

Nefropatia cukrzycowa (NC) jest przewlekłym powikłaniem cukrzycy będącym najczęstszą przyczyną niewydolności nerek wymagającej terapii nerkozastępczej – dializ bądź przeszczepu nerki. Ważną rolę w rozwoju NC przypisuje się zaburzeniom strukturalno-funkcyjnym podocytów – komórek, wyścielających zewnętrzną powierzchnię błony podstawnej śródbłonka naczyń włosowatych kłębuszków nerkowych. Podocyty cechują się wysoką aktywnością metaboliczną, umożliwiającą tym dzielącym się komórkom współtworzyć jedną z warstw bariery filtracyjnej, która ze względu na obciążenie funkcjonalne wynikające ze znacznej objętości filtrowanego osocza i ilości filtrowanych białek, stale musi podlegać proteomicznej odnowie. Podocyty charakteryzują się bardzo gęstą siecią cystern mitochondrialnych o różnorodnej wielkości i morfologii, wskazujących na wysokie zapotrzebowanie energetyczne tych komórek. Wiąże się to z koniecznością utrzymania przez podocyty odpowiedniej liczby mitochondriów oraz zapewnienia ich właściwej aktywności i funkcji, co z kolei uzależnione jest od procesów fuzji i podziału mitochondriów, a także ich transportu wewnątrzkomórkowego. Procesy te podlegają ścisłej kontroli przez mechanizmy regulatorowe, wśród których istotną rolę odgrywa szczególnie rodzaj autofagii – mitofagia. Mitofagia jest procesem selektywnej degradacji niefunkcyjnych i uszkodzonych mitochondriów, ponadto, służy do zaprogramowanego usuwania mitochondriów np. w erytrocytach i komórkach soczewki oka w trakcie rozwoju embrionalnego. Prawidłowy przebieg mitofagii warunkuje sprawne usuwanie uszkodzonych mitochondriów, których nagromadzenie prowadzi do stresu komórkowego (np. stresu tlenowego) i śmierci na drodze apoptozy. Z kolei fuzja mitochondriów jest istotna przede wszystkim w warunkach większego zapotrzebowania energetycznego komórek, gdyż promuje fosforylację oksydacyjną, umożliwia wewnątrzcytoplazmatyczną biodystrybucję kwasów tłuszczowych oraz zapewnia efektywną produkcję ATP.

Stwierdzono, że zaburzenia w dynamice mitochondrialnej są związane z procesami starzenia, a także z patogenezą chorób neurodegeneracyjnych oraz cukrzycy typu 2. W komórkach mięśniowych nagromadzenie uszkodzonych mitochondriów prowadzi do zaburzenia szlaków sygnalizacyjnych insuliny oraz zahamowania dokomórkowego transportu glukozy. Z kolei zahamowanie ekspresji jednego z kluczowych markerów biogenezy mitochondriów w komórkach β trzustki u gryzoni powoduje znaczne zmniejszenie ilości mitochondrialnego DNA, spadek wydolności oksydacyjnej i rozwój cukrzycy. W podocytach procesy mitofagii i biogenezy mitochondriów nie zostały dotychczas dokładnie zbadane, choć wydaje się, że mogą one mieć ważne znaczenie szczególnie w rozwoju insulinooporności tych komórek w przebiegu cukrzycy. Stąd, głównym celem projektu jest zbadanie potencjalnych zmian bioenergetyki podocytów w cukrzycy, a także określenie roli dynamiki mitochondrialnej i mitofagii w patogenezie NC.

Doświadczenia, zaplanowane w projekcie, pozwolą uzyskać odpowiedzi na następujące pytania badawcze: 1) Jak środowisko o zwiększonym stężeniu glukozy i insuliny wpływa na profil bioenergetyczny podocytów? 2) Jaka jest rola mitofagii i biogenezy mitochondrialnej dla prawidłowej funkcji podocytów oraz ich przeżywalności? oraz 3) Czy zaburzenia dynamiki mitochondrialnej i mitofagii w podocytach mogą prowadzić do rozwoju insulinooporności komórek oraz dysfunkcji bariery filtracyjnej nerek? Badania będą prowadzone zarówno na linii immortalizowanych podocytów ludzkich, jak i pierwotnych podocytach szczurzych. Dodatkowo, część badań zostanie przeprowadzona na modelach zwierzęcych cukrzycy: szczurach z chemicznie indukowaną cukrzycą (poprzez podanie dootrzewnowe streptozotocyny) oraz na modelu hiperinsulinemii i oporności insulinowej uwarunkowanej genetycznie (szczury stada Zucker). Ocena profilu bioenergetycznego będzie oparta o analizy tempa zużycia tlenu oraz zmian wewnątrzkomórkowego pH w podocytach po inkubacjach w obecności wysokiego stężenia glukozy i insuliny, które jest charakterystyczne w początkowych stadiach rozwoju NC. W badanych układach zostaną przeprowadzone wieloparametrowe analizy mitochondriów: ich ilość, wielkość i kształt (z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej), zawartość mitochondrialnego DNA, ich rozmieszczenie wewnątrzkomórkowe i kolokalizacja z markerami autofagii oraz z wakuolami autofagalnymi. Zbadane będzie również znaczenie mitofagii i biogenezy mitochondriów w rozwoju insulinooporności podocytów oraz dla ich prawidłowych funkcji, co będzie oceniane w układach po zahamowaniu ekspresji wybranych genów odpowiedzialnych za podziały/fuzję mitochondriów, bądź uczestniczących w procesach mitofagii (np. Drp1, Mfn1/2, parkina, PINK1). W celu zbadania funkcji podocytów analizowana będzie ich przepuszczalność dla albuminy *in vitro*, a w kolejnych etapach badań – mierzona albuminuria u zwierząt cukrzycowych wraz z oceną poziomu markerów mitofagalnych w nerkach.

Biorąc pod uwagę fakt, iż środowisko pozakomórkowe, charakterystyczne dla cukrzycy, wpływa na funkcje podocytów, a także moduluje mitofagię i dynamikę mitochondrialną w innych komórkach, próby określenia roli tych procesów w bioenergetyce podocytów w środowisku o wysokim stężeniu glukozy i insuliny wydają się być uzasadnione i istotne w celu uzyskania nowej wiedzy na temat patogenezы NC. Wydaje się prawdopodobne, iż głębsze poznanie kluczowych mechanizmów przyczyniających się do regulacji bioenergetyki w podocytach w cukrzycy umożliwi nie tylko lepsze leczenie NC, ale także wskaże potencjalne ścieżki molekularne, których farmakologiczna bądź genetyczna modulacja będzie w stanie zapobiegać rozwojowi tego powikłania u chorych na cukrzycę.