

# Djelovanje hladne ishemije tijekom transplantacije bubrega: patofiziologija oštećenja i prezervacijske otopine za hladnu pohranu

## Effects of cold ischemia during kidney transplantation: pathophysiology of damage and cold storage preservation solutions

Alojzije Lacković<sup>1</sup>, Tanja Čelić<sup>1\*</sup>, Josip Španjol<sup>2</sup>

**Sažetak.** Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda jedan je od najvažnijih uzroka oslabljene funkcije transplantiranog bubrega. Dosad su identificirani mnogi čimbenici koji mogu povećati vjerojatnost njezina nastanka, a jedan od najvažnijih je način pohrane bubrega, odnosno duljina trajanja hladne ishemije. Osnovni uzrok oštećenja tkiva u hladnoj ishemiji je nedostatak kisika, koji dovodi do smanjenja koncentracije adenosin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*, ATP-a) te slabljenja aktivnosti Na/K-ATP-aze (Na/K crpke). Puno kompleksniji i teži oblik oštećenja tkiva nastaje ponovnom uspostavom cirkulacije, odnosno reperfuzijom, prilikom koje dolazi do pojačanog ulaska kisika u stanice te stvaranja velike količine slobodnih kisikovih radikala. Njihovo nakupljanje unutar tkiva uzrokuje oštećenja DNA, proteina i lipida stanične membrane. Ljudski organizam djelomično je zaštićen od djelovanja slobodnih kisikovih radikala pomoću vlastitih antioksidativnih enzimatskih sustava, poput superoksid dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (GSH-Px) te katalaze. Kako bi se spriječio nastanak navedenih oštećenja, u kliničkoj se praksi za vrijeme trajanja ishemije bubrega koriste različite otopine za njegovo čuvanje.

**Ključne riječi:** hladna ishemija; otopine za čuvanje organa; slobodni radikali kisika; transplantacija bubrega

**Abstract.** Ischemic-reperfusion injury is important cause of transplanted kidney decreased function. So far many risk factors have been identified, which may increase the probability of its occurrence, the most important one is duration of the cold ischemia. The main cause of tissue damage in cold ischemia is lack of oxygen, which leads to a decreased concentration of adenosine triphosphate (ATP) and decrease in Na/K-ATPase activity. More complex and severe form of tissue damage is caused by re-establishment of circulation, known as reperfusion, which leads to increased oxygen level in the cells and creation of reactive oxygen species (ROS). ROS cause damage of the DNA, proteins, and lipids of cell membrane. Human body is partially protected from effects of ROS by its own antioxidant enzymatic systems, such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), and catalase. In order to prevent occurrence of these impairments, different organ preservation solutions can be used during cold ischemia period.

**Key words:** cold ischemia; kidney transplantation; preservation solutions, organ; reactive oxygen species

<sup>1</sup>Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka, Hrvatska

<sup>2</sup>Klinika za urologiju, Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka, Hrvatska

**\*Dopisni autor:**

Doc. dr. sc. Tanja Čelić, dr. med.  
Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka  
E-mail: tanja.celic@medri.uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

## UVOD

Transplantacija bubrega je najuspješnija metoda u liječenju kronične bubrežne bolesti i bubrežnog zatajenja. Prilikom postupka transplantacije bubrege se eksplantira iz tijela darivatelja, ispere se hladnom otopinom za čuvanje tkiva i čuva se u ohlađenoj otopini na +4 °C do priključenja bubrega u cirkulaciju primaoca kada započinje proces reperfuzije. Tijekom reperfuzije topla krv primaoca izaziva dodatno oštećenje tkiva. Tako nastaje

Organi najčešće zahvaćeni ishemijskim oštećenjem su srce, mozak i bubrege. Ishemija i reperfuzija, koja potom uslijedi, uzrok su metaboličkih promjena, uključujući snižavanje razine ATP-a, stvaranje slobodnih radikala kisika, promjene unutarstanične koncentracije iona i poremećaj homeostaze pH u zahvaćenim organima.

ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje, a o stupnju tog oštećenja ovisi duljina preživljavanja transplantiranog organa<sup>1,2</sup>.

Hladna ishemija je proces koji započinje vađenjem organa iz tijela darivatelja i perfundiranjem hladnom otopinom (+4 °C), a traje do priključenja bubrega u cirkulaciju primaoca. Vrijeme koje protekne između ta dva događanja, eksplantacije organa iz tijela darivatelja i implantacije u tijelo primatelja, naziva se vrijeme hladne ishemije<sup>2-4</sup>. U transplantaciji bubrega pomno se vodi briga o trajanju vremena hladne ishemije jer je dokazano da je vrijeme hladne ishemije nezavisni prediktor funkcije presatka. Produženo vrijeme hladne ishemije ima nepovoljan učinak na preživljenje i funkciju presatka. U okvirima transplantacije bubrega preporučeno je vrijeme hladne ishemije do 24 sata, a prosječno trajanje hladne ishemije prilikom transplantacije bubrega iznosi 21 sat<sup>5,6</sup>.

Bubrezi preminulih darivatelja podvrgnuti su hladnoj ishemiji u periodu dok se čeka postupak transplantacije, za razliku od bubrega živućih darivatelja koji nisu podvrgnuti hladnoj ishemiji. Produženo vrijeme hladne ishemije uzrok je smanjene funkcije presatka, te se skraćuje vrijeme odbacivanja organa, povećana je smrtnost primatelja organa i veći su troškovi zdravstvene skrbi. Također, tijekom hladne ishemije započinje pro-

ces oštećenja bubrega u smislu razvoja fibroze tkiva. Hladna ishemija je zbog toga razlog nastanka kronične ozljede bubrega. Ozljeda bubrega uzrokovana produženim trajanjem hladne ishemije može oštetiti organ do te mjere da on gubi svoju funkciju te je takav neadekvatan za transplantaciju<sup>7,8</sup>.

U samom postupku transplantacije bubrega, prilikom uzimanja organa od darivatelja, dolazi do oštećenja bubrega toplom ishemijom. To pokreće kaskadu molekularnih događanja u stanici koja uključuje: manjak adenozin trifosfata (ATP-a), nakupljanje hipoksantina, slabljenje Na/K pumpe, stanično bubrenje i povišenje koncentracije unutarstaničnog kalcija. Odmah po ekskorporaciji bubrega on se ispire otopinom za čuvanje tkiva i trenutno hladi na +4 °C. Hipotermijom se smanjuju zahtjevi za metaboličkom aktivnošću organa, a otopina za čuvanje tkiva štiti tkivo bubrega tijekom trajanja hladne ishemije<sup>9,10</sup>. Pohrana bubrega na niskim temperaturama ima važnu ulogu u transplantaciji organa, ali uza sve prednosti po hrane bubrega na niskim temperaturama pojavljuje se problem oštećenja organa uzrokovan trajanjem vremena ishemije i hipotermijom.

## PATOFIZIOLOGIJA OŠTEĆENJA STANICA HLADNOM ISHEMIJOM

Osnova oštećenja stanica u hladnoj ishemiji je nedostatak kisika, pri čemu prvo strada proces aerobne razgradnje glukoze. Ubrzo po nastupu hipoksije prestaje oksidativna fosforilacija, stanica te aktivira alternativni put dobivanja energije – anaerobnu razgradnju glukoze. Aerobnom razgradnjom jedne molekule glukoze nastaje 36 molekula ATP-a, dok u procesu anaerobne glukolize nastaju samo 2 molekule ATP-a. Opisani procesi uzrokuju da se već nakon 15 minuta od početka hipoksije količina ATP-a u stanici snizi na 35 %, da bi nakon 90 minuta iznosila samo 6 %. Smanjenje količine ATP-a slabi stanične procese koji zahtijevaju mnogo energije, a to su ponajprije ustroji za održavanje optimalnog ionskog sastava<sup>11</sup>. Istodobno, s promjenama u razgradnji glukoze, mijenja se i građa stanice. Prvo nestaje glikogen, a gotovo istodobno pojavljuju se kromatinske grudice u jezgri. Mišljenje je da se to zbiva zbog promjene pH. U stanici oštećenoj hipoksijom vide

se i protruzije koje su vjerojatno posljedica promjena u mikrotubulima i mikrofilamentima čija je funkcija održanje oblika stanice. Između 30 i 60 minuta od početka hipoksije raspadaju se poliribosomi s površine endoplazmatske mrežice, a mitohondriji prelaze u stanje bez energije. Produženjem hipoksije narušava se propusnost mitohondrijske membrane i mitohondriji počinju bubriti. Uspostave li se u toj fazi oštećenja stanice normalni uvjeti, tj. krvotok i oksigenacija hipoksičnog tkiva, kondenzirani mitohondriji počinju proizvoditi ATP i prelaze u energizirano stanje. ATP će oporaviti i mitohondrije u početnoj fazi bubrenja, koji još nisu nepopravljivo oštećeni. Obnovljena energijska proizvodnja popraviti će i ostale stanične funkcije, pa će stanica preživjeti hipoksijsko oštećenje. Međutim, obnova krvnog optoka i dolazak kisika u tkivo mogu i oštetiti stanice koje su preživjele hipoksiju, jer kisik u tim stanicama može prijeći u vrlo aktivne slobodne radikale. Takvo se oštećenje stanica naziva postishemijsko oštećenje<sup>11</sup>.

Opisana oštećenja dovode do nekroze stanica, a tijekom reperfuzije uz nekrozu značajan broj subletalno oštećenih stanica umire apoptozom. Novija istraživanja vode u smjeru supresije razvoja apoptoze tijekom hladne ishemije. Istraživanja u tom smislu promatraju mitohondrijski apoptotični put kao začetnika oštećenja tijekom hladne ishemije<sup>11,12</sup>.

#### OKSIDATIVNI STRES I ANTIOKSIDATIVNI SUSTAVI

Teži oblik oštećenja tkiva nastaje ponovnom uspostavom cirkulacije, odnosno reperfuzijom, pri čemu dolazi do pojačanog ulaska kisika u stanice te stvaranja velike količine slobodnih kisikovih radikala, koji uzrokuju oštećenja DNA, proteina i lipida stanične membrane. Krajnji rezultat ovakvih događanja jest da stanica gubi svoj vlastiti integritet i odumire<sup>1</sup>. Slobodni radikali su molekule ili dijelovi molekula koji sadrže nesparesni elektron u vanjskoj ljusci. Upravo nesparesni elektron omogućuje slobodnim radikalima veliku reaktivnost te smanjenu specifičnost za reaktante. Iz tog razloga mogu reagirati s različitim spojevima te imaju kratak poluvijek trajanja. Vežanjem na ciljne molekule, slobodni radikali pokreću neenzimske lan-

čane reakcije. Slobodni radikali mogu nastati u tkivu na različite načine, kao što su nepotpuna redukcija kisika, enzimskim reakcijama, radiolizom malih molekula, kao međuproizvod metabolizma egzogenih i endogenih molekula u tkivima te pri aktivaciji trombocita<sup>1</sup>. Najvažniji slobodni kisikovi radikali jesu superoksidni anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) te hidroksilni radikal ( $OH^{\cdot}$ ). Dnevno, procesom nepotpune redukcije kisika u tkivu, nastane  $2-4 \times 10^{10}$  slobodnih kisikovih radikala. U hipoksiji, povišena koncentracija kalcija unutar stanice potiče stvaranje slobodnih kisikovih radikala, pomoću različitih procesa, poput poticanja metabolizma arahidonske kiseline, permeabilne tranzicije mitohondrija te pretvorbe ksantin-dehidrogenaze u ksantin-oksidadu. Prilikom ponovnog uspostavljanja cirkulacije, ksantin-oksidadu prevodi dostupne velike količine kisika u kisikove radikale, čime nastaje preveliko opterećenje tkiva radikalima, što predstavlja osnovu postishemijskog oštećenja tkiva<sup>1</sup>. Ljudski organizam djelomično je zaštićen od djelovanja slobodnih kisikovih radikala, pomoću vlastitih antioksidativnih enzimskih sustava, poput superoksid dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (engl. *glutathione peroxidase*, GSH-Px) te katalaze, ali i pomoću prirodnih antioksidansa, kao što su vitamini C i E, koenzim Q, ubikvinon, metionin, cistein i melatonin<sup>13</sup>. Enzimskim reakcijama se slobodni radikali prevode u manje toksične ili pak netoksične spojeve. Dva različita oblika SOD-a pretvaraju superoksidni anion u manje toksičan spoj, vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), koji se kasnije pomoću katalaze razlaže do vode i kisika. Oštećenja u tkivima mogu nastati kao posljedica slabosti zaštitnih mehanizama ili zbog prevelike proizvodnje slobodnih radikala. Kada je riječ o proteinima, ciljno mjesto djelovanja slobodnih radikala predstavljaju aminokiseline. Izravna oksidacija bočnih lanaca aminokiselina dovodi do karbonilacije proteina i stvaranja karbonilnih skupina (aldehidi i ketoni), pri čemu je ubrzan katabolizam proteina te je posljedično i skraćen poluvijek molekula u stanici<sup>13</sup>. Arginin, lizin, prolin i treonin su aminokiseline koje su posebno osjetljive na djelovanje slobodnih kisikovih radikala. Oduzimanje vodikovih iona iz tiolne skupine cisteina može dovesti do stvaranja disulfidnih veza i nepravilnog prekla-

panja proteina. Nenormalno preklapanje može uzrokovati gubitak funkcije, ali i agregaciju proteina te smrt stanice<sup>13</sup>. Slobodni radikali sudjeluju u patogenezi ateroskleroze oksidacijom LDL-čestica koje time dobivaju jaka aterogena svojstva. Hidroksilni radikali mogu izazvati lipidnu peroksidaciju u staničnoj membrani, prilikom čega dolazi do povećane propusnosti stanice i njene smrti. Kada je riječ o bubregu, ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje tkiva dovodi do procesa tubulointersticijske fibroze, koji nastaje kao posljedica pojačanog stvaranja TGF- $\beta$  te drugih profibrotičkih čimbenika, koji zajedno stimuliraju proliferaciju fibroblasta, sintezu ekstracelularnog matriksa te pretvorbu epitelnog tkiva u mezenhimalno tkivo. Proces fibroze bubrega je ireverzibilan te rezultira smanjenjem bubrežne funkcije. TGF- $\beta$  aktivacijom i poticanjem fibroblasta na povećano stvaranje komponenti izvanstaničnog matriksa, poput kolagena tipa IV te fibronektina, predstavlja glavni čimbenik uključen u proces fibroze bubrega<sup>14</sup>.

#### EPITELNE STANICE KANALIĆA BUBREGA I NJIHOVA SPOSOBNOST REGENERACIJE I ADAPTACIJE NA HIPOKSIJU

Nefron je glavna funkcionalna jedinica bubrega sastavljena od glomerula, proksimalnih zavijenih kanalića, Henleove petlje i distalnih zavijenih kanalića. Henleovu petlju čine tanki silazni i debeli uzlazni krak smješten u srži bubrega (engl. *medullary thick ascending limb*, mTAL). Pojam distalni kanalić obuhvaća mTAL segment i distalni zavijeni kanalić bubrega<sup>15</sup>. Ostatak sabirnog sustava bubrega, sabirne cijevi, važan je segment bubrežne funkcije, ali ne pripada nefronu, što se vidi već i prema podrijetlu sabirnog sustava koji nastaje iz ureteralnog pupoljka, dok nefron potječe iz metanefričkog blastema. Bubrežni nefron je jedino epitelno tkivo koje je mezenhimalnog podrijetla. Iz mezenhima se razvijaju glomeruli, proksimalni i distalni kanalići<sup>16</sup>.

Tkivni raspored struktura nefrona pažljivo je raspoređen. U bubrežnoj srži u neposrednoj blizini jedan uz drugoga stoje silazni i uzlazni krak Henleove petlje, a u kori bubrega proksimalni i distalni zavijeni kanalići nalaze se jedan uz drugoga<sup>15,17</sup>. Bliska položenost proksimalnih i distalnih kanalića te Henleove petlje ima ključnu ulogu u fiziološ-

kim i patološkim procesima u bubregu. Također, poznata je uloga distalnog kanalića koji aktivno odgovara na oštećenje bubrega i razvoj bolesti. Odgovori epitelnih stanica distalnog kanalića uključuju staničnu regeneraciju, apoptozu, nekrozu i upalu. Uvid u biološke i molekularne funkcije svih dijelova nefrona može otvoriti nova područja terapijskog djelovanja pri akutnoj ozljedi bubrega. Kada bi se moglo smanjiti oštećenje i ponovno uspostaviti funkciju bubrega nakon akutne bubrežne ozljede, to bi značilo spriječiti progresiju bolesti prema tubulointersticijskoj fibrozi koja karakterizira kroničnu bubrežnu bolest<sup>18</sup>.

Dijelovi nefrona smješteni u srži bubrega imaju sposobnost koncentrirati novostvoreni urin s obzirom na stanje hidriranosti tijela. Epitelne stanice kanalića zadužene su za vršenje izmjena raznih tvari putem pasivnog i aktivnog transporta. Prokrvljenost tog dijela bubrega je relativno slaba tako da je srž bubrega, iako neprestano u funkciji, u trajnim uvjetima niske koncentracije kisika<sup>17,19</sup>. Niska razina kisika je posljedica slabog protoka krvi kroz vasa recta, ali i velike potrošnje kisika u mTAL segmentu nefrona koji prethodi u tkivnom položaju. Parcijalni tlak kisika u bubrežnoj srži je 10 – 20 mmHg, a u bubrežnoj kori oko 50 mmHg. Relativno niska koncentracija kisika vjerojatno dovodi do povećane otpornosti distalnog dijela kanalića u bubrežnoj kori, pa su oni razvili veći kapacitet anaerobne glikolize nego stanice proksimalnog kanalića. Također distalni kanalići imaju veću sposobnost preživljenja i adaptacije na hipoksiju<sup>20,21</sup>. Kao što je spomenuto, epitelne stanice proksimalnih i distalnih kanalića bubrega su visoke metaboličke aktivnosti, stoga su dobro opskrbljene mitohondrijima, koji su izvor energije, ali i oksidacijskog stresa. Mitohondriji nakupljaju slobodne radikale kisika koji su glavni čimbenici ili oštećenja biomolekula oksidacijom ili čuvari stanica zbog mogućnosti redoks reakcije<sup>21</sup>.

Takva mikrookolina u kojoj funkcionira bubrežna srž, s niskom koncentracijom kisika i povećanim stvaranjem ROS-a, opasna je čim se poremeti normalna opskrba krvlju. Zbog toga su epitelne stanice kanalića razvile razne mehanizme adaptacije, a presudno za njihov opstanak je koordinirano djelovanje između susjednih kanalića. Do sada su poznati mnogi autokrini i parakrini činitelji

(prostaglandin, dušikova sintetaza, adenzin, kinin) koji reguliraju opskrbu kisikom i rad kanalića u bubrežnoj srži. Navedeni činitelji djeluju tako što pojačavaju vazodilataciju, smanjuju metaboličke zahtjeve i povećavaju kapacitet energije te kontroliraju koncentraciju kisika<sup>22-24</sup>.

Važnost interakcije stanica posebno je naglašena u bubregu jer se heterogena skupina stanica nalazi na bliskom mjestu i mora uskladiti svoje funkcije. Osim što je stanična interakcija važna u normalnim uvjetima funkcije bubrega, ona posebice dolazi do izražaja tijekom patoloških i regenerativnih procesa. Da bi stanica preživjela oštećenje mora biti pod utjecajem čimbenika rasta koje joj dostavljaju susjedne stanice, u stanju dobre prokrvljenosti, očuvanog izvanstaničnog sastava i s odsustvom upale<sup>24,25</sup>. Najčešći uzrok akutne bubrežne insuficijencije je ishemijsko oštećenje te oštećenje slobodnim radikalima kisika koje uslijedi s nastupom reperfuzije. U eksperimentalnim modelima i u pacijenata s akutnim zatajenjem bubrega istraživano je koji čimbenici rasta i citokini protektivno djeluju na tkivo bubrega.

Epitelni čimbenik rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF) dokazan je kao važan protein u oporavku nakon oštećenja bubrega. U normalnom bubregu epitelne stanice distalnog kanalića sintetiziraju i ekspimiraju EGF. Receptor za EGF prisutan je na bazolateralnoj i apikalnoj površini epitelnih stanica proksimalnih kanalića. Iako se njegova sinteza i ekspresija gubi u stanicama distalnog kanalića tijekom akutnog zatajenja bubrega, ima ulogu snažnog mitogena i pokretača reepitelizacije nakon 24 – 48 sati po reperfuziji, te tako pomaže ponovnu uspostavu bubrežne funkcije. Početni gubitak ekspresije EGF-a tijekom ishemije može potaknuti Bcl-2 ekspresiju u epitelnim stanicama kanalića bubrega, prvenstveno distalnim kanalićima. Povećana ekspresija Bcl-2 potiče zaštitu stanica i omogućuje im povratak ekspresije EGF-a. Bez zaštite molekulom Bcl-2 nastupila bi apoptotična smrt proksimalnih stanica kanalića bubrega, jer su ovisne o normalnom funkcioniranju distalnih kanalića<sup>22,23</sup>.

Inzulinu nalik čimbenik (engl. *insulin growth factor*, IGF) također potiče oporavak bubrežne funkcije nakon ishemijskog oštećenja. U zdravom bubregu IGF je sintetiziran u distalnim kanalićima

i sabirnim cijevima. Stanice proksimalnog kanalića ne pokazuju ekspresiju IGF-a, ali zato obiluju receptorima za IGF, posebice nakon nastupa ozljede. Tijekom akutno ozljede bubrega IGF ekspresija se povećava u distalnim kanalićima već u ranoj fazi nastupa ishemije, a kasnije u fazi oporavka od ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja ekspresija IGF se uočava i u proksimalnim kanalićima<sup>24,25</sup>.

Prisutnost matičnih stanica u odraslom bubregu tek mora biti dokazano, iako se nagađa da je bubrežna papila središte bubrežnih progenitornih stanica i da u parijetalnom listu Bowmanove čahure postoje multipotentne progenitorne stanice te da mezenhimalne stanice nalik fibroblastima u bubrežnoj srži pokazuju mogućnost modelacije prema epitelnim strukturama<sup>26</sup>. Nefron, kao što je već prije spomenuto, potječe iz metanefričkog mezenhima za kojeg se zna da sadrži pluripotentne i samoobnavljajuće stanice. U odraslom bubregu mnoge preživjele epitelne stanice nakon ozljede postaju dediferencirane, odnosno vraćaju se u prvotni razvojni stadij, mezenhim. Epitelne stanice ulaze u proces epitelno-mezenhimne transformacije u kojem gube mikrotrepitiljke, stanjuju se i poprimaju karakteristike miofibroblasta te ekspimiraju alfa glatkomišićni aktin (engl. *α-smooth muscle actin*, α-SMA). Te stanice proliferiraju i mogu se ponovno diferencirati u epitel te obnoviti svoju funkciju i strukturu<sup>27</sup>.

#### ENDOGENI PROTEKTIVNI ČIMBENICI U HLADNOJ ISHEMIJI: HIF-1 I HSP70

Osim opisanih promjena stanične funkcije i građe, ishemija dovodi do nakupljanja i aktivacije molekula koje pokušavaju omogućiti čim bolju prilagodbu stanice na hipoksiju. Hipoksijom inducirani čimbenik-1 (engl. *hypoxia inducible factor-1*, HIF-1) je transkripcijski faktor koji tijekom hipoksije regulira aktivaciju gena koji sudjeluju u angiogenezi, metabolizmu željeza i glukoze te staničnoj proliferaciji i preživljavanju. HIF-1 se sastoji od konstitutivno izražene podjedinice HIF-1β i od kisikom regulirane podjedinice HIF-1α. Stabilnost i aktivnost alfa podjedinice je regulirana posttranslacijskim modifikacijama kao što su hidrosilacija, ubikvitinacija, acetilacija i fosforilacija<sup>28-31</sup>. Tijekom normoksije (~21 % O<sub>2</sub>) hidroksilirani HIF-1α se veže na von Hippel Lindau tumor supresorski



protein (VHL) koji služi kao receptorska podjedinica u stvaranju ligaza ubikvitinskog kompleksa. Ovaj kompleks ima ulogu u ubikvitinaciji i razgradnji proteina. Nakon vezivanja HIF-1 $\alpha$  na VHL dolazi do ubikvitinacije, a nakon toga do brzog raspadanja HIF-1 $\alpha$ . Da bi se HIF-1 $\alpha$  uopće vezao za VHL protein najprije treba doći do hidroksilacije njegova prolinskog ostatka pomoću enzima prolil hidroksilaze<sup>31</sup>. Stupanj djelovanja te hidroksilaze ovisi o oksigenaciji stanice, pa je u stanju normoksije en-

Otopine za hladnu pohranu organa sprječavaju nepovratno oštećenje tkiva tijekom ishemije i reperfuzije. Novija istraživanja dokazuju da tkiva perfundirana s UW otopinom ipak imaju manju proizvodnju ROS-a i manji utrošak ATP-a tijekom hladne ishemije, odnosno UW otopina ima veći antioksidacijski potencijal od ostalih otopina za hladnu pohranu organa.

zim u aktivnoj formi, dok je tijekom hipoksije hidroksilaza inaktivna. Stoga, u stanju hipoksije (~1 % O<sub>2</sub>) HIF-1 $\alpha$  se ne veže za VHL i ne dolazi do njegove razgradnje. HIF-1 $\alpha$  u ishemijskim uvjetima u jezgri potiče prepisivanje gena koji protektivno djeluju u stanicama, te na taj način štite od oštećenja<sup>28,32</sup>. Tijekom akutne ishemije bubrega, u tijeku koje je HIF-1 $\alpha$  proteoliza inhibirana, HIF-1 $\alpha$  se opaža u jezgri epitelnih stanica kanalića bubrega, gdje se spaja s HIF-1 $\beta$  u dimer koji je transkripcijski aktivni oblik HIF-1<sup>32,33</sup>. U stanjima akutnog oštećenja bubrega, kada je limitirana dostupnost glukoze, HIF-1 potiče hipoksijom induciranu staničnu smrt putem svog utjecaja na metabolizam glukoze. Ako je u tkivu prisutna dovoljna količina glukoze, HIF-1 nije neophodan za preživljavanje epitelnih stanica kanalića bubrega niti za indukciju smrti stanice posredovanu hipoksijom. Usprkos svojoj kontroverznoj ulozi u akutnoj ozljedi bubrega, najvažnija uloga HIF-1 je da potiče prepisivanje protektivnih činitelja<sup>32,33</sup>. Činitelji koje HIF-1 direktno regulira uključuju hem oksigenazu 1 (engl. *heme oxygenase-1*, HO-1), inhibitor aktivatora plazminogena-1 (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1), tkivni inhibitor metaloproteinaze-1 (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase-1*, TIMP-1) i supresor Wilmsova tumora (engl. *Wilms*

*tumor suppressor*, WT-1)<sup>32,33</sup>. Pretretman tkiva bubrega s HIF prolil-hidroksilaza inhibitorom, kojem je uloga da sprječava proteolizu HIF-1 $\alpha$ , u eksperimentalnim modelima akutne i kronične bubrežne ozljede rezultira poboljšanom glomerularnom filtracijom<sup>32,33</sup>.

Proteini toplinskog šoka (engl. *heat shock protein*, Hsp) su klasa funkcionalno povezanih proteina uključenih u svijanja novostvorenih proteina, pri njihovom prolasku kroz staničnu membranu te u vođenju proteina prema lizosomu s ciljem njihove razgradnje. Opisana uloga Hsp događa se u stanicama bez stresnih uvjeta, kada se Hsp ponašaju kao kućepaziteljski proteini<sup>34,35</sup>. Međutim, u stanjima stresa ekspresija Hsp se povećava te djeluju kao proteini odgovora na stres. Navedenoj klasi proteina pripada i Hsp70 obitelj, strukturno i funkcionalno očuvana tijekom evolucije, te ubikvitarno prisutna u organizmima, od bakterija do ljudi. Proteini toplinskog šoka su nazvani sukladno njihovoj molekularnoj težini, a najčešće izučavani proteini ove obitelji su Hsp60, Hsp70 i Hsp90. U stresne uvjete koji potiču proizvodnju Hsp70 ubrajaju se infekcija, upala, izloženost toksinima, izgladnjivanje i hipoksija. S obzirom na to, proteini toplinskog šoka nazivaju se još i stres proteini, a njihova je aktivnost dio glavnog tkivnog stresnog odgovora<sup>36</sup>. Hsp su u velikoj količini izraženi u bubrežnoj srži i predstavljaju unutarstanični obrambeni sustav epitelnih stanica kanalića bubrega. U zdravom bubregu Hsp su prisutni u malim količinama. Izloženošću stanica raznim vrstama stresa, uključujući ishemiju (hipoksiju), povećava se razina HSP ekspresije. Studije pokazuju da se glavnina ekspresije Hsp nalazi u distalnim kanalićima, i tamo ima ulogu protektivnog faktora u ishemijskim uvjetima. Hsp su po funkciji molekularni "chaperoni" koji prepoznaju pogrešno konformirane ili denaturirane proteine, s njima stvore kompleks kako bi ili ispravili pogrešku u tom proteinu ili ga degradirali. Hsp također inhibira apoptozu interferirajući sa signalnom kaskadom pro-apoptotičnih faktora citokroma c i Apaf-1. Ključna funkcija Hsp je da poveća stanični kapacitet na otpornost prema ozljedi, te na taj način Hsp pridonosi staničnom preživljenju u inače smrtonosnim uvjetima<sup>36</sup>. Jedan od najbolje istraženih proteina ove obitelji je Hsp70, za kojeg je eksperimentalno utvrđeno da štiti epitelne sta-

nice kanalića bubrega kod štetnog djelovanja visoke koncentracije ureje u mokraći. Zaštitni mehanizam Hsp70 ostvaruje tako što sprečava inhibiciju enzima i apoptotično djelovanje ureje. Osim toga u kulturi stanica bubrežne srži izloženih hipertoničnom mediju i s visokim koncentracijama Hsp70 stanice su otporne na visoku temperaturu, oksidacijski stres i ciklosporin A, također su otporne na djelovanje pro-apoptotičnih molekula<sup>36</sup>.

#### OTOPINE ZA ČUVANJE TKIVA TIJEKOM HLADNE ISHEMIJE

Otopine za čuvanje tkiva tijekom hladne ishemije koriste se kako bi održale organ u optimalnom stanju u vremenu između eksplantacije i transplantacije. Početak upotrebe otopina za čuvanje organa označava veliku prekretnicu u transplantacijskoj praksi jer se mijenja shvaćanje o transplantaciji kao zahvatu koji se mora izvršiti bez odgađanja. Otopine za čuvanje organa omogućile su vrijeme potrebno za transport organa, vrijeme za usporedbu tkivne kompatibilnosti, očuvanje funkcije organa tijekom hladne ishemije i bolju postoperativnu funkciju organa<sup>37-39</sup>.

Od samog razvoja transplantacije započinju istraživanja otopine koja bi spriječila oštećenje tkiva koje se razvija u tijeku hladne ishemije. Prva otopina za perfuziju bubrega tijekom transplantacije bila je Collinsova otopina (Eurocollins), izumljena 60-ih godina prošlog stoljeća. Eurocollins otopina zamišljena je kao pokušaj imitacije fiziološkog unutarstaničnog sastava, a sadrži visoku koncentraciju glukoze i elektrolita. U otopinu je dodan snažni fosfatni pufer, a glukoza je služila za postizanje hiperosmolarnosti. Upravo je visoka koncentracija glukoze bila i glavna mana otopini, jer se u hipotermijskim uvjetima glukoza enzimatski cijepa u laktat koji udvostručuje unutarstaničnu količinu molekula i čini stanicu podložniju bubrenju<sup>40</sup>. Eurocollins otopina koristila se 15-ak godina kao standardna otopina za pohranu bubrega tijekom hladne ishemije, pa iako je produžila funkcionalnost organa, ubrzo je zaključeno da ne može očuvati tkivo bubrega kroz duži period trajanja hladne ishemije.

Kontinuiranim radom na očuvanju organa tijekom transplantacije pioniri u tom polju, Belzer i

Southard, 80-ih godina prošlog stoljeća razvijaju University of Wisconsin (UW) otopinu. UW otopina i danas se koristi u rutinskoj upotrebi za ispiranje bubrega i čuvanje tkiva tijekom hladne ishemije jer se pokazalo da ima najveći antioksidativni potencijal u odnosu na ostale ispitivane otopine<sup>41</sup>. No usprkos tome nastaje oštećenje tkiva tijekom produženog trajanja hladne ishemije. U svom sastavu UW otopina sadrži alopurinol čija je uloga stvaranje novog adenozin trifosfata (ATP), adenozin čija je uloga zaštititi od reperfuzijske ozljede koja nastaje zbog slobodnih radikala kisika i glutation koji inhibira aktivnost ksantin oksidaze. UW otopina ima i nekoliko nedostataka kao što su velika osmolarnost, kratki vijek aktivnosti dodanog glutationa te visoka cijena. Poznajući mehanizme oštećenja koji nastaju tijekom hladne ishemije UW otopina ipak ne pruža dovoljnu zaštitu tkivu bubrega<sup>41,42</sup>.

Najbliža po učinkovitosti UW otopini je Histidin-Triptofan-Ketoglutarat otopina (HTK), razvijena dodavanjem snažnog puferskog sustava, sastavljenog od histidina u kombinaciji s dva supstrata. Prednost HTK-a nad UW otopinom je mala viskoznost koja omogućava bržu i kvalitetniju perfuziju organa<sup>43,44</sup>. Provedene su mnoge studije usporedbe učinkovitosti UW i HTK otopine. Iako početna istraživanja pokazuju da otopine imaju istu učinkovitost tijekom hladne ishemije kraće od 24 sata, novija istraživanja dokazuju da tkiva perfundirana s UW otopinom ipak imaju manju proizvodnju ROS-a i manji utrošak ATP-a tijekom hladne ishemije, odnosno UW otopina ima veći antioksidacijski potencijal<sup>39,45</sup>.

Trenutno se nastavljaju istraživanja i traže se nove aktivne supstancije koje bi imale bolju zaštitnu ulogu te smanjile oštećenje tkiva tijekom hladne ishemije. Efikasnijim smanjivanjem oksidativnog oštećenja stanica mogla bi smanjiti učestalost odbacivanja presatka, kao i nastanka odgođene funkcije presatka. Na taj način mogao bi se poboljšati ishod transplantacija bubrega, a samim time i uspješnost liječenja kroničnog zatajenja bubrega. Usprkos korištenju otopina za čuvanje tkiva ne smije se zaboraviti da o vremenu hladne ishemije ovisi stupanj oštećenja tkiva.

**Izjava o sukobu interesa:** Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

## LITERATURA

1. Mannon RB. Delayed Graft Function: The AKI of Kidney Transplantation. *Nephron* 2018;140:94-8.
2. Steichen C, Giraud S, Bon D, Barrou B, Badet L, Salamé E et al. Barriers and Advances in Kidney Preservation. *Biomed Res Int* 2018 doi: 10.1155/2018/9206257
3. Hayakawa K, Kubota Y, Sasaki H. Should we discard the renal allografts from cardiac death donors that have total ischemic time longer than 24 hours? *Transplant Proc* 2006;38:3382-93.
4. Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J Investig Med* 2004;52:299-309.
5. Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transplant.* 2015;5:52-67.
6. Arnau A, Rodrigo E, Miñambres E. Prediction of kidney transplant outcome by donor quality scoring systems: expanded criteria donor and deceased donor score. *Transplant Proc* 2012;44:2555-7.
7. Ponticelli C. Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2014;6:1134-40.
8. Gamulin S, Marušić M et al. *Patofiziologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 1998:80-82.
9. Renders L, Heemann U. Chronic renal allograft damage after transplantation: what are the reasons, what can we do? *Curr Opin Organ Transplant* 2012;17:634-9.
10. Cimmino F, Avitabile M, Alessandro Lasorsa V, Montella A, Pezone L, Cantalupo S, Visconte F, Corrias MV, Iolascon A, Capasso M. HIF-1 transcription activity: HIF1A driven response in normoxia and in hypoxia. *BMC Medical Genetics.* 2019;37: <https://doi.org/10.1186/s12881-019-0767-1>.
11. Subramaniam K. Early graft failure after heart transplantation: prevention and treatment. *Int Anesthesiol Clin* 2012;50:202-27.
12. Minor T, von Horn C. Rewarming Injury After Cold Preservation. *Int J Mol Sci* 2019;20:2059. doi: 10.3390/ijms20092059.
13. Sands JM, Layton HE. The physiology of urinary concentration: an update. *Semin Nephrol* 2009 May;29(3):178-95.
14. Kölling M, Genschel C, Kaucsar T, Hübner A, Rong S, Schmitt R et al. Hypoxia-induced long non-coding RNA Malat1 is dispensable for renal ischemia/reperfusion-injury. *Sci Rep.* 2018;8:3438. doi: 10.1038/s41598-018-21720-3.
15. Thuillier R, Hauet T. Role of Translocator Protein in Renal Ischemia Reperfusion, Renal Preservation and Acute Kidney Injury. *Curr Mol Med* 2012;12:413-25.
16. Textor SC, Lerman LO. The Role of Hypoxia in Ischemic Chronic Kidney Disease. *Semin Nephrol* 2019;39:589-98.
17. Fine LG, Norman JT. The breathing kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1974-6.
18. Angelotti ML, Ronconi E, Ballerini L, Peired A, Mazzinghi B, Sagrinati C et al. Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury. *Stem Cells.* 2012;30:1714-25.
19. Klinkhammer BM, Goldschmeding R, Floege J, Boor P. Treatment of Renal Fibrosis-Turning Challenges into Opportunities. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2017;24:117-29.
20. Nigam S, Lieberthal W. Acute renal failure. III. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F3-F11.
21. Villanueva S, Céspedes C, Vio CP. Ischemic acute renal failure induces the expression of a wide range of nephrogenic proteins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R861-70.
22. Soliman AR, Soliman MA, Sadek KM. Association of insulin growth factor-1 and growth hormone levels in elderly renal transplant recipients with cardiac dysfunction. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2019;30:62-7.
23. Bruno S, Camussi G. Isolation and characterization of resident mesenchymal stem cells in humanglomeruli. *Methods Mol Biol* 2012;879:367-80.
24. Wang J, Zhu H, Huang L, Zhu X, Sha J, Li G et al. Nrf2 signaling attenuates epithelial-to-mesenchymal transition and renal interstitial fibrosis via PI3K/Akt signaling pathways. *Exp Mol Pathol* 2019;111:104296. doi: 10.1016/j.yexmp.2019.104296.
25. Maes C, Carmeliet G, Schipani E. Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:358-6.
26. Hahne M, Schumann P, Mursell M, Strehl C, Hoff P, Buttgerit F et al. Unraveling the role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in the adaption process of human microvascular endothelial cells (HMEC-1) to hypoxia: Redundant HIF-dependent regulation of macrophage migration inhibitory factor. *Microvasc Res* 2018;116:34-44.
27. Li M, Kim WY. Two sides to every story: the HIF-dependent and HIF-independent functions of pVHL. *J Cell Mol Med* 2011;15:187-5.
28. Fang Y, Zhang H, Zhong Y, Ding X. Prolyl hydroxylase 2 (PHD2) inhibition protects human renal epithelial cells and mice kidney from hypoxia injury. *Oncotarget.* 2016;7:54317-28.
29. Chen Y, Jiang S, Zou J, Zhong Y, Ding X. Silencing HIF-1 $\alpha$  aggravates growth inhibition and necrosis of proximal renal tubular epithelial cell under hypoxia. *Ren Fail* 2016;38:1726-34.
30. Mazzei L, Docherty NG, Manucha W. Mediators and mechanisms of heat shock protein 70 based cytoprotection in obstructive nephropathy. *Cell Stress Chaperones* 2015;20:893-906.
31. Ahluwalia A, Tarnawski AS. Critical role of hypoxia sensor HIF-1 $\alpha$  in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Curr Med Chem* 2012;19:90-7.
32. Deshmukh AB, Patel JK, Prajapati AR, Shah S. Perspective in chronic kidney disease: targeting hypoxia-inducible factor (HIF) as potential therapeutic approach. *Ren Fail* 2012;34:521-2.
33. Shu S, Wang Y, Zheng M, Liu Z, Cai J, Tang C et al. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Kidney Injury and Repair. *Cells.* 2019;8:207. doi: 10.3390/cells8030207.
34. Chebotareva N, Bobkova I, Shilov E. Heat shock proteins and kidney disease: perspectives of HSP therapy. *Cell Stress Chaperones* 2017;22:319-43.
35. Healy DA, Daly PJ, Docherty NG. Heat shock-induced protection of renal proximal tubular epithelial cells from



- cold storage and rewarming injury. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:805-12.
36. Sreedharan R, Van Why SK. Heat shock proteins in the kidney. *Pediatr Nephrol* 2016;30:1561-70.
37. O'Callaghan JM, Knight SR, Morgan RD, Morris PJ. Preservation solutions for static cold storage of kidney allografts: a systematic review and meta-analysis. *J Urol* 2012;188:1217.
38. Tabriziani H, Lipkowitz MS, Vuong N. Chronic kidney disease, kidney transplantation and oxidative stress: a new look to successful kidney transplantation. *Clin Kidney J* 2018;11:130-5.
39. de Boer JD, Strelniece A, van Rosmalen M, de Vries E, Ysebaert D, Guba M et al. The Effect of Histidine-tryptophan-ketoglutarate Solution and University of Wisconsin Solution: An Analysis of the Eurotransplant Registry. *Transplantation* 2018;102:1870-7.
40. Lema Zuluaga GL, Serna Agudelo RE, Zuleta Tobón JJ. Preservation solutions for liver transplantation in adults: celsior versus custodiol: a systematic review and meta-analysis with an indirect comparison of randomized trials. *Transplant Proc* 2013;45:25-32.
41. Chen Y, Shi J, Xia TC, Xu R, He X, Xia Y. Preservation Solutions for Kidney Transplantation: History, Advances and Mechanisms. *Cell Transplant* 2019;28:1472-89.
42. Khalifeh T, Baulier E, Le Pape S, Kerforne T, Coudroy R, Maiga S et al. Strategies to optimize kidney recovery and preservation in transplantation: specific aspects in pediatric transplantation. *Pediatr Nephrol* 2015;30:1243-54.
43. Watson CJ, Bradley JA. Cold storage of deceased donor kidneys: does the solution matter or is the solution elsewhere? *Am J Transplant* 2012;12:806-7.
44. Li S, Liu B, Guan Q, Chafeeva I, Brooks DE, Nguan CY et al. Cold preservation with hyperbranched polyglycerol-based solution improves kidney functional recovery with less injury at reperfusion in rats. *Am J Transl Res* 2017;9:429-41.
45. Jing L, Yao L, Zhao M, Peng LP, Liu M. Organ preservation: from the past to the future. *Acta Pharmacol Sin* 2018;39:845-57.