

Nefropatia cukrzycowa (NC) jest jednym z najczęstszych powikłań cukrzycy, charakteryzującym się postępującą dysfunkcją bariery filtracyjnej kłębuszków nerkowych (*glomerular filtration barrier*; GFB) oraz utratą funkcji nerek. Komórki podocytarne stanowią kluczową warstwę GFB, a ich uszkodzenie leży u podstaw patogenezy NC. Mitochondria odgrywają główną rolę w utrzymaniu prawidłowej wewnątrzkomórkowej homeostazy energetycznej, lipidowej i węglowodanowej, ponadto dynamika mitochondriów jest ściśle związana z wrażliwością na insulinę w podocytach. Uszkodzone mitochondria wywierają negatywny wpływ na komórki, między innymi poprzez indukowanie stresu oksydacyjnego, odpowiedzi zapalnej, czy aktywację apoptozy. Modyfikacja funkcji mitochondriów może wpływać na produkcję i uwalnianie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (*extracellular vesicles*; EVs), takich jak egzosomy. Coraz więcej dowodów wskazuje, że w warunkach patologicznych podocyty uwalniają EVs, które następnie stymulują odpowiedź immunologiczną i potęgują reakcje prozapalne. Jednak rola mitochondriów w efektach związanych z działaniem egzosomów na podocyty w NC nie została jak dotąd wyjaśniona.

Przypuszczamy, że zaburzenia homeostazy mitochondriów w środowisku hiperglikemii wpływa na biogenezę egzosomów i ich wydzielanie w podocytach, co nasila szkodliwe zmiany w bioenergetyce, funkcji i żywotności tych komórek. Dlatego głównym celem projektu jest wyjaśnienie roli i mechanizmów molekularnych regulacji szlaków mitochondrialno-egzosomalnych w podocytach w stanie fizjologicznym i patologicznym. W ramach projektu zbadamy potencjał inhibitorów biogenezy egzosomalnej oraz metforminy, popularnego leku przeciwcukrzycowego, do poprawy wydolności mitochondriów w podocytach i utrzymania funkcji nerek w zwierzęcym modelu cukrzycy. Ponadto, wyniki projektu mogą wskazać nowy mechanizm uszkodzenia podocytów, polegający na regulacji mitofagii i wydzielania egzosomów przez wysokie stężenie glukozy, co może mieć istotne znaczenie kliniczne w profilaktyce i leczeniu NC.

Nasze wcześniejsze badania wykazały, że po 5 dniach hodowli w warunkach o wysokim stężeniu glukozy (30 mM; HG) w podocytach rozwija się insulinooporność. Wykazaliśmy również, że w podocytach hodowanych w HG uszkodzona jest funkcja mitochondriów, co może wynikać z zaburzenia dynamiki mitochondrialnej i mitofagii. Biologia mitochondriów jest ściśle związana z powstawaniem egzosomów, jednak w podocytach mechanizmy regulacyjne biogenezy egzosomów, selekcji ich zawartości oraz wydzielania z komórek są wciąż mało poznane. Nasze wstępne wyniki pokazały, że w warunkach o wysokim stężeniu glukozy podocyty wydzielają większą liczbę egzosomów i o większej średnicy, niż w warunkach kontrolnych. Dodatkowo, główny marker mitofagalny, PINK1, jak również stres metaboliczny (np. HG) zmieniają poziom ekspresji białek zaangażowanych w biogenezę i sekrecję egzosomów. Dlatego istotne wydaje się dalsze badanie mechanizmów mitochondrialno-egzosomalnych w podocytach, zwłaszcza jako potencjalnych przyczyn uszkodzenia podocytów w NC.

W projekcie najpierw określimy rolę egzosomów w biologii, funkcji i bioenergetyce podocytów poprzez zastosowanie farmakologicznych inhibitorów różnych szlaków biogenezy egzosomów (np. Manumycyna A, GW4869) oraz poprzez genetyczne modyfikacje podocytów (wyciszenie ekspresji markera egzosomalnego CD63). W układach tych będziemy oceniać poziom różnych markerów egzosomalnych w lizatach komórkowych i izolowanych egzosomach, żywotność podocytów, ich morfologię, przepuszczalność dla albuminy, wrażliwość na insulinę, a także określimy ilość i rozmiar izolowanych egzosomów (*nanoparticle tracking analysis*; NTA). Zbadamy również wpływ zahamowania powstawania egzosomów na różne parametry mitochondrialne, np. wydolność oddechową, dynamikę mitochondriów, poziom mitochondrialnego DNA (mtDNA). W kolejnych krokach określimy wpływ stresu metabolicznego (np. HG) na biogenezę egzosomów w podocytach i sprawdzimy, czy zahamowanie biogenezy egzosomów może złagodzić odpowiedź immunologiczną w podocytach hodowanych w HG. Jednym z celów projektu jest scharakteryzowanie roli mitochondriów w tworzeniu i wydzielaniu egzosomów w podocytach, zwłaszcza w podocytach hodowanych w HG. W tym celu zbadamy obecność mtDNA oraz poziom metabolitów mitochondrialnych w wydzielanych EVs. Ponadto, za pomocą barwników fluorescencyjnych i super-rozdzielczej mikroskopii fluorescencyjnej (STED) sprawdzimy, czy w odpowiedzi na stres metaboliczny podocyty wydzielają funkcjonalne mitochondria w EVs. Dodatkowo w ramach projektu zbadamy nowy mechanizm regulacyjny biogenezy egzosomów w podocytach, związany z działaniem metforminy na mitochondria.

Biorąc pod uwagę, że podocyty są wrażliwe na działanie egzosomów wydzielanych przez inne komórki, zbadamy efekty egzosomów uwalnianych przez podocyty pod wpływem stresu związanego z HG na funkcje komórek i parametry mitochondrialne. Na koniec, sprawdzimy wpływ inhibitorów biogenezy egzosomalnej i metforminy na funkcję nerek *in vivo* przy użyciu szczurzego modelu NC. Badania te określą, czy te związki mogą zapobiegać lub łagodzić chorobę nerek w cukrzycy.

Wyniki badań zaplanowanych w ramach projektu dostarczą nowej wiedzy na temat roli egzosomów w biologii podocytów i określą znaczenie szlaków egzosomalnych w rozwoju NC. Biorąc pod uwagę, że zarówno mitochondria, jak i egzosomy odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu podocytów w cukrzycy, wydaje się istotne zrozumienie mechanizmów ich wzajemnej regulacji w celu opracowania skuteczniejszych strategii zapobiegania lub leczenia NC.