

Joanna Karczewska

**Charakterystyka transportu glukozy
w podocytach szczurzych:
rola receptorów purynowych
i AMP-kinazy białkowej**

Autoreferat

Promotor: dr hab. n. med. Maciej Jankowski, prof. IMDiK PAN

Zespół Kliniczno-Badawczy Molekularnej i Komórkowej Nefrologii
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk

Gdańsk 2011

Nerki są kluczowym narządem utrzymującym homeostazę ustroju a ich wydolność ulega obniżeniu w przebiegu szeregu chorób ogólnoustrojowych np. cukrzycy. Jednym z pierwszych stwierdzanych zaburzeń funkcji nerek w cukrzycy jest zwiększona przepuszczalność filtru kłębuszkowego czego wyrazem jest zwiększenie ilości albuminy w moczu. W patogenezie tego zjawiska istotną rolę ogrywają zaburzenie morfologiczno-funkcjonalne podocytów tzw. podocytopatia cukrzycowa.

Podocyty są wysoko zróżnicowanymi komórkami nabłonkowymi kłębuszka nerkowego, które poprzez modyfikację przepuszczalności filtru kłębuszkowego, uczestniczą w regulacji filtracji kłębuszkowej. Ich aktywność może podlegać regulacji przez zewnątrzkomórkowe nukleozydy i nukleotydy, które wywierają swój efekt przez receptory purynergiczne; P1 oraz P2. Obecność receptorów purynergicznych stwierdzono na podocytach.

W cukrzycy dochodzi do zmniejszenia liczby podocytów co prowadzi do zwiększonego obciążenia metabolicznego i hipertrofii pozostałych w kłębuszku nerkowym podocytów, czemu towarzyszą zmiany aktywności kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK), enzymu uważanego za wewnątrzkomórkowy czujnik stanu energetycznego komórki.

Celem pracy było scharakteryzowanie transportu glukozy do podocytów w warunkach prawidłowych i wysokich stężeń glukozy z uwzględnieniem potencjalnej roli receptorów purynergicznych oraz AMPK. Podjęto również próbę odpowiedzi na pytanie czy zaburzenia powyższych mechanizmów mogą ogrywać ewentualną rolę w patogenezie podocytopatii cukrzycowej?

Doświadczenia wykonywano na pierwotnej hodowli szczurzych podocytów w środowisku inkubacyjnym o stężeniu glukozy 5,6 mM i 24,4 mM mannitolu (NG) oraz stężeniu glukozy 30 mM (HG). Transport glukozy był oceniany na podstawie akumulacji w komórkach 2-deoxy-[1-³H]-D-glukozy (2-DG) w obecności agonistów i antagonistów receptorów purynergicznych oraz aktywatora AMPK. Mierzono aktywność ekto-ATPazy i ekto-5'-nukleotydu. Obecność AMPK w nieśmiertelnej linii mysich podocytów badano przy użyciu metody Western blot. Detekcja ufosforylowanej Thr-172 w podjednostce α AMPK posłużyła do badania aktywacji AMPK. Metodą immunofluorescencyjną zbadano występowanie receptorów purynergicznych P2Y₁.

Transport 2-DG w środowisku HG wynosił 1271 ± 86 nmol/h/mg białka i był 2,7-x większy od tempa transportu w środowisku NG (477 ± 37 nmol/h/mg białka, $P < 0,05$). Florydzyina, inhibitor sodu-zależnego transportu glukozy, powodowała w środowisku NG zmniejszenie aktywności transportu 2-DG o 20% (426 ± 39 vs. 544 ± 34 nmol/h/mg białka; $P < 0,05$) natomiast cytochalazyna B, inhibitor dyfuzji ułatwionej glukozy o 80% (92 ± 2 vs. 470 ± 16 nmol/h/mg białka; $P < 0,05$). Zewnątrzkomórkowe stężenie ATP w środowisku NG wynosiło $30,0 \pm 2,4$ nM i było większe od stężenia ATP w środowisku HG ($20,8 \pm 1,4$ nM, $P < 0,05$). Niższemu zewnątrzkomórkowemu stężeniu ATP w środowisku HG towarzyszyło wyższe stężenie adenozyiny w płynie zewnątrzkomórkowym ($0,73 \pm 0,12$ nM vs $0,48 \pm 0,01$ nM; $P < 0,05$). Nie stwierdzono statystycznie znamiennych różnic pomiędzy aktywnością ekto-ATPazy oraz ekto-5'-nukleotyduazy w środowisku NG i HG. Zewnątrzkomórkowy ATP w sposób zależny od stężenia zwiększał tempo transportu 2-DG do podocytów; w środowisku NG: 25 μ M ATP – $18 \pm 0,5\%$; 50 μ M ATP – $25 \pm 0,7\%$; 100 μ M ATP – $30,5 \pm 0,6\%$ oraz w środowisku HG: 50 μ M ATP – $14 \pm 0,5\%$; 100 μ M ATP – $24 \pm 0,5\%$. Zablokowanie receptorów P2 zmniejszało tempo podstawowego transportu 2-DG natomiast analogi ATP (β,γ -metylene ATP, 2-metylotio ATP oraz Bz-ATP) zwiększały tempo transportu 2-DG w środowisku NG i HG. W środowisku NG, siła działania agonistów receptorów purynergicznych przedstawiała się następująco: 2-MeSATP – 21%, Bz-ATP - 24% oraz β,γ -meATP – 39%. W środowisku HG najsilniejszy efekt na tempo transportu 2-DG tj. wzrost o 50% wywierał Bz-ATP natomiast siła działania β,γ -meATP i 2-MeSATP była zbliżona do siebie i wynosiła około 17%. Aktywacja AMPK powodowała zmniejszenie tempa transportu 2-DG a efekt ten był zależny od stężenia glukozy w płynie zewnątrzkomórkowym. Stwierdzono również, że aktywacja receptorów P2 powoduje wzrost aktywności AMPK w podocytach a stosując metodę immunofluorescencyjną wykazano obecność receptorów P2Y₁.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują że transport glukozy do podocytów odbywa się, przede wszystkim, na drodze dyfuzji ułatwionej i jest regulowany przez zewnątrzkomórkowe stężenie glukozy a aktywacja receptorów purynergicznych P2 zwiększa transport glukozy do podocytów. Efekt ten jest nasilony w warunkach zwiększonego stężenia glukozy w płynie zewnątrzkomórkowym.

Wydaje się prawdopodobne, że ewentualne zaburzenia wewnątrzkomórkowego przekazywania informacji pomiędzy receptorami purynergicznymi P2 a kinazą białkową aktywowaną przez AMP mogą prowadzić do zaburzeń transportu i wewnątrzkomórkowej przemiany glukozy prowadząc, między innymi, do rozwoju podocytopatii cukrzycowej.