



ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Milena Magdalena Kotewicz

Wpływ urolityn na strukturę i funkcje podocytów kłębuszka nerkowego w warunkach cukrzycy

Effect of urolithins on renal glomerular podocytes under conditions of diabetes

PROMOTORZY:

dr hab. n. farm. Barbara Lewko, prof. uczelni
prof. dr hab. Leszek Kalinowski

GDAŃSK, 2023

Pragnę serdecznie podziękować wszystkim, bez których przedłożona praca nie mogłaby powstać, w szczególności:

Mojej promotor Pani prof. Barbarze Lewko za obecność i wsparcie okazane na każdym kroku mojej pracy naukowej, za wyrozumiałość, cierpliwość i zaufanie. Za rolę mentorki, która pokazała mi również jak być dobrym człowiekiem.

Mojemu promotorowi Panu prof. Leszkowi Kalinowskiemu za możliwości rozwoju i zdobywania bezcennego doświadczenia.

*Pracę dedykuję moim Rodzicom.
Mamo i Tato dzięki Wam wszystko jest możliwe.*

SPIS TREŚCI

1.	WYKAZ PRAC NAUKOWYCH	4
2.	INNE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE	5
3.	WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	6
4.	STRESZCZENIE	7
5.	ABSTRACT	9
6.	WPROWADZENIE.....	11
7.	HIPOTEZA I CELE BADAŃ.....	20
8.	MATERIAŁY I ZASTOSOWANE METODY BADAWCZE	21
8.1.	Materiały i metody ujęte w publikacji.....	21
8.2.	Materiały i metody nieujęte w publikacji.....	23
8.3.	Analiza statystyczna	24
9.	WYNIKI	25
9.1.	Publikacja 1	25
9.2.	Publikacja 2	26
9.3.	Oddziaływanie urolityny A na podocyty poprzez modulowanie aktywności TGFβ.....	34
9.3.1.	<i>Ekspresja nefryny i podocyny.....</i>	34
9.3.2.	<i>Zdolność podocytów do migracji</i>	37
9.3.3.	<i>Wpływ urolityny A na ekspresję integryny-β3</i>	40
9.3.4.	<i>Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna komórek podocytarnych</i>	42
9.3.5.	<i>Wpływ urolityny A na ekspresję receptora typu I i II dla TGFβ.....</i>	44
9.3.6.	<i>Wpływ urolityny A na zależną od TGFβ aktywację białek SMAD.....</i>	48
10.	PODSUMOWANIE	51
11.	PIŚMIENNICTWO	52
	PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	61

1. WYKAZ PRAC NAUKOWYCH

1. DOI: 10.31373/ejtcn/137918

KOTEWICZ MILENA, LEWKO BARBARA. *Urolithins and their possible implications for diabetic kidney*. Eur. J. Transl. Clin. Med.; 2022: vol. 5, nr 1, s. 53-63.

Charakt. Merytoryczna: praca poglądowa/przeładowa

Punktacja MEiN: 40.000

2. DOI: 10.3390/cells11162471

KOTEWICZ MILENA, KRAUZE-BARANOWSKA MIROSLAWA, DACA AGNIESZKA, PŁOSKA AGATA, GODLEWSKA SYLWIA, KALINOWSKI LESZEK, LEWKO BARBARA. *Urolithins modulate the viability, autophagy, apoptosis, and nephrin turnover in podocytes exposed to high glucose*. Cells; 2022: vol. 11, nr 16, s. 1-24.

Charakterystyka merytoryczna: praca oryginalna

Impact Factor: 7.666

Punktacja MEiN: 140.000

Łączna wartość wskaźnika oddziaływania (IF): **7.666**

Łączna punktacja MEiN: **180.000**

Badania wykonano dzięki finansowaniu z:

- projektu NCBiR POWR.03.05.00-00-z082/18 współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020;
- grantów Narodowego Centrum Nauki OPUS 2015/19/B/NZ7/03830 i 2019/33/B/NZ7/02699;
- grantu Ministra Edukacji i Nauki 10/E-389/SPUB/SP/2020.

2. INNE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE

KONFERENCJE NAUKOWE: prezentacje ustne

- **15th World Congress on Polyphenols Applications, Valencia, Spain, September 28-30, 2022**
KOTEWICZ MILENA, DACA AGNIESZKA, PŁOSKA AGATA, KALINOWSKI LESZEK, LEWKO BARBARA.
Effect of urolithin A on apoptosis and autophagy in podocytes cultured in high glucose.
- **13th International Podocyte Conference, Manchester, United Kingdom, July 27-31, 2021**
KOTEWICZ MILENA, LEWKO BARBARA, DACA AGNIESZKA, KRAUZE-BARANOWSKA MIROSŁAWA, KALINOWSKI LESZEK.
Urolithin A is a potent regulator of podocyte functions.

KONFERENCJE NAUKOWE: postery

- **13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie: "Kongress für Nephrologie 2021", Rostock, Niemcy, 23.-26. September 2021**
KOTEWICZ MILENA, LEWKO BARBARA, GODLEWSKA SYLWIA, KRAUZE-BARANOWSKA MIROSŁAWA, KALINOWSKI LESZEK.
In vitro metabolism and effects of Urolithin A in cultured mouse podocytes.
- **13th World Congress on Polyphenols Applications: Malta Polyphenols 2019, Valletta, Malta, September 30 - October 1, 2019**
KOTEWICZ MILENA, LEWKO BARBARA, KRAUZE-BARANOWSKA MIROSŁAWA, GOBIS KATARZYNA.
Urolithin A modulates nephrin expression and viability of cultured mouse podocytes.

3. WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

$\Delta\Delta Ct$	<i>ang. $\Delta\Delta$ comparative threshold (Ct) method</i> ; metoda porównawcza cyklu progowego
BSA	<i>ang. bovine serum albumin</i> , surowicza albumina bydłęca
EMT	<i>ang. epithelial to mesenchymal transition</i> ; przemiana nabłonkowo – mezenchymalna
GFB	<i>ang. glomerular filtration barrier</i> ; kłębuszkowa bariera filtracyjna
GBM	<i>ang. glomerular basement membrane</i> ; błona podstawna kłębuszka
HG	<i>ang. high glucose</i> ; pożywka o wysokim stężeniu glukozy [25 mM]
MFI	<i>ang. mean fluorescence intensity</i> ; średnia intensywność fluorescencji
MTT	bromek 3-(4,5-dimetyltiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy
NG	<i>ang. normal glucose</i> ; pożywka o normalnym stężeniu glukozy [5,5mM]
ROS	<i>ang. reactive oxygen species</i> ; reaktywne formy tlenu
SD	<i>ang. slit diaphragm</i> ; błona szczelinowa
qPCR	<i>ang. quantitative polymerase chain reaction</i> ; reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym
T β RI	receptor dla transformującego czynnika wzrostu typu I
T β RII	receptor dla transformującego czynnika wzrostu typu II
TGF- β 1	<i>ang. transforming growth factor beta 1</i> ; transformujący czynnik wzrostu beta 1
TGFBR1	<i>ang. transforming growth factor beta receptor I gene</i> ; gen receptora dla transformującego czynnika wzrostu typu I
TGFBR2	<i>ang. transforming growth factor beta receptor II gene</i> ; gen receptora dla transformującego czynnika wzrostu typu II
UA	Urolityna A
UB	Urolityna B

4. STRESZCZENIE

Nefropatia cukrzycowa uznawana jest za jedno z najczęstszych i najpoważniejszych powikłań cukrzycy. Przewlekła hiperglikemia stanowi czynnik inicjujący nieodwracalne transformacje w obrębie kłębuszkowej bariery filtracyjnej (GFB), prowadząc między innymi do utraty komórek podocytarnych. Podocyty są terminalnie zróżnicowanymi komórkami, współtworzącymi w nerkach wyspecjalizowany filtr dla krążących składników krwi. Wytwarzana przez te komórki błona szczelinowa decyduje o zdolności filtra do selektywnego przesączania. Podocyty jako jedyne komórki w nerce nie mają zdolności do proliferacji, więc ich utrata jest nieodwracalna i zapoczątkowuje rozwój nefropatii. Opracowanie leczenia skutecznie hamującego podocytopatię staje się więc priorytetem, szczególnie wobec wciąż rosnącej liczby chorych na cukrzycę. Urolityny są naturalnymi polifenolowymi metabolitami spożywanych elagotanin. Z uwagi na antyoksydacyjne i przeciwzapalne właściwości oraz niską toksyczność, wydają się być szczególnie interesujące jako potencjalne czynniki przeciwdziałające groźnym powikłaniom przewlekłej hiperglikemii. Ponadto krążąc we krwi i ulegając filtracji mają bezpośredni kontakt z tkanką nerkową. Jednakże nieliczne opublikowane jak dotąd badania nie objęły wpływu urolityn na podocyty.

Uwzględniając duży potencjał terapeutyczny urolityn wysunięto przypuszczenie, że pośrednio lub bezpośrednio działając na podocyty, mogłyby w warunkach cukrzycy chronić te komórki przed uszkodzeniem. Dlatego celem moich badań było określenie wpływu urolityn na strukturę i funkcje podocytów w warunkach imitujących cukrzycę *in vitro*. Badania były prowadzone na unieśmiertnionej linii podocytów mysich, hodowanych w środowisku o normalnym (NG) i wysokim (HG) stężeniu glukozy, z dodatkiem urolityn i/lub transformującego czynnika wzrostu TGF- β 1. Spośród przetestowanych czterech form urolityn: urolityny A (UA), urolityny B (UB) oraz ich metylowych pochodnych, wytypowano UA jako najmniej toksyczną i mającą największy potencjał antyoksydacyjny w badanych komórkach.

Badania dowiodły, że podocyty mają zdolność metabolizowania tego związku, przede wszystkim przez glukuronidację. Co ciekawe, przemiany wolnego aglikonu zachodziły wolniej w podocytach hodowanych w HG. Oznacza to, że ta bardziej aktywna biologicznie forma dłużej pozostawała w środowisku zawierającym wysokie stężenie glukozy, być może chroniąc komórki przed niekorzystnym działaniem tego środowiska. Urolityna zwiększała żywotność podocytów w warunkach odpowiadających hiperglikemii poprzez hamowanie apoptozy,

redukcję stresu oksydacyjnego i pobudzenie procesu autofagii. Ciekawym spostrzeżeniem było też, że UA moduluje endocytozę znajdującą się w błonie komórkowej nefryny i reguluje jej obrót metaboliczny. Jednocześnie, w obecności wysokiego stężenia glukozy, a także TGF- β 1, które obniżały ekspresję głównych białek błony szczelinowej: nefryny i podocyny, UA hamowała te zmiany. To wskazuje, że UA pozwala zachować prawidłowy skład molekularny błon szczelinowych, co może przyczynić się do utrzymania ich integralności i zapobiegać rozwojowi białkomoczu *in vivo*. Mechanizmy prowadzące do białkomoczu obejmują też zmianę fenotypu migracyjnego podocytów. Wykazano, że zarówno glukoza o wysokim stężeniu, jak i TGF- β 1, stymulują migrację tych komórek, co było silnie hamowane przez urolitynę A. Kolejne badania wykazały, że efekt UA wiązał się z jej zdolnością do obniżania ekspresji integryny- β 3, która pośredniczy w nasileniu procesów migracyjnych. Zwiększona mobilność podocytów była związana z indukowaną przez glukozę i TGF- β 1 przemianą nabłonkowo- mezenchymalną (EMT) podocytów, na co wskazywała też podwyższona ekspresja fibronektyny. Również w tym przypadku UA działała przeciwnie, co może wskazywać, że EMT była przez nią hamowana. Badając mechanizmy, za pomocą których UA może oddziaływać na efekty zależne od TGF- β 1, wykazano, że urolityna A obniża ekspresję receptorów TGF β , a także hamuje aktywność szlaku sygnalizacyjnego zależnego od białek SMAD.

Opisane w niniejszej rozprawie właściwości urolityny A, w szczególności w warunkach odpowiadających hiperglikemii, wskazują, że urolityna A powinna być brana pod uwagę jako potencjalny lek chroniący nerki w podocytopatii cukrzycowej.

Słowa kluczowe: urolityny, podocyty, cukrzyca, nefropatia.

5. ABSTRACT

The nephropathy associated with diabetes is known to be the leading cause of end-stage renal disease worldwide. Chronic hyperglycemia stimulates irreversible alterations within glomerular filtration barrier (GFB), especially in podocytes. Podocytes are terminally differentiated cells covering the outer surface of glomerular capillaries in the kidney. Selectivity of filtration of peripheral blood depends on the integrity of slit diaphragms, structures between podocytes foot processes. Podocytes are the only cells in the kidney that do not have the ability to proliferate, so their loss is irreversible and initiates the development of nephropathy. Research on the mechanism of podocytopathy can contribute to the development of new treatment strategies against injury of these cells, which given the high, and ever-increasing number of diabetic patients is of utmost importance. Urolithins are natural polyphenolic metabolites generated by gut microbiota upon dietary intake of plant-derived ellagitannins. Due to their antioxidative and anti-inflammatory properties as well as low toxicity, they seem to be particularly interesting as potential factors against dangerous complications of chronic hyperglycemia. Furthermore, after absorption and internal metabolism they are circulating in the bloodstream and undergo glomerular filtration directly contacting the kidney tissue. However, the data regarding the effects of urolithins may have on the renal tissue is still scarce.

Considering the high therapeutic potential of urolithins, we assumed that they could directly or indirectly exhibit beneficial effects in the kidney, especially by protecting podocytes from impairment and loss of these cells. Therefore, the aim of my research was to investigate the effect of urolithins on renal glomerular podocytes under conditions of diabetes. The study was carried out using immortalized mouse podocyte cell line, cultured in the media containing normal glucose (NG) and high glucose (HG) concentrations. Additionally, urolithins and/or transforming growth factor TGF- β 1 were added. From four tested forms of urolithins: urolithin A (UA), urolithin B (UB) and their methyl derivatives, UA was selected as the least toxic and with the highest antioxidant potential in the studied cells.

Obtained results indicated that podocytes have the ability to metabolize this compound, mainly by glucuronidation. Interestingly, conversion to conjugates was slower in podocytes cultured in HG. This means that the form with much higher activity remained longer in the environment containing high concentrations of glucose, possibly protecting podocytes from the adverse effects of this environment. Urolithin A improved the viability of podocytes exposed to high glucose, by decreasing the rate of apoptosis, reducing an oxidative stress and stimulating

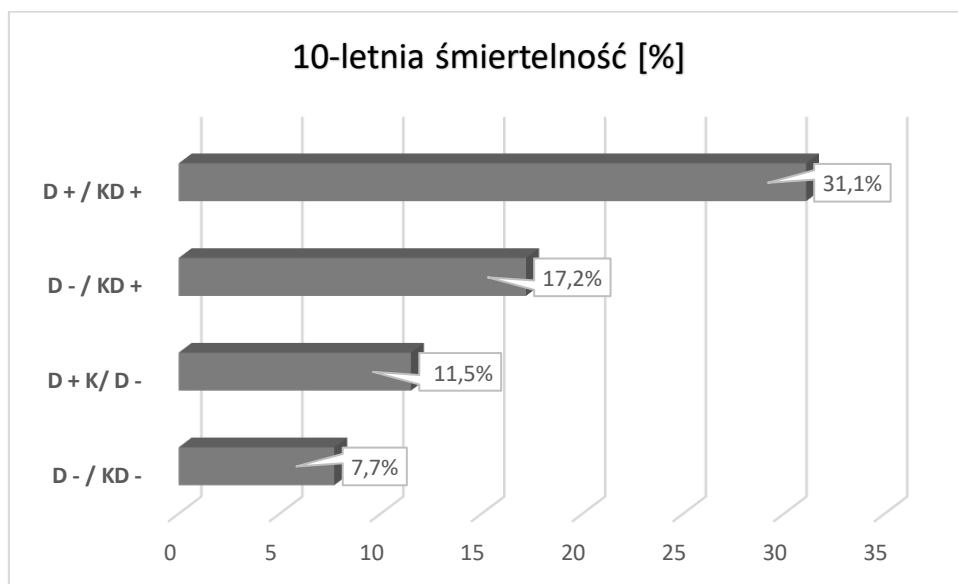
the autophagic flux. Simultaneously, by modulating endocytosis of nephrin, protein in the cell membrane, UA regulates its turnover. At the same time, in the presence of high concentrations of glucose and TGF- β 1, which reduced the expression of the main proteins of the slit membrane: nephrin and podocin, UA inhibited these changes. The appropriate molecular composition of the slit diaphragm mediated by UA may contribute to maintaining its integrity and prevent proteinuria *in vivo*. Mechanisms leading to proteinuria also include a change in the podocyte's motility. Both high glucose and TGF- β 1 have stimulated the migration of these cells, which was strongly inhibited by urolithin A. Next experiments showed that the effect of UA was related to its ability to downregulate the expression of integrin- β 3, the protein that mediates migration process. Increased podocyte motility was associated with high glucose and TGF- β 1-induced podocyte epithelial-mesenchymal transition (EMT), as also indicated by increased expression of fibronectin. In this case, UA also acted in the opposite way, decreasing the fibronectin expression and block EMT. In experiments focusing on mechanisms by which UA may affect TGF- β 1-dependent pathway, we found that urolithin A downregulates the expression of TGF β receptors and also inhibits the activity of the SMAD protein-dependent signalling pathway.

The properties of urolithin A described in this dissertation, in particular in high glucose conditions, indicate that urolithin A should be considered as a potential therapeutic candidate protecting the kidneys in diabetic podocytopathy.

Keywords: urolithins, podocytes, diabetes, nephropathy

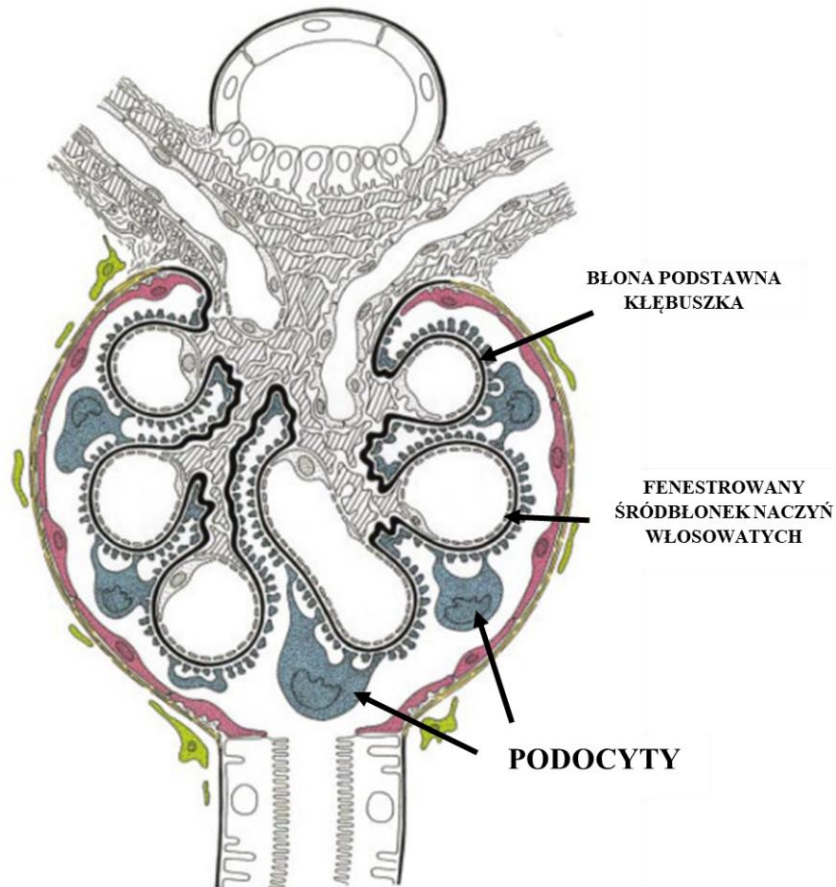
6. WPROWADZENIE

Zachorowalność na cukrzycę na świecie z roku na rok wzrasta. Obecnie szacuje się, że sięga ona już 10,5 % populacji, głównie ze względu na wzrost wskaźnika otyłości oraz zachorowań na cukrzycę typu 2. Nefropatia cukrzycowa pozostaje jednym z najczęstszych i najpoważniejszych powikłań obu typów cukrzycy, często doprowadzająca do schyłkowej niewydolności nerek oraz śmierci osób chorych [1,2].



Ryc. 1 10-letnia skumulowana śmiertelność, standaryzowana do wieku, populacji, płci i rasy. **D** (*Diabetes*): pacjenci z cukrzycą; **KD** (*Kidney disease*): pacjenci z chorobami nerek. Opracowano na podstawie [3].

Filtracja osocza w kłębuszkach nerkowych jest podstawowym procesem umożliwiającym utrzymanie homeostazy organizmu człowieka. Dzięki sprawnie działającym kłębuszkom nerkowym, selektywnie usuwany jest z ustroju nadmiar wody oraz toksyczne metabolity, przy jednoczesnym zatrzymywaniu we krwi niezbędnych do życia białek. Proces ten jest uzależniony od prawidłowej struktury oraz funkcjonowania kłębuszkowej bariery filtracyjnej (GFB), która jest wyspecjalizowanym i selektywnym filtrem dla krążących składników krwi [4,5]. Bariere filtracyjną tworzy błona podstawna naczyń włosowatych, która od strony światła naczyń jest wyścielona fenestrowanymi komórkami śródbłonna, a z zewnątrz pokryta jest komórkami podocytarnymi.

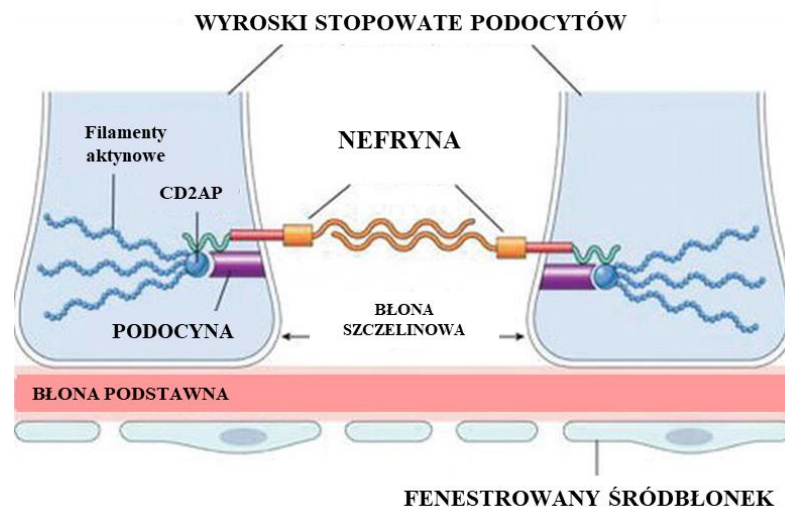


Ryc. 2 Budowa kłębuszkowej bariery filtracyjnej [6]

Podocyty to nietypowe, wysoce zróżnicowane komórki pochodzenia nabłonkowego. Duże, unoszące się swobodnie nad powierzchnią naczyń ciało komórki daje początek wypustkom głównym, które następnie rozgałęziają się, tworząc wyrostki stopowate, szczelnie obejmujące powierzchnię włóściczek i mocno w niej zakotwiczone. Jedynie ten element podocytów zawiera silnie rozbudowany aparat kurczliwy, składający się przede wszystkim z włókien aktyny. Wyrostki tworzą skomplikowaną strukturę przestrzenną, zazębiając się z wyrostkami sąsiedniej komórki i wchodzą z nimi w interakcje. Każda włóściczka pokryta jest przez kilka podocytów, a jednocześnie każdy podocyt oplata więcej niż jedną włóściczkę [7]. Pomiędzy wyrostkami rozpościera się błona szczelinowa, tworząca szczelną barierę, o właściwościach sita molekularnego, przepuszczając cząsteczki o średnicy do około 14 nm [8]. Funkcjonalnie błona szczelinowa jest tym elementem GFB, który ostatecznie decyduje o końcowym składzie ultrafiltratu. Jednocześnie jest ona przekaźnikiem sygnałów pomiędzy sąsiadującymi podocytami. Na przestrzeni ostatnich lat zidentyfikowano wiele jej składników, które charakteryzują się nie tylko wzajemnymi interakcjami, ale także komunikacją z białkami

wewnątrz komórek podocytarnych. Nadrzędną rolę w budowie i wzmacnianiu struktury błony przypisuje się obecnie białkom: nefrynie oraz podocynie [9].

Nefryna uznawana jest za podstawowe białko strukturalne błony szczelinowej, które poprzez swoje przezbłonowe domeny pośredniczy w przenoszeniu sygnałów do wnętrza komórek podocytarnych. Zmiany ufosforylowania reszt tyrozynowych nefryny pobudzają kaskady sygnalizacyjne regulujące kształt wypustek podocytów, ich adhezję, żywotność komórek, a także ekspresję białek syntezowanych przez podocyty [10]. Zaburzenia struktury i funkcji podocytów bardzo często związane są ze zmianą ekspresji tego białka [11,12]. Badania na ludzkich nerkach płodowych wykazały, iż brak nefryny uniemożliwia rozwój błon szczelinowych, nawet pomimo prawidłowej ekspresji innych białek wchodzących w ich skład [13]. W 1998 roku brak ekspresji nefryny, wywołany mutacjami w kodującym ją genie *NPHS1*, został po raz pierwszy zidentyfikowany jako przyczyna występowania wrodzonego zespołu nerczycowego typu fińskiego [14,15]. Mutacje pojedynczego genu w tej jednostce chorobowej są odpowiedzialne za nieprawidłowości w funkcjonowaniu lub za całkowity brak błon szczelinowych i w konsekwencji za masywny białkomocz [16,17]. Kluczowe znaczenie nefryny w procesie selektywnej filtracji potwierdzono też w badaniach na myszach, pozbawionych genu *NPHS1*. W przeciwieństwie do zwierząt z nieprawidłową ekspresją składników błony podstawnej kłębuszka, u myszy pozbawionych nefryny obserwowano szczególnie wysokie wydalanie białka z moczem [18]. Usytuowanie nefryny w błonie szczelinowej jest uzależnione od jej interakcji z podocyną, zlokalizowaną w raftach lipidowych błony komórkowej wyrostków stopowatych. Mutacje genu *NPHS2* kodującego podocynę stanowią najczęstsze podłoże steroidoopornego zespołu nerczycowego [19–21].



Ryc. 3 Wybrane molekularne składniki błony szczelinowej. Opracowano na podstawie [22].

Prawidłowa ekspresja nefryny i współdziałającej z nią podocyny jest więc niezbędna dla utrzymania integralności błony szczelinowej oraz struktury i funkcji podocytów, a w konsekwencji - dla selektywności filtracji.

Funkcjonowanie podocytów regulowane jest nie tylko poprzez sygnały przekazywane za pośrednictwem białek błony szczelinowej, ale też przez informacje docierające z kłębuszkowej błony podstawnej (GBM). Podocyty są zakotwiczone w GBM za pomocą kompleksów białkowych, łączących składniki błony podstawnej z wewnątrzkomórkowymi białkami wypustek stopowatych. Interakcje pomiędzy podocytami i błoną podstawną zachodzą przede wszystkim za pośrednictwem integryn, stanowiących rodzinę przebłonowych heterodimerycznych białek składających się z podjednostek α i β [23,24]. Integryny pośredniczą w przekazywaniu chemicznych i mechanicznych sygnałów pomiędzy macierzą pozakomórkową a komórkami i regulują różnorodne procesy biologiczne, jak różnicowanie czy polaryzację. Obecne w wyrostkach głównych mikrotubule oraz aktyna w wyrostkach stopowatych koordynują nie tylko kształt komórek, ale też migrację podocytów. Integryny uczestniczą w tym procesie jako białka regulujące adhezję komórek, a jednocześnie jako przekaźniki sygnałów modulujących strukturę filamentów aktynowych i kształt wypustek [25–27]. Umiarkowana zdolność podocytów do migracji jest interpretowana jako zjawisko przeciwdziałające uszkodzeniu błony szczelinowej i wzmacniające kontakt z błoną podstawną, natomiast nasilenie tego zjawiska prowadzi do rozszczelnienia bariery filtracyjnej i białkomoczu [28,29]. Spowodowane jest to osłabieniem adhezji komórek do podłoża, co pociąga za sobą deformację (spłaszczenie) wyrostków stopowatych z zanikiem błony szczelinowej oraz większą podatność na odrywanie się komórek od błony podstawnej.

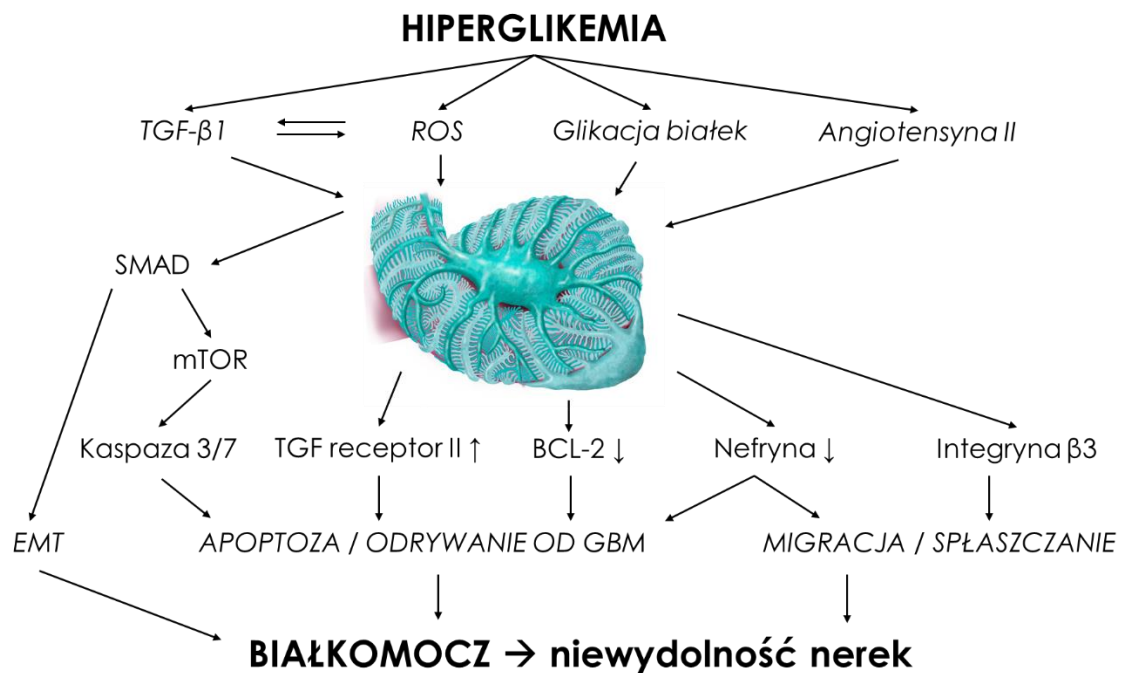
Komórki podocytarne syntezują nie tylko białka błony szczelinowej, ale też składniki błony podstawnej, a także pobudzają rozrost śródbłonka. Ponadto wytwarzając i uwalniając różnego typu proteazy utrzymują obrót metaboliczny bariery filtracyjnej, zachowując tym samym jej integralność [30,31]. Jednocześnie, obejmując elastycznymi wypustkami włóścizki i reagując na zmiany ciśnienia filtracji, fizycznie stabilizują pęczek naczyniowy kłębuszka. W odróżnieniu od pozostałych komórek kłębuszka, podocyty są komórkami postmitotycznymi, co umożliwia zachowanie terminalnie zróżnicowanej struktury, ale z drugiej strony powoduje, że w dojrzałej nerce nie mogą one proliferować [32,33]. Fizjologicznie wysoka ekspresja inhibitorów kinaz zależnych od cyklin, takich jak p27, powoduje, że uszkodzone czy utracone podocyty nie mogą być zastąpione nowymi. Jediną możliwą odpowiedzią pozostałych komórek jest hipertrofia, mająca na celu zachowanie kontaktu między sąsiadującymi

wyrostkami stopowatymi. Zjawisko to występuje m.in. w hiperglikemii, gdzie ekspresja p27 dodatkowo się zwiększa, stymulując komórki do rozrostu [34]. Od chwili narodzin człowieka każdy kłębuszek pokrywa około 500-600 podocytów [35], a utrata każdej komórki jest zjawiskiem nieodwracalnym. Kompensacyjna hipertrofia jest możliwa tylko w ograniczonym zakresie, więc ubytek wielu komórek prowadzi do zniszczenia bariery filtracyjnej, a następnie całego nefronu. Dlatego wśród badaczy panuje zgodność, że kluczową rolę w patogenezie różnego typu chorób nerek pełni uszkodzenie i utrata podocytów, co jest początkiem postępującego rozwoju glomerulopatii [36–39].

Nefropatia cukrzycowa uznawana jest za główną przyczynę postępu choroby i śmierci u osób z cukrzycą. Wiąże się ją także ze zwiększonym odsetkiem incydentów sercowo-naczyniowych [40]. Przewlekła hiperglikemia inicjuje nieodwracalne strukturalno-funkcjonalne zmiany w obrębie GFB, pobudza procesy zwłóknieniowe oraz zapalne. Zaangażowany jest w to szereg różnorodnych czynników takich jak cytokiny, chemokiny, enzymy, hormony, białka regulatorowe i inne. Aktywują się dodatkowe szlaki metaboliczne, których udział w przemianach glukozy w warunkach normoglikemii jest znikomy (szlak poliolowy, szlak heksozaminowy), następuje aktywacja kinazy białkowej C (PKC) oraz zwiększa się nieenzymatyczna glikacja białek i akumulacja zaawansowanych produktów glikacji (AGEs). Dodatkowo, procesom tym towarzyszy stres oksydacyjny związany ze wzrostem wytwarzania rodników tlenowych [41]. Na drodze tych mechanizmów, nadmiar glukozy uszkadza nieodwracalnie nie tylko nerki, ale także inne narządy [42]. U pacjentów z cukrzycą wzrost utraty białka z moczem, od normoalbuminurii aż do jawnego białkomoczu, koreluje w badaniach z upośledzeniem selektywności GFB. Na podstawie biopsji nerek pacjentów udowodniono, że w początkowych etapach rozwoju nefropatii cukrzycowej dochodzi do drastycznego obniżenia liczby podocytów w kłębuszkach, czemu towarzyszy nasilanie się białkomoczu [36,43] oraz do wzrostu wydalania tych komórek z moczem [38]. Zwiększona synteza czynników wzrostu i aktywacja stanu zapalnego wywołują stres oksydacyjny oraz modyfikują szlaki metaboliczne w podocytach promując w nich szlaki apoptotyczne [44]. Utrata części komórek wymusza zmiany fenotypu pozostałych, co skutkuje nie tylko hipertrofią, ale też zwiększoną zdolnością do migracji, czemu towarzyszy reorganizacja szkieletu aktynowego i spłaszczanie wyrostków stopowatych [45]. Prowadzi to do przebudowy, a również do zniszczenia błon szczelinowych, co wiąże się ze zwiększoną przepuszczalnością dla filtrowanych białek. Hiperglikemia bezpośrednio powoduje też zmiany ekspresji białek błony szczelinowej. W badaniach *in vitro*, na modelach zwierzęcych, a także

u pacjentów z nefropatią cukrzycową, wykazano zmniejszoną ekspresję białka oraz mRNA nefryny i podocyny [46,47], co powoduje utratę przez GFB zdolności filtracyjnych, i w konsekwencji objawia się narastającą proteinurią.

Szlaki sygnalizacyjne związane z transformującym czynnikiem wzrostu TGF β są kluczowym elementem pośredniczącym w zmianach zachodzących w kłębuszkach nerkowych w trakcie wielu chorób przewlekłych, do których należy też cukrzyca [48,49]. Jednym z czynników determinujących uszkodzenie nerek w hiperglikemii jest nasilona lokalna synteza TGF β w komórkach kłębuszka, w tym również w podocytach oraz wzrost ekspresji swoistego dla tej cytokiny receptora [7,50]. Zidentyfikowano u ssaków trzy izoformy: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 [51]. TGF- β 1 indukuje apoptozę za pośrednictwem wewnątrzkomórkowych białek z rodziny SMAD [52], pobudza migrację komórek podocytarnych, ale również inicjuje proces przemiany nabłonkowo – mezenchymalnej (EMT). Wszystko to przyczynia się do zaburzeń funkcji całych nefronów i progresji nefropatii cukrzycowej [53,54].



Ryc. 4 Molekularne mechanizmy zmian w obrębie podocytów, zależne od hiperglikemii. Opracowano na podstawie [55]. **ROS** (*reactive oxygen species*): reaktywne formy tlenu; **EMT** (*epithelial to mesenchymal transition*): przemiana nabłonkowo-mezenchymalna); **GBM** (*glomerular basement membrane*): błona podstawna kłębuszka.

Ze względu na unikatowy charakter komórek podocytarnych, badania nad mechanizmami prowadzącymi do ich uszkodzeń, są szczególnie istotne, gdyż uzyskane wyniki stają się podstawą do opracowywania nowoczesnych terapii, mogących hamować postęp choroby nerek. W świetle rozwijającej się wciąż na całym świecie pandemii cukrzycy i związanej z nią nefropatii, ochrona podocytów przed uszkodzeniem i apoptozą staje się priorytetem [56–59]. Rozpoznane patomechanizmy podocytopatii dają podstawę do testowania kolejnych związków mogących zatrzymać, a nawet odwrócić niekorzystne zmiany w komórkach. Polifenole naturalnego pochodzenia, z uwagi na szerokie spektrum działania biologicznego i terapeutycznego, wydają się być szczególnie interesujące jako potencjalne czynniki przeciwdziałające negatywnym skutkom hiperglikemii.

Do takich związków należą urolityny, metabolity elagotanin i kwasu elagowego, powstające w przewodzie pokarmowym po spożyciu pokarmów takich jak granaty, maliny czy orzechy. Przy udziale rezydującej w dystalnej części jelit flory bakteryjnej, syntezowane są urolityny: A (UA), B (UB), C (UC) oraz D (UD) [60]. Elagotaniny i kwas elagowy, które dopiero po konwersji do urolityn mogą być łatwo wchłaniane w jelitach, podczas absorpcji w enterocytach i w czasie krążenia wątrobowego ulegają metabolizmowi I i II fazy tworząc glukuronidy, siarczany lub pochodne metylowe. Niewielka ilość urolityn wykrywana jest również w formie niezwiązanej [61,62]. Mimo iż skoniugowane formy występują w wyższych stężeniach, wolne aglikony wykazują znacznie wyższą aktywność biologiczną [63]. Synteza konkretnych form urolityn zależy bezpośrednio od składu mikroflory bakteryjnej jelit, która jest zmienna osobniczo. Jak dotąd opisano w populacji trzy metabotypy: metabotyp A (producenci UA oraz koniugatów UA), metabotyp B (producenci UB, UA i izo-UA), metabotyp 0 (niewytwarzający urolityn). U ludzi metabotyp A wydaje się być dominujący [64].

Urolityny oraz ich koniugaty, krążąc we krwi, docierają do wielu tkanek, gdzie przenikając przez błony komórkowe mogą indukować zróżnicowane efekty biologiczne [65]. Wyniki badań, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, w oparciu o stężenia możliwe naturalnie do osiągnięcia po absorpcji w przewodzie pokarmowym (2-10 μ M dla aglikonów, do 100 μ M dla koniugatów [66]), opisują wielokierunkowe działanie urolityn, takie jak modulację ekspresji genów czy też zmiany aktywności enzymów i cząsteczek sygnałowych [60]. Jednym z pierwszych szeroko zbadanych i opisanych efektów urolityn jest ich działanie antyoksydacyjne [67,68]. Wykazują one również silną aktywność przeciwzapalną, hamując m.in. produkcję prostaglandy-E2 (PGE2), inhibitora plazminogenu PAI-1 oraz interleukiny

IL-8, uczestniczących między innymi w regulacji migracji oraz w procesie adhezji. Poza zdolnością do hamowania cyklooksygenazy COX-2 oraz do blokowania czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, białek c-Jun, p38, a także szlaków MAPK [69–71], z wykorzystaniem linii komórkowej gruczolaka okrężnicy (*Caco-2*) udowodniono przeciwnowotworowe i antyproliferacyjne działanie urolityn. Obejmuje ono blokadę cyklu komórkowego poprzez zmiany ekspresji genów regulatorowych CCNB1 i CCNB1IP1, hamowanie onkogenów K-ras i c-Myc, a także modyfikacje receptorów dla czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR2) oraz receptorów dla nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR) [72]. Opisano również wpływ urolityn na hamowanie szlaku Wnt [73] i regulację apoptozy [74]. W raku prostaty urolityny hamują aktywność CYP1B1, białka obniżającego odpowiedź na chemioterapię. Co więcej, urolityny wykazują działanie przeciwnowotworowe poprzez blokowanie enzymu CK2 czy też topoizomerazy II, głównego białka replikacji [75,76]. Efekty wywierane przez urolityny obejmują również działanie antybakteryjne, blokując Quorum Sensing (QS) - bakteryjny mechanizm komunikacyjny, przez co zmniejszają masę biofilmu *Yersinia enterocolitica* [77]. Opisuje się je również jako modulatory estrogenowe, czyli związki o charakterze endokrynnym [78], antyglukacyjnym i neuroprotektynym [68].

Zarówno sprzężone jak i niesprężone formy urolityn wykryto w ludzkim osoczu oraz moczu nawet 48 godzin po spożyciu pokarmów bogatych w kwas elagowy. Wiadomo zatem, że urolityny bezpośrednio mają kontakt z tkanką nerkową podczas przepływu filtratu przez nefron [66]. Kilka badań *in vitro* i *in vivo* wykazało korzystne działanie urolityn w wywołanych hiperglikemią uszkodzeniach komórek i narządów, obejmując również ich korzystne działanie w cukrzycowych i niecukrzycowych chorobach nerek [79,80]. Niemniej jednak, choć wydaje się oczywiste, że podczas przesączania kłębuszkowego krew bogata w urolityny bezpośrednio kontaktuje się z wszystkimi elementami bariery filtracyjnej, nieliczne opublikowane badania przeprowadzone na komórkach nerkowych jak dotąd nie objęły podocytów.

Zachęcające wyniki obserwacji *in vitro* i *in vivo*, łącznie z badaniami klinicznymi sprawiły, że w ostatnich latach urolityny są wskazywane jako związki mające duży potencjał terapeutyczny, szczególnie w przypadku nowotworów, ale też innych schorzeń, a także w procesie starzenia [81–83]. Rosnące zainteresowanie farmakologicznymi właściwościami tych związków wiąże się też z potwierdzonym już bezpieczeństwem stosowania urolityn, a przede wszystkim urolityny A, podawanych pacjentom zarówno w postaci naturalnej, jak i w formie syntetycznych suplementów diety [84,85]. Biorąc pod uwagę możliwe

wykorzystanie urolityn w celu poprawy funkcji podocytów przeprowadziliśmy jako pierwsi rozległe badania, podczas których mysie podocyty poddano ekspozycji na urolitynę A oraz urolitynę B w warunkach normalnego (NG) oraz wysokiego stężenia glukozy (HG).

7. HIPOTEZA I CELE BADAŃ

HIPOTEZA:

Uwzględniając antyoksydacyjne i przeciwzapalne właściwości urolityn wysunęliśmy hipotezę, że mogą one działać korzystnie w przebiegu chorób nerek, włącznie z nefropatią cukrzycową. Wydaje się, że urolityny, działając na podocyty pośrednio lub bezpośrednio, mogłyby w warunkach cukrzycy chronić komórki przed uszkodzeniem, co mogłoby zapobiegać lub spowolnić rozwój nieodwracalnych zmian. Ponadto, zaobserwowane w innych komórkach różnorodne efekty biologiczne, obejmujące modulację ekspresji białek i właściwości komórek, stały się inspiracją do sprawdzenia, czy i w jaki sposób związki te mogą wpływać na strukturę i funkcje podocytów w warunkach imitujących cukrzycę *in vitro*.

CEL GŁÓWNY:

Celem pracy było określenie wpływu urolityn na strukturę i funkcje podocytów w warunkach imitujących cukrzycę *in vitro*.

CELE SZCZEGÓŁOWE:

1. Określenie wpływu urolityn na żywotność podocytów i określenie ewentualnych mechanizmów pośredniczących w tym procesie.
2. Ocena wpływu urolityn na zależne od wysokiego stężenia glukozy zmiany funkcji podocytów i wstępne określenie mechanizmów w tym uczestniczących.

8. MATERIAŁY I ZASTOSOWANE METODY BADAWCZE

8.1. Materiały i metody ujęte w publikacji

8.1.1 Urolityny

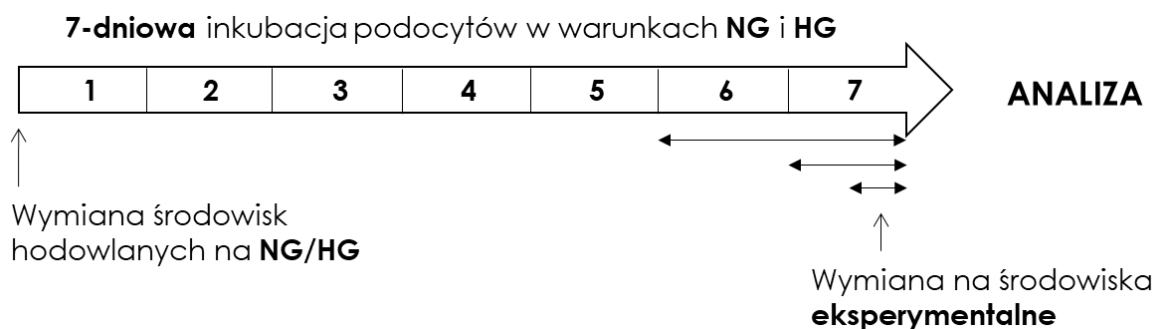
Urolityny stosowane do badań zostały zsyntezowane w Katedrze Chemii Organicznej i przekazane przez Katedrę Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. We wstępnych badaniach żywotności podocytów ocenie poddano 4 formy urolityn: Urolitynę A, 1,8-dimetylo Urolitynę A, Urolitynę B oraz 1-metylo Urolitynę B, o stężeniach: 10 μM , 30 μM , 100 μM , rozpuszczone w dimetylosulfotlenku (DMSO). Roztwory wyjściowe urolityn przechowywano w temperaturze -80°C .

8.1.2. Hodowla komórkowa i inkubacja w środowiskach doświadczalnych

Doświadczenia były przeprowadzone w warunkach *in vitro*, na unieśmiertnionych podocytach mysich linii SVI (Cell Line Services, Eppelheim, Niemcy). Hodowlę komórkową prowadzono zgodnie z poprzednio ustalonym i opublikowanym protokołem [86]. W skrócie, niezróżnicowane komórki były namnażane w temperaturze 33°C , w pożywce z dodatkiem interferonu γ (IFN γ). Po osiągnięciu stanu subkonfluencji hodowlę kontynuowano przez kolejne 7-10 dni w temperaturze 37°C , w pożywce pozbawionej IFN γ . W tym czasie następowało zatrzymanie proliferacji i różnicowanie podocytów.

8.1.3. Schemat procedury eksperymentalnej

Zróżnicowane podocyty były inkubowane przez 7 dni w pożywkach o normalnym (5,5 mM, NG) i wysokim (25 mM, HG) stężeniu glukozy. Wybranym grupom eksperymentalnym dodawano do pożywki testowane związki na ostatnie 12, 24 lub 48 godzin. Po zakończeniu inkubacji komórki były gotowe do przeprowadzenia wybranej analizy [87].



Ryc. 5 Schemat procedury eksperymentalnej. Środowiska eksperymentalne zawierały testowane substancje bądź sam rozpuszczalnik w odpowiednim rozcieńczeniu.

8.1.4. Ocena zmian stężenia urolityn podczas inkubacji z komórkami podocytarnymi

W celu określenia stabilności urolityn w czasie trwania inkubacji z podocytami wykonano analizę stężenia tych związków w pożywce pobranej z komórek w wybranych odstępach czasu. Próbkę ekstrahowano zgodnie z częściowo zmodyfikowaną procedurą zaproponowaną przez Sala i in. [87,88] zaś oceny dokonano z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrem mas (HPLC-DAD-MS/MS) [87].

8.1.5. Ocena żywotności podocytów

Żywotność podocytów została określona za pomocą testu MTT, przy użyciu czytnika SPECTROstar Nano i analizowana za pomocą oprogramowania SPECTROstar NanoMars [87].

8.1.6. Ocena zmian morfologicznych oraz reorganizacji cytoszkieletu aktywnego komórek podocytarnych

Zmiany morfologiczne podocytów oceniano z wykorzystaniem mikroskopii optycznej na komórkach barwionych fioletem krystalicznym. Do oceny struktury cytoszkieletu aktywnego komórek zastosowano barwienie falloidyną sprzęgniętą z fluorochromem Alexa Fluor 488, po czym analizowano komórki przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego firmy Zeiss oraz mikroskopu konfokalnego Perkin Elmer Opera Phenix® HCS [87].

8.1.7. Ocena apoptozy, poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) i aktywności kaspaz 3/7

Stopień apoptozy podocytów w warunkach doświadczalnych oceniono za pomocą zestawu Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit, wykorzystującego zdolność aneksyny V do wiązania się z fosfatydyloseryną, będącą markerem apoptozy.

Stężenie reaktywnych form tlenu określono za pomocą zestawu CellROX™ Green Flow Cytometry Assay Kit, w którym bezbarwny reagent przenika przez błony żywych komórek, a pod wpływem utlenienia przez ROS emituje fluorescencję.

Aktywność kaspaz: 3 i 7, oceniono za pomocą zestawu CellEvent Caspase- 3/7 Green Detection Reagent with SYTOX™AADvanced™ Dead Cell Stain. Wszystkie procedury przeprowadzono zgodnie z postępowaniem opisanym przez producenta, po czym próbki analizowano przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSVerser™ Flow Cytometer oraz oprogramowania FlowJo™ Software v10.8.0.

8.1.8. Ilościowa ocena ekspresji białek

Ekspresja nefryny na powierzchni podocytów została określona przy użyciu cytometru przepływowego, z wykorzystaniem przeciwciała skierowanego przeciw zewnątrzkomórkowemu epitopowi białka. Do oceny całkowitej ekspresji badanych białek zastosowano technikę Western blot, z użyciem przeciwciał mono- oraz poliklonalnych. Do zobrazowania lokalizacji badanych białek, połączonej z ich ilościową oceną, zastosowano barwienie immunofluorescencyjne za pomocą przeciwciał mono- oraz poliklonalnych oraz wykorzystano mikroskop konfokalny wraz z oprogramowaniem Harmony High-Content Imaging and Analysis Software 4.8 [87].

8.1.9. Ocena zmian ekspresji mRNA wybranych białek

Zmiany ekspresji mRNA wybranych białek podocytarnych zostały określone za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) z wykorzystaniem zestawów TaqMan RNA-to-CT™ 1-step KIT. Materiał genetyczny wyizolowano przy użyciu zestawu PureLink™ RNA Mini Kit. Względne poziomy ekspresji mRNA docelowego genu zostały znormalizowane względem genu β -aktyny i za pomocą porównawczej metody Ct ($\Delta\Delta Ct$) [87].

8.2. Materiały i metody nieujęte w publikacji

8.2.1. Ocena wpływu urolityn na aktywność transformującego czynnika wzrostu TGF- β 1 w podocytach

W badaniach wykorzystano cytokinę TGF- β 1 firmy R&D systems (USA). Liofilizat rozpuszczono w 100 μ l jałowego 4 mM HCl / BSA, otrzymując roztwór TGF- β 1 o stężeniu 50 000 ng/ml, który rozporcjowany przechowywano w -80°C . Podczas przygotowywania środowisk doświadczalnych wykonywano roztwór roboczy TGF- β 1 o stężeniu 500 ng/ml, który następnie rozcieńczano 100-krotnie pożywkami hodowlanymi o normalnym i wysokim stężeniu glukozy. Tak przygotowany roztwór cytokiny o stężeniu 5 ng/ml był gotowy do inkubacji z podocytami.

8.2.2. Ocena zdolności podocytów do migracji

W celu określenia zmian zdolności migracyjnych podocytów wykonano test gojenia ran (wound healing assay), w którym obserwowano wędrówkę komórek w kierunku mechanicznie uformowanej wolnej przestrzeni w konfluentnej warstwie pokrywającej dno płytki hodowlanej.

Niezmierzane podocyty hodowano na 12-dołkowych płytkach do czasu osiągnięcia pełnej konfluencji, po czym indukowano proces różnicowania (*Rozdział 8.1.2.*). Procedura eksperymentalna była zgodna z przedstawionym schematem (*Rozdział 8.1.3.*). Wymiana środowisk doświadczalnych była połączona z wykonaniem rysy w konfluentnej warstwie komórek, za pomocą plastikowej końcówki od pipety (0,1 – 10 μ L). Po 48 godzinach inkubacji podocytów w środowiskach doświadczalnych komórki utrwalono za pomocą 2% paraformaldehydu, zabarwiono fioletem krystalicznym i dokonywano oceny mikroskopowej. Komórki kontrolne, reprezentujące stan przed rozpoczęciem migracji (czas 0), były barwione natychmiast po wykonaniu rysy. Następnie z wykorzystaniem programu ImageJ oraz rozszerzenia "Wound healing size tool" oceniono zmiany pola powierzchni zajmowanej przez podocyty [89]. Wyznaczono granice pustej przestrzeni rysy i policzono jej powierzchnię. Wyniki przedstawiono jako stosunek zajętej powierzchni do całkowitej powierzchni obrazu.

8.3. Analiza statystyczna

Wyniki badań porównywano za pomocą testu t-Studenta, jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testu Manna – Whitneya i przedstawiono jako *średnią \pm błąd standardowy średniej (SEM)*. Za istotność statystyczną przyjęto wartość $p < 0,05$. Do analizy oraz prezentacji wyników wykorzystano oprogramowanie SigmaPlot 11 (SYSTAT Software, USA).

9. WYNIKI

W skład mojej rozprawy doktorskiej wchodzi dwie publikacje: praca oryginalna, pełnotekstowa, opublikowana w międzynarodowym czasopiśmie indeksowanym na liście filadelfijskiej oraz praca pogładowa opublikowana w polskim czasopiśmie punktowanym na liście MEiN. Dysertacja zawiera ponadto nieopublikowane wyniki badań, będące przedmiotem przygotowywanej obecnie publikacji. Dotyczą one wpływu urolityn na efekty wywoływane w podocytach przez cytokinę TGF- β 1 oraz analizę podstawowych mechanizmów, na drodze których urolityny mogą modulować te efekty.

9.1. Publikacja 1

Kotewicz Milena, Lewko Barbara. *Urolithins and their possible implications for diabetic kidney.* Eur. J. Transl. Clin. Med.; 2022: vol. 5, nr 1, s. 53-63.

Celem publikacji, będącej pracą pogładową, było przedstawienie wyników badań *in vivo* i *in vitro* opisujących dotychczas poznane efekty biologiczne urolityn w różnego typu tkankach oraz biochemiczne mechanizmy działania tych związków.

W pracy zestawiono informacje ukazujące zdolność urolityn do modulowania wielu komórkowych szlaków sygnalizacyjnych, które odpowiadają za zróżnicowane działanie tych związków, w tym przeciwnowotworowe i antyproliferacyjne, przeciwzapalne i antyoksydacyjne, hamujące migrację, czy też pobudzające autofagię. Opisane dotychczas mechanizmy molekularne, za pośrednictwem których urolityny wywierają swoje końcowe efekty, obejmują wpływ na ekspresję genów kodujących różnego typu białka, w tym białka sygnalizacyjne, białka cyklu komórkowego, onkogeny, czy różnego typu cytokiny i elementy układu odpornościowego. Urolityny regulują też stan ufosforylowania białek, zmieniając w ten sposób ich aktywność, a także hamują powstawanie zaawansowanych produktów glikacji przez wychwytywanie grup karbonylowych.

Uwzględniając powyższe efekty, w publikacji podkreślono korzystny wpływ urolityn w modulowaniu odpowiedzi organizmu na przewlekłą hiperglikemię podczas cukrzycy, kiedy dochodzi do nadprodukcji cytokin prozapalnych, czynników wzrostu i reaktywnych form tlenu

oraz wzrasta poziom glikacji białek. Szczególną uwagę zwrócono przy tym na skutki działania urolityn w nerkach, a zwłaszcza na procesy związane z aktywnością systemów zależnych od TGF β , które odpowiadają za rozwój patologicznych zmian obserwowanych w nefropatii cukrzycowej.

Wśród opublikowanych wyników badań dotyczących wpływu urolityn na różnego typu narządy i tkanki, stosunkowo niewiele odnosi się do nerek, a żadne z nich nie dotyczą komórek podocytarnych, których stan i liczba decyduje o losie całego nefronu. Założeniem tej publikacji było wskazanie, że urolityny, mogąc regulować różnego rodzaju wewnątrzkomórkowe mechanizmy, często korzystne dla komórek, powinny być wzięte pod uwagę jako potencjalne związki chroniące podocyty przed czynnikami uszkadzającymi je w warunkach hiperglikemii.

Możliwość stosowania w przyszłości nefroprotekcijnej terapii w oparciu o urolityny jest tym większa, że doustne stosowanie preparatów zawierających urolitynę A (UA) zostało już zaakceptowane i uznane jako bezpieczne przez Federalny Urząd Żywności i Leków w USA.

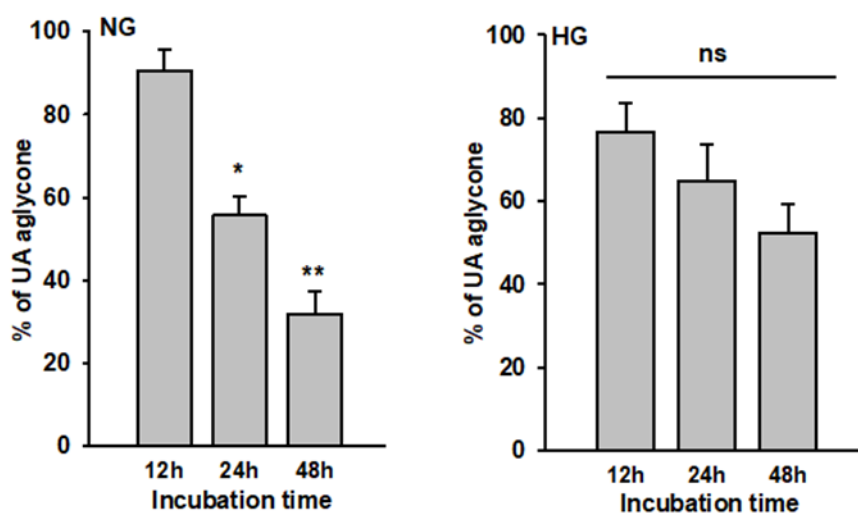
9.2. Publikacja 2

Kotewicz Milena, Krauze-Baranowska Mirosława, Daca Agnieszka, Płoska Agata, Godlewska Sylwia, Kalinowski Leszek, Lewko Barbara. *Urolithins modulate the viability, autophagy, apoptosis, and nephrin turnover in podocytes exposed to high glucose*. *Cells*; 2022: vol. 11, nr 16, art. ID 2471, s. 1-24.

Publikacja 2 jest pracą oryginalną, w której opisano efekty wywierane przez urolityny na procesy determinujące przeżywalność i podstawowe cechy podocytów w warunkach odpowiadających hiperglikemii.

Przemiany metaboliczne urolityn w tkankach prowadzą do powstawania koniugatów, których aktywność biologiczna jest niższa niż aktywność niesprzężonych aglikonów [90]. Dlatego, w pierwszej kolejności zbadaliśmy zdolność podocytów do metabolizowania UA, będącej najpowszechniej występującej formą urolityn [60], a wyniki wykorzystano do opracowania szczegółowego protokołu badawczego. Analiza z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-DAD MS/MS) wykazała spadek stężenia wyjściowego aglikonu na korzyść powstających metabolitów. 3-O/ lub 8-O-glukuronid UA (UAM) wykryto już po 12 godzinach od czasu rozpoczęcia eksperymentu,

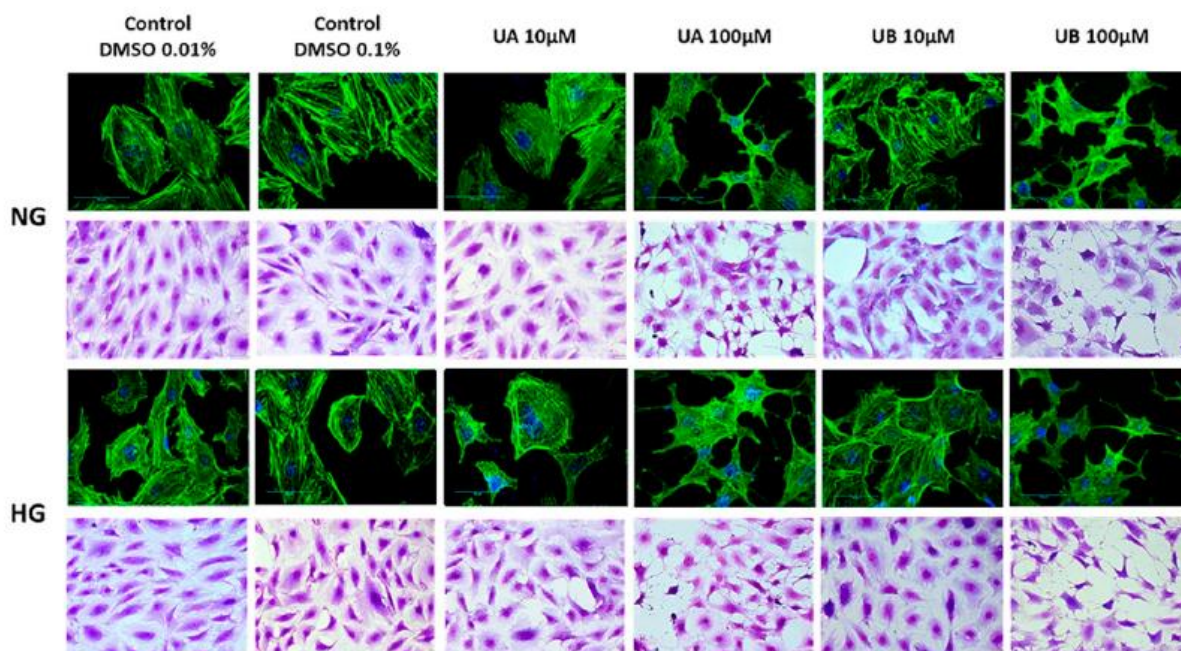
a jego stężenie zwiększało się wraz z upływem czasu. Na tej podstawie, ze względu na planowane, w niektórych eksperymentach 48-godzinne okresy inkubacji wymieniano pożywki eksperymentalne na świeże po 24 godzinach. Ciekawym spostrzeżeniem było, że **tempo metabolizowania UA w warunkach HG było niższe, niż w obecności glukozy o normalnym stężeniu (Ryc. 6). Spowolnienie przemiany bioaktywnego aglikonu do mniej aktywnego metabolitu może być mechanizmem umożliwiającym skuteczniejszą obronę komórek przed skutkami działania glukozy o wysokim stężeniu.**



Ryc. 6 (w publikacji Figure 2 B, C). Tempo metabolizmu urolityny A w podocytach inkubowanych przez 7 dni w pożywce z normalnym (5,5 mM - NG) i wysokim (25 mM – HG) stężeniem glukozy. Stężenie wyjściowe UA wynosiło 10 μ M (100%). Wykresy przedstawiają odsetek wolnego aglikonu wykrytego w pożywce znad komórek po 12, 24 i 48 godzinach od dodania UA. * $p < 0,01$ vs 12h; ** $p < 0,003$ vs 12h. ns- brak znamienności statystycznej. Szczegółowy opis metod zawarto w omawianej publikacji.

W publikacjach przedstawiających wyniki badań *in vitro*, stężenia użytych urolityn wahają się w szerokim zakresie, od 0,1 μ M do 100 μ M, w zależności od rodzaju komórek [91–93]. Przeprowadzono więc testy żywotności podocytów z grup NG i HG inkubowanych z urolitynami A i B (10, 30 i 100 μ M) przez 24 i 48 godzin, aby dobrać optymalne stężenie związków do kolejnych doświadczeń. Uzyskane wyniki dostarczyły kilku informacji:

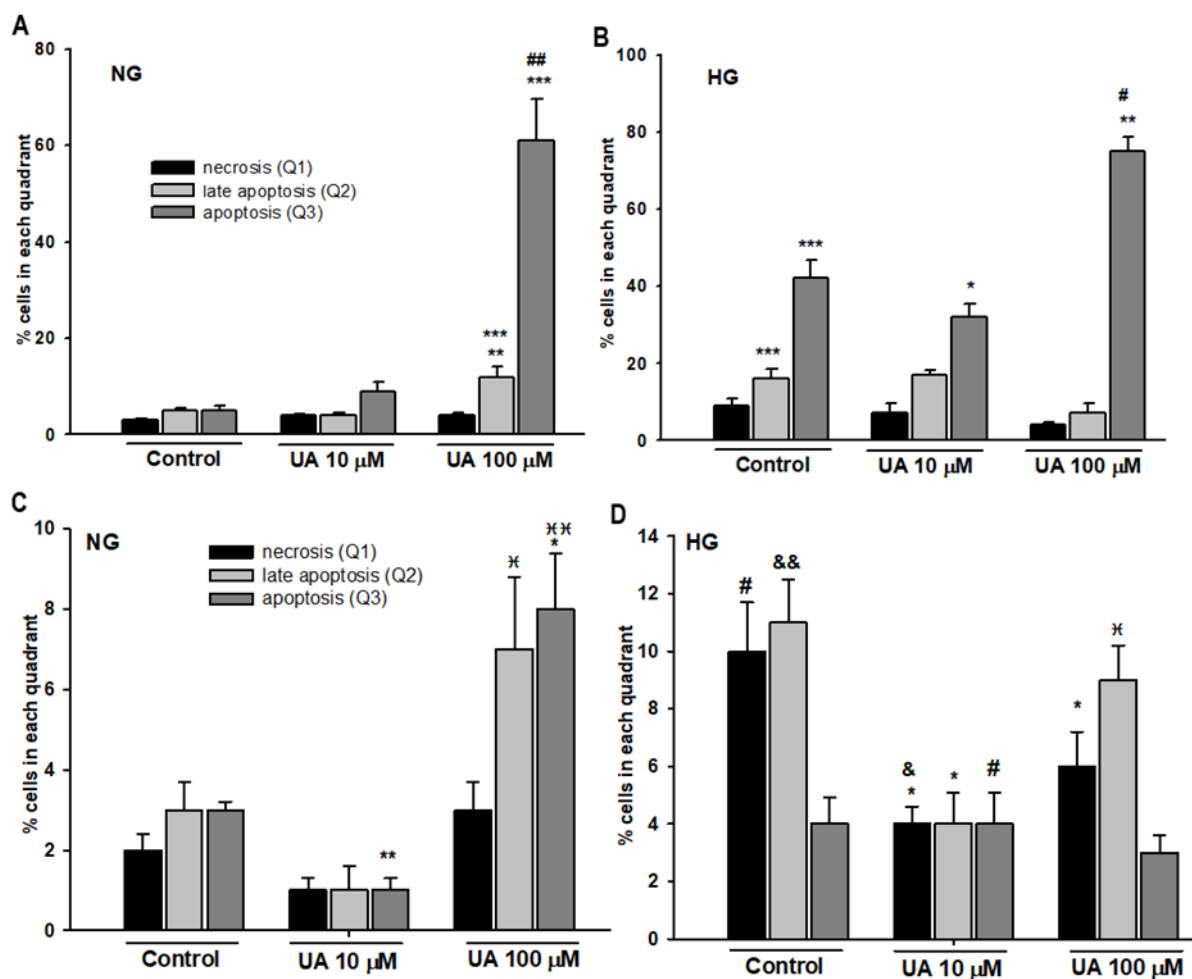
- W warunkach NG jedynie 10 μ M UA nie obniża żywotności podocytów.
- Wysokie stężenie glukozy obniża żywotność podocytów, co jest hamowane przez 10 μ M UA, ale nie przez UB.
- W miarę wzrostu stężenia urolityn, ich toksyczność względem podocytów zwiększa się, czego dowodem jest obniżenie żywotności oraz towarzyszące temu zmiany morfologiczne komórek (Ryc. 7).



Ryc. 7 (w publikacji Figure 5). Urolityny o wysokim stężeniu silnie zmieniają strukturę cytoszkieletu aktynowego i morfologię podocytów. Komórki były inkubowane przez 7 dni w pożywce z normalnym (5,5 mM - NG) i wysokim (25 mM – HG) stężeniem glukozy. Na ostatnie 48 godzin dodano do pożywki 10 μ M lub 100 μ M UA lub UB, po czym komórki zabarwiono fioletem krystalicznym, albo falloidyną sprzężoną z fluorochromem Alexa488. Szczegółowy opis metod zawarto w omawianej publikacji.

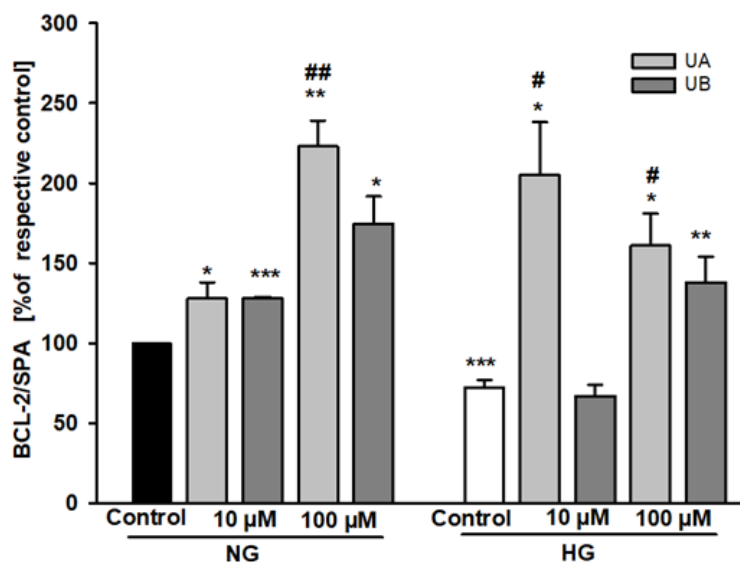
Obserwacje były o tyle interesujące, że w dostępnej literaturze praktycznie nie ma wzmianek o toksyczności urolityn. Uzyskane wyniki z jednej strony stały się więc podstawą do wytypowania do dalszych eksperymentów przede wszystkim 10 μ M UA, a z drugiej strony stały się inspiracją do badań mechanizmów pośredniczących w regulowaniu żywotności podocytów.

Jednym z podstawowych mechanizmów, które należało wziąć pod uwagę, była śmierć komórek na drodze apoptozy i/lub nekrozy. Cytometryczna ocena apoptozy przy użyciu aneksyny V-FITC oraz analiza aktywności kaspaz 3/7 wykazały, że zgodnie z naszymi przypuszczeniami, w obecności 100 μ M UA odsetek komórek apoptotycznych bardzo silnie wzrósł w porównaniu z komórkami kontrolnymi, a także w porównaniu do komórek inkubowanych z 10 μ M UA (Ryc. 8). Apoptoza następowała zarówno w podocytach inkubowanych w NG, jak i w HG. Analizy potwierdziły też, że wysokie stężenie glukozy per se, zmniejszając żywotność podocytów, nasila w nich proces apoptozy. Ponadto, ważnym spostrzeżeniem było, że **10 μ M UA hamowała apoptozę indukowaną przez HG**. Co więcej, aktywność kaspaz 3/7 była redukowana przez tę urolitynę nawet w warunkach NG.



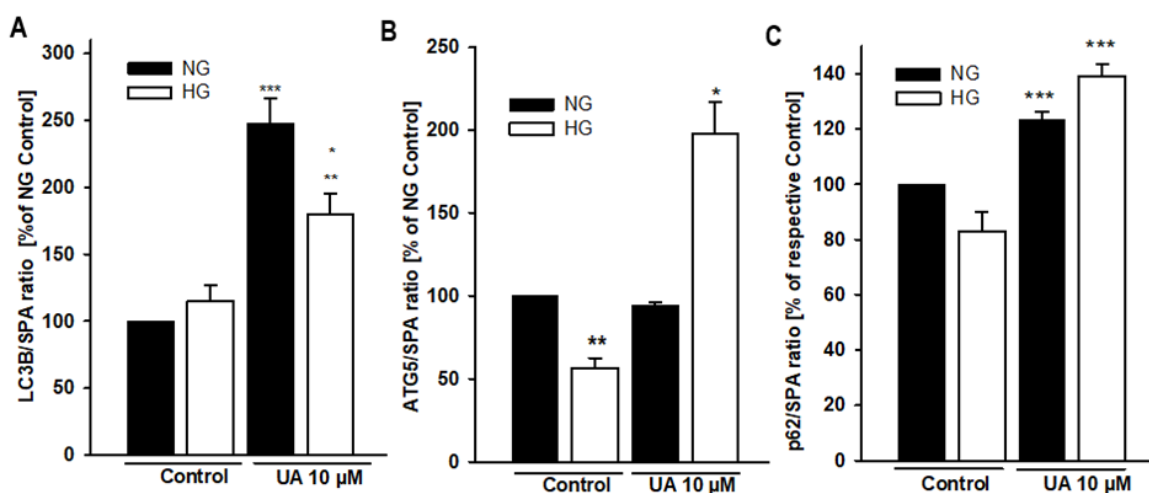
Ryc. 8 (w publikacji Figure 7 B, C, E, F) 100 μM urolityna A powoduje apoptozę podocytów. Komórki były inkubowane przez 7 dni w pożywce z normalnym (5,5 mM - NG) i wysokim (25 mM – HG) stężeniem glukozy. Urolityny dodawano 24 godz. przed zakończeniem inkubacji. Ilościowa analiza wyników pomiarów cytometrycznych stopnia apoptozy (**A, B**) oraz aktywności kaspaz 3/7 (**C, D**). Szczegółowy opis metod oraz analizy statystycznej zawarto w omawianej publikacji. Dla **A** i **B**: * $p < 0,05$ vs. HG Control, # $p < 0,01$ vs. HG Control, ** $p < 0,01$ vs. odpowiednia grupa 10 μM UA, ## $p < 0,001$ vs. NG 10 μM UA, *** $p < 0,001$ vs. NG Control. Dla **C** i **D** * $p < 0,05$ vs. Control, ** $p < 0,01$ vs. Control, ☒ $p < 0,05$ vs. 10 μM UA, ☒☒ $p < 0,01$ vs. 10 μM UA, # $p < 0,05$ vs. odpowiednia grupa w NG, & $p < 0,01$ vs. odpowiednia grupa NG 10 M UA, && $p < 0,005$ vs. NG Control.

Badania wykazały też, że w komórkach inkubowanych w HG wraz z obniżoną żywotnością zmniejsza się też ekspresja białka Bcl-2, które jest silnym regulatorem antyapoptotycznym. Silny wzrost ekspresji Bcl-2 w obecności 10 μM UA wskazuje, że białko to pośredniczy w hamowaniu apoptozy przez urolitynę. Niespodziewanie jednak, zarówno UA jak i UB w stężeniu 100 μM również zwiększały ekspresję Bcl-2 (Ryc. 9). Można przypuszczać, że w tym przypadku jest to odpowiedź obronna komórek na obecność proapoptotycznego stężenia urolityn.



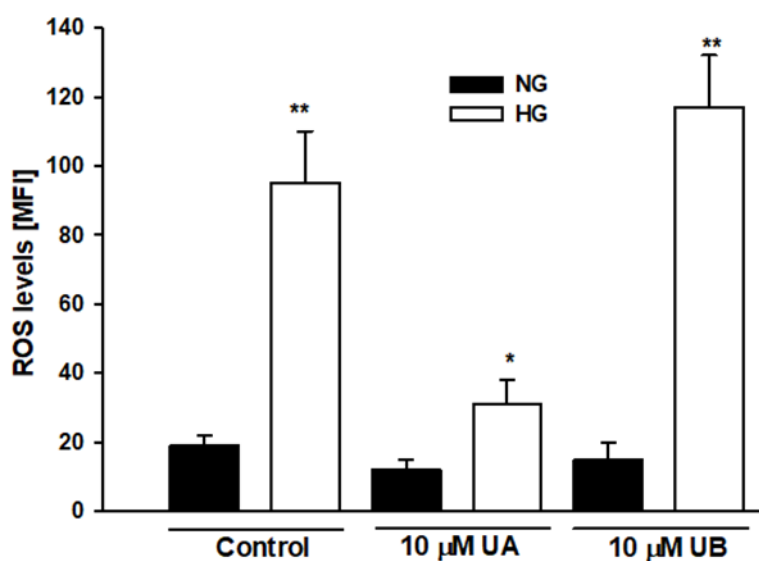
Ryc. 9 (w publikacji Figure 6) Ekspresja Bcl-2 jest modulowana przez urolityny i wysokie stężenie glukozy. Komórki były inkubowane przez 7 dni w NG i HG). Urolityny dodawano 24 godziny przed zakończeniem inkubacji. Szczegółowy opis metod oraz analizy statystycznej zawarto w omawianej publikacji. * $p < 0,05$ vs. Kontrola NG/HG, ** $p < 0,02$ vs. Kontrola NG/HG, *** $p < 0,001$ vs. Kontrola NG, # $p < 0,05$ vs. HG UB 10 mM, ## $p < 0,02$ vs. NG 10 μM UA.

Wraz z apoptozą, na przeżywalność komórek wpływa drugi, często przeciwstawnie działający proces autofagii, zatem żywotność komórek jest wypadkową współdziałania obu tych procesów [94]. Przypuszczając, że zależne od UA hamowanie apoptozy w podocytach może być związane ze zmianami natężenia autofagii, sprawdziliśmy wpływ urolityny na ekspresję białek będących typowymi wskaźnikami tego procesu: białka łańcucha lekkiego 3B (LC3B), białka 5 związanego z autofagią (ATG5) i białka p62 [95]. Pomimo braku różnic pomiędzy ekspresją białka LC3B w komórkach inkubowanych w NG i HG, wyraźny spadek ekspresji ATG5 w grupie HG (Ryc. 10 A i B) wskazuje na obniżenie autofagii w podocytach poddanych działaniu glukozy o wysokim stężeniu. Z kolei 10 μM UA wyraźnie zwiększa ekspresję obu markerów w komórkach tej grupy, co wskazuje na **stymulowanie procesu autofagii**. Nieoczekiwanie, ekspresja białka p62, które w trakcie autofagii ulega degradacji, zwiększyła się pod wpływem UA, bez względu na stężenie glukozy w pożywce. Możliwe jednak, że UA, niezależnie od autofagii, wpłynęła na poziom tego białka, np. bezpośrednio pobudzając jego transkrypcję [96,97].



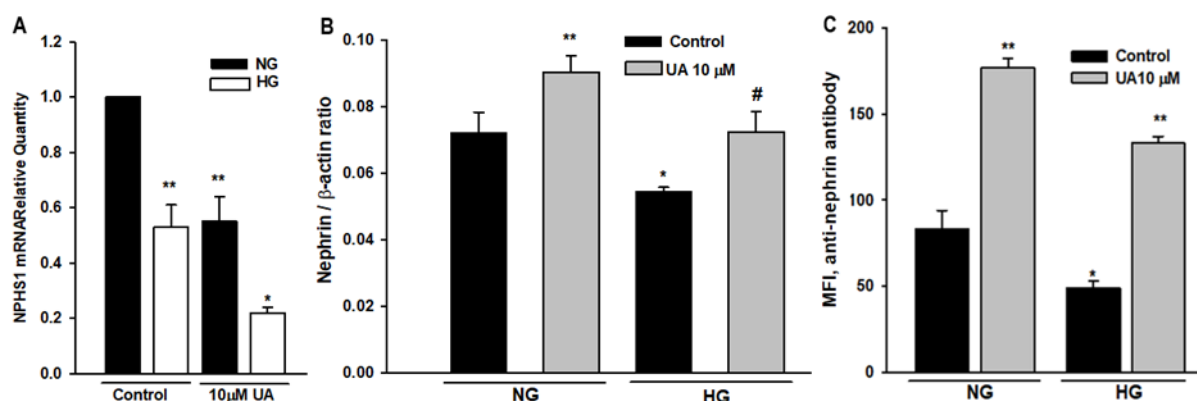
Ryc. 10 (w publikacji Figure 9 B, C, D) Urolityn A zwiększa ekspresję markerów autofagii. Komórki były inkubowane przez 7 dni w NG i HG). Urolityny dodawano 24 godz. przed zakończeniem inkubacji. Wykresy przedstawiają wyniki ilościowej analizy densytometrycznej rezultatów uzyskanych metodą Western blot. Szczegółowy opis metod oraz analizy statystycznej zawarto w omawianej publikacji. Dla **A**: * $p < 0,05$ vs. Kontrola HG, ** $p < 0,01$ vs. Kontrola NG, *** $p < 0,001$ vs. Kontrola NG. Dla **B**: * $p < 0,01$ vs. UA NG and vs. Kontrola NG, ** $p < 0,001$ vs. Kontrola NG and vs. UA HG. Dla **C**: *** $p < 0,001$ vs. Kontrola NG/HG.

Cytoprotekcyjne właściwości UA zostały też poparte badaniami oceniającymi zdolność UA i UB do obniżania poziomu reaktywnych form tlenu (ROS), powstających w podocytach w warunkach hiperglikemii. **W przeciwieństwie do UB, 10 µM UA wykazała silny potencjał antyoksydacyjny**, zmniejszając wewnątrzkomórkowy poziom ROS prawie o 70% (Ryc. 11).



Ryc. 11 (w publikacji Figure 8) Urolityn A obniża poziom ROS w podocytach inkubowanych przez 7 dni w pożywce zawierającej 25 mM glukozę (HG). Urolityny dodawano 24 godz. przed zakończeniem inkubacji. Szczegółowy opis metod oraz analizy statystycznej zawarto w omawianej publikacji. * $p < 0,05$ vs. HG Control, ** $p < 0,01$ vs. NG Control).

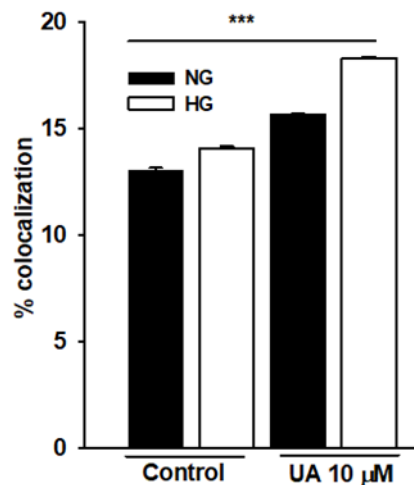
Hiperglikemia skutkuje podocytopatią, której podstawowe objawy, oprócz utraty komórek, obejmują również zanik błon szczelinowych, czego rezultatem jest białkomocz. Kierując się informacją o zahamowaniu białkomoczu przez UA w eksperymencie *in vivo* [98], zbadaliśmy wpływ UA na ekspresję nefryny, będącej głównym składnikiem błon szczelinowych. Zgodnie z wcześniej opublikowanymi danymi [99,100], w podocytach inkubowanych w HG zaobserwowaliśmy obniżenie ekspresji mRNA dla genu NPHS1 kodującego nefrynę, jak i spadek ekspresji tego białka w lizatach komórkowych (Ryc. 12 A i B). Dużym zaskoczeniem była jednak obserwacja, że w tych samych warunkach, w obecności UA ekspresja mRNA genu NPHS1 dodatkowo obniżyła się o ponad 50%, podczas gdy ekspresja białka wzrosła, a szczególnie na powierzchni podocytów. Co więcej, urolityna silnie zwiększyła również powierzchniową ekspresję nefryny w komórkach inkubowanych w warunkach NG (Ryc. 12 C).



Ryc. 12 (w publikacji: A- Figure 10; B-Figure 11B, C-Figure 12A) Urolityna A w zróżnicowany sposób moduluje całkowitą i powierzchniową ekspresję nefryny w podocytach. Dla **A**: * $p < 0,05$ vs. Control HG, ** $p < 0,01$ vs. Control. Dla **B**: $p < 0,05$ vs. Control HG, ** $p < 0,01$ vs. Control. Dla **C**: * $p < 0,05$ vs. NG Control, ** $p < 0,001$ vs. odpowiedniej Kontroli.

Próbując wyjaśnić brak korelacji między ekspresją mRNA i białka wysunęliśmy hipotezę, że urolityna A może hamować internalizację i lizosomalną degradację nefryny. Jednakże ilościowa analiza kolokalizacji nefryny z markerem wczesnych endosomów EEA1 wykazała efekt przeciwny do spodziewanego. W obecności UA, a szczególnie w warunkach HG, poziom nefryny obecnej w endosomach wyraźnie się zwiększył (Ryc. 13), Wynika stąd,

że urolityna A zwiększa nie tylko wytwarzanie białka nefryny, ale też jego endocytozę. Brak zgodności pomiędzy ekspresją genu i białka nefryny w komórkach poddanych działaniu UA zaobserwowaliśmy nie tylko w przypadku nefryny, ale też w przypadku fibronektyny, co przedstawiono w kolejnym rozdziale (*Rozdział 9.3.4*), przedstawiającym nieopublikowane wyniki.



Ryc. 13 (w publikacji *Figure 13B*) W obecności UA wzrasta wewnątrzkomórkowa kolokalizacja nefryny z markerem endosomalnym EAA1. Ilościowa analiza obrazów z mikroskopu konfokalnego. *** $p < 0,001$.

Przedstawione w publikacji wyniki wskazują, że urolityna A zwiększa żywotność podocytów poddanych działaniu glukozy o wysokim stężeniu, co jest związane z hamowaniem apoptozy i pobudzeniem procesu autofagii. Jednocześnie UA moduluje ekspresję nefryny oraz jej przemieszczanie się do endosomów, a to może bezpośrednio wpływać na strukturę błony szczelinowej, której integralność decyduje o przepuszczalności bariery filtracyjnej. Kolejne badania miały na celu ustalenie, czy UA wywiera wpływ na zmiany fenotypowe podocytów, które leżą u podłoża utraty funkcji tych komórek w hiperglikemii. Wyniki opisane w dalszej części pracy wchodzi w skład przygotowywanej obecnie publikacji.

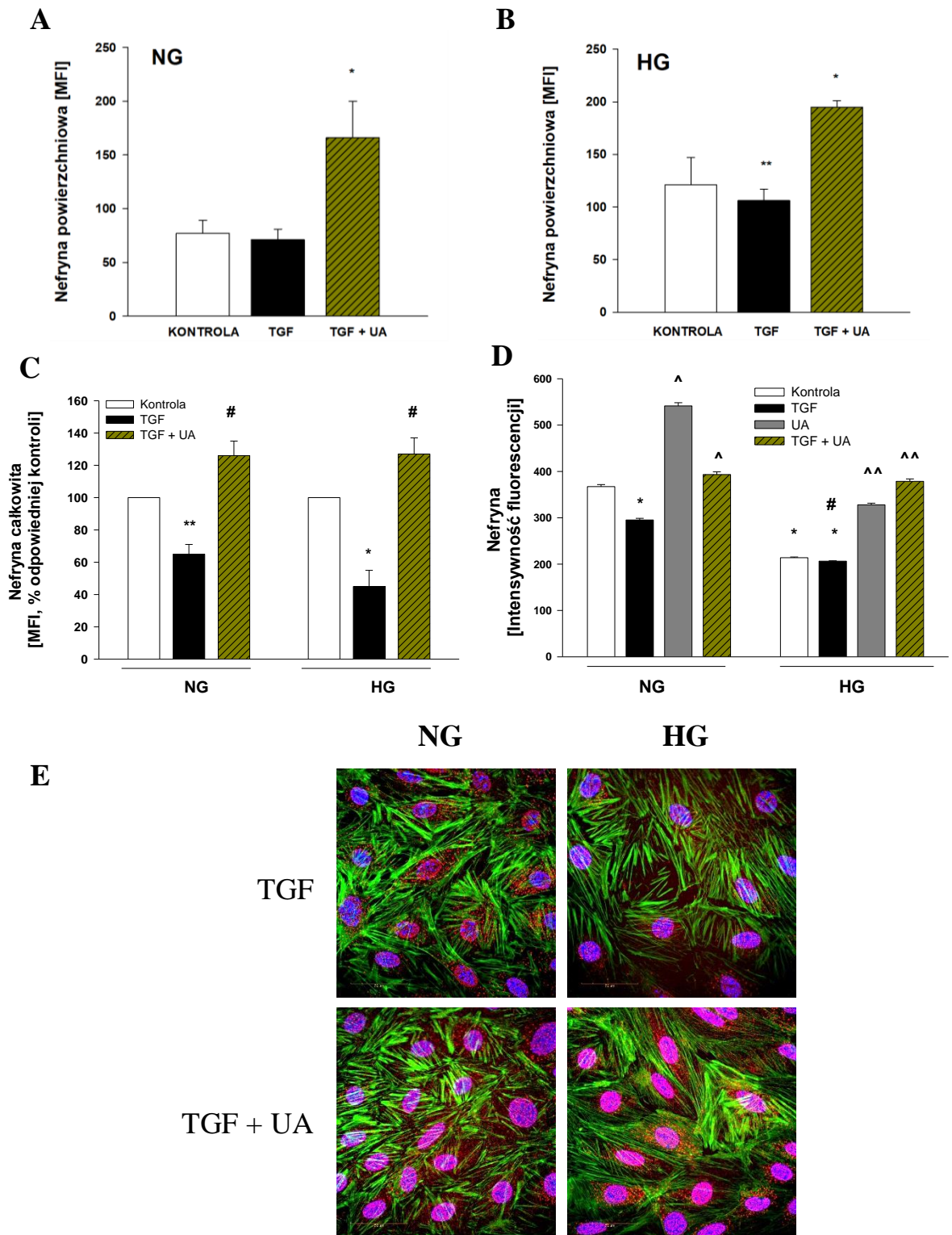
9.3. Oddziaływanie urolityny A na podocyty poprzez modulowanie aktywności TGFβ

Zaprezentowane w niniejszym rozdziale wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzanych zgodnie z opisanym poprzednio protokołem, z użyciem metod i odczynników opisanych w *publikacji 2*. Nieopisane poprzednio metody zostały przedstawione w poniższym tekście. Rezultaty zaprezentowano i jednocześnie przedyskutowano w tym samym rozdziale.

W przebiegu przewlekłych podocytopatii, jednym z głównych patomechanizmów prowadzących do dysfunkcji i utraty podocytów jest nadekspresja TGFβ oraz podwyższona aktywność systemów sygnalizacyjnych zależnych od tej cytokiny [101,102]. W cukrzycy czynnikiem indukującym ten proces jest hiperglikemia, która zaburzając równowagę procesów metabolicznych i hemodynamicznych, prowadzi do zwiększenia syntezy i oddziaływania TGFβ na podocyty. W rezultacie zmienia się ekspresja wielu białek, w tym białek błony szczelinowej, morfologia i fenotyp komórek podocytarnych, a także wzrasta ich skłonność do apoptozy. Wydawało się więc prawdopodobne, że mechanizmy, poprzez które urolityna A wywierała wcześniej zaobserwowane efekty, mogą być związane z jej oddziaływaniem nie tylko na mechanizmy regulowane przez samą glukozę, ale też na system zależny od TGFβ. W kolejnych eksperymentach podjęto próbę określenia, czy istnieje taka zależność.

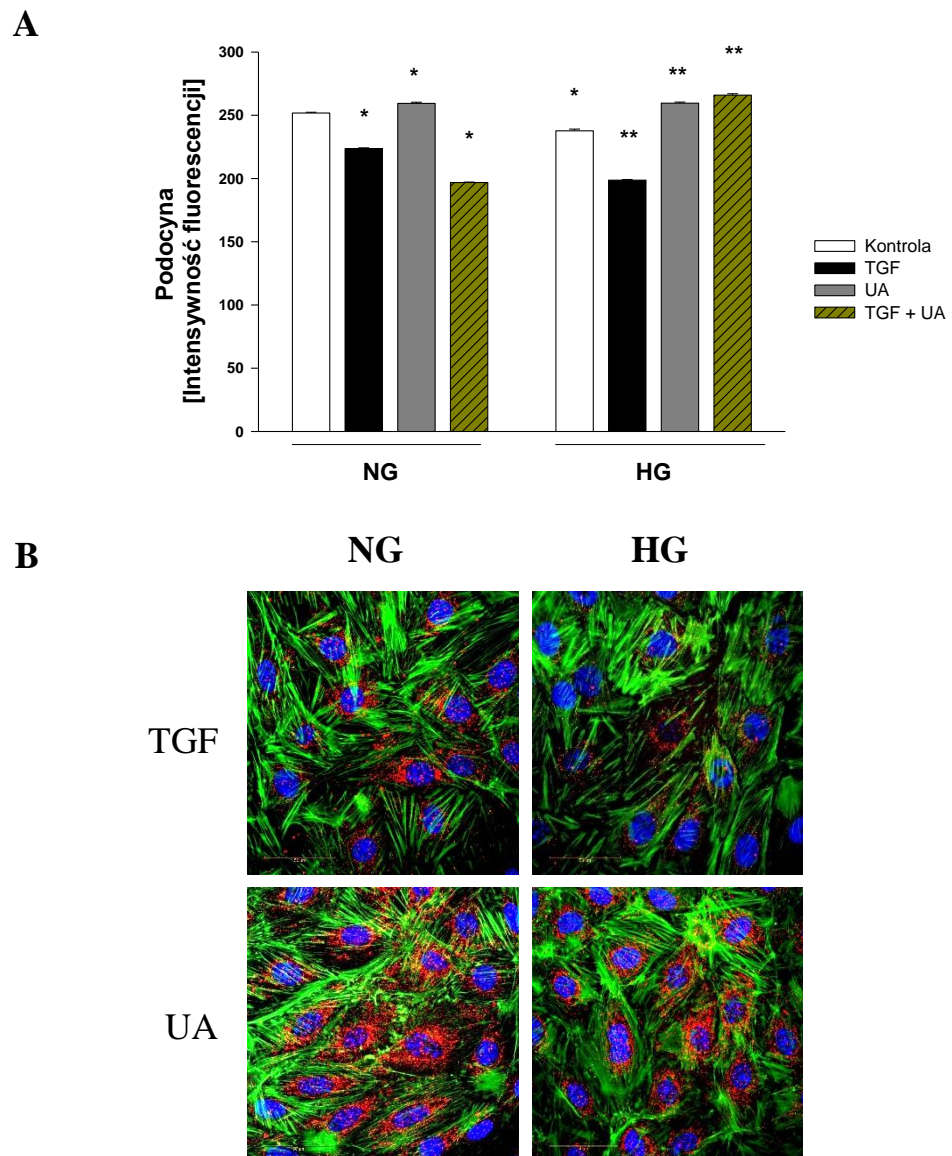
9.3.1. Ekspresja nefryny i podocyny

Nefryna z podocyną są podstawowymi składnikami błony szczelinowej, od których zależy jej selektywna przepuszczalność. W *publikacji 2* opisaliśmy, że wskutek oddziaływania UA na nefrynę, obniżona w warunkach hiperglikemii ekspresja tego białka osiąga ponownie poziom podobny do tego, który obserwowaliśmy przy fizjologicznym stężeniu glukozy. W kolejnych doświadczeniach komórki z grup NG i HG były inkubowane przez 24 lub 48 godzin w pożywkach, dodawano 10 μM UA i/lub roztwór TGF-β1 w stężeniu 5 ng/ml (R&D systems, USA). Ilościowa analiza wyników cytometrycznych oraz natężenia fluorescencji z użyciem mikroskopu konfokalnego (Ryc. 14) wskazuje, że TGF-β1 silnie obniża ekspresję nefryny w komórkach inkubowanych w NG, co podobnie do innych doniesień [103] dowodzi, że efekt jest wywierany bezpośrednio przez cytokinę, niezależnie od stężenia glukozy. Sama glukoza o wysokim stężeniu również powoduje obniżenie ekspresji nefryny, a w obecności TGF-β1 efekt ten dodatkowo się nasila.



Ryc. 14 Zależna od TGF- β 1 ekspresja nefryny na powierzchni podocytów (**A** i **B**) oraz w całych komórkach (**C**) jest modulowana przez urolitynę A. Podocyty inkubowano z badanymi czynnikami przez 24 godziny. Wyniki cytometrii przepływowej są przedstawione jako średnia intensywność fluorescencji (MFI). Dla **A** i **B**: * $p < 0,05$ vs. TGF β 1 i vs. odpowiednia Kontrola, ** $p < 0,05$ vs. Kontrola HG. Dla **C**: * $p < 0,05$ vs. Kontrola HG, ** $p < 0,01$ vs. Kontrola NG, # $p < 0,01$ vs. TGF, $n = 5$. (**D**) Ilościowa ocena ekspresji poprzez intensywność fluorescencji, wykonana na mikroskopie konfokalnym. (**E**) Przykładowe obrazy barwienia immunofluorescencyjnego nefryny. Nefryna, β -aktyna, jądra komórkowe. Dla **D**: * $p < 0,001$ vs. Kontrola NG, ^ $p < 0,001$ vs. Kontrola NG i TGF NG, # $p < 0,05$ vs. Kontrola HG, ^^ $p < 0,001$ vs. Kontrola HG i TGF HG. Liczna analizowanych komórek w jednym doświadczeniu: 49-550 komórek.

Urolityna A, zarówno w komórkach inkubowanych w NG, jak i w HG, hamuje efekt wywierany przez TGF- β 1, zwiększając ekspresję nefryny w podocytach. Podobnie na powierzchni komórek, gdzie poprzednio zaobserwowaliśmy szczególnie silny stymulujący wpływ UA na obecność nefryny (*Publikacja 2*), w warunkach HG ekspresja białka obniżyła się pod wpływem TGF- β 1, a przeciwny efekt zaobserwowaliśmy, kiedy w pożywce znajdowała się dodatkowo UA (Ryc. 14 B).



Ryc. 15 Zależna od TGF- β 1 ekspresja podocyny podocytach jest modulowana przez urolitynę A. **(A)** Analiza ilościowa. **(B)** Przykładowe obrazy barwienia immunofluorescencyjnego podocyny. **Podocyna, β -aktyna, jądra komórkowe.** Podocyty inkubowano z badanymi czynnikami przez 24 godziny w komórkach wyznakowanych przeciwciałami (pierwszorzędowe: NBP2-75624, Novus Biologicals; drugorzędowe: ab150079, Abcam, UK), zgodnie z procedurą opisaną w *publikacji 2*, analizowano intensywność fluorescencji przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Liczba analizowanych komórek w jednym doświadczeniu: 500-550. * $p < 0.001$ vs. Kontrola NG, ** $p < 0.001$ vs. Kontrola HG, $n = 3$.

Immunofluorescencyjna analiza podocyny wskazuje, że glukoza o wysokim stężeniu zmniejsza ekspresję tego białka. Jednocześnie, podobnie jak w przypadku nefryny, niezależnie od stężenia glukozy, ekspresja podocyny obniża się, kiedy komórki są poddane działaniu TGF- β 1 (Ryc. 15), co jest potwierdzeniem wcześniejszych obserwacji [104]. Urolityna A z kolei powoduje niewielkie, ale statystycznie znamienne zwiększenie ekspresji podocyny, zarówno w warunkach NG, jak i w HG. **W podocytach inkubowanych w obecności glukozy o wysokim stężeniu, dodanie do pożywki UA wraz z TGF- β 1 zapobiegło zmianom wywołanym przez samą cytokinę.** Zaskakującym efektem było jednak znaczne obniżenie ekspresji podocyny w obecności obu badanych czynników w komórkach z grupy NG. Można jednak spekulować, że wewnątrzkomórkowa lokalizacja podocyny zmienia się pod wpływem UA tak, że pomimo zmniejszonej syntezy białka, jego pula w obrębie błony szczelinowej pozostaje nie zmieniona. Translokacja tego białka jest znanym zjawiskiem, a jego przemieszczanie się do cytoplazmy obserwuje się np. u pacjentów z nefropatią IgA [105]. Z kolei niedostateczna translokacja podocyny z cytoplazmy do błony, np. przy mutacjach genu NPHS2, leży u podłoża wrodzonych steroidoopornych zespołów nerczycowych [106]. Uwzględniając, że transport podocyny do błony komórkowej odbywa się na drodze endocytozy [107], a w *publikacji 2* wykazaliśmy, że urolityna A reguluje transport endosomalny, można przypuszczać, że obniżenie całkowitej ekspresji podocyny po inkubacji z TGF- β 1 i UA nie musi oznaczać mniejszej ilości białka w błonie podocytów.

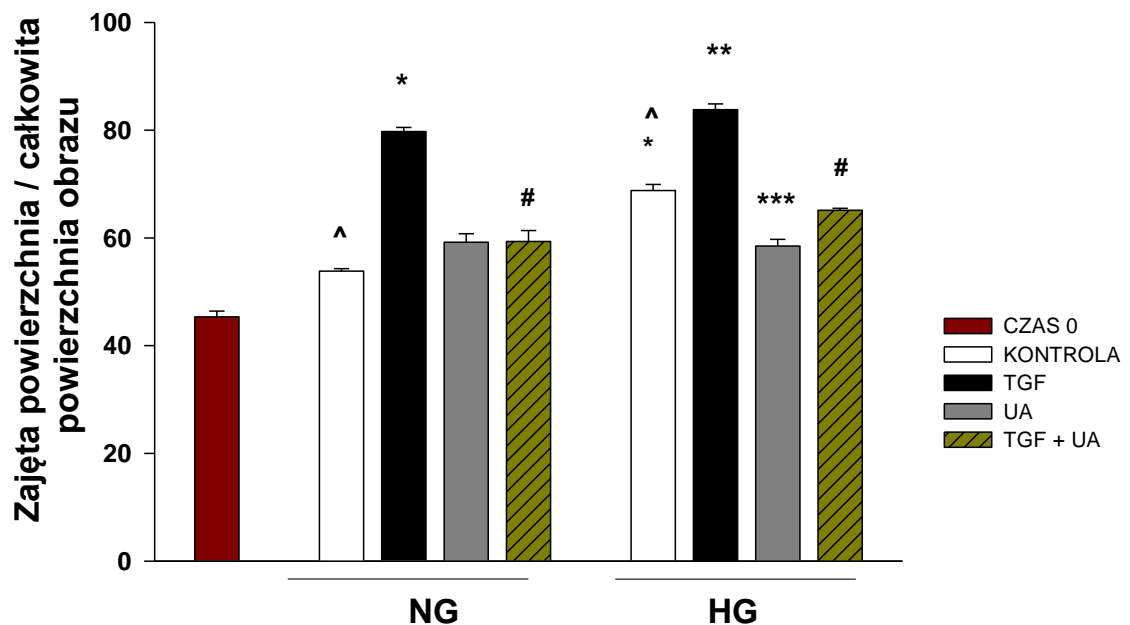
9.3.2. Zdolność podocytów do migracji

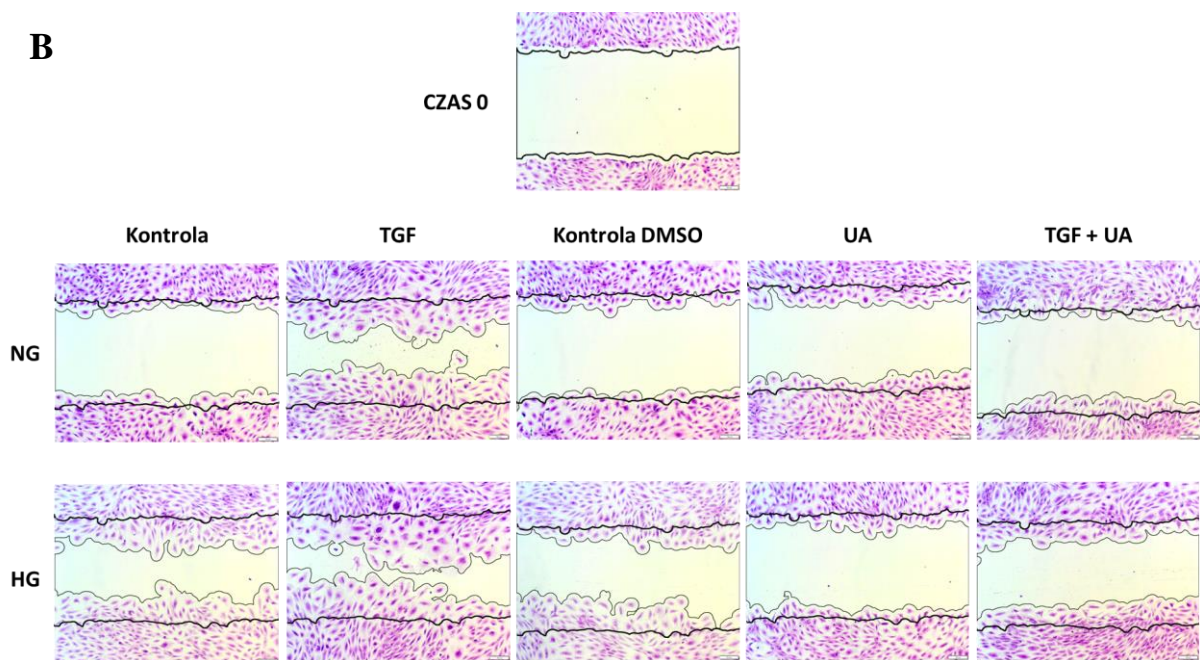
Stan błony szczelinowej zależy nie tylko od ekspresji tworzących ją białek, ale też od morfologii wyrostków stopowatych podocytów. Jest przy tym bardzo istotne, aby odległość pomiędzy sąsiednimi wyrostkami nie przekraczała możliwości rozciągania się tej częściowo elastycznej struktury [108]. Dzięki złożonej konstrukcji cytoszkieletu podocyty są zdolne do przemieszczania się, co zapewnia utrzymanie integralności bariery filtracyjnej, kiedy pojedyncze komórki zostają utracone, a pozostałe na drodze hipertrofii i zmiany położenia uzupełniają ubytki w warstwie pokrywającej włóśniczki. Jest to też mechanizm pozwalający na dynamiczne dostosowanie się monowarstwy podocytów do zmieniającej się średnicy włóśniczek [28,109]. Jednakże, w chorobach takich jak zespół nerczycowy, czy nefropatia cukrzycowa, zwiększony potencjał migracyjny podocytów wiąże się z deformacją wyrostków stopowatych, zanikiem błony szczelinowej, osłabieniem adhezji oraz odrywaniem się komórek od błony podstawnej, co przede wszystkim objawia się w formie

białkomoczu [58,110,111]. Ruchliwość wypustek jest więc miarą zdolności podocytów do pełnienia ich funkcji w barierze filtracyjnej kłębuszka nerkowego. Nasze obserwacje wskazujące, że UA, poprzez regulację ekspresji białek, może korzystnie wpływać na strukturę błony szczelinowej, skłoniły nas do sprawdzenia czy związek ten moduluje też mobilność podocytów w warunkach odpowiadających hiperglikemii.

Przeprowadzone testy gojenia ran ukazały widoczną zmianę położenia komórek z grupy kontrolnej NG (Ryc. 16), wskazującą na zdolność podocytów do spontanicznego przemieszczania się. Pod wpływem glukozy o wysokim stężeniu ruchliwość komórek wyraźnie wzrosła, ale zarówno w warunkach HG jak i NG, mobilność podocytów najsilniej była stymulowana przez TGF- β 1, co znajduje też potwierdzenie w dawniejszych publikacjach [112,113]. W warunkach odpowiadających hiperglikemii, urolityna A działała przeciwnie i w obecności TGF- β 1, hamowała indukowaną przez tę cytokinę migrację komórek. Jest więc prawdopodobne, że w warunkach *in vivo* efektem działania UA byłoby zmniejszenie białkomoczu wynikającego z nadmiernej mobilności podocytów.

A





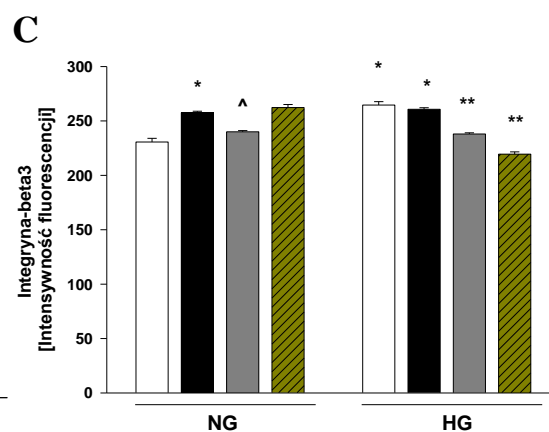
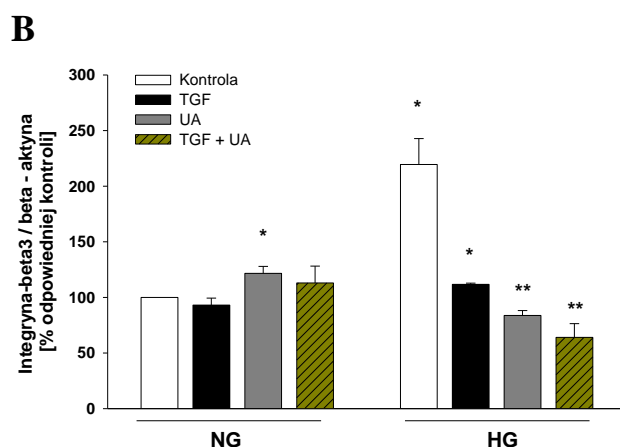
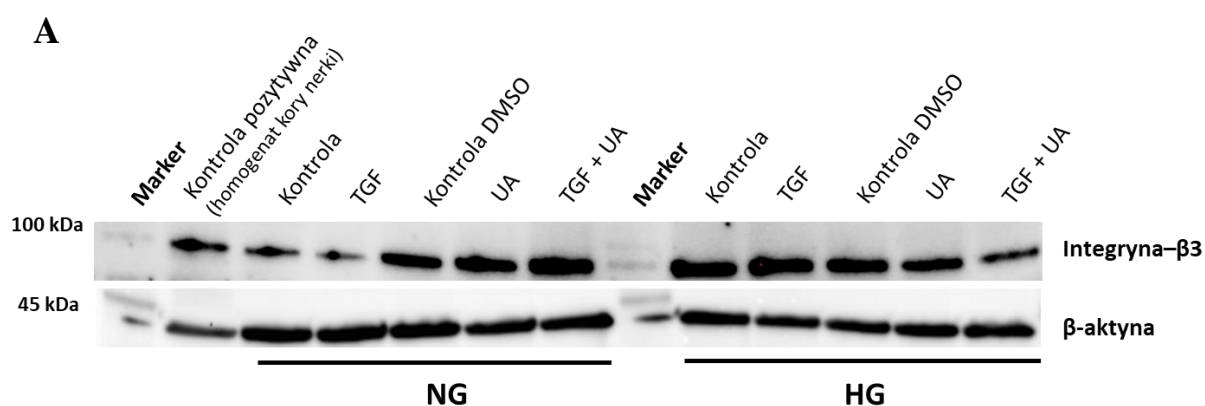
Ryc. 16 Urolityna A hamuje migrację podocytów stymulowaną przez TGF- β 1 i przez glukozę o wysokim stężeniu. Czas "0" - stan przed rozpoczęciem 48-godzinowego testu gojenia ran. (A) Analiza ilościowa zdolności podocytów do migracji. Podocyty inkubowano przez 48 godzin z badanymi czynnikami i analizowano zgodnie z procedurą opisaną w 8.2.2. $^{\wedge}$ $p < 0,001$ vs. CZAS 0, * $p < 0,0001$ vs. Kontrola NG, ** $p < 0,001$ vs. Kontrola HG, *** $p < 0,02$ vs. Kontrola HG, # $p < 0,01$ vs. TGF (odpowiednio NG lub HG), $n = 3-6$. (B) Zdjęcie reprezentujące jedno z czterech niezależnych doświadczeń.

Modulowanie migracji przez urolitynę A badano poprzednio przede wszystkim w odniesieniu do komórek nowotworowych. Udowodnione mechanizmy zmniejszające mobilność i tworzenie przerzutów obejmowały między innymi hamowanie przez UA ekspresji białek zaangażowanych w polimeryzację aktyny, glikozylację podoplaniny, czy aktywność metaloproteiny-9 (MMP9) [114]. Z drugiej strony, inwazyjność i migracja komórek nowotworowych, ale też mobilność komórek nienowotworowych, są powiązane z poziomem integryn, regulujących ich adhezję do podłoża [27,115]. Ich ekspresja i aktywność, nie tylko w nowotworach, ale też w wielu tkankach ustroju, jest z kolei kontrolowana przez TGF β [116]. Nasunęło się więc przypuszczenie, że zaobserwowane przez nas zmiany mobilności podocytów mogą się wiązać z działaniem UA na zależną od TGF β aktywność integryn.

9.3.3. Wpływ urolityny A na ekspresję integryny- β 3

Kompleksy α/β integryn w podocytach zawierają zarówno podjednostki β 1, β 3 jak i β 5 [110,117]. Spośród nich, szczególnie aktywacja podjednostek β 3 wiąże się z nasileniem migracji podocytów *in vitro* [26,117], a to z kolei indukuje białkomoczą *in vivo* [118]. Wykazano też, że TGF- β 1 pobudza migrację podocytów poprzez stymulowanie ekspresji integryny- β 3. Towarzyszące temu zmiany morfologiczne, a przede wszystkim spłaszczenie wyrostków stopowatych, prowadzą w konsekwencji do dysfunkcji całego filtra kłębuszkowego [112]. Dlatego też skupiliśmy się na przebadaniu efektów wywieranych przez UA na tę właśnie podjednostkę integryn.

Obserwowanej w obecności TGF- β zwiększonej mobilności podocytów (Ryc. 16) towarzyszył niewielki wzrost ekspresji integryny- β 3, co było szczególnie widoczne w komórkach inkubowanych w warunkach HG (Ryc.17). Jednocześnie, pod wpływem działania samej tylko glukozy, wzrostowi migracji towarzyszył silny wzrost ekspresji tej integryny. Regulowane przez glukozę zwiększenie syntezy tego białka opisano już wcześniej dla kłębuszkowych komórek nabłonkowych *in vitro* [119]. W grupie komórek HG urolityna A wyraźnie hamowała efekty wywierane przez glukozę, a także przez TGF- β 1, silnie obniżając ekspresję integryny- β 3, co koreluje z zaobserwowanym przez nas wpływem UA na zdolność podocytów do migracji. W porównaniu z wpływem TGF- β 1 na mobilność podocytów, zauważyliśmy mniejszy, niż spodziewany udział tej cytokiny na ekspresję tego białka. Należy jednak wziąć pod uwagę, że nawet niewielkie zmiany w obecności tego białka mogą mieć wpływ na sygnalizację w komórce, znacznie zmieniając jej właściwości. Z drugiej zaś strony, indukowana przez TGF- β 1 mobilność komórek zależy nie tylko od integryn, ale też od różnych innych czynników, jak regulowana przez tę cytokinę aktywność fosfataz [120], czy zdolność do reorganizacji włókien aktyny i tworzenia filamentów naprężeniowych [121]. Można więc wnioskować, że w warunkach hiperglikemii, urolityna A hamuje zależną od glukozy i od TGF- β 1 ekspresję integryny- β 3, co stanowi jeden z mechanizmów obniżania zdolności podocytów do migracji.

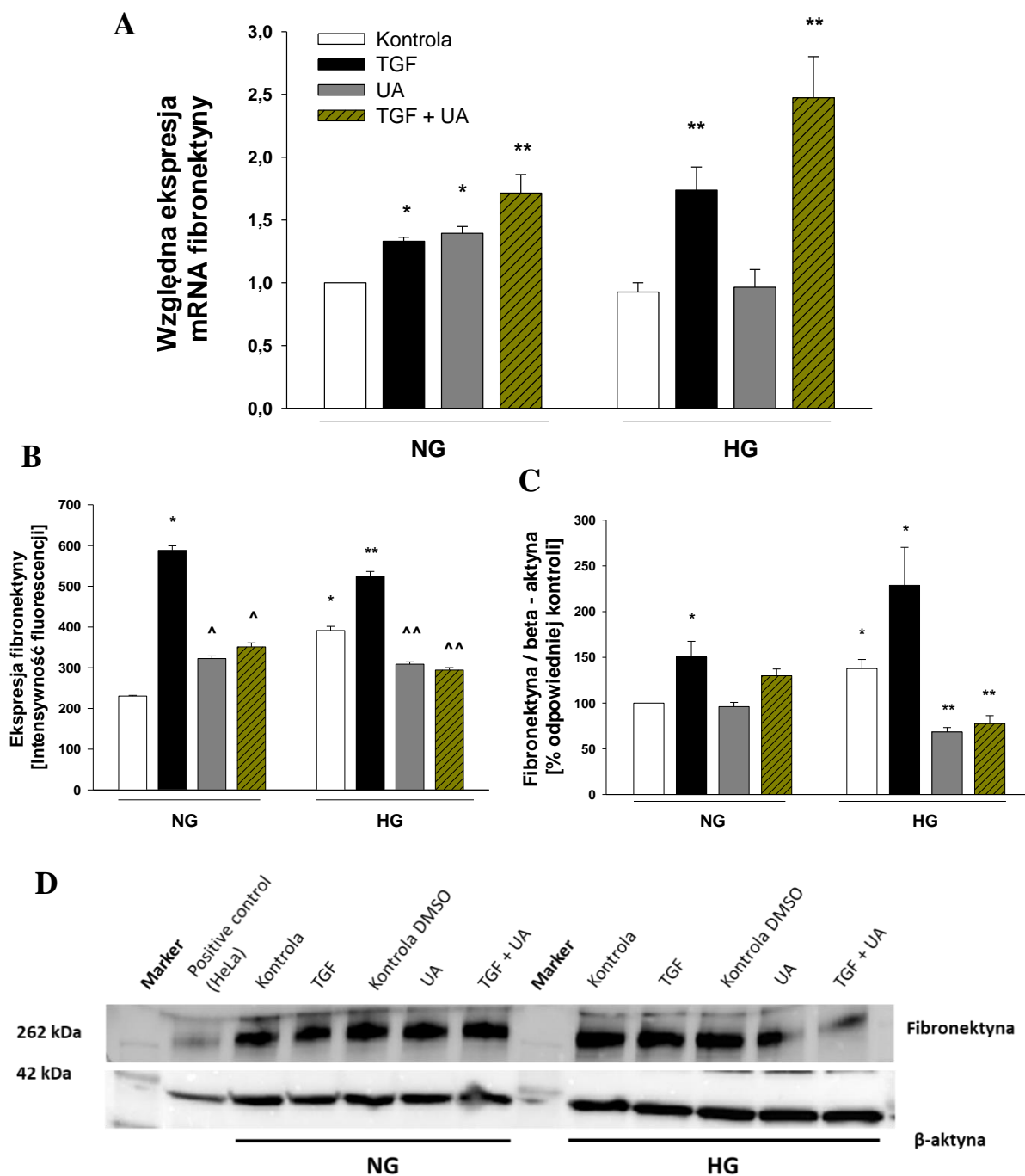


Ryc. 17 Zależna od TGFβ-1 i glukozy ekspresja integryny-β3 jest regulowana przez UA. Podocyty inkubowano z badanymi czynnikami przez 24 godziny. Przykładowy immunoblot (A). Analiza densytometryczna integryny-β3 (B). Ilościowa analiza mikroskopowa ekspresji integryny-β3. Komórki inkubowano z przeciwciałami (pierwszorzędowe: sc-46655, Santa Cruz Biotechnology; drugorzędowe: ab150113, Abcam, UK), zgodnie z procedurą opisaną w publikacji 2, po czym analizowano intensywność fluorescencji przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Ilość Liczba analizowanych komórek: 500-550 (C). Dla B: * p<0,001 vs. Kontrola NG, ** p<0,01 vs. Kontrola HG i TGF HG, Kontrola HG, # p<0,05 vs. Kontrola NG, n = 5-9. Dla C: * p<0,001 vs. Kontrola NG, ** p<0,001 vs. Kontrola HG i TGF HG, ^ p<0,001 vs. TGF NG, n = 3.

9.3.4. Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna komórek podocytnych

Wywołane hiperglikemią morfologiczne zmiany w podocytach, obejmujące zanik białek błony szczelinowej, spłaszczenie wyrostków stopowatych i spadek ekspresji białek adhezyjnych ułatwiający utratę komórek, w ostatnich latach powszechnie przypisuje się przemianie nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT) podocytów [122,123]. EMT jest procesem, w którym komórki nabłonkowe zmieniają swój kontakt z macierzą pozakomórkową, a także pomiędzy sobą nawzajem tak, aby stało się możliwe opuszczenie tkanki macierzystej. Cytoskielet aktywny ulega reorganizacji, zwiększając potencjał migracyjny komórek, a ich fenotyp zmienia się na mezenchymalny [124]. EMT jest fizjologicznym procesem, zachodzącym podczas rozwoju embrionalnego, ale może być też zjawiskiem destrukcyjnym, kiedy mechanizmy kontrolne zostają rozregulowane. Typowym przykładem patologicznych skutków EMT są migrujące komórki nowotworowe, tworzące przerzuty. Zauważono, że podocyty, będące komórkami pochodzenia nabłonkowego, ulegają takiej przemianie w odpowiedzi na czynniki uszkodzające, do których, oprócz wysokiego stężenia glukozy, należy m.in. TGF β [103]. Skutkuje to utratą ekspresji charakterystycznych dla nich białek, np. nefryny czy innych komponentów błony szczelinowej, natomiast pojawiają się białka typowe dla komórek mezenchymalnych, jak desmina, metaloproteinaza-9 (MMP-9), czy fibronektyna [103,125]. Co ważne, EMT jest procesem odwracalnym [126], zatem kluczowe jest poszukiwanie związków mających zdolność do hamowania tych zmian. W badaniach na liniach komórkowych raka płuca wykazano, iż urolityna A ma zdolność hamowania EMT poprzez degradację czynnika transkrypcyjnego Snail [127]. Z kolei w linii komórkowej raka jelita grubego wykazano, że urolityna A zmniejsza ekspresję MMP-9, hamując zdolność do tworzenia przerzutów [128]. Sprawdziliśmy więc, czy w naszych warunkach doświadczalnych podocyty ulegały EMT i czy urolityna A może modulować tę przemianę. W tym celu przeanalizowałam ekspresję fibronektyny, będącej jednym z typowych markerów EMT.

Niezależnie od stężenia glukozy, pod wpływem inkubacji z TGF- β 1 ekspresja fibronektyny w podocytach wzrosła (Ryc. 18). Zarówno mikroskopowa (Ryc. 18 B), jak i densytometryczna (Ryc. 18 C) ilościowa analiza ekspresji białka pokazuje, że UA silnie **hamuje zależny od TGF- β 1 wzrost ekspresji fibronektyny**, co jest szczególnie widoczne w podocytach inkubowanych w warunkach odpowiadających hiperglikemii. Ponadto glukoza w wysokim stężeniu również istotnie zwiększyła ekspresję tego białka, podobnie jak to opisano poprzednio [103,129,130].



Ryc. 18 Urolityna A moduluje ekspresję fibronektyny w podocytach. Podocyty inkubowano z badanymi czynnikami przez 24 godziny. Ilościowa analiza ekspresji mRNA (**A**). Ilościowa analiza mikroskopowa (**B**). Komórki inkubowano z przeciwciałami (pierwszorzędowe: ab2413, Abcam, UK; drugorzędowe: ab150079, Abcam, UK), zgodnie z procedurą opisaną w *publikacji 2*, po czym analizowano intensywność fluorescencji przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Liczba analizowanych komórek: 755. Analiza densytometryczna wyników Western blot (**C**). Przykładowy immunoblot (**D**). Dla **A**: * $p < 0,001$ vs. Kontrola NG, ** $p < 0,01$ vs. odpowiednia Kontrola, $n = 3-5$. Dla **B**: * $p < 0,001$ vs. Kontrola NG, ** $p < 0,001$ vs. Kontrola NG i HG, ^ $p < 0,001$ vs. TGF, ^^ $p < 0,001$ vs. Kontrola HG i TGF, $n = 3$. Dla **C**: * $p < 0,01$ vs. Kontrola NG, ** $p < 0,01$ vs. Kontrola HG i TGF HG, $n = 3-7$.

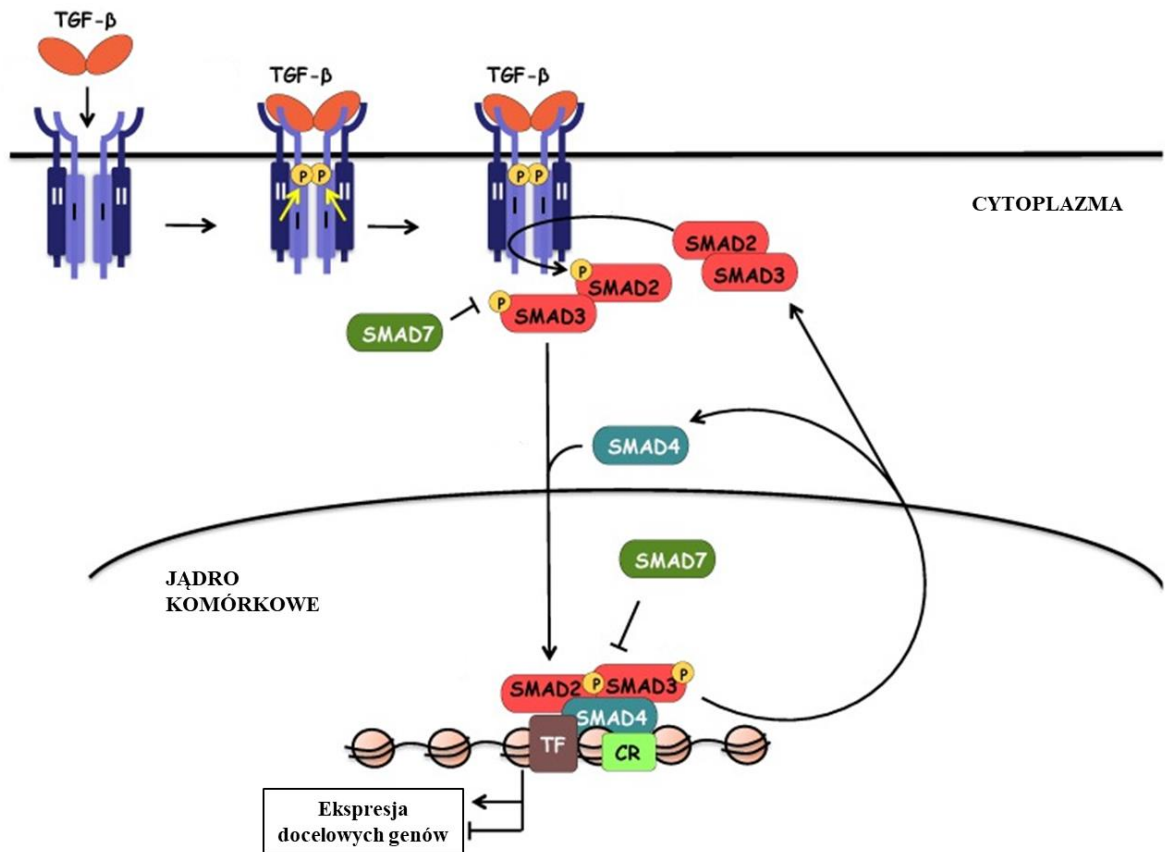
W warunkach NG urolityna A wydaje się nie mieć wpływu na ekspresję fibronektyny, natomiast w komórkach inkubowanych w HG UA powoduje wyraźny spadek ekspresji tego białka. Sugeruje to, że **UA przeciwdziała nie tylko efektom wywieranym przez TGF β , ale też przez samą glukozę**. Nieoczekiwanie jednak, w podocytach inkubowanych w NG w obecności UA, ekspresja mRNA fibronektyny wzrastała, a jednoczesna inkubacja z obydwoma czynnikami, UA i TGF- β 1 zwiększała tę ekspresję bez względu na stężenie glukozy (Ryc. 18 A). Podobnie, jak w przypadku nefryny (publikacja 2), widać tu brak korelacji między ekspresją białka i kodującego je mRNA. Wbrew powszechnemu przekonaniu, jest to zjawisko stosunkowo często spotykane i wiąże się z post-transkrypcyjną wieloetapową regulacją ekspresji białka [131,132]. Tym nie mniej, zaobserwowane przez nas zmiany ekspresji fibronektyny wskazują, że **urolityna A zahamowała proces przemiany EMT podocytów indukowany przez TGF- β 1 oraz odwróciła te zmiany w komórkach inkubowanych przez 7 dni w warunkach odpowiadających hiperglikemii**. Za udziałem urolityny w hamowaniu procesu EMT przemawia też, opisane przez nas powyżej, obniżenie przez UA zależnej od TGF- β 1 i od glukozy ekspresji integryny- β 3 (9.3.3.). Wykazano bowiem, że na zasadzie sprzężenia zwrotnego, TGF β może indukować ekspresję integryny- β 3, która z kolei pośredniczy w przekazywaniu sygnałów od TGF β , stymulujących w komórkach EMT [133].

9.3.5. Wpływ urolityny A na ekspresję receptora typu I i II dla TGF β

Wyniki naszych doświadczeń wyraźnie wskazują, że w podocytach poddanych działaniu glukozy o wysokim stężeniu urolityna A wywiera efekty przeciwdziałające skutkom wywieranym przez TGF β -1. Nasuwa się więc pytanie, na jakiej drodze UA zmienia odpowiedź komórek na działanie tej cytokiny.

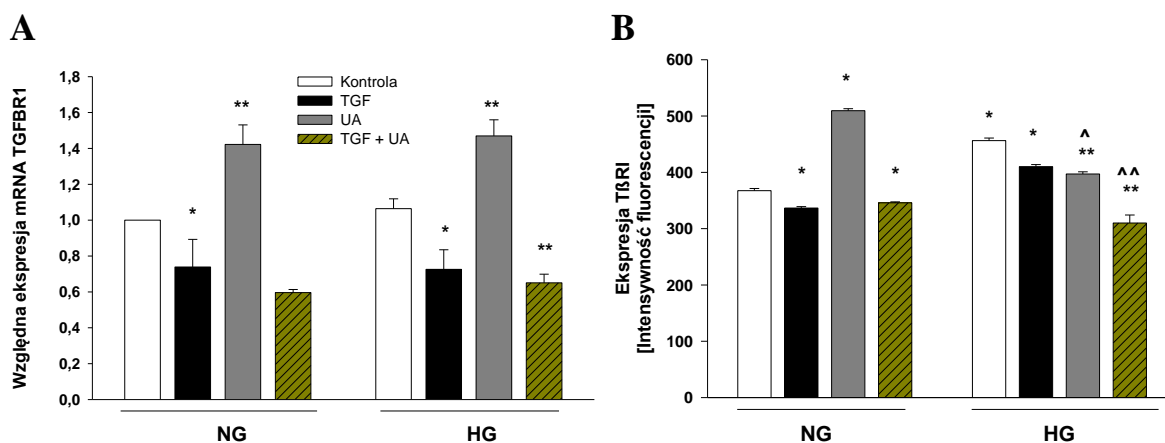
Czynniki wzrostu TGF β są dimerycznymi polipeptydami, które swoje biologiczne działanie wywierają za pośrednictwem swoistych receptorów: typu I (T β RI) oraz typu II (T β RII), będących homodimerami. Transbłonowy T β RII po związaniu z ligandem przyłącza T β RI i aktywuje go poprzez fosforylację. Powstaje w ten sposób kompleks ligand-receptor, który składa się z ligandu TGF β oraz heterotetrameru T β RI i T β RII [134]. Aktywowany kompleks przekazuje sygnał do wnętrza komórki za pośrednictwem białek SMAD, które ulegają fosforylacji. Fosfo-SMAD2 oraz fosfo-SMAD3 po połączeniu z SMAD4 tworzą kompleks, który w jądrze komórkowym, łącząc się z czynnikami transkrypcyjnymi, reguluje ekspresję genów związanych z aktywnością TGF β [135] (Ryc. 19). W przebiegu hiperglikemii, w obrębie kłębuszków nerkowych, w tym również w podocytach, zaobserwowano wzrost

ekspresji nie tylko samej cytokiny TGF β , ale również swoistego dla niej receptora T β RII [50,136], co podkreśla jego rolę w patogenezie zaburzeń nerkowych [137]. Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki sprawdziliśmy czy w podocytach działanie urolityny A na efekty zależne od TGF- β 1 oparte jest na zmianach ekspresji receptorów tej cytokiny.



Ryc. 19 Szlak sygnalizacyjny TGF β / SMAD [138].

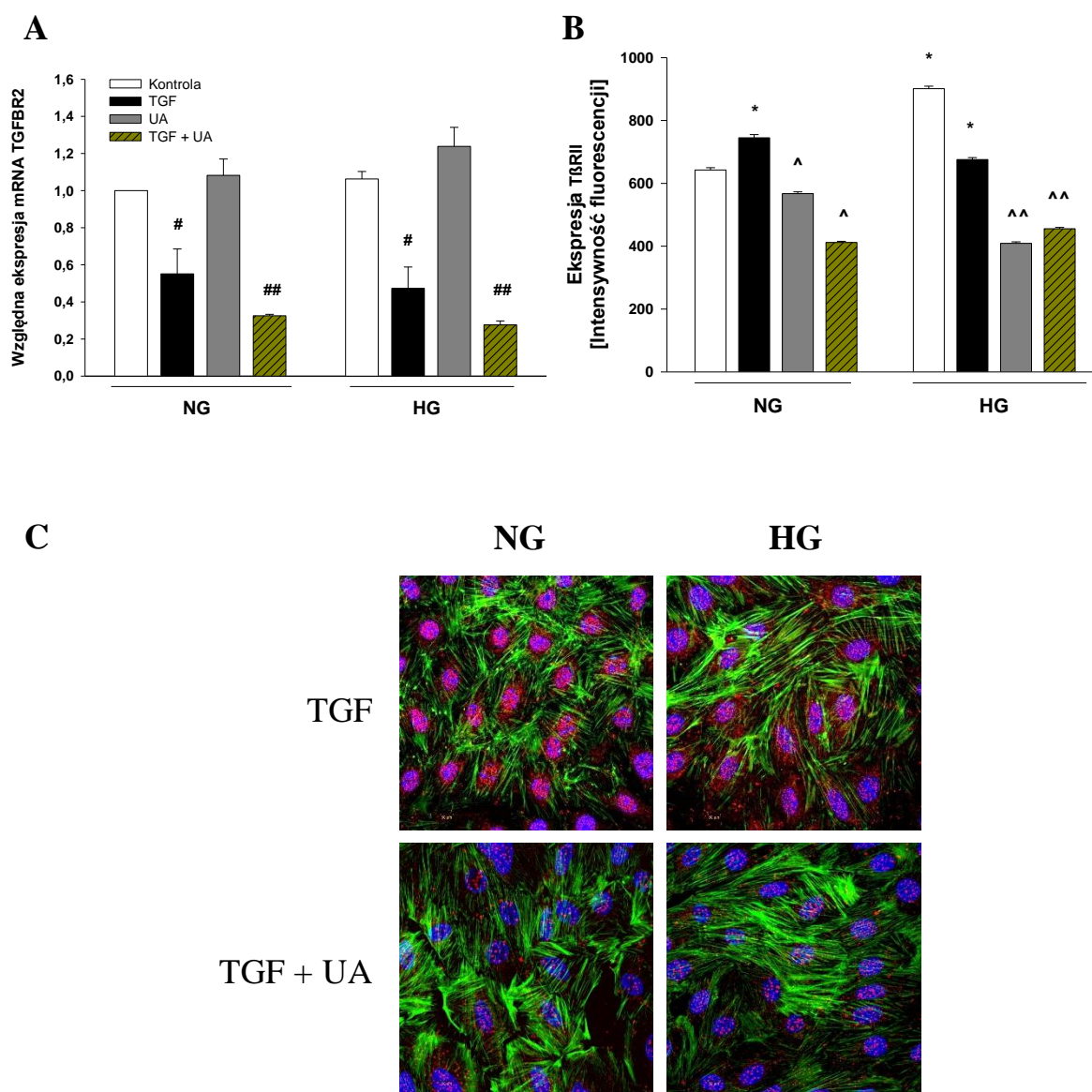
Pod wpływem wysokiego stężenia glukozy ekspresja białka receptora T β RI wyraźnie się zwiększyła (Ryc. 20 B), co w niewielkim stopniu znajdowało odbicie w ekspresji odpowiedniego mRNA, gdzie widoczny wzrost nie osiągnął jednak znamienności statystycznej (Ryc. 20 A). Zaobserwowaliśmy też, że bez względu na stężenie glukozy, inkubacja w obecności TGF- β 1 skutkowałą obniżeniem ekspresji receptora. Są wprawdzie doniesienia opisujące zwiększenie ekspresji własnych receptorów przez TGF β [139], ale dowiedziono też, że efekt ten zależy od czasu inkubacji komórek z cytokiną i po 24 godzinach obserwowano już zjawisko odwrotne [140], podobnie jak w naszych eksperymentach. W warunkach HG, w obecności TGF- β 1 urolityna A zmniejszyła ekspresję T β RI, co było szczególnie widoczne w odniesieniu do białka (Ryc. 20 B).



Ryc. 20 Urolityna A moduluje ekspresję receptora TβRI w podocytach. Podocyty inkubowano z badanymi czynnikami przez 24 godziny. Ilościowa analiza ekspresji mRNA TGFBR1 (genu dla receptora typu I) (A). Ilościowa analiza mikroskopowa (B). Komórki inkubowano z przeciwciałami (pierwszorzędowe: # PA5-32631, Invitrogen, USA; drugorzędowe: ab150079, Abcam, UK), zgodnie z procedurą opisaną w publikacji 2, po czym analizowano intensywność fluorescencji przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Liczba analizowanych komórek: 71 – 817. Dla A: * p<0,05 vs. odpowiednia Kontrola, ** p<0,001 vs. odpowiednia Kontrola, n = 3-9. Dla B: * p<0,001 vs. Kontrola NG, ** p<0,001 vs. Kontrola HG, ^ p<0,02 vs TGF HG, ^^ p<0,001 vs. TGF HG, n = 3.

Ciekawą obserwacją jest bardzo wyraźne zwiększenie ekspresji tego receptora w obecności samej UA, szczególnie w warunkach NG. Być może towarzyszą temu zmiany w innych elementach szlaku przekazywania sygnałów TGFβ. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują bowiem, że pomimo zwiększenia ekspresji TβRI, urolityna A w komórkach inkubowanych w NG działała przeciwstawnie do TGF-β1, jak to miało miejsce w przypadku regulacji migracji, ekspresji białek błony szczelinowej, czy fibronektyny. Z drugiej strony, można jednak przypuszczać, że obniżenie przez UA ekspresji receptora TβRI może mieć wpływ na hamowanie efektów TGF-β1 w warunkach HG. Tym nie mniej, ze względu na to, że aktywacja tego receptora następuje po związaniu ligandu przez TβRII, przebadano również wpływ UA na jego ekspresję.

Podobnie jak w przypadku TβRI, wysokie stężenie glukozy spowodowało istotny wzrost ekspresji białka TβRII (Ryc. 21 B), czemu towarzyszył nieznaczny wzrost ekspresji mRNA (Ryc. 21 A). 24-godzinna inkubacja podocytów w obecności TGF-β1 skutkowało obniżeniem ekspresji tego receptora, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, z wyjątkiem białka w komórkach inkubowanych w NG. Dodanie urolityny A do komórek inkubowanych w obecności TGF-β1 dodatkowo obniżyło ekspresję tego receptora, w tym również białka w grupie komórek NG. Podsumowując, **w warunkach odpowiadających hiperglikemii urolityna A obniżyła ekspresję receptorów TβRI i TβRII w podocytach poddanych działaniu TGF-β1.**

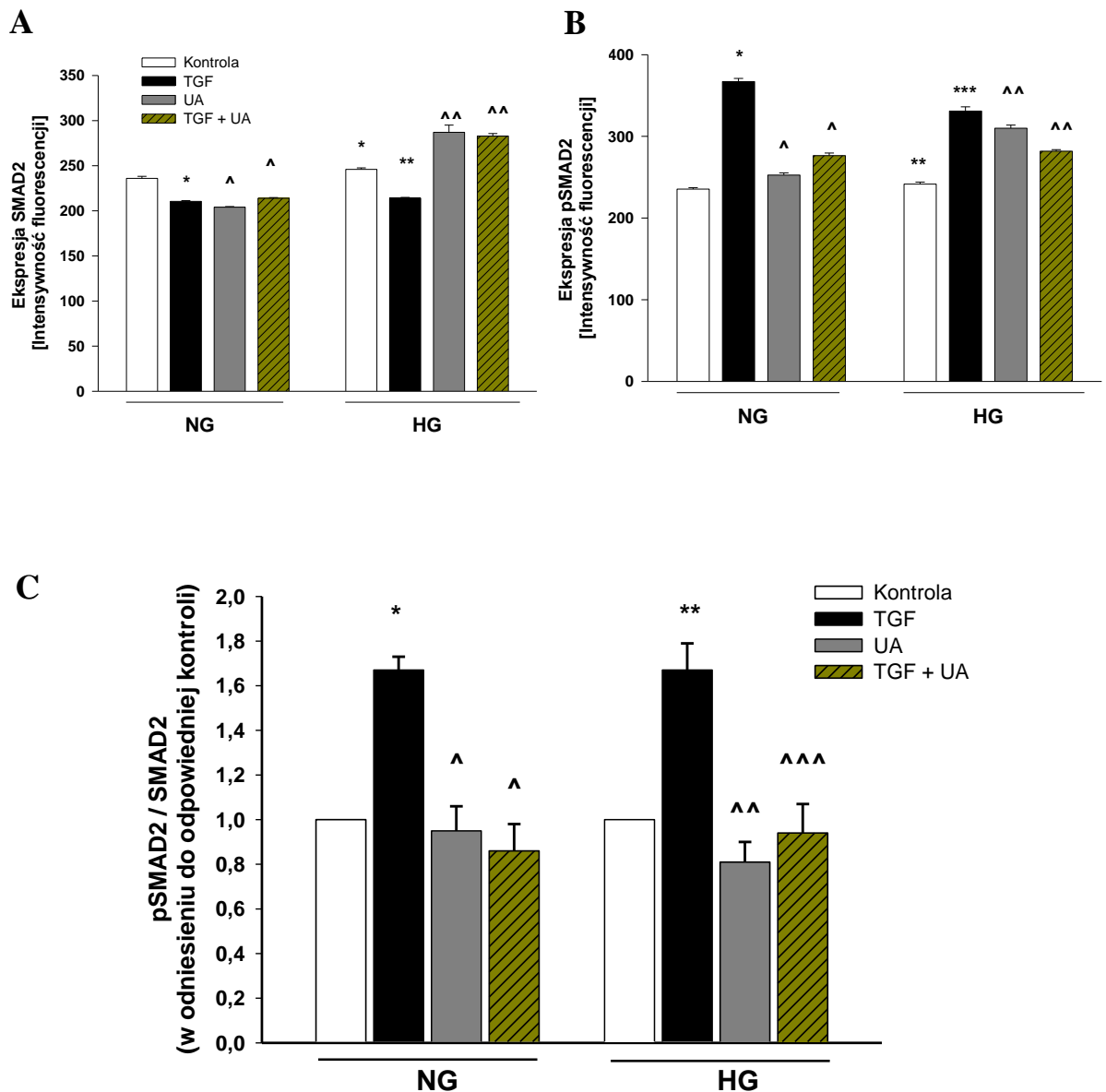


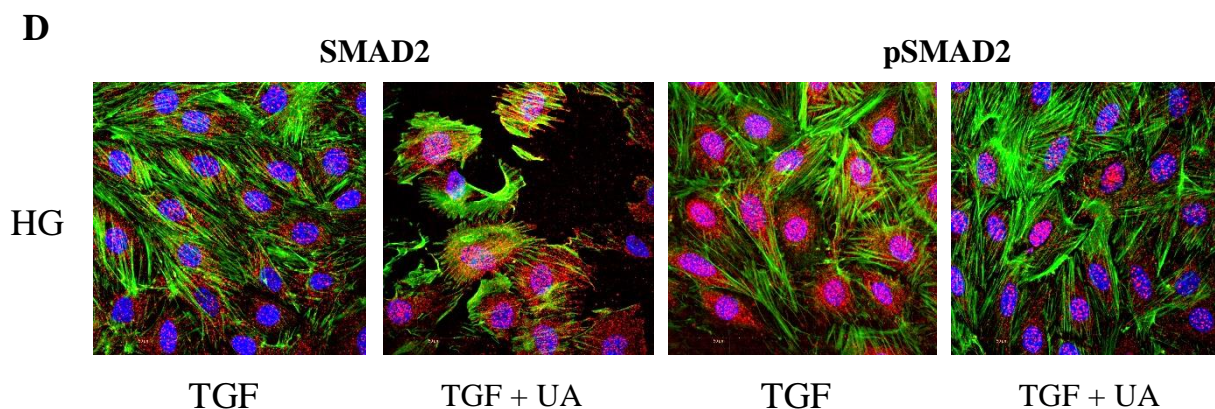
Ryc. 21 Urolityna A moduluje ekspresję receptora TβRII w podocytach. Podocyty inkubowano z badanymi czynnikami przez 24 godziny. Ilościowa analiza ekspresji mRNA TGFBR2 (genu dla receptora typu II) (A). Ilościowa analiza mikroskopowa (B). Komórki inkubowano z przeciwciałami (pierwszorzędowe: ab61213, Abcam, UK; drugorzędowe: ab150079, Abcam, UK), zgodnie z procedurą opisaną w publikacji 2, po czym analizowano intensywność fluorescencji przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Liczba analizowanych komórek: 845. (C) Przykładowe obrazy z barwienia immunofluorescencyjnego TβRII, TβRII, β-aktyna, jądra komórkowe. Dla A: # p<0,005 vs. odpowiednia Kontrola, ## p<0,0001 vs. odpowiednia Kontrola, n = 3-6. Dla B: * p<0,001 vs. Kontrola NG, ^ p<0,001 vs. Kontrola NG i TGF, ^^ p<0,001 vs. Kontrola HG i TGF, n = 3.

Biorąc pod uwagę, że aktywacja szlaku sygnałowego TGFβ zależy w pierwszej kolejności od wytworzenia kompleksu TGFβ/TβRII spadek ekspresji receptora II typu pod wpływem UA może być istotnym czynnikiem hamującym zmiany indukowane przez tę cytokinę.

9.3.6. Wpływ urolityny A na zależną od TGFβ aktywację białek SMAD

Białka z rodziny SMAD są głównymi cząsteczkami efektorowymi w szlaku sygnałowym TGFβ. Fosforylacja białka SMAD2 powoduje jego aktywację i jest kluczowa w tworzeniu trimerycznych kompleksów SMAD, które po translokacji do jądra komórkowego łączą się jądrowymi czynnikami transkrypcyjnymi, modulując w ten sposób transkrypcję genów [138]. W doświadczeniach *in vivo* i *in vitro* wykazano, że urolityny A i B mogą obniżać poziom ufosforylowanej formy SMAD 2/3 [80,98]. Wydawało się więc prawdopodobne, że również w naszych eksperymentach ten mechanizm może pośredniczyć w obserwowanych przez nas zmianach indukowanych przez UA w obecności TGF-β1.





Ryc. 22 Urolityna A hamuje aktywację szlaku sygnalizacyjnego SMAD w podocytach. Podocyty inkubowano z badanymi czynnikami przez 24 godziny. Analiza densytometryczna wyników Western blot. Wyniki przedstawione jako % kontroli pSMAD2/% kontroli SMAD2 (C). Ilościowa analiza mikroskopowa (A i B). Komórki inkubowano z przeciwciałami (pierwszorzędowe: przeciwciało anty SMAD2: # 51-1300, przeciwciało anty p-SMAD2: # 44-244G, Invitrogen, USA; drugorzędowe: ab150079, Abcam, UK), zgodnie z procedurą opisaną w publikacji 2, po czym analizowano intensywność fluorescencji przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Liczba analizowanych komórek: 550, n = 3-4. (D) Przykładowe obrazy z barwienia immunofluorescencyjnego SMAD2 i pSMA2. **SMAD2/pSMAD2, β-aktyna, jądra komórkowe** Dla A: * p<0,001 vs. Kontrola NG, ** p<0,001 vs. Kontrola NG i HG, ^ p<0,01 vs. TGF NG, ^^ p<0,001 vs. Kontrola HG i TGF, n = 3. Dla B: * P<0,001 vs. Kontrola NG, ** p<0,05 vs. Kontrola NG, ^ p<0,001 vs TGF NG, ^^ p<0,001 vs. TGF HG, n = 3. Dla C: * p<0,001 vs Kontrola NG, ^ p<0,005 vs. TGF, ** p<0,03 vs. Kontrola HG, ^^ p<0,05 vs. TGF HG, ^^^ p<0,005 vs. TGF HG.

Jak przedstawiono na Rycinie 22 A, po stymulacji przez TGF-β1, ekspresja SMAD2 obniżyła się w niewielkim, chociaż statystycznie znamionym stopniu, natomiast wzrosła w środowisku o wysokim stężeniu glukozy. W tych warunkach UA sama, a także w obecności TGF-β1, spowodowała istotny wzrost ekspresji tego białka. Z kolei ekspresja ufosforylowanej formy SMAD silnie wzrosła pod wpływem TGF-β1 (Ryc. 22 B), co zostało zahamowane przez UA. Zmiany poziomu aktywnej formy SMAD w odniesieniu do formy nieaktywnej (pSMAD/SMAD) przedstawiono na panelu C. Analiza ilościowa wyników Western blot jest zgodna z pomiarami immunofluorescencji i wskazuje, że zarówno w warunkach NG, jak i HG, **TGF-β1 silnie aktywuje sygnalizację zależną od SMAD, natomiast urolityna A hamuje ten efekt.** Obniżenie ekspresji SMAD2 w środowisku o normalnym stężeniu glukozy pod wpływem UA może wynikać z hamowania przez UA całego szlaku TGF-β1/SMAD np. poprzez zaobserwowane obniżenie ekspresji TβRII, bądź też wzrost ekspresji SMAD7, naturalnego inhibitora tego szlaku [80].

Podsumowując, przedstawione wyniki wskazują, że w podocytach inkubowanych w obecności glukozy o wysokim stężeniu urolityna A hamuje indukowane przez TGFβ zmiany prowadzące do zmiany fenotypu, właściwości i funkcji podocytów, co zestawiono w **Tabeli nr 1.**

	NG		HG	
	TGFβ	TGFβ + UA	TGFβ	TGFβ + UA
NEFRYNA	↓	↑	↓	↑
PODOCYNA	↓	↓	↓	↑
MIGRACJA	↑	↓	↑	↓
INTEGRYNA-β3	↑	b/z	↑	↓
FIBRONEKTYNA	↑	↑	↑	↓
TβRI	↓	↓	↓	↓
TβRII	↑	↓	↑	↓
pSMAD2/SMAD2	↑	↓	↑	↓

Tabela nr 1 Modulowanie przez urolitynę A efektów zależnych od TGFβ w podocytach poddanych działaniu normalnego i wysokiego stężenia glukozy. b/z: bez zmian w porównaniu z TGFβ.

Obniżeniu przez UA zdolności migracyjnych komórek towarzyszyło zmniejszenie zależnej od TGFβ-1 ekspresji fibronektyny i integryny-β3, co wskazuje na hamowanie przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej podocytów. To z kolei oznacza, że urolityna A chroni podocyty przed utratą fenotypu zróżnicowanych, wysoce wyspecjalizowanych komórek. Z kolei utrzymanie przez UA wysokiej ekspresji nefryny i podocyny w obecności TGF-β1 dowodzi, że urolityna stabilizuje strukturę błon szczelinowych, co może przyczynić się do zachowania prawidłowych funkcji podocytów. Jednocześnie można zauważyć, że przynajmniej część obserwowanych przez nas zmian, jak wzrost mobilności podocytów, ekspresji fibronektyny i integryny-β3, a także obniżenie ekspresji białek błony szczelinowej, indukowana jest nie tylko przez TGF-β1, ale też przez samą glukozę. Przedstawione tu przeciwstawne działanie urolityny A sugeruje, że związek ten nie tylko hamuje, ale i przynajmniej częściowo, odwraca efekty zależne od glukozy, ponieważ podocyty przez 7 dni pozostawały w warunkach hiperglikemii, a UA była dodawana dopiero w ostatniej dobie. Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje, można przypuszczać, że farmakologiczne skutki stosowania urolityny mogłyby polegać nie tylko na hamowaniu postępu podocytopatii cukrzycowej, ale być może łagodziłoby już powstałe zmiany w filtrze kłębuszkowym.

10. PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano wielokierunkowy wpływ urolityny A na komórki podocytarne. Ponadto wykazano, że w warunkach imitujących cukrzycę UA hamuje, a nawet odwraca uszkodzające podocyty zmiany indukowane przez glukozę o wysokim stężeniu. Dowiedziono też, że w warunkach hiperglikemii urolityna A może chronić komórki podocytarne przed niekorzystnym wpływem TGF β , który jest jednym z głównych czynników niszczących podocyty w cukrzycy. Najważniejsze spostrzeżenia przedstawione w niniejszej dysertacji są następujące:

- Urolityna A wywiera korzystniejsze efekty biologiczne w podocytach niż urolityna B.
- Urolityna A jest metabolizowana przez podocyty, przy czym w warunkach hiperglikemii proces ten zachodzi wolniej.
- Urolityny A i B w sposób zależny od stężenia regulują żywotność podocytów.
- W warunkach odpowiadających hiperglikemii urolityna A zwiększa żywotność komórek podocytarnych poprzez hamowanie apoptozy, stymulowanie autofagii i hamowanie produkcji wolnych rodników tlenowych.
- Urolityna A wywiera efekty przeciwstawne do działania glukozy o wysokim stężeniu oraz TGF- β 1:
 - hamując obniżanie ekspresji białek błony szczelinowej.
 - zmniejszając zdolność podocytów do migracji.
 - hamując przemianę nabłonkowo-mezenchymalną podocytów.
- Urolityna A wpływa na efekty wywierane przez TGF β przez regulowanie ekspresji receptorów tego białka oraz aktywności szlaku sygnalizacyjnego zależnego od białek SMAD.

Powyższe efekty urolityny A mogą w warunkach *in vivo* przekładać się na ochronę komórek podocytarnych przed czynnikami niszczącymi je w trakcie cukrzycy. Bezpośredni wpływ urolityny A na strukturę błony szczelinowej może przyczynić się do zachowania jej integralności. Działanie urolityny A może przede wszystkim skutkować redukcją białkomoczu i przedłużeniem prawidłowej funkcji nerek. Badania przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że urolityna A powinna być brana pod uwagę jako potencjalny lek chroniący nerki w podocytopatii cukrzycowej.

11. PIŚMIENICTWO

1. Sun, H.; Saeedi, P.; Karuranga, S.; Pinkepank, M.; Ogurtsova, K.; Duncan, B.B.; Stein, C.; Basit, A.; Chan, J.C.N.; Mbanya, J.C.; et al. IDF Diabetes Atlas: Global, Regional and Country-Level Diabetes Prevalence Estimates for 2021 and Projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2022**, *183*, 109119, doi:10.1016/j.diabres.2021.109119.
2. Tuttle, K.R.; Bakris, G.L.; Bilous, R.W.; Chiang, J.L.; de Boer, I.H.; Goldstein-Fuchs, J.; Hirsch, I.B.; Kalantar-Zadeh, K.; Narva, A.S.; Navaneethan, S.D.; et al. Diabetic Kidney Disease: A Report from an ADA Consensus Conference. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 2864–2883, doi:10.2337/dc14-1296.
3. Afkarian, M.; Sachs, M.C.; Kestenbaum, B.; Hirsch, I.B.; Tuttle, K.R.; Himmelfarb, J.; de Boer, I.H. Kidney Disease and Increased Mortality Risk in Type 2 Diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2013**, *24*, 302–308, doi:10.1681/ASN.2012070718.
4. Dembele, M.; Delafosse, M.; Yousfi, N.; Debiec, H.; Ngo, K.; Plaisier, E.; Ronco, P.; Perry, G. [Models of glomerular filtration barrier: New developments]. *Med. Sci. (Paris)*. **2021**, *37*, 242–248, doi:10.1051/medsci/2021010.
5. Pollak, M.R.; Quaggin, S.E.; Hoenig, M.P.; Dworkin, L.D. The Glomerulus: The Sphere of Influence. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2014**, *9*, 1461–1469, doi:10.2215/CJN.09400913.
6. Kriz, W.; Gretz, N.; Lemley, K. V. Progression of Glomerular Diseases: Is the Podocyte the Culprit? *Kidney Int.* **1998**, *54*, 687–697, doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00044.x.
7. Pavenstädt, H.; Kriz, W.; Kretzler, M. Cell Biology of the Glomerular Podocyte. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 253–307, doi:10.1152/physrev.00020.2002.
8. Lennon, R.; Randles, M.J.; Humphries, M.J. The Importance of Podocyte Adhesion for a Healthy Glomerulus. *Front. Endocrinol.* **2014**, *5*.
9. Jalanko, H. Pathogenesis of Proteinuria: Lessons Learned from Nephrin and Podocin. *Pediatr. Nephrol.* **2003**, *18*, 487–491.
10. Martin, C.E.; Jones, N. Nephrin Signaling in the Podocyte: An Updated View of Signal Regulation at the Slit Diaphragm and Beyond. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2018**, *9*, 1–12, doi:10.3389/fendo.2018.00302.
11. Li, X.; Chuang, P.Y.; D’Agati, V.D.; Dai, Y.; Yacoub, R.; Fu, J.; Xu, J.; Taku, O.; Premisrirut, P.K.; Holzman, L.B.; et al. Nephrin Preserves Podocyte Viability and Glomerular Structure and Function in Adult Kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *26*, 2361–2377, doi:10.1681/ASN.2014040405.
12. Verma, R.; Venkatareddy, M.; Kalinowski, A.; Li, T.; Kukla, J.; Mollin, A.; Cara-Fuentes, G.; Patel, S.R.; Garg, P. Nephrin Is Necessary for Podocyte Recovery Following Injury in an Adult Mature Glomerulus. *PLoS One* **2018**, *13*, e0198013, doi:10.1371/journal.pone.0198013.
13. Ruotsalainen, V.; Patrakka, J.; Tissari, P.; Reponen, P.; Hess, M.; Kestilä, M.; Holmberg, C.; Salonen, R.; Heikinheimo, M.; Wartiovaara, J.; et al. Role of Nephrin in Cell Junction Formation in Human Nephrogenesis. *Am. J. Pathol.* **2000**, *157*, 1905–1916, doi:10.1016/S0002-9440(10)64829-8.
14. Kestilä, M.; Lenkkeri, U.; Männikkö, M.; Lamerdin, J.; McCready, P.; Putaala, H.; Ruotsalainen, V.; Morita, T.; Nissinen, M.; Herva, R.; et al. Positionally Cloned Gene for a Novel Glomerular Protein--Nephrin--Is Mutated in Congenital Nephrotic Syndrome. *Mol. Cell* **1998**, *1*, 575–582, doi:10.1016/s1097-2765(00)80057-x.
15. Lenkkeri, U.; Männikkö, M.; McCready, P.; Lamerdin, J.; Gribouval, O.; Niaudet, P.M.; Antignac, C. K.; Kashtan, C.E.; Homberg, C.; Olsen, A.; et al. Structure of the Gene for Congenital Nephrotic Syndrome of the Finnish Type (NPHS1) and Characterization of Mutations. *Am. J. Hum. Genet.* **1999**, *64*, 51–61, doi:10.1086/302182.
16. Santín, S.; Bullich, G.; Tazón-Vega, B.; García-Maset, R.; Giménez, I.; Silva, I.; Ruiz, P.; Ballarín, J.; Torra, R.; Ars, E. Clinical Utility of Genetic Testing in Children and Adults with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2011**, *6*, 1139–1148, doi:10.2215/CJN.05260610.

17. Patrakka, J.; Kestilä, M.; Wartiovaara, J.; Ruotsalainen, V.; Tissari, P.; Lenkkeri, U.; Männikkö, M.; Visapää, I.; Holmberg, C.; Rapola, J.; et al. Congenital Nephrotic Syndrome (NPHS1): Features Resulting from Different Mutations in Finnish Patients. *Kidney Int.* **2000**, *58*, 972–980, doi:<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00254.x>.
18. Rantanen, M.; Palmén, T.; Pätäri, A.; Ahola, H.; Lehtonen, S.; A[Combining Ring Above]ström, E.; Floss, T.; Vauti, F.; Wurst, W.; Ruiz, P.; et al. Nephrin TRAP Mice Lack Slit Diaphragms and Show Fibrotic Glomeruli and Cystic Tubular Lesions. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2002**, *13*.
19. Mikó, Á.; K Menyhárd, D.; Kaposi, A.; Antignac, C.; Tory, K. The Mutation-Dependent Pathogenicity of NPHS2 p.R229Q: A Guide for Clinical Assessment. *Hum. Mutat.* **2018**, *39*, 1854–1860, doi:10.1002/humu.23660.
20. Huber, T.B.; Simons, M.; Hartleben, B.; Sernetz, L.; Schmidts, M.; Gundlach, E.; Saleem, M.A.; Walz, G.; Benzing, T. Molecular Basis of the Functional Podocin-Nephtrin Complex: Mutations in the NPHS2 Gene Disrupt Nephtrin Targeting to Lipid Raft Microdomains. *Hum. Mol. Genet.* **2003**, *12*, 3397–3405, doi:10.1093/hmg/ddg360.
21. Pitekova, B.; Bezdiccka, M.; Konopasek, P.; Breza, J.; Barton, P.; Zieg, J. Genetic Nephrotic Syndrome Associated with Disturbed Function of Glomerular Slit Membrane and Podocyte Cytoskeleton in Children. *Clin. Exp. Nephrol.* **2023**, *27*, 101–109, doi:10.1007/s10157-022-02305-x.
22. Uwaezuoke, S.N. Childhood Idiopathic Nephrotic Syndrome as a Podocytopathy. In: Rath, T., Ed.; IntechOpen: Rijeka, 2019; p. Ch. 3 ISBN 978-1-78984-314-9.
23. Shankland, S.J. The Podocyte's Response to Injury: Role in Proteinuria and Glomerulosclerosis. *Kidney Int.* **2006**, *69*, 2131–2147, doi:10.1038/sj.ki.5000410.
24. Mezu-Ndubuisi, O.J.; Maheshwari, A. The Role of Integrins in Inflammation and Angiogenesis. *Pediatr. Res.* **2021**, *89*, 1619–1626, doi:10.1038/s41390-020-01177-9.
25. Kubiak, A.; Niemir, Z.I. Znaczenie Podocytów w Prawidłowym Funkcjonowaniu Kłębuszka Nerkowego Oraz w Patogenezie Kłębuszkowych Zapaleń Nerek. Część I. Charakterystyka Fenotypowa i Czynność Podocytów w Okresie Ich Różnicowania Się i Dojrzałości. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2006**, *60*, 248–258.
26. Li, Z.; Zhang, L.; Shi, W.; Chen, Y.; Zhang, H.; Liu, S.; Liang, X.; Ling, T.; Yu, C.; Huang, Z.; et al. Spironolactone Inhibits Podocyte Motility via Decreasing Integrin B1 and Increasing Integrin B3 in Podocytes under High-Glucose Conditions. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 6849–6854, doi:10.3892/mmr.2015.4295.
27. Huttenlocher, A.; Horwitz, A.R. Integrins in Cell Migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a005074, doi:10.1101/cshperspect.a005074.
28. Kriz, W.; Shirato, I.; Nagata, M.; LeHir, M.; Lemley, K. V The Podocyte's Response to Stress: The Enigma of Foot Process Effacement. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2012**, *304*, F333–F347, doi:10.1152/ajprenal.00478.2012.
29. Endlich, N.; Siegerist, F.; Endlich, K. Are Podocytes Motile? *Pflugers Arch.* **2017**, *469*, 951–957, doi:10.1007/s00424-017-2016-9.
30. Maestroni, S.; Zerbini, G. Glomerular Endothelial Cells versus Podocytes as the Cellular Target in Diabetic Nephropathy. *Acta Diabetol.* **2018**, *55*, 1105–1111, doi:10.1007/s00592-018-1211-2.
31. McMillan, J.I.; Riordan, J.W.; Couser, W.G.; Pollock, A.S.; Lovett, D.H. Characterization of a Glomerular Epithelial Cell Metalloproteinase as Matrix Metalloproteinase-9 with Enhanced Expression in a Model of Membranous Nephropathy. *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 1094–1101, doi:10.1172/JCI118502.
32. Lasagni, L.; Lazzeri, E.; Shankland, S.J.; Anders, H.-J.; Romagnani, P. Podocyte Mitosis - a Catastrophe. *Curr. Mol. Med.* **2013**, *13*, 13–23, doi:10.2174/1566524011307010013.
33. Mundel, P.; Shankland, S.J. Podocyte Biology and Response to Injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2002**, *13*.
34. Stieger, N.; Worthmann, K.; Schiffer, M. The Role of Metabolic and Haemodynamic Factors in Podocyte Injury in Diabetes. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **2011**, *27*, 207–215, doi:10.1002/dmrr.1164.
35. Jefferson, J.A.; Shankland, S.J. The Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Adv. Chronic*

- Kidney Dis.* **2014**, *21*, 408–416, doi:10.1053/j.ackd.2014.05.009.
36. Pagtalunan, M.E.; Miller, P.L.; Jumping-Eagle, S.; Nelson, R.G.; Myers, B.D.; Rennke, H.G.; Coplon, N.S.; Sun, L.; Meyer, T.W. Podocyte Loss and Progressive Glomerular Injury in Type II Diabetes. *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 342–348, doi:10.1172/JCI119163.
 37. Kriz, W. Podocyte Is the Major Culprit Accounting for the Progression of Chronic Renal Disease. *Microsc. Res. Tech.* **2002**, *57*, 189–195, doi:10.1002/jemt.10072.
 38. Kravets, I.; Mallipattu, S.K. The Role of Podocytes and Podocyte-Associated Biomarkers in Diagnosis and Treatment of Diabetic Kidney Disease. *J. Endocr. Soc.* **2020**, *4*, bvaa029, doi:10.1210/jendso/bvaa029.
 39. Wiggins, R.-C. The Spectrum of Podocytopathies: A Unifying View of Glomerular Diseases. *Kidney Int.* **2007**, *71*, 1205–1214, doi:10.1038/sj.ki.5002222.
 40. White, K. Glomerular Structure in Diabetes - Can It Predict the Future? *Am. J. Nephrol.* **2015**, *41*, 275–276, doi:10.1159/000430850.
 41. Ighodaro, O.M. Molecular Pathways Associated with Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *108*, 656–662, doi:https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.058.
 42. Vinod, P.B. Pathophysiology of Diabetic Nephropathy. *Clin. Queries Nephrol.* **2012**, *1*, 121–126, doi:https://doi.org/10.1016/S2211-9477(12)70005-5.
 43. White, K.E.; Bilous, R.W.; Marshall, S.M.; El Nahas, M.; Remuzzi, G.; Piras, G.; De Cosmo, S.; Viberti, G. Podocyte Number in Normotensive Type 1 Diabetic Patients with Albuminuria. *Diabetes* **2002**, *51*, 3083–3089, doi:10.2337/diabetes.51.10.3083.
 44. Susztak K; Raff AC; Schiffer M; Böttinger EP Glucose-Induced Reactive Oxygen Species Cause Apoptosis of Podocytes and Podocyte Depletion at the Onset of Diabetic Nephropathy. *Diabetes* **2006**, *55*, 225–233.
 45. Campbell, K.N.; Tumlin, J.A. Protecting Podocytes: A Key Target for Therapy of Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Am. J. Nephrol.* **2018**, *47*, 14–29, doi:10.1159/000481634.
 46. Jim, B.; Ghanta, M.; Qipo, A.; Fan, Y.; Chuang, P.Y.; Cohen, H.W.; Abadi, M.; Thomas, D.B.; He, J.C. Dysregulated Nephlin in Diabetic Nephropathy of Type 2 Diabetes: A Cross Sectional Study. *PLoS One* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0036041.
 47. Lu, X.Y.; Liu, B.C.; Cao, Y.Z.; Song, C.; Su, H.; Chen, G.; Klein, J.D.; Zhang, H.X.; Wang, L.H.; Ma, H.P. High Glucose Reduces Expression of Podocin in Cultured Human Podocytes by Stimulating TRPC6. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **2019**, *317*, F1605–F1611, doi:10.1152/ajprenal.00215.2019.
 48. Wang, X.B.; Zhu, H.; Song, W.; Su, J.H. Gremlin Regulates Podocyte Apoptosis via Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Pathway in Diabetic Nephropathy. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 183–189, doi:10.12659/MSM.905758.
 49. Wang, L.; Wang, H.-L.; Liu, T.-T.; Lan, H.-Y. TGF-Beta as a Master Regulator of Diabetic Nephropathy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22157881.
 50. Iglesias-de la Cruz, M.C.; Ziyadeh, F.N.; Isono, M.; Kouahou, M.; Han, D.C.; Kalluri, R.; Mundel, P.; Chen, S. Effects of High Glucose and TGF- β 1 on the Expression of Collagen IV and Vascular Endothelial Growth Factor in Mouse Podocytes. *Kidney Int.* **2002**, *62*, 901–913, doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00528.x.
 51. Li, M.O.; Wan, Y.Y.; Sanjabi, S.; Robertson, A.-K.L.; Flavell, R.A. Transforming Growth Factor-Beta Regulation of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **2006**, *24*, 99–146, doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737.
 52. Böttinger, E.P.; Bitzer, M. TGF- β Signaling in Renal Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2002**, *13*, 2600–2610, doi:10.1097/01.ASN.0000033611.79556.AE.
 53. Huang, H.; Lin, X.; You, Y.; Tang, C.; Gu, X.; Huang, M.; Qin, Y.; Tan, J.; Huang, F. Inhibition of TRPC6 Signal Pathway Alleviates Podocyte Injury Induced by TGF-B1. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *41*, 163–172, doi:10.1159/000455985.

54. Hills, C.E.; Squires, P.E. TGF-Beta1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Therapeutic Intervention in Diabetic Nephropathy. *Am. J. Nephrol.* **2010**, *31*, 68–74, doi:10.1159/000256659.
55. Zhang, L.; Wen, Z.; Han, L.; Zheng, Y.; Wei, Y.; Wang, X.; Wang, Q.; Fang, X.; Zhao, L.; Tong, X. Research Progress on the Pathological Mechanisms of Podocytes in Diabetic Nephropathy. *J. Diabetes Res.* **2020**, *2020*, 7504798, doi:10.1155/2020/7504798.
56. Marshall, S.M. The Podocyte: A Potential Therapeutic Target in Diabetic Nephropathy? *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 2713–2720, doi:10.2174/138161207781662957.
57. Liu, N.; Xu, L.; Shi, Y.; Zhuang, S. Podocyte Autophagy: A Potential Therapeutic Target to Prevent the Progression of Diabetic Nephropathy. *J. Diabetes Res.* **2017**, *2017*, 3560238, doi:10.1155/2017/3560238.
58. Barutta, F.; Bellini, S.; Gruden, G. Mechanisms of Podocyte Injury and Implications for Diabetic Nephropathy. *Clin. Sci. (Lond.)* **2022**, *136*, 493–520, doi:10.1042/CS20210625.
59. Aaltonen, P.; Luimula, P.; Åström, E.; Palmén, T.; Grönholm, T.; Palojoki, E.; Jaakkola, I.; Ahola, H.; Tikkanen, I.; Holthöfer, H. Changes in the Expression of Nephritin Gene and Protein in Experimental Diabetic Nephropathy. *Lab. Invest.* **2001**, *81*, 1185–1190, doi:10.1038/labinvest.3780332.
60. Espín, J.C.; Larrosa, M.; García-Conesa, M.T.; Tomás-Barberán, F. Biological Significance of Urolithins, the Gut Microbial Ellagic Acid-Derived Metabolites: The Evidence so Far. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, doi:10.1155/2013/270418.
61. Gramec Skledar, D.; Tomašič, T.; Sollner Dolenc, M.; Peterlin Mašič, L.; Zega, A. Evaluation of Endocrine Activities of Ellagic Acid and Urolithins Using Reporter Gene Assays. *Chemosphere* **2019**, *220*, 706–713, doi:10.1016/j.chemosphere.2018.12.185.
62. García-Villalba, R.; Giménez-Bastida, J.A.; Cortés-Martín, A.; Ávila-Gálvez, M.Á.; Tomás-Barberán, F.A.; Selma, M.V.; Espín, J.C.; González-Sarrías, A. Urolithins: A Comprehensive Update on Their Metabolism, Bioactivity, and Associated Gut Microbiota. *Mol. Nutr. Food Res.* **2022**, *n/a*, 2101019, doi:https://doi.org/10.1002/mnfr.202101019.
63. Ávila-Gálvez, M.Á.; Espín, J.C.; González-Sarrías, A. Physiological Relevance of the Antiproliferative and Estrogenic Effects of Dietary Polyphenol Aglycones versus Their Phase-II Metabolites on Breast Cancer Cells: A Call of Caution. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 8547–8555, doi:10.1021/acs.jafc.8b03100.
64. García-Villalba, R.; Beltrán, D.; Frutos, M.D.; Selma, M. V; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. Metabolism of Different Dietary Phenolic Compounds by the Urolithin-Producing Human-Gut Bacteria *Gordonibacter Urolithinfaciens* and *Ellagibacter Isourolithinfaciens*. *Food Funct.* **2020**, *11*, 7012–7022, doi:10.1039/d0fo01649g.
65. Hasheminezhad, S.H.; Boozari, M.; Iranshahi, M.; Yazarlu, O.; Sahebkar, A.; Hasanpour, M.; Iranshahi, M. A Mechanistic Insight into the Biological Activities of Urolithins as Gut Microbial Metabolites of Ellagitannins. *Phytother. Res.* **2022**, *36*, 112–146, doi:10.1002/ptr.7290.
66. Tomás-Barberán, F.A.; González-Sarrías, A.; García-Villalba, R.; Núñez-Sánchez, M.A.; Selma, M. V.; García-Conesa, M.T.; Espín, J.C. Urolithins, the Rescue of “Old” Metabolites to Understand a “New” Concept: Metabotypes as a Nexus among Phenolic Metabolism, Microbiota Dysbiosis, and Host Health Status. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*, doi:10.1002/mnfr.201500901.
67. Bialonska, D.; Kasimsetty, S.G.; Khan, S.I.; Ferreira, D. Urolithins, Intestinal Microbial Metabolites of Pomegranate Ellagitannins, Exhibit Potent Antioxidant Activity in a Cell-Based Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10181–10186, doi:10.1021/jf9025794.
68. Verzelloni, E.; Pellacani, C.; Tagliazucchi, D.; Tagliaferri, S.; Calani, L.; Costa, L.G.; Brighenti, F.; Borges, G.; Crozier, A.; Conte, A.; et al. Antigliocative and Neuroprotective Activity of Colon-Derived Polyphenol Catabolites. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 35–43, doi:10.1002/mnfr.201000525.
69. Giménez-Bastida, J.A.; González-Sarrías, A.; Larrosa, M.; Tomás-Barberán, F.; Espín, J.C.; García-Conesa, M.T. Ellagitannin Metabolites, Urolithin A Glucuronide and Its Aglycone Urolithin A, Ameliorate TNF- α -Induced Inflammation and Associated Molecular Markers in Human Aortic Endothelial Cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 784–796, doi:10.1002/mnfr.201100677.

70. González-Sarriás, A.; Larrosa, M.; Tomás-Barberán, F.A.; Dolara, P.; Espín, J.C. NF-KappaB-Dependent Anti-Inflammatory Activity of Urolithins, Gut Microbiota Ellagic Acid-Derived Metabolites, in Human Colonic Fibroblasts. *Br. J. Nutr.* **2010**, *104*, 503–512, doi:10.1017/S0007114510000826.
71. Giménez-Bastida, J.A.; Larrosa, M.; González-Sarriás, A.; Tomás-Barberán, F.; Espín, J.C.; García-Conesa, M.-T. Intestinal Ellagitannin Metabolites Ameliorate Cytokine-Induced Inflammation and Associated Molecular Markers in Human Colon Fibroblasts. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 8866–8876, doi:10.1021/jf300290f.
72. González-Sarriás, A.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A.; García-Conesa, M.T. Gene Expression, Cell Cycle Arrest and MAPK Signalling Regulation in Caco-2 Cells Exposed to Ellagic Acid and Its Metabolites, Urolithins. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, doi:10.1002/mnfr.200800150.
73. Sharma, M.; Li, L.; Cerver, J.; Killian, C.; Koor, A.; Seeram, N.P. Effects of Fruit Ellagitannin Extracts, Ellagic Acid, and Their Colonic Metabolite, Urolithin A, on Wnt Signaling. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3965–3969, doi:10.1021/jf902857v.
74. Kasimsetty, S.G.; Bialonska, D.; Reddy, M.K.; Ma, G.; Khan, S.I.; Ferreira, D. Colon Cancer Chemopreventive Activities of Pomegranate Ellagitannins and Urolithins. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 2180–2187, doi:10.1021/jf903762h.
75. Furlanetto, V.; Zagotto, G.; Pasquale, R.; Moro, S.; Gatto, B. Ellagic Acid and Polyhydroxylated Urolithins Are Potent Catalytic Inhibitors of Human Topoisomerase II: An in Vitro Study. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 9162–9170, doi:10.1021/jf302600q.
76. Cozza, G.; Gianoncelli, A.; Bonvini, P.; Zorzi, E.; Pasquale, R.; Rosolen, A.; Pinna, L.A.; Meggio, F.; Zagotto, G.; Moro, S. Urolithin as a Converging Scaffold Linking Ellagic Acid and Coumarin Analogues: Design of Potent Protein Kinase CK2 Inhibitors. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2273–2286, doi:10.1002/cmdc.201100338.
77. Giménez-Bastida, J.A.; Truchado, P.; Larrosa, M.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A.; Allende, A.; García-Conesa, M.T. Urolithins, Ellagitannin Metabolites Produced by Colon Microbiota, Inhibit Quorum Sensing in *Yersinia Enterocolitica*: Phenotypic Response and Associated Molecular Changes. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1465–1474, doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.003.
78. Larrosa, M.; González-Sarriás, A.; García-Conesa, M.T.; Tomás-Barberán, F.A.; Espín, J.C. Urolithins, Ellagic Acid-Derived Metabolites Produced by Human Colonic Microflora, Exhibit Estrogenic and Antiestrogenic Activities. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1611–1620, doi:10.1021/jf0527403.
79. Kotewicz, M.; Lewko, B. Urolithins and Their Possible Implications for Diabetic Kidney. *Eur. J. Transl. Clin. Med.* **0**, doi:10.31373/ejtc/137918.
80. Cheng, Z.; Tu, J.; Zhang, H.; Zhang, Y.; Zhou, B. Urolithin A Attenuates Renal Fibrosis by Inhibiting TGF- β 1/Smad and MAPK Signaling Pathways. *J. Funct. Foods* **2021**, *83*, 104547, doi:https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104547.
81. Vini, R.; Azeez, J.M.; Remadevi, V.; Susmi, T.R.; Ayswarya, R.S.; Sujatha, A.S.; Muraleedharan, P.; Lathika, L.M.; Sreeharshan, S. Urolithins: The Colon Microbiota Metabolites as Endocrine Modulators: Prospects and Perspectives. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 800990, doi:10.3389/fnut.2021.800990.
82. Tow, W.-K.; Chee, P.-Y.; Sundralingam, U.; Palanisamy, U.D. The Therapeutic Relevance of Urolithins, Intestinal Metabolites of Ellagitannin-Rich Food: A Systematic Review of In Vivo Studies. *Nutrients* **2022**, *14*.
83. D'Amico, D.; Andreux, P.A.; Valdés, P.; Singh, A.; Rinsch, C.; Auwerx, J. Impact of the Natural Compound Urolithin A on Health, Disease, and Aging. *Trends Mol. Med.* **2021**, *27*, 687–699, doi:10.1016/j.molmed.2021.04.009.
84. Andreux, P.A.; Blanco-Bose, W.; Ryu, D.; Burdet, F.; Ibberson, M.; Aebischer, P.; Auwerx, J.; Singh, A.; Rinsch, C. The Mitophagy Activator Urolithin A Is Safe and Induces a Molecular Signature of Improved Mitochondrial and Cellular Health in Humans. *Nat. Metab.* **2019**, *1*, 595–603, doi:10.1038/s42255-019-0073-4.
85. Djedjibegovic, J.; Marjanovic, A.; Panieri, E.; Saso, L. Ellagic Acid-Derived Urolithins as Modulators of Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 5194508, doi:10.1155/2020/5194508.

86. Krtil, J.; Pláteník, J.; Kazderová, M.; Tesar, V.; Zima, T. Culture Methods of Glomerular Podocytes. *Kidney Blood Press. Res.* **2007**, *30*, 162–174, doi:10.1159/000102520.
87. Kotewicz, M.; Krauze-Baranowska, M.; Daca, A.; Płoska, A.; Godlewska, S.; Kalinowski, L.; Lewko, B. Urolithins Modulate the Viability, Autophagy, Apoptosis, and Nephron Turnover in Podocytes Exposed to High Glucose. *Cells* **2022**, *11*.
88. Sala, R.; Mena, P.; Savi, M.; Brighenti, F.; Crozier, A.; Miragoli, M.; Stilli, D.; Del Rio, D. Urolithins at Physiological Concentrations Affect the Levels of Pro-Inflammatory Cytokines and Growth Factor in Cultured Cardiac Cells in Hyperglucidic Conditions. *J. Funct. Foods* **2015**, *15*, 97–105, doi:10.1016/j.jff.2015.03.019.
89. Suarez-Arnedo, A.; Torres Figueroa, F.; Clavijo, C.; Arbeláez, P.; Cruz, J.C.; Muñoz-Camargo, C. An Image J Plugin for the High Throughput Image Analysis of in Vitro Scratch Wound Healing Assays. *PLoS One* **2020**, *15*, e0232565, doi:10.1371/journal.pone.0232565.
90. Ávila-Gálvez, M.A.; Giménez-Bastida, J.A.; González-Sarrías, A.; Espín, J.C. Tissue Deconjugation of Urolithin A Glucuronide to Free Urolithin A in Systemic Inflammation. *Food Funct.* **2019**, *10*, 3135–3141, doi:10.1039/c9fo00298g.
91. Adachi, S.; Sasaki, K.; Kondo, S.; Komatsu, W.; Yoshizawa, F.; Isoda, H.; Yagasaki, K. Antihyperuricemic Effect of Urolithin A in Cultured Hepatocytes and Model Mice. *Molecules* **2020**, *25*, 5136, doi:10.3390/molecules25215136.
92. Abdelazeem, K.N.M.; Kalo, M.Z.; Beer-Hammer, S.; Lang, F. The Gut Microbiota Metabolite Urolithin A Inhibits NF-KB Activation in LPS Stimulated BMDMs. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 7117, doi:10.1038/s41598-021-86514-6.
93. Cásedas, G.; Les, F.; Choya-Foces, C.; Hugo, M.; López, V. The Metabolite Urolithin-A Ameliorates Oxidative Stress in Neuro-2a Cells, Becoming a Potential Neuroprotective Agent. *Antioxidants* **2020**, *9*, 177, doi:10.3390/antiox9020177.
94. Thorburn, A. Apoptosis and Autophagy: Regulatory Connections between Two Supposedly Different Processes. *Apoptosis* **2008**, *13*, 1–9, doi:10.1007/s10495-007-0154-9.
95. Yoshii, S.R.; Mizushima, N. Monitoring and Measuring Autophagy. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, doi:10.3390/ijms18091865.
96. Zhang, X.; Chen, S.; Huang, K.; Le, W. Why Should Autophagic Flux Be Assessed? *Acta Pharmacol. Sin.* **2013**, *34*, 595–599, doi:10.1038/aps.2012.184.
97. Nakaso, K.; Yoshimoto, Y.; Nakano, T.; Takeshima, T.; Fukuhara, Y.; Yasui, K.; Araga, S.; Yanagawa, T.; Ishii, T.; Nakashima, K. Transcriptional Activation of P62/A170/ZIP during the Formation of the Aggregates: Possible Mechanisms and the Role in Lewy Body Formation in Parkinson's Disease. *Brain Res.* **2004**, *1012*, 42–51, doi:10.1016/j.brainres.2004.03.029.
98. Li, Q.; Li, K.; Chen, Z.; Zhou, B. Anti-Renal Fibrosis and Anti-Inflammation Effect of Urolithin B, Ellagitannin-Gut Microbial-Derived Metabolites in Unilateral Ureteral Obstruction Rats. *J. Funct. Foods* **2020**, *65*, 103748, doi:https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103748.
99. Doublier, S.; Salvidio, G.; Lupia, E.; Ruotsalainen, V.; Verzola, D.; Deferrari, G.; Camussi, G. Nephron Expression Is Reduced in Human Diabetic Nephropathy: Evidence for a Distinct Role for Glycated Albumin and Angiotensin II. *Diabetes* **2003**, *52*, 1023–1030, doi:10.2337/diabetes.52.4.1023.
100. Li, C.; Siragy, H.M. High Glucose Induces Podocyte Injury via Enhanced (Pro)Renin Receptor-Wnt- β -Catenin-Snail Signaling Pathway. *PLoS One* **2014**, *9*, e89233, doi:10.1371/journal.pone.0089233.
101. Herman-Edelstein, M.; Weinstein, T.; Gafer, U. TGF β 1-Dependent Podocyte Dysfunction. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2013**, *22*, 93–99, doi:10.1097/MNH.0b013e32835b4870.
102. Lee, H.S. Mechanisms and Consequences of TGF- β Overexpression by Podocytes in Progressive Podocyte Disease. *Cell Tissue Res.* **2012**, *347*, 129–140, doi:10.1007/s00441-011-1169-7.
103. Li, Y.; Kang, Y.S.; Dai, C.; Kiss, L.P.; Wen, X.; Liu, Y. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is a Potential Pathway Leading to Podocyte Dysfunction and Proteinuria. *Am. J. Pathol.* **2008**, *172*, 299–308, doi:10.2353/ajpath.2008.070057.

104. Abu Hamad, R.; Berman, S.; Hachmo, Y.; Stark, M.; Hasan, F.; Doenyas-Barak, K.; Efrati, S. Response of Renal Podocytes to Excessive Hydrostatic Pressure: A Pathophysiologic Cascade in a Malignant Hypertension Model. *Kidney Blood Press. Res.* **2017**, *42*, 1104–1118, doi:10.1159/000485774.
105. Fukuda, H.; Hidaka, T.; Takagi-Akiba, M.; Ichimura, K.; Oliva Trejo, J.A.; Sasaki, Y.; Wang, J.; Sakai, T.; Asanuma, K.; Tomino, Y. Podocin Is Translocated to Cytoplasm in Puromycin Aminonucleoside Nephrosis Rats and in Poor-Prognosis Patients with IgA Nephropathy. *Cell Tissue Res.* **2015**, *360*, 391–400, doi:10.1007/s00441-014-2100-9.
106. Bouchireb, K.; Boyer, O.; Gribouval, O.; Nevo, F.; Huynh-Cong, E.; Morinière, V.; Campait, R.; Ars, E.; Brackman, D.; Dantal, J.; et al. NPHS2 Mutations in Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome: A Mutation Update and the Associated Phenotypic Spectrum. *Hum. Mutat.* **2014**, *35*, 178–186, doi:10.1002/humu.22485.
107. Roselli, S.; Moutkine, I.; Gribouval, O.; Benmerah, A.; Antignac, C. Plasma Membrane Targeting of Podocin Through the Classical Exocytic Pathway: Effect of NPHS2 Mutations. *Traffic* **2004**, *5*, 37–44, doi:https://doi.org/10.1046/j.1600-0854.2003.00148.x.
108. Pätäri-Sampo, A.; Ihalmo, P.; Holthöfer, H. Molecular Basis of the Glomerular Filtration: Nephlin and the Emerging Protein Complex at the Podocyte Slit Diaphragm. *Ann. Med.* **2006**, *38*, 483–492, doi:10.1080/07853890600978149.
109. He, F.F.; Bao, D.; Su, H.; Wang, Y.M.; Lei, C.T.; Zhang, C.Y.; Ye, C.; Tang, H.; Wan, C.; You, C.Q.; et al. IL-6 Increases Podocyte Motility via MLC-Mediated Focal Adhesion Impairment and Cytoskeleton Disassembly. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 7173–7181, doi:10.1002/jcp.26546.
110. Greka, A.; Mundel, P. Cell Biology and Pathology of Podocytes. *Annu. Rev. Physiol.* **2012**, *74*, 299–323, doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153238.
111. Ding, W.Y.; Saleem, M.A. Current Concepts of the Podocyte in Nephrotic Syndrome. *Kidney Res. Clin. Pract.* **2012**, *31*, 87–93, doi:https://doi.org/10.1016/j.krcp.2012.04.323.
112. Chen, C.A.; Chang, J.M.; Chang, E.E.; Chen, H.C.; Yang, Y.L. TGF-B1 Modulates Podocyte Migration by Regulating the Expression of Integrin-B1 and -B3 through Different Signaling Pathways. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *105*, 974–980, doi:10.1016/j.biopha.2018.06.054.
113. Lee, E.Y.; Chung, C.H.; Khoury, C.C.; Yeo, T.K.; Pyagay, P.E.; Wang, A.; Chen, S. The Monocyte Chemoattractant Protein-1/CCR2 Loop, Inducible by TGF-Beta, Increases Podocyte Motility and Albumin Permeability. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2009**, *297*, F85-94, doi:10.1152/ajprenal.90642.2008.
114. Al-Harbi, S.A.; Abdulrahman, A.O.; Zamzami, M.A.; Khan, M.I. Urolithins: The Gut Based Polyphenol Metabolites of Ellagitannins in Cancer Prevention, a Review. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, doi:10.3389/fnut.2021.647582.
115. Hamidi, H.; Ivaska, J. Every Step of the Way: Integrins in Cancer Progression and Metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 533–548, doi:10.1038/s41568-018-0038-z.
116. Margadant, C.; Sonnenberg, A. Integrin-TGF-Beta Crosstalk in Fibrosis, Cancer and Wound Healing. *EMBO Rep.* **2010**, *11*, 97–105, doi:10.1038/embor.2009.276.
117. Schordan, S.; Schordan, E.; Endlich, K.; Endlich, N. AlphaV-Integrins Mediate the Mechanoprotective Action of Osteopontin in Podocytes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2011**, *300*, F119-32, doi:10.1152/ajprenal.00143.2010.
118. Wei, C.; Möller, C.C.; Altintas, M.M.; Li, J.; Schwarz, K.; Zacchigna, S.; Xie, L.; Henger, A.; Schmid, H.; Rastaldi, M.P.; et al. Modification of Kidney Barrier Function by the Urokinase Receptor. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 55–63, doi:10.1038/nm1696.
119. Kitsiou, P. V.; Tzinia, A.K.; Stetler-Stevenson, W.G.; Michael, A.F.; Fan, W.-W.; Zhou, B.; Tsilibary, E.C. Glucose-Induced Changes in Integrins and Matrix-Related Functions in Cultured Human Glomerular Epithelial Cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2003**, *284*, F671-9, doi:10.1152/ajprenal.00266.2002.
120. WALSH, J.E.; YOUNG, M.R.I. Interrelationship Between Protein Phosphatase 1 and TGF-β in

- Regulating Motility and Cytoskeletal Architecture of Endothelial Cells. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 4861 LP – 4866.
121. Bakin, A. V.; Safina, A.; Rinehart, C.; Daroqui, C.; Darbary, H.; Helfman, D.M. A Critical Role of Tropomyosins in TGF- β Regulation of the Actin Cytoskeleton and Cell Motility in Epithelial Cells. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 4682–4694, doi:10.1091/mbc.e04-04-0353.
 122. Anil Kumar, P.; Welsh, G.I.; Saleem, M.A.; Menon, R.K. Molecular and Cellular Events Mediating Glomerular Podocyte Dysfunction and Depletion in Diabetes Mellitus. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2014**, *5*, 151, doi:10.3389/fendo.2014.00151.
 123. Ying, Q.; Wu, G. Molecular Mechanisms Involved in Podocyte EMT and Concomitant Diabetic Kidney Diseases: An Update. *Ren. Fail.* **2017**, *39*, 474–483, doi:10.1080/0886022X.2017.1313164.
 124. Radisky, D.C. Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 4325–4326, doi:10.1242/jcs.02552.
 125. Reidy, K.; Susztak, K. Epithelial-Mesenchymal Transition and Podocyte Loss in Diabetic Kidney Disease. *Am. J. Kidney Dis.* **2009**, *54*, 590–593, doi:10.1053/j.ajkd.2009.07.003.
 126. Kang, Y.S.; Li, Y.; Dai, C.; Kiss, L.P.; Wu, C.; Liu, Y. Inhibition of Integrin-Linked Kinase Blocks Podocyte Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Ameliorates Proteinuria. *Kidney Int.* **2010**, *78*, 363–373, doi:10.1038/ki.2010.137.
 127. Cheng, F.; Dou, J.; Zhang, Y.; Wang, X.; Wei, H.; Zhang, Z.; Cao, Y.; Wu, Z. Urolithin A Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells via P53-Mdm2-Snail Pathway. *Onco. Targets. Ther.* **2021**, *14*, 3199–3208, doi:10.2147/OTT.S305595.
 128. Zhao, W.; Shi, F.; Guo, Z.; Zhao, J.; Song, X.; Yang, H. Metabolite of Ellagitannins, Urolithin A Induces Autophagy and Inhibits Metastasis in Human Sw620 Colorectal Cancer Cells. *Mol. Carcinog.* **2018**, *57*, 193–200, doi:10.1002/mc.22746.
 129. Odoni, G.; Ritz, E. Diabetic Nephropathy--What Have We Learned in the Last Three Decades? *J. Nephrol.* **1999**, *12 Suppl 2*, S120-4.
 130. Ling, L.; Chen, L.; Zhang, C.; Gui, S.; Zhao, H.; Li, Z. High Glucose Induces Podocyte Epithelial-to-mesenchymal Transition by Demethylation-mediated Enhancement of MMP9 Expression. *Mol Med Rep* **2018**, *17*, 5642–5651, doi:10.3892/mmr.2018.8554.
 131. Brion, C.; Lutz, S.M.; Albert, F.W. Simultaneous Quantification of mRNA and Protein in Single Cells Reveals Post-Transcriptional Effects of Genetic Variation. *Elife* **2020**, *9*, e60645, doi:10.7554/eLife.60645.
 132. Greenbaum, D.; Colangelo, C.; Williams, K.; Gerstein, M. Comparing Protein Abundance and mRNA Expression Levels on a Genomic Scale. *Genome Biol.* **2003**, *4*, 117, doi:10.1186/gb-2003-4-9-117.
 133. Galliher, A.J.; Schiemann, W.P. Beta3 Integrin and Src Facilitate Transforming Growth Factor-Beta Mediated Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Mammary Epithelial Cells. *Breast Cancer Res.* **2006**, *8*, R42, doi:10.1186/bcr1524.
 134. Kubiczikova, L.; Sedlarikova, L.; Hajek, R.; Sevcikova, S. TGF- β – an Excellent Servant but a Bad Master. *J. Transl. Med.* **2012**, *10*, 183, doi:10.1186/1479-5876-10-183.
 135. Rodríguez-Vita, J.; Sánchez-Galán, E.; Santamaría, B.; Sánchez-López, E.; Rodrigues-Díez, R.; Blanco-Colio, L.M.; Egido, J.; Ortiz, A.; Ruiz-Ortega, M. Essential Role of TGF-Beta/Smad Pathway on Statin Dependent Vascular Smooth Muscle Cell Regulation. *PLoS One* **2008**, *3*, e3959, doi:10.1371/journal.pone.0003959.
 136. Hill, C.; Flyvbjerg, A.; Grønbaek, H.; Petrik, J.; Hill, D.J.; Thomas, C.R.; Sheppard, M.C.; Logan, A. The Renal Expression of Transforming Growth Factor-Beta Isoforms and Their Receptors in Acute and Chronic Experimental Diabetes in Rats. *Endocrinology* **2000**, *141*, 1196–1208, doi:10.1210/endo.141.3.7359.
 137. Hartner, A.; Hilgers, K.F.; Bitzer, M.; Veelken, R.; Schöcklmann, H.O. Dynamic Expression Patterns of Transforming Growth Factor-Beta(2) and Transforming Growth Factor-Beta Receptors in Experimental Glomerulonephritis. *J. Mol. Med. (Berl)*. **2003**, *81*, 32–42, doi:10.1007/s00109-002-0403-x.

138. Tzavlaki, K.; Moustakas, A. TGF- β Signaling. *Biomolecules* **2020**, *10*, doi:10.3390/biom10030487.
139. Duan, D.; Derynck, R. Transforming Growth Factor- β (TGF- β)-Induced up-Regulation of TGF- β Receptors at the Cell Surface Amplifies the TGF- β Response. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 8490–8504, doi:10.1074/jbc.RA118.005763.
140. Baugé, C.; Cauvard, O.; Leclercq, S.; Galéra, P.; Boumédiène, K. Modulation of Transforming Growth Factor Beta Signalling Pathway Genes by Transforming Growth Factor Beta in Human Osteoarthritic Chondrocytes: Involvement of Sp1 in Both Early and Late Response Cells to Transforming Growth Factor Beta. *Arthritis Res. Ther.* **2011**, *13*, R23, doi:10.1186/ar3247.

**PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Urolithins and their possible implications for diabetic kidney

Milena Kotewicz , Barbara Lewko 

Department of Pharmaceutical Pathophysiology, Medical University of Gdańsk, Poland

Abstract

The increasing prevalence of diabetic kidney disease (DKD), a common complication of type 1 and type 2 diabetes, is becoming a leading risk factor of developing end stage renal disease (ESRD). The multiple mechanisms involved in renal tissue damage are a challenge for effective targeted therapy. Urolithins are metabolites generated by gut microbiota upon dietary intake of plant-derived ellagitannins. Multidirectional effects of these compounds include their anti-inflammatory, antioxidant, anti-proliferatory, anti-migratory and antiglycative properties that are mediated by modulation of signaling pathways and gene expression. Biochemical properties of urolithins indicate their capacity to regulate numerous mechanisms responsible for developing the hyperglycemia-induced tissue injury. The potentially beneficial effects of urolithins on podocytes, the most vulnerable renal cells should be particularly considered. The purpose of this review is to provide the evidence from the *in vivo* and *in vitro* studies showing that urolithin-based therapy could be a useful tool for protecting the kidneys from damage in diabetes.

Keywords: urolithins · diabetes · kidney · podocytes

Citation

Kotewicz M, Lewko B. Urolithins and their possible implications for diabetic kidney. Eur J Transl Clin Med. 2022;5(1):53-63.

DOI: [10.31373/ejtc/137918](https://doi.org/10.31373/ejtc/137918)

Introduction

Urolithins (hydroxylated dibenzo [*b,d*]-pyran-6-one derivatives) are a family of bioactive compounds which were first isolated from beaver scent glands in 1949 [1]. Their presence in human and animal intestines is a result of bac-

terial metabolism in gastrointestinal tract of dietary ellagitannins (ETs) and their constituent, ellagic acid (EA) [2]. ETs and EA are naturally occurring polyphenols found in numerous fruits and vegetables, e.g. pomegranates, raspberries and nuts [3]. Their beneficial health properties including anti-inflammatory, antioxidant and antiproliferative effects

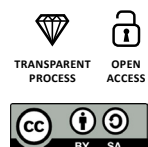
Corresponding author:

Milena Kotewicz, Department of Pharmaceutical Pathophysiology, Medical University of Gdańsk, Poland
e-mail: mkotewicz@gumed.edu.pl

Available online: www.ejtc.gumed.edu.pl

Copyright © Medical University of Gdańsk

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International.



have been proven in both animal and human models. Various studies demonstrated the protective effects of ETs and EA against chronic diseases of the cardiovascular system, neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. However, ETs and EA have poor bioavailability and their biological activity is associated with urolithins that are more easily absorbed in gut [4-8]. The synthesis of urolithins depends on the composition in the gut of specific bacteria that varies between the individuals. The identification of the microorganisms responsible for the complete transformation of EA into the final urolithins is still under research. According to the recent findings, different numbers of *Synergistetes phylum* and members of *Coriobacteriaceae* (genus *Gordonibacter urolithinifaciens* and *Gordonibacter pamelaee*) and *Lachnospiraceae* families can be used to discriminate between individuals producing certain urolithin forms [9-10]. Thus, after absorption and passage through the liver, different urolithins can be found in human body fluids and tissues at nanomolar to micromolar concentrations. Absorbed urolithins undergo phase I and phase II metabolism, resulting in glucuronide, sulfate and methylated derivatives, while small amounts can be found in the form of free aglycones [2, 11-12].

Both the conjugated and unconjugated forms of urolithins can be detected in human plasma and urine even 48 hours after consumption of ET-rich food [6, 13-14]. It is clear therefore that bioactive urolithins directly contact renal tissue during the passage through the nephron. It seems plausible that the cells constituting the glomerular filter, as well as epithelial cells lining the urinary tract may be affected by these compounds. Antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties of these compounds could be beneficial in treating several renal diseases, including diabetic kidney disease (DKD) [15-16]. Nevertheless, so far there are not many data on the effects of urolithins on the renal tissue. The purpose of this review is to provide the evidence from the *in vivo* and *in vitro* studies showing that urolithin-based therapy could be a useful tool for protecting the kidneys from damage in diabetes.

Material and methods

We searched the Medline, Scopus and Science Direct databases for articles published from 2011 to April 2021 using the following keywords: kidney disease, urolithins, ellagic acid, elagitannins, podocytes, polyphenols, diabetes, nephropathy, transforming growth factor and relevant abbreviations (e.g. TGF β , CKD, DN). Older articles describe pathomechanisms and serve as context for the presented new information. The inclusion criteria were: full-text article, on-topic. Case reports and letters to the Editor were excluded from the review.

Results

Bioavailability and metabolism

Similarly to other phytochemicals, ETs are poorly absorbed in the gut. However, following consumption the ETs undergo spontaneous hydrolysis into EA in the upper gastrointestinal tract. Microbes residing in the intestine further transform EA yielding a series of bioactive compounds including urolithins that are characterized by a dibenzopyranone structure and a decreasing number of phenolic hydroxyl groups (Figure 1) [4, 17-18]. Due to their high lipophilicity, urolithins are much more readily absorbed than the original polyphenols.

After absorption in the gut, urolithins rapidly undergo metabolism by phase II enzymes in enterocytes [8, 19]. Once in the bloodstream, conjugated and unconjugated metabolites reach liver via portal circulation and are further subjected to phase II metabolism in hepatocytes. Due to enterohepatic recirculation, part of urolithin conjugates can be secreted with bile back to the small intestine [5, 20]. Analyses of human and animal blood and urine samples indicate that urolithins A and B and their glucuronide and sulfate conjugates are predominant urolithin isoforms. In particular, Uro A is considered to be a major metabolite in humans. However, depending on the study design, the measured final plasma concentrations vary substantially reaching 0.1–35 μ M [4,8,15]. Human and animal studies have shown that urolithin metabolites accumulate in the gall bladder and urinary bladder [21], prostate gland [22-23], colon and intestinal tissues [22], whereas no accumulation in other tissues (e.g. muscles, adipose tissue, heart, liver, kidney) was observed [21].

Individual variability in the composition of gut microbiome results in significant differences in ET metabolism and urolithin type production, which is defined as different metabolotypes [8]. Specific gut microbiota profile or illnesses generating dysbacteriosis may contribute to different bacteria composition and levels, consequently leading to various potential health effects [24-26]. Therefore, it is essential to consider the influence of factors such as age, gender, race, health condition and geographic origins on the polyphenol profile after consumption of ETs-rich products. Based on the amount and type of urolithins excreted in the urine from healthy volunteers, three different urolithin metabolotypes have been described: metabolotype A (only Uro A metabolites excreted), metabolotype B (Uro B and/ or Uro B metabolites excreted in addition to Uro A and isourolithin A) and urolithin metabolotype O (no urolithins/ urolithin metabolites excreted) [13]. Significant interindividual variability was also reported in the first pharmacokinetic study, that showed for the first time that EA bioavailability was not increased after intake of a high free EA dose. It was concluded that factors such as pH and food protein content have a strong impact on EA bioavailability [19].

Biological activity

The direct biological effects of urolithins have been examined in different cell models, such as various cancer cell lines, fibroblasts, immune, endothelial and epithelial cells [4, 27-28].

The studies on the chemopreventive potential of EA and its metabolites Uro A and Uro B revealed that their anti-tumor properties, including the influence on cancer cell apoptosis and proliferation involve alterations in the expression of genes involved in signaling (MAPK) pathways, oncogenes (K-Ras, c-Myc), suppressors (DASP6, Fos), p53

protein, growth factor receptors (FGFR2, EGFR) and multiple genes involved in cell cycle [11, 29-33]. EA, as well as urolithins (and principally Uro A) exhibit proapoptotic activity via caspase-dependent pathways, in which activation of caspases 3, 8 and 9 has been reported [34-35]. Inhibition of cancer growth is mediated by suppression by Uro A and Uro B of Wnt/ β -catenin signaling [36-37].

Moreover, anti-tumor and anti-metastatic effects of urolithins include inhibition of migration of cancer cells by diverse mechanisms such as suppressing the K-ras/HMGA2 expression or by decreasing actin polymerization [38-39].

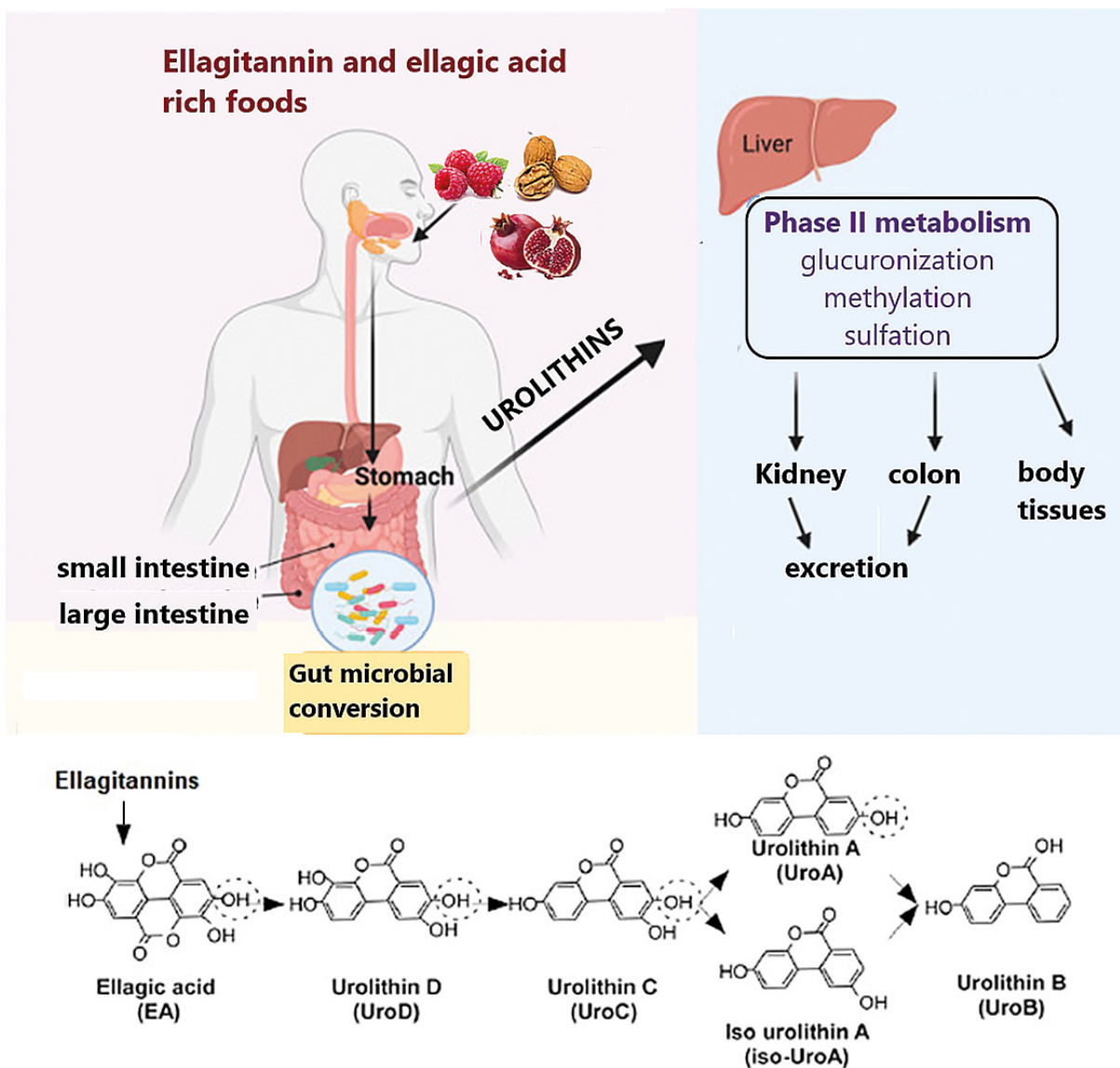


Figure 1. Dietary ellagitannins and ellagic acid are converted by the gut microbiota to urolithins that are readily absorbed to the bloodstream. Most of circulating urolithins undergo II phase metabolism in liver and the conjugates as well as free aglycones reach various peripheral tissues. Urolithins from filtered plasma pass the nephron to be excreted in urine. Some urolithin metabolites are also excreted in faeces [18, 75]

Suppression by urolithins of cell motility accounts also for the mechanisms of their anti-inflammatory activity. By moderate down-regulation of chemokine C-C motif ligand 2 (CCL2), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and decreased expression of IL-8, Uro-A and Uro-A glucuronide inhibited induced by TNF α monocyte adhesion and human fibroblast and aortic endothelial cell migration [40]. The anti-inflammatory and antioxidant activities of Uro A and Uro B involve inhibition of the nuclear factor kappa-B (NF- κ B) pathway and modulation of phosphorylation of diverse kinases such as AMPK and MAPK pathway members [41]. In the IL- β 1 stimulated rat chondrocytes and in LPS-stimulated macrophages, Uro A pre-treatment inhibited NF- κ Bp65 translocation into the nucleus [42-43], while in the HepG2 hepatic carcinomas cell line,

Uro A decreased p65 expression and increased the activity of intracellular antioxidant enzymes SOD and GSH-Px [41]. Suppression of NO production, decrease of proinflammatory molecules such as TNF- α , IL-6 and IL- β at the mRNA and protein levels was observed in the presence of Uro B in the LPS-activated mouse microglial cells and in J774 murine macrophages stimulated with LPS [28,43]. Another study demonstrated that Uro A, by regulating miR-10a-5p, reduced the proliferation of murine CD4+ T cells, that are a trigger to immune response [17]. Furthermore, Uro A exhibited anti-inflammatory effects by directly binding the aryl hydrocarbon receptor (AHR). Acting as a selective AHR antagonist, Uro A inhibited its transcriptional activity which resulted in attenuating cytokine-induced inflammatory signaling in Caco-2 cells [3].

Table 1. Summarizes diverse biological effects exerted by urolithins

Biological activity	Cell line	Signaling pathway	References	Urolithin	Urolithin Effect
Anti-tumor (anti-proliferative, anti-metastatic, pro-apoptotic)	Caco-2 cells Caco-2 cells Caco-2 cells SW 480 Caco-2 cells HCT-116, Caco-2 cells HCC cells HepG2 Ishikawa cells (ECACC)	MAPK kinase Oncogenes (K-Ras, c-Myc) Suppressors (DASP6, Fos) p53 protein Growth factor receptors (FGFR2, EGFR) Cell cycle genes (CCNB1, CCNB1IP1) Wnt/ β -catenin K-ras/HMGA2 Actin polymerization	[30] [30] [30] [11, 33] [30] [30] [36-37] [35] [38]	UroA, UroB UroA, UroB UroA, UroB UroA UroA, UroB UroA, UroB UroA, UroB UroA UroA	\uparrow/\downarrow \uparrow/\downarrow \uparrow/\downarrow \uparrow \uparrow/\downarrow \uparrow/\downarrow \downarrow \downarrow \downarrow
Proapoptotic	T24 cells, HepG2, Caco-2 cells, SW 480, HT-29	Caspases: 3, 8, 9	[34-35]	UroA, UroB, 8-OMe UA	\uparrow
Inhibition of the cell motility	Human aortic endothelial cells, monocytes, human fibroblasts	C-C motif ligand 2 (CCL2) plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) IL-8	[40]	UroA UroA UroA	\downarrow \downarrow \downarrow
Anti-proliferative, anti-renal fibrosis	HK-2 cells	TGF- β 1/ Smad NF- κ B	[66]	UroB	\downarrow
Anti-inflammatory and anti-oxidant	Chondrocytes, HepG2 T24 cells HepG2 Murine CD4+ T cells Caco-2 cells Murine kidney HK-2 cells	NF- κ Bp65 SOD and GSH-Px AMPK and MAPK kinases MicroRNA-10a-5p Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) TNF- α , IL-18, IL-23, MIP2 TGF- β 1, IL-6, NF- κ Bp65	[41-43] [41] [41] [17] [3] [63] [66]	UroA	\downarrow
Suppression of NO release	Murine microglial cells, macrophages	TNF- α , IL-6 and IL- β	[28, 43]	UroB, UroA	\downarrow
Autophagy	Murine hippocampal tissue J774.1 murine macrophages N2a cells, primary murine cortical neurons Murine kidney	MicroRNA-34a, SIRT1 Akt/mTOR signaling Endoplasmic reticulum stress TFEB \rightarrow CLEAR motif-containing genes	[44] [43-44] [45] [46]	UroA UroA UroA UroA	\uparrow \downarrow \downarrow \uparrow

It has been demonstrated that Uro-A exhibits protective properties against brain aging [44] and against ischemic neuronal and ischemia reperfusion renal injury (IRI) [45-46]. These anti-inflammatory and cytoprotective effects include induction by Uro A of autophagic flux, which was confirmed by observed expression of the autophagic markers LC3-II and p62 [43-45]. Some recent studies show that Uro A activates autophagy by upregulating Sirtuin 1 (SIRT1) signaling [44] and by impairing Akt/mTOR signaling [43-44]. Within the kidney, Uro A attenuated IRI by inducing autophagy through activation of transcription factor EB (TFEB) followed by regulation of target genes of Coordinated Lysosomal Expression and Regulation (CLEAR) network [46].

Safety of urolithin administration

Considering that Uro A is the most representative urolithin form and potential therapeutic agent, safety profile of this compound was evaluated in several studies. A comprehensive study by Heilman et al. [47] indicated that in both 28-day and 90-day observations in rats, orally administered synthetic Uro A did not modify any clinical and blood parameters, did not disrupt homeostasis and did not indicate any specific toxic mechanisms. The 4-week clinical trial in which up to 2000 mg oral Uro A doses were administered to elderly volunteers confirmed that the treatment had no adverse health effects. The observed 31 unfavorable effects were determined to be unrelated to the compound tested [48]. On the basis of the above findings, the US Food and Drug Administration already issued a favorable review for using Uro A as a food ingredient [49].

Urolithins in diabetes

Pathophysiology of diabetes is strictly linked to metabolic changes and chronic inflammation. Overproduction of multiple pro-inflammatory cytokines, growth factors and reactive oxygen species (ROS) account for the diabetes-related damage of tissues and organs [50-51]. Thus, antioxidant and anti-inflammatory properties of urolithins may exert a protective role in diabetic state [52]. It was reported recently that while the *in vivo* occurring extensive conjugation severely hampers the activity of urolithins, systemic inflammation triggers tissue deconjugation of Uro A glucuronide, yielding free aglycone with remarkably higher biological activity [53]. Indeed, the *in vivo*, as well as the *in vitro* studies confirmed the beneficial effects of unconjugated Uro A and Uro B administration to diabetic rats. Urolithin injections prevented the early cardiac inflammatory response as well as the occurrence of cardiac dysfunction in the streptozocin-induced (STZ) type 1 diabetes rats [54]. In cardiomyocytes cultured in the presence of 25mM glucose, Uro B significantly reduced the glucose-induced high levels of monocyte

chemoattractant protein-1 (MCP-1), the pro-inflammatory cytokine fractalkine and vascular endothelial growth factor (VEGF). In fibroblasts exposed to high glucose, expression of fractalkine was reduced by Uro A, Uro B, Uro C and Uro D [55]. In diabetes, hyperglycemia is also a causative factor for neurodegeneration and development of Alzheimer's disease. Uro A injections in a STZ-induced diabetic mouse prevented mitochondrial ROS accumulation, amyloidogenesis and neuronal cell death, which indicates that Uro A-based therapy may be useful in prevention and treatment of diabetes-associated neuronal impairment [56]. Viability of neuronal cells exposed to oxidative stress was significantly increased in the presence of Uro A and Uro B [57]. In addition, via facilitating L-type Ca²⁺ channel opening, Uro A and Uro C have been shown to enhance insulin secretion in cultured INS-1 beta-cells and isolated rat islets of Langerhans [58].

One of the hallmarks of diabetes mellitus (DM) is spontaneous non-enzymatic glycation of proteins, lipids and nucleic acids. Dependent on the level and duration of hyperglycemia this process leads to formation of advanced glycation end products (AGEs) that permanently modify protein structures and functions, contributing to oxidative stress and development of chronic diabetic complications [57, 59-60]. Anti glycative properties of Uro A and Uro B were shown in several *in vitro* experiments in which glycation of the bovine serum albumin (BSA) was strongly hampered by these compounds. The effects were concentration-dependent and the mechanisms included urolithins scavenging for reactive carbonyl species [57, 61].

Urolithins in diabetic and non-diabetic kidney disease

Although urolithins do not accumulate in the kidney, the circulating urolithin-rich plasma has continuous contact with renal structures [2, 6, 14], possibly affecting the renal tissue. Indeed, in the experimental rat model based on cisplatin-induced nephrotoxicity, Guada et al. revealed that Uro A effectively attenuated kidney damage by inhibiting the inflammatory cascade and apoptosis pathway. Furthermore, anti-inflammatory cytokine IL-10 was markedly increased in the kidneys of Uro A-treated animals [62]. Similarly, in the cisplatin-induced acute kidney injury (AKI) mouse model, orally given nanoparticle-encapsulated Uro A not only reduced mortality but also protected the kidneys from oxidative stress and cytotoxic injury including necrosis, tubular atrophy and glomerular hypertrophy [16]. Also, in another experiment, Uro A pretreatment of mice receiving cisplatin for 3 days not only improved renal parameters but also attenuated oxidative and nitrative stress and downregulated the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines TNF α , IL-23, IL-18 and MIP2 [63]. Beneficial properties of Uro A were also documented in the kidney ischemia

reperfusion injury (IRI) in mice. Attenuation of renal injury was associated with Uro A – dependent reduction of pro-inflammatory cytokines TNF α , IL1 β , MIP1 α and promotion of autophagy [46]. Subcutaneously administered Uro A also increased activity of antioxidant enzymes and attenuated expression of pro-inflammatory cytokines in the kidneys of aging mice [64].

Modulation of the renal TGF β system

The transforming growth factor beta (TGF β) family of multipotential cytokines controls numerous physiological and pathological events such as embryogenesis, carcinogenesis and the immune response [15, 65]. Regulation of cell proliferation, differentiation, migration and apoptosis involves ability of TGF β to affect the transcription and translation processes. The hyperglycemia and inflammation associated with diabetes strongly activate the TGF β system, resulting in undesirable changes within tissues. In diabetic kidney disease (DKD), overactive TGF β plays a prominent role in promoting renal cell hypertrophy, fibrosis and stimulating extracellular matrix (ECM) accumulation. So far, urolithins have been shown to counteract the TGF β -dependent effects in unilateral ureteral obstruction (UUO) rats and in cultured renal epithelial cells. In the UUO model, Uro B treatment abolished renal damage and fibrosis, maintained tubular and glomerular structure and reduced inflammatory cell infiltration. Moreover, expression levels of TGF β 1, NF- κ B p65, angiotensin II, collagen IV and several pro-inflammatory factors was significantly reduced. In cultured proximal tubular HK-2 cells, Uro B inhibited stimulated by TGF β cell proliferation and restored cell morphology. It was demonstrated that in the *in vivo*, as well as in the *in vitro* experiments, protective effects of Uro B were related to the down-regulation of TGF- β 1/Smad, most likely via inhibition of the NF- κ B signaling [66]. Overproduction of the plasminogen activator inhibitor (PAI-1) results in accumulation of ECM in acute and chronic kidney diseases, including diabetic nephropathy. In stimulated by TGF β renal epithelial NRK-52e cell line significant increase of PAI-1 release was inhibited by Uro A in a dose-dependent manner [67]. The positive feedback loop between TGF β and PAI-1 has also been documented in diabetic kidney [68]. Hence, targeting the TGF β - and PAI-1-related pathways by urolithins might be an effective approach in treating renal fibrosis and inflammation, particularly in the DKD.

Potential effects of urolithins on podocytes

Podocytes are terminally-differentiated, highly specialized cells of epithelial origin covering the outer aspect of glomerular capillaries. Due to their inability to replenish in mature kidney, podocyte loss is believed to initiate irrevers-

ible impairment of the glomerular filter [69-70]. Clinical and experimental data suggest a key role of podocytes in the development of diabetic nephropathy (DN) [71]. Podocyte depletion is considered to be the first indicator of glomerular destruction in diabetic patients, even before the appearance of proteinuria [72]. For preventing detachment, podocytes rearrange their structure and migrate to seek attachment in other sites of glomerular basement membrane. However, increased migration may disrupt the slit diaphragms between neighboring cells and the tightness of glomerular filter resulting in proteinuria [73]. Recently performed in our laboratory experiments showed that Uro A effectively inhibited induced by high (30 mM) glucose motility of mouse podocytes (unpublished data), which could be beneficial in the diabetic kidney.

Diabetic milieu induces multiple mechanisms in podocytes that directly affect functions and viability of these cells. In addition to AGEs and direct cytotoxic effects of hyperglycemia, primarily via increased production of ROS, deleterious for podocytes is up-regulation of their local renin-angiotensin and TGF β systems and increased synthesis of VEGF. Moreover, angiotensin II, TGF β and VEGF reciprocally modulate their production, this way perpetuating podocyte and glomerular impairment [74]. So far, our knowledge on urolithin-mediated effects on the podocytes is very limited. However, it seems likely that similarly to other cells, urolithins in podocytes may regulate the activities of TGF β , VEGF, antioxidant systems and multiple signaling pathways and kinases that are sensitive to urolithins in other cell types. The urolithins' ability to attenuate the harmful hyperglycemia-induced effects could protect these vulnerable cells from injury.

Conclusions

A growing body of evidence suggests that urolithins are potent multifunctional compounds capable of regulating a variety of cellular processes. Since they do not act through specific receptors, urolithins may affect various cell and tissue types. Not all body tissues accumulate urolithins but all urolithins present in plasma pass the glomerular filter, thus directly contacting kidney cells. However, so far relatively little is known about the effects of urolithins on kidney function and data concerning action of urolithins on glomerular cells is particularly sparse. Yet, the available reports definitely show that urolithin administration prevents inflammation and diabetes-induced changes in renal tissue. Figure 2 summarizes the current state of knowledge on urolithin-dependent protective effects in the kidney. The research on urolithins is growing and it can be expected that in the near future the beneficial effects of urolithins in kidney disease will be supported by ample evidence.

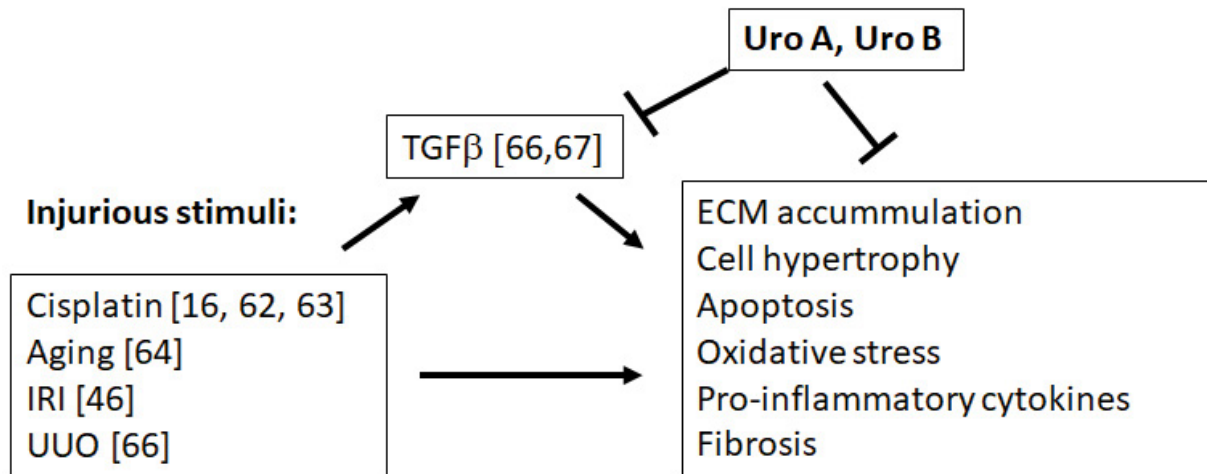


Figure 2. Protective effects of urolithins in the kidney. IRI -ischemia-reperfusion injury. UUO – unilateral ureteral obstruction [66]

Funding

None.

Conflicts of interest

None.

References

- Lederer E. Chemistry and biochemistry of some mammalian secretions and excretions. *J Chem Soc* [Internet]. 1949;(0):2115. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=jr9490002115>
- García-Villalba R, Selma M V, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Identification of Novel Urolithin Metabolites in Human Feces and Urine after the Intake of a Pomegranate Extract. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2019 Oct 9;67(40):11099-107. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b04435>
- Muku G, Murray I, Espín J, Perdew G. Urolithin A Is a Dietary Microbiota-Derived Human Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonist. *Metabolites* [Internet]. 2018 Nov 29;8(4):86. Available from: <http://www.mdpi.com/2218-1989/8/4/86>
- Espín JC, Larrosa M, García-Conesa MT, Tomás-Barberán F. Biological Significance of Urolithins, the Gut Microbial Ellagic Acid-Derived Metabolites: The Evidence So Far. Heber D, editor. *Evidence-Based Complement Altern Med* [Internet]. 2013;2013:1-15. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/270418/>
- Del Rio D, Rodríguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2013 May 10;18(14):1818-92. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2012.4581>
- Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D. Pomegranate Juice Ellagitannin Metabolites Are Present in Human Plasma and Some Persist in Urine for Up to 48 Hours. *J Nutr* [Internet]. 2006 Oct 1;136(10):2481-5. Available from: <https://academic.oup.com/jn/article/136/10/2481/4746683>
- Larrosa M, García-Conesa MT, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2010 Dec;31(6):513-39. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299710000749>
- Tomás-Barberán FA, González-Sarrías A, García-Villalba R, Núñez-Sánchez MA, Selma M V, García-Conesa MT, et al. Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2017 Jan;61(1):1500901. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201500901>
- Cortés-Martín A, Romo-Vaquero M, García-Mantrana I, Rodríguez-Varela A, Collado MC, Espín JC, et al. Urolithin Metabotypes can Anticipate the Different Restoration of the Gut Microbiota and Anthropometric Profiles during the First Year Postpartum. *Nutrients* [Internet]. 2019 Sep 3;11(9):2079. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/9/2079>

10. Romo-Vaquero M, Cortés-Martín A, Loria-Kohen V, Ramírez-de-Molina A, García-Mantrana I, Collado MC, et al. Deciphering the Human Gut Microbiome of Urolithin Metabotypes: Association with Enterotypes and Potential Cardiometabolic Health Implications. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2019 Feb;63(4):1800958. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201800958>
11. Narayanan BA, Re GG. IGF-II down regulation associated cell cycle arrest in colon cancer cells exposed to phenolic antioxidant ellagic acid. *Anticancer Res* [Internet]. 2001;21(1A):359-64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11299762>
12. Losso J, Bandsode R, Trappey A, Bawadi H, Truax R. In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2004 Nov;15(11):672-8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286304001226>
13. Tomás-Barberán FA, García-Villalba R, González-Sarrías A, Selma M V, Espín JC. Ellagic Acid Metabolism by Human Gut Microbiota: Consistent Observation of Three Urolithin Phenotypes in Intervention Trials, Independent of Food Source, Age, and Health Status. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2014 Jul 16;62(28):6535-8. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf5024615>
14. Piwowarski JP, Stanisławska I, Granica S, Stefańska J, Kiss AK. Phase II Conjugates of Urolithins Isolated from Human Urine and Potential Role of β -Glucuronidases in Their Disposition. *Drug Metab Dispos* [Internet]. 2017 Jun;45(6):657-65. Available from: <http://dmd.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/dmd.117.075200>
15. Kubiczokova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF- β – an excellent servant but a bad master. *J Transl Med* [Internet]. 2012 Dec 3;10(1):183. Available from: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-10-183>
16. Zou D, Ganugula R, Arora M, Nabity MB, Sheikh-Hamad D, Kumar MNVR. Oral delivery of nanoparticle urolithin A normalizes cellular stress and improves survival in mouse model of cisplatin-induced AKI. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2019 Nov 1;317(5):F1255-64. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.00346.2019>
17. Zhang S, Al-Maghout T, Cao H, Pelzl L, Salker MS, Veldhoen M, et al. Gut Bacterial Metabolite Urolithin A (UA) Mitigates Ca²⁺ Entry in T Cells by Regulating miR-10a-5p. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Jul 31;10:1737. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01737/full>
18. Kang I, Buckner T, Shay NF, Gu L, Chung S. Improvements in Metabolic Health with Consumption of Ellagic Acid and Subsequent Conversion into Urolithins: Evidence and Mechanisms. *Adv Nutr* [Internet]. 2016 Sep 1;7(5):961-72. Available from: <https://academic.oup.com/advances/article/7/5/961/4616729>
19. González-Sarrías A, García-Villalba R, Núñez-Sánchez MÁ, Tomé-Carneiro J, Zafrilla P, Mulero J, et al. Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: A crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts. *J Funct Foods* [Internet]. 2015 Dec;19:225-35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464615004363>
20. Mena P, Dall'Asta M, Calani L, Brighenti F, Del Rio D. Gastrointestinal stability of urolithins: an in vitro approach. *Eur J Nutr* [Internet]. 2017 Feb 6;56(1):99-106. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00394-015-1061-4>
21. Espín JC, González-Barrío R, Cerdá B, López-Bote C, Rey AI, Tomás-Barberán FA. Iberian Pig as a Model To Clarify Obscure Points in the Bioavailability and Metabolism of Ellagitannins in Humans. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2007 Dec 1;55(25):10476-85. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0723864>
22. Seeram NP, Aronson WJ, Zhang Y, Henning SM, Moro A, Lee R, et al. Pomegranate Ellagitannin-Derived Metabolites Inhibit Prostate Cancer Growth and Localize to the Mouse Prostate Gland. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2007 Sep 1;55(19):7732-7. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf071303g>
23. González-Sarrías A, Giménez-Bastida JA, García-Conesa MT, Gómez-Sánchez MB, García-Talavera N V, Gil-Izquierdo A, et al. Occurrence of urolithins, gut microbiota ellagic acid metabolites and proliferation markers expression response in the human prostate gland upon consumption of walnuts and pomegranate juice. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2010 Mar;54(3):311-22. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.200900152>
24. Nuñez-Sánchez MA, García-Villalba R, Monedero-Saiz T, García-Talavera N V, Gómez-Sánchez MB, Sánchez-Álvarez C, et al. Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2014 Jun;58(6):1199-211. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201300931>
25. Cerdá B, Periago P, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Identification of Urolithin A as a Metabolite Produced by Human Colon Microflora from Ellagic Acid and Related Compounds. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2005 Jul 1;53(14):5571-6. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf050384i>
26. García-Villalba R, Beltrán D, Espín JC, Selma MV, Tomás-Barberán FA. Time Course Production of Urolithins from Ellagic Acid by Human Gut Microbiota. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2013 Sep 18;61(37):8797-806. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf402498b>





27. Bobowska A, Granica S, Filipek A, Melzig MF, Moeslinger T, Zentek J, et al. Comparative studies of urolithins and their phase II metabolites on macrophage and neutrophil functions. *Eur J Nutr* [Internet]. 2021 Jun 22;60(4):1957-72. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00394-020-02386-y>
28. Lee G, Park J-S, Lee E-J, Ahn J-H, Kim H-S. Anti-inflammatory and antioxidant mechanisms of urolithin B in activated microglia. *Phytomedicine* [Internet]. 2019 Mar;55:50-7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711318302204>
29. Ceci C, Lacal P, Tentori L, De Martino M, Miano R, Graziani G. Experimental Evidence of the Antitumor, Antimetastatic and Antiangiogenic Activity of Ellagic Acid. *Nutrients* [Internet]. 2018 Nov 14;10(11):1756. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/11/1756>
30. González-Sarrías A, Espín J-C, Tomás-Barberán FA, García-Conesa M-T. Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signaling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2009 Jun;53(6):686-98. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.200800150>
31. Cho H, Jung H, Lee H, Yi HC, Kwak H, Hwang KT. Chemopreventive activity of ellagitannins and their derivatives from black raspberry seeds on HT-29 colon cancer cells. *Food Funct* [Internet]. 2015;6(5):1675-83. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5FO00274E>
32. Ríos J-L, Giner R, Marín M, Recio M. A Pharmacological Update of Ellagic Acid. *Planta Med* [Internet]. 30.05.2018. 2018 Oct 30;84(15):1068-93. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-0633-9492>
33. Mohammed Saleem YI, Albassam H, Selim M. Urolithin A induces prostate cancer cell death in p53-dependent and in p53-independent manner. *Eur J Nutr* [Internet]. 2020 Jun 8;59(4):1607-18. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00394-019-02016-2>
34. Qiu Z, Zhou B, Jin L, Yu H, Liu L, Liu Y, et al. In vitro antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2013 Sep;59:428-37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027869151300402X>
35. Qiu Z, Zhou J, Zhang C, Cheng Y, Hu J, Zheng G. Antiproliferative effect of urolithin A, the ellagic acid-derived colonic metabolite, on hepatocellular carcinoma HepG2.2.15 cells by targeting Lin28a/let-7a axis. *Brazilian J Med Biol Res* [Internet]. 2018/05/07. 2018;51(7):e7220-e7220. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2018000700602&tlng=en
36. Lv M, Shi C, Pan F, Shao J, Feng L, Chen G, et al. Urolithin B suppresses tumor growth in hepatocellular carcinoma through inducing the inactivation of Wnt/ β -catenin signaling. *J Cell Biochem* [Internet]. 2019 Oct 19;120(10):17273-82. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.28989>
37. Sharma M, Li L, Cerver J, Killian C, Koor A, Seeram NP. Effects of Fruit Ellagitannin Extracts, Ellagic Acid, and Their Colonic Metabolite, Urolithin A, on Wnt Signaling. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2010 Apr 14;58(7):3965-9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf902857v>
38. Alauddin M, Okumura T, Rajaxavier J, Khozoei S, Pöschel S, Takeda S, et al. Gut Bacterial Metabolite Urolithin A Decreases Actin Polymerization and Migration in Cancer Cells. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2020 Apr;64(7):1900390. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201900390>
39. Zhao W, Shi F, Guo Z, Zhao J, Song X, Yang H. Metabolite of ellagitannins, urolithin A induces autophagy and inhibits metastasis in human sw620 colorectal cancer cells. *Mol Carcinog* [Internet]. 2018 Feb;57(2):193-200. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mc.22746>
40. Giménez-Bastida JA, González-Sarrías A, Larrosa M, Tomás-Barberán F, Espín JC, García-Conesa M-T. Ellagitannin metabolites, urolithin A glucuronide and its aglycone urolithin A, ameliorate TNF- α -induced inflammation and associated molecular markers in human aortic endothelial cells. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2012 May;56(5):784-96. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201100677>
41. Wang Y, Qiu Z, Zhou B, Liu C, Ruan J, Yan Q, et al. In vitro antiproliferative and antioxidant effects of urolithin A, the colonic metabolite of ellagic acid, on hepatocellular carcinomas HepG2 cells. *Toxicol Vitro* [Internet]. 2015 Aug;29(5):1107-15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088723331500079X>
42. Ding S-L, Pang Z-Y, Chen X-M, Li Z, Liu X-X, Zhai Q-L, et al. Urolithin a attenuates IL-1 β -induced inflammatory responses and cartilage degradation via inhibiting the MAPK/NF- κ B signaling pathways in rat articular chondrocytes. *J Inflamm* [Internet]. 2020 Dec 24;17(1):13. Available from: <https://journal-inflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12950-020-00242-8>
43. Boakye YD, Groyer L, Heiss EH. An increased autophagic flux contributes to the anti-inflammatory potential of urolithin A in macrophages. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2018 Jan;1862(1):61-70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416517303276>

44. Chen P, Chen F, Lei J, Li Q, Zhou B. Activation of the miR-34a-Mediated SIRT1/mTOR Signaling Pathway by Urolithin A Attenuates d-Galactose-Induced Brain Aging in Mice. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2019 Oct 1;16(4):1269-82. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13311-019-00753-0>
45. Ahsan A, Zheng Y-R, Wu X-L, Tang W-D, Liu M-R, Ma S-J, et al. Urolithin A-activated autophagy but not mitophagy protects against ischemic neuronal injury by inhibiting ER stress in vitro and in vivo. *CNS Neurosci Ther* [Internet]. 2019 Sep 11;25(9):976-86. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cns.13136>
46. Heilman J, Andreux P, Tran N, Rinsch C, Blanco-Bose W. Safety assessment of Urolithin A, a metabolite produced by the human gut microbiota upon dietary intake of plant derived ellagitannins and ellagic acid. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2017 Oct;108:289-97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691519303801>
47. Heilman J, Andreux P, Tran N, Rinsch C, Blanco-Bose W. Safety assessment of Urolithin A, a metabolite produced by the human gut microbiota upon dietary intake of plant derived ellagitannins and ellagic acid. *Food Chem Toxicol*. 2017;
48. Andreux PA, Blanco-Bose W, Ryu D, Burdet F, Ibberson M, Aebischer P, et al. The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans. *Nat Metab* [Internet]. 2019 Jun 14;1(6):595-603. Available from: <http://www.nature.com/articles/s42255-019-0073-4>
49. Djedjibegovic J, Marjanovic A, Panieri E, Saso L. Ellagic Acid-Derived Urolithins as Modulators of Oxidative Stress. Morroni F, editor. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2020 Jul 28;2020:1-15. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2020/5194508/>
50. Tsalamandris S, Antonopoulos AS, Oikonomou E, Papamikroulis G-A, Vogiatzi G, Papaioannou S, et al. The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *Eur Cardiol Rev* [Internet]. 2019 Apr 30;14(1):50-9. Available from: <https://www.ecrjournal.com/articles/role-inflammation-diabetes-current-concepts-and-future-perspectives>
51. Vinod PB. Pathophysiology of diabetic nephropathy. *Clin Queries Nephrol* [Internet]. 2012 Apr;1(2):121-6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211947712700055>
52. Roopchand DE, Kuhn P, Rojo LE, Lila MA, Raskin I. Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice. *Pharmacol Res* [Internet]. 2013 Feb;68(1):59-67. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661812002290>
53. Ávila-Gálvez MA, Giménez-Bastida JA, González-Sarrías A, Espín JC. Tissue deconjugation of urolithin A glucuronide to free urolithin A in systemic inflammation. *Food Funct* [Internet]. 2019;10(6):3135-41. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9FO00298G>
54. Savi M, Bocchi L, Mena P, Dall'Asta M, Crozier A, Brighenti F, et al. In vivo administration of urolithin A and B prevents the occurrence of cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2017 Dec 6;16(1):80. Available from: <http://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-017-0561-3>
55. Sala R, Mena P, Savi M, Brighenti F, Crozier A, Miragoli M, et al. Urolithins at physiological concentrations affect the levels of pro-inflammatory cytokines and growth factor in cultured cardiac cells in hyperglucidic conditions. *J Funct Foods* [Internet]. 2015 May;15:97-105. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464615001279>
56. Lee HJ, Jung YH, Choi GE, Kim JS, Chae CW, Lim JR, et al. Urolithin A suppresses high glucose-induced neuronal amyloidogenesis by modulating TGM2-dependent ER-mitochondria contacts and calcium homeostasis. *Cell Death Differ* [Internet]. 2021 Jan 23;28(1):184-202. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41418-020-0593-1>
57. Verzelloni E, Pellacani C, Tagliazucchi D, Tagliaferri S, Calani L, Costa LG, et al. Antiglycative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol catabolites. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2011 May;55(S1):S35-43. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201000525>
58. Bayle M, Neasta J, Dall'Asta M, Gautheron G, Virsolvy A, Quignard J-F, et al. The ellagitannin metabolite urolithin C is a glucose-dependent regulator of insulin secretion through activation of L-type calcium channels. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2019/10/10. 2019 Oct 10;176(20):4065-78. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.14821>
59. Wautier J, Guillausseau P. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *J Peripher Nerv Syst* [Internet]. 2002 Jun 20;7(2):138-138. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1529-8027.2002.02011.16.x>
60. Bondeva T, Wojciech S, Wolf G. Advanced glycation end products inhibit adhesion ability of differentiated podocytes in a neuropilin-1-dependent manner. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2011 Oct;301(4):F852-70. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.00575.2010>
61. Liu W, Ma H, Frost L, Yuan T, Dain JA, Seeram NP. Pomegranate phenolics inhibit formation of advanced glycation endproducts by scavenging reactive carbonyl species. *Food Funct* [Internet]. 2014 Nov;5(11):2996-3004. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4FO00538D>

62. Guada M, Ganugula R, Vadhanam M, Ravi Kumar MNV. Urolithin A Mitigates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Inhibiting Renal Inflammation and Apoptosis in an Experimental Rat Model. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2017 Oct;363(1):58-65. Available from: <http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.117.242420>
63. Jing T, Liao J, Shen K, Chen X, Xu Z, Tian W, et al. Protective effect of urolithin a on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice via modulation of inflammation and oxidative stress. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2019 Jul;129:108-14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691519302303>
64. Chen P, Lei J, Chen F, Zhou B. Ameliorative effect of urolithin A on D-gal-induced liver and kidney damage in aging mice via its antioxidative, anti-inflammatory and antiapoptotic properties. *RSC Adv* [Internet]. 2020;10(14):8027-38. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=D0RA00774A>
65. Li MO, Flavell RA. TGF- β : A Master of All T Cell Trades. *Cell* [Internet]. 2008 Aug;134(3):392-404. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867408009458>
66. Li Q, Li K, Chen Z, Zhou B. Anti-renal fibrosis and anti-inflammation effect of urolithin B, ellagitannin-gut microbial-derived metabolites in unilateral ureteral obstruction rats. *J Funct Foods* [Internet]. 2020 Feb;65:103748. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464619306723>
67. Chappell MC, Pingue G, Pirro N, Tallant A, Gallagher P. The Microbiome Product Urolithin A Abolishes TGF β -Dependent Stimulation of PAI-1 in Renal Epithelial Cells. *FASEB J* [Internet]. 2019 Apr;33(S1):1-9. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.lb530
68. Seo JY, Park J, Yu MR, Kim YS, Ha H, Lee HB. Positive Feedback Loop between Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Transforming Growth Factor-Beta1 during Renal Fibrosis in Diabetes. *Am J Nephrol* [Internet]. 2009;30(6):481-90. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/242477>
69. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* [Internet]. 2006 Jun;69(12):2131-47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815514403>
70. Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Sanden SK, Hussain S, Filipiak WE, et al. Podocyte Depletion Causes Glomerulosclerosis: Diphtheria Toxin-Induced Podocyte Depletion in Rats Expressing Human Diphtheria Toxin Receptor Transgene. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2005 Oct;16(10):2941-52. Available from: <https://jasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2005010055>
71. White K. Glomerular Structure in Diabetes - Can It Predict the Future? *Am J Nephrol* [Internet]. 2015;41(4-5):275-6. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/430850>
72. Kostovska I, Trajkovska KT, Cekovska S, Spasovski G, Labudovic D. Nephrin and Podocalyxin - New Podocyte Proteins for Early Detection of Secondary Nephropathies. *BANTAO J* [Internet]. 2016 Jun 27;14(1):11-6. Available from: <https://www.sciendo.com/article/10.1515/bj-2016-0003>
73. Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley K V. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2013 Feb 15;304(4):F333-47. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.00478.2012>
74. Lin JS, Susztak K. Podocytes: the Weakest Link in Diabetic Kidney Disease? *Curr Diab Rep* [Internet]. 2016 May 6;16(5):45. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11892-016-0735-5>

Article

Urolithins Modulate the Viability, Autophagy, Apoptosis, and Nephron Turnover in Podocytes Exposed to High Glucose

Milena Kotewicz ¹, Mirosława Krauze-Baranowska ², Agnieszka Daca ³ , Agata Płoska ⁴ , Sylwia Godlewska ², Leszek Kalinowski ^{4,5}  and Barbara Lewko ^{1,*} 

- ¹ Department of Pharmaceutical Pathophysiology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Gdansk, 80-210 Gdansk, Poland
- ² Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Gdansk, 80-210 Gdansk, Poland
- ³ Department of Pathology and Experimental Rheumatology, Faculty of Medicine, Medical University of Gdansk, 80-210 Gdansk, Poland
- ⁴ Department of Medical Laboratory Diagnostics-Fahrenheit Biobank BBMRI, Faculty of Pharmacy, Medical University of Gdansk, 80-210 Gdansk, Poland
- ⁵ BioTechMed Centre, Department of Mechanics of Materials and Structures, Gdansk University of Technology, 80-233 Gdansk, Poland
- * Correspondence: barbara.lewko@gumed.edu.pl

Abstract: Urolithins are bioactive compounds generated in human and animal intestines because of the bacterial metabolism of dietary ellagitannins (and their constituent, ellagic acid). Due to their multidirectional effects, including anti-inflammatory, antioxidant, anti-cancer, neuroprotective, and antiglycative properties, urolithins are potential novel therapeutic agents. In this study, while considering the future possibility of using urolithins to improve podocyte function in diabetes, we assessed the results of exposing mouse podocytes cultured in normal (NG, 5.5 mM) and high (HG, 25 mM) glucose concentrations to urolithin A (UA) and urolithin B (UB). Podocytes metabolized UA to form glucuronides in a time-dependent manner; however, in HG conditions, the metabolism was lower than in NG conditions. In HG milieu, UA improved podocyte viability more efficiently than UB and reduced the reactive oxygen species level. Both types of urolithins showed cytotoxic activity at high (100 μ M) concentration. The UA upregulated total and surface nephron expression, which was paralleled by enhanced nephron internalization. Regulation of nephron turnover was independent of ambient glucose concentration. We conclude that UA affects podocytes in different metabolic and functional aspects. With respect to its pro-survival effects in HG-induced toxicity, UA could be considered as a potent therapeutic candidate against diabetic podocytopathy.



Citation: Kotewicz, M.; Krauze-Baranowska, M.; Daca, A.; Płoska, A.; Godlewska, S.; Kalinowski, L.; Lewko, B. Urolithins Modulate the Viability, Autophagy, Apoptosis, and Nephron Turnover in Podocytes Exposed to High Glucose. *Cells* **2022**, *11*, 2471. <https://doi.org/10.3390/cells11162471>

Academic Editor: Alexander E. Kalyuzhny

Received: 30 June 2022

Accepted: 6 August 2022

Published: 9 August 2022

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



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

Keywords: podocytes; urolithins; urolithin A; high glucose; nephron; diabetic nephropathy

1. Introduction

The current global diabetes prevalence is estimated to be over 10.5% of the population and is rising dramatically [1]. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) accounts for more than 90% of all diabetes cases worldwide. Diabetic kidney disease is the most common cause of end-stage kidney disease in T2DM patients [2]. The prominent role of podocytes in diabetic kidney disease pathogenesis and progression has been demonstrated in numerous studies [3–5]. Accordingly, there is a consensus that podocytes are a primary therapeutic target to prevent the development of diabetic nephropathy [6–8]. Studies on the mechanisms of podocyte injury continue to provide new targets for treatment. Simultaneously, numerous novel therapeutic approaches are being investigated in vivo and in vitro to protect podocytes from impairment and loss. In this context, polyphenolic compounds are gaining more and more attention due to their broad spectrum of biological activities and therapeutic effects.

Urolithins comprise a group of polyphenolic compounds that are produced by gut microbiota after consuming ellagitannins and ellagic acid, complex polyphenols present in

foods such as pomegranate, berries, and nuts. Dietary (poly)phenols are poorly absorbed in the intestine and after they reach the distal part of the gastrointestinal tract, they are metabolized by residing microbiota into urolithins D (UD), C (UC), A (UA), and B (UB), which are then transported into circulation (Figure 1) [9,10]. Most urolithins undergo phase II metabolism to form conjugates, mainly glucuronides and sulfates [11]. Although conjugated forms of urolithins are found in higher concentrations, free aglycones (unconjugated urolithins) show much higher biological activity [12]. Based on the differences in composition of gut microbiota between populations, three urolithin phenotypes (metabotypes) have been described: metabotype A (UA and UA conjugate producers), metabotype B (UB, UA, and iso-UA producers), and metabotype 0 (non-producers) [13]. In humans, metabotype A is predominant [14]. The diverse biological properties of urolithins include antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, neuroprotective, antiglycative and other activities [15,16] that are exerted by the modulation of signaling molecules, cell structure, and protein expression [17]. Moreover, following human trials [18], urolithins are considered safe, and UA has been recently approved by the US Food and Drug Administration (FDA) as generally recognized as safe (GRAS) for its use as an ingredient.

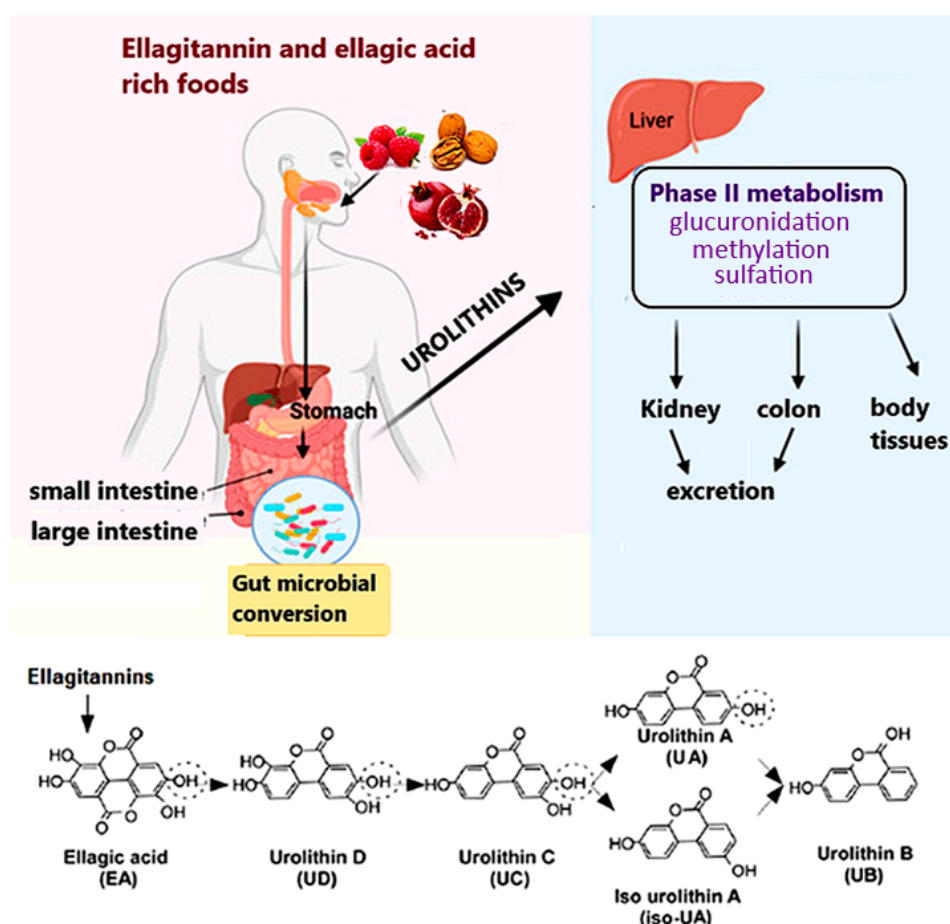


Figure 1. Ellagitannins and their hydrolysable derivative, ellagic acid, are natural polyphenols abundant in some fruits, nuts, and seeds. Ellagitannin is metabolized by gut microbiota into distinct types of urolithins that are further converted by large intestine enterocytes and the liver into conjugates. Both conjugated and unconjugated urolithins enter the blood circulation system and reach the body tissues. Besides accumulation in certain organs, urolithins are excreted in urine and feces [9]. Figure was adapted from [10,17].

Several *in vitro* and *in vivo* studies have indicated beneficial effects of urolithins in hyperglycemia-induced impairments in cellular and organ functions. Recently, the

advantageous effects of urolithins in diabetic and non-diabetic kidney diseases have been reported [17,19]. Nevertheless, although it seems obvious that during glomerular filtration of urolithin-containing blood podocytes will directly contact these compounds, the few published studies conducted on renal cells do not include podocytes so far. Considering the potential impact of urolithin-based therapies on podocytes, as well as the future possibility of using urolithins for the improvement of podocyte function in diabetes, our goal was to assess the results of exposing mouse podocytes to UA and UB in conditions mimicking diabetes.

2. Materials and Methods

2.1. Urolithins

Urolithin A (UA, 3,8-dihydroxy-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-one) and urolithin B (UB, 3-hydroxy-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-one) were synthesized in the Department of Organic Chemistry at the Medical University of Gdańsk, based on literature data [20], and were kindly provided by the Department of Pharmacognosy and Department of Organic Chemistry, Medical University of Gdańsk, Poland. Urolithin A (228.2 g/mol) and UB (212.2 g/mol) were dissolved in sterile dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Darmstadt, Germany), and 10 mM stock solutions were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2. Podocyte Culture and Treatment

Immortalized mouse podocytes (SVI clone, Cell Line Services, Eppelheim, Germany) were cultured as described previously [21]. Briefly, the cells were propagated at $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ in RPMI1640 medium (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) containing 11 mM glucose and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, EURx Molecular Biology Products, Gdańsk, Poland), 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (PAN-Biotech, Germany), and 10 U/mL recombinant mouse interferon- γ (IFN- γ , PeproTech EC, London, UK). Differentiation was induced by shifting the temperature to $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Podocytes were grown without IFN- γ , in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 5.5 mM glucose (PAN-Biotech, Germany) and 5% FBS for 7–10 d. Subsequently, the cells were divided into two groups, one group remaining in DMEM with normal glucose (NG, 5.5 mM), and the other one was switched to high glucose (HG, 25 mM), and the culture was continued for the next 7 d. Culture media were changed every 2 d. Experimental NG or HG media containing 0.5% FBS and urolithins were added for the last 24 h or 48 h. The final DMSO concentration did not exceed 0.1% (*v/v*).

2.3. Chromatographic Determination of Urolithin A and Identification of Its Metabolite in Podocyte Culture Media

The HPLC-hypergrade (LC/MS) Lichrosolv solvents, acetonitrile, and methanol were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Analytical-grade formic acid (89–91% purity) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained from Milli-Q[®] system (Molsheim, France).

The determined compounds were extracted from the podocyte culture according to the method of Sala et al. [22] modified by us. A mixture of 500 μL of cell culture media and 500 μL of cold methanol was vortexed for 1 min. The mixture was then centrifuged at 14,000 rpm for 10 min at room temperature. The supernatant was subjected to chromatographic analysis.

The chromatographic analysis was carried out using a HPLC-DAD-MS/MS Shimadzu system (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) (detailed data are reported in Supplementary Materials S1 and S2) equipped with a Kinetex C-18 column (Phenomenex, Torrance, CA, USA; 2.6 μm , 100 mm \times 2.1 mm) maintained at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. A triple-quadrupole LCMS 8040 (Shimadzu Corp., Japan) mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) interface, operated in positive mode and negative mode, was used for mass spectrometric (MS) analysis. Analysis was performed by scanning from *m/z* 200 to 800 using a multiple reaction monitoring (MRM) technique. The operating conditions for the MS analysis were: DL (Desolvation Line) temperature $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, heat block temperature $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, nebulizing

gas flow 3 L/min, drying gas flow 15 L/min, collision-induced dissociation gas pressure 230 kPa, detector voltage 1.9 kV, and interface voltage 4.5 kV for (+) ESI and 3.5 kV for (−) ESI. Dwell time was 100 ms. Data acquisition was performed with the software LabSolutions version 5.89 (Copyright© 2022–2016 Shimadzu Corp., Japan). Samples (1 μ L for MRM and 6 μ L for scanning) were analyzed with a use of gradient elution (Supplementary Material S1) during a total run time of 30 min. The procedure used was based on a modification of García-Villalba et al.'s [23] method. Under these conditions, UA was eluted with tR 13.53 min and its unknown metabolite (UAM) with tR 8.07 min. Both compounds had similar UV spectra—237,270 sh, 279,296, 305,354 and 267 sh; 278; 293; 302; 348, respectively, for UA and UAM, which were consistent with the literature data on urolithins and their metabolites [22]. The UAM was identified as urolithin 3-/or 8-O-glucuronide based on the m/z values of molecular ions $[M + H]^+$ at m/z 405 and $[M - H]^-$ at m/z 403 and fragment ion $[M + H\text{-glucuronosyl}]^+$ at m/z 229.

2.4. Targeted Analysis of Urolithin A and Its Metabolite by Means of an MRM-Based Approach

Urolithin A and its metabolite were detected by tandem mass spectrometry (MS/MS) using MRM in positive mode by monitoring the transitions from precursor ions to dominant product ions, namely m/z 229.1 \rightarrow m/z 157.0 (+) (CE-22.0), m/z 229.1 \rightarrow m/z 128.1 (+) (CE-40.0), m/z 229.1 \rightarrow m/z 185.0 (+) (CE-18.0) for both compounds. The most intense transition was used for the quantitation (quantifier transition). The method was validated according to the guidelines of the FDA [24], including linearity range, limit of quantitation, limit of detection, repeatability, and extraction recovery for NG and HG media, separately (Supplementary Material S2).

2.5. Cell Viability Assay

Cell viability was determined using MTT assay. Podocytes were plated at 8000 cells per well in a 96-well plate and cultured as described above. Experimental media were added for the last 24 h or 48 h. After the indicated treatment period, the experimental media were removed, 100 μ L of 0.5 mg/mL MTT was added to each well and cells were again incubated for 4 h at 37 °C. To dissolve the formazan crystals formed in the viable cells, 150 μ L DMSO—Isopropanol (1:1, v/v) were added to each well. Following shaking the plates 3 \times 1 min, absorbance was read at 570 nm in the SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany). Results were analyzed using SPECTROstar Nano Mars software.

2.6. Flow Cytometry Analysis of Nephrin

Podocytes cultured in 6-well plates (90,000 cells/well) were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), detached by Accutase (STEMCELL Technologies, Köln, Germany), and centrifuged for 7 min at 400 $\times g$. Subsequently, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature for 8 min and blocked with blocking solution (2% FBS, 2% bovine serum albumin, 0.2% fish gelatin, in PBS) for 60 min at room temperature. Finally, the cells were resuspended in cold FACS buffer (2% FBS in PBS), and aliquots of 3 \times 10³ cells/tube were incubated with phycoerythrin-conjugated antibody directed against the extracellular domain of nephrin (G-8, Santa Cruz) for 30 min at 4 °C. To omit debris and cell clumps, gating was performed, and 10⁴ gated events were counted. Cell fluorescence was analyzed using a BD FACSVerser™ Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and FlowJo™ Software v10.8.0 (Ashland, OR, USA). Background fluorescence, assessed with an IgG isotype control, was subtracted from the corresponding samples during analysis.

2.7. Detection of Apoptosis

An Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit and CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent with SYTOX™ AADvanced™ Dead Cell Stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Rockwell, NY, USA) were used to quantify apoptosis according to the manufacturer's instructions. Briefly, podocytes plated at 90,000 cells/well in a 6-well plate were cultured and treated with urolithins as described above. The cells were

harvested by Accutase and washed with cold FACS buffer. For Annexin V assay, podocytes were resuspended in binding buffer, 5 μL Alexa Fluor[®] 488 Annexin V, together with 1 μL propidium iodide (PI) working solution, were added to each 100 μL of cell suspension and the cells were incubated for 15 min at room temperature. For caspase 3/7 assay, podocytes were suspended in FACS buffer and 1 μL of CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent was added to all samples, which were then incubated for 30 min. During the last 5 min of incubation, 1 μL of SYTOX AADvanced dead cell stain solution was added to each sample and flow cytometry analysis was performed.

2.8. Immunofluorescence Staining and Confocal Microscopy

Immunofluorescence studies were performed as described previously [25]. Briefly, podocytes seeded on round glass coverslips (Bionovo, Legnica, Poland) were cultured in NG and HG media as indicated. Following exposure to various treatments, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 8 min at room temperature, permeabilized (0.3% Triton X-100 in PBS) for 3 min and blocked with blocking solution as described in Section 2.6. The permeabilization step was omitted to visualize surface-bound antibodies. A 60-min incubation with primary antibodies (Supplementary Table S3) was followed by a subsequent 30-min incubation with secondary antibodies (Supplementary Table S4). All antibodies were diluted in blocking solution. Non-specific staining was controlled by replacing primary antibodies with blocking solution alone, which was followed by incubation with secondary antibodies. The coverslips were mounted on microscope slides using Fluoroshield[™] with DAPI (Merck, Darmstadt, Germany). Images were captured with the Opera Phenix[®] Plus High-Content Screening System (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and analyzed with Harmony High-Content Imaging and Analysis Software 4.8 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). The images were merged using the ImageJ software (Version 1.53r, National Institutes of Health, University of Wisconsin, Madison, WI, USA), downloaded from: imagej.nih.gov/ij/ (accessed on 29 June 2022).

2.9. Assessment of Morphology and Actin Cytoskeleton

Podocytes grown in the culture plates were washed twice with PBS, fixed with 2% paraformaldehyde for 20 min, washed with deionized water and then stained with 0.1% crystal violet for 30 min at 37 °C to assess cell morphology. In separate experiments, podocytes were grown on the glass coverslips and immunostaining for F-actin was performed after washing with PBS and fixing with 4% paraformaldehyde, using phalloidin tagged to Alexa Fluor 488 dye (MoBiTec, Göttingen, Germany). Coverslips were mounted on the microscope slides using Fluoroshield[™] with DAPI. The images were taken with an inverted fluorescence microscope Zeiss AxioScope A1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany), using NIS-Elements BR software (Precoptic, Warszawa, Poland).

2.10. RNA Isolation and qPCR

Total RNA from treated podocytes was extracted and purified with PureLink[™] RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The purity and integrity of the extracted RNA was checked with Cytation 3 multimode microplate reader (BioTek, Santa Clara, CA, USA) and analyzed by BioTek Gen5[™] 2.0 Data Analysis Software (Santa Clara, CA, USA). Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed using TaqMan RNA-to-CT[™] 1-step KIT (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's protocol. Briefly, the real-time (RT)-PCR reaction mix (TaqMan RT-PCR Mix, TaqMan RT Enzyme Mix, water) was combined with TaqMan[™] Gene Expression Assay for *Nphs1* gene encoding nephrin (Assay ID: Mm01176615_g1) or *Actb* gene encoding β -actin (Assay ID: Mm04394036_g1). A sample of 50 ng total RNA from each experimental group was added to 7.5 μL of Master Mix (10 μL total volume). The PCR reactions were carried out using QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) and involved the following steps: (1) reverse transcription at 48 °C for 20 min; (2) polymerase activation at 95 °C for 10 min;

(3) 40 cycles denaturation (15 s at 95 °C) followed by annealing/extending at 60 °C for 1 min. Relative levels of target gene mRNA expression were normalized to β -actin and the relative level of mRNA was calculated with the $\Delta\Delta$ comparative threshold (Ct) method.

2.11. Protein Extraction and Western Blot Analysis

Podocytes subjected to the different experimental conditions were lysed using PierceTM RIPA Buffer (Thermo Fisher Scientific), containing HaltTM Protease and Phosphatase Single-Use Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific), and proteins were extracted from the cells according to the manufacturer's protocol. Total protein concentration was determined by DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins (20–30 μ g) were separated by CriterionTM TGX Stain-FreeTM Precast Gel electrophoresis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Trans-Blot Turbo, Midi Format, 0.2 μ m PVDF) using Trans-Blot Turbo Transfer system (Bio-Rad Laboratories, USA). Next, the membranes were blocked with 5% bovine serum albumin in TBST buffer (Tris Buffered Saline with Tween 20) for 30 min and incubated overnight with primary antibodies (Supplementary Table S3). Sodium Potassium ATPase (SPA) or β -actin expression was analyzed to ensure equal protein loading. The membranes were washed in TBST and incubated with horseradish peroxidase-linked secondary antibody (Supplementary Table S4). The proteins were then visualized by VisiGloTM Select HRP Substrate Kit (VWR Chemicals, Aurora, OH, USA) and imaged using a ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Densitometry was performed using ImageLab v2.0 analysis software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

2.12. Statistical Analyses

All data are shown as mean \pm SEM and were compared by ANOVA, Mann–Whitney, or the Student's *t*-test to test for statistical significance. *p* values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Urolithin A Is Metabolized by Podocytes

In *in vivo* conditions, the majority of urolithins absorbed from the gut undergo phase II metabolism, forming conjugates, of which glucuronides are the most abundant [9]. Additionally, in the cell cultures, final free urolithin concentration can be modified by metabolic processes [26]. Peripheral metabolism of urolithins by podocytes is a key point to be considered during research. Therefore, we examined the ability of podocytes to metabolize UA in NG and HG conditions. The stability of UA, as well as the appearance of its newly formed metabolites, was studied in NG and HG cell media containing 10 μ M UA after 12 h, 24 h, and 48 h of incubation. A sensitive HPLC-MS/MS analysis was performed to target the UA concentration and to identify different UA metabolites that could be formed under the experimental conditions.

The UA molecules were stable under the experimental conditions (cell-free incubation), in contrast to collected cell culture supernatants. The analysis of the concentration of UA in the medium over time, both with NG and HG concentrations, showed a decrease in the concentration of the parent molecule in favor of the emerging metabolite. The 3-O- or 8-O-glucuronide UA (UAM), the metabolite of UA in the cell culture medium, was detected after 12 h of incubation and increased as the time of incubation passed (Figure 2A). The time-course analysis of UA revealed statistically significant differences of aglycone concentrations in NG. The % of aglycone was significantly reduced by 35% after 24 h (*p* < 0.01) and by 59% after 48 h (*p* < 0.003) as compared to the 12-h group (Figure 2B). There was no significant difference in metabolic capacity between the NG and HG groups, but metabolism of urolithins by podocytes seemed to be lower in HG conditions (Figure 2C).

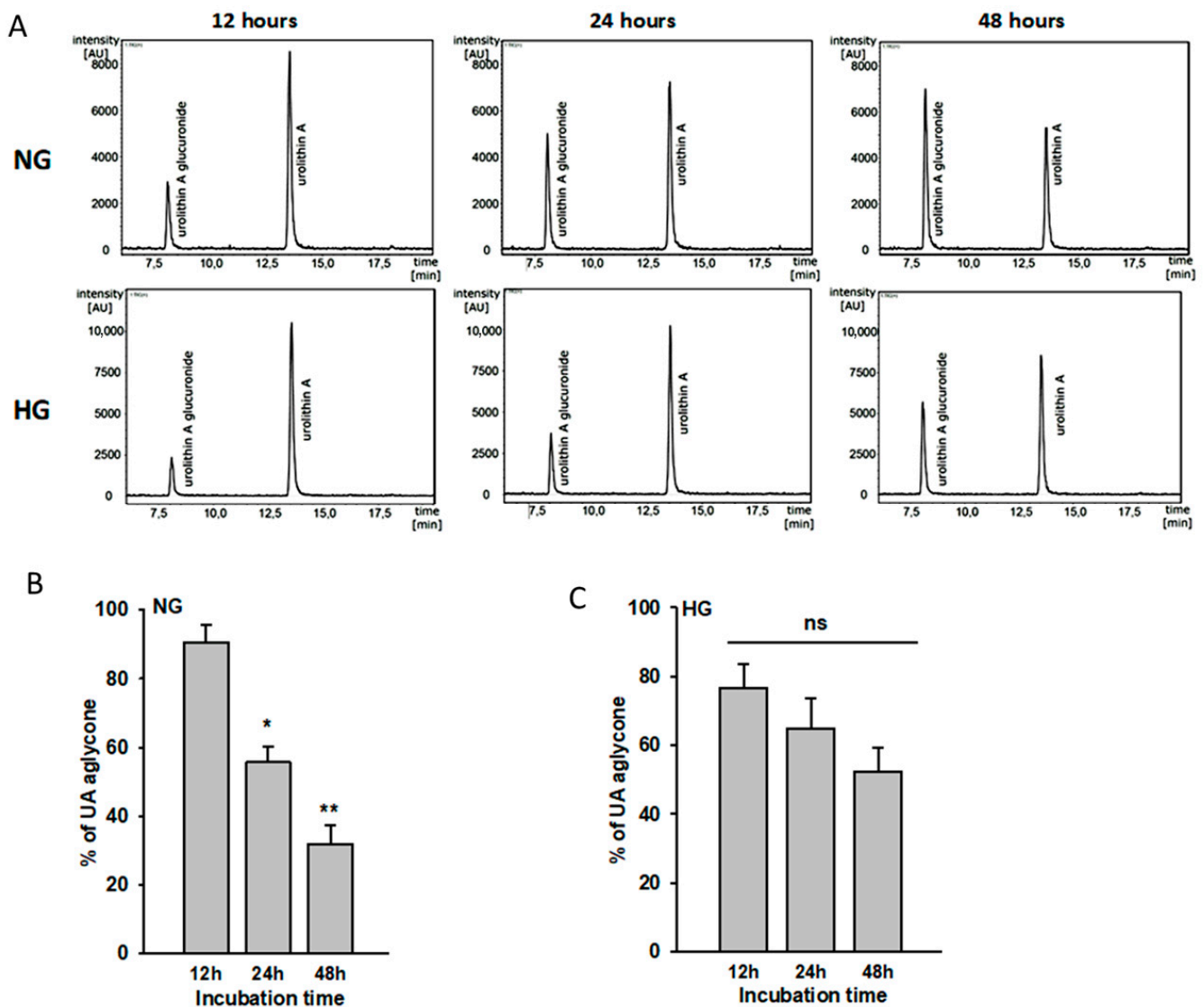


Figure 2. Urolithin A is metabolized by podocytes. Podocytes cultured for 7 d in normal (5.5 mM, NG) or high (25 mM, HG) glucose were incubated with 10 μ M UA for the indicated time periods. At time 0, concentration of UA aglycone was 10 μ M (100%). The presence of urolithin and its glucuronide in the culture medium was assessed using HPLC-DAD-MS/MS after 12 h, 24 h, and 48 h of incubation (A). Calculated results (B,C) show percentage of free aglycone detected in culture media and are expressed as mean \pm SEM from three independent experiments performed in duplicate. The Student's *t*-test was used to calculate *p* values. * *p* < 0.01 24 h vs. 12 h, ** *p* < 0.003 48 h vs. 12 h. AU: arbitrary units; ns: not significant.

Based on these results, for 48-h incubation periods, incubation media were replaced with fresh urolithin solutions after 24 h.

3.2. Podocyte Viability and Structure Are Affected by High Concentrations of Urolithins

Dependent on the cell type, a broad range of urolithin concentrations has been reported to be effective in *in vitro* experiments [27–29]. Thus, to establish conditions for our further experiments, we first tested the viability of NG podocytes that were exposed to increasing concentrations of UA and UB for 24 h and 48 h. Following the 24-h treatment, MTT assay showed a significant decline in the viability of podocytes incubated with 10 μ M UB, whereas a pronounced drop in the presence of both UA and UB was observed at a 100 μ M concentration (Figure 3A). Results of prolonged, 48-h incubation with 10, 30, and 100 μ M

UA and UB revealed that only 10 μM UA did not affect podocyte viability, while at higher concentrations of both urolithins, the viability gradually declined (Figure 3B).

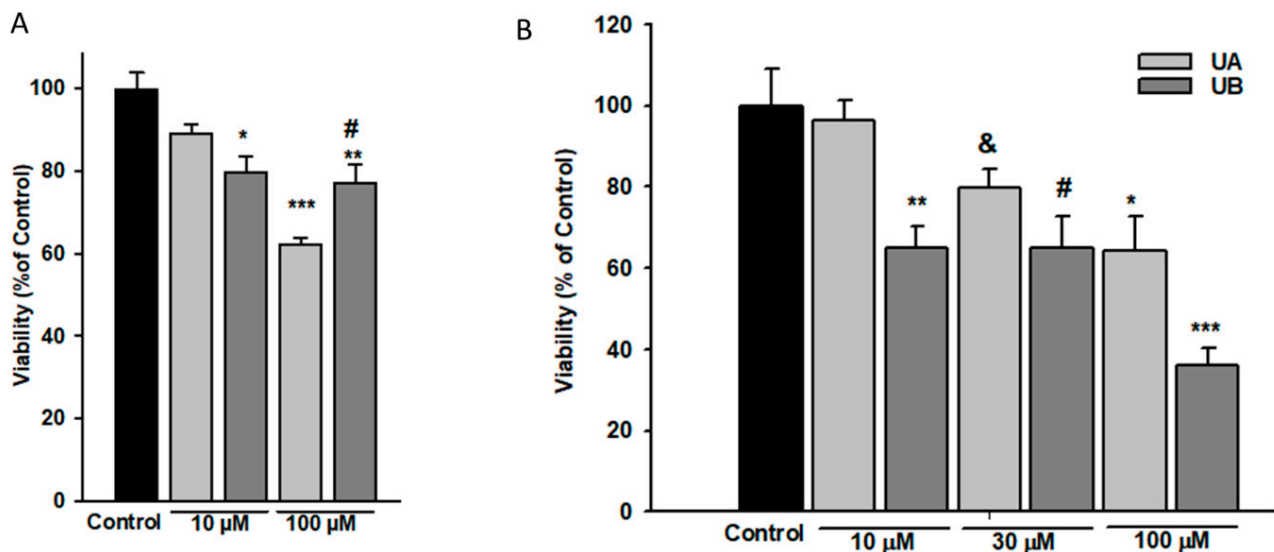


Figure 3. Podocyte viability was impaired by high concentrations of urolithins. Podocytes cultured in normal glucose (5.5 mM, NG) were incubated for 24 h (A) or 48 h (B) with varying concentrations of urolithins and analyzed by MTT test. Results show mean \pm SEM. Control cells were incubated with vehicle (DMSO) alone. ANOVA test was used to calculate p values. For 24-h incubation (A) * $p < 0.05$ vs. Control, ** $p < 0.01$ vs. Control, *** $p < 0.001$ vs. Control and 10 μM UA, # $p < 0.05$ vs. 100 μM UA. For 48-h incubation (B) * $p < 0.05$ 100 μM UA vs. 100 μM UB, vs. 10 μM UA, and vs. Control, # $p < 0.05$ vs. Control, & $p < 0.05$ vs. 10 μM UA, ** $p < 0.005$ vs. 10 μM UA and vs. Control, *** $p < 0.001$ vs. Control. Each MTT test was performed in quadruplicate ($n = 4$).

Moreover, in UB-treated podocytes, the percentage of viable cells significantly dropped at 10 μM UB concentration ($p < 0.01$ vs. Control). On the other hand, in podocytes cultured in HG, UA and UB affected the cell viability in a different manner (Figure 4). HG alone significantly decreased the percentage of viable podocytes ($p < 0.01$ vs. NG Control), whereas in the cells treated for 48 h with 10 μM UA, the viability was improved, as compared to HG Control ($p < 0.005$). Nevertheless, it was still below the value for untreated NG cells ($p < 0.05$). An adverse effect was observed in 10 μM UB-treated podocytes. In this group, the percentage of viable cells was markedly lower than in the respective UA group ($p < 0.005$). Increasing urolithin concentrations resulted in further decline in the number of viable cells. Yet, at all concentrations, the percentage of viable UA-treated podocytes was slightly higher than in UB-treated cells.

The function of podocytes is strictly correlated with the maintenance of the actin cytoskeleton [30]. Remodeling of actin fiber organization may reflect cell damage triggered by biological and chemical factors. Therefore, we investigated the impact of urolithin concentration on podocyte morphology and cytoskeleton. Crystal violet and F-actin staining clearly demonstrated that there were no apparent differences between the architecture of control podocytes and the cells exposed for 24 h to 10 μM UA and UB. High glucose itself rearranged F-actin fibers to form thick cortical bundles, and urolithins apparently did not seem to modulate this effect. However, at 100 μM urolithins, profound changes occurred, such as cell body narrowing, shrinking, and rearrangement of F-actin fibers (Figure 5). The results confirmed that exposure to 100 μM urolithins is deleterious to podocytes.

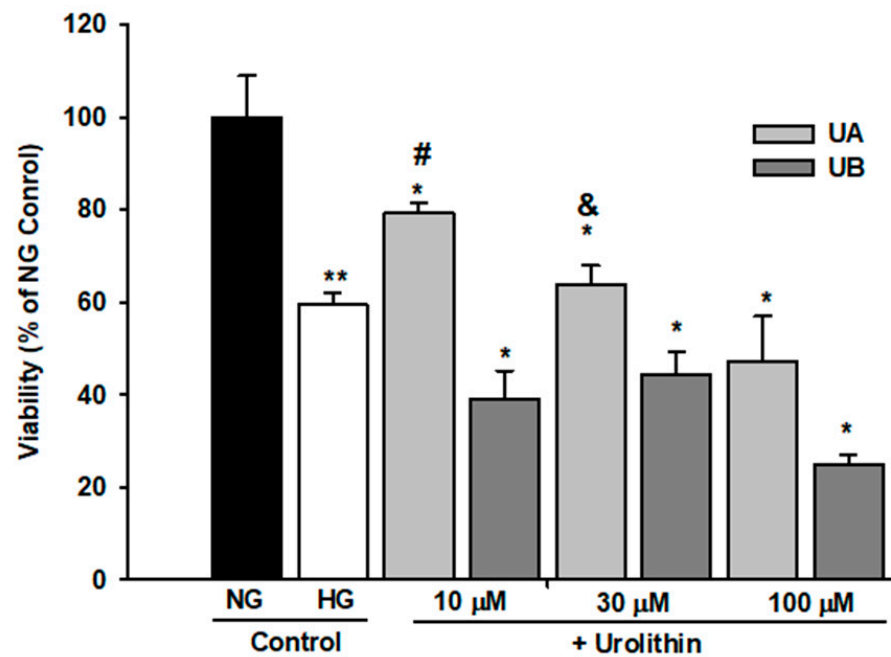


Figure 4. Urolithins A and B differentially affected the viability of podocytes exposed to high glucose. Podocytes cultured in high glucose (25 mM, HG) were incubated for 48 h with varying concentrations of urolithins. Control cells were incubated with vehicle (DMSO) alone. Results show mean \pm SEM. ANOVA and the Student's *t*-tests were used to calculate *p* values. * *p* < 0.05 vs. NG Control, & *p* < 0.05 vs. 30 μ M UB, ** *p* < 0.01 vs. NG Control and vs. 100 μ M UB, # *p* < 0.005 vs. HG Control and vs. 10 μ M UB. Each MTT test was performed in quadruplicate (*n* = 4).

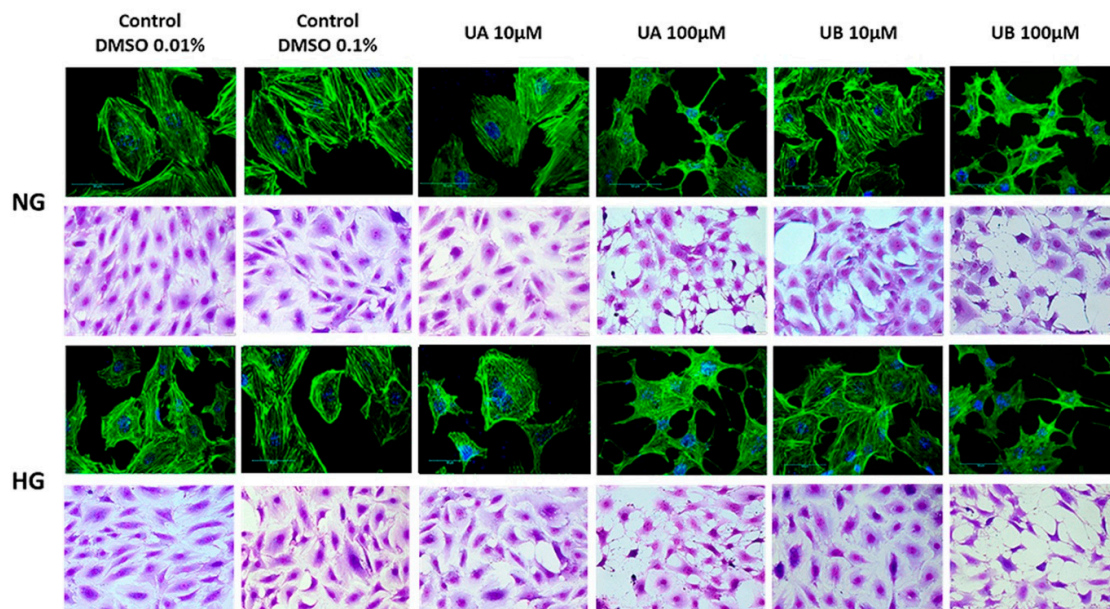


Figure 5. Urolithins at high concentrations disrupted podocyte morphology and structure. Podocytes were cultured on glass coverslips for 7 d in normal (5.5 mM, NG) or high (25 mM, HG) glucose. For the last 48 h, the cells were incubated with 10 μ M and 100 μ M UA or UB and subsequently stained with crystal violet or phalloidin/Alexa 488. Media containing respective vehicle concentrations served as the controls. Representative pictures out of three independent experiments.

Urolithin-dependent changes in podocyte viability could be due to regulation by urolithins of apoptotic and/or necrotic mechanisms. The Bcl-2 protein family members play a pivotal role in regulating cell apoptosis [31]. Thus, using Western blot analysis, we

first examined whether Bcl-2 expression was modulated by UA and UB. Furthermore, based on the MTT results, our intention was to check whether Bcl-2 expression was differentially regulated by UA and UB in HG-treated cells. In general, Bcl-2 upregulation is associated with anti-apoptotic mechanisms [32]. Therefore, we were surprised to find that in both the NG and HG groups, despite loss of viability, the Bcl-2 expression was markedly higher at 100 μ M UA and UB than in the control cells (Figure 6). On the other hand, pronounced downregulation of Bcl-2 in the control cells cultured for 7 d in HG ($p < 0.001$ vs. NG Control) suggested that HG induced podocyte apoptosis, which was in accordance with numerous other studies [33,34]. Moreover, both 10 μ M UA and 10 μ M UB elevated the Bcl-2 level in the NG group. Conversely, in the HG group only, 10 μ M UA upregulated Bcl-2 expression.

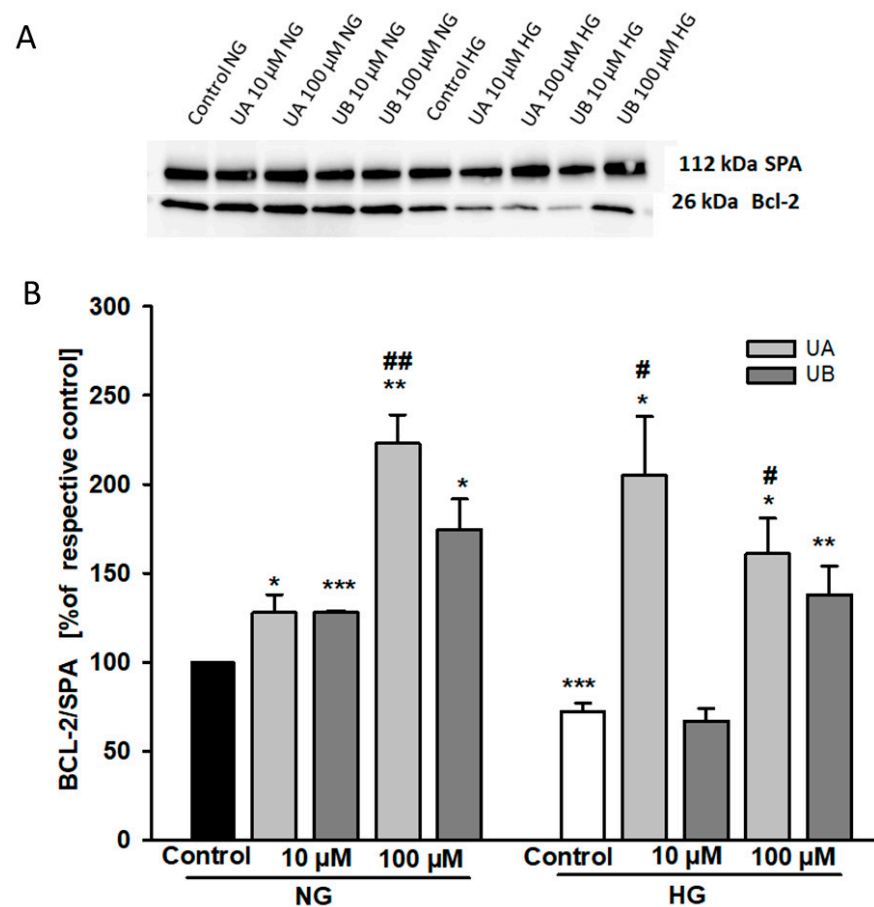


Figure 6. Urolithins and high glucose modulate the expression of Bcl-2. Podocytes cultured for 7 d in normal (5.5 mM, NG) or high (25 mM, HG) glucose were incubated for 24 h with 10 μ M UA and 10 μ M UB. 20- μ g protein samples from total cell lysates were subjected to Western blot analysis followed by quantitative densitometric analysis. Representative immunoblot (A). Quantification results of the ratio of Bcl-2 to Alpha 1 Sodium Potassium ATPase (SPA) are shown as % of respective Control (B). HG Control is expressed as % of the NG Control. Results show mean \pm SEM. ANOVA and the Student's *t*-tests were used to calculate *p* values. * $p < 0.05$ vs. respective Control, ** $p < 0.02$ vs. respective Control, *** $p < 0.001$ vs. NG Control, # $p < 0.05$ vs. HG-UB10 mM, ## $p < 0.02$ vs. NG-10 μ M UA ($n = 4$).

Next, we cytometrically quantified apoptosis in podocytes incubated with UA. Results of Annexin V/PI double-staining disclosed that in the NG group, the percentage of early and late apoptotic cells significantly increased at 100 μ M UA (Figure 7B), which was most likely the reason for the previously observed decline in podocyte viability. Exposure of podocytes to HG induced early and late apoptosis (Figure 7C), which was consistent with earlier MTT and Bcl-2 results. The percentage of early apoptotic cells was markedly reduced

at 10 μM UA ($p < 0.05$ vs. Control) while a considerable increase occurred at 100 μM UA ($p < 0.01$ vs. 10 μM UA). These results indicate that apoptosis induced by prolonged treatment of podocytes with HG can be at least partially reversed by 10 μM UA.

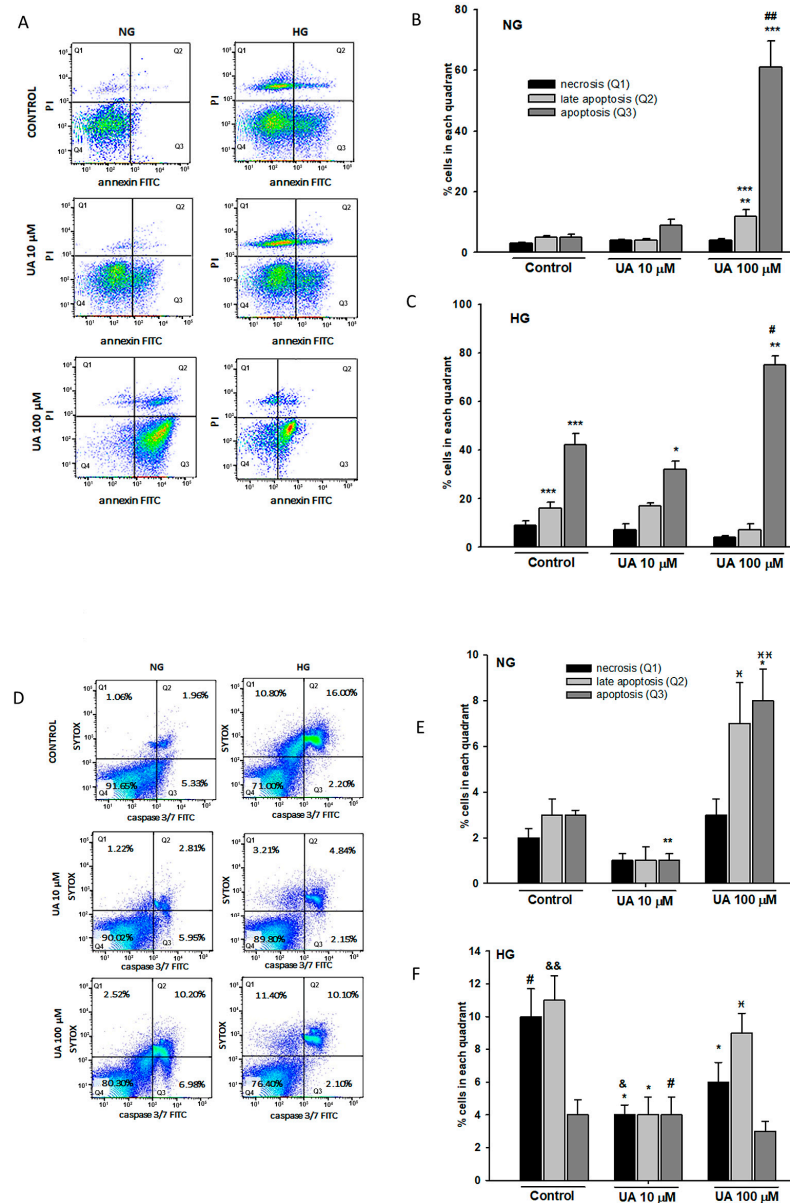


Figure 7. 100 μM UA induced podocyte apoptosis. Podocytes cultured for 7 d in normal (5.5 mM, NG) or high (25 mM, HG) glucose were treated with 10 μM and 100 μM UA for 24 h. Representative flow cytometry images of Annexin V/Propidium Iodide (PI) double-staining (A) and quantitative analysis of podocyte apoptosis (B,C). Representative flow cytometry images of activated caspase-3/7 (D) quantitative analysis of activated caspase-3/7 detection (E,F). Sytox Green nucleic acid stain was used as an indicator of necrotic cells. ANOVA and the Student’s *t*-tests were used to calculate *p* values. For (B,C) * $p < 0.05$ vs. HG Control, # $p < 0.01$ vs. HG Control, ** $p < 0.01$ vs. respective 10 μM UA, ## $p < 0.001$ vs. NG- 10 μM UA, *** $p < 0.001$ vs. NG Control. For (E,F) * $p < 0.05$ vs. Control, ** $p < 0.01$ vs. Control, [x] $p < 0.05$ vs. 10 μM UA, [x][x] $p < 0.01$ vs. 10 μM UA, # $p < 0.05$ vs. respective NG group, & $p < 0.01$ vs. respective NG 10 μM UA, && $p < 0.005$ vs. NG Control. The values are mean \pm SEM ($n = 4$ for (B,C), $n = 3$ for (E,F)).

We also measured caspase 3/7 activity to confirm that the reduced podocyte viability reflected changes in podocyte apoptosis. The cells were simultaneously stained with SYTOX

to assess the percentage of dead cells. The results from flow cytometry revealed that in both NG and HG cells, caspase 3/7 was activated upon treatment of podocytes with 100 μ M UA (Figure 7D). Alone, HG significantly increased caspase activity compared with that in the NG group (Figure 7E, $p < 0.005$). Interestingly, compared to the control, 10 μ M UA reduced the activity of caspase 3/7 not only in HG ($p < 0.05$), but also in NG-treated podocytes ($p < 0.01$). Taken together, these results suggested that in podocytes exposed to HG, 10 μ M UA treatment may improve cell viability by decreasing the rate of apoptosis. Conversely, 100 μ M UA triggered podocyte apoptosis, which was aggravated by the HG milieu.

Based on the above results, in our further experiments, we applied 10 μ M urolithin concentration and 24 h incubation time, unless indicated otherwise.

3.3. Urolithin A Reduces High Glucose-Induced Reactive Oxygen Species Production in Podocytes

Mechanisms involved in the HG-induced apoptosis include elevation of intracellular reactive oxygen species (ROS) [35]. On the other hand, similarly to other polyphenolic compounds, antioxidative properties of urolithins, including UA, have been well documented [36]. Hence, we examined whether the effects of UA and UB on podocyte viability observed by us could be associated with the regulation of ROS levels by urolithins. Flow cytometric analysis confirmed that in HG-treated podocytes, ROS levels increased almost fivefold, as compared to the NG cells (Figure 8, $p < 0.01$). In podocytes incubated with 10 μ M UA, ROS production was prominently downregulated ($p < 0.05$ vs. HG Control), whereas there was no significant effect of incubation with 10 μ M UB. That UB was a much less potent antioxidant than UA was consistent with previous observations [20]. As oxidative stress plays a pivotal role in apoptosis [37], our results suggest that anti-apoptotic effects of UA in podocytes exposed to HG are associated with the reduction of ROS levels, which most likely accounts for its antioxidant activity.

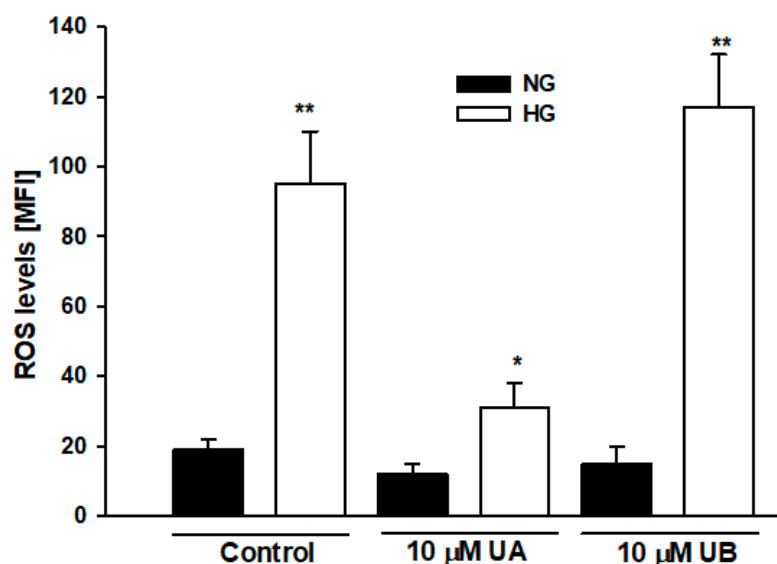


Figure 8. Urolithin A but not UB reduced reactive oxygen species (ROS) levels in podocytes exposed to high glucose. Podocytes cultured for 7 d in normal (5.5 mM, NG) or high (25 mM, HG) glucose were incubated for 24 h with 10 μ M UA or 10 μ M UB. ROS were detected by flow cytometry using CellROX Green reagent. Results show mean \pm SEM. Mann–Whitney test was used to calculate p values. * $p < 0.05$ vs. HG Control, ** $p < 0.01$ vs. NG Control ($n = 4$). MFI: mean fluorescence intensity.

3.4. Urolithin A Modulates Expression of Autophagy-Related Proteins

Cell viability is regulated by an interplay between apoptosis and autophagy [38]. Opposite to apoptosis, autophagy generally enhances cell survival; however, in some circumstances it also may lead to cell death [39]. It has been demonstrated in different studies that HG either impairs [7,40,41] or stimulates [42,43] autophagy in podocytes, and

the results seem to depend on duration of cell exposure to the hyperglycemic milieu. On the other hand, urolithins have been shown to regulate autophagy in some cell types [44,45]. To ascertain if UA-dependent effects on podocyte viability and apoptosis were associated with the modulation of autophagy, we next examined the expression of three commonly used autophagy markers, light chain 3B protein (LC3B), autophagy-related 5 protein (ATG5), and p62. The LC3B is bound to autophagosomes, while ATG5 is a key regulator of autophagy, and the levels of both proteins are directly correlated with autophagic flux [46]. In examining LC3B levels on Western blot analysis, we observed no significant changes in LC3B expression in HG-treated cells (Figure 9B). However, as compared to the NG Control, the ATG5 levels were markedly downregulated ($p < 0.001$, Figure 9C), suggesting that HG impaired autophagic flux in podocytes. Upon treatment with 10 μ M UA, LC3B and ATG5 levels increased significantly in HG cells ($p < 0.01$ vs. NG Control), and LC3B was also upregulated by UA in the NG group ($p < 0.001$ vs. NG Control). These results indicate that autophagy in podocytes was induced in response to UA. Accordingly, pronounced differences between immunofluorescent staining in the control and UA-treated podocytes were observed by confocal microscopy (Figure 9E). Unexpectedly, p62 protein, which is degraded during autophagy, was upregulated by UA in both NG and HG cells (Figure 9D, $p < 0.001$ vs. respective Control), which seemed to be in contrast with the LCB3 and ATG5 results. Quantitative analysis of confocal images confirmed that UA increased the expression of p62 (Figure 9F). Simultaneously, upregulated p62 levels in non-treated HG cells suggested that autophagy was reduced by HG, which was in concert with ATG5 Western blot analysis.

3.5. Urolithin A Upregulates Nephritin Protein but Reduces mRNA Expression

Hyperglycemia-induced impairment of nephritin expression is associated with severe podocyte dysfunction. It has been previously reported that some polyphenolic compounds modulated the expression of nephritin in vivo and in vitro [47,48]. Hence, we next examined whether UA affected the expression of nephritin in podocytes cultured in the NG and HG media. Considering that urolithins can regulate gene expression [27,49], we first performed the quantitative RT-PCR analysis of *NPHS1* gene in podocytes treated with 10 μ M UA. Results revealed that in podocytes from the HG group, nephritin mRNA was significantly decreased ($p < 0.01$, Figure 10). Moreover, 24-h treatment of podocytes with UA significantly reduced the expression of *NPHS1* gene in podocytes from NG ($p < 0.01$), as well as from the HG group ($p < 0.05$).

To determine if UA-induced changes in nephritin expression were mirrored by respective changes in protein levels, we performed a Western blot analysis that confirmed that total nephritin expression was significantly downregulated in podocytes exposed to HG ($p < 0.05$ vs. NG, Figure 11). Yet, in contrast to the qPCR results, upon treatment with 10 μ M UA, nephritin expression was markedly upregulated in NG cells ($p < 0.01$ vs. NG Control) and was also elevated, however, not significantly, in HG-treated podocytes.

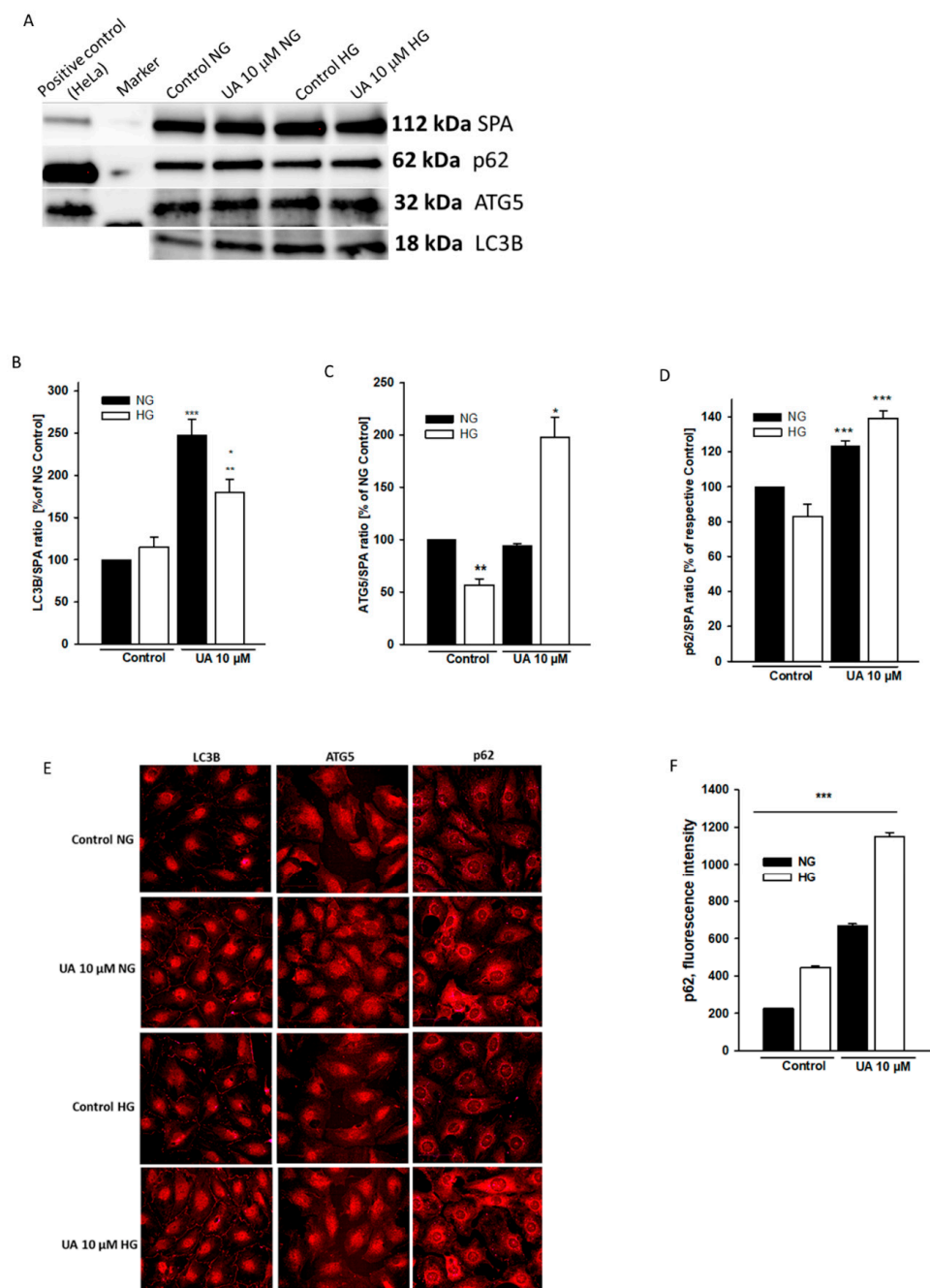


Figure 9. Expression of autophagic markers was upregulated by UA. Podocytes cultured for 7 d in normal (5.5 mM, NG) or high (25 mM, HG) glucose were incubated for 24 h with 10 μ M UA. Immunofluorescence and Western blot analysis were performed to examine the expression patterns of autophagic markers LC3B, ATG-5, and p62. A representative immunoblot (A). Quantitative densitometric analysis was used to determine the ratios of LC3B (B), ATG-5 (C), and p62 (D) to Alpha 1 Sodium Potassium ATPase (SPA). Results of experiments performed in duplicate show mean \pm SEM ($n = 3$ for ATG5 and p62, $n = 4$ for LC3B). The Student's *t*-test was used to calculate *p* values. For LC3B (B) * $p < 0.05$ vs. HG Control, ** $p < 0.01$ vs. NG Control, *** $p < 0.001$ vs. NG Control. For ATG-5 (C) * $p < 0.01$ vs. NG-UA and vs. NG Control, ** $p < 0.001$ vs. NG Control and vs. HG-UA. For p62 (D) *** $p < 0.001$ vs. respective Control. Representative confocal microscopy images of immunofluorescent staining against LC3B, ATG-5, and p62 (E). Quantification of p62 expression (F). 500 cells were analyzed per experiment ($n = 3$), *** $p < 0.001$ NG vs. HG and UA vs. Control.

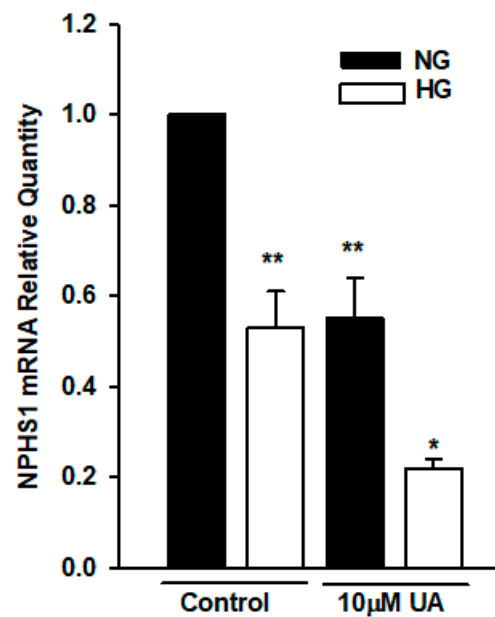


Figure 10. High glucose and UA downregulated the expression of NPHS1 mRNA. Podocytes cultured for 7 d in NG or HG media were incubated for 24 h with 10 µM UA, and total RNA was isolated and analyzed by quantitative RT-PCR. Relative levels of NPHS1 mRNA expression were normalized to β -actin. Each experiment was performed in triplicate, and results are shown as mean \pm SEM. The Student's *t*-test was used to calculate *p* values. * *p* < 0.05 vs. Control HG, ** *p* < 0.01 vs. Control NG (*n* = 3).

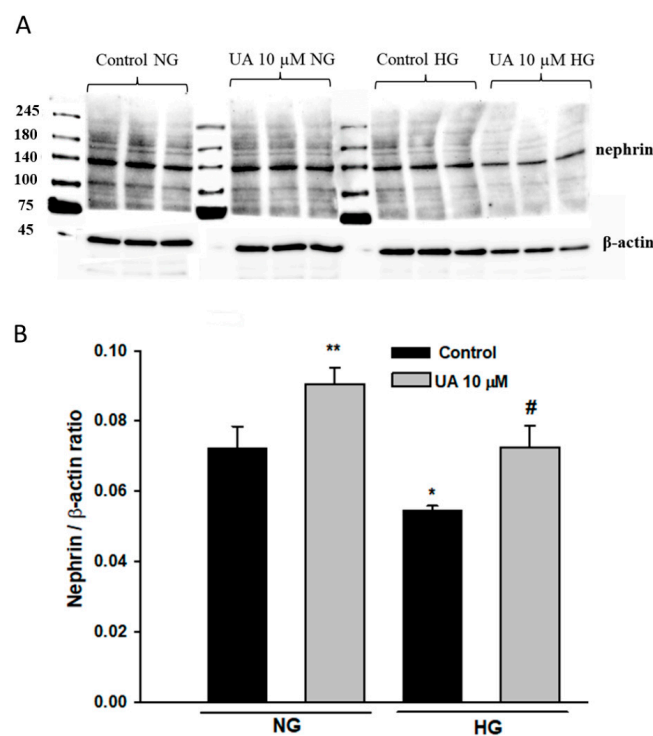


Figure 11. Urolithin A increased total nephrin expression in podocytes. 30- μ g protein samples from total cell lysates were subjected to Western blot analysis followed by quantitative densitometric analysis. Nephrin expression in mouse kidney cortex homogenate served as a positive control. A representative immunoblot (A). Experiments were performed in triplicate. Results of quantitative densitometric analysis corrected for β -actin show mean \pm SEM (B). The Student's *t*-test was used to calculate *p* values. * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01 vs. Control NG, # *p* < 0.05 vs. Control HG (*n* = 3–5).

3.6. Urolithin A Upregulates Nephrin Expression at the Podocyte Surface

Proper nephrin expression at the podocyte surface is essential for podocyte function, so we focused our next analysis on nephrin localized at the plasma membrane. Using an antibody directed to the extracellular nephrin domain, we performed a flow cytometry assay of podocytes treated as above. The results were in line with these from the Western blot analysis and showed not only the HG-induced drop in surface-bound nephrin (Figure 12A), but also a pronounced nephrin upregulation in response to 10 μ M UA in both NG and HG podocytes ($p < 0.001$).

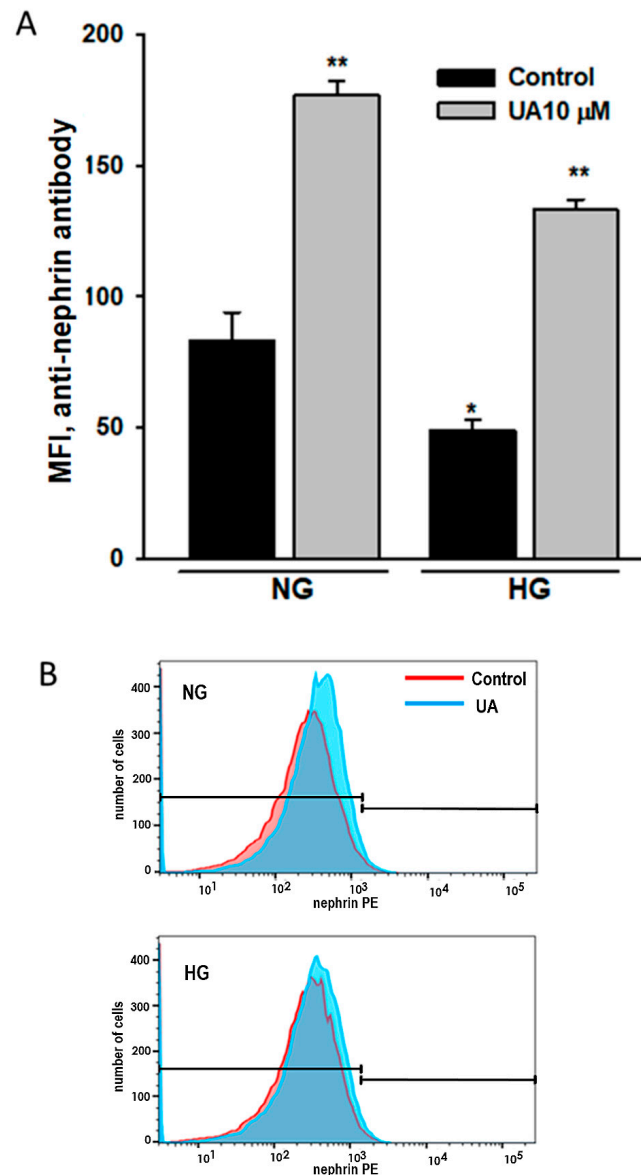


Figure 12. Urolithin A increased nephrin expression at the podocyte surface. Podocytes cultured for 7 d in normal (5.5 mM, NG) or high (25 mM, HG) glucose were incubated for 24 h with 10 μ M UA, stained with phycoerythrin-conjugated antibody against the extracellular nephrin domain and analyzed by flow cytometry. Quantitative analysis of UA and UB effects (A) and representative histogram showing the effect of UA (B) on extracellular nephrin expression. Results show mean \pm SEM. Mann–Whitney test was used to calculate p values. * $p < 0.05$ vs. NG Control, ** $p < 0.001$ vs. respective Control ($n = 5$). MFI: mean fluorescence intensity.

3.7. Intracellular Trafficking of Nephrin Is Modulated by Urolithin A

We next attempted to explain the striking discrepancy between the effects of UA on nephrin mRNA and protein expression. One of the possibilities was that while simultaneously suppressing the *NPHS1* gene, UA suppressed the rate of nephrin endocytosis and slowed down nephrin turnover. To check this hypothesis, we quantified the co-localization of nephrin and early endosome marker EEA1 (Figure 13). However, confocal analysis of double-stained cells disclosed that upon UA treatment, the extent of intracellular co-localization of nephrin and EEA1 markedly increased in both NG and HG cells ($p < 0.001$). These results indicate that UA enhanced nephrin trafficking and the effect was independent on glucose concentration.

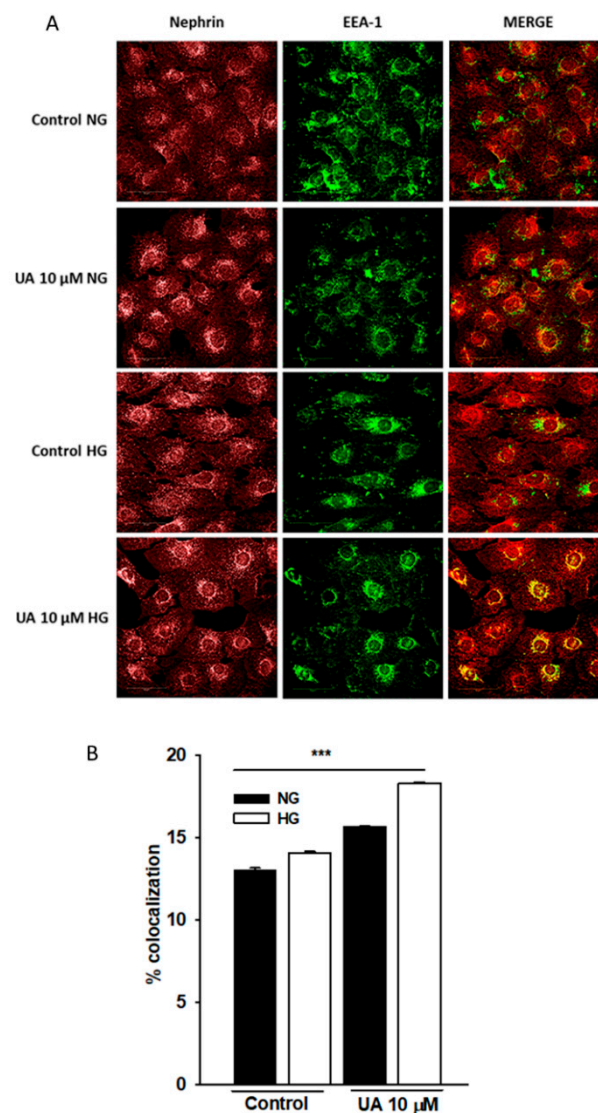


Figure 13. Upon treatment with UA, nephrin co-localization with early endosomal marker EEA1 was increased. Podocytes cultured for 7 d in normal (5.5 mM, NG) or high (25 mM, HG) glucose were incubated for 24 h with 10 μ M UA. Representative confocal microscopy images of double staining against nephrin and EEA-1 (A). Quantification of nephrin and EEA-1 co-localization (B). Experiments were performed in duplicate and 500 cells were analyzed per experiment ($n = 3$). ANOVA test was used to calculate p values. *** $p < 0.001$.

4. Discussion

Urolithins, the products of gut microbiota from ellagitannin rich foodstuff were identified in humans almost 20 years ago [50]. Since then, numerous in vitro and in vivo studies

have demonstrated that endogenous as well as exogenously delivered urolithins are potent multifunctional compounds capable of regulating a variety of cellular processes [11]. Due to their immense health benefits, urolithins are under consideration for the application in the treatment of several diseases, including diabetes [51]. Some urolithins circulating in plasma accumulate in certain tissues, whereas the remaining urolithins pass through the glomerular filtration barrier, directly contacting its components. Nevertheless, almost no publications address the action of these compounds on podocytes. Following the establishment of a HG-induced podocyte injury model, in our present study, we demonstrated that urolithins affected podocyte viability and nephrin expression, as well as nephrin endosomal trafficking. We revealed that in HG-treated podocytes, UA decreased the rate of apoptosis, upregulated autophagic flux, and inhibited HG-induced ROS production. Our further finding was that independent of ambient glucose concentration, UA upregulated nephrin expression at the podocyte surface and, most likely, accelerated nephrin turnover. Moreover, we showed that podocytes metabolized urolithins by glucuronidation.

Urolithins are highly lipophilic and thus can easily cross cell membranes. After being produced in the large intestine, urolithins undergo phase II metabolism (mostly glucuronidation) in intestinal enterocytes and hepatocytes [10,23]. In our experiments we have demonstrated that podocytes also actively converted free aglycones to glucuronides that were then released from the cells into the culture media (Figure 2). In podocytes cultured in NG, the rate of glucuronidation was relatively high (69% of free aglycone conjugated after 48-h incubation with UA). However, podocytes from the HG group exhibited slower metabolism of UA than NG cells, resulting in a 48% decrease of UA after 48 h. Compared to UA conjugates, free aglycones show much higher biological activity [13,52,53]. Experiments in rats revealed that systemic inflammation triggered tissue deconjugation of UA-glucuronide to free UA [52], which was probably a mechanism enhancing the anti-inflammatory activity of urolithin. It is well established that HG induces oxidative stress and activates a number of inflammatory pathways [47,54]. In our experiments, UA profoundly decreased ROS production in podocytes from the HG group (Figure 8). Hence, we hypothesize that slowing down the glucuronidation rate of UA in podocytes exposed to HG could be protective against the deleterious effects of HG.

Different dose-dependent effects of urolithins on cell viability *in vitro* were observed in various cell types [29,44,55,56]. In some cells, UA and UB did not show any cytotoxic effects up to the concentration of 100 μ M [27]; therefore, we tested physiological (10–30 μ M) as well as high (100 μ M) concentrations of UA and UB. However, we found that in NG conditions, only 10 μ M UA was not toxic, whereas UB already at that low concentration impaired podocyte viability (Figure 3). Consistent with previous reports [57,58], exposure to HG reduced podocyte viability (Figure 4) and increased apoptotic rate (Figure 7A–C), as well as caspase 3/7 activity (Figure 7D–F), with concomitant downregulation of anti-apoptotic protein Bcl-2 (Figure 6). Treatment of podocytes with 10 μ M UA suppressed apoptosis and caspase activity and improved cell viability, while UB at all tested concentrations aggravated the toxic effect of HG (Figure 4). Yet, at 100 μ M concentrations, both UA and UB dramatically reduced the viability of podocytes from the NG and HG groups (Figures 3 and 4), which was accompanied by the disruption of the cell architecture (Figure 5) and increased apoptotic rate (Figure 7). Nevertheless, at the same time, the anti-apoptotic protein Bcl-2 was upregulated, which could be a defensive mechanism toward apoptotic stimuli, as has been proposed for some other cells [59,60]. The Bcl-2 protein is also involved in the inhibition of autophagy, another catabolic process essential for cellular homeostasis. The predominant function of autophagy is to promote cell survival, although under some circumstances it is linked to cell death [61]. Together with ATG5, Bcl-2 is responsible for crosstalk among apoptosis and autophagy [62]. In the context of our results, Bcl-2 upregulation at 100 μ M UA could be directed against UA toxicity, as a cytoprotective mechanism abolishing the cell death-inducing autophagy. On the other hand, subcellular localization of Bcl-2 is distributed between mitochondria—which are the main site of Bcl-2 expression—and other organelles. A small portion is localized to the endoplasmic retic-

ulum (ER) membrane, and only ER-targeted Bcl-2, but not mitochondrial Bcl-2, inhibits autophagy [63,64]. However, in this study, we did not investigate the subcellular expression of Bcl-2 in podocytes exposed to UA.

In different *in vitro* studies on podocytes, HG has been reported either to induce [42] or to attenuate [41] autophagy. This apparent discrepancy has been cleared up in a study in which the authors demonstrated that the autophagic flux depended on the duration of exposure to HG. Autophagy was induced after a short-term (48-h) treatment of podocytes with HG, while it was repressed after a long-term (15-d) exposure to HG [43]. In line with this finding, our study revealed that the long-term (7-d) exposure of podocytes to HG suppressed autophagy, which was reflected by downregulation of ATG5 and upregulation of p62 levels (Figure 9C,F). At the same time, the level of autophagosome marker LC3B remained unchanged (Figure 9B). Yet, the number of autophagosomes does not always correspond to the autophagic activity. As a matter of fact, it is resultant of the balance between the rate of their generation and the rate of their conversion into autolysosomes. Thus, lack of LC3B downregulation may represent suppression of autophagy downstream of autophagosome formation [65]. However, upon treatment with 10 μ M UA, both LC3B and ATG5 were upregulated, which indicates that UA stimulated autophagy in HG, and most likely in NG podocytes. These results suggest that in HG-treated podocytes, UA could induce recovery from an apoptotic state by upregulating autophagic flux.

As it is recommended that the measurement of autophagic flux be performed in combination with several markers, we also determined the expression of p62, also known as SQSTM1/sequestome 1. The p62 molecules are selectively incorporated into autophagosomes through direct binding to LC3 and are degraded by autophagy. Thus, the total cellular expression levels of p62 inversely correlates with autophagic activity, and p62 is frequently used to monitor autophagic flux [66]. Therefore, we were astonished to realize that in podocytes treated with 10 μ M UA, p62 was significantly upregulated (Figure 9D–F), which is usually associated with the reduction of autophagic activity. Yet, several factors, including transcriptional upregulation, can affect the whole-cell p62 level under certain conditions [66,67]. The transcriptional activity of urolithins has been documented in several studies [44,68,69], which makes it likely that UA could affect the expression of p62 independent of autophagy. Furthermore, in addition to its cytosolic functions, including involvement in autophagy, p62 also forms nuclear bodies, the role of which is not fully understood [70].

Normal nephrin expression is critical for slit diaphragm integrity and podocyte structure and function. Disturbances in nephrin abundance and cellular localization are considered to cause podocyte injury and loss [71,72], which is in turn associated with the majority of glomerular diseases [73]. Several mechanisms have been postulated to mediate podocyte depletion in nephrin-deficient glomeruli. Surprisingly, disturbances in nephrin expression are not associated with apoptosis [74]. Proteinuria, a hallmark of many glomerular diseases, precedes podocyte impairment. Among the few published studies on the effects of urolithins on kidney function, one study showed UB ameliorated proteinuria in a unilateral ureteral obstruction rat model [75]. Thus, exploring the effects of UA on nephrin expression seemed to be particularly interesting to us.

High glucose downregulated nephrin at both mRNA (Figure 10) and total protein (Figure 11) levels, which was consistent with previously published data [76–78]. Simultaneously, HG-treated podocytes expressed less nephrin at the surface (Figure 12). In the presence of UA, surface nephrin was increased, which was accompanied by the elevation of total nephrin expression in the whole-cell lysates. However, this was accompanied by a pronounced drop of NPHS1 mRNA levels, which was an unexpected finding. Discrepancy between the abundance of cognate protein and RNA molecules is frequently observed, whereas quantitative relations between RNA and protein are still not fully understood [79,80]. It has been proposed that such an inverse correlation may be due to the regulation of translation [81] and is frequently associated with the molecular and structural polarity of some cells [82], such as podocytes. Urolithin A is known to modulate

multiple intracellular signaling pathways [28], so we can speculate that UA also affected transcriptional activity in podocytes.

Some studies have revealed that the decreased abundance of surface nephrin was associated with enhanced internalization of the protein [83,84]. Hence, we investigated in a converse situation, when nephrin expression at the podocyte surface was upregulated by UA, whether nephrin endocytic trafficking could be impaired. Based on the detailed study on nephrin incorporation into endosomal structures [85], we examined the intracellular co-localization of nephrin with early endosome marker EEA1 that was shown to highly co-localize with nephrin at an early phase, as well as over a long time of internalization. In podocytes exposed to HG, nephrin incorporation into EEA1-positive compartments increased, which indicated that endocytosis was enhanced in HG cells, as described previously [83]. However, as shown in Figure 13B, in both NG- and HG-treated podocytes, incubation with UA further augmented nephrin trafficking. Thus, both synthesis and endocytosis of nephrin were augmented by UA, which suggests that UA accelerated nephrin turnover. Of all the urolithin isoforms, UA and UB are the most frequently tested compounds. Both urolithins have been shown to exert various *in vitro* and *in vivo* biological activities, that in general are considered to be beneficial [11,17]. In this study, we show that in HG-treated podocytes, UA demonstrated its cytoprotective properties more effectively than UB. Moreover, UB seemed to negatively affect podocyte viability more readily than UA. Thus, our results suggest that in HG milieu mimicking diabetes, UA may have higher therapeutic potential than UB. However, one should note that concentrations of highly bioactive free aglycones in the culture media were higher than in the *in vivo* conditions. In plasma, as well as in tissues, most urolithins are found in a less active conjugated form, no matter if administered orally or directly injected [9,86]. So far, various conditions (e.g., concentration, incubation time, conjugates, or free aglycones) for *in vitro* studies on urolithins have been used by different authors. It still remains questionable, however, to what extent the experiments yield physiologically relevant results [16]. Nevertheless, it is tempting to consider future treatment of podocytes (e.g., with nanoparticle carriers that would transport active urolithin aglycones directly to the target cells). In this context, *in vitro* studies may provide essential data on safety and efficiency of such treatment.

In summary, our results show that urolithins are involved in mechanisms regulating podocyte viability. Observed in HG milieu, the pro-survival effects of urolithins, and particularly those of UA, make these polyphenolic compounds potent therapeutic candidates against podocyte impairment in diabetes. Slowing down UA glucuronidation in HG milieu could represent the adjustment of podocytes to the current demand for highly active free aglycone. Furthermore, enhanced by UA, nephrin turnover suggests that slit diaphragm integrity could be modulated by this compound. However, considering their pleiotropic activities, urolithins need to be carefully studied with respect to potential long-term merits and the adverse effects.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11162471/s1>, Material S1: HPLC system and conditions of separation; Material S2: Validation of the developed HPLC-MS/MS method for the determination of urolithin A and its metabolite; Table S3: Primary antibodies; Table S4: Secondary antibodies.

Author Contributions: Conceptualization, M.K., M.K.-B. and B.L.; data curation, M.K.-B. and B.L.; formal analysis, M.K., A.D., A.P. and S.G.; funding acquisition, L.K.; investigation, M.K.; methodology, M.K.-B. and B.L.; project administration, M.K. and B.L.; software, A.D., A.P. and S.G.; supervision, L.K. and B.L.; validation, M.K.-B. and A.D.; visualization, M.K.; writing—original draft, M.K., S.G. and B.L.; writing—review and editing, M.K.-B. and B.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the project POWR.03.05.00-00-z082/18 co-financed by the European Union through the European Social Fund under the Operational Program Knowledge Education Development 2014–2020 and by the Polish National Science Centre (NCN) OPUS grants 2015/19/B/NZ7/03830 and 2019/33/B/NZ7/02699, and by the Ministry of Education and Science Poland grant 10/E-389/SPUB/SP/2020 (all three grants to Leszek Kalinowski).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Anna Siekierzycka, and Anna Janaszak-Jasiecka, (Division of Medical Laboratory Diagnostics, Medical University of Gdansk) for helpful support and suggestions. We would also like to thank Katarzyna Gobis, (Department of Organic Chemistry, Medical University of Gdansk) for synthesizing the urolithins. Part of the data were presented in abstract form at the annual meeting of the German Society of Nephrology, at the World Congress of Polyphenols and at the International Podocyte Conference.

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

References

1. Sun, H.; Saeedi, P.; Karuranga, S.; Pinkepank, M.; Ogurtsova, K.; Duncan, B.B.; Stein, C.; Basit, A.; Chan, J.C.N.; Mbanya, J.C.; et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2022**, *183*, 109119. [[CrossRef](#)]
2. Tuttle, K.R.; Bakris, G.L.; Bilous, R.W.; Chiang, J.L.; de Boer, I.H.; Goldstein-Fuchs, J.; Hirsch, I.B.; Kalantar-Zadeh, K.; Narva, A.S.; Navaneethan, S.D.; et al. Diabetic kidney disease: A report from an ADA Consensus Conference. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 2864–2883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Pagtalunan, M.E.; Miller, P.L.; Jumping-Eagle, S.; Nelson, R.G.; Myers, B.D.; Rennke, H.G.; Coplon, N.S.; Sun, L.; Meyer, T.W. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J. Clin. Investig.* **1997**, *99*, 342–348. [[CrossRef](#)]
4. Kriz, W. Podocyte is the major culprit accounting for the progression of chronic renal disease. *Microsc. Res. Tech.* **2002**, *57*, 189–195. [[CrossRef](#)]
5. Kravets, I.; Mallipattu, S.K. The Role of Podocytes and Podocyte-Associated Biomarkers in Diagnosis and Treatment of Diabetic Kidney Disease. *J. Endocr. Soc.* **2020**, *4*, bvaa029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Marshall, S.M. The podocyte: A potential therapeutic target in diabetic nephropathy? *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 2713–2720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Liu, N.; Xu, L.; Shi, Y.; Zhuang, S. Podocyte Autophagy: A Potential Therapeutic Target to Prevent the Progression of Diabetic Nephropathy. *J. Diabetes Res.* **2017**, *2017*, 3560238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Barutta, F.; Bellini, S.; Gruden, G. Mechanisms of podocyte injury and implications for diabetic nephropathy. *Clin. Sci.* **2022**, *136*, 493–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Espín, J.C.; Larrosa, M.; García-Conesa, M.T.; Tomás-Barberán, F. Biological Significance of Urolithins, the Gut Microbial Ellagic Acid-Derived Metabolites: The Evidence So Far. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 270418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Toney, A.M.; Fox, D.; Chaidez, V.; Ramer-Tait, A.E.; Chung, S. Immunomodulatory Role of Urolithin A on Metabolic Diseases. *Biomedicines* **2021**, *9*, 192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. García-Villalba, R.; Giménez-Bastida, J.A.; Cortés-Martín, A.; Ávila-Gálvez, M.Á.; Tomás-Barberán, F.A.; Selma, M.V.; Espín, J.C.; González-Sarriás, A. Urolithins: A Comprehensive Update on their Metabolism, Bioactivity, and Associated Gut Microbiota. *Mol. Nutr. Food Res.* **2022**, 2101019. [[CrossRef](#)]
12. Ávila-Gálvez, M.Á.; Espín, J.C.; González-Sarriás, A. Physiological Relevance of the Antiproliferative and Estrogenic Effects of Dietary Polyphenol Aglycones versus Their Phase-II Metabolites on Breast Cancer Cells: A Call of Caution. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 8547–8555. [[CrossRef](#)]
13. Tomás-Barberán, F.A.; García-Villalba, R.; González-Sarriás, A.; Selma, M.V.; Espín, J.C. Ellagic Acid Metabolism by Human Gut Microbiota: Consistent Observation of Three Urolithin Phenotypes in Intervention Trials, Independent of Food Source, Age, and Health Status. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 6535–6538. [[CrossRef](#)]
14. García-Villalba, R.; Beltrán, D.; Frutos, M.D.; Selma, M.V.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. Metabolism of different dietary phenolic compounds by the urolithin-producing human-gut bacteria *Gordonibacter urolithinifaciens* and *Ellagibacter isourolithinifaciens*. *Food Funct.* **2020**, *11*, 7012–7022. [[CrossRef](#)]
15. Hasheminezhad, S.H.; Boozari, M.; Iranshahi, M.; Yazarlu, O.; Sahebkar, A.; Hasanpour, M.; Iranshahi, M. A mechanistic insight into the biological activities of urolithins as gut microbial metabolites of ellagitannins. *Phytother. Res.* **2022**, *36*, 112–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Vini, R.; Azeez, J.M.; Remadevi, V.; Susmi, T.R.; Ayswarya, R.S.; Sujatha, A.S.; Muraleedharan, P.; Lathika, L.M.; Sreeharshan, S. Urolithins: The Colon Microbiota Metabolites as Endocrine Modulators: Prospects and Perspectives. *Front. Nutr.* **2022**, *8*, 800990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Kotewicz, M.; Lewko, B. Urolithins and their possible implications for diabetic kidney. *Eur. J. Transl. Clin. Med.* **2020**, *5*, 53–63. [[CrossRef](#)]
18. Andreux, P.A.; Blanco-Bose, W.; Ryu, D.; Burdet, F.; Ibberson, M.; Aebischer, P.; Auwerx, J.; Singh, A.; Rinsch, C. The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans. *Nat. Metab.* **2019**, *1*, 595–603. [[CrossRef](#)]
19. Cheng, Z.; Tu, J.; Zhang, H.; Zhang, Y.; Zhou, B. Urolithin A attenuates renal fibrosis by inhibiting TGF- β 1/Smad and MAPK signaling pathways. *J. Funct. Foods* **2021**, *83*, 104547. [[CrossRef](#)]
20. Bialonska, D.; Kasimsetty, S.G.; Khan, S.I.; Ferreira, D. Urolithins, intestinal microbial metabolites of Pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10181–10186. [[CrossRef](#)]
21. Kobayashi, N.; Reiser, J.; Schwarz, K.; Sakai, T.; Kriz, W.; Mundel, P. Process formation of podocytes: Morphogenetic activity of microtubules and regulation by protein serine/threonine phosphatase PP2A. *Histochem. Cell Biol.* **2001**, *115*, 255–266. [[CrossRef](#)]
22. Sala, R.; Mena, P.; Savi, M.; Brighenti, F.; Crozier, A.; Miragoli, M.; Stilli, D.; Del Rio, D. Urolithins at physiological concentrations affect the levels of pro-inflammatory cytokines and growth factor in cultured cardiac cells in hyperglucidic conditions. *J. Funct. Foods* **2015**, *15*, 97–105. [[CrossRef](#)]
23. García-Villalba, R.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. Chromatographic and spectroscopic characterization of urolithins for their determination in biological samples after the intake of foods containing ellagitannins and ellagic acid. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1428*, 162–175. [[CrossRef](#)]
24. Booth, B.P.; Simon, W.C. Analytical method validation. In *New Drug Development: Regulatory Paradigms for Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2016; pp. 138–159. [[CrossRef](#)]
25. Endlich, N.; Schordan, E.; Cohen, C.D.; Kretzler, M.; Lewko, B.; Welsch, T.; Kriz, W.; Otey, C.A.; Endlich, K. Palladin is a dynamic actin-associated protein in podocytes. *Kidney Int.* **2009**, *75*, 214–226. [[CrossRef](#)]
26. Aragonès, G.; Danesi, F.; Del Rio, D.; Mena, P. The importance of studying cell metabolism when testing the bioactivity of phenolic compounds. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *69*, 230–242. [[CrossRef](#)]
27. Adachi, S.; Sasaki, K.; Kondo, S.; Komatsu, W.; Yoshizawa, F.; Isoda, H.; Yagasaki, K. Antihyperuricemic Effect of Urolithin A in Cultured Hepatocytes and Model Mice. *Molecules* **2020**, *25*, 5136. [[CrossRef](#)]
28. Abdelazeem, K.N.M.; Kalo, M.Z.; Beer-Hammer, S.; Lang, F. The gut microbiota metabolite urolithin A inhibits NF- κ B activation in LPS stimulated BMDMs. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 7117. [[CrossRef](#)]
29. Cásedas, G.; Les, F.; Choya-Foces, C.; Hugo, M.; López, V. The Metabolite Urolithin-A Ameliorates Oxidative Stress in Neuro-2a Cells, Becoming a Potential Neuroprotective Agent. *Antioxidants* **2020**, *9*, 177. [[CrossRef](#)]
30. Welsh, G.I.; Saleem, M.A. The podocyte cytoskeleton—Key to a functioning glomerulus in health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2012**, *8*, 14–21. [[CrossRef](#)]
31. Hardwick, J.M.; Soane, L. Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a008722. [[CrossRef](#)]
32. Cory, S.; Adams, J.M. The Bcl2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 647–656. [[CrossRef](#)]
33. Ziyadeh, F.; Wolf, G. Pathogenesis of the Podocytopathy and Proteinuria in Diabetic Glomerulopathy. *Curr. Diabetes Rev.* **2008**, *4*, 39–45. [[CrossRef](#)]
34. Lei, J.; Zhao, L.; Zhang, Y.; Wu, Y.; Liu, Y. High Glucose-Induced Podocyte Injury Involves Activation of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Induced Endoplasmic Reticulum (ER) Stress. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *45*, 2431–2443. [[CrossRef](#)]
35. Susztak, K.; Raff, A.C.; Schiffer, M.; Böttinger, E.P. Glucose-Induced Reactive Oxygen Species Cause Apoptosis of Podocytes and Podocyte Depletion at the Onset of Diabetic Nephropathy. *Diabetes* **2006**, *55*, 225–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Djedjibegovic, J.; Marjanovic, A.; Panieri, E.; Saso, L. Ellagic Acid-Derived Urolithins as Modulators of Oxidative Stress. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 5194508. [[CrossRef](#)]
37. Kannan, K.; Jain, S.K. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* **2000**, *7*, 153–163. [[CrossRef](#)]
38. Mariño, G.; Niso-Santano, M.; Baehrecke, E.H.; Kroemer, G. Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 81–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Jung, S.; Jeong, H.; Yu, S.-W. Autophagy as a decisive process for cell death. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 921–930. [[CrossRef](#)]
40. Tagawa, A.; Yasuda, M.; Kume, S.; Yamahara, K.; Nakazawa, J.; Chin-Kanasaki, M.; Araki, H.; Araki, S.; Koya, D.; Asanuma, K.; et al. Impaired Podocyte Autophagy Exacerbates Proteinuria in Diabetic Nephropathy. *Diabetes* **2016**, *65*, 755–767. [[CrossRef](#)]
41. Audzeyenka, I.; Rogacka, D.; Piwkowska, A.; Angielski, S.; Jankowski, M. Viability of primary cultured podocytes is associated with extracellular high glucose-dependent autophagy downregulation. *Mol. Cell. Biochem.* **2017**, *430*, 11–19. [[CrossRef](#)]
42. Ma, T.; Zhu, J.; Chen, X.; Zha, D.; Singhal, P.C.; Ding, G. High glucose induces autophagy in podocytes. *Exp. Cell Res.* **2013**, *319*, 779–789. [[CrossRef](#)]
43. Lenoir, O.; Jasiak, M.; Héniq, C.; Guyonnet, L.; Hartleben, B.; Bork, T.; Chipont, A.; Flosseau, K.; Bensaada, I.; Schmitt, A.; et al. Endothelial cell and podocyte autophagy synergistically protect from diabetes-induced glomerulosclerosis. *Autophagy* **2015**, *11*, 1130–1145. [[CrossRef](#)]

44. Al-Harbi, S.A.; Abdulrahman, A.O.; Zamzami, M.A.; Khan, M.I. Urolithins: The Gut Based Polyphenol Metabolites of Ellagitannins in Cancer Prevention, a Review. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 647582. [[CrossRef](#)]
45. Boakye, Y.D.; Groyer, L.; Heiss, E.H. An increased autophagic flux contributes to the anti-inflammatory potential of urolithin A in macrophages. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2018**, *1862*, 61–70. [[CrossRef](#)]
46. Kroemer, G.; Mariño, G.; Levine, B. Autophagy and the Integrated Stress Response. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 280–293. [[CrossRef](#)]
47. Hayashi, D.; Wang, L.; Ueda, S.; Yamanoue, M.; Ashida, H.; Shirai, Y. The mechanisms of ameliorating effect of a green tea polyphenol on diabetic nephropathy based on diacylglycerol kinase α . *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 11790. [[CrossRef](#)]
48. Pan, Q.-R.; Ren, Y.-L.; Zhu, J.-J.; Hu, Y.-J.; Zheng, J.-S.; Fan, H.; Xu, Y.; Wang, G.; Liu, W.-X. Resveratrol Increases Nephric and Podocin Expression and Alleviates Renal Damage in Rats Fed a High-Fat Diet. *Nutrients* **2014**, *6*, 2619–2631. [[CrossRef](#)]
49. González-Sarriás, A.; Espín, J.-C.; Tomás-Barberán, F.A.; García-Conesa, M.-T. Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 686–698. [[CrossRef](#)]
50. Cerdá, B.; Espín, J.C.; Parra, S.; Martínez, P.; Tomás-Barberán, F.A. The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur. J. Nutr.* **2004**, *43*, 205–220. [[CrossRef](#)]
51. Raimundo, A.F.; Ferreira, S.; Tomás-Barberán, F.A.; Santos, C.N.; Menezes, R. Urolithins: Diet-Derived Bioavailable Metabolites to Tackle Diabetes. *Nutrients* **2021**, *13*, 4285. [[CrossRef](#)]
52. Ávila-Gálvez, M.A.; Giménez-Bastida, J.A.; González-Sarriás, A.; Espín, J.C. Tissue deconjugation of urolithin A glucuronide to free urolithin A in systemic inflammation. *Food Funct.* **2019**, *10*, 3135–3141. [[CrossRef](#)]
53. Bobowska, A.; Granica, S.; Filipiek, A.; Melzig, M.F.; Moeslinger, T.; Zentek, J.; Kruk, A.; Piwowarski, J.P. Comparative studies of urolithins and their phase II metabolites on macrophage and neutrophil functions. *Eur. J. Nutr.* **2021**, *60*, 1957–1972. [[CrossRef](#)]
54. Giacco, F.; Brownlee, M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 1058–1070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Liberal, J.; Carmo, A.; Gomes, C.; Cruz, M.T.; Batista, M.T. Urolithins impair cell proliferation, arrest the cell cycle and induce apoptosis in UMUC3 bladder cancer cells. *Investig. New Drugs* **2017**, *35*, 671–681. [[CrossRef](#)]
56. Qiu, Z.; Zhou, J.; Zhang, C.; Cheng, Y.; Hu, J.; Zheng, G. Antiproliferative effect of urolithin A, the ellagic acid-derived colonic metabolite, on hepatocellular carcinoma HepG2.2.15 cells by targeting Lin28a/let-7a axis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2018**, *51*, e7220. [[CrossRef](#)]
57. Lin, J.S.; Susztak, K. Podocytes: The Weakest Link in Diabetic Kidney Disease? *Curr. Diab. Rep.* **2016**, *16*, 45. [[CrossRef](#)]
58. Li, J.; Ling, Y.; Yin, S.; Yang, S.; Kong, M.; Li, Z. Baicalin serves a protective role in diabetic nephropathy through preventing high glucose-induced podocyte apoptosis. *Exp. Ther. Med.* **2020**, *20*, 367–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Sandau, K.B.; Brüne, B. Up-regulation of Bcl-2 by redox signals in glomerular mesangial cells. *Cell Death Differ.* **2000**, *7*, 118–125. [[CrossRef](#)]
60. Amstad, P.A.; Liu, H.; Ichimiya, M.; Berezsky, I.K.; Trump, B.F.; Buhimschi, I.A.; Gutierrez, P.L. BCL-2 is involved in preventing oxidant-induced cell death and in decreasing oxygen radical production. *Redox Rep.* **2001**, *6*, 351–362. [[CrossRef](#)]
61. Denton, D.; Kumar, S. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ.* **2019**, *26*, 605–616. [[CrossRef](#)]
62. Luo, S.; Rubinsztein, D.C. Atg5 and Bcl-2 provide novel insights into the interplay between apoptosis and autophagy. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 1247–1250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Fan, Y.-J.; Zong, W.-X. The cellular decision between apoptosis and autophagy. In *Beyond Apoptosis: Cellular Outcomes of Cancer Therapy*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2012. [[CrossRef](#)]
64. Popgeorgiev, N.; Jabbour, L.; Gillet, G. Subcellular Localization and Dynamics of the Bcl-2 Family of Proteins. *Front. Cell Dev. Biol.* **2018**, *6*, 13. [[CrossRef](#)]
65. Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Levine, B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* **2010**, *140*, 313–326. [[CrossRef](#)]
66. Zhang, X.; Chen, S.; Huang, K.; Le, W. Why should autophagic flux be assessed? *Acta Pharmacol. Sin.* **2013**, *34*, 595–599. [[CrossRef](#)]
67. Nakaso, K.; Yoshimoto, Y.; Nakano, T.; Takeshima, T.; Fukuhara, Y.; Yasui, K.; Araga, S.; Yanagawa, T.; Ishii, T.; Nakashima, K. Transcriptional activation of p62/A170/ZIP during the formation of the aggregates: Possible mechanisms and the role in Lewy body formation in Parkinson's disease. *Brain Res.* **2004**, *1012*, 42–51. [[CrossRef](#)]
68. Kikuchi, H.; Harata, K.; Madhyastha, H.; Kuribayashi, F. Ellagic acid and its fermentative derivative urolithin A show reverse effects on the gp91-phox gene expression, resulting in opposite alterations in all-trans retinoic acid-induced superoxide generating activity of U937 cells. *Biochem. Biophys. Rep.* **2021**, *25*, 100891. [[CrossRef](#)]
69. Cisneros-Zevallos, L.; Bang, W.Y.; Delgadillo-Puga, C. Ellagic Acid and Urolithins A and B Differentially Regulate Fat Accumulation and Inflammation in 3T3-L1 Adipocytes While Not Affecting Adipogenesis and Insulin Sensitivity. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2086. [[CrossRef](#)]
70. Fu, A.; Cohen-Kaplan, V.; Avni, N.; Livneh, I.; Ciechanover, A.; Ben-Neriah, Y.; Schulman, B.A. p62-containing, proteolytically active nuclear condensates, increase the efficiency of the ubiquitin-proteasome system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2107321118. [[CrossRef](#)]
71. Li, X.; Chuang, P.Y.; D'Agati, V.D.; Dai, Y.; Yacoub, R.; Fu, J.; Xu, J.; Taku, O.; Premisrut, P.K.; Holzman, L.B.; et al. Nephric Preserves Podocyte Viability and Glomerular Structure and Function in Adult Kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *26*, 2361–2377. [[CrossRef](#)]

72. Verma, R.; Venkatareddy, M.; Kalinowski, A.; Li, T.; Kukla, J.; Mollin, A.; Cara-Fuentes, G.; Patel, S.R.; Garg, P. Nephlin is necessary for podocyte recovery following injury in an adult mature glomerulus. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0198013. [[CrossRef](#)]
73. Wiggins, R.-C. The spectrum of podocytopathies: A unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int.* **2007**, *71*, 1205–1214. [[CrossRef](#)]
74. Doné, S.C.; Takemoto, M.; He, L.; Sun, Y.; Hultenby, K.; Betsholtz, C.; Tryggvason, K. Nephlin is involved in podocyte maturation but not survival during glomerular development. *Kidney Int.* **2008**, *73*, 697–704. [[CrossRef](#)]
75. Li, Q.; Li, K.; Chen, Z.; Zhou, B. Anti-renal fibrosis and anti-inflammation effect of urolithin B, ellagitannin-gut microbial-derived metabolites in unilateral ureteral obstruction rats. *J. Funct. Foods* **2020**, *65*, 103748. [[CrossRef](#)]
76. Doublier, S.; Salvidio, G.; Lupia, E.; Ruotsalainen, V.; Verzola, D.; Deferrari, G.; Camussi, G. Nephlin Expression Is Reduced in Human Diabetic Nephropathy. *Diabetes* **2003**, *52*, 1023–1030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Li, C.; Siragy, H.M. High Glucose Induces Podocyte Injury via Enhanced (Pro)renin Receptor-Wnt- β -Catenin-Snail Signaling Pathway. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e89233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Lu, X.-Y.; Liu, B.-C.; Cao, Y.-Z.; Song, C.; Su, H.; Chen, G.; Klein, J.D.; Zhang, H.-X.; Wang, L.-H.; Ma, H.-P. High glucose reduces expression of podocin in cultured human podocytes by stimulating TRPC6. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2019**, *317*, F1605–F1611. [[CrossRef](#)]
79. Wang, D. Discrepancy between mRNA and protein abundance: Insight from information retrieval process in computers. *Comput. Biol. Chem.* **2008**, *32*, 462–468. [[CrossRef](#)]
80. Perl, K.; Ushakov, K.; Pozniak, Y.; Yizhar-Barnea, O.; Bhonker, Y.; Shivatzki, S.; Geiger, T.; Avraham, K.B.; Shamir, R. Reduced changes in protein compared to mRNA levels across non-proliferating tissues. *BMC Genom.* **2017**, *18*, 305. [[CrossRef](#)]
81. Schwanhäusser, B.; Busse, D.; Li, N.; Dittmar, G.; Schuchhardt, J.; Wolf, J.; Chen, W.; Selbach, M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **2011**, *473*, 337–342. [[CrossRef](#)]
82. Moritz, C.P.; Mühlhaus, T.; Tenzer, S.; Schulenburg, T.; Friauf, E. Poor transcript-protein correlation in the brain: Negatively correlating gene products reveal neuronal polarity as a potential cause. *J. Neurochem.* **2019**, *149*, 582–604. [[CrossRef](#)]
83. Quack, I.; Woznowski, M.; Potthoff, S.A.; Palmer, R.; Königshausen, E.; Sivritas, S.; Schiffer, M.; Stegbauer, J.; Vonend, O.; Rump, L.C.; et al. PKC α Mediates β -Arrestin2-dependent Nephlin Endocytosis in Hyperglycemia. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 12959–12970. [[CrossRef](#)]
84. Martin, C.E.; Petersen, K.A.; Aoudjit, L.; Tilak, M.; Eremina, V.; Hardy, W.R.; Quaggin, S.E.; Takano, T.; Jones, N. ShcA Adaptor Protein Promotes Nephlin Endocytosis and Is Upregulated in Proteinuric Nephropathies. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2018**, *29*, 92–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Qin, X.-S.; Tsukaguchi, H.; Shono, A.; Yamamoto, A.; Kurihara, H.; Doi, T. Phosphorylation of Nephlin Triggers Its Internalization by Raft-Mediated Endocytosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *20*, 2534–2545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Savi, M.; Bocchi, L.; Mena, P.; Dall’Asta, M.; Crozier, A.; Brighenti, F.; Stilli, D.; Del Rio, D. In vivo administration of urolithin A and B prevents the occurrence of cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc. Diabetol.* **2017**, *16*, 80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]