

Tomasz Kulesza

Student III roku studiów doktoranckich

Promotor: dr hab. inż. Agnieszka Piwkowska, prof. IMDiK

Pracownia Molekularnej i Komórkowej Nefrologii IMDiK PAN

## ŚRODOWISKO HIPERGLIKEMICZNE ZABURZA DZIAŁANIE TRANSPORTERÓW FOSFORANOWYCH I PROMUJE PROCESY KALCYFIKACJI W PODOCYTACH I KLĘBUSZKACH NERKOWYCH

**Wstęp.** Kalcyfikacja tkanek miękkich to jedno z najpoważniejszych powikłań występujących w przebiegu przewlekłej choroby nerek (CKD). Uważa się, że cukrzyca przyczynia się do połowy przypadków CKD na świecie. Nieorganiczny fosforan (Pi) i pirofosforan (PPi) to dwie kluczowe substancje biorące udział w mineralizacji. Pi jest elementem składowym hydroksyapatytu, natomiast PPi to najsilniejszy inhibitor kalcyfikacji. Przewlekła hiperfosfatemia obserwowana u chorych na CKD bezpośrednio przyczynia się do defektu funkcjonowania kłębuszkowej bariery filtracyjnej (GFB). Najbardziej wrażliwym na uszkodzenia elementem GFB są podocyty, których wypustki stopowate zazębiają się ze sobą tworząc szczeliny filtracyjne zapobiegające przedostawaniu się makromolekuł do ultrafiltratu. Celem prowadzonych badań było określenie wpływu wysokich stężeń glukozy na gospodarkę fosforanową w podocytach, z uwzględnieniem transporterów nieorganicznego fosforanu oraz na kłębuszkową kalcyfikację.

**Metodologia.** Unieśmiertelnione ludzkie podocyty hodowano w pożywce ze standardowym stężeniem glukozy (11 mM, SG) i wysokim stężeniem glukozy (30 mM, HG) przez 5 dni. Do oceny ilości białek transportujących Pi dokomórkowo (Pit 1, Pit 2, NaPi 2c) oraz białka odpowiedzialnego za eksport Pi z komórki (XPR1) użyto metody western blot i immunohistochemii (wykorzystano preparaty nerek szczurów rasy Wistar z cukrzycą typu 1 wyindukowaną streptozotocyną). Komórkową lokalizację wyżej wymienionych transporterów zbadano za pomocą biotynylacji białek błony komórkowej oraz immunofluorescencji (mikroskop konfokalny). Metodą luminescencyjną oceniono stężenie wewnątrzkomórkowego i zewnątrzkomórkowego ATP. Komercyjnie dostępnym zestawem zbadano zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe stężenie PPi. Intensywność kalcyfikacji w podocytach oceniono wykorzystując barwienie Alizarin Red.

**Wyniki.** Wysokie stężenie glukozy powoduje spadek w ilości transporterów Pit 1 i Pit 2 w ludzkich podocytach. Zaobserwowano także zmniejszenie się ilości białka Pit 1, Pit 2 oraz NaPi 2c w kłębuszkach nerkowych szczurów z wyindukowaną cukrzycą. W warunkach HG spada błonowa lokalizacja transporterów Pit 1, Pit 2 oraz NaPi 2c, wzrasta natomiast błonowa ilość transportera XPR1. Ustalono również spadek w zewnątrzkomórkowym i wewnątrzkomórkowym stężeniu ATP oraz w zewnątrzkomórkowym stężeniu PPi w podocytach hodowanych w wysokim stężeniu glukozy. Środowisko hiperglikemiczne powoduje także wzrost intensywności kalcyfikacji w ludzkich podocytach.

**Podsumowanie.** Otrzymane wyniki wskazują, że ekspozycja komórek podocytarnych na wysokie stężenie glukozy prowadzi do zaburzenia homeostazy fosforanowej w tych komórkach. Zmienia się rozmieszczenie transporterów fosforanowych, spada również zewnątrzkomórkowe stężenie PPi i dochodzi do promocji procesu kalcyfikacji. Otrzymane zależności mają swoje odzwierciedlenie w badaniach *in vivo* przeprowadzonych na szczurzym modelu z wyindukowaną cukrzycą typu 1.