

# Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda u transplantaciji bubrega: mehanizmi nastanka i novi terapijski pristupi

---

**Naglić, Melani**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:599855>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-11**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINA

Melani Naglić

ISHEMIJSKO-REPERFUZIJSKA OZLJEDA U TRANSPLANTACIJI BUBREGA:

MEHANIZMI NASTANKA I NOVI TERAPIJSKI PRISTUPI

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINA

Melani Naglić

ISHEMIJSKO-REPERFUZIJSKA OZLJEDA U TRANSPLANTACIJI BUBREGA:

MEHANIZMI NASTANKA I NOVI TERAPIJSKI PRISTUPI

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Tanja Čelić, dr. med.

Diplomski rad ocjenjen je dana \_\_\_\_\_ u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Josip Španjol, dr. med.
2. Izv. prof. dr. sc. Kristina Pilipović, dr. med.
3. Izv. prof. dr. sc. Lara Batičić, dipl. san. ing.

Rad sadrži 46 stranica i 71 literaturni navod.

## ZAHVALA

Ovim se putem zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Tanji Čelić, na pruženim savjetima, pomoći i usmjeravanju pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i vjeri u mene tijekom čitavog studija. Posebno bih istaknula svoje roditelje, djeda i baku, uz koje nikad nije nedostajalo ohrabrenja i motivacije.

Na kraju, zahvaljujem se svojim prijateljima što su mi uljepšali studentske dane.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. SVRHA RADA .....	4
3. PREGLED LITERATURE NA ZADANU TEMU .....	4
3.1. MEHANIZMI OŠTEĆENJA .....	4
3.1.1. Ishemija .....	4
3.1.2. Reperfuzija .....	7
3.1.3. Stanična smrt .....	9
3.1.4. Aktivacija imunološkog sustava .....	11
3.2. MEHANIZMI OPORAVKA .....	15
3.3. PREVENCIJA I TERAPIJA ISHEMIJSKO-REPERFUZIJSKE OZLJEDE .....	21
3.3.1. Liječenje darivatelja .....	21
3.3.2. Pohrana organa .....	23
3.3.2.1. Otopine za hladnu pohranu organa .....	23
3.3.2.2. Perfuzija u uređaju za mehaničku prezervaciju bubrega .....	28
3.3.3. Novi terapijski ciljevi .....	29
4. RASPRAVA .....	31
5. ZAKLJUČAK .....	35
6. SAŽETAK .....	36
7. SUMMARY .....	37
8. LITERATURA .....	38
9. ŽIVOTOPIS .....	46

## POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA

Apaf-1 – engl. *apoptotic protease activating factor 1*; apoptotički aktivirajući faktor proteaza 1

ATP – engl. *adenosine triphosphate*; adenzin trifosfat

CSF-1 – engl. *colony-stimulating factor 1*; faktor stimulacije kolonije 1

DAMP – engl. *damage-associated molecular pattern*; molekularni obrazac oštećenja

DBD – engl. *donation after brain death*; darivanje nakon moždane smrti

DC – engl. *dendritic cell*; dendritička stanica

DCD – engl. *donation after circulatory death*; darivanje nakon cirkulacijske smrti

DGF – engl. *delayed graft function*; odgođena funkcija presatka

DISC – engl. *death-inducing signaling complex*; signalni kompleks koji inducira smrt

DNA – engl. *deoxyribonucleic acid*; deoksiribonukleinska kiselina

EC – engl. *Eurocollins*

ECD – engl. *extended criteria donor*; darivatelj prema proširenim kriterijima

EGF – engl. *epidermal growth factor*; epidermalni čimbenik rasta

FADH<sub>2</sub> – engl. *flavin adenine dinucleotide*; flavin adenin dinukleotid

HMGB1 – engl. *high mobility group box 1*; protein visoke pokretljivosti iz skupine 1

HMP – engl. *hypothermic machine perfusion*; perfuzija u uređaju za mehaničku prezervaciju bubrega

HOC – engl. *hyperosmolar citrate*; hiperosmolarni citrat

HTK – engl. *histidine-tryptophan-ketoglutarate*; histidin-triptofan-ketoglutarat

ICAM-1 – engl. *intercellular adhesion molecule 1*; međustanična adhezijska molekula 1

IGF – engl. *insulin growth factor*; inzulinu nalik čimbenik rasta

IGL-1 - Institut Georges Lopez 1

IKK $\alpha$  – engl. *I $\kappa$ B kinase  $\alpha$* ; I $\kappa$ B kinaza  $\alpha$

IL-6 – engl. *interleukin 6*

IL-10 – engl. *interleukin 10*

IL-22 – engl. *interleukin 22*

IRI – engl. *ischemia-reperfusion injury*; ishemijsko-reperfuzijska ozljeda

KBB – kronična bubrežna bolest

MAC – engl. *membrane attack complex*; kompleks koji napada membranu

mPTP – engl. *mitochondrial permeability transition pore*; mitohondrijska permeabilizacijska pora

NADH – engl. *nicotinamide adenine dinucleotide*; nikotinamid adenin dinukleotid

NF- $\kappa$ B – engl. *nuclear factor  $\kappa$ B*; nuklearni faktor  $\kappa$ B

NO – engl. *nitric oxide*, dušični oksid

PAF – engl. *platelet activating factor*; trombocitni aktivirajući faktor

PDGF – engl. *platelet-derived growth factor*; čimbenik rasta iz trombocita

PEG – engl. *polyetilenglycol* ; polietilenglikol

PNF – engl. *primary non function*; primarna afunkcija presatka



ROS – engl. *reactive oxygen species*; slobodni kisikovi radikali

TEC – engl. *tubular epithelial cells*; tubularne epitelne stanice

TGF- $\beta$  – engl. *transforming growth factor  $\beta$* ; transformirajući čimbenik rasta  $\beta$

TLR – engl. *Toll-like receptors*; Toll-like receptori

TNF- $\alpha$  – engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ; tumor nekroza čimbenik  $\alpha$

SCOT - Solution de Conservation des Organes et Tissus

sCR1 – engl. *soluble complement receptor type 1*; topljivi receptor komplementa tip 1

siRNA – engl. *small interfering ribonucleic acid*; mala interferirajuća ribonukleinska kiselina

UW – engl. *University of Wisconsin*

VCAM-1 – engl. *vascular cell adhesion molecule 1*; adhezijska molekula vaskularnih stanica

1

VEGF-A – engl. *vascular endothelial growth factor A*; vaskularni endotelni faktor rasta A

ZSKBB – završni stadij kronične bubrežne bolesti

## 1. UVOD

Kronična bubrežna bolest (KBB), definirana kao stanje oštećenja bubrežne funkcije ili strukture u trajanju duljem od tri mjeseca, zahvaća između 8% i 16% svjetske populacije. U razvijenim zemljama najčešći su uzroci kronične bubrežne bolesti šećerna bolest i arterijska hipertenzija (1). Prevalencija kronične bubrežne bolesti nastavlja rasti uslijed starenja populacije i globalne epidemije tipa 2 šećerne bolesti, prijeteci dostizanje epidemijskih razmjera (2). Optimalni pristup KBB-i uključuje redukciju kardiovaskularnog rizika, liječenje albuminurije, izbjegavanje potencijalnih nefrotoksina i prilagodbu doze lijekova, uz praćenje komplikacija poput hiperkalijemije, metaboličke acidoze, anemije i ostalih metaboličkih poremećaja (1). Iako je danas KBB moguće otkriti u ranijim stadijima te usporiti njeno napredovanje, mnogi bolesnici razviju 5. stadij kroničnog bubrežnog zatajenja koji nazivamo završni stadij KBB (ZSKBB) te se pripremaju za postupke nadomještanja bubrežne funkcije – hemodijalizu, peritonejsku dijalizu ili transplantaciju bubrega (3). Pacijenti sa ZSKBB imaju bolje dugoročno preživljavanje ako se stave na listu čekanja i naposljetku podvrgnu transplantaciji bubrega te često imaju bolju kvalitetu života od onih koji ostanu na dijalizi (4).

Od 1980. godine u svrhu transplantacije bubrega zakonski je, uz dotadašnje korištenje organa živih srodnih darivatelja i umrlih osoba nakon proglašenja smrti na temelju prestanka rada srca (*engl. donation after circulatory death, DCD*), omogućeno i korištenje organa umrlih darivatelja uz proglašavanje smrti na temelju smrti mozga (*engl. donation after brain death, DBD*). To je pridonijelo kvaliteti organa jer je cirkulacija krvi bila održana do trenutka uzimanja organa (5). Iako je transplantacija bubrega optimalni izbor liječenja pacijenata sa ZKSBB, na globalnoj je razini prisutan problem nestašice pogodnih organa darivatelja za transplantaciju te su brojni transplantacijski centri, s ciljem povećanja broja darivateljskih organa, počeli prihvaćati i darivatelje prema proširenim kriterijima – „marginalne darivatelje“ (*engl. extended criteria donors, ECD*). Korištenje organa darivatelja koji se smatraju marginalnim utječe na

ishode transplantacije zbog često suboptimalne kvalitete organa. Neophodno je optimiziranje stanja svakog darivateljskog organa prije ili u vrijeme transplantacije te minimiziranje dodatne ozljede, kako bi se postigla najbolja moguća post-transplantacijska funkcija organa i izbjegla primarna afunkcija presatka (*engl. primary non function, PNF*), odgođena funkcija presatka (*engl. delayed graft function, DGF*) i kronično odbacivanje presatka (6).

Bubrežni presadci neizbježno podliježu ishemiji od trenutka kad se odvoje od cirkulacije darivatelja. Ozljeda započinje pri eksplantaciji organa iz darivatelja prolaznom kirurškom toplom ishemijom, praćenom periodom hladne ishemije u hipotermnoj otopini za čuvanje organa te potom toplom ishemijom tijekom implantacije u primatelja. Nakon revaskularizacije, uspostavljen protok krvi u postishemijskom bubregu aktivira slijed događaja koji pogoršava bubrežnu ozljedu; ovaj se patološki fenomen opisuje kao ishemijsko-reperfuzijska ozljeda (*engl. ischemia-reperfusion injury, IRI*) (7). Poremećaj cirkulacije nastupa pri moždanoj smrti darivatelja kao posljedica ozbiljnih hemodinamskih promjena, koje već u samom darivatelju uzrokuju aktivaciju kaskade komplementa i urođene imunosti. Klemanje renalne arterije uzrokuje kratku, ali opsežnu ishemiju tijekom postupka eksplantacije bubrega iz darivatelja, a hladna ishemija tijekom skladištenja organa dovodi do daljnjeg ishemijskog oštećenja. Pri transplantaciji bubrega od živih srodnih darivatelja organ je također podvrgnut toploj ishemiji, ali u tom slučaju nisu prisutni poremećaji vezani uz moždanu smrt darivatelja te je znatno kraći period hladne ishemije, što rezultira rjeđom i blažom ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom pri presađivanju bubrega od srodnih živućih darivatelja (8). Za razliku od bubrega darivatelja s proglašenom moždanom smrću, bubrezi darivatelja s cirkulacijskom smrću podliježu opsežnijoj ozljedi toplom ishemijom, uzrokovanoj nedostatnom perfuzijom organa tijekom faze agonije i nakon srčanog zastoja (9).

Vrijeme hladne ishemije definirano je kao period koji započinje prestankom krvne opskrbe organa u tijelu darivatelja, kad započinje perfuzija prezervacijskom tekućinom i traje

sve do početka vaskularnog anastomoziranja u tijelu primatelja (10). Nakon eksplantacije iz darivatelja organi zahtijevaju učinkovitu pohranu u periodu čekanja transplantacije. Otopine za hladnu pohranu razvijene su s ciljem održavanja vijabilnosti tkiva, tako da reduciraju metaboličku aktivnost i nakupljanje toksičnih supstanci tijekom razdoblja hladne ishemije. Bubrezi koji se koriste za transplantaciju mogu provesti dulje razdoblje očuvanja u takvim otopinama, što rezultira povećanom podložnošću oštećenju prilikom reperfuzije (11). Korištenje bubrega preminulih darivatelja često dovodi do prolongiranog vremena hladne ishemije, koje je snažni čimbenik rizika za odgođenu funkciju bubrežnog presatka te negativno utječe na preživljavanje presatka (12). Pohrana se provodi čuvanjem organa na +4°C, temeljeno na principu da se metabolizam gotovo dvostruko usporava za svakih 10°C pada temperature, ili u perfuzoru s kontinuiranim protokom tekućine kroz bubrege. Unatoč tome, u razdoblju hladne ishemije stanična se ozljeda ne može spriječiti, nego samo ublažiti, održavajući aktivnost metabolizma na oko 10% i u hipoksičnim uvjetima (13). Iako je ponovno uspostavljanje cirkulacije u ishemičnom organu neophodno za sprječavanje nepovratnog oštećenja stanica, reperfuzija može značajno pogoršati ozljedu tkiva započetu ishemijom; dokazi koji podupiru koncept da reperfuzija paradoksalno pogoršava ozljedu tkiva pružili su velik poticaj istraživanjima, kako bi se terapijski interveniralo i na tu komponentu oštećenja (13, 14). Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda obuhvaća višestruke procese koji rezultiraju oštećenjem tkiva, uključujući promjene unutarstanične koncentracije iona, gubitak mitohondrijskog membranskog potencijala, stvaranje slobodnih kisikovih radikala (*engl. reactive oxygen species, ROS*), disfunkciju endotela, agregaciju trombocita s mikroembolizacijama, fenomen izostanka ponovnog protoka (*engl. no reflow fenomen*) i aktivaciju imunološkog sustava (15).

Oštećenje tkiva uslijed IRI pridonosi morbiditetu i mortalitetu širokog spektra patoloških stanja, poput infarkta miokarda, ishemijskog moždanog udara, traume, akutne bubrežne ozljede, srčanog zastoja i apneje u snu, a poseban izazov predstavlja u transplantaciji

organa (16). Neizbježan je događaj pri transplantaciji bubrega i jedan od najvažnijih mehanizama odgovornih za PNF i DGF pri transplantaciji. Povezana je s proupalnim odgovorom i akutnim odbacivanjem presatka, a može rezultirati i progresivnom intersticijskom fibrozom te naposljetku dovesti do kronične disfunkcije presatka (6).

## 2. SVRHA RADA

Svrha je ovog rada ukazati na mehanizme nastanka ishemijsko-reperfuzijske ozljede i dati pregled dostupnih i potencijalnih preventivskih i terapijskih mjera usmjerenih na ublažavanje i brži oporavak od IRI. Bolje razumijevanje patofizioloških procesa u podlozi bubrežnog oštećenja vodi u razvitak ciljanijih terapijskih strategija.

## 3. PREGLED LITERATURE NA ZADANU TEMU

### 3.1. MEHANIZMI OŠTEĆENJA

#### 3.1.1. Ishemija

Nedostatna opskrba tkiva kisikom uslijed ishemijske narušava biokemijske reakcije koje osiguravaju nesmetano funkcioniranje, integritet i opstanak stanica. Kisik je neophodan za održavanje homeostaze stanica te njegov nedostatak utječe na sve stanične funkcije (17).

U aerobnim uvjetima piruvat nastao glikolizom odlazi u mitohondrije i oksidativnom dekarboksilacijom prelazi u acetil CoA, koji ulazi u ciklus limunske kiseline i stvara reducirane kofaktore u obliku NADH i FADH<sub>2</sub> (*engl. nicotinamide adenine dinucleotide, NADH i flavin adenine dinucleotide, FADH<sub>2</sub>*) (18). Molekule NADH i FADH<sub>2</sub> smatraju molekulama bogatim energijom jer svaka od njih ima par elektrona visokog potencijala prijenosa na druge molekule. Prijenosom tih elektrona na molekularni kisik lancem nosača elektrona oslobađa se velika energija, koja se može upotrijebiti za sintezu adenozin trifosfata (*engl. adenosine triphosphate, ATP*); taj je proces oksidativne fosforilacije glavni izvor ATP-a u aerobnih

organizama (19). S obzirom na to da lanac transporta elektrona zahtijeva kisik kao konačni akceptor elektrona, neadekvatna opskrba tkiva kisikom uslijed ishemije inhibira proces oksidativne fosforilacije (18). U anaerobnim uvjetima, piruvat ne ulazi u mitohondrije, već se u citosolu pomoću enzima laktat dehidrogenaze pretvara u laktat. Iako stanica ne koristi laktat kao izravni izvor energije, ova reakcija omogućuje regeneraciju NAD<sup>+</sup> (iz NADH), kofaktora koji mora biti dostupan u dovoljno visokim unutarstaničnim koncentracijama za odvijanje glikolize. Anaerobna glikoliza rezultira proizvodnjom 2 molekule ATP-a po jednoj molekuli glukoze. U usporedbi s procesom oksidativne fosforilacije, koji maksimizira energetski potencijal jedne molekule glukoze, anaerobna glikoliza predstavlja nezadovoljavajuće sredstvo proizvodnje energije (18).

Anaerobni metabolizam ne zadovoljava potrebe aerobnih tkiva te posljedično brzo opada unutarstanična razina ATP-a. Uz to, nakupljanje mliječne kiseline koja nastaje pri laktat-ovisnoj proizvodnji ATP-a povećava unutarstaničnu acidozu. (8). Ishemija rezultira manjkom metaboličkih supstrata; u ishemičnom tkivu uočeno je manje glikogena. Iscrpljenje staničnih zaliha glikogena sprječava odvijanje anaerobne glikolize, a ako je glikogen još uvijek prisutan, no iscrpljenje su zalihe ATP-a, glikoliza ne može započeti. Toksični metabolički produkti nisu eliminirani te raste osmolarno opterećenje, a nakupljeni H<sup>+</sup>, laktati i NADH inhibiraju enzime glikolize (20). Mitohondrijska ATP-aza, koja u fiziološkim uvjetima služi za sintezu ATP-a procesom oksidativne fosforilacije, u ishemijskim uvjetima paradoksalno uzrokuje hidrolizu ATP-a; troši ATP kako bi protone preusmjerila iz matriksa u intermembranski prostor i održala potencijal mitohondrijske membrane. Nedostatak kisika urušava mitohondrijski elektrokemijski gradijent, što prebacuje ATP-azu sa sinteze na hidrolizu ATP-a, dovodeći do rasipnog trošenja ATP-a proizvedenog anaerobnom glikolizom. Dakle, aktivnost ATP-aze nije samo onemogućena tijekom ishemije u smislu stvaranja ATP-a, već će prevladati njezina aktivnost ATP hidrolize; ovaj enzim može raditi i u obrnutom načinu (21). ATP se razgrađuje

do adenzin difosfata, adenzin monofosfata, inozin monofosfata, adenzina te naposljetku hipoksantina. U fiziološkim uvjetima, hipoksantin se pomoću enzima ksantin dehidrogenaze pretvara u ksantin. U ishemijskim uvjetima, ksantin dehidrogenaza uz pomoć kalcija prolazi kroz konformacijsku promjenu u ksantin oksidazu, sposobnu generirati slobodne kisikove radikale (22).

Nedostatak ATP-a inhibira rad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-aze, posljedično uzrokujući nakupljanje natrija unutar stanice. Unutarstanično nagomilavanje natrija za sobom povlači vodu te dovodi do nastajanja staničnog edema (6). Uslijed nakupljanja brojnih međuprodukata i produkata glikolize te postupne defosforilacije ATP-a do adenzina i anorganskog fosfata, povećava se osmolarno opterećenje ishemičnih stanica. Posljedično privlačenje tekućine u stanicu zbog hiperosmolarnosti zapravo se smatra odgovornim za nastajanje edema stanica u većoj mjeri od insuficijencije  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  crpke (20). Unutarstanično nakupljanje natrija pokušava se ublažiti pojačanim radom  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiporta u obrnutom smjeru, tako da u stanicu ulazi i nakuplja se  $\text{Ca}^{2+}$ , a izlazi  $\text{Na}^+$  (23). Međutim, citosolno nakupljanje kalcija uslijed povećanog utoka iz izvanstaničnog prostora nastupa tek kasnije; prvotni je uzrok oštećenje mehanizma sekvestracije kalcija unutar endoplazmatskog retikuluma zbog manjka ATP-a. Povišena razina unutarstaničnih  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  uzrokuje zadržavanje kalcija u matriksu mitohondrija te dovodi do preopterećenja kalcijem (24).

Uslijed povišene razine kalcija u mitohondrijima citokrom c izgubi svoje usidrenje u unutrašnjoj membrani mitohondrija, a do njegovog će otpuštanja u citosol te posljedične aktivacije kaspaze-3 doći prilikom reperfuzije. Citokrom c prodire u citosol kroz mitohondrijsku permeabilizacijsku poru (*engl. mitochondrial permeability transition pore, mPTP*), neselektivnu poru unutrašnje mitohondrijske membrane, koja je u fiziološkim uvjetima zatvorena te se otvara uslijed preopterećenja kalcijem (20). Pri fiziološkom pH, višak mitohondrijskog kalcija doveo bi do otvaranja mitohondrijske permeabilizacijske pore, što je

povezano s apoptozom. Tijekom ishemije, otvaranje mitohondrijske permeabilizacijske pore spriječeno je niskim unutarstaničnim pH, ali će se odviti prilikom reperfuzije (24). Mitohondrijsko preopterećenje kalcijem dovodi do stvaranja slobodnih kisikovih radikala tijekom ishemije, no znatno se više ROS-a stvara kasnije, tijekom reperfuzije (24). Povišena razina citosolnog kalcija pri neutralnom bi pH aktivirala razne proteaze (poput kalpaina i kaspaza) i fosfolipaze, koje zahvaljujući acidozi ostaju neaktivne tijekom ishemijskog razdoblja, no oštećuju stanicu pri normalizaciji pH uslijed reperfuzije (24).

### 3.1.2. Reperfuzija

Stanice, kao odgovor na hipoksiju, prolaze kroz specifične promjene u enzimskim aktivnostima, funkciji mitohondrija, strukturi citoskeleta, membranskom transportu i antioksidacijskoj obrani, što skupno predstavlja predispoziciju za reoksigenacijsku ozljedu (25). Tijekom reperfuzije rastu razine kisika te dolazi do normalizacije pH, štetne za prethodno ishemične stanice (25). Reperfuzijska ozljeda, kao efektorska faza ishemijske ozljede, razvija se satima ili danima po inicijalnoj ozljedi. Procesi popravka i regeneracije odvijaju se zajedno s apoptozom, autofagijom i nekrozom; sudbina organa ovisi o tome što će prevladati (20).

Reperfuzijsko oštećenje dominantno je posljedica stvaranja velikih količina slobodnih kisikovih radikala. Mitohondriji su prepoznati kao ključni izvor ROS-a, stvaranjem superoksida po reperfuziji. Iako postoje alternativni izvori stvaranja superoksida, poput puta ksantin oksidaze i NADPH oksidaze, aktivacija ovih puteva odvija se u kasnijoj fazi, sekundarno inicijalnom mitohondrijskom naletu stvaranja superoksida. Generalizirana disfunkcija lanca prijenosa elektrona smatrala se uzrokom produkcije superoksida, no otkriveno je da postoji specifični metabolički put pri kojem se superoksid stvara kroz obrnuti transport elektrona u kompleksu I lanca prijenosa elektrona (25). Selektivna akumulacija sukcinata, intermedijarnog metabolita ciklusa limunske kiseline, odgovorna je za mitohondrijsku produkciju superoksida



pri reperfuziji. Do ishemijskog nakupljanja sukcinata dolazi zbog obrata sukcinat dehidrogenaze, koji vodi u redukciju fumarata u sukcinat. Uslijed reperfuzije nakupljeni se sukcinat ponovno oksidira sukcinat dehidrogenazom i održava proton-motornu silu konvencionalnim prijenosom elektrona kroz komplekse III i IV do kisika, ali i potiče opsežno stvaranje slobodnih kisikovih radikala obrnutim prijenosom elektrona u mitohondrijskom kompleksu I. Akumulacija sukcinata prilikom ishemije praćena je njegovim metaboliziranjem po reperfuziji, što se odvija istodobno s povećanjem proizvodnje slobodnih kisikovih radikala u mitohondrijima (26). Tijekom ishemije, ksantin dehidrogenaza pretvara se u ksantin oksidazu. Razgradnja ATP-a rezultira nakupljanjem hipoksantina, koji je supstrat za aktivnost ksantin oksidaze. U reperfuziji, produkcija superoksida posredovana je pretvaranjem hipoksantina u mokraćnu kiselinu djelovanjem ksantin oksidaze (27). Osim slobodnih kisikovih radikala, u bubregu se pomoću inducibilne NO (*engl. nitric oxide, NO*) sintaze, medijatora upale, proizvode reaktivne dušikove jedinice poput dušikovog oksida (28).

Masivna produkcija ROS-a dovodi do lipidne peroksidacije i karbonilacije proteina, koji aktiviraju različite procese oštećenja, pridonoseći ozljedi staničnih membrana, citoskeleta i DNA (*engl. deoxyribonucleic acid, DNA*) te uzrokujući poremećaj stvaranja ATP-a. Uz to, kombinacija stvaranja slobodnih kisikovih radikala, disfunkcije mitohondrija i povišene razine mitohondrijskog kalcija uzrokuje otvaranje mitohondrijske permeabilizacijske pore. Uslijed toga, dolazi do oslobađanja tvari poput citokroma c, sukcinata i mitohondrijske DNA, koje su sposobne inducirati staničnu smrt apoptozom i nekrozom, a mogu djelovati i kao molekularni obrasci oštećenja (*engl. damage-associated molecular pattern, DAMP*) i aktivirati urođenu, a potom i stečenu imunost (6). Osim direktnog učinka na mitohondrije, kalcij može aktivirati fosfolipaze i kalpaine koji će prouzročiti oštećenje mitohondrija (29). Kalpain sudjeluje u preradi i otpuštanju mitohondrijskog proteina AIF, koji translocira u jezgru te posreduje fragmentaciju DNA (29).

Otvaranje mPTP rezultira brзом izmjenom otopljenih tvari veličine do 1,5 kDa, s redistribucijom NADH u citosol i priljevom citosolne vode, što dovodi do ekspanzije matriksa. U ekstremnim slučajevima, bubrenje matriksa dovoljno je za gubljenje nabora unutrašnje membrane, no vanjska je membrana manje rastezljiva i rupturira, oslobađajući proapoptičke čimbenike iz intermembranskog prostora. Opsežno bubrenje mitohondrija može dovesti do stanične smrti i prije no što se apoptoza nastavi, zbog energetskog kolapsa i nekontroliranih enzimatskih procesa (29).

### 3.1.3. Stanična smrt

Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda aktivira različite oblike stanične smrti, koji se mogu svrstati u apoptozu, nekrozu i staničnu smrt povezanu s autofagijom (8). Od navedenih, nekroza predstavlja najslabije kontrolirani oblik stanične smrti. Nekontrolirano bubrenje stanice vodi k rupturi stanične membrane, s posljedičnim otpuštanjem staničnih fragmenata u izvanstanični prostor. Ti fragmenti djeluju kao molekularni obrasci oštećenja te mogu aktivirati imunološki sustav, s infiltracijom upalnih stanica u tkivo i oslobađanjem različitih citokina (6).

Za razliku od nekontroliranog procesa nekroze, apoptoza je visoko reguliran i kontroliran proces u kojem aktivacija kaskade kaspaza rezultira samoograničavajućom, programiranom staničnom smrti. Kaspaze su proteaze koje imaju ključnu ulogu u procesu apoptoze. Postoje dvije vrste kaspaza: inicijatorske (-2,- 8, -9, 10) i izvršne (-3, -6, -7) kaspaze. Inicijatorske se kaspaze mogu aktivirati vezanjem za specifični aktivacijski kompleks proteina (signalni kompleks koji inducira smrt, apoptosom). Formirani kompleksi zatim aktiviraju izvršne kaspaze, koje proteolitički degeneriraju različite unutarstanične proteine. U apoptozi se stvaraju apoptotička tijela koja sadrže fragmente tih unutarstaničnih proteina. Apoptotička tijela podliježu apoptozi prije no što se njihov sadržaj može razliti u izvanstanični prostor, što dovodi do manjeg stimuliranja imunološkog sustava u usporedbi s nekrozom. Apoptoza se može

inicirati kroz intrinzični (mitohondrijski) i ekstrinzični put (put receptora smrti) (6). U mitohondrijskom putu dolazi do otpuštanja proapoptotičkih faktora, poput citokroma c, iz intermembranskog prostora mitohondrija u citosol. U citosolu, citokrom c se veže za apaf-1 (*engl. apoptotic protease-activating factor 1*) i dovodi do njegove oligomerizacije. Nastali kompleks, apoptosom, aktivira kaspazu-9, čija katalitička aktivnost cijepa i aktivira izvršne kaspaze-3 i -7 (30). Ekstrinzični put ovisi o izvanstaničnim molekulama poput tumor nekroza čimbenika- $\alpha$  (*engl. tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$* ). Vezanje na receptore smrti na staničnoj membrani dovodi do konformacijskih promjena u signalnom kompleksu koji inducira smrt (*engl. death-inducing signaling complex, DISC*), rezultirajući konverzijom prokaspaza u kaspaze. Jedan od ovih ekstrinzičnih putova, vezan uz kaspazu-8, istraživao je u mišjim modelima IRI. Tubularne epitelne stanice bubrega najosjetljivije su na hipoksiju i prve podliježu apoptozi prilikom ishemijsko-reperfuzijske ozljede (31).

Programirana stanična smrt bila je sinonim apoptoze, no opisani su novi putovi regulirane nekroze. Najbolje proučeni model regulirane nekroze je nekroptoza koja se aktivira poremećajima apoptoze posredovane kaspazom-8 i posljedica je interakcije između protein kinaza 1 i 3 i njihovih receptora. U tom slučaju dolazi do nastanka nekroptosoma, koji može potaknuti upalu i aktivirati urođenu i stečenu imunost (8).

Autofagija se na bazalnoj razini odvija u većini stanica kako bi se održala stanična homeostaza, dok autofagija uslijed stanične ozljede prvenstveno služi kao obrambena strategija za preživljavanje stanica. Uslijed metaboličkog stresa, pomoću autofagije se stvaraju aminokiseline i lipidi, upotrebljivi za sintezu proteina i proizvodnju ATP-a. Autofagija može očistiti proteinske agregate, oštećene organele i unutarstanične patogene te ograničiti oštećenje DNA i kromosomsku nestabilnost. Unatoč citoprotektivnoj ulozi autofagije u preživljavanju stanica, autofagija je predložena kao mogući mehanizam stanične smrti. Iako postoji malo uvjerljivih dokaza da autofagija može izravno dovesti do smrti stanica, čini se mogućim da bi

ekscesivna degradacija staničnih organela uslijed autofagije mogla prouzročiti štetu. Odnosi između autofagije, stanične smrti i preživljavanja veoma su složeni. Autofagija i apoptoza međusobno se ne isključuju te čak dijele određene zajedničke regulatore. Kao posljedica toga, čini se da autofagija i apoptoza mogu međusobno surađivati, antagonizirati se ili si pomagati, utječući na različite načine na sudbinu stanice (32). Određena istraživanja ističu ključnu ulogu autofagije u održavanju integriteta tubularnih stanica (32). Moguće je da u bubrežnoj ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi autofagija ima dvostruku ulogu, i protektivnu i štetnu, ovisno o trajanju ishemije i fazi tog procesa (33). S obzirom na dvostruku ulogu autofagije, cilj bi bio ograničiti razinu autofagije unutar zaštitnog prozora. Pri ozbiljnoj, prolongiranoj ishemiji inhibitori autofagije vjerojatno nadmašuju aktivatore (33).

#### 3.1.4. Aktivacija imunološkog sustava

Poveznica između stanične smrti i aktivacije nespecifične imunosti leži u međustaničnoj komunikaciji proupalnih molekula. Oštećene i nekrotične stanice otpuštaju molekularne obrasce oštećenja u izvanstanični prostor. DAMP-ove potom prepoznaju tkivni makrofagi i endotelne stanice pomoću Toll-like receptora (*engl. Toll-like receptors, TLR*), posebice TLR4 (31). Aktivacija TLR4 inducira otpuštanje nuklearnog faktora- $\kappa$ B (*engl nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B*) i njegovu translokaciju u jezgru, gdje djeluje kao transkripcijski faktor zaslužan za pojačanje ekspresije upalnih gena (31). Istraživanje na mišjem modelu pokazalo je da je ekspresija TLR4 i njegovih brojnih endogenih liganda povećana nakon bubrežne ishemije te da je puni razvoj bubrežne IRI ovisio o signaliziranju putem TLR4/MyD88 puta. Miševi s genetskim nedostatkom TLR4 ili adaptorske molekule MyD88 bili su zaštićeni od disfunkcije bubrega i histološkog oštećenja, zahvaljujući redukciji stvaranja proupalnih citokina i kemokina, s istodobnim smanjenjem infiltracije makrofagima i neutrofilima te smanjenjem apoptoze tubularnih epitelnih stanica. Demonstrirano je da je TLR4 signalizacija u bubrežnim parenhimatoznim stanicama imala veću ulogu u oštećenju bubrega, no ekspresija TLR4 na

leukocitima također ima znatnu ulogu (34). Istraživanje provedeno na bubrezima darivatelja pokazalo je da je u svima TLR4 konstitutivno izražen u stanicama proksimalnih i distalnih tubula, no razina je značajnije viša u organima preminulih, u usporedbi s živućim darivateljima. U tubulima bubrega preminulih, ali ne i živućih darivatelja, također je prikazan protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (*engl. high mobility group box 1, HMGB1*), poznati endogeni TLR4 ligand koji može stimulirati proupalni odgovor. HMGB1 može djelovati kao DAMP u patogenezi bubrežne IRI (35). Također je prikazano kako su mutacije TLR4 s gubitkom funkcije povezane s manjom ekspresijom proupalnih gena unutar presatka. Uočena je važna uloga ekspresije bubrežnog parenhimatoznog TLR4 u posredovanju ishemijsko-reperfuzijske ozljede bubrega promicanjem nakupljanja leukocita, stvaranjem proupalnih molekula i posredovanjem oštećenja bubrega (35). Aktivacija TLR4 u bubrežnoj IRI ostvaruje brojne posljedice na presadak. Prvenstveno potiče oslobađanje raznih proupalnih medijatora poput interleukina-6 (*engl. interleukin 6, IL-6*) i TNF- $\alpha$ , što je praćeno povećanom ekspresijom kemotaksijskih proteina uključenih u privlačenje neutrofila i matrofaga. TLR4 aktivacija dovodi i do povećane ekspresije adhezijskih molekula, poput međustanične adhezijske molekule 1 (*engl. intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1*), adhezijske molekule vaskularnih stanica 1 (*engl. vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1*) i E-selektina, olakšavajući migraciju i infiltraciju leukocita u intersticijski prostor. Aktivacija TLR4 na cirkulirajućim imunološkim stanicama vodi do njihove aktivacije. Neutrofil i makrofazi uključeni su u ranu fazu nakon reperfuzije. Neutrofil se smatraju primarnim medijatorima ozljede, čija aktivacija vodi u otpuštanje slobodnih kisikovih radikala, raznih proteaza i ozljedu bubrežnog tkiva. Po aktivaciji, makrofazi otpuštaju proteolitičke enzime i proupalne citokine. Naposljetku, imunološki odgovor posredovan TLR4 povezan je i s bubrežnom fibrozom (6).

Endotelne su stanice po reperfuziji sklone posredovanju adhezije i transmigracije leukocita u tkiva, što predstavlja važnu ulogu urođene imunosti kao odgovora na ishemijsko-

reperfuzijsku ozljedu. Endotelne stanice izražavaju molekule poput P-selektina i ICAM-1 kako bi se olakšala transmigracija aktiviranih leukocita u intersticijski prostor. Citokini i proteaze oslobođeni iz aktiviranih leukocita potiču oštećenje tkiva povećanjem vaskularne propusnosti, tromboze i stanične smrti. Po ozljedi, nekoliko molekula sudjeluje u interakciji između leukocita, endotelnih stanica i trombocita. Jedna od njih je trombocitni aktivirajući faktor (*engl. platelet-activating factor, PAF*), fosfolipidni posrednik uključen u akutne upalne i imunološke reakcije. U mišjim modelima transplantacije bubrega, prikazano je da PAF facilitira kroničnu nefropatiju presatka te odbacivanje. Tijekom ishemije, endotelne stanice također otpuštaju tvari poput faktora rasta iz trombocita (*engl. platelet-derived growth factor, PDGF*), koje pospješuju vazokonstrikciju kako bi ublažile edem tkiva. Uslijed reperfuzije, vazokonstrikcija se pogoršava smanjenom ekspresijom endotelne NO sintetaze i povećanom osjetljivošću na vazokonstriktorne molekule, uključujući angiotenzin II (31). Smanjena vaskularna relaksacija nakon reperfuzije, uz održanu kontrakciju pericita, može rezultirati i „no-reflow“ fenomenom, kojeg karakterizira povećani otpor mikrovaskularnom protoku po uspostavljanju normalnih uvjeta (8).

Komplement je važna sastavnica nespecifične imunosti te predstavlja ključnu ulogu u obrani domaćina, čišćenju imunokompleksa i tkivnoj homeostazi. Pri ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi sustav komplementa aktivira se endogenim ligandima koji mogu pokrenuti cijepanje komponenata komplementa klasičnim, lektinskim i alternativnim putem. Stvaranje terminalnih komponenata komplementa, C3a i C5a, te formacija kompleksa koji napada membranu (*engl. membrane attack complex, MAC*), imaju ključnu ulogu u pojačavanju imunološkog odgovora, kemotaksiji, regrutaciji i aktivaciji neutrofila i monocita te izravnoj ozljedi tubularnih stanica (36). Humane pretkliničke studije pokazale su da u bubrezima preminulih darivatelja dolazi do jače aktivacije sustava komplementa u odnosu na one živućih darivatelja te su stoga u većem riziku njegove aktivacije (31). Provedeno istraživanje o razlici ekspresije komponenata

komplementa u organima preminulih i živućih darivatelja pokazalo je da razlike u ekspresiji gena komplementa ne ovise o unutarnjoj histološkoj kvaliteti organa, nego o razlici u duljini trajanja hladne ishemije i smrti darivatelja. Lokalna ekspresija gena komplementa značajno korelira s ranom i kasnom funkcijom presatka (37). Nije moguće potpuno razlučiti učinke prolongiranog vremena ishemije od direktnih učinaka moždane smrti darivatelja, no povećana ekspresija gena komplementa pri prolongiranoj ishemiji zajedno sa saznanjem da je ekspresija gena komplementa u organima preminulih darivatelja s najkraćim vremenom hladne ishemije i dalje veća od one u živućih darivatelja dovode do zaključka da oboje pojedinačno doprinose odgovoru na ozljedu u bubrezima preminulih darivatelja (37). Lokalna ekspresija C3 komponente komplementa u bubregu darivatelja štetna je za preživljavanje organa. Odsutnost lokalnog stvaranja C3 komponente u bubregu darivatelja uvelike poboljšava preživljavanje bubrežnog presatka nakon transplantacije (38). Važan je posrednik u bubrežnoj ozljedi zapravo C3 komponenta komplementa lokalno proizvedena u bubrezima darivatelja, a ne cirkulirajući C3 primatelja, što se može objasniti time da C3 komponenta zbog svoje velike molekularne veličine posljedično slabo prodire iz cirkulacije kroz bazalnu membranu u bubreg (39). Na mišjem modelu pokazano je da nakon moždane smrti darivatelja također dolazi i do aktivacije komplementa na sistemskoj razini. Štoviše, kod humanih preminulih darivatelja visoka razina C5b-C9 povezana je s većom stopom akutnog odbacivanja u primatelja. (39) Aktivacija sustava komplementa povezuje se i sa širokim spektrom neimunoloških procesa, poput modulacije biologije matičnih stanica, regeneracije tkiva i progresije u fibrozu nakon ozljede (36).

Inicijalna stanična smrt uslijed IRI dovodi do masivne produkcije DAMP-ova, inducirajući aktivaciju nespecifične imunosti. Aktivacija upalnih stanica, poput neutrofila i makrofaga, rezultira oštećenjem bubrežnih tubularnih stanica i daljnjim otpuštanjem staničnih fragmenata (7). Poveznicu između nespecifične i specifične imunosti čine dendritičke stanice (*engl. dendritic cell, DC*). Dendritičke stanice su antigen-prezentirajuće stanice koje imaju

esencijalnu ulogu u patogenezi IRI. Nezrele DC se mogu aktivirati DAMP-ovima kroz TLR i sustav komplementa. Nakon sazrijevanja, mogu aktivirati specifičnu imunost direktno, prezentiranjem antigena limfocitima B i T, ili indirektno citokinskom signalizacijom. Sekrecijom proupalnih citokina dendritičke stanice imaju ulogu u ranoj fazi IRI, a kasnije doprinose disfunkciji presatka; posttransplantacijske biopsije pokazale su da je visoka gustoća dendritičkih stanica, kao neovisni čimbenik, povezana sa slabijim preživljenjem presatka (6).

I dok se aktivacija nespecifične imunosti odvija unutar nekoliko minuta, specifični imunološki odgovor započinje nakon duljeg perioda (8). U tkivima pogođenim upalom dendritičke stanice sazriju, vežu antigen i migriraju u limfne čvorove, gdje mogu prezentirati antigen T stanicama. Aktivacija T stanica posredovana je signalima stvorenim od strane T - staničnog receptora i ko-stimulirajućih molekula (8). Mehanizmi aktivacije antigen-specifičnih T stanica tijekom sterilne upale nisu sasvim jasni, no novija saznanja upućuju na doprinos antigen-specifičnih, kao i antigen-neovisnih mehanizama aktivacije. Nekoliko je istraživanja pokazalo da se T limfociti nakupljaju tijekom ishemije i reperfuzije (16). Istraživanja na mišjim modelima s nedostatkom specifičnih populacija limfocita pokazala su da CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfociti oboje imaju štetne učinke u bubrežnoj IRI (16). Interakcija T i B limfocita može stvoriti aloimuni odgovor. Nedavno je dokumentirano da bubrežna IRI može pojačati humoralni imunološki odgovor, utječući na odbacivanje posredovano antitijelima (8). Nasuprot tome, čini se da regulatorne T stanice imaju zaštitnu ulogu u bubrežnoj IRI (26).

### 3.2. MEHANIZMI OPORAVKA

Bubreg ima kapacitet regeneriranja izgubljenih epitelnih stanica te ishod ishemijsko-reperfuzijske ozljede ovisi o opsegu mehanizama oporavka (24). Ovisno o stupnju ozljede, bubrezi imaju mogućnost regeneracije; kad se radi o manje ozbiljnoj ozljedi, bubrežni se kanalići mogu regenerirati i povratiti normalnu ili približno normalnu bubrežnu funkciju, no u



slučaju opsežnog oštećenja regenerativni kapacitet je reduciran (40). Oporavak oštećenih kanalića postiže se zamjenom mrtvih stanica novonastalim epitelnim stanicama te je brzi proliferativni odgovor osnova bubrežnog oporavka, vodeći u obnavljanje strukture i funkcije nefrona (40, 41). Iako je poznato da je stanična proliferacija odgovorna za oporavak oštećenog bubrega, postoje kontroverze oko toga koji tip stanica proliferira kao odgovor na IRI – predložene su preživjele endogene epitelne stanice, stromalne stanice koštane srži, intrarenalne progenitorne i intrarenalne intersticijske stanice (24).

Postoje dokazi koji sugeriraju da se preživjele tubularne epitelne stanice dediferenciraju i proliferiraju, naposljetku zamjenjujući ireverzibilno oštećene stanice i obnavljajući integritet tubula (40). Istraživanje provedeno na mišjem bubregu ukazuje na dominantnu ulogu intrinzičnih, preživjelih epitelnih stanica u oporavku oštećenih nefrona; iako se nije formalno isključila mogućnost manjeg doprinosa ostalih staničnih tipova, ukoliko oni postoje, nemaju signifikantnu ulogu kao izvor novih stanica (41). Nakon IRI, te se preostale epitelne stanice dediferenciraju na način da izgube staničnu polarnost i četkastu prevlaku, migriraju na mjesto ozljede i proliferiraju. Novonastale se stanice diferenciraju u funkcionalne polarizirane epitelne stanice (24). Prema istraživanju na mišjem modelu, jedan dan nakon IRI stanice su u procesu diobe, s vrhuncem nakon 3 dana. Regeneracija tubula doseže oko 50% već nakon deset dana, a potpuna obnova tubularne morfologije može potrajati i do četiri tjedna (40). Iako su starija istraživanja predlagala ulogu matičnih stanica koštane srži, pretežno su odbačene kao mogući značajni izvor progenitornih stanica. Međutim, administracija mezenhimalnih matičnih stanica ubrzava popravak oštećenog renalnog epitela kroz parakrinu sekreciju čimbenika rasta, citokina i kemokina (42).

Središnji problem u tkivnoj ozljedi i popravku čini promjena razine sinteze i ekspresije čimbenika rasta u odgovoru na ozljedu (43). Zahvaljujući njihovom učinku u regeneraciji tkiva, predložena je ključna uloga čimbenika rasta, poput epidermalnog čimbenika rasta (*engl.*

*epidermal growth factor, EGF*), inzulinu nalik čimbenika (*engl. insulin growth factor, IGF*) i transformirajućeg čimbenika rasta- $\beta$  (*engl. transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$* ) u procesu oporavka od akutne bubrežne ozljede; o njima najvjerojatnije ovisi proces regeneracije i popravka preživjelim tubularnim epitelnim stanicama (44, 45). Postoje dokazi da djelovanje čimbenika rasta može biti pod utjecajem antiapoptotske ravnoteže Bcl-2 obitelji gena, pri čemu epitelne stanice distalnog tubula imaju važnu ulogu; poznato je da su epitelne stanice distalnog tubula izvor sinteze i ekspresije nekoliko čimbenika rasta, a Bcl-2 geni zajedno s čimbenicima rasta mogu sinergistički djelovati u smanjenju stanične smrti i promoviranju regeneracije i popravka pomoću autokrinih i parakrinih mehanizama (43). Stanice distalnog kanalića otpornije su na ishemijsko oštećenje od stanica proksimalnog tubula, s manjim stupnjem stanične smrti i većom predispozicijom za apoptozu, umjesto nekroze, nakon oksidativnog stresa (43). Istraživanje utjecaja anoksije na različite segmente nefrona pokazalo je da su stanice S3 segmenta proksimalnog kanalića i debelog uzlaznog kraka smještenog u bubrežnoj srži, u usporedbi s ostalim segmentima, najpodložnije anoksičnoj ozljedi (8). Čimbenici rasta koje izlučuju distalne tubularne epitelne stanice (*engl. tubular epithelial cells, TEC*) pod antiapoptotičkim utjecajem Bcl-2, poput EGF-a, autokrinim učinkom uzrokuju njihovu daljnju zaštitu i djeluju na receptore proksimalnih TEC, promovirajući regeneraciju parakrinim učinkom (43).

Stanice proksimalnih i distalnih kanalića nefrona posjeduju receptore za EGF, koji za proksimalne TEC predstavlja jedan od najučinkovitijih tvari koje stimuliraju rast tkiva (45). Unatoč početnom padu sinteze i ekspresije EGF-a u distalnom tubulu nakon IRI, njegova uloga snažnog mitogena potiče bubrežnu reepitelizaciju 24-48 sati nakon reperfuzije, pomažući oporavak bubrežne funkcije. Inicijalni gubitak EGF-a prilikom ishemije potencijalno inducira Bcl-2 ekspresiju u distalnim TEC, što promovira staničnu zaštitu i ponovnu ekspresiju EGF-a.

Bez zaštitne uloge Bcl-2 molekule došlo bi do opsežne stanične smrti proksimalnih i distalnih tubularnih epitelnih stanica (43).

IGF-1 također promovira popravak bubrežnih kanalića nakon ishemične ozljede. I dok stanice proksimalnog tubula pokazuju nikakvu do minimalnu ekspresiju IGF-1, posjeduju receptore za IGF-1 koji se aktiviraju nakon bubrežne ozljede. Ekspresija se IGF-1 u distalnim tubulima povećava u ranom periodu ishemijsko-reperfuzijskog oporavka, što je praćeno povećanom lokalizacijom i u proksimalnim tubulima. Bcl2 ekspresija u distalnom tubulu može ga zaštititi u vremenu kad povećanje ekspresije IGF-1 doprinosi distalnom tubulu autokrinim, a proksimalnom tubulu parakrinim djelovanjem (43).

Iako stanična smrt sama po sebi nije regenerativni odgovor, epitelne stanice u procesu umiranja mogu stvarati signale koji započinju popravak. Moguće je da citokini imaju ulogu u određivanju sudbine epitelnih stanica, doprinoseći stvaranju signala koji rezultiraju infiltracijom neutrofila i makrofaga u tkivo i promovirajući dediferencijaciju i proliferaciju epitelnih stanica (46). DAMP-ovi mogu izravno ili neizravno ubrzati proces regeneracije bubrežnih kanalića. Renalne progenitorne stanice proksimalnog i distalnog tubula imaju veću otpornost na stres i preživljavaju oštećenje tubula. TLR2-agonistički DAMP-ovi pojačavaju klonsku ekspanziju i diferencijaciju tih stanica unutar tubula, što ubrzava regeneraciju (47). TLR4-agonistički DAMP-ovi aktiviraju intersticijske dendritičke stanice i makrofage, rezultirajući otpuštanjem IL-22 (*engl. interleukin 22*). IL-22 aktivira IL-22 receptor, izražen isključivo na tubularnim epitelnim stanicama. Signalizacija pomoću IL-22 receptora ubrzava reepitelizaciju tubula iz preživjelih tubularnih epitelnih stanica u fazi oporavka. I dok TLR4 blokada u fazi ozljede ima povoljan učinak na sprječavanje akutne bubrežne ozljede, TLR4 blokada u fazi regeneracije odgađa oporavak kanalića (47). IL-22, koji pripada IL-10 (*engl. interleukin 10*) obitelji citokina s regulatornom ulogom u popravku tkiva, posrednik je regeneracije tubularnih epitelnih stanica u fazi oporavka nakon akutne bubrežne ozljede. Nekroza TEC služi kao podražaj za TLR4

posredovanu indukciju sekrecije IL-22 od strane intrarenalnih dendritičkih stanica i ostalih mononuklearnih fagocita. Dakle, TLR4 signalizacija potiče regeneraciju epitela u postishemijskoj akutnoj bubrežnoj ozljedi kroz mononuklearno-fagocitnu sekreciju IL-22, što povezuje bubrežnu upalu i regeneraciju na razini TLR4 (48).

Iako preživjele epitelne stanice kanalića ulaze u staničnu diobu u roku od nekoliko sati po ozljedi, funkcionalni tubularni oporavak ne može se odviti prije no što dođe do rezolucije sterilne upale i tubulointersticijski mikrokoliš postane dominiran proregeneracijskim čimbenicima (48). Kako bi se omogućio oporavak tkiva, postoji niz regulatornih mehanizama koji preveniraju da imunološka reakcija postane patološki pretjerana, ograničavanjem aktivacije preživjelih tubularnih epitelnih stanica i infiltriranih imunoloških stanica. Važnim signalnim putem smatra se aktivacija NF $\kappa$ B, koji sudjeluje u inicijaciji i završetku upale, te naknadnoj regeneraciji ili popravku tkiva (49). U procesu oporavka, rezolucija upale i proliferacija tubularnih epitelnih stanica ovise o IKK $\alpha$ -ovisnom ne-kanonskom NF $\kappa$ B putu. Istraživanje pokazuje da su glavne komponente ne-kanonskog NF $\kappa$ B puta, poput IKK $\alpha$  (*engl. I $\kappa$ B kinase  $\alpha$* ), izražene u preživjelim epitelnim tubularnim stanicama tijekom faze oporavka. Utišavanje IKK $\alpha$  na tubularnim epitelnim stanicama pogoršalo je histološko oštećenje i odgodilo tubularnu regeneraciju 3. dan po ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi (49).

Odgovor nespecifične imunosti na bubrežnu ozljedu važan je za tubularnu reparaciju i regeneraciju bubrega te je kao takav vrlo dobro orkestriran. Nakon rane faze upale, populacija makrofaga prelazi u reparativni fenotip, karakteriziran produkcijom brojnih faktora rasta, poput PDGF, TGF- $\beta$ , IGF-1 i VEGF-A (*engl. vascular endothelial growth factor A, VEGF-A*), koji promoviraju tubularnu regeneraciju (50). Mononuklearni fagociti imaju bifazičan utjecaj u oštećenom bubregu. Rani priljev makrofaga promovira proupalni milje koji može služiti za uklanjanje oštećenih stanica i promoviranje apoptoze subletalno ozlijeđenih stanica, pogoršavajući inicijalnu razinu tubularne ozljede i povećavajući opadanje glomerularne

filtracije. Međutim, kao odgovor na informacije primljene iz oštećenog bubrega, dolazi do naknadnog obrata i alternativne aktivacije proregenerativnog fenotipa makrofaga, vodeći do supresije upalnog odgovora i poticanja faze proliferativne reparacije (51). Čimbenik stimulacije kolonije-1 (*engl. colony-stimulating factor 1, CSF-1*) aktivira M2 makrofag-ovisnu tubularnu reparaciju, a dominantno ga produciraju aktivirane tubularne stanice. M2 makrofagi (alternativno aktivirani) produciraju IL-10 i čimbenike rasta (48). Inhibicija CSF-1 signalizacije koči proliferaciju makrofaga i dendritičkih stanica, smanjuje M2 polarizaciju i inhibira oporavak. CSF-1 posredovana ekspanzija i polarizacija bubrežnih makrofaga i dendritičkih stanica važan je mehanizam koji utječe na regeneraciju tubula nakon oštećenja (42).

Ukoliko se radi o opsežnoj ozljedi, proces popravka biti će abnormalan te naposljetku dovesti do atrofije i fibroze kanalića, odgovorne za kroničnu bubrežnu bolest. Ishemijska akutna bubrežna ozljeda može rezultirati nepotpunim tubularnim oporavkom, kroničnom upalom i hipoksijom, što vodi u proliferaciju fibroblasta i prekomjerno taloženje izvanstaničnog matriksa – dvije karakteristike fibroze tkiva (24). Bubrežna fibroza smatra se aberantnim oblikom zacjeljivanja rana, praćenim prekomjernim taloženjem izvanstaničnog matriksa. Leukociti izlučuju čimbenike rasta i matriksne metaloproteinaze, koji aktiviraju mezangijske stanice i intersticijske fibroblaste u svrhu izlučivanja komponenti izvanstaničnog matriksa (47). Nakupljanje ekstracelularnog matriksa dovest će do formiranja fibroznih ožiljaka, koji oštećuju bubrežnu funkciju. Nije potpuno razjašnjeno što pomiče ravnotežu u korist fibrogeneze umjesto reparacije bubrežnog tkiva, no izravno uključenim su se pokazali kronična hipoksija povezana s disfunkcijom žila i kronična aktivacija makrofaga. Nije poznat prag ozljede koji pomiče ravnotežu između potpunog oporavka i bubrežne fibroze, no moguće je da ovisi i o prisutnosti ranije postojeće bubrežne bolesti (24).

### 3.3. PREVENCIJA I TERAPIJA ISHEMIJSKO-REPERFUZIJSKE OZLJEDE

#### 3.3.1. Liječenje darivatelja

Najveći broj bubrežnih presađaka preminulih darivatelja dolazi od darivanja nakon moždane smrti, što je povezano s lošijim preživljenjem presatka u usporedbi s bubrežnim presađcima živućih darivatelja. Moždana smrt dovodi do poremećaja regulacije autonomnog živčanog sustava i inducira brojne patofiziološke procese u ljudskom tijelu (52). Karakteriziraju ju dvije različite hemodinamske faze: u ranoj se fazi javlja nekontrolirana aktivacija simpatikusa, s arterijskim tlakom preko 200 mm Hg i tahiaritmijama, praćena znatno duljim periodom hipotenzije uslijed simpatičke insuficijencije, gubitka žilnog tonusa i smanjenog perifernog otpora (20). Nekroza hipotalamusa i epifize dovodi do poremećaja termoregulacije i hormonalne homeostaze: serumski hormoni štitnjače ne mogu zadovoljiti metaboličke potrebe, vazopresin ne uspijeva kontrolirati diabetes insipidus, zaustavljena je proizvodnja kortizola i nedovoljno se proizvodi inzulin. Otpuštaju se slobodni radikali i proteolitički enzimi, vodeći do spore, ali progresivne apoptoze i nekroze tkiva. Navedeni procesi rezultiraju opadanjem funkcije organa DBD darivatelja, uključujući smanjenu funkciju bubrega. Postoji značajan utjecaj moždane smrti na funkciju bubrežnog presatka, s češćim epizodama akutnog odbacivanja i smanjenim dugoročnim preživljenjem (20).

Nakon dijagnoze moždane smrti, potrebna je aktivna njega darivatelja u svrhu optimiziranja organske funkcije za naknadnu transplantaciju. Liječenje darivatelja uključuje postupke održavanja tjelesne temperature, adekvatne oksigenacije, cirkulirajućeg volumena, kardiovaskularne stabilnosti i mokrenja (52). Pokazalo se da rani, agresivni tretman darivatelja s naglaskom na hemodinamskoj stabilizaciji povećava broj darivanja organa. Tretiranje hipertenzije uzrokovane katekolaminskom olujom i održavanje adekvatnog intravaskularnog volumena u naknadnom periodu hipotenzije od ključne su važnosti (20, 52). Istraživanje

provedeno s ciljem ispitivanja utjecaja davanja niskih doza dopamina kao dio terapijskih postupaka usmjerenih na darivatelja pokazalo je da dopamin ublažava štetne utjecaje slobodnih kisikovih radikala u uvjetima hladne ishemije pri pohrani organa. Umjesto stabilizacije bubrežne hemodinamike, dopamin je poboljšao toleranciju organa na ishemično oštećenje pri hladnoj pohrani. Potreba za dijalizom u prvom tjednu nakon transplantacije, kao glavni mjereni ishod ovog istraživanja, bila je značajno smanjena u primatelja čiji je presadak prethodno tretiran dopaminom. Međutim, administracija dopamina nije utjecala na preživljenje presatka (53).

S obzirom na to da aktivacija sustava komplementa u darivatelju s moždanom smrću ima ulogu u oštećenju presatka, terapijski bi pristup u vidu inhibicije aktivacije komplementa mogao poboljšati posttransplantacijsku funkciju bubrega. Istraživanje na mišjem modelu, u kojem su po indukciji moždane smrti budući darivatelji tretirani inhibitorom komplementa sCR1 (*engl. soluble complement receptor type 1*), pokazalo je značajno poboljšanje posttransplantacijske funkcije bubrega u primatelja čiji je presadak prethodno tretiran sa sCR1 (54).

Do današnjeg su vremena provedena brojna istraživanja ishemijskog prekondicioniranja, protektivne metode pri kojoj se primjenjuju kratki, ponavljajući periodi ishemije i reperfuzije u svrhu razvoja tolerancije na naknadnu ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu. Ishemijsko prekondicioniranje razvijeno je u istraživanjima vezanim uz srce, no može se primijeniti i kod bubrega (55). Istraživanja su pokazala da ishemijsko prekondicioniranje bubrega smanjuje lizu stanica, apoptozu i lipidnu peroksidaciju, s poboljšanjem funkcije ishemičnog bubrega. Potencijalni se preventivni mehanizam djelovanja odvija putem smanjenja adhezijskih molekula i upalnog odgovora, no druga istraživanja predlažu da je ishemijsko prekondicioniranje posredovano predishemijskom aktivacijom adenozijskih receptora, posebno A1 adenozijskih receptora (56). Primjena timoglobulina na mišjem modelu inducirane

moždane smrti smanjila je ekspresiju proupalnih citokina i dovela do poboljšanja nakon bubrežnog oštećenja (8).

Pregledom intervencija usmjerenih na odgođenu funkciju presatka čini se da one primijenjene na darivatelju imaju veću učinkovitost od onih primijenjenih na primatelju; intervencije kod preminulog darivatelja mogu ublažiti ozljedu, a one kod primatelja transplantata ubrzavaju oporavak od ozljede (57).

### 3.3.2. Pohrana organa

Održavanje vijabilnosti organa od eksplantacije do transplantacije od presudne je važnosti za optimalnu funkciju i preživljavanje presatka (58). Vrijeme hladne ishemije povezano je s preživljenjem organa preminulih darivatelja i incidencijom odgođene funkcije presatka (12). Istraživanje provedeno na više od 91 000 transplantacija bubrega pokazalo je da su bubrezi izloženi hladnoj ishemiji duljoj od 17 sati pod višim rizikom štetnog ishoda od onih transplantiranih unutar 17 sati (59). U logističkom smislu, pohrana organa osigurava vrijeme neophodno za organizaciju osoblja i objekata, transport organa i obavljanje potrebnih laboratorijskih testova; tijekom vremena hladne ishemije moguće je izvršiti usporedbu tkivne kompatibilnosti te pripremu primatelja. S obzirom na nestašicu organa dostupnih za transplantaciju, postoji potreba za što boljom upotrebom svih raspoloživih organa, pri čemu adekvatna pohrana predstavlja jedan od ključnih koraka (60, 61). Trenutno postoje dva načina očuvanja bubrega: statički i dinamički. Čuvanje bubrega u otopinama za hladnu pohranu glavna je statička metoda, a od dinamičkih se upotrebljava perfuzija u uređaju za mehaničku prezervaciju bubrega (*engl. hypothermic machine perfusion, HMP*) (62).

#### 3.3.2.1. Otopine za hladnu pohranu organa

Očuvanje otopinama za hladnu pohranu, pri čemu je bubreg pohranjen u hipotermijskim uvjetima, postupak je koji se koristi za smanjenje metaboličkih potreba organa i ublažavanje



ishemijske ozljede. Uspješno se primjenjuje u transplantaciji bubrega već više od pedeset godina, a desetljećima predstavlja najčešće korištenu metodu pohrane organa zbog jednostavnosti i niske cijene (63). Nakon ispiranja eksplantiranog organa s prezervacijskom otopinom na 0-4°C, uranja se u otopinu i ostaje na toj istoj temperaturi sve do vremena transplantacije (64). Razvijene su brojne otopine za čuvanje organa, s ciljem suprotstavljanja štetnim učincima reperfuzije, hlađenja presatka i procesa oporavka. Napravljene su na način da ciljaju biokemijske i strukturalne promjene koje se događaju tijekom tih procesa, no znatno se razlikuju u prirodi i koncentraciji sastojaka (65). Unatoč razlici u sastavu, imaju iste principe: smanjenje staničnog i mitohondrijskog bubrenja koloidima/nepropusnim sredstvima, ublažavanje unutarstanične acidoze puferima, smanjenje štetnog djelovanja reaktivnih kisikovih spojeva antioksidansima i osiguranje supstrata za odvijanje metabolizma (66). Smanjena metabolička aktivnost ključna je za sprječavanje nepopravljivog oštećenja organa. Snižavanje temperature na 4°C smanjuje enzimsku aktivnost i metabolizam za 58% u većini stanica (60).

Od 1960.-ih godina otopine za hladnu pohranu postaju zlatnim standardom očuvanja organa u periodu čekanja transplantacije (64). 1969. godine Geoffrey Collins razvio je prvu otopinu za hladnu pohranu, nazvanu Collinsova otopina, koja je produjila očuvanje bubrega sve do 24 sata. Collinsova je otopina naknadno izmijenjena te se modificirana verzija, s nazivom Eurocollins (EC), koristila kao standardna otopina idućih petnaestak godina (63). Marshallova otopina, hiperosmolarni citrat (HOC), u upotrebi je od kasnih 70.-ih godina te koristi i danas, no Eurocollins otopina ostaje standardom pohrane bubrega sve do pojave University of Wisconsin (UW) otopine kasnih 80.-ih godina 20. stoljeća (67). U slično se vrijeme pojavljuje i Histidin-Triptofan-Ketoglutarat otopina (HTK) otopina te time UW i HTK postaju zlatnim standardom za hladnu pohranu organa (63). Celsior otopina, razvijena 1994.,

prvotno je korištena u transplantaciji srca i sadrži određene zajedničke sastavnice s UW i HTK otopinama (60).

Collinsova otopina svojom visokom koncentracijom kalija i magnezija te niskom koncentracijom natrija oponaša sastav unutarstanične tekućine; s obzirom na neaktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-aze u hipotermiji, prisutnost takvih otopina u izvanstaničnom prostoru ima cilj postizanjem ravnoteže prevenirati ulazak iona natrija i klorida u stanicu. Collinsova je otopina obogaćena fosfatnim puferom i sadrži visoku koncentraciju glukoze (60, 63). Izostavljanje magnezijevog fosfata, zbog zabrinutosti o taloženju kristala magnezija u izvornoj otopini, povećalo je kemijsku stabilnost preinačene otopine, nazvane Eurocollins. Upravo je visoka koncentracija glukoze, koja služi kao nosač osmotskog opterećenja za postizanje hiperosmolarnosti, bila najveći nedostatak ove otopine. Čak i u hipotermijskim uvjetima, glukoza se enzimatskim procesima razgrađuje bar do laktata, što rezultira udvostručenjem intracelularne količine molekula i vodi u stanično bubrenje (60).

Kao alternativa Collinsovoj otopini razvijena je Marshallova otopina, hiperosmolarni citrat. Sadržavala je visoke koncentracije kalija, magnezija i natrija, a citrat je zamijenio fosfat u ulozi pufera. Zamjena glukoze manitolom osigurala je bolja osmotska svojstva i manju viskoznost, a kao hipertonična otopina, HOC prevenira ulazak tekućine u stanice (60, 61).

University of Wisconsin otopina najčešće je korištena otopina za hladnu pohranu organa. Inicijalno je razvijena za korištenje u transplantaciji gušterače, no njena je uporaba široko rasprostranjena u očuvanju raznih organa, uključujući bubrege i jetru (63). Poput Eurocollins otopine, UW otopina također sadrži visoku koncentraciju kalija i nisku koncentraciju natrija, što ju čini otopinom unutarstaničnog tipa. Postoji nekoliko prednosti UW otopine nad Eurocollins otopinom: hidrosietil škrob, koji je zamijenio albumin, služi kao koloidni nosač sa svrhom minimiziranja intersticijskog edema tijekom perfuzije, antioksidansi

alopurinol i glutation smanjuju oksidativni stres, adenzin se koristi kao prekursor ATP-a, a uvedeni metabolički supstrati, poput laktobionata i rafinoze, zamjenjujući glukozu nastoje spriječiti bubrenje stanica (63). Istraživanja na animalnim modelima, kao i klinička ispitivanja, pokazala su da je UW otopina uspješnija u očuvanju organa od Eurocollins otopine. Primjerice, u modelu autotransplantacije psećeg bubrega, svi su bubrezi bili vijabilni nakon pohrane u UW otopini u trajanju od 72 sata, dok od bubrega pohranjenih u Eurocollins otopini nijedan nije bio vijabilan nakon istog vremenskog razdoblja. (63) Europsko istraživanje potvrdilo je njenu superiornost nad Eurocollins otopinom, smanjujući stopu odgođene funkcije presatka s 33% na 23% (60). Također, jednogodišnje preživljenje presatka bilo je značajnije više pri korištenju UW otopine. S obzirom na dobivene rezultate, Eurocollins otopina u Europi više nije bila preferiran izbor u očuvanju abdominalnih organa (58). UW otopina omogućuje uspješniji ishod transplantacije, bolju fiziološku funkciju i manju histološku štetu bubrega od Eurocollins otopine. U slučaju organa marginalnih donora, organi pohranjeni u UW otopini pokazali su manju stopu primarne afunkcije i odbacivanja u prvih 12 mjeseci po transplantaciji (61). Unatoč popularnosti UW otopine, nedavna istraživanja upućuju na njene potencijalne nedostatke. Visok stupanj viskoznosti, uslijed prisutnosti hidroksietil škroba, ugrožava mikrocirkulaciju, a visoka koncentracija kalija dovodi do vazokonstrikcije; otežano je ispiranje tkiva i zasićenje otopinom. Osim toga, otopini se prije uporabe dodaju penicilin G, deksametazon i inzulin, a nedostatak predstavlja i njena visoka cijena (60, 63).

U pionirskim godinama pohrane organa, visoka koncentracija kalija i niska koncentracija natrija u otopini smatrale su se nužnima za prevenciju staničnog bubrenja te su otopine unutarstaničnog tipa dugo predstavljane ključnima za održavanje vijabilnosti stanica. Novija istraživanja pokazuju da omjer kalija i natrija ne igra središnju ulogu u očuvanju organa; otopine izvanstaničnog tipa pokazale su se kao jednako ili čak i više učinkovite. Također, niska

koncentracija kalija olakšava ispiranje organa pri eksplantaciji, jer ne dolazi do vazospazma inducirano kalijem (58).

Histidin-Triptofan-Ketoglutarat otopina, prvotno razvijena za korištenje pri kardioplegiji u otvorenim operacijama srca, sadrži niske koncentracije kalija, natrija i magnezija. Histidin u HTK otopini predstavlja snažni pufer koji usporava snižavanje tkivnog pH tijekom hladne ishemije, triptofan stabilizira membranu, a ketoglutarat se može upotrijebiti kao supstrat za odvijanje metabolizma. Mala viskoznost HTK otopine omogućuje učinkovitije ispiranje organa te kraće vrijeme hlađenja za postizanje hipotermijskih uvjeta u odnosu na UW otopinu (61, 63). Eurotransplantovo multicentrično randomizirano istraživanje usporedilo je učinkovitost UW, HTK i Eurocollins otopine u očuvanju bubrežnih presadaka, a rezultati su pokazali jednakost UW i HTK otopine u sposobnosti prezervacije organa, s jednakom incidencijom primarne afunkcije i sličnim trogodišnjim preživljavanjem bubrežnog presatka (63). Iako prema rezultatima istraživanja UW i HTK otopina imaju istu incidenciju odgođene funkcije presatka, oskudni su podaci o rezultatima u slučaju prologiranog vremena hladne pohrane (>24 h) (58).

Celsiorova je otopina koloid koji svojom visokom koncentracijom natrija pripada otopinama izvanstaničnog tipa. Prvotno je korištena u transplantaciji srca, no pokazala se učinkovitom i u pohrani abdominalnih organa (58). Kombinira osmotsku učinkovitost UW otopine (laktobionat, manitol) sa snažnom puferom aktivnošću HTK otopine (histidin). Za razliku od UW otopine, reducirani glutation jedini je antioksidans u ovoj otopini (61).

U novije su vrijeme razvijene i tzv. otopine četvrte generacije u Europi, poput Institut Georges Lopez-1 otopine (IGL-1) i Solution de Conservation des Organes et Tissus (SCOT). Radi se o otopinama izvanstaničnog tipa koje sadržavaju polietilen glikol (*engl. polyetilenglycol, PEG*) kao koloid (66). IGL-1, novija otopina razvijena u Francuskoj,

kombinira prednosti UW i Celsior otopine. PEG se veže za površine stanica i tkiva, stabilizirajući ih od štetnih interakcija; istraživanja predlažu da ta značajka izmjenjuje imunogenost donorskog tkiva kao posljedice IRI (60).

Zahvaljujući svojoj jednostavnosti i učinkovitosti pohrane organa do 24 sata, očuvanje otopinama za hladnu pohranu najšire je korištena metoda u svakodnevnoj kliničkoj praksi (20). Glavni je nedostatak nemogućnost primjene standardiziranog parametra za procjenu zdravstvenog statusa organa i mjerenje ishemijskog oštećenja, kako bi se mogla predvidjeti vijabilnost presatka (60). Sve veći broj bubrega dobivenih od darivatelja prema proširenim kriterijima i darivatelja s nekucajućim srcem dovodi u pitanje mogućnost ove metode da prevenira opadanje kvalitete organa tijekom hladne pohrane; u novije vrijeme javlja se potreba za novim pristupom pri pohrani takvih organa, kao i onih s prolongiranim vremenom hladne ishemije (20, 58).

#### 3.3.2.2. Perfuzija u uređaju za mehaničku prezervaciju bubrega

Iako strojna perfuzija predstavlja jednu od ranih metoda očuvanja bubrega, zbog jednostavnosti pohrane hladnim otopinama nije bila široko korištena, pogotovo od pojave UW otopine s uspješnim očuvanjem 24 do 30 sati. S obzirom na sve veću upotrebu organa dobivenih od ECD i DCD darivatelja, u posljednje vrijeme raste interes za strojnom perfuzijom (20).

Sam process pripreme, koji uključuje spajanje bubrega na uređaj putem renalne arterije i osiguravanje nepropusnosti sustava, traje duže no priprema za statičku metodu prezervacije otopinama za hladnu pohranu (60, 61). Perfuzija u uređaju za mehaničku prezervaciju bubrega podrazumijeva kontinuirano pumpanje hladne otopine za očuvanje kroz bubreg. Otopina opskrbljuje tkivo nutrijentima s ili bez kisika, odnosi toksične produkte metabolizma i dostavlja pufere koji apsorbiraju nakupljenju mliječnu kiselinu (61). Hipotermijska strojna perfuzija odvija se na 0-4°C kroz arteriju, prema konceptu da se proizvodnja energije lancem

transporta elektrona održava na hipotermijskim temperaturama. HMP kontinuirano osigurava metaboličke supstrate za stvaranje ATP-a, što presatku omogućuje obnavljanje energijskih zaliha (60, 64). Postoje određene prednosti strojne perfuzije, poput mogućnosti procjene ishemijskog oštećenja i vijabilnosti organa kao prediktora posttransplantacijskog ishoda. HMP također omogućuje primjenu farmakološke terapije i genskog transfera (60, 61). Eurotransplantova randomizirana studija usporedila je učinke strojne perfuzije i očuvanja otopinama za hladnu pohranu, a rezultati upućuju na smanjenu incidenciju odgođene funkcije presatka pri korištenju strojne perfuzije, uključujući i organe marginalnih darivatelja. HMP također smanjuje incidenciju, trajanje i težinu odgođene funkcije presatka u darivatelja s nekucajućim srcem (20). Iako je HMP inicijalno značajno skuplji od očuvanja hladnim otopinama, konačni bi troškovi mogli potencijalno biti manji, zahvaljujući nižoj incidenciji odgođene funkcije presatka (i posljedično nižoj vjerojatnosti potrebe za dijalizom), kraćem boravku u bolnici i boljoj stopi preživljenja presatka (61).

Unatoč uspješnosti ove metode, perfuzija organa na niskim temperaturama dovodi do nuspojava uzrokovanih hipotermijom i samom perfuzijom; ublažavanje ovih nuspojava glavna je funkcija novih perfuzijskih otopina (62).

### 3.3.3. Novi terapijski ciljevi

Primjenjuju se razni pristupi usmjereni na inhibiciju signalizacije koja vodi u upalu. Trenutno je središnji fokus mnogih istraživanja razumijevanje složene regulacije TLR signalizacije (68). Eksperimentalna su istraživanja pokazala da je moguće spriječiti aktivaciju nespecifične imunosti inhibicijom TLR2, čija je ekspresija prisutna na epitelnim stanicama kanalića zajedno s TLR4. Inhibicija TLR2 novim monoklonalnim antitijelima mogla bi značajno smanjiti posljedice ishemijsko-reperfuzijske ozljede na modelima infarkta miokarda, što otvara mogućnost daljnjim istraživanjima na bubregu (69). Istraživanje na mišjem modelu

pokazalo je da nedostatak TLR4 u stanicama bubrežnog parenhima prevenira povećanje stvaranja proupalnih citokina i smanjuje akumulaciju neutrofila i makrofaga u modelu bubrežne ishemijsko-reperfuzijske ozljede (28). Ostale potencijalne ciljeve za buduća istraživanja predstavljaju adapterska molekula MyD88, NK stanice i inflammasomi (68). Miševi tretirani s tvari koja inhibira homodimerizaciju MyD88 imali su bolju stopu preživljavanja od netretiranih životinja; upalni je odgovor bio smanjen te je došlo do poboljšanja tubularne intersticijske fibroze u miševa podvrgnutih ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi (70).

Jedan od ciljeva istraživanja terapijskih mogućnosti predstavlja i inhibicija sustava komplementa, važne komponente nespecifičnog imunološkog odgovora. Potencijalna je meta inhibicija C5a sastavnice komplementa i kompleksa koji napada membranu – MAC (C5b-C9). Eculizumab, humano monoklonsko antitijelo usmjereno na C5 komponentu komplementa, već se koristilo u transplantaciji bubrega za liječenje atipičnog hemolitičko-uremičnog sindroma i odbacivanja bubrežnog transplantata posredovanog antitijelima. Provode se istraživanja procjene potencijalne uloge eculizumaba u prevenciji i liječenju bubrežne IRI (68). Na mišjem modelu sa četverosatnim vremenom hladne ishemije bubrezi su pohranjeni u otopinu koja je sadržavala malu interferirajuću RNA (*engl. small interfering ribonucleic acid, siRNA*) usmjerenu na C3 sastavnicu komplementa, Fas gen i RelB gen. Otopina koja je sadržavala siRNA smanjila je razinu apoptoze stanica i histopatološke promjene bubrega te prolongirala preživljenje presatka. Također je smanjila ekspresiju proupalnih citokina, IL-6 i TNF $\alpha$  (71).

#### 4. RASPRAVA

U današnje vrijeme transplantacija bubrega optimalan je izbor liječenja pacijenata sa završnim stadijem KBB-a; pacijenti sa ZKSBB imaju bolje dugoročno preživljavanje i bolju kvalitetu života ako se podvrgnu transplantaciji, u odnosu na one koji ostanu na dijalizi (4, 6). Postoji nekoliko vrsta darivanja bubrega: darivanje nakon moždane smrti, darivanje nakon cirkulacijske smrti i darivanje od živih srodnih darivatelja, a u posljednje se vrijeme sve više koriste I bubrezi “marginalnih darivatelja” u svrhu povećanja broja dostupnih organa za transplantaciju (7). DBD darivatelji smatraju se poželjnijima od DCD darivatelja, jer je cirkulacija krvi u presatku održana sve do trenutka uzimanja organa. Iako su organi DCD darivatelja podvrgnuti duljem razdoblju tople ishemije, mogli bi imati teoretsku prednost: u DBD darivatelja uslijed moždane smrti dolazi do sistemske upalne “citokinske oluje”, što pokreće razne patofiziološke procese u darivatelju i dovodi do mikrovaskularnog i parenhimatoznog oštećenja bubrežnog presatka (7). Iako su DCD darivatelji također podložni upalnom odgovoru, zbog brzine oštećenja neurona to se događa u manjoj mjeri nego u DBD darivateljima (7).

Nakon eksplantacije bubrega, presadak se pohranjuje u otopini za hladnu pohranu kako bi se održala vijabilnost stanica, što ne uspijeva potpuno prevenirati hipoksijom inducirano stanično oštećenje. Uz to, naknadna reperfuzija ishemičnog bubrega može uzrokovati upalno i oksidativno oštećenje, što se skupno naziva ishemijsko-reperfuzijska ozljeda (10).

IRI obuhvaća brojne procese, uključujući poremećaj ionske ravnoteže s unutarstaničnim nakupljanjem iona, poremećaj mitohondrijskog membranskog potencijala, stvaranje slobodnih kisikovih radikala, disfunkciju endotela, mikroembolizacije, fenomen „no reflow“ i aktivaciju imunološkog sustava (15). Inicijalno hipoksično oštećenje praćeno je opsežnim stvaranjem



slobodnih kisikovih radikala po reperfuziji te inicira ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu, vodeći u apoptozu, nekrozu i upalni odgovor (28). IRI ima velik doprinos u razvoju akutne bubrežne ozljede, a u značajnom broju takvih slučajeva prepoznata je ključna uloga mitohondrija kroz stvaranje ogromne količine slobodnih kisikovih radikala u ranoj fazi reperfuzije (25). Njihova centralna uloga u patofiziologiji IRI i bolje razumijevanje procesa koji vode u oštećenje bubrega doveli su do identifikacije novih terapijskih ciljeva i potencijalnih biomarkera (25). Mitohondriji imaju značajan utjecaj u procesima apoptoze i nekroze te aktivaciji imunološkog sustava (25). Odgovor imunološkog sustava karakteriziran je aktivnošću neutrofila, makrofaga, dendritičkih stanica, limfocita, endotelnih i tubularnih epitelnih stanica. Stanice imunološkog sustava nemaju isključivo štetni utjecaj tijekom upale, već neke od njih imaju protektivnu ulogu u procesima oporavka od IRI. Otkrivanje složenih mehanizama njihovog djelovanja moglo bi pridonijeti budućoj prevenciji i liječenju ishemijsko-reperfuzijske ozljede (28).

Odgodena funkcija presatka definirana je kao neuspjeh transplantiranog bubrega da odmah preuzme funkciju, s potrebom za dijalizom u prvom postoperacijskom tjednu (7). Primarno je posljedica postishemične akutne tubularne nekroze uzrokovane ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom, a predstavlja jednu od češćih ranih komplikacija transplantacije bubrega od preminulih darivatelja. Stupanj ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja povezan je s nekoliko čimbenika koji se događaju u darivatelju, tijekom transplantacije i naposljetku u primatelju (8). Produljeno vrijeme hladne ishemije neovisni je čimbenik razvoja DGF-a. Prolongirana hladna ishemija potiče DGF i akutno odbacivanje, što zauzvrat može skratiti dugoročno preživljenje presatka (7). Odgodena funkcija presatka dovodi do značajnih posljedica. Uz akutne komplikacije vezane uz zatajenje bubrega i produljenu hospitalizaciju, razvoj DGF-a povisuje rizik kronične nefropatije presatka i skraćuje njegovo preživljenje. Trenutno se DGF nakon transplantacije bubrega primarno smatra posljedicom IRI, što

objašnjava veću incidenciju u bubrezima preminulih darivatelja koji redovno podilaze produljenim vremenima ishemije (35).

Trenutni pristup IRI ima cilj suprotstavljanja njenim glavnim posljedicama, odgođenoj funkciji presatka i aktivaciji nespecifične imunosti. Prevencija DGF-a se uglavnom oslanja na liječenje darivatelja prije transplantacije i očuvanje bubrega otopinama za hladnu pohranu (68). Glavno je načelo otopina za hladnu pohranu očuvanje vijabilnosti organa u najvećoj mogućoj mjeri, kako bi se postigli bolji transplantacijski ishodi nakon reperfuzije. Ključni su sastojci tih otopina puferi, koloidi, nutrijenti i antioksidansi, odgovorni za suzbijanje staničnog bubrenja, acidoze, iscrpljenja staničnog ATP-a i proizvodnje slobodnih kisikovih radikala. Bolje poznavanje mehanizama ishemijskog oštećenja bubrega dovelo je do spoznaje da obogaćenje prezervacijskih otopina različitim tvarima s ciljanim učinkom ima veliki potencijal poboljšanja kvalitete presatka (63). Zlatni standard među otopinama za očuvanje bubrega predstavlja UW otopina, koja kombinira metabolički inertne supstrate laktobionat i rafinozu, hidroksietil škrob s koloidnim djelovanjem, ATP prekursor adenzin te glutation i alopurinol sa svrhom uklanjanja štetnih kisikovih radikala (60).

Uslijed nestašice organa dostupnih za transplantaciju, u posljednje se vrijeme sve više upotrebljavaju bubrezi dobiveni od marginalnih donora ili donora s nekucajućim srcem te posljedično raste interes za strojnom perfuzijom (20). Za razliku od očuvanja otopinama za hladnu pohranu, HMP omogućava procjenu ishemičnog oštećenja i vijabilnosti organa kao prediktora posttransplantacijskog ishoda te nudi mogućnost farmakoloških intervencija za poboljšanje kvalitete presatka (60). Upotreba HMP mogla bi, u usporedbi sa statičkim očuvanjem otopinama za hladnu pohranu organa, značajno smanjiti odgođenu funkciju presatka i povećati korištenje organa DCD darivatelja (68).

Aktivacija urođene imunosti i njen značajan utjecaj u patogenezi IRI predstavljaju potencijalni terapijski cilj te se na tu temu provide brojna istraživanja. Postoji potreba za razumijevanjem različite uloge upalnih stanica ovisno o fazi ishemijsko-reperfuzijske ozljede te njihovog sudjelovanja u progresiji akutne bubrežne ozljede u kroničnu bubrežnu bolest. Od velike bi kliničke važnosti bilo otkriće mehanizama koji povezuju ishemičnu ozljedu presatka s akutnim odbacivanjem, kao i njihova modifikacija novim terapijskim sredstvima (28).

## 5. ZAKLJUČAK

Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda u transplantaciji bubrega češća je i ozbiljnija pri presađivanju bubrega od preminulih darivatelja, a na nju utječu čimbenici vezani uz darivatelja, primatelja i pohranu organa. Oštećenje bubrega rezultat je dinamičnih, složenih procesa u kojima središnju ulogu imaju stvaranje slobodnih kisikovih radikala, lipidna peroksidacija i posljedična upala. IRI uzrokuje oštećenje stanica na nekoliko načina, poput stanične smrti, mikrovaskularne disfunkcije te aktivacije nespecifične i specifične imunosti. Umiruće stanice otpuštaju DAMP-ove koji stimuliraju Toll-like receptore, što vodi u kompleksnu regulaciju upalnih stanica i njihovih medijatora, uzrokujući aktivaciju imunološkog sustava kao ključnog koraka patogeneze IRI. Glavne su kliničke posljedice bubrežne IRI odgođena funkcija presatka zbog tubularne disfunkcije, odbacivanje presatka povezano s pojačanom imunogenošću presatka te kronična disfunkcija presatka. Trenutno se ispituju nova sredstva usmjerena na različite mehanizme oštećenja, od kojih su brojna još u pretkliničkoj fazi. Intervencija u ranoj fazi kaskade događaja čini se poželjnom zbog važne uloge mitohondrijske disfunkcije u pokretanju IRI. Ometanje signalizacije koja vodi u aktivaciju urođene imunosti i sustava komplementa te manipulacija dendritičkim stanicama obećavajuće su terapijske mogućnosti za buduće djelovanje. Složenost patogeneze IRI uvjetuje potrebu za različitim terapijskim pristupima, primjenjujući kombinaciju terapijskih sredstava usmjerenih na sve faze nastanka oštećenja tijekom darivanja, hladne pohrane i samog procesa transplantacije.

## 6. SAŽETAK

Transplantacija bubrega predstavlja optimalan izbor liječenja pacijenata sa završnim stadijem kronične bubrežne bolesti te su dugoročno preživljavanje i kvaliteta života onih koji se podvrgnu transplantaciji bolji nego u pacijenata koji ostanu na dijalizi. Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda, neizbježan događaj pri transplantaciji bubrega, jedan je od najvažnijih mehanizama odgovornih za primarnu afunkciju i odgođenu funkciju presatka. Povezana je s proupalnim odgovorom i akutnim odbacivanjem, a može rezultirati i progresivnom intersticijskom fibrozom te naposljetku dovesti do kronične disfunkcije presatka. Inicijalna ishemijska ozljeda tkiva ovisi o trajanju prekida opskrbe krvlju, a naknadna reperfuzija paradoksalno ne uspostavlja normalne uvjete, već dovodi do još većeg oštećenja. Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda obuhvaća višestruke procese koji rezultiraju oštećenjem tkiva, uključujući promjene unutarstanične koncentracije iona, stvaranje slobodnih kisikovih radikala, otvaranje mitohondrijske permeabilizacijske pore, disfunkciju endotela, agregaciju trombocita s mikroembolizacijama, fenomen izostanka ponovnog protoka, staničnu smrt i aktivaciju imunološkog sustava. Cilj trenutnog pristupa ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi suprotstavljanje je njenim glavnim posljedicama, odgođenoj funkciji presatka i aktivaciji nespecifične imunosti. Produljeno vrijeme hladne ishemije neovisan je čimbenik razvoja odgođene funkcije presatka, čija se prevencija uglavnom oslanja na liječenje darivatelja prije transplantacije i očuvanje bubrega otopinama za hladnu pohranu. Složenost patofizioloških mehanizama u podlozi ishemijsko-reperfuzijske ozljede uvjetuje potrebu za različitim terapijskim pristupima, s primjenom kombinacije terapijskih sredstava usmjerenih na sve faze nastanka oštećenja tijekom darivanja, hladne pohrane i samog procesa transplantacije.

## 7. SUMMARY

Kidney transplantation is still the optimal treatment for patients with end stage renal disease. Long-term survival with kidney transplantation is significantly better than dialysis and transplantation provides a sustainably higher quality of life. Ischemia-reperfusion injury is an inevitable event accompanying kidney transplantation and one of the most important mechanisms for non- or delayed function immediately after transplantation. It is accompanied by a proinflammatory response and is associated with acute rejection and chronic graft dysfunction due to interstitial fibrosis. Tissue injury initially occurs as a result of the ischemic insult, which is determined primarily by the duration of the interruption in the blood supply. Paradoxically, the subsequent reperfusion does not restore the normal conditions, but further enhances the damage. Ischemia-reperfusion injury involves multiple processes, including ion accumulation, production of large amounts of reactive oxygen species, opening of the mitochondrial permeability transition pore, endothelial dysfunction, platelet aggregation with microembolization, no-reflow phenomenon, cell death and immune activation. The current treatment is aimed to contrast the main consequences of ischemia-reperfusion injury, i.e. delayed graft function and activation of innate immunity. Extended cold ischemia time is an independent risk factor for the development of delayed graft function, whose prevention mainly rests on pre-transplant treatment of the donor and perfusion of the kidney with preservation solutions. Due to the complexity of the pathophysiological mechanisms, a multiple treatment strategy using a combination of agents given at various time points during the donation, preservation and transplantation process is most likely the best strategy to reduce ischemia-reperfusion injury.

## 8. LITERATURA

1. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *JAMA*. 2019;322(13):1294-1304.
2. Meguid El Nahas A, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet*. 2005;365(9456):331-40.
3. Rački S. KRONIČNA BUBREŽNA BOLEST I NADOMJEŠTANJE BUBREŽNE FUNKCIJE. *Acta medica Croatica*. 2019;73(3):235-236.
4. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med*. 1999;341(23):1725-30.
5. Orlić P, Maričić A, Velčić G, Valenčić M, Oguić R, Mozetić V, et al. Transplantacija bubrega od umrlog davatelja s nekucajućim srcem uz primjenu perfuzije in situ. *Medicinski vjesnik*. 2005;37(1-4):43-46.
6. Nieuwenhuijs-Moeke GJ, Pischke SE, Berger SP, Sanders JSF, Pol RA, Struys MMRF, et al. Ischemia and Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Relevant Mechanisms in Injury and Repair. *J Clin Med*. 2020;9(1):253.
7. Zhao H, Alam A, Soo AP, George AJT, Ma D. Ischemia-Reperfusion Injury Reduces Long Term Renal Graft Survival: Mechanism and Beyond. *EBioMedicine*. 2018;28:31-42.
8. Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transplant*. 2015;5(2):52-67.
9. Peters-Sengers H, Houtzager JHE, Idu MM, Heemskerk MBA, van Heurn ELW, Homan van der Heide JJ, et al. Impact of Cold Ischemia Time on Outcomes of Deceased Donor Kidney Transplantation: An Analysis of a National Registry. *Transplant Direct*. 2019;5(5):e448.

10. Nieto-Ríos JF, Ochoa-García CL, Serna-Campuzano A, Benavides-Hermosa B, Calderón-Puentes LL, et al. Time of Cold Ischemia and Delayed Graft Function in a Cohort of Renal Transplant Patients in a Reference Center. *Indian J Nephrol.* 2019;29(1):8-14.
11. Koo DD, Welsh KI, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation: an immunohistochemical analysis of changes after reperfusion. *Am J Pathol.* 1998;153(2):557-66.
12. Salahudeen AK, Haider N, May W. Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts. *Kidney Int.* 2004;65(2):713-8.
13. De Rosa S, Antonelli M, Ronco C. Hypothermia and kidney: a focus on ischaemia-reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;32(2):241-247.
14. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298:229-317.
15. van den Akker EK, Manintveld OC, Hesselink DA, de Bruin RW, Ijzermans JN, Dor FJ. Protection against renal ischemia-reperfusion injury by ischemic postconditioning. *Transplantation.* 2013;95(11):1299-305.
16. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011;17(11):1391-401.
17. Gourdin M, Dubois P. Impact of Ischemia on cellular metabolism. U: Aronow WS, ed. *Artery Bypass.* London: IntechOpen; 2013. p. 3-17.
18. Granchi C, Bertini S, Macchia M, Minutolo F. Inhibitors of lactate dehydrogenase isoforms and their therapeutic potentials. *Curr Med Chem.* 2010;17(7):672-97.
19. Stryer L. *Biokemija.* 2. izd. Zagreb: Školska knjiga; 1991



20. Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc.* 2008;40(10):3279-88.
21. Grover GJ, Atwal KS, Sleph PG, Wang FL, Monshizadegan H, Monticello T, et al. Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F1F0-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(4):H1747-55.
22. Dorweiler B, Pruefer D, Andrasi TB, Maksan SM, Schmiedt W, Neufang A, et al. Ischemia-Reperfusion Injury: Pathophysiology and Clinical Implications. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2007;33(6):600-12.
23. Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2009;104(2):181-188.
24. Chatauret N, Badet L, Barrou B, Hauet T. Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury. *Prog Urol.* 2014;24(1):S4-12.
25. Martin JL, Gruszczuk AV, Beach TE, Murphy MP, Saeb-Parsy K. Mitochondrial Mechanisms and Therapeutics in Ischaemia Reperfusion Injury. *Pediatr. Nephrol.* 2018;34:1167–1174.
26. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature.* 2014;515(7527):431-435.
27. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation.* 2002;73(4):493-9.
28. Kezić A, Stajic N, Thaiss F. Innate Immune Response in Kidney Ischemia/Reperfusion Injury: Potential Target for Therapy. *J Immunol Res.* 2017;2017:6305439.

29. Gottlieb RA. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011;16(3-4):233-8.
30. Yu X, Acehan D, Ménétret JF, Booth CR, Ludtke SJ, Riedl SJ, et al. A structure of the human apoptosome at 12.8 Å resolution provides insights into this cell death platform. *Structure.* 2005;13(11):1725-35.
31. Fernández AR, Sánchez-Tarjuelo R, Cravedi P, Ochando J, López-Hoyos M. Review: Ischemia Reperfusion Injury-A Translational Perspective in Organ Transplantation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8549.
32. Pallet N, Livingston M, Dong Z. Emerging functions of autophagy in kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2014;14(1):13-20.
33. Decuyper JP, Ceulemans LJ, Agostinis P, Monbaliu D, Naesens M, Pirenne J, et al. Autophagy and the Kidney: Implications for Ischemia-Reperfusion Injury and Therapy. *Am J Kidney Dis.* 2015;66(4):699-709.
34. Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2007;117(10):2847–2859.
35. Krüger B, Krick S, Dhillon N, Lerner SM, Ames S, Bromberg JS, et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(9):3390-5.
36. Danobeitia JS, Djamali A, Fernandez LA. The role of complement in the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury and fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2014;7:16.
37. Naesens M, Li L, Ying L, Sansanwal P, Sigdel TK, Hsieh SC, et al. Expression of complement components differs between kidney allografts from living and deceased donors. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(8):1839-51.

38. Pratt JR, Basheer SA, Sacks SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat Med.* 2002;8(6):582-7.
39. Damman J, Daha MR, van Son WJ, Leuvenink HG, Ploeg RJ, Seelen MA. Crosstalk between complement and Toll-like receptor activation in relation to donor brain death and renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Transplant.* 2011;11(4):660-9.
40. Feng J, Hu W, Feng C, Mao X, Jin K, Ye Y. Increasing Proliferation of Intrinsic Tubular Cells after Renal Ischemia-reperfusion Injury in Adult Rat. *Aging Dis.* 2015;6(4):228-35.
41. Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, Mugford JW, Soeung S, Duffield JS, et al. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell.* 2008;2(3):284-91.
42. Zhang MZ, Yao B, Yang S, Jiang L, Wang S, Fan X, et al. CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2012;122(12):4519-32.
43. Gobe GC, Johnson DW. Distal tubular epithelial cells of the kidney: Potential support for proximal tubular cell survival after renal injury. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(9):1551-61.
44. Gao L, Zhong X, Jin J, Li J, Meng XM. Potential targeted therapy and diagnosis based on novel insight into growth factors, receptors, and downstream effectors in acute kidney injury and acute kidney injury-chronic kidney disease progression. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):9.
45. Humes HD, Cieslinski DA, Coimbra TM, Messana JM, Galvao C. Epidermal growth factor enhances renal tubule cell regeneration and repair and accelerates the recovery of renal function in postischemic acute renal failure. *J Clin Invest.* 1989;84(6):1757-61.
46. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8):2199-210.

47. Anders HJ, Schaefer L. Beyond tissue injury-damage-associated molecular patterns, toll-like receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(7):1387-400.
48. Kulkarni OP, Hartter I, Mulay SR, Hagemann J, Darisipudi MN, Kumar Vr S, et al. Toll-like receptor 4-induced IL-22 accelerates kidney regeneration. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(5):978-89.
49. Wan X, Hou LJ, Zhang LY, Huang WJ, Liu L, Zhang Q, et al. IKK $\alpha$  is involved in kidney recovery and regeneration of acute ischemia/reperfusion injury in mice through IL10-producing regulatory T cells. *Dis Model Mech.* 2015;8(7):733-42.
50. Tammaro A, Kers J, Scantlebery AML, Florquin S. Metabolic Flexibility and Innate Immunity in Renal Ischemia Reperfusion Injury: The Fine Balance Between Adaptive Repair and Tissue Degeneration. *Front Immunol.* 2020;11:1346.
51. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(2):317-26.
52. de Vries DK, Wijermars LG, Reinders ME, Lindeman JH, Schaapherder AF. Donor pretreatment in clinical kidney transplantation: a critical appraisal. *Clin Transplant.* 2013;27(6):799-808.
53. Schnuelle P, Gottmann U, Hoeger S, Boesebeck D, Lauchart W, Weiss C, et al. Effects of donor pretreatment with dopamine on graft function after kidney transplantation: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2009;302(10):1067-75.
54. Damman J, Hoeger S, Boneschansker L, Theruvath A, Waldherr R, Leuvenink HG, et al. Targeting complement activation in brain-dead donors improves renal function after transplantation. *Transpl Immunol.* 2011;24(4):233-7.

55. Saat TC, van den Akker EK, IJzermans JN, Dor FJ, de Bruin RW. Improving the outcome of kidney transplantation by ameliorating renal ischemia reperfusion injury: lost in translation? *J Transl Med.* 2016;14:20.
56. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev.* 2015;4(2):20-7.
57. Feng S. Optimizing Graft Survival by Pretreatment of the Donor. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;12(3):388-390.
58. Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation.* 2007;83(10):1289-98.
59. Opelz G, Döhler B. Multicenter analysis of kidney preservation. *Transplantation.* 2007;83(3):247-53.
60. Catena F, Coccolini F, Montori G, Vallicelli C, Amaduzzi A, Ercolani G, et al. Kidney preservation: review of present and future perspective. *Transplant Proc.* 2013;45(9):3170-7.
61. Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, Somov AY, Rodriguez JV, Fuller BJ. Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. *Transfus Med Hemother.* 2011;38(2):125-142.
62. Lee CY, Mangino MJ. Preservation methods for kidney and liver. *Organogenesis.* 2009;5(3):105-12.
63. Chen Y, Shi J, Xia TC, Xu R, He X, Xia Y. Preservation Solutions for Kidney Transplantation: History, Advances and Mechanisms. *Cell Transplant.* 2019;28(12):1472-1489.
64. Jing L, Yao L, Zhao M, Peng LP, Liu M. Organ preservation: from the past to the future. *Acta Pharmacol Sin.* 2018;39(5):845-857.

65. O'Callaghan JM, Knight SR, Morgan RD, Morris PJ. Preservation solutions for static cold storage of kidney allografts: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant.* 2012;12(4):896-906.
66. Legeai C, Durand L, Savoye E, Macher MA, Bastien O. Effect of preservation solutions for static cold storage on kidney transplantation outcomes: A National Registry Study. *Am J Transplant.* 2020;20(12):3426-3442.
67. O'Callaghan JM, Knight SR, Morgan RD, Morris PJ. A National Registry Analysis of Kidney Allografts Preserved With Marshall's Solution in the United Kingdom. *Transplantation.* 2016;100(11):2447-2452.
68. Ponticelli C. Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(6):1134-40.
69. Lepper PM, Bals R. On the edge: targeting Toll-like receptor 2 in ischemia/reperfusion injury. *Circ Cardiovasc Interv.* 2012;5(2):146-9.
70. Zhang LM, Liu JH, Xue CB, Li MQ, Xing S, Zhang X, et al. Pharmacological inhibition of MyD88 homodimerization counteracts renal ischemia reperfusion-induced progressive renal injury in vivo and in vitro. *Sci Rep.* 2016;6:26954.
71. Zheng X, Zang G, Jiang J, He W, Johnston NJ, Ling H, et al. Attenuating Ischemia-Reperfusion Injury in Kidney Transplantation by Perfusing Donor Organs With siRNA Cocktail Solution. *Transplantation.* 2016;100(4):743-52.

## 9. ŽIVOTOPIS

Melani Naglič rođena je 13.08.1997. godine u Rijeci. Pohađala je Osnovnu školu dr. Josipa Pančića u Bribiru, nakon čega upisuje opću gimnaziju u Crikvenici. Maturirala je 2015. godine te iste godine upisuje Intergrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Medicine u Rijeci.

Posjeduje Njemačku jezičnu diplomu druge razine (DSD II, nivo C1).