{ ng}/\text{mg}$, $p = 0.008$).

4. Discussion

The use of *Punica granatum L.* extract has gained interest thanks to its antioxidative and anti-inflammatory properties (Figure 9) [46–51]. Almost half of a pomegranate fruit's

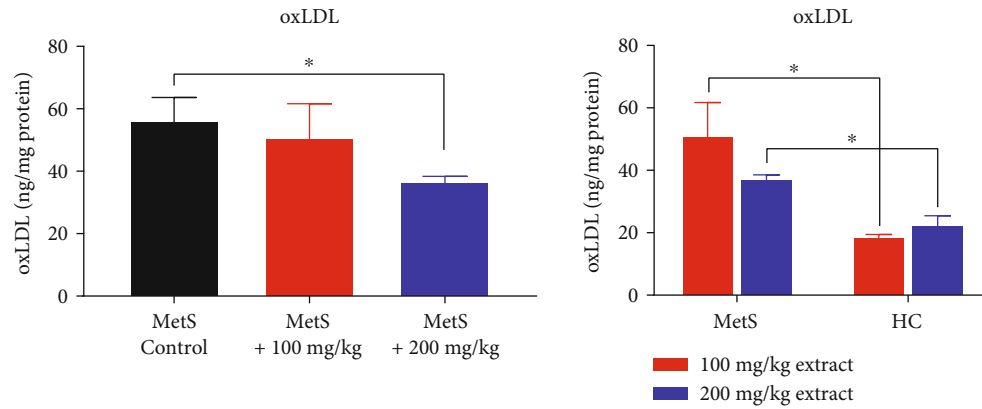


FIGURE 6: OxLDL concentration in kidney tissue (* $p < 0.05$).

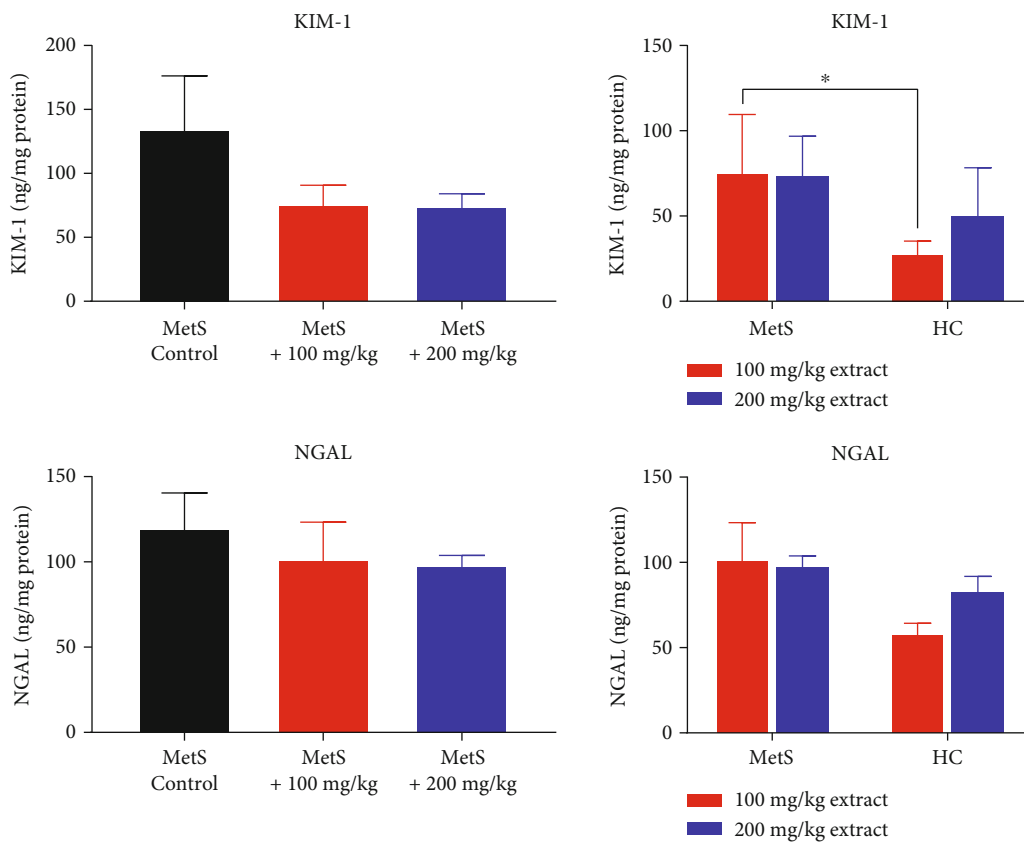


FIGURE 7: Concentrations of KIM-1 and NGAL in kidney tissue (* $p < 0.05$).

weight is from the peel. The peel is rich in bioactive substances such as vitamins, flavonoids, phenolics, ellagitannins, and minerals [52]. Different products derived from pomegranates such as extracts, oils, and juices have been confirmed to positively affect MetS, diabetes, and comorbid diseases [53]. Pomegranate has the ability to reduce insulin resistance via the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and therefore regulates abnormal oxidative stress in macrophages and inhibits pathological cardiac changes. In addition, pomegranate and punicalagin improve lipid metabolism [53, 54]. Pomegranate extract administration can reduce total cholesterol and triglyceride levels

[53]. Treatment with the extract has a positive effect on the pathologic accumulation of atherosclerotic lesions by reducing macrophage oxLDL uptake [54]. Punicalagin has been proven to activate the forkhead box O1 (FoxO1) pathway, which is thought to prevent mitochondrial loss and vascular disturbance. Moreover, punicalagin downregulates the expression of IL-6 and MMP-1 which contributes to inflammation [55]. Punicalagin is proved to regulate cell death in particular apoptosis and pyroptosis. The treatment with punicalagin decreases Bax (proapoptotic factor) and upregulates Bcl-2 (antiapoptotic factor) which led to downregulation of caspases involved in apoptotic cell death—caspase

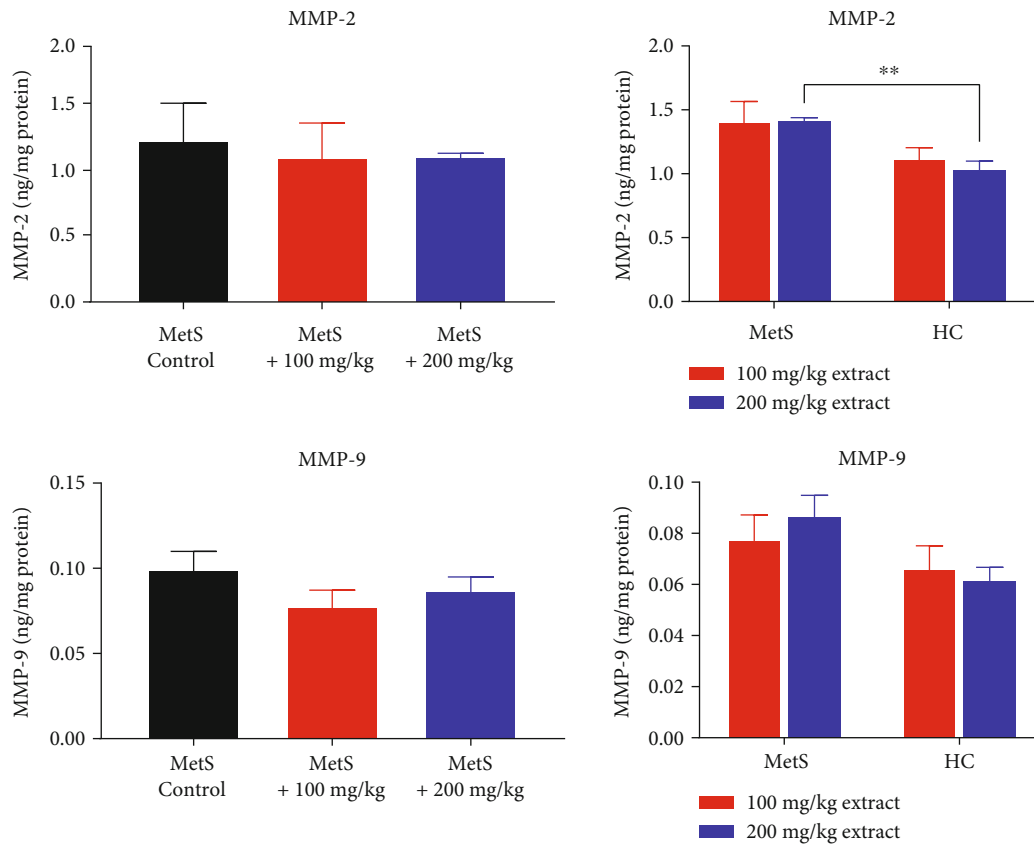


FIGURE 8: Concentration of MMP-2 and MMP-9 in kidney tissue (** $p < 0.01$).

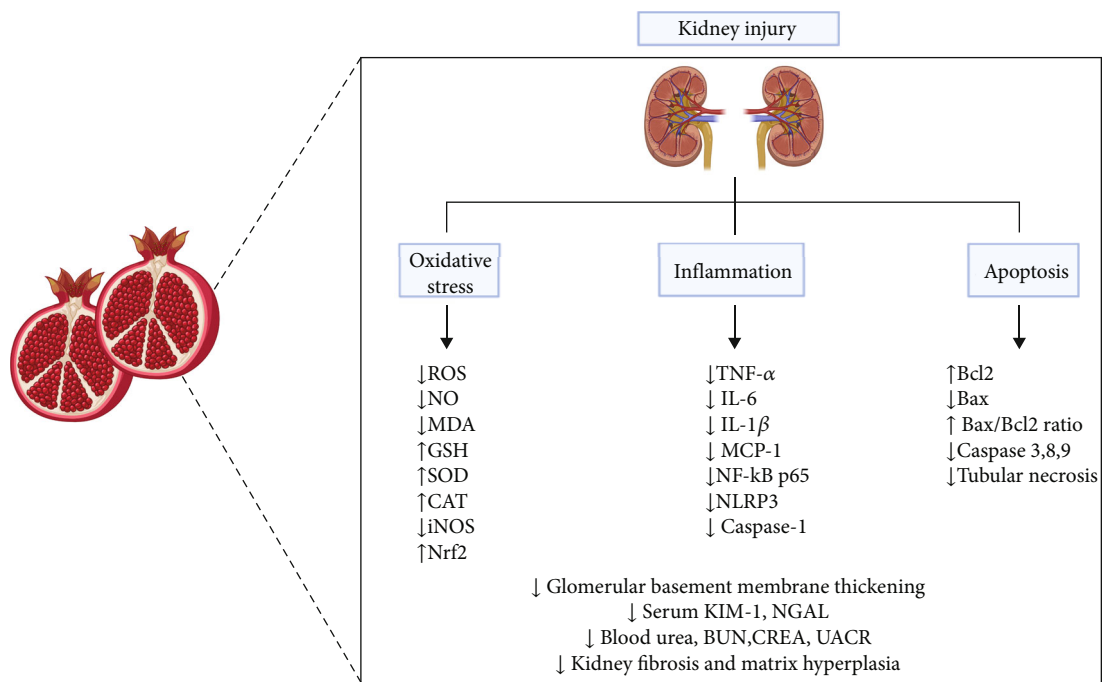


FIGURE 9: The positive effect of punicalagin on kidney injury [46–49, 50, 51] created with <http://BioRender.com/>.

3,8 and 9 [50]. Besides, punicalagin mitigate pyroptosis via HMGB-1/TLR4/NF- κ B signaling pathway by downregulation of the expression of involved proteins [46]. In this

study, we evaluated the positive effects of *Punica granatum* L. polyphenol-rich extract on oxidative stress and kidney injury in MetS. We showed that MetS contributes to kidney

injury, and antioxidants can reduce this damage. Moreover, we confirmed that the administration of *Punica granatum L.* extract has positive effects on the reduction of oxidative stress and changes in the activity of antioxidative enzymes. Previously, it has been reported that MetS correlates with increased oxidative stress and lower antioxidative defense capacity due to the reduction of antioxidant enzyme levels [37]. Obesity and diabetes influence kidney functioning and may induce AKI [56, 57]. So far, pathophysiological mechanisms are not well defined; however, multiple factors have been proposed as predictors of the development of AKI and its progression into CKD. Among these, glomerulopathy, inflammation, dysfunction of the endothelium, activation of the sympathetic nervous system, and renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) are mentioned [58]. Hemodynamic changes such as an increased GFR and albumin excretion accompanied by glomerulopathy led to podocyte cell damage and mesangial enlargement [58]. Obese patients and patients suffering from diabetes often demonstrate hypertension that disturbs the normal blood flow through the kidneys [57]. Besides, oxidative stress is proposed as an important risk factor for AKI development and its progression [58]. Downregulation of the endogenous antioxidant system and increased production of ROS correlate with the levels of kidney injury markers (KIM-1, NGAL) and renal tubular cell injury [50]. For this reason, naturally existing polyphenols have been investigated as a potential protector from AKI and CKD, due to their ability to reduce inflammation and oxidative stress which are the main triggers of kidney dysfunction [50, 59].

SOD is an enzyme that catalyzes the conversion of superoxide into molecular oxygen and hydrogen peroxide. We observed that higher SOD activity was found in the kidneys of MetS animals, and treatment with *Punica granatum L.* extract reduced the activity. Punicalagin reduces ROS generation and exhibits strong superoxide radical scavenging activity [60]. We have found that a low concentration of pomegranate extract can reduce ROS/RNS levels in kidney tissue. Reducing oxidative stress by the direct scavenging of ROS/RNS in the kidneys can lead to a decrease in SOD activity. A number of MetS risk factors, such as fasting glucose levels, waist circumference, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) serum levels, high blood pressure, and previous treatment for hypertension might affect the antioxidant enzyme systems. The LIPGENE study showed that patients with 3, 4, or 5 MetS factors had higher SOD levels than those with only two [61]. Therefore, SOD can be upregulated by high concentrations of ROS and increased oxidative stress. This could explain our findings, that SOD activity was the highest in the MetS groups which correlate with higher ROS/RNS concentrations. Surprisingly, many of the ellagitannins exhibited a relatively high prooxidant activity. Punicalagin shows antioxidative activity in the prooxidant activity test [62]. In our study, the higher concentration of the extract corresponded with higher ROS/RNS levels compared to the lower concentration in the MetS rates. This indicates the prooxidative effects of the extract when used at higher doses. In another study, a polyphenol-rich diet has been confirmed to positively affect SOD activity

and the expression of NF-E2-related factor 2 (Nrf2) which is a transcription factor that regulates antioxidant enzyme activities. Besides, the kidneys of animals with MetS on a blueberry-enriched diet demonstrated fewer pathological changes and organ fibrosis [63]. Interestingly, the diet significantly increased both SOD and CAT activity, indicating a beneficial antioxidant effect in MetS animals [63]. In our study, the use of polyphenols was associated with a decrease in SOD activity and ROS/RNS concentrations.

CAT is the second most important enzyme in the antioxidative system. CAT plays a crucial role in the reduction of hydrogen peroxide. In our study, CAT activity in the kidney tissue homogenates was higher in both groups treated with polyphenolic extract, but a significant increase was only found after using the concentration of 100 mg/kg. There is a tendency for pomegranate extract to upregulate CAT activity, but the higher dose was less effective. This showed an increase in antioxidant activity to values close to those occurring in healthy rats receiving the extract.

The dysregulation of ROS is well-known in diabetic kidney disease (DKD). DKD impairs normal mitochondrial function, including mitochondrial biogenesis, fission, and fusion [64]. But also metabolic changes and the above-mentioned Nrf2 play a major role in the etiology and pathogenesis of DKD. Renal exposure to high blood glucose levels is associated with an overproduction of ROS and a reduction of antioxidants. Hyperglycemia-induced ROS production leads to the increased formation of advanced glycation end products (AGEs) and activation of nuclear factor κ B (NF κ B) pathways which lead to abnormal endothelial and vascular cell activity [65]. Oxidative stress induces cellular apoptosis, glomerular distortion, and the regression of foot processes in podocytes, with consequent loss of integrity of the glomerular barrier. These abnormalities overlap other vascular alterations associated with persistently high levels of ROS [66].

We did not detect any significant changes in GSH concentrations in the kidneys of rats with MetS, not treated and treated with polyphenol-rich extract, indicating that the extract did not affect GSH concentrations in MetS animals. However, we observed a higher concentration of GSH in kidneys treated with extract in MetS in comparison to HC. An adequate supply of GSH in the kidneys is very important to maintain normal functioning and protection against oxidative stress. It is associated with an increased aerobic metabolism and kidney exposure to high concentrations of various oxidants [67]. Renal GSH metabolism is one of the most important aspects in the study of kidney function in MetS. Downregulation of GSH biosynthesis contributes to oxidative stress and kidney injury. Intracellular thiol concentrations, which control key molecular mechanisms of cells, are especially important in patients suffering from CKD [68]. One study indicated that GSH significantly suppressed the diabetes-induced increase in urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, albumin, and creatinine levels. The authors concluded that GSH treatment can beneficially affect diabetic rats and suggests the usefulness of dietary GSH treatment to reduce diabetic complications [69].

A high concentration of ROS/RNS leads to the oxidation of proteins and lipids. OxLDL is an indicator of abnormal lipid modification and oxidative stress. The high concentrations of LDL and oxLDL, found in MetS, may induce pathological changes in the glomerulus [70]. The accumulation of circulating LDL in the glomeruli provokes mesangial cell proliferation and renal impairment followed by glomerulosclerosis [70]. OxLDL activates apoptosis and the progression of renal damage [71]. Also, it stimulates the oxLDL receptor, CD36 expression, and activation of Nrf2, which initiates the prooxidative pathway and contributes to kidney fibrosis [70, 72]. Our findings confirmed that oxLDL concentrations were higher in the groups with MetS compared to the corresponding healthy groups. Furthermore, treatment with high-concentration pomegranate polyphenolic extract significantly reduced the tissue levels of oxLDL. Pomegranate juice has previously been shown to reduce the uptake of oxLDL by macrophages and the biosynthesis of cholesterol [63, 73]. Reduced oxidative stress and its consequences regulate the formation of foam cells and atherosclerosis [63, 73]. High levels of LDL and oxLDL may induce pathological changes in the glomerulus, the most vulnerable part of the nephron [70].

KIM-1 is a biomarker of kidney injury since its expression is very low in healthy kidneys and is expressed by cells of the proximal tubule. It is a transmembrane glycoprotein that is rapidly upregulated and secreted into the urine after the damaging acts [74]. However, the progression of diabetes-related kidney disease and kidney fibrosis results in a reduction in KIM-1 expression and urinary levels [10]. NGAL is a small protein that belongs to the lipocalin family. It is physiologically produced at a low level by various organs, such as the kidneys, lungs, trachea, stomach, and colon [61]. Harmful conditions such as ischemic and toxic AKI as well as diabetic nephropathy increase both the expression of KIM-1 and NGAL [22, 61, 75]. KIM-1 and NGAL expression and serum levels are also elevated in diabetic nephropathy [50]. We found a tendency for animals given the polyphenolic extract in both doses had a lower concentration of KIM-1. In addition, significantly lower concentrations of KIM-1 were found in the kidney tissue homogenates of healthy rats treated with 100 mg/kg of extract compared to the corresponding group of rats with MetS (MetS+100 mg/kg). We noticed no significant difference in NGAL concentrations between the groups. In other studies, treatment with pomegranate extract in AKI reduces the expression and serum concentration of KIM-1 and NGAL. Pomegranate due to its antioxidative effects can reduce serum levels of injury markers during gentamicin-associated nephrotoxicity, which corresponded to the histological changes in the kidney structure [75]. Curcumin, a natural strong antioxidant has been proven to positively affect kidney functioning by reducing cell death [59]. However, curcumin reduces the expression of kidney injury markers and their levels in the urine of diabetic rats [59]. It has been demonstrated that high punicalagin concentrations cause liver injury and fibrosis [51], as well as damage to the kidney structure in cattle following *Terminalia oblongata* combustion [76]. This could explain our findings that high concentrations of pomegranate extract were associated with higher levels of

kidney injury markers in the healthy group treated with 200 mg/kg of extract.

MMPs are a class of proteins that degrade extracellular matrix components and contribute to the physiological and pathophysiological remodeling of tissues including the kidney [76]. MMPs are thought to play an important role in the progression of kidney disease leading to kidney fibrosis and inflammation. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are members of the MMP family that degrades collagen and other structural proteins frequently found in kidney cells. The activity is controlled at several stages including protein expression, posttranslational modifications, and through specific inhibitors [77]. High expression and activation of the gelatinases MMP-2 and MMP-9 lead to the epithelial-mesenchymal transition of tubular cells and changes in the basement membrane. As a result, mesenchymal cells migrate and form an abnormal fibrotic core [78]. MMP-2 and MMP-9 activity can also be activated by increased oxidative stress which plays an important role in the pathogenesis of CKD [79]. Inhibition of MMP-2 has been demonstrated to have positive effect on heart ischemia-reperfusion injury [80]. Tang et al. demonstrated that punicalagin can reduce the activity of MMP-2 and MMP-9 in HeLa cells while increasing the expression of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 (TIMP-1) and TIMP-3 [81]. In our study, we noted that MMP-2 concentrations in the kidney were significantly higher in the MetS group treated with high concentrations of polyphenolic extract (200 mg/kg) compared to the corresponding healthy group. This might be a warning sign for the progression of abnormal changes in the kidneys of rats with MetS.

It has been reported that patients with MetS have a higher blood viscosity [82]. In MetS, oxidative stress and chronic systemic inflammation increase blood viscosity by decreasing erythrocyte deformability and the rheological properties of blood [83]. Obese patients with metabolic disorders are at great risk of developing hyperviscosity syndrome (HVS) which alters tissue perfusion and can lead to complications such as nephropathy, AKI, and glucose intolerance [82]. Impaired kidney function and AKI are generally an effect of tubular obstruction and renal ischemia. The use of natural antioxidants, e.g., punicalagin or berberine, may be of benefit in the treatment of AKI [22, 84].

5. Limitations

Our study has a few limitations. First, there is no control group of healthy rats, which should be watered only with pure water without polyphenolic extract. Second, the sample size was limited since there are only 6 animals in each group. Moreover, we suggest that further study should be performed to provide information about kidney morphological changes and various parameters in the urine, and blood should be evaluated.

6. Conclusions

This study provides evidence about the increased oxidative stress in MetS kidneys. We detected that *Punica granatum L.* extract may have two opposite effects: antioxidative and

prooxidative, and the effect is related on the extract concentration. Moreover, we showed that *Punica granatum L.* extract has a positive effect on the kidneys by regulating ROS/RNS production and modifying the endogenous anti-oxidative system. This experiment allowed us to investigate the effect of different bioactive substances of pomegranate peel and not just one particular polyphenol to kidney damage associated with the metabolic syndrome. Treatment with polyphenolic extract may be beneficial for MetS kidneys prone to AKI and structural damage.

Data Availability

The data that support the findings of this study are openly available at the request of the reader.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Authors' Contributions

Anna Radajewska and Jakub Szyller contributed equally to this work.

Acknowledgments

This study was supported by the Wrocław Medical University Grant no. SUBK.D010.22.010.

References

- [1] M. G. Saklayen, "The global epidemic of the metabolic syndrome," *Current Hypertension Reports*, vol. 12, no. 2, pp. 135–142, 2018.
- [2] A. Scuteri, S. Laurent, F. Cucca et al., "Metabolic syndrome across Europe: different clusters of risk factors," *European Journal of Preventive Cardiology*, vol. 22, no. 4, pp. 486–491, 2015.
- [3] J.-A. Shin, J.-H. Lee, S.-Y. Lim et al., "Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness," *Journal of Diabetes Investigation*, vol. 4, no. 4, pp. 334–343, 2013.
- [4] F. Locatelli, P. Pozzoni, and L. del Vecchio, "Renal manifestations in the metabolic syndrome," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 17, 4 suppl 2, pp. S81–S85, 2006.
- [5] K. G. M. M. Alberti, P. Z. Zimmet, and WHO Consultation, "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation," *Diabetic Medicine*, vol. 15, no. 7, pp. 539–553, 1998.
- [6] S. M. Grundy, B. Hansen, S. C. Smith, J. I. Cleeman, and R. A. Kahn, "Clinical management of metabolic syndrome," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 24, no. 2, p. 24, 2004.
- [7] G. M. Reaven, "Role of insulin resistance in human disease," *Diabetes*, vol. 37, no. 12, pp. 1595–1607, 1988.
- [8] M. Hanefeld and F. Schaper, "Dyslipidemia in the metabolic syndrome," in *In: The Metabolic Syndrome at the Beginning of the XXI Century*, pp. 347–358, Elsevier, 2005.
- [9] H. Yanai, Y. Tomono, K. Ito, N. Furutani, H. Yoshida, and N. Tada, "The underlying mechanisms for development of hypertension in the metabolic syndrome," *Nutrition Journal*, vol. 7, no. 1, p. 10, 2008.
- [10] M. F. Landecho, I. Colina, A. Huerta, A. Fortuño, G. Zalba, and O. Beloqui, "Connection between the early phases of kidney disease and the metabolic syndrome," *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, vol. 64, no. 5, pp. 373–378, 2011.
- [11] E. McCracken, M. Monaghan, and S. Sreenivasan, "Pathophysiology of the metabolic syndrome," *Clinics in Dermatology*, vol. 36, no. 1, pp. 14–20, 2018.
- [12] A. Gnasso, M. Cacia, C. Cortese et al., "No effect on the short-term of a decrease in blood viscosity on insulin resistance," *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 68, no. 1, pp. 45–50, 2018.
- [13] E. DeVallance, Y. Li, M. J. Jurczak, E. Cifuentes-Pagano, and P. J. Pagano, "The role of NADPH oxidases in the etiology of obesity and metabolic syndrome: contribution of individual isoforms and cell biology," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 31, no. 10, pp. 687–709, 2019.
- [14] Y. Rochlani, N. V. Pothineni, S. Kovelamudi, and J. L. Mehta, "Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds," *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, vol. 11, no. 8, pp. 215–225, 2017.
- [15] H. Bi, Y. Wu, C. Zhao, and G. Long, "Association between the dietary factors and metabolic syndrome with chronic kidney disease in Chinese adults," *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, vol. 7, no. 11, pp. 4448–4454, 2014.
- [16] S. D. Navaneethan, J. D. Schold, and T. R. Srinivas, "Metabolic syndrome and mild to moderate chronic kidney disease among minorities," *Seminars in Nephrology*, vol. 30, no. 1, pp. 51–58, 2010.
- [17] A. S. Go, G. M. Chertow, D. Fan, C. E. McCulloch, and C. Y. Hsu, "Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization," *New England Journal of Medicine*, vol. 351, no. 13, pp. 1296–1305, 2004.
- [18] G. B. D. Silva, A. C. S. N. Bentes, E. D. F. Daher, and S. M. A. D. Matos, "Obesity and kidney disease," *Nefrología*, vol. 39, no. 1, pp. 65–69, 2017.
- [19] G. L. Cavoli, R. Passantino, A. Ferrantelli et al., "Acute kidney injury in a patient with metabolic syndrome," *Bio Impacts*, vol. 5, no. 3, pp. 155–157, 2015.
- [20] J. A. Kellum, P. Romagnani, G. Ashuntantang, C. Ronco, A. Zarbock, and H. J. Anders, "Acute kidney injury," *Nature Reviews. Disease Primers*, vol. 7, no. 1, p. 52, 2021.
- [21] H. Husi and C. Human, "Molecular determinants of acute kidney injury," *Journal of Injury and Violence Research*, vol. 7, no. 2, pp. 75–86, 2014.
- [22] H. M. Al-Kuraishy, A. I. Al-Gareeb, and M. S. Sadek Al-Naimi, "Pomegranate attenuates acute gentamicin-induced nephrotoxicity in Sprague-Dawley rats: the potential antioxidant and anti-inflammatory effects," *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 12, no. 3, pp. 484–486, 2019.
- [23] K. A. Nath and S. M. Norby, "Reactive oxygen species and acute renal failure," *The American Journal of Medicine*, vol. 109, no. 8, pp. 665–678, 2000.
- [24] H. Cao, "Adipocytokines in obesity and metabolic disease," *Journal of Endocrinology*, vol. 220, no. 2, pp. T47–T59, 2014.
- [25] M. Nagase, S. Yoshida, S. Shibata et al., "Enhanced aldosterone signaling in the early nephropathy of rats with metabolic

- syndrome: possible contribution of fat-derived factors,” *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 17, no. 12, pp. 3438–3446, 2006.
- [26] J. D. Kopple and U. Feroze, “The effect of obesity on chronic kidney disease,” *Journal of Renal Nutrition*, vol. 21, no. 1, pp. 66–71, 2011.
- [27] J. D. Kopple, “Obesity and chronic kidney disease,” *Journal of Renal Nutrition*, vol. 20, no. 5, pp. S29–S30, 2010.
- [28] J. E. Hall, J. R. Henegar, T. M. Dwyer et al., “Is obesity a major cause of chronic kidney disease?,” *Advances in Renal Replacement Therapy*, vol. 11, no. 1, pp. 41–54, 2004.
- [29] A. Bakhtiari, K. Hajian-Tilaki, S. Omidvar, and F. Nasiri Amiri, “Association of lipid peroxidation and antioxidant status with metabolic syndrome in Iranian healthy elderly women,” *Biomedical Reports*, vol. 7, no. 4, pp. 331–336, 2017.
- [30] H. M. Sarbijani, M. Khoshnia, and A. Marjani, “The association between metabolic syndrome and serum levels of lipid peroxidation and interleukin-6 in Gorgan,” *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, vol. 10, no. 1, pp. S86–S89, 2016.
- [31] L. Magtanong, P. J. Ko, and S. J. Dixon, “Emerging roles for lipids in non-apoptotic cell death,” *Cell Death and Differentiation*, vol. 23, no. 7, pp. 1099–1109, 2016.
- [32] L.-J. Su, J.-H. Zhang, H. Gomez et al., “Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2019, Article ID 5080843, 13 pages, 2019.
- [33] A.-N. Li, S. Li, Y.-J. Zhang, X. R. Xu, Y. M. Chen, and H. B. Li, “Resources and biological activities of natural polyphenols,” *Nutrients*, vol. 6, no. 12, pp. 6020–6047, 2014.
- [34] E. Brglez Mojzer, M. Knez Hrnčič, M. Škerget, Ž. Knez, and U. Bren, “Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects,” *Molecules*, vol. 21, no. 7, p. 901, 2016.
- [35] C. Tian, X. Ye, R. Zhang et al., “Green tea polyphenols reduced fat deposits in high fat-fed rats via ERK 1/2-PPAR γ -adiponectin pathway,” *PLoS One*, vol. 8, no. 1, article e53796, 2013.
- [36] C. Tian, Q. Huang, L. Yang et al., “Green tea consumption is associated with reduced incident CHD and improved CHD-related biomarkers in the Dongfeng-Tongji cohort,” *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, p. 24353, 2016.
- [37] K. Liu, M. Luo, and S. Wei, “The bioprotective effects of polyphenols on metabolic syndrome against oxidative stress: evidences and perspectives,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2019, Article ID 6713194, 16 pages, 2019.
- [38] M. S. Garud and Y. A. Kulkarni, “Gallic acid attenuates type I diabetic nephropathy in rats,” *Chemico-Biological Interactions*, vol. 282, pp. 69–76, 2018.
- [39] H. Eo, J. E. Park, Y. Jeon, and Y. Lim, “Ameliorative effect of *Ecklonia cava* polyphenol extract on renal inflammation associated with aberrant energy metabolism and oxidative stress in high fat diet-induced obese mice,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 65, no. 19, pp. 3811–3818, 2017.
- [40] B. H. Ali, M. Al Za, S. A. Adham, J. Yasin, A. Nemmar, and N. Schupp, “Therapeutic effect of chrysin on adenine-induced chronic kidney disease in rats,” *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 38, no. 1, pp. 248–257, 2016.
- [41] F. L. Rodríguez-Fierros, V. Guarner-Lans, M. E. Soto et al., “Modulation of renal function in a metabolic syndrome rat model by antioxidants in *Hibiscus sabdariffa* L,” *Molecules*, vol. 26, no. 7, p. 2074, 2021.
- [42] M. Funamoto, H. Masumoto, K. Takaori et al., “Green tea polyphenol prevents diabetic rats from acute kidney injury after cardiopulmonary bypass,” *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 101, no. 4, pp. 1507–1513, 2016.
- [43] N. Calabriso, M. Massaro, E. Scoditti et al., “Red grape skin polyphenols blunt matrix metalloproteinase-2 and -9 activity and expression in cell models of vascular inflammation: protective role in degenerative and inflammatory diseases,” *Molecules*, vol. 21, no. 9, p. 1147, 2016.
- [44] L. Crasci, M. R. Lauro, G. Puglisi, and A. Panico, “Natural antioxidant polyphenols on inflammation management: anti-glycation activity vs metalloproteinases inhibition,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 58, no. 6, pp. 893–904, 2018.
- [45] N. Atale, C. B. Mishra, S. Kohli et al., “Anti-inflammatory effects of *S. cumini* seed extract on gelatinase-B (MMP-9) regulation against hyperglycemic cardiomyocyte stress,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2021, Article ID 8839479, 14 pages, 2021.
- [46] D. Jin, B. Zhang, Q. Li, J. Tu, and B. Zhou, “Effect of punicalagin on multiple targets in streptozotocin/high-fat diet-induced diabetic mice,” *Food & Function*, vol. 11, no. 12, pp. 10617–10634, 2020.
- [47] X. An, Y. Zhang, Y. Cao, J. Chen, H. Qin, and L. Yang, “Punicalagin protects diabetic nephropathy by inhibiting pyroptosis based on TXNIP/NLRP3 pathway,” *Nutrients*, vol. 12, no. 5, p. 1516, 2020.
- [48] S. H. Aladaileh, F. K. Al-Swailmi, M. H. Abukhalil, A. F. Ahmeda, and A. M. Mahmoud, “Punicalagin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis in rats,” *Life Sciences*, vol. 286, article 120071, 2021.
- [49] J. Xu, K. Cao, X. Liu, L. Zhao, Z. Feng, and J. Liu, “Punicalagin regulates signaling pathways in inflammation-associated chronic diseases,” *Antioxidants*, vol. 11, p. 29, 2022.
- [50] A. A. Fouad, H. O. Qutub, and W. N. Al-Melhim, “Nephroprotection of punicalagin in rat model of endotoxemic acute kidney injury,” *Toxicology Mechanisms and Methods*, vol. 26, no. 7, pp. 538–543, 2016.
- [51] E. Shaygannia, M. Bahmani, B. Zamanzad, and M. Rafeian-Kopaei, “A review study on *Punica granatum* L,” *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, vol. 21, no. 3, pp. 221–227, 2016.
- [52] S. A. Mahesar, A. H. Kori, S. T. H. Sherazi, A. A. Kandhro, and Z. H. Laghari, “Pomegranate (*Punica granatum*) seed oil,” in *Fruit Oils: Chemistry and Functionality*, pp. 691–709, Springer International Publishing, Cham, 2019.
- [53] S. Medjakovic and A. Jungbauer, “Pomegranate: a fruit that ameliorates metabolic syndrome,” *Food & Function*, vol. 4, no. 1, pp. 19–39, 2013.
- [54] C. Hou, W. Zhang, J. Li et al., “Beneficial effects of pomegranate on lipid metabolism in metabolic disorders,” *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 63, no. 16, p. 1800773, 2019.
- [55] X. Liu, K. Cao, W. Lv et al., “Punicalagin attenuates endothelial dysfunction by activating FoxO1, a pivotal regulating switch of mitochondrial biogenesis,” *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 135, pp. 251–260, 2019.
- [56] S. M. W. Yu and J. V. Bonventre, “Acute kidney injury and progression of diabetic kidney disease,” *Advances in Chronic Kidney Disease*, vol. 25, no. 2, pp. 166–180, 2018.

- [57] J. I. Lakkis and M. R. Weir, "Obesity and kidney disease," *Progress in Cardiovascular Diseases*, vol. 61, no. 2, pp. 157–167, 2018.
- [58] H. Schiffl and S. M. Lang, "Obesity, acute kidney injury and outcome of critical illness," *International Urology and Nephrology*, vol. 49, no. 3, pp. 461–466, 2017.
- [59] H. Ghasemi, B. Einollahi, N. Kheiripour, S. R. Hosseini-Zijoud, and M. F. Nezhad, "Protective effects of curcumin on diabetic nephropathy via attenuation of kidney injury molecule 1 (KIM-1) and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) expression and alleviation of oxidative stress in rats with type 1 diabetes," *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 22, pp. 376–383, 2019.
- [60] A. P. Kulkarni, S. M. Aradhya, and S. Divakar, "Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant - punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit," *Food Chemistry*, vol. 87, no. 4, pp. 551–557, 2004.
- [61] K. Siddiqui, S. S. Joy, T. P. George, M. Mujammami, and A. A. Alfadda, "Potential role and excretion level of urinary transferin, KIM-1, RBP, MCP-1 and NGAL markers in diabetic nephropathy," *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, vol. 13, pp. 5103–5111, 2020.
- [62] J. Moilanen, M. Karonen, P. Tähtinen, R. Jacquet, S. Quideau, and J. P. Salminen, "Biological activity of ellagitannins: effects as anti-oxidants, pro-oxidants and metal chelators," *Phytochemistry*, vol. 125, pp. 65–72, 2016.
- [63] B. Fuhrman, N. Volkova, and M. Aviram, "Pomegranate juice inhibits oxidized LDL uptake and cholesterol biosynthesis in macrophages," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 16, no. 9, pp. 570–576, 2005.
- [64] C. Tang, J. Cai, X.-M. Yin, J. M. Weinberg, M. A. Venkatachalam, and Z. Dong, "Mitochondrial quality control in kidney injury and repair," *Nature Reviews. Nephrology*, vol. 17, no. 5, pp. 299–318, 2021.
- [65] S. S. Korshunov, V. P. Skulachev, and A. A. Starkov, "High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria," *FEBS Letters*, vol. 416, no. 1, pp. 15–18, 1997.
- [66] K. R. Tuttle, G. L. Bakris, R. D. Toto, J. B. McGill, K. Hu, and P. W. Anderson, "The effect of ruboxistaurin on nephropathy in type 2 diabetes," *Diabetes Care*, vol. 28, no. 11, pp. 2686–2690, 2005.
- [67] L. H. Lash, "Role of glutathione transport processes in kidney function," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 204, no. 3, pp. 329–342, 2005.
- [68] F. Santangelo, V. Witko-Sarsat, T. Drueke, and B. Descamps-Latscha, "Restoring glutathione as a therapeutic strategy in chronic kidney disease," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 19, no. 8, pp. 1951–1955, 2004.
- [69] Y. Ueno, M. Kizaki, R. Nakagiri, T. Kamiya, H. Sumi, and T. Osawa, "Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy," *The Journal of Nutrition*, vol. 132, no. 5, pp. 897–900, 2002.
- [70] R. Rodrigo and C. Bosco, "Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. A review," *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 142, no. 3–4, pp. 317–327, 2006.
- [71] Y. Nishida, H. Oda, and N. Yorioka, "Effect of lipoproteins on mesangial cell proliferation," *Kidney International*, vol. 56, pp. S51–S53, 1999.
- [72] Z. Liu, Y. Sun, and H. Zhang, *Nrf 2 play an protective role in Oxldl induced fibrosis in renal tubular cells*, Published Online First, 2021.
- [73] M. Kaplan, T. Hayek, A. Raz et al., "Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis," *The Journal of Nutrition*, vol. 131, no. 8, pp. 2082–2089, 2001.
- [74] T. Ichimura, J. V. Bonventre, V. Bailly et al., "Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 7, pp. 4135–4142, 1998.
- [75] H. M. Al-Kuraishy, A. I. Al-Gareeb, and M. S. Al-Naimi, "Pomegranate protects renal proximal tubules during gentamicin induced-nephrotoxicity in rats," *Journal of Contemporary Medical Sciences*, vol. 5, pp. 35–40, 2019.
- [76] P. B. Oelrichs, C. M. Pearce, J. Zhu, and L. J. Filippich, "Isolation and structure determination of terminalin a toxic condensed tannin from *Terminalia oblongata*," *Natural Toxins*, vol. 2, no. 3, pp. 144–150, 1994.
- [77] A. Krzywonos-Zawadzka, A. Franczak, M. A. J. Moser, A. Olejnik, G. Sawicki, and I. Bil-Lula, "Pharmacological protection of kidney grafts from cold perfusion-induced injury," *BioMed Research International*, vol. 2019, Article ID 9617087, 8 pages, 2019.
- [78] H. Zhao, Y. Dong, X. Tian et al., "Matrix metalloproteinases contribute to kidney fibrosis in chronic kidney diseases," *World Journal of Nephrology*, vol. 2, no. 3, pp. 84–89, 2013.
- [79] Z. Cheng, M. H. Limbu, Z. Wang et al., "MMP-2 and 9 in chronic kidney disease," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 4, p. 776, 2017.
- [80] M. Banaszkiwicz, A. Krzywonos-Zawadzka, A. Olejnik, A. Noszczyk-Nowak, and I. Bil-Lula, "Silencing RNA for MMPs may be utilized for cardioprotection," *Cardiovascular Therapeutics*, vol. 2022, Article ID 9729018, 12 pages, 2022.
- [81] J. Tang, B. Li, S. Hong et al., "Punicalagin suppresses the proliferation and invasion of cervical cancer cells through inhibition of the β -catenin pathway," *Molecular Medicine Reports*, vol. 16, no. 2, pp. 1439–1444, 2017.
- [82] H. M. Al-Kuraishy, A. I. Al-Gareeb, M. M. El-Bouseary, F. I. Sonbol, and G. E. S. Batiha, "Hyperviscosity syndrome in COVID-19 and related vaccines: exploring of uncertainties," in *Clinical and Experimental Medicine*, pp. 1–10, Springer-Verlag Italia, Milan, Italy, 2022.
- [83] P. Gyawali, R. S. Richards, E. U. Nwose, and P. T. Bwititi, "Whole-blood viscosity and metabolic syndrome," *Clinical Lipidology*, vol. 7, no. 6, pp. 709–719, 2012.
- [84] M. Alorabi, S. Cavalu, H. M. Al-Kuraishy et al., "Pentoxifylline and berberine mitigate diclofenac-induced acute nephrotoxicity in male rats via modulation of inflammation and oxidative stress," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 152, article 113225, 2022.



Article

Mitoquinone Alleviates Donation after Cardiac Death Kidney Injury during Hypothermic Machine Perfusion in Rat Model

Anna Radajewska ¹, Jakub Szyller ¹, Anna Krzywonos-Zawadzka ^{1,*}, Agnieszka Olejnik ¹, Grzegorz Sawicki ^{1,2} and Iwona Bil-Lula ^{1,*}

¹ Division of Clinical Chemistry and Laboratory Hematology, Department of Medical Laboratory Diagnostics, Faculty of Pharmacy, Wrocław Medical University, Borowska 211A, 50-556 Wrocław, Poland; anna.radajewska@umw.edu.pl (A.R.); jakub.szyller@umw.edu.pl (J.S.); agnieszka.olejnik@umw.edu.pl (A.O.); grzegorz.sawicki@umw.edu.pl (G.S.)

² Department of Anatomy, Physiology and Pharmacology, College of Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK S7N 5E5, Canada

* Correspondence: anna.krzywonos-zawadzka@umw.edu.pl (A.K.-Z.); iwona.bil-lula@umw.edu.pl (I.B.-L.); Tel.: +48-717-840-628 (I.B.-L.)

Abstract: Transplanted organs are subjected to harmful conditions through stopping blood flow, hypothermic storage of the graft, and subsequent reperfusion. In particular, kidneys donated from patients after cardiac arrest (DCD) are classified as more vulnerable to ischemia–reperfusion injury (IRI). Hypothermic machine perfusion is proposed as a solution for better kidney storage before transplantation, and it is a good platform for additional graft treatment. Antioxidants have gained interest in regenerative medicine due to their ability to scavenge reactive oxygen species (ROS), which play a key role in IRI. We evaluated the effect of Mitoquinone (MitoQ), a strong mitochondria-targeted antioxidant, administered directly to the perfusing buffer. Rat kidneys were isolated, randomly classified into one of the following groups, donation after brainstem death (DBD), DCD, and DCD with MitoQ, and perfused for 22 hours with a hypothermic machine perfusion system. Subsequently, we detected levels of kidney injury (KIM-1) and oxidative stress (ROS/RNS, cytochrome C oxidase, and mitochondrial integrity) markers. We compared the activation of the apoptosis pathway (caspase 3 and 9), the concentration of phosphorylated Akt (pAkt), and the pAkt/total Akt ratio. MitoQ reduces KIM-1 concentration, total ROS/RNS, and the level of caspases. We observed a decrease in pAkt and the pAkt/total Akt ratio after drug administration. The length of warm ischemia time negatively impacts the graft condition. However, MitoQ added to the perfusing system as an ‘on pump’ therapy mitigates injury to the kidney before transplantation by inhibiting apoptosis and reducing ROS/RNS levels. We propose MitoQ as a potential drug for DCD graft preconditioning.

Keywords: kidney graft; hypothermic machine perfusion; MitoQ; ischemia–reperfusion injury; oxidative stress



Citation: Radajewska, A.; Szyller, J.; Krzywonos-Zawadzka, A.; Olejnik, A.; Sawicki, G.; Bil-Lula, I. Mitoquinone Alleviates Donation after Cardiac Death Kidney Injury during Hypothermic Machine Perfusion in Rat Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 14772. <https://doi.org/10.3390/ijms241914772>

Academic Editor: Gian Marco Giggeri

Received: 22 August 2023

Revised: 27 September 2023

Accepted: 28 September 2023

Published: 30 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

End-stage renal disease (ESRD) is the final stage of chronic kidney disease (CKD) that needs an urgent intervention, of which kidney transplantation is preferred. Compared to other therapeutic opinions, both hemodialysis and peritoneal dialysis, kidney transplantation increases the patient’s quality of life and reduces the mortality rate [1]. Multiple countries are allowed to use expanded criteria donor (ECD) kidneys in order to increase the pool of kidney grafts suitable for donation. Despite the greater number of possible graft donors, there arises a problem because ECD or kidneys donated after a cardiovascular cause of death (DCD) are more vulnerable to ischemia–reperfusion injury (IRI), and consequently primary nonfunction (PNF) or delayed graft function (DGF) [2].

IRI that occurs right after cardiac arrest, called warm ischemia time (WIT), continues during organ preservation, known as cold ischemia time (CIT) [3]. Reperfusion injury is

related to the restoration of blood flow and paradoxically causes strong damage through oxidative stress and massive reactive oxygen species production [4]. IRI reduces the quality of a kidney transplant and is related to delayed graft function, which requires repeating a dialysis treatment [5]. In addition, transplanted kidneys are at risk of damage due to a reduction in active nephrons, acute injury, and constant toxic injury caused by immunosuppressive drugs. Mechanical perfusion is a recently used solution for DCD kidneys, where the graft is kept in a hypothermic condition and the flow of the buffer provides vascular patency and excises the toxic wastes [6]. Moreover, it is a perfect solution for additional treatment 'on pump' during the unavoidable time of running the surgical procedures. Therefore, preconditioning a kidney graft during machine perfusion is one of the possible ways to improve the kidney's condition.

Oxidative stress is defined as an imbalance between the generation of free radicals or oxidants and the intercellular antioxidative mechanisms that reduce the highly reactive particles [4]. Recently, the adverse effect of oxidants has been thoroughly studied because it is proposed as an important factor for the reactivity of the immune system in diseases like acute and CKD, cardiovascular disease, diabetes, and metabolic syndrome [7]. CKD and dialysis are associated with elevated levels of oxidative stress markers and pro-inflammatory cytokines [8,9]. The whole process of kidney transplantation, starting with surgical intervention, organ storage, reperfusion, and further immunosuppressive treatment, causes massive production of oxidants and insufficient efficiency of the antioxidant system [10,11]. Oxidative stress induces DNA fragmentation and cytochrome C release that trigger the activation of apoptosis [12]. La Manna et al. showed that a low oxidation level and apoptosis 6 months after kidney transplantation correlate with better functioning of the kidney graft. Moreover, they noticed a correlation between IL-10 level and DNA oxidation, and between both IL-6 and IL-10 and the level of fragmented DNA [13].

In this study, we compared the differences in oxidative stress and apoptosis activation between donation after brainstem death (DBD) and DCD kidney grafts subjected to 22 h of hypothermic machine perfusion. Furthermore, we evaluated Mitoquinone (MitoQ) organ preconditioning. We proposed to use a mitochondria-targeted antioxidant, MitoQ, with high antioxidative properties. MitoQ is a lipophilic cation that easily penetrates the mitochondrial membrane barrier and accumulates internally [14]. The additional advantage of MitoQ is the ubiquinone moiety in the structure, which is activated by Complex II to the ubiquinol, reduces ROS, and is recycled back to the form that can be reused, which provides a high antioxidant capacity [14]. Mitoquinone mesylate was previously clinically tested for the treatment of hepatitis C [15], non-alcoholic fatty liver disease [16], and insulin resistance [17]. Nowadays, a few clinical studies have been performed: for antiviral treatment, dilated cardiomyopathy [18], and diastolic dysfunction [19]. MitoQ was also shown to reduce the oxidative damage associated with clinical acute kidney injury (AKI) [20]. Therefore, we chose MitoQ as a good candidate for ameliorating ischemia–reperfusion injury, which is strongly associated with oxidative stress.

2. Results

2.1. The Influence of MitoQ Administration on the Level of Kidney Injury Markers

KIM-1 is known as a marker of kidney injury. We showed elevated concentrations of KIM-1 in the DCD group (113.51 ± 63 ng/mL vs. 260.03 ± 40.72 ng/mL, $p = 0.012$ for DBD vs. DCD) compared to DBD. The administration of the MitoQ into the perfusate buffer reduced the level (260.03 ± 40.72 ng/mL vs. 117.10 ± 25.49 ng/mL, $p = 0.033$ for DCD vs. DCD + MitoQ) (Figure 1).

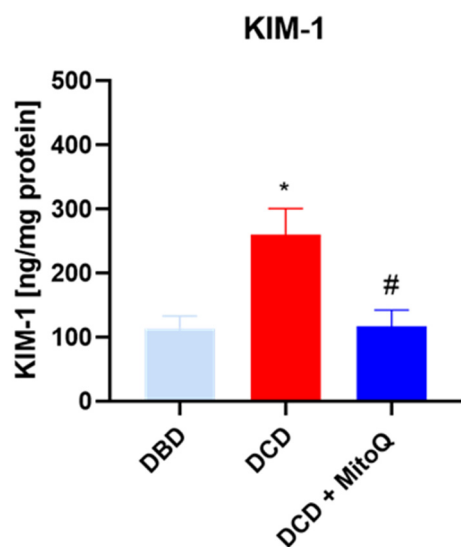


Figure 1. Concentration of KIM-1 in kidney homogenates (data represent mean \pm SD (n = 7), * $p < 0.05$ DBD vs. DCD, # $p < 0.05$ DCD vs. DCD + MitoQ).

2.2. Oxidative Status of Perfused Kidneys

Total ROS/RNS concentrations in kidney tissue homogenates were determined to evaluate the intensity of oxidative stress after the hypothermic machine perfusion of the rat kidneys. We found that the quantity of ROS/RNS was elevated in DCD grafts in comparison to DBD grafts (17.53 ± 7.10 nM/ μ g protein vs. 52.73 ± 13.63 nM/ μ g protein, $p = 0.0368$ for DBD vs. DCD). The group with MitoQ had significantly reduced ROS/RNS levels compared to the DCD group (52.73 ± 13.63 nM/ μ g protein vs. 10.97 ± 2.84 nM/ μ g protein, $p = 0.0134$ for DCD vs. DCD + MitoQ) (Figure 2).

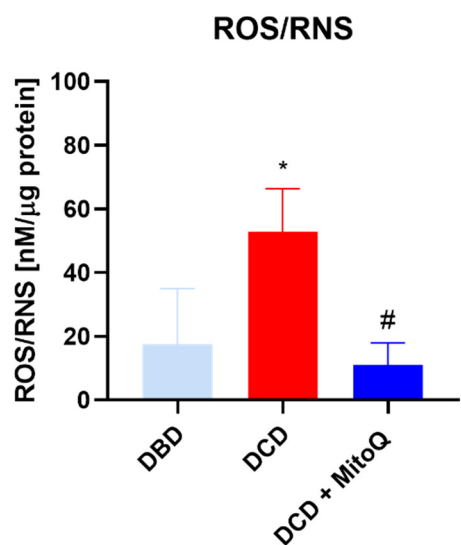


Figure 2. Concentration of ROS/RNS in kidney homogenates (data represent mean \pm SEM (n = 6), * $p < 0.05$ DBD vs. DCD, # $p < 0.05$ DCD vs. DCD + MitoQ).

2.3. Caspase 3 and Caspase 9 Concentrations Are Reduced after MitoQ Administration

Caspase 9 initiates the apoptosis process that further activates caspases 3, 6, or 7, known as apoptosis-executing caspases [21]. Here, we observed the increased concentration of caspase 9 (A) and caspase 3 (B) in the DCD group compared to DBD (casp 9: 7.31 ± 0.43 ng/mg protein vs. 14.86 ± 2.61 ng/mg protein, $p = 0.028$ for DBD vs. DCD; casp 3: 15.86 ± 1.23 ng/mg protein vs. 39.07 ± 5.76 ng/mg protein, $p = 0.002$ for DBD vs. DCD). MitoQ significantly reduced both initialing and executing caspase concentrations in

kidney tissue (casp 9: 14.86 ± 2.61 ng/mg protein vs. 7.15 ± 1.53 ng/mg protein, $p = 0.019$ for DCD vs. DCD + MitoQ; casp 3: 39.07 ± 5.76 ng/mg protein vs. 14.82 ± 2.81 ng/mg protein $p = 0.002$ for DCD vs. DCD + MitoQ) (Figure 3).

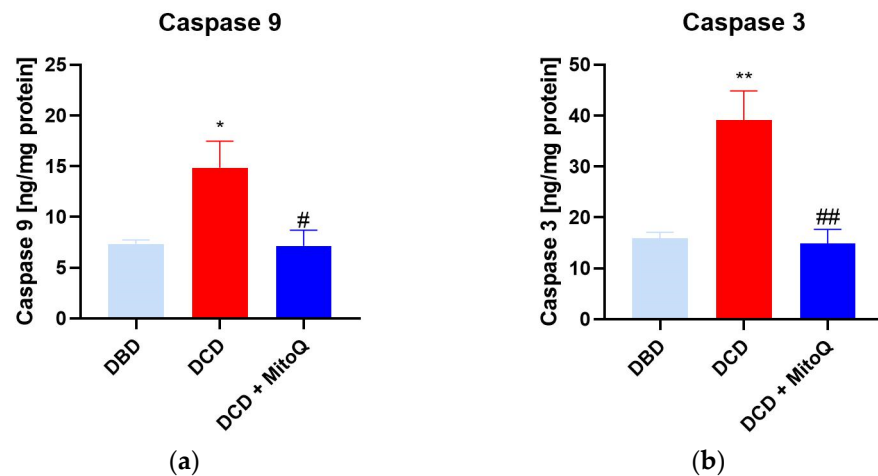


Figure 3. (a) Caspase 9 and (b) caspase 3 concentration in kidney tissue (data represent mean \pm SEM (n = 6), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ DBD vs. DCD, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ DCD vs. DCD + MitoQ).

2.4. MitoQ Mitigate the Ratio of Phosphorylated Akt and Total Akt in Kidney Tissue

An ELISA assay was performed to assess the concentration of phosphorylated Akt (p-Akt) in kidney tissue. The concentration was significantly higher in the DCD group compared to the DBD group (0.15 ± 0.03 ng/mg protein vs. 0.42 ± 0.06 ng/mg protein, $p = 0.005$ for DBD vs. DCD) (a). Moreover, MitoQ administration resulted in p-Akt downregulation (0.42 ± 0.06 ng/mg protein vs. 0.20 ± 0.05 ng/mg protein, $p = 0.02$ for DCD vs. DCD + MitoQ). Subsequently, we calculated the p-Akt to total Akt (tAkt) ratio (b) to show the relative changes of the active form for DBD and DCD kidney grafts, and the impact of MitoQ treatment. Here, we observed the same dependence: the p-Akt/tAkt ratio was higher for DCD grafts (1.48 ± 0.33 arbitrary units vs. 3.72 ± 0.69 arbitrary units, $p = 0.014$ for DBD vs. DCD), and the significant depletion was noticed after MitoQ supplementation (3.72 ± 0.69 arbitrary units vs. 1.79 ± 0.41 arbitrary units, $p = 0.035$ for DCD vs. DCD + MitoQ) (Figure 4).

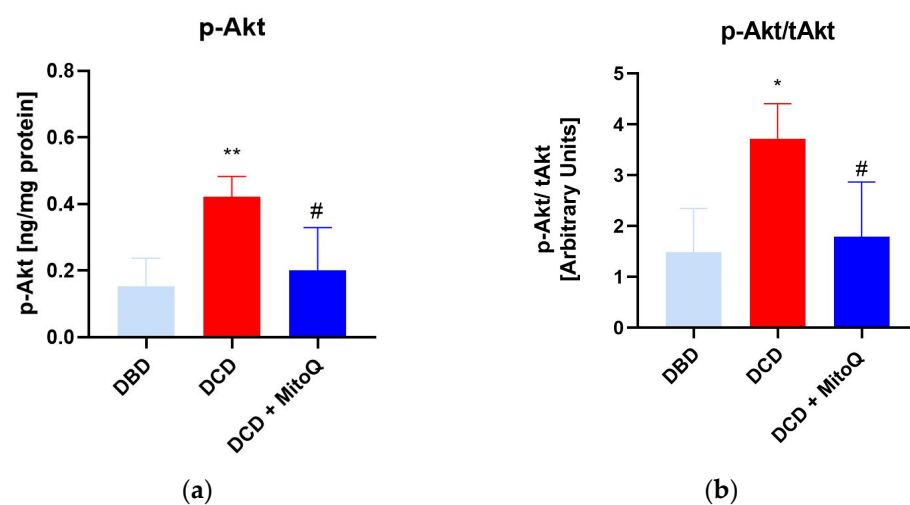


Figure 4. (a) p-Akt concentration and (b) ratio of p-Akt/tAkt in kidney tissue (data represent mean \pm SEM (n = 7), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ DBD vs. DCD, # $p < 0.05$ DCD vs. DCD + MitoQ).

2.5. MitoQ Mitigate the Ratio of Phosphorylated Akt and Total Akt in Kidney Tissue

We did not observe significant differences for cytochrome c oxidase activity (CcO) (A) between DBD and DCD groups (0.04 ± 0.01 Units/mL vs. 0.15 ± 0.05 Units/mL, $p = 0.091$ for DBD vs. DCD) and between the DCD group and the DCD + MitoQ group (0.15 ± 0.05 Units/mL vs. 0.09 ± 0.04 Units/mL, $p = 0.391$ for DCD vs. DCD + MitoQ). We found a slight increase in CcO activity for the DCD group compared to the DBD group, but Mitoquinone administration had no effect on CcO activity. Moreover, we evaluated the mitochondrial outer membrane integrity (B), and this result did not confirm the positive effect of MitoQ administration on the percentage of mitochondria with an undamaged outer membrane ($55.71 \pm 11.82\%$ vs. $68.60 \pm 11.24\%$, $p = 0.728$ for DBD vs. DCD; $68.60 \pm 11.24\%$ vs. $29.43 \pm 14.18\%$, $p = 0.115$ for DCD vs. DCD + MitoQ) (Figure 5).

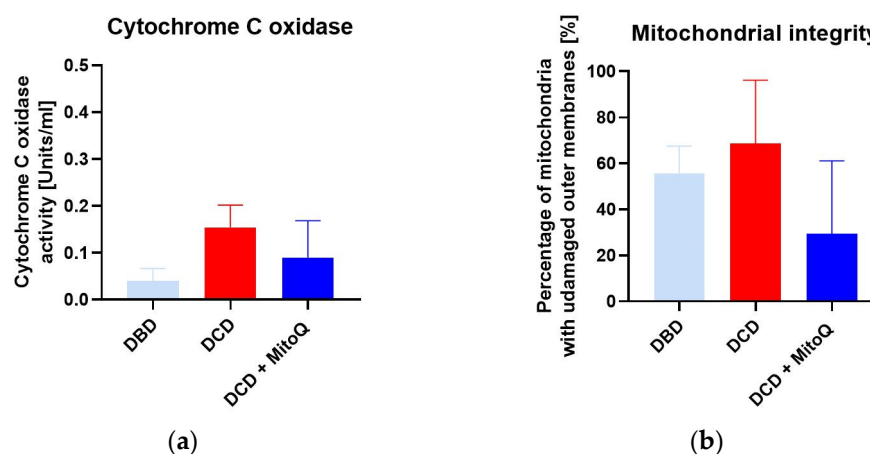


Figure 5. (a) Cytochrome C oxidase activity (CcO) and (b) mitochondrial outer membrane integrity in isolated mitochondria from kidney tissue (data represent mean \pm SEM ($n = 6$)).

3. Discussion

Mitoquinone was previously studied in different animal models of kidney transplantation [22] and tested in clinical trials, demonstrating its safety [23]. However, none of these studies combined long-term hypothermic perfusion (22 h) and the model of kidneys donated after cardiovascular causes of death with prolonged WIT. We focused on the comparison of DBD and DCD rat kidney grafts and the positive effect of MitoQ on DCD grafts. Direct MitoQ administration into the perfusion buffer helps to avoid different drug interactions and poorer MitoQ bioavailability when given orally or intravenously [24]. Additionally, kidney preconditioning might improve graft viability and minimize patient burden. This hypothesis has been illustrated in Figure 6.

In the present study, we showed that Mitoquinone, a mitochondria-targeted antioxidant, reduces ROS/RNS production and prevents the increased apoptosis of kidney cells during the ischemic phase of the IRI of transplanted kidneys. Moreover, we detected decreased concentrations of phosphorylated Akt and the pAkt/tAkt ratio after drug application. We detected an increased level of the early injury marker KIM-1 when the warm ischemia time was longer (like in DCD grafts) compared to DBD grafts, where the warm ischemia time is minimal. The preconditioning of the kidney graft with MitoQ reduced the concentration of the injury marker in DCD kidneys. Our results suggest that Mitoquinone is a possibly good candidate for preconditioning a perfused kidney graft before surgery.

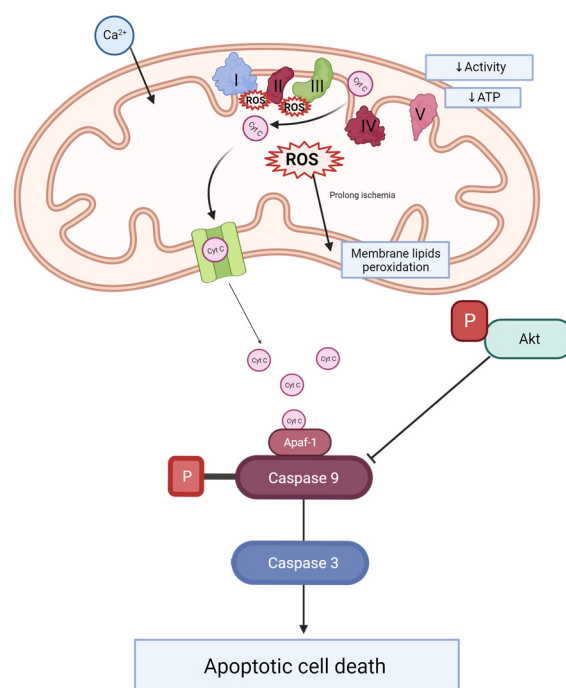


Figure 6. Scheme of caspase activation and Akt signaling during kidney injury. During ischemia-reperfusion, an increase in mitochondrial calcium is observed. This leads to electron transporter chain hyperactivity and increased ROS production. ROS causes the peroxidation of membrane lipids. Changes of ETC activity and mitochondrial membrane potential effects decrease complex V activity and ATP production. Additionally, cytochrome C leakage from mitochondrial space into the cytosol activates caspase 9, which plays an important role in caspase 3 activation and apoptosis. Phosphorylated Akt inhibits caspase 9 activation. Ca^{2+} —calcium, ROS—reactive oxygen species, Cyt C—cytochrome C, I—complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase), II—complex II (succinate dehydrogenase), III—complex III (CoQ-cytochrome c reductase), IV—complex IV (cytochrome c oxidase), V—complex V (F1F0 ATP synthase), ATP—adenosine triphosphate, P—phosphate groups, Akt—AKT serine/threonine kinase 1, ETC—electron transporter chain, Apaf-1—apoptotic protease activating factor 1.

Mitochondria are the main source of energy and reactive oxygen species production. ROS are important in cell signaling, but they also play a significant role in numerous diseases and the aging process [25]. Previous studies have shown that ROS are massively produced during prolonged cold storage of the organ, and during the reperfusion stage [26]. Moreover, the analysis of perfusates collected after human DCD and DBD kidney graft perfusion showed elevated injury markers (NGAL and LDH) for DCD compared to DBD [27]. Our study also proved that longer warm ischemia associated with DCD grafts resulted in increased KIM-1 protein concentrations in kidney tissue. Moreover, 30 min of WIT resulted in a higher ROS/RNS concentration compared to kidneys with minimal WIT. We detected the positive effect of MitoQ administration on injury and oxidative stress marker levels. Increased oxidative stress causes cell apoptosis through the opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP), and subsequently the leakage of cytochrome c, which activates the caspase-dependent apoptosis pathway [28].

In our study, we detected a significant reduction in the concentration of the important apoptosis proteins caspase 3 and caspase 9 when MitoQ was added. Mitoquinone was proven to protect gentamicin-treated kidneys from increased cell death via the depletion of caspase 3 and 7 activity [29]. The increased mitochondrial ROS production correlates with organ fibrosis and the activation of apoptosis [30]. MitoQ administration reduces the expression of liver fibrosis proteins such as Col1A1 and the active form of caspase 3, which represents the executive apoptosis protease [30].

PI3K/Akt signaling plays an important role in redox balance, apoptosis activation, and autophagy [31,32]. Akt is the serine/threonine kinase that controls various cell biology pathways, such as apoptosis, proliferation, autophagy, and metabolism. The active form of Akt probably has a dual effect on pathologic pathways and disease progression. Although Akt is proposed as an anti-apoptotic signaling molecule [33] that inhibits caspase 9 and caspase 3 activation [34], and therefore promotes cell survival, it is also suggested that high Akt activity results in disease progression. Moreover, Akt contributes to kidney fibrosis in CKD [35]. CKD is related to cell proliferation and the accumulation of extracellular matrix deposits in the glomeruli and the interstitial space. The transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) is proposed as an important inducer of kidney fibrosis and an activator of the Akt protein [36,37]. Here, we detected a higher ratio of pAkt to total Akt connected to an increased level of the activated form in the DCD group compared to the DBD group. A long period of warm ischemia is associated with a higher phosphorylation of Akt. Moreover, MitoQ administration significantly downregulated the pAkt/total Akt ratio. The hyperactivation of Akt contributes to DNA damage and cell proliferation in polycystic kidney disease [38]. Conduit et al. propose Akt inhibitors as good candidates for PKD treatment [38].

Cytochrome C oxidase (CcO) is an important transmembrane protein located in the mitochondrion's membrane. CcO is involved in ATP production and is part of the respiratory electron transport chain known as complex IV. Electrons are transferred from reduced cytochrome C to cytochrome C oxidase, which transfers them into molecular oxygen that is reduced to water [39,40]. The activity of CcO changes with pathologies. During brain ischemia–reperfusion, CcO becomes hyperactive and dramatically drops as mitochondrial injury progresses in the late reperfusion phase [40]. Ischemia is caused by oxygen and, therefore, energy depletion, which results in calcium accumulation, which provokes the dephosphorylation of mitochondrial proteins. The calcium signaling pathway highly activates the ETC complex, and during the reperfusion phase it demonstrates hyperpolarization of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and massive ROS production [41]. However, the study of See et al. did not confirm any significant changes in CcO activity during different times of heart cold storage [42]. We did not detect any significant change in CcO activity between DBD and DCD kidneys. In addition, MitoQ administration did not have an impact on this enzyme's activity. We also did not confirm the positive effect of the mitochondria-targeted drug on mitochondrial membrane integrity.

4. Material and Methods

4.1. Reagents

All the reagents used in this work are listed in Table 1.

Table 1. Information of reagents.

Name of the Product	Source	Identifier
Aprotinin	Roche (Basel, Switzerland)	10236624001
Bovine Serum Albumin	Sigma (Saint Louis, MO, USA)	A3294-100G
Buprenorphine	Orion Pharma, 0.3 mg/ml (Warsaw, Poland)	N/A
CaCl ₂	Sigma (Saint Louis, MO, USA)	C1016
Dithiothreitol	Roche (Basel, Switzerland)	10708984001

Table 1. *Cont.*

Name of the Product	Source	Identifier
DMSO	Origen (Austin, Texas)	CP-50
EDTA	Chempur (Piekary Śląskie, Poland)	118798103
Glucose	Chempur (Piekary Śląskie, Poland)	114595600
KCl	Chempur (Piekary Śląskie, Poland)	117397402
KH ₂ PO ₄	Sigma (Saint Louis, MO, USA)	P0662
Leupeptin	Sigma (Saint Louis, MO, USA)	L8511
MgSO ₄	Sigma (Saint Louis, MO, USA)	M7506
Mitoquinone	Abcam (Cambridge, United Kingdom)	ab285406
NaCl	POCH (Gliwice, Poland)	BA4121116
NaHCO ₃	Chempur (Piekary Śląskie, Poland)	428105306
DPBS	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)	A2644601
Sodium pentobarbital	Biowet, (133,3 mg + 26,7 mg)/ml (Puławy, Poland)	N/A
Soybean trypsin inhibitor	Sigma (Saint Louis, MO, USA)	P8340
Sucrose	Sigma (Saint Louis, MO, USA)	S0389
Tris-HCl	Roche (Basel, Switzerland)	10812846001
Triton X-100	Sigma (Saint Louis, MO, USA)	X100

4.2. Experimental Animals

Adult, pathogen-free, male Wistar rats weighing 300–350 g were purchased from the Mossakowski Medical Research Center, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland. Two animals per cage were kept under a controlled temperature (22 ± 2 °C), humidity (55% ± 10%), light/dark cycle (12/12 h), and with unlimited food and water provided. All animal experimental procedures were approved by the local Ethics Committee for Experiments on Animals at the Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław, Poland, and carried out in accordance with the Guide of the Polish Ministry of Science and Higher Education for the Care and Use of Experimental Animals. Animals were randomly categorized into study groups (7 animals per group).

4.3. Hypothermic Machine Perfusion of Rat Kidney

Rats were desensitized with buprenorphine (0.05 mg/kg, i.p.) and anesthetized with sodium pentobarbital (0.5 mL/kg i.p.). Then, the heart was excised from the animal, which

initiated warm ischemia. The right kidney was immediately excised, cannulated by the renal artery, and connected to the hypothermic machine perfusion system (Single Channel Perfusion System, EMKA Technologies, Paris, France) (DBD group) or tied for 30 min with controlled temperature (37 °C) to mimic DCD graft donation and subsequently excised, cannulated by the renal artery, and connected to the hypothermic machine perfusion system (experimental groups: DCD and DCD + MitoQ) (Figure 7). Kidneys were perfused for an hour with a perfusion buffer to wash out blood cells, and then disposed of and replaced with 100 mL of fresh perfusion buffer with Mitoquinone (DCD + MitoQ group) or without MitoQ (DBD and DCD group). The final MitoQ concentration was 18 $\mu\text{mol/l}$. It was selected based on the safe and effective dose studied by Dare et al. on a mouse renal ischemia–reperfusion injury model (in vivo study) [20]. The perfusion buffer was based on Krebs–Henseleit buffer (pH = 7.4; 118 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L KH_2PO_4 , 1.2 mmol/L MgSO_4 , 3.0 mmol/L CaCl_2 , 25 mmol/L NaHCO_3 , 11 mmol/L glucose, and 0.5 mmol/L EDTA) with albumin. The kidney was perfused with cold buffer (4 °C) for 22 h with a constant flow rate (0.12 mL/min) to maintain the pressure between 50 and 120 mmHg. The output of the monitoring system was recorded using IOX2 software (EMKA Technologies, Paris, France).

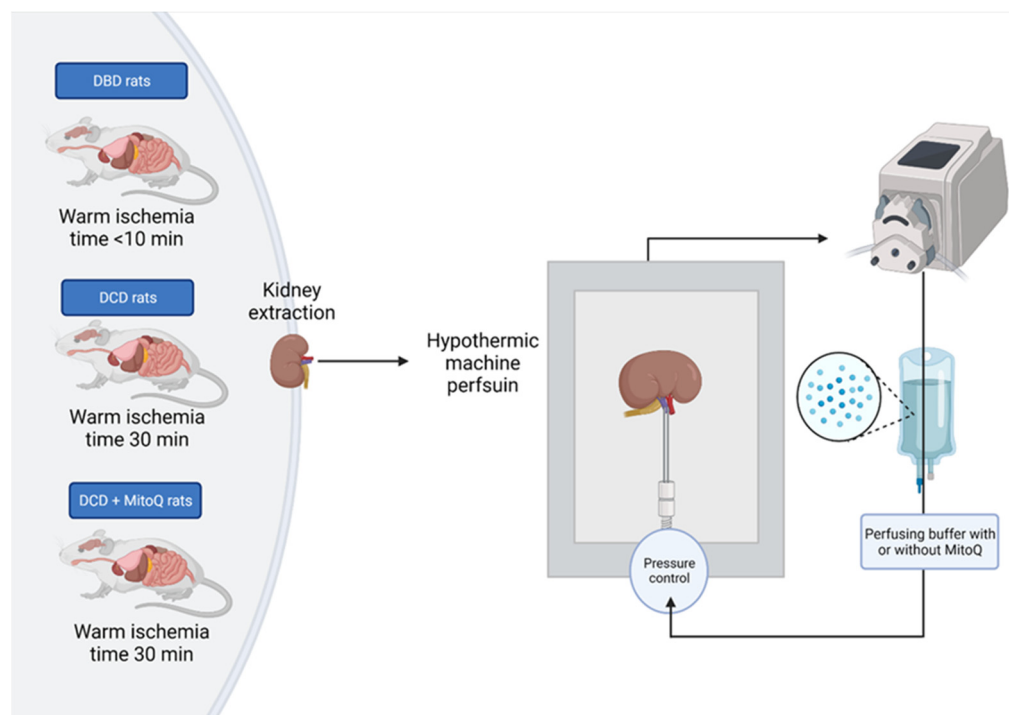


Figure 7. Scheme of the kidney preparation and perfusion. Right kidney was excised, flushed with pure buffer, and perfused for 22 h with or without MitoQ in the hypothermic condition (4 °C) with controlled pressure (50–120 mmHg).

4.4. Preparation of Kidney Homogenates

Kidneys were kept at -80°C and subsequently crushed in liquid nitrogen. Kidney tissue was homogenized with a manual homogenizer in cold homogenization buffer (50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 3.1 mmol/L sucrose, 1 mmol/L dithiothreitol, 10 mg/mL leupeptin, 10 mg/mL soybean trypsin inhibitor, 2 mg/mL aprotinin, and 0.1% Triton X-100). The homogenates were centrifuged for 10 min at 14,000 RPM, and the supernatants were collected and stored at -80°C .

4.5. Assessment of Kidney Injury Marker (KIM-1)

Kidney injury marker 1 is an early marker of kidney cell injury, especially of proximal tubule cells [43]. KIM-1 concentration in kidney homogenates was determined with an

ELISA kit (cat. E0785r, EIAab Science Inc., Wuhan, China). To determine KIM-1 protein concentration, we used 100 μ L of kidney homogenates diluted 1000 times. The detected concentration of KIM-1 in the sample was then normalized to the total protein concentration in the homogenate. Briefly, the primary antibodies bound to KIM-1. Then, KIM-1 was detected with anti-KIM-1 secondary antibodies conjugated with biotin and enzyme-conjugated avidin. The substrate solution was added and a color proportional to the protein concentration was detected using a Spark Multimode Microplate Reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) at 450 nm.

4.6. Detection of Total Protein Concentration

The Bradford method was used to detect the total protein concentration in the kidney homogenate samples. Briefly, Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (cat. 5000006, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used and BSA (heat shock fraction, \geq 98%, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) was used as a standard. The absorbance measured at 595 nm is proportional to the protein concentration. Absorbance was measured on Spark multimode microplate reader (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland).

4.7. Assessments of ROS/RNS in the Kidney Tissue

To evaluate the oxidative stress in kidney tissue, the OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit (cat. STA-347 Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) was used. In the presence of ROS and RNS, dichlorodihydrofluorescein DiOxyQ (DCFH-DiOxyQ) is oxidized to the fluorescent 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF). The fluorescence signal was measured at 480 nm (excitation) and 530 nm (emission) with a Spark Multimode Microplate Reader (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland). The total ROS/RNS concentration is proportional to the fluorescent signal. The detected concentration was normalized to the total protein concentration.

4.8. Mitochondria Isolation

Intact mitochondria were isolated from frozen kidney tissue with the Minute™ Mitochondria Isolation Kit for Muscle Tissues/Cultured Muscle Cells (cat. MM-038, Invent Biotechnologies, Plymouth, MA, USA). This kit allows for the isolation of mitochondria, cytosol, and nuclei. Approximately 30 μ g of minced tissue and dissociation beads was placed on the surface of the filter cartridge. The buffer was added, and the tissue paste was ground and centrifuged for 30 s ($16,000 \times g$). The filter was discarded, and the supernatant was vortexed and centrifuged for 5 min ($1000 \times g$). Next, the obtained supernatant was transferred to a new microtube and centrifuged for 20 min ($11,000 \times g$). Then, the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 200 μ L of the provided buffer and vortexed. The tube was centrifuged for 10 min ($11,000 \times g$) and the obtained supernatant was transferred to a fresh tube with ice-cold DPBS and vortexed. Subsequently, the tube was centrifuged for 20 min ($16,000 \times g$) to obtain the pellet of the mitochondrial fraction. Mitochondria were dissolved in 50 μ L of the homogenization buffer (50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 3.1 mmol/L sucrose, 1 mmol/L dithiothreitol, 10 mg/mL leupeptin, 10 mg/mL soybean trypsin inhibitor, 2 mg/mL aprotinin, and 0.1% Triton X-100), and the total protein concentration was measured.

4.9. Measurements of Cytochrome C Oxidase Activity and Outer Mitochondrial Membrane Integrity

Cytochrome C oxidase activity and outer mitochondrial membrane integrity were measured in isolated mitochondria with the Cytochrome C Oxidase Assay Kit (cat. CYTO-COX1 Sigma-Aldrich). Reduced ferrocytochrome c is oxidized in a two-phased reaction by cytochrome c oxidase with a sudden burst of activity [44]. Briefly, in the quart cuvette, we mixed 950 μ L of assay buffer, 100 μ L enzyme dilution buffer, and 20 μ L of isolated sample. By adding 50 μ L of ferrocytochrome c substrate solution, the reaction was started. The absorbance at 550 nm was kinetically measured after 5 and 60 s of the

reaction. To subtract the background values, we measured the change in absorbance in a mix of 950 μL of assay buffer, 120 μL enzyme dilution buffer, and 50 μL of ferrocytochrome c substrate solution. Subsequently, CcO activity was calculated using the equation: $\text{Units/mL} = \frac{\Delta A/\text{min} \times \text{dil} \times 1.1}{(\text{vol of enzyme}) \times 21.84}$ (where $\Delta A/\text{min} = A/\text{minute (sample)} - A/\text{minute (blank)}$; dil = dilution factor of enzyme or sample; 1.1 = reaction volume in ml; vol of enzyme = volume of enzyme or sample in ml; $21.84 = \Delta \epsilon^{\text{mM}}$ mM between ferrocytochrome c and ferricytochrome c at 550 nm). The activity of the sample was normalized based on total mitochondrial protein concentration. To determine the outer mitochondrial membrane integrity, the activity of CcO was measured in the presence and absence of n-dodecyl β -D-maltoside. To detect intact mitochondria, 0.1 mg protein/mL of mitochondrial suspension was mixed with 1x enzyme dilution buffer. For total cytochrome c oxidase activity detection, the same amount of the same sample was mixed with Enzyme Dilution Buffer containing 1 mM n-dodecyl β -D-maltoside. Both prepared samples were incubated for 10 min on ice. A total of 1 μg of mitochondrial protein was used, following the CcO activity assay described above. The calculated ratio between measurements of samples with and without detergent stands for the integrity of the outer mitochondrial membrane and is presented as a percentage of mitochondria with an undamaged outer membrane:

$$\left(\% = \frac{(\Delta A(\text{total}) - \Delta A(\text{intact})) \times 100}{\Delta A(\text{total})}; \Delta A(\text{intact}) = \Delta A(\text{intact sample}) - \Delta A(\text{blank}); \Delta A(\text{total}) = \Delta A(\text{total sample}) - \Delta A(\text{blank})\right).$$

The measurements were performed on a spectrophotometer (UV-Vis Double Beam HALO DB-20 Spectrofotometer, Dynamica GmbH, Zürich, Switzerland) in the Laboratory of Elemental Analysis and Structural Research of Wrocław Medical University.

4.10. Caspase 3 and Caspase 9 Concentration Measurement

Caspase 3 and caspase 9 concentrations were measured in kidney homogenates according to company instructions (cat. E1648Ra, Rat Caspase 3, CASP3 ELISA kit and cat. E1898Ra, Rat Caspase 9, CASP9 ELISA kit, BT Lab, Birmingham, UK). Briefly, caspase 3 or caspase 9, respectively, binds to the pre-coated plate. A biotinylated antibody is added and binds to the protein. Streptavidin-HRP antibody is added, and, after incubation, the substrate solution demonstrates a developing color that is proportional to caspase concentration. The absorbance is then determined using a Spark multimode microplate reader (Tecan Trading AG, Switzerland) at 450 nm. We used 100 μL of kidney homogenate diluted 200 times. The results were normalized to the total protein level.

4.11. Total Akt and Phosphorylated Akt Concentration

Total Akt was detected using ELISA (cat. PEL-AKT-S473-T-1, RayBio[®] Human, Mouse and Rat Phospho-AKT (Ser473) and Total AKT ELISA Kit), and the phosphorylated Akt form (Ser473) concentration was determined using the Rat Phospho-AKT(S473) ELISA Kit (cat. E2452Ra, BT Lab). Phospho-Akt concentration was normalized with the total protein level. Later, we calculated the ratio of phospho-Akt and total Akt, which better reflects the active form level than pAkt concentration.

4.12. Statistical Analysis

The data were collected and further analyzed using GraphPad Prism 8.0.1 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The normality of variance changes was determined using the Shapiro–Wilk normality test. ANOVA or nonparametric equivalent tests were performed, and post hoc tests were used for comparisons between groups. The obtained results were expressed as mean \pm SEM, and a p value of < 0.05 stands for significant change.

5. Study Limitations

Our study has a few limitations. Firstly, we did not perform the kidney transplantation procedure; therefore, we were not able to evaluate the post-surgical effect of MitoQ graft preconditioning. Secondly, due to technical limitations, we were able to detect the input

pressure of the canula and maintain it around 50–120 mmHg, although different pressures might be detected inside the organ. We believe the next step should be the evaluation of MitoQ's positive effect on kidney injury and apoptosis after the reperfusion phase, where the ROS/RNS burst occurs.

6. Conclusions

Our study showed that warm ischemia time might play an important role in the condition of kidney grafts that undergo hypothermic machine perfusion. We showed that a longer WIT, like for DCD kidneys, increases the levels of oxidative stress and injury markers, resulting in a higher concentration of pro-apoptotic caspases in kidney tissue. Moreover, we propose MitoQ, a mitochondria-targeted antioxidant, as a good candidate to reduce the harmful effect of prolonged WIT, and the following CIT, via a reduction in oxidative stress and apoptotic cell death.

Author Contributions: Conceptualization, I.B.-L., G.S. and A.K.-Z.; methodology, J.S., A.R. and A.O.; software, J.S.; formal analysis, A.R.; investigation, A.R., J.S. and A.O.; resources, A.R. and A.O.; data curation, A.R., J.S. and I.B.-L.; writing—original draft preparation, A.R.; writing—review and editing, A.R., I.B.-L. and A.K.-Z.; visualization, A.R.; supervision, I.B.-L.; manuscript correction, I.B.-L.; critical analysis of the article for important intellectual content, I.B.-L.; final approval of the version to be submitted, I.B.-L.; project administration, I.B.-L. and A.K.-Z.; funding acquisition, G.S. and A.K.-Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Science Centre, Poland, grant no. 2017/27/B/NZ4/00601.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the local Ethics Committee for Experiments on Animals at the Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław, Poland, and performed following the Guide of the Polish Ministry of Science and Higher Education for the Care and Use of Experimental Animals.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data of this study will be available upon request from the reader.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tonelli, M.; Wiebe, N.; Knoll, G.; Bello, A.; Browne, S.; Jadhav, D.; Klarenbach, S.; Gill, J. Systematic Review: Kidney Transplantation Compared With Dialysis in Clinically Relevant Outcomes. *Am. J. Transplant.* **2011**, *11*, 2093–2109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. van Heurn, L.E.; Talbot, D.; Nicholson, M.L.; Akhtar, M.Z.; Sanchez-Fructuoso, A.I.; Weekers, L.; Barrou, B. Recommendations for donation after circulatory death kidney transplantation in Europe. *Transpl. Int.* **2016**, *29*, 780–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Stevenson, R.P.; Shapter, O.; Aitken, E.; Stevenson, K.; Shiels, P.G.; Kingsmore, D.B. Has the Expansion in Extended Criteria Deceased Donors Led to a Different Type of Delayed Graft Function and Poorer Outcomes? *Transplant. Proc.* **2018**, *50*, 3160–3164. [[CrossRef](#)]
4. Krzywonos-Zawadzka, A.; Franczak, A.; Moser, M.A.J.; Olejnik, A.; Sawicki, G.; Bil-Lula, I. Pharmacological Protection of Kidney Grafts from Cold Perfusion-Induced Injury. *Biomed. Res. Int.* **2019**, *2019*, 9617087. [[CrossRef](#)]
5. Mezzolla, V.; Pontrelli, P.; Fiorentino, M.; Stasi, A.; Pesce, F.; Franzin, R.; Rascio, F.; Grandaliano, G.; Stallone, G.; Infante, B.; et al. Emerging biomarkers of delayed graft function in kidney transplantation. *Transplant. Rev.* **2021**, *35*, 100629. [[CrossRef](#)]
6. Radajewska, A.; Krzywonos-Zawadzka, A.; Bil-Lula, I. Recent Methods of Kidney Storage and Therapeutic Possibilities of Transplant Kidney. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1013. [[CrossRef](#)]
7. Radajewska, A.; Szyller, J.; Niewiadomska, J.; Noszczyk-Nowak, A.; Bil-Lula, I. *Punica granatum* L. Polyphenolic Extract as an Antioxidant to Prevent Kidney Injury in Metabolic Syndrome Rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2023**, *2023*, 6144967. [[CrossRef](#)]
8. Daenen, K.; Andries, A.; Mekahli, D.; Van Schepdael, A.; Jouret, F.; Bammens, B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* **2019**, *34*, 975–991. [[CrossRef](#)]
9. Liakopoulos, V.; Roumeliotis, S.; Gorny, X.; Eleftheriadis, T.; Mertens, P.R. Oxidative Stress in Patients Undergoing Peritoneal Dialysis: A Current Review of the Literature. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 3494867. [[CrossRef](#)]
10. García-Sánchez, A.; Miranda-Díaz, A.G.; Cardona-Muñoz, E.G. The Role of Oxidative Stress in Physiopathology and Pharmacological Treatment with Pro- and Antioxidant Properties in Chronic Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 2082145. [[CrossRef](#)]

11. Fonseca, I.; Reguengo, H.; Almeida, M.; Dias, L.; Martins, L.S.; Pedroso, S.; Santos, J.; Lobato, L.; Henriques, A.C.; Mendonça, D. Oxidative stress in kidney transplantation: Malondialdehyde is an early predictive marker of graft dysfunction. *Transplantation* **2014**, *97*, 1058–1065. [CrossRef] [PubMed]
12. Ye, J.; Li, J.; Yu, Y.; Wei, Q.; Deng, W.; Yu, L. l-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway. *Regul. Pept.* **2010**, *161*, 58–66. [CrossRef]
13. La Manna, G.; Lanci, N.; Della Bella, E.; Comai, G.; Cappuccilli, M.L.; Nisi, K.; Todeschini, P.; Carretta, E.; Scolari, M.P.; Stefoni, S. Reduction of oxidative damage reflects a better kidney transplantation outcome. *Am. J. Nephrol.* **2011**, *34*, 496–504. [CrossRef]
14. James, A.M.; Sharpley, M.S.; Manas, A.R.B.; Frerman, F.E.; Hirst, J.; Smith, R.A.; Murphy, M.P. Interaction of the Mitochondria-targeted Antioxidant MitoQ with Phospholipid Bilayers and Ubiquinone Oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 14708–14718. [CrossRef] [PubMed]
15. Antipodean Pharmaceuticals, Inc. A Double-Blind, Parallel, Randomized Comparison of Two Doses of MitoQ and Placebo for the Treatment of Patients with Raised Liver Enzymes Due to Hepatitis C. 2008. Available online: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00433108> (accessed on 5 September 2023).
16. A Study to Compare MitoQ and Placebo to Treat Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)—Full Text View—ClinicalTrials.gov. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01167088> (accessed on 12 September 2023).
17. Hostrup, M. Mitochondrial Dysfunction and Insulin Resistance in Skeletal Muscle. 2021. Available online: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04558190> (accessed on 5 September 2023).
18. Imperial College London. Examining the Effects of Mitochondrial Oxidative Stress in DCM. 2022. Available online: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05410873> (accessed on 5 September 2023).
19. University of Colorado, Denver. Mitochondrial Targeted Antioxidant Supplementation and Diastolic Function in Healthy Men and Women. 2022. Available online: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03586414> (accessed on 11 September 2023).
20. Dare, A.J.; Bolton, E.A.; Pettigrew, G.J.; Bradley, J.A.; Saeb-Parsy, K.; Murphy, M.P. Protection against renal ischemia–reperfusion injury in vivo by the mitochondria targeted antioxidant MitoQ. *Redox Biol.* **2015**, *5*, 163–168. [CrossRef] [PubMed]
21. Allan, L.A.; Clarke, P.R. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J.* **2009**, *276*, 6063–6073. [CrossRef] [PubMed]
22. Hamed, M.; Logan, A.; Gruszczuk, A.V.; Beach, T.E.; James, A.M.; Dare, A.J.; Barlow, A.; Martin, J.; Georgakopoulos, N.; Gane, A.M.; et al. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates ischaemia–reperfusion injury in kidney transplantation models. *Br. J. Surg.* **2021**, *108*, 1072–1081. [CrossRef]
23. Gane, E.J.; Weilert, F.; Orr, D.W.; Keogh, G.F.; Gibson, M.; Lockhart, M.M.; Frampton, C.M.; Taylor, K.M.; Smith, R.A.; Murphy, M.P. The mitochondria-targeted anti-oxidant mitoquinone decreases liver damage in a phase II study of hepatitis C patients. *Liver Int.* **2010**, *30*, 1019–1026. [CrossRef]
24. Hall, A.M.; Schuh, C.D. Mitochondria as therapeutic targets in acute kidney injury. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2016**, *25*, 355–362. [CrossRef]
25. Qiao, X.; Chen, X.; Wu, D.; Ding, R.; Wang, J.; Hong, Q.; Shi, S.; Li, J.; Xie, Y.; Lu, Y.; et al. Mitochondrial pathway is responsible for aging-related increase of tubular cell apoptosis in renal ischemia/reperfusion injury. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2005**, *60*, 830–839. [CrossRef]
26. Mitchell, T.; Rotaru, D.; Saba, H.; Smith, R.A.J.; Murphy, M.P.; MacMillan-Crow, L.A. The Mitochondria-Targeted Antioxidant Mitoquinone Protects against Cold Storage Injury of Renal Tubular Cells and Rat Kidneys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *336*, 682–692. [CrossRef] [PubMed]
27. Moser, M.A.; Arcand, S.; Lin, H.B.; Wojnarowicz, C.; Sawicka, J.; Banerjee, T.; Luo, Y.; Beck, G.R.; Luke, P.P.; Sawicki, G. Protection of the Transplant Kidney from Preservation Injury by Inhibition of Matrix Metalloproteinases. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0157508. [CrossRef] [PubMed]
28. Wang, C.; Youle, R.J. The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* **2009**, *43*, 95–118. [CrossRef]
29. Ojano-Dirain, C.P.; Antonelli, P.J. Prevention of gentamicin-induced apoptosis with the mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone. *Laryngoscope* **2012**, *122*, 2543–2548. [CrossRef]
30. Turkseven, S.; Bolognesi, M.; Brocca, A.; Pesce, P.; Angeli, P.; Di Pascoli, M. Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone attenuates liver inflammation and fibrosis in cirrhotic rats. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2020**, *318*, G298–G304. [CrossRef] [PubMed]
31. Lin, D.; Xiang, T.; Qiu, Q.; Leung, J.; Xu, J.; Zhou, W.; Hu, Q.; Lan, J.; Liu, Z.; Zhong, Z.; et al. Aldehyde dehydrogenase 2 regulates autophagy via the Akt-mTOR pathway to mitigate renal ischemia-reperfusion injury in hypothermic machine perfusion. *Life Sci.* **2020**, *253*, 117705. [CrossRef]
32. Du, X.; Zhang, P.; Fu, H.; Ahsan, H.M.; Gao, J.; Chen, Q. Smart mitochondrial-targeted cancer therapy: Subcellular distribution, selective TrxR2 inhibition accompany with declined antioxidant capacity. *Int. J. Pharm.* **2019**, *555*, 346–355. [CrossRef]
33. Franke, T.F.; Hornik, C.P.; Segev, L.; Shostak, G.A.; Sugimoto, C. PI3K/Akt and apoptosis: Size matters. *Oncogene* **2003**, *22*, 8983–8998. [CrossRef]
34. Fathy, M.; Abdel-Latif, R.; Abdelgwad, Y.M.; Othman, O.A.; Abdel-Razik, A.R.H.; Dandekar, T.; Othman, E.M. Nephroprotective potential of eugenol in a rat experimental model of chronic kidney injury; targeting NOX, TGF- β , and Akt signaling. *Life Sci.* **2022**, *308*, 120957. [CrossRef]
35. Lan, A.; Du, J. Potential role of Akt signaling in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2015**, *30*, 385–394. [CrossRef]

36. Böttinger, E.P. TGF- β in Renal Injury and Disease. *Semin. Nephrol.* **2007**, *27*, 309–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ghosh Choudhury, G.; Abboud, H.E. Tyrosine phosphorylation-dependent PI 3 kinase/Akt signal transduction regulates TGF β -induced fibronectin expression in mesangial cells. *Cell. Signal.* **2004**, *16*, 31–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Conduit, S.E.; Davies, E.M.; Ooms, L.M.; Gurung, R.; McGrath, M.J.; Hakim, S.; Cottle, D.L.; Smyth, I.M.; Dyson, J.M.; Mitchell, C.A. AKT signaling promotes DNA damage accumulation and proliferation in polycystic kidney disease. *Hum. Mol. Genet.* **2020**, *29*, 31–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Yang, Z.; Duan, Z.; Yu, T.; Xu, J.; Liu, L. Inhibiting Cytochrome C Oxidase Leads to Alleviated Ischemia Reperfusion Injury. *Korean Circ. J.* **2017**, *47*, 193–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Hüttemann, M.; Helling, S.; Sanderson, T.H.; Sinkler, C.; Samavati, L.; Mahapatra, G.; Varughese, A.; Lu, G.; Liu, J.; Ramzan, R.; et al. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: Cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1817*, 598–609. [[CrossRef](#)]
41. Sanderson, T.H.; Wider, J.M.; Lee, I.; Reynolds, C.A.; Liu, J.; Lepore, B.; Tousignant, R.; Bukowski, M.J.; Johnston, H.; Fite, A.; et al. Inhibitory modulation of cytochrome c oxidase activity with specific near-infrared light wavelengths attenuates brain ischemia/reperfusion injury. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 3481. [[CrossRef](#)]
42. See, Y.P.; Weisel, R.D.; Mickle, D.A.; Teoh, K.H.; Wilson, G.J.; Tumiati, L.C.; Mohabeer, M.K.; Madonik, M.M.; Axford-Gatley, R.A.; Salter, D.R. Prolonged hypothermic cardiac storage for transplantation. The effects on myocardial metabolism and mitochondrial function. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **1992**, *104*, 817–824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ichimura, T.; Bonventre, J.V.; Bailly, V.; Wei, H.; Hession, C.A.; Cate, R.L.; Sanicola, M. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 4135–4142. [[CrossRef](#)]
44. Thompson, D.A.; Ferguson-Miller, S. Lipid and subunit III depleted cytochrome c oxidase purified by horse cytochrome c affinity chromatography in lauryl maltoside. *Biochemistry* **1983**, *22*, 3178–3187. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Załącznik 2. Oświadczenie autorki rozprawy doktorskiej.

Wrocław, 10.05.2024 r.
miejsowość, data

OŚWIADCZENIE AUTORKI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Oświadczam, że w publikacji:

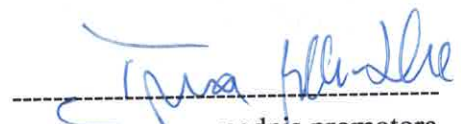
Anna Radajewska, Anna Krzywonos-Zawadzka, Iwona Bil-Lula. Recent Methods of Kidney Storage and Therapeutic Possibilities of Transplant Kidney. Biomedicines. 2022 Apr 28;10(5):1013. doi: 10.3390/biomedicines10051013.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na analizie dostępnej literatury, przygotowania manuskryptu, przygotowaniu grafik, rycin i tabel, edycji tekstu publikacji.



podpis autorki



podpis promotora

Wrocław, 10.05.2024 r.
miejsowość, data

OŚWIADCZENIE AUTORKI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Oświadczam, że w publikacji:

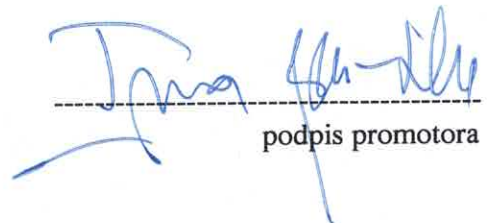
Anna Radajewska, Jakub Szyller, Joanna Niewiadomska, Agnieszka Noszczyk-Nowak, Iwona Bil-Lula. Punica granatum L. Polyphenolic Extract as an Antioxidant to Prevent Kidney Injury in Metabolic Syndrome Rats. Oxid Med Cell Longev. 2023 Jan 5; 2023:6144967.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na opracowaniu metodologii badań, pobraniu i przygotowaniu materiału badanego, dobraniu testów analitycznych oraz wykonaniu części testów, analizie statystycznej części uzyskanych wyników, wizualizacji wyników, przygotowaniu publikacji, grafik i rycin do publikacji.



podpis autorki



podpis promotora

Wrocław, 10.05.2024 r.
miejsowość, data

OŚWIADCZENIE AUTORKI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Oświadczam, że w publikacji:

Anna Radajewska, Jakub Szyller, Agnieszka Olejnik, Anna Krzywonos-Zawadzka, Grzegorz Sawicki, Iwona Bil-Lula. Mitoquinone Alleviates Donation after Cardiac Death Kidney Injury during Hypothermic Machine Perfusion in Rat Model; Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 14772.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na opracowaniu metodologii badań, opiece nad zwierzętami laboratoryjnymi, izolacji i kaniulacji nerki szczurzej do badań, przygotowaniu materiału do badań, dobraniu odpowiednich testów analitycznych i wykonaniu części testów, stworzeniu bazy wyników, przygotowaniu publikacji, przygotowaniu grafik i rycin do publikacji, edycji tekstu publikacji.



podpis autorki



podpis promotora

Załącznik 3. Oświadczenia współautorów publikacji.

Wrocław, 30.04.2024 r.
miejsowość, data

dr Anna Krzywonos-Zawadzka
tytuł, imię i nazwisko

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Katedra Analizy Medycznej,
Zakład Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej,
ul. Borowska 211A
50-556 Wrocław
miejsce zatrudnienia

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

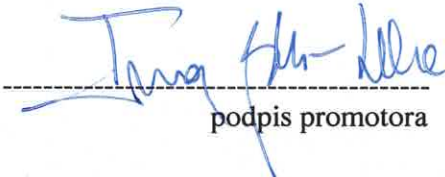
Anna Radajewska, Anna Krzywonos-Zawadzka, Iwona Bil-Lula. Recent Methods of Kidney Storage and Therapeutic Possibilities of Transplant Kidney. Biomedicines. 2022 Apr 28;10(5):1013. doi: 10.3390/biomedicines10051013.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na edycji tekstu publikacji i dokonaniu korekty językowej przygotowanego manuskryptu.



podpis współautora



podpis promotora

Wrocław, 06.05.2024 r.
miejsce, data

dr hab. Iwona Bil-Lula, prof. uczelni
tytuł, imię i nazwisko

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Katedra Analizy Medycznej,
Zakład Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej,
ul. Borowska 211A
50-556 Wrocław
miejsce zatrudnienia

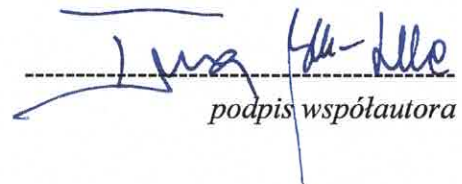
OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

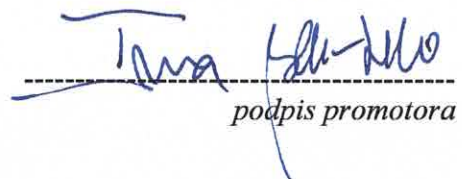
Anna Radajewska, Anna Krzywonos-Zawadzka, Iwona Bil-Lula. Recent Methods of Kidney Storage and Therapeutic Possibilities of Transplant Kidney. Biomedicines. 2022 Apr 28;10(5):1013. doi: 10.3390/biomedicines10051013.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na ocenie merytorycznej pracy, edycji manuskryptu oraz dokonaniu korekty językowej przygotowanego manuskryptu, zatwierdzeniu ostatecznej wersji pracy.



podpis współautora



podpis promotora

Wrocław, 30.04.2024 r.
miejsowość, data

dr Jakub Szyller
tytuł, imię i nazwisko

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Katedra Analityki Medycznej,
Zakład Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej,
ul. Borowska 211A
50-556 Wrocław
miejsce zatrudnienia

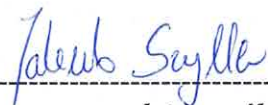
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

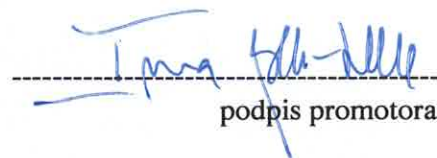
Anna Radajewska, Jakub Szyller, Joanna Niewiadomska, Agnieszka Noszczyk-Nowak, Iwona Bil-Lula. Punica granatum L. Polyphenolic Extract as an Antioxidant to Prevent Kidney Injury in Metabolic Syndrome Rats. Oxid Med Cell Longev. 2023 Jan 5; 2023:6144967. doi: 10.1155/2023/6144967.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na pozyskaniu środków na badania, wykonaniu części testów techniką ELISA i opisanu metody: Ocena i analiza składu związków polifenolowych zawartych w otrzymanym ekstrakcie oraz edycji tekstu publikacji.



podpis współautora



podpis promotora

Wrocław, 09.05.2024 r.
miejsowość, data

dr Joanna Niewiadomska
tytuł, imię i nazwisko

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
pl. Grunwaldzki 47,
50-366 Wrocław
miejsce zatrudnienia

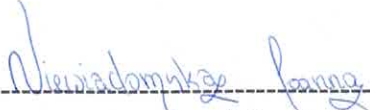
OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

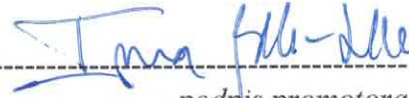
Anna Radajewska, Jakub Szyller, Joanna Niewiadomska, Agnieszka Noszczyk-Nowak, Iwona Bil-Lula. *Punica granatum L. Polyphenolic Extract as an Antioxidant to Prevent Kidney Injury in Metabolic Syndrome Rats. Oxid Med Cell Longev.* 2023 Jan 5; 2023:6144967. doi: 10.1155/2023/6144967.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na opiece nad zwierzętami, podawaniu i przygotowaniu preparatu *Punica granatum L.*, pozyskaniu wyciągu do badań oraz wykonywaniu procedur na zwierzętach.



podpis współautora



podpis promotora

Wrocław, 09.05.2024 r.
miejsowość, data

prof. dr hab. Agnieszka Noszczyk-Nowak
tytuł, imię i nazwisko

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
pl. Grunwaldzki 47A
50-366 Wrocław
miejsce zatrudnienia

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Anna Radajewska, Jakub Szyller, Joanna Niewiadomska, Agnieszka Noszczyk-Nowak, Iwona Bil-Lula. *Punica granatum L. Polyphenolic Extract as an Antioxidant to Prevent Kidney Injury in Metabolic Syndrome Rats. Oxid Med Cell Longev. 2023 Jan 5; 2023:6144967.*

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na uzyskaniu zgody komisji etycznej, nadzorowaniu procedur wykonywanych na zwierzętach oraz edycji tekstu manuskryptu.



Signed by /
Podpisano przez:

Agnieszka
Noszczyk-Nowak

Date / Data:
2024-05-10 08:24

podpis współautora

podpis promotora

Wrocław, 06.05.2024 r.
miejsowość, data

dr hab. Iwona Bil-Lula, prof. uczelni
tytuł, imię i nazwisko

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Katedra Analityki Medycznej,
Zakład Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej,
ul. Borowska 211A
50-556 Wrocław
miejsce zatrudnienia

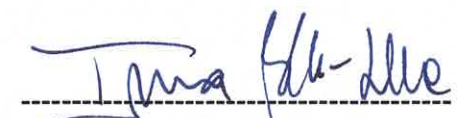
OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

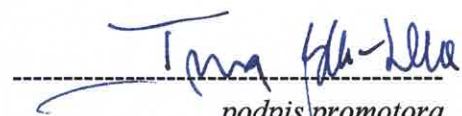
Anna Radajewska, Jakub Szyller, Joanna Niewiadomska, Agnieszka Noszczyk-Nowak, Iwona Bil-Lula. Punica granatum L. Polyphenolic Extract as an Antioxidant to Prevent Kidney Injury in Metabolic Syndrome Rats. Oxid Med Cell Longev. 2023 Jan 5; 2023:6144967.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na udziale w konceptualizacji pracy, nadzorze prac prowadzonych przez doktorantkę i zespół badawczy, ocenie merytorycznej manuskryptu, edycji tekstu pierwotnego, dokonaniu korekty językowej przygotowanego manuskryptu, zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji.



podpis współautora



podpis promotora

Wrocław, 30.04.2024 r.
miejsowość, data

dr Jakub Szyller
tytuł, imię i nazwisko

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Katedra Analityki Medycznej,
Zakład Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej,
ul. Borowska 211A
50-556 Wrocław
miejsce zatrudnienia

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

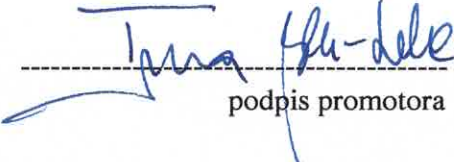
Anna Radajewska, Jakub Szyller, Agnieszka Olejnik, Anna Krzywonos-Zawadzka, Grzegorz Sawicki, Iwona Bil-Lula. Mitoquinone Alleviates Donation after Cardiac Death Kidney Injury during Hypothermic Machine Perfusion in Rat Model; Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 14772.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na wykonaniu części testów metodą ELISA i testów fluorymetrycznych, częściowego opracowania metodologii badań, opracowania statystycznego części wyników, obsłudze programu komputerowego do perfuzji nerki.



podpis współautora



podpis promotora

Wrocław, 30.04.2024 r.
miejsowość, data

dr Agnieszka Olejnik
tytuł, imię i nazwisko

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Katedra Analityki Medycznej,
Zakład Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej,
ul. Borowska 211A
50-556 Wrocław
miejsce zatrudnienia

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

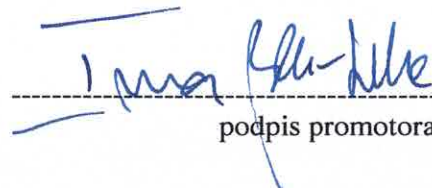
Anna Radajewska, Jakub Szyller, Agnieszka Olejnik, Anna Krzywonos-Zawadzka, Grzegorz Sawicki, Iwona Bil-Lula. Mitoquinone Alleviates Donation after Cardiac Death Kidney Injury during Hypothermic Machine Perfusion in Rat Model; Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 14772.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na opracowaniu metodologii, pomocy przy doborze testów oraz wykonaniu części testów metodą ELISA.



podpis współautora



podpis promotora

Wrocław, 30.04.2024 r.
miejsowość, data

dr Anna Krzywonos-Zawadzka
tytuł, imię i nazwisko

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Katedra Analityki Medycznej,
Zakład Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej,
ul. Borowska 211A
50-556 Wrocław
miejsce zatrudnienia

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

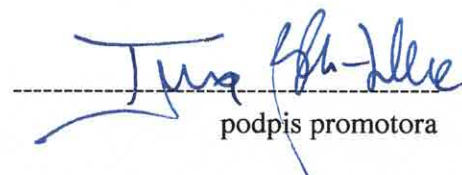
Anna Radajewska, Jakub Szyller, Agnieszka Olejnik, Anna Krzywonos-Zawadzka, Grzegorz Sawicki, Iwona Bil-Lula. Mitoquinone Alleviates Donation after Cardiac Death Kidney Injury during Hypothermic Machine Perfusion in Rat Model; Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 14772.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na uzyskaniu zgody komisji etycznej na pracę z wykorzystaniem zwierząt, konceptualizacji badań, edycji tekstu manuskryptu, zarządzaniu projektem, pozyskaniu finansowania.



podpis współautora



podpis promotora

Wrocław, 09.05.2024 r.
miejsowość, data

prof. dr hab. Grzegorz Sawicki
tytuł, imię i nazwisko

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Katedra Analityki Medycznej,
Zakład Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej,
ul. Borowska 211A
50-556 Wrocław
miejsce zatrudnienia

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

Anna Radajewska, Jakub Szyller, Agnieszka Olejnik, Anna Krzywonos-Zawadzka, Grzegorz Sawicki, Iwona Bil-Lula. Mitoquinone Alleviates Donation after Cardiac Death Kidney Injury during Hypothermic Machine Perfusion in Rat Model; Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 14772.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na konceptualizacji badań oraz pozyskaniu finansowania.



Signed by /
Podpisano przez:

Grzegorz Marek
Sawicki

Date / Data:
~~2024-05-10-12:14~~

podpis współautora

podpis promotora

Wrocław, 06.05.2024 r.
miejsowość, data

dr hab. Iwona Bil-Lula, prof. uczelni
tytuł, imię i nazwisko

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Katedra Analizy Medycznej,
Zakład Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej,
ul. Borowska 211A
50-556 Wrocław
miejsce zatrudnienia

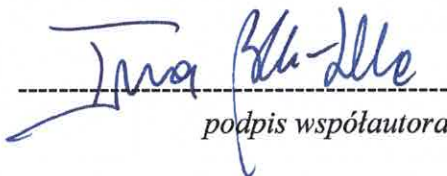
OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

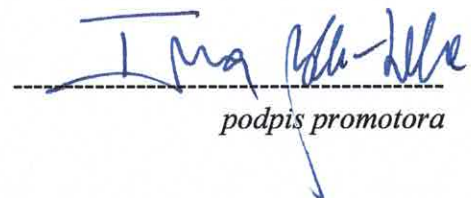
Anna Radajewska, Jakub Szyller, Agnieszka Olejnik, Anna Krzywonos-Zawadzka, Grzegorz Sawicki, Iwona Bil-Lula. Mitoquinone Alleviates Donation after Cardiac Death Kidney Injury during Hypothermic Machine Perfusion in Rat Model; Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 14772.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

mój udział polegał na konceptualizacji badań, zarządzaniu uzyskanymi danymi, edycji tekstu manuskryptu, nadzorowaniu prac doktorantki i zespołu badawczego, prowadzeniu nadzoru formalnego nad projektem i zarządzaniu zasobami, edycji manuskryptu i korekcie językowej, krytycznej analizie artykułu, zatwierdzeniu ostatecznej wersji publikacji.



podpis współautora



podpis promotora

Załącznik 4. Wykaz publikacji i abstraktów potwierdzony przez bibliotekę.

Anna Radajewska

Wykaz publikacji

1. Publikacje w czasopismach naukowych

1.1 Publikacje w czasopiśmie z IF:

Lp	Opis bibliograficzny	IF	Punkty ministerialne
1	Czyż Anna, Król Magdalena, Przybyszewski Oskar, Radajewska Anna , Moreira Helena, Barg Ewa: Transformacje nowotworowe komórek hematopoetycznych u osób z trisomią 21 chromosomu, <i>Postępy Biologii Komórki</i> , 2019, vol. 46, nr 2, s. 111-127	0,163	20
2	Radajewska Anna , Przybyszewski Oskar, Emhemmed Fathi, Muller Christian D., Barg Ewa, Moreira Helena: Three dimensional in vitro culture systems in anticancer drug discovery targeted on cancer stem cells, <i>American Journal of Cancer Research</i> , 2021, vol. 11, nr 10, s. 4931-4946	5,942	100
3	Radajewska Anna , Krzywonos-Zawadzka Anna, Bil-Lula Iwona: Recent methods of kidney storage and therapeutic possibilities of transplant kidney, <i>Biomedicines</i> , 2022, vol. 10, nr 5, art.1013 [15 s.], DOI:10.3390/biomedicines10051013	4,7	100
4	Radajewska Anna , Moreira Helena, Bęben Dorota, Siwiela Oliwia, Szyjka Anna, Gębczak Katarzyna, Nowak Paulina, Frąszczak Jakub, Emhemmed Fathi, Muller Christian D., Barg Ewa: Combination of irinotecan and melatonin with the natural compounds wogonin and celastrol for colon cancer treatment, <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 2023, vol. 24, nr 11, art.9544 [21 s.], DOI:10.3390/ijms24119544	5,6*	140
5	Radajewska Anna , Szyller Jakub, Krzywonos-Zawadzka Anna, Olejnik Agnieszka, Sawicki Grzegorz, Bil-Lula Iwona: Mitoquinone alleviates donation after cardiac death kidney injury during hypothermic machine perfusion in rat model, <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 2023, vol. 24, nr 19, art.14772 [14 s.], DOI:10.3390/ijms241914772	5,6*	140
6	Olejnik Agnieszka, Radajewska Anna , Krzywonos-Zawadzka Anna, Bil-Lula Iwona: Klotho inhibits IGF1R/PI3K/AKT signalling pathway and protects the heart from oxidative stress during ischemia/reperfusion injury, <i>Scientific Reports</i> , 2023, vol. 13, art.20312 [15 s.], DOI:10.1038/s41598-023-47686-5	4,6*	140
7	Rodak Kamil, Bęben Dorota, Birska Monika, Siwiela Oliwia, Kokot Izabela, Moreira Helena, Radajewska Anna , Szyjka Anna, Kratz Ewa Maria: Evaluating the neuroprotective potential of caffeinated coffee in the context of aluminum-induced neurotoxicity: insights from a PC12 cell culture model, <i>Antioxidants</i> , 2024, vol. 13, nr 3, art.342 [21 s.], DOI:10.3390/antiox13030342	7*	100
SUMA:		33,605	740

*IF za 2022 rok

1.2 Publikacje w czasopiśmie bez IF:

Lp	Opis bibliograficzny	Punkty ministerialne
1	Radajewska Anna , Szyller Jakub, Niewiadomska Joanna, Noszczyk-Nowak Agnieszka, Bil-Lula Iwona: Punica granatum L. polyphenolic extract as an antioxidant to prevent kidney injury in metabolic syndrome rats, <i>Oxidative Medicine and Cellular Longevity</i> , 2023, vol. 2023, art.6144967 [14 s.], DOI:10.1155/2023/6144967	20
SUMA:		20

2. Monografie naukowe

2.1 Książka autorska: -

2.2 Książka redagowana: -

2.3 Rozdziały:

Lp	Opis bibliograficzny	Punkty ministerialne
1	Stecko Jakub, Szymańska Natalia, Radajewska Anna , Siwiela Oliwia, Bębenek Kacper: CBD - sensacja czy rewolucja medycyny, W: Holistyczny wymiar współczesnej medycyny. T.9, (red.) Elżbieta Krajewska-Kulaś [i in.], Białystok 2022, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, s. 942-961, ISBN 978-83-963859-4-9	20
SUMA:		20

4. Abstrakty

Lp	Opis bibliograficzny
1	Radajewska Anna , Przybyszewski Oskar, Moreira Helena, Barg Ewa, Emhemmed F., Muller C.D.: Evaluation of tumor stem cells in LoVo, HT29 and MCF7 cell lines in three-dimensional cell cultures, W: 4th International Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 09-10 October 2020, (red.) Julita Kulbacka, Nina Rembiałkowska, Joanna Weźgowiec, Wrocław 2020, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., s. 202, ISBN 978-83-66489-37-0
2	Bęben Dorota, Siwiela O., Radajewska Anna , Gębczak Katarzyna, Oszmiański J., Emhemmed F., Nabais M., Muller C.D., Barg Ewa, Moreira Helena: Polyphenol-rich extracts from pomegranate and cistus in the fight against breast cancer, W: 24e congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie "Cytométrie 2021". Strasbourg [France], 6-8 octobre 2021. Livre des résumés 2021, 101 poz.SP11-5
3	Radajewska Anna , Bęben Dorota, Siwiela O., Gębczak Katarzyna, Szyjka Anna, Emhemmed F., Nabais M., Muller C.D., Barg Ewa, Moreira Helena: Anticancer potential of melatonin in combination with irinotecan, wogonin or celastrol on sensitive and multidrug resistant colon cancer cells, W: 24e congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie "Cytométrie 2021". Strasbourg [France], 6-8 octobre 2021. Livre des résumés 2021, 102 poz.SP11-6
4	Radajewska Anna , Bil-Lula Iwona, Szyller Jakub, Krzywonos-Zawadzka Anna: Wykorzystanie ciągłej mechanicznej perfuzji nerki szczurzej w hipotermii jako modelu dawcy po śmierci sercowej - metodyka, W: II. WSMML - Wrocławskie Spotkanie Medycyny Laboratoryjnej. Wrocław, 26 marca 2021. Program konferencji i książka abstraktów 2021, 25 poz.P15, [[Dostęp 7.04.2021]. Dostępny w: https://medtube.pl/uploads/a/4/03252a48ceca6bebd6b26b609a92fb950fe3.pdf]
5	Olejniak Agnieszka, Kamińska Marta, Radajewska Anna , Bil-Lula Iwona: Cardiopreventive influence of Klotho protein on antioxidant and anti-apoptotic mechanisms in heart injured by ischemia/reperfusion, <i>Cardiovascular Research</i> , 2022, vol. 118, nr suppl.2, s.ii58 poz.049, [EuroThrombosis & EuroVessels 2022. Lisbon, Portugal, 20-22 October], DOI:10.1093/cvr/cvac157.055

Lp	Opis bibliograficzny
6	Rodak Kamil, Radajewska Anna , Bęben Dorota, Birska Monika, Siwiela Oliwia: Czy codzienne przyzwyczajenia żywieniowe mogą być induktorem chorób, którym towarzyszy mentalne osamotnienie? – badania in vitro neurotoksyczności związków glinu w rozwoju choroby Alzheimera w aspekcie protekcyjnego działania kofeiny i kawy, W: VII Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 15 grudnia 2022 roku. Książka abstraktów, Wrocław 2022, s. 34-35
7	Radajewska Anna , Szyller Jakub, Krzywonos-Zawadzka Anna, Bil-Lula Iwona: Mitoquinone mesylate (MITOQ) as a mitochondria-targeted antioxidant in the treatment of ischemiareperfusion injury during kidney graft perfusion, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2023, vol. 61, nr suppl.1, s.S1446 poz.P1360, [WorldLab - EuroMedLab Roma 2023. Rome, Italy, May 21-25, 2023]
8	Olejniki Agnieszka, Kamińska Marta, Radajewska Anna , Krzywonos-Zawadzka Anna, Bil-Lula Iwona: Recombinant Klotho protein contributes to antioxidative protection in ischemia/reperfusion injury of the rat heart, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2023, vol. 61, nr suppl.1, s.S485 poz.P0399, [WorldLab - EuroMedLab Roma 2023. Rome, Italy, May 21-25, 2023]
9	Olejniki Agnieszka, Kaminska M., Radajewska Anna , Krzywonos-Zawadzka Anna, Bil-Lula Iwona: Cardiopreventive effect of Klotho protein on oxidative stress, inflammation and apoptosis during cardiac ischemia/reperfusion injury, European Journal of Preventive Cardiology, 2023, vol. 30, nr suppl.1, i350 poz.11404, [ESC Preventive Cardiology 2023], DOI:10.1093/eurjpc/zwad125.263
10	Rodak Kamil, Bęben Dorota, Birska Monika, Siwiela Oliwia, Radajewska Anna : Assessing the neuroprotective effects of caffeinated coffee in the context of aluminum-induced neurotoxicity: In-sights from PC12 cell culture model, W: IX International Students' Conference of Young Medical Researchers. Wrocław, 30.03-01.04.2023. Book of abstracts 2023, 61 poz.85, ISBN 978-83-942024-5-3
11	Radajewska Anna , Szyller Jakub, Olejniki Agnieszka: Mitoquinone mesylate (MitoQ) has a protective effect on perfused kidney by reducing apoptosis, W: IX International Students' Conference of Young Medical Researchers. Wrocław, 30.03-01.04.2023. Book of abstracts 2023, 62 poz.86, ISBN 978-83-942024-5-3
12	Radajewska Anna , Szyller Jakub, Krzywonos-Zawadzka Anna, Olejniki Agnieszka, Bil-Lula Iwona: Mesylan mitochinonu (MitoQ) zmniejsza uszkodzenie niedokrwiennie-reperfuzyjne nerek poddanych zimnej maszynowej perfuzji w procesie transplantacji, W: Konferencja "Rzeczywistość a innowacje w medycynie laboratoryjnej" wrocławskiego oddziału PTDL współorganizowanej z Katedrą Analityki Medycznej UMW. Szklarska Poręba, 25-26 maj 2023 r. Książka streszczeń, Szklarska Poręba 2023, poz.P11

Impact factor: 33,605

Punkty ministerialne: 780

OSOBA SPORZĄDZAJĄCA: AGNIESZKA BARAN
FILIA NR 1 BG UMW



Signed by /
Podpisano przez:

Dominika
Sidorska

Date / Data:
2024-05-09 14:33