

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Barbara Lewko

**WPŁYW HIPERGLIKEMII I STRESU MECHANICZNEGO
NA WEWNĄTRZKOMÓRKOWE CZYNNIKI
REGULUJĄCE FUNKCJE KOMÓREK PODOCYTARNYCH
KŁĘBUSZKÓW NERKOWYCH**

Rozprawa habilitacyjna

Akademia Medyczna w Gdańsku
Zakład Immunopatologii

Kierownik: prof. dr hab. med. Jan Stępiński

Gdańsk 2007

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

© Copyright by Medical University of Gdańsk

Wydawca: *Akademia Medyczna w Gdańsku*
Druk: *Dział Wydawnictw AMG*
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,
Zlecenie KW/317/07

*Moim Profesorom i Mistrzom,
Janowi Stepińskiemu
Stefanowi Angielskiemu
serdecznie dziękuję*

SPIS TREŚCI

WYKAZ PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY HABILITACYJNEJ ...	7
WYKAZ UŻYTYCH SKRÓTÓW	8
STRESZCZENIE	9
1. WSTĘP	10
1.1. KŁĘBUSZEK NERKOWY I BARIERA FILTRACYJNA	11
1.2. BUDOWA I FUNKCJE KOMÓREK PODOCYTARNYCH.....	12
1.3. ODDZIAŁYWANIE CZYNNIKÓW NACZYNIORUCHOWYCH NA PODOCYTY	14
1.3.1. Rola cGMP w podocytach	14
1.3.2. Rola angiotensyny II w komórkach podocytarnych.....	15
1.4. METABOLIZM I TRANSPORT GLUKOZY.....	16
1.4.1. Metabolizm glukozy	16
1.4.2. Transport glukozy.....	17
1.4.3. Czynniki modulujące transport glukozy.....	18
1.5. WPŁYW HIPERGLIKEMII NA FUNKCJE PODOCYTÓW.....	20
1.6. REGULACJA FUNKCJI KOMÓREK PODOCYTARNYCH PRZEZ STRES MECHANICZNY	20
1.6.1. Stres mechaniczny w kłębuszku nerkowym	20
1.6.2. Wrażliwość komórek podocytarnych na stres mechaniczny	21
2. CEL PODJĘTYCH BADAŃ	23
3. MATERIAŁ I METODY.....	24
4. DYSKUSJA WYNIKÓW BADAŃ	25
4.1. CHARAKTERYSTYKA SYSTEMU TRANSPORTU GLUKOZY DO PODOCYTÓW.....	25
4.2. WPŁYW HIPERGLIKEMII I STRESU MECHANICZNEGO NA FUNKCJE PODOCYTÓW	26
4.2.1. Modulacja transportu glukozy do podocytów.....	26
4.2.2. Modulacja syntezy cGMP w podocytach.....	27
4.3. ANGIOTENSYNA II JAKO CZYNNIK MODULUJĄCY SYNTEZĘ CGMP W PODOCYTACH.....	29
5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI	31
6. PIŚMIENNICTWO	32

Wykaz publikacji będących przedmiotem rozprawy habilitacyjnej

1. Gołos M, **Lewko B**, Bryl E, Witkowski JM, Dubaniewicz A, Olszewska A, Latawiec E, Angielski S, Stepiński J: Effect of angiotensin II on ANP-dependent guanylyl cyclase activity in cultured mouse and rat podocytes. *Kidney Blood Press Res* 25, 296-302, 2002 (IF 1,025)
2. **Lewko B**, Stepiński J: Cyclic GMP signaling in podocytes. *Microsc Res Tech* 57 (4); 232-235, 2002 (IF 2,307)
3. **Lewko B**, Endlich N, Kriz W, Stepiński J, Endlich K: C-type natriuretic peptide as a podocyte hormone and modulation of its cGMP production by glucose and mechanical stress. *Kidney Int.* 66(3):1001-1008, 2004 (IF 5,302)
4. **Lewko B**, Bryl E, Witkowski JM, Latawiec E, Endlich N, Haehnel B, Kocksch C, Angielski S, Kriz W, Stepiński J: Characterization of glucose uptake by cultured rat podocytes. *Kidney & Blood Press Res* 28 (1):1-7, 2005 (IF 1,067)
5. **Lewko B**, Bryl E, Witkowski JM, Latawiec E, Angielski S, Stepiński J: Mechanical stress and glucose concentration modulate glucose transport in cultured rat podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 20 (2):306-311, 2005 (IF 2,840)
6. **Lewko B**, Gołos M, Latawiec E, Angielski S, Stepiński J: Regulation of cGMP synthesis in cultured podocytes by vasoactive hormones. *J Physiol Pharmacol* 57 (4): 599-610, 2006 (IF 2,212)

Wykaz użytych skrótów

ACE	konwertaza angiotensyny, EC: 3.4.15.1, <i>angiotensin converting enzyme</i>
AMP	adenozyno-5'-monofosforan, <i>adenosine 5'-monophosphate</i>
AMPK	kinaza białkowa aktywowana przez AMP, EC:2.7.11.11, <i>AMP-regulated protein kinase</i>
Ang II	angiotensyna II
ANP	przedsionkowy peptyd natriuretyczny, <i>atrial natriuretic peptide</i>
AT1	receptor typu 1 dla angiotensyny II
AT2	receptor typu 2 dla angiotensyny II
ATP	adenozyno-5'-trifosforan, <i>adenosine 5'-triphosphate</i>
BNP	mózgowy peptyd natriuretyczny, <i>brain natriuretic peptide</i>
cGMP	cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan, <i>cyclic guanosine 3',5'-monophosphate</i>
CNP	peptyd natriuretyczny typu C, <i>C-type natriuretic peptide</i>
ELISA	test immunoenzymatyczny, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GC-A	receptor typu A dla peptydów natriuretycznych, <i>guanylyl cyclase-A</i>
GC-B	receptor typu B dla peptydów natriuretycznych, <i>guanylyl cyclase-B</i>
GFR	wielkość przesączania kłębuszkowego, <i>glomerular filtration rate</i>
GLUT	transporter glukozy przenoszący glukozę na drodze dyfuzji ułatwionej
HIV	wirus zespołu nabytego braku odporności, <i>human immunodeficiency virus</i>
K_m	stała Michaelisa
MAPK	kinaza białkowa aktywowana przez mitogen, EC 2.7.11.24, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
mRNA	informacyjny kwas rybonukleinowy, <i>messenger ribonucleic acid</i>
Na^+, K^+ -ATPaza	pompa sodowo-potasowa, EC 3.6.3.9
NF- κ B	czynnik transkrypcji jądrowej κ B, <i>nuclear factor κB</i>
NO	tlenek azotu, <i>nitric oxide</i>
NOS1	izoforma 1 (neuronalna) syntazy tlenu azotu EC 1.14.13.39, <i>nitric oxide synthase 1</i>
NP	peptydy natriuretyczne, <i>natriuretic peptides</i>
NPR-C	receptor metabolizujący (klirensowy) dla peptydów natriuretycznych, <i>clearance natriuretic peptide receptor</i>
PKA	kinaza białkowa A, EC 2.7.11.11, <i>protein kinase A</i>
PKC	kinaza białkowa C, EC 2.7.11.13, <i>protein kinase C</i>
PKG	kinaza białkowa G, EC 2.7.11.12, <i>protein kinase G</i>
RAAS	układ renina-angiotensyna-aldosteron, <i>renin-angiotensin-aldosterone system</i>
RAS	układ renina-angiotensyna, <i>renin-angiotensin system</i>
RIA	test radioimmunologiczny, <i>radioimmunoassay</i>
ROS	reaktywne formy tlenu, <i>reactive oxygen species</i>
RT-PCR	reakcja odwróconej transkrypcji połączona z reakcją łańcuchową polimerazy, <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
SGLT	transporter glukozy zależny od jonów sodu, <i>sodium-dependent glucose transporter</i>
SNAP	S-nitrozo-N-acetylo-DL-penicylamina
$S_{0,5}$	odpowiednik stałej Michaelisa w równaniu kinetycznym Hilla
TGF β	transformujący czynnik wzrostu β , <i>transforming growth factor β</i>
VEGF	naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu, <i>vascular endothelial growth factor</i>

Streszczenie

Cechami charakteryzującymi nefropatię cukrzycową są hiperglikemia oraz, często jej towarzyszące, nadciśnienie kłębuszkowe. Podocyty, pokrywające zewnętrzną powierzchnię włosniczek w kłębuszku, poddane są w tych warunkach działaniu wysokiego stężenia glukozy oraz stresu mechanicznego, przenoszonego na te komórki ze strony naczyń kapilarnych. Ze względu na swoje bardzo rozbudowane funkcje, wysoki stopień zróżnicowania oraz brak zdolności proliferacyjnych, podocyty są komórkami kluczowymi dla funkcjonowania kłębuszka nerkowego, a ich uszkodzenie jest jedną z głównych przyczyn różnego typu glomerulopatii. Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu hiperglikemii i stresu mechanicznego na niektóre z podstawowych elementów funkcjonowania podocytów, takie jak transport glukozy do wnętrza komórek oraz odpowiedź komórek na działanie czynników naczynioruchowych. Doświadczenia były przeprowadzone *in vitro*, na komórkach podocytarnych bezpośrednio izolowanych z kłębuszków nerkowych szczura, a także na mysich podocytach z nieśmiertelnej linii komórkowej. W badanych komórkach scharakteryzowano systemy transportujące glukozę, a także jeden z systemów generujących cGMP. W podocytach hodowanych w warunkach podwyższonego stężenia glukozy oraz poddawanych działaniu stresu mechanicznego, określono zdolność tych komórek do transportu glukozy i do syntezy cyklicznego GMP. Zbadano też wpływ angiotensyny II, hormonu indukowanego w stanach hiperglikemii i stresu mechanicznego, na produkcję cGMP w podocytach. Uzyskane wyniki wskazują, że podocyty posiadają zróżnicowany system transportu glukozy przez błonę komórkową, a hiperglikemia w połączeniu ze stresem mechanicznym silnie aktywują ten system. Ponadto, oprócz zdolności do syntezy cGMP w odpowiedzi na parakrynnie działające peptydy natriuretyczne i tlenek azotu, komórki te posiadają układ generujący cykliczny GMP w sposób autokrynnny. Obejmuje on wytwarzany przez podocyty peptyd natriuretyczny CNP wraz ze specyficznymi dla niego receptorami. Wielkość syntezy cGMP w podocytach jest modulowana przez hiperglikemię, stres mechaniczny, a także przez angiotensynę II. Obserwowane w warunkach hiperglikemii oraz stresu mechanicznego zmiany funkcjonowania podocytów mogą wyjaśniać niektóre mechanizmy w patogenezie glomerulopatii cukrzycowej.

1. Wstęp

Liczba chorych z przewlekłą niewydolnością nerek wzrasta na świecie co roku średnio o 8%, stając się powszechnym problemem społecznym. W tej grupie schorzeń, nefropatia cukrzycowa jest główną przyczyną prowadzącą do schyłkowej niewydolności nerek [1,2]. Mimo że etiologia większości schorzeń jest znana, to mechanizmy prowadzące do postępującego uszkodzenia nerek nadal pozostają nie w pełni rozpoznane.

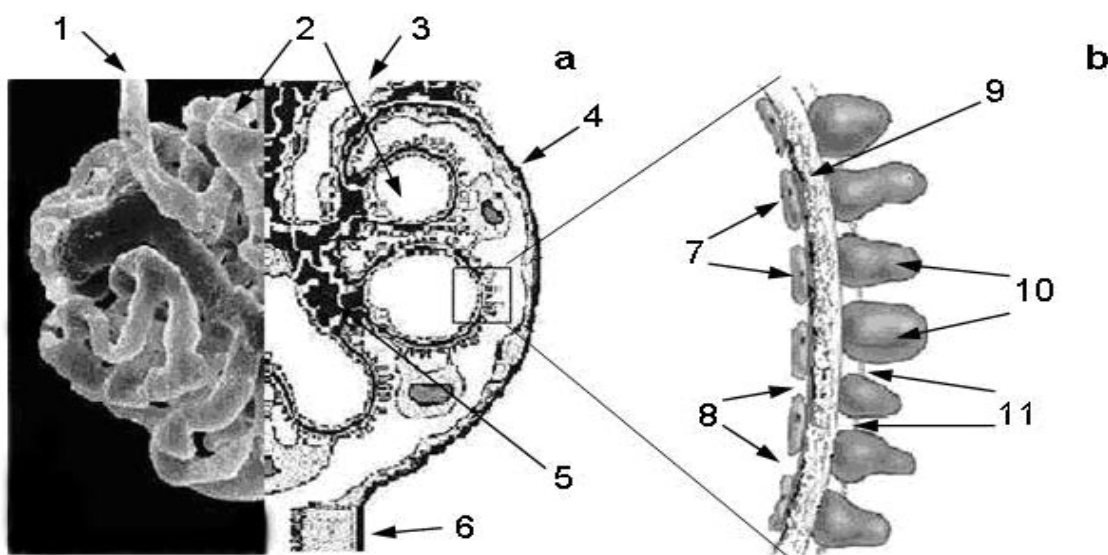
Oprócz chorób o podłożu immunologicznym, najczęstszymi przyczynami wystąpienia nefropatii są cukrzyca i nadciśnienie tętnicze, które często są z sobą ściśle powiązane [3-5]. Hiperglikemia, będąca podstawowym objawem cukrzycy, powoduje zmiany w szlakach metabolicznych i przepuszczalności wewnątrzkomórkowej, wpływając przez to na strukturę, funkcjonowanie i żywotność komórek. Wzrost ciśnienia tętniczego wiąże się natomiast z rozkojarzeniem aktywności wzajemnie równoważących się systemów generujących czynniki obkurczające i rozkurczające. W nerce jest to przede wszystkim układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS), generujący naczynioskurczowy hormon angiotensynę II (Ang II), oraz systemy peptydów natriuretycznych, które, wraz z tlenkiem azotu, działają poprzez rozkurczający cykliczny 3',5'-monofosforan guanozyny (cGMP). Ponadto, zwiększony nacisk krwi na ściany naczyń tętniczych jest źródłem stresu mechanicznego wywieranego na śródbłonek oraz sąsiadujące z nim komórki. Stres mechaniczny jest zaś kolejnym czynnikiem modulującym zarówno strukturę komórek, jak i systemy sygnalizacji wewnątrzkomórkowej.

Badania ostatnich lat wskazują, że większość zmian wywołanych przez czynniki patogene w nerce wiąże się ze zmianami morfologii i funkcji komórek podocytarnych kłębuszków nerkowych [6]. Uszkodzenie podocytów pociąga za sobą uszkodzenia kolejnych elementów kłębuszka oraz zaburzenia jego funkcji filtracyjnej [7,8]. W rezultacie dochodzi do utraty białek z moczem, co prowadzi do zmian składu osocza, zaburzeń metabolicznych większości narządów i, w efekcie, do poważnych powikłań ogólnoustrojowych. Proteinuria jest też czynnikiem przyspieszającym wtórne, często nieodwracalne uszkodzenia struktury nefronów [9]. Nieprawidłowa funkcja nerek przyczynia się z kolei do dalszego wzrostu ciśnienia tętniczego i, w konsekwencji, do pogłębiania się uszkodzeń w obrębie tego narządu [10].

1.1. Kłębuszek nerkowy i bariera filtracyjna

Podstawową jednostką morfologiczną i czynnościową nerki jest nefron składający się z kłębuszka nerkowego oraz cewki bliższej (proksymalnej) i połączonej z nią pętlą Henlego cewki dalszej (dystalnej), uchodzącej do cewki zbiorczej. Kłębuszki regulują skład filtrowanego osocza oraz tempo filtracji, natomiast w cewkach zachodzą procesy decydujące o ostatecznym składzie i objętości wydalanego moczu

Mającą ulec filtracji krew dopływa do kłębuszka tętniczką doprowadzającą, która rozgałęzia się, tworząc pęczek zagiętych w pętlę naczyń włosowatych. Na końcu pętli, w pobliżu tętniczki doprowadzającej, włosniczki ponownie zbiegają się, tworząc tętniczkę odprowadzającą odfiltrowaną krew do naczyń okołocewkowych. Skierowane do wnętrza kłębuszka fragmenty ścian włosniczek stykają się z mezangium. Jest to rodzaj tkanki łącznej, utworzonej z komórek mezangialnych, otoczonych przez macierz. Mezangiocyty, syntetyzując składniki macierzy, zapewniają stabilność struktury kłębuszka, natomiast za pośrednictwem elementów kurczliwych modulują szybkość filtracji kłębuszkowej (*glomerular filtration rate*, GFR) [11, 12]. Pęczek naczyniowy jest zamknięty w zbudowanej z komórek nabłonkowych ściennych kapsule – torebce Bowmana (ryc.1a) i wraz z nią stanowi strukturę kłębuszka nerkowego. Między powierzchnią włosniczek, a ścianą torebki Bowmana znajduje się pusta przestrzeń, do której wypływa filtrat, aby następnie spłynąć do cewki bliższej uchodzącej z torebki po stronie przeciwnej do bieguna naczyniowego.



Ryc.1. (a) Kłębuszek nerkowy. Pęczek naczyniowy widziany w mikroskopie elektronowym (lewy panel) oraz schemat przekroju poprzecznego przez włosniczki (prawy panel); 1-tętniczka doprowadzająca, 2-włosniczka, 3-tętniczka odprowadzająca, 4-torebka Bowmana, 5-mezangium, 6-cewka bliższa; (b) Elementy bariery filtracyjnej. 7-komórki śródbłonna, 8-fenestracje, 9-błona podstawna, 10-wyrostki stopowate podocytów, 11- szczeliny filtracyjne z błoną szczelinową. Rycina na podstawie [7, 13, 14]

Filtracja kłębuszkowa rozpoczyna się we włosniczkach, gdzie dochodząca do 50 mm Hg różnica ciśnienia hydrostatycznego po obu stronach naczynia jest siłą napędową tego procesu. Śródbłonek naczyń włosowatych kłębuszka zawiera „okienka” (fenestracje) o średnicy 50-100 nm, przesłonięte włóknami glikokaliksu, posiadającego reszty siarczanowe [14, 15]. Ujemny ładunek, łącznie z ograniczoną przestrzenią przepływu między włóknami wypełniającymi fenestracje, stanowią pierwszy element bariery filtracyjnej (ryc.1b), zatrzymującej komórki krwi, białka i wielkocząsteczkowe składniki osocza. Na tym etapie regulowana jest też szybkość filtracji, ponieważ średnica „okienek” zależy od stopnia rozdęcia włosniczki, co z kolei jest modulowane przez wewnątrzkapilarne ciśnienie krwi i przeciwstawiające się temu siły elementów kurczliwych w komórkach otaczających naczynie.

Śródbłonek włosniczek, z wyjątkiem fragmentów stykających się z mezangium, otoczony jest przez kłębuszkową błonę podstawną (*glomerular basement membrane*, GBM). Jej struktura przypomina żel, składający się w ok. 90% z wody, a w pozostałej części z usieciowanego heteropolimeru zbudowanego z kolagenu typu IV, lamininy, fibronektyny, entaktyny, perlekanu i siarczanu heparanu [14]. Obfitość grup siarczanowych obecnych w tych białkach sprawia, że GBM, drugi element bariery filtracyjnej, jest zaporą dla filtrowanych anionów. Ze względu na gęstość usieciowania, pełni ona też rolę sita, zatrzymującego duże cząsteczki [16].

Ostatnim elementem bariery filtracyjnej kłębuszka są trzewne komórki nabłonkowe, pokrywające zewnętrzną powierzchnię błony podstawnej, określane jako podocyty.

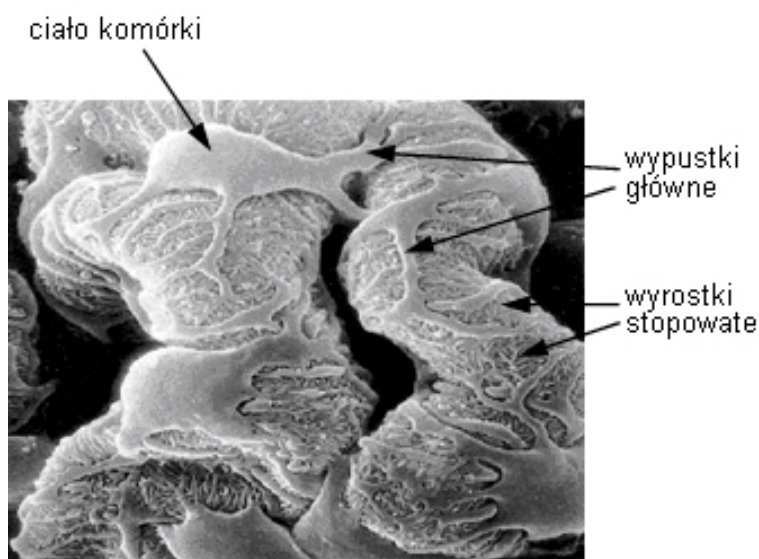
1.2. Budowa i funkcje komórek podocytarnych

Kłębuszkowe trzewne komórki nabłonkowe, czyli podocyty, choć opisane po raz pierwszy w 1929 roku [17], do dziś pozostają najmniej rozpoznanymi komórkami nerki. Hodowane *in vitro*, traciły ekspresję wielu białek, co wiązało się z zanikiem fenotypu, a zarazem unikalnych właściwości tych komórek [18]. Dopiero w połowie lat dziewięćdziesiątych opracowano technikę izolacji i hodowli podocytów szczurzych, zachowujących cechy komórek *in vivo* [19]. Obecnie dostępne są też uniesmiertelnione linie komórek mysich [20] i ludzkich [21].

Dojrzałe podocyty są wysoce zróżnicowane, co jednak wiąże się z zanikiem ich zdolności do proliferacji, jeszcze na etapie nefrogenezy [22]. Z tego względu, w odróżnieniu od pozostałych komórek kłębuszka, utrata podocytów prowadzi do nieodwracalnych uszkodzeń nefronu i postępującej niewydolności całej nerki [7, 23, 24]. Z drugiej strony, w nefropatiach związanych z HIV oraz w różnego typu kłębuszkowych zapaleniach nerek, obserwowana jest patologiczna proliferacja, w wyniku której powstają podocyty nie zróżnicowane i nie spełniające

swoich funkcji [25-28]. W trakcie rozwoju choroby nerek, podocyty są prawdopodobnie pierwszymi komórkami kłębuszka, które ulegają uszkodzeniu [7, 29, 30]. Konsekwencją tego jest zaburzenie struktury i funkcji bariery filtracyjnej, postępująca degradacja całego kłębuszka nerkowego i pozostałych części nefronu [28, 31, 32].

W podocytach można wyróżnić trzy morfologicznie różniące się segmenty: duże ciało komórki, przechodzące w wypustki główne, które z kolei rozgałęziając się, tworzą wyrostki stopowate. Ciało komórki i wypustki główne unoszą się swobodnie w przestrzeni Bowmana, natomiast mocno zakotwiczone w GBM wyrostki stopowate szczelnie oplatają zewnętrzną stronę włóscinek (ryc. 2). Wypustki sąsiadujących komórek zazębiają się, a między nimi znajdują się szczeliny filtracyjne o szerokości około 40 nm [33, 34], przez które przepływa przesącz z błony podstawnej. Szczeliny te przesłonięte są błoną, pełniącą rolę ostatniego elementu bariery filtracyjnej (ryc. 1b). Prawidłowa struktura elementów komórki, a szczególnie błony szczelinowej podocytów, jest podstawowym warunkiem zachowania funkcji filtracyjnej całego kłębuszka nerkowego [35, 36]. Zaburzenia ekspresji białek podocytarnych są przyczyną zarówno wrodzonych, jak i nabytych niewydolności nerek [37, 38].



Ryc.2. Komórki podocytarne oplatające włóscinki kłębuszka nerkowego. Zdjęcie wykonane przy użyciu mikroskopu elektronowego [Źródło: <http://medd.klinikum.uni-muenster.de/mitarbeiter/Pavenstaedt/>]

Podocyty, posiadając silnie rozwinięty aparat kurczliwy, mogą regulować powierzchnię filtracji i opór hydrauliczny bariery filtracyjnej [39]. Przeciwdziałając się, przez obkurczenie wypustek, ciśnieniu rozdymającemu włóscinki, stabilizują one strukturę kłębuszka nerkowego [22, 40]. W dojrzałym kłębuszku jedynie podocyty uczestniczą w obrocie metabolicznym błony podstawnej, syntetyzując jej składniki, a także produkując degradujące ją proteinazy

[22, 41]. Ponadto, wytwarzają one białka modulujące właściwości śródbłonna naczyń włosowatych [42, 43], są więc komórkami regulującymi zarówno ekspresję, jak i funkcje wszystkich elementów bariery filtracyjnej.

1.3. Oddziaływanie czynników naczynioruchowych na podocyty

Wyposażone w kurczliwe filamenty podocyty posiadają bardzo rozbudowany system receptorów, w tym receptory hormonów naczynioruchowych, działających zarówno przez wapń, jak i przez cykliczne nukleotydy [44]. W odpowiedzi na te czynniki, komórki podocytarne prawdopodobnie modulują średnicę znajdujących się pod nimi włosniczek, regulując w ten sposób wielkość współczynnika filtracji kłębuszkowej. Ponadto, hormony te mogą modulować ekspresję białek [45, 46], wpływając tym samym na różne funkcje tych komórek. Oprócz czynników o charakterze parakrynnym, w regulacji funkcji podocytów mogą też uczestniczyć ich własne, autokrynnie działające systemy generujące hormony naczynioruchowe [47, 48]. Do chwili obecnej, dane mówiące o bezpośredniej roli, jaką odgrywają te czynniki w funkcjonowaniu komórek podocytarnych, są jednak stosunkowo nieliczne.

1.3.1. Rola cGMP w podocytach

Działające za pośrednictwem cyklicznego guanozyno-3',5'-monofosforanu (cGMP) peptydy natriuretyczne (NP) i tlenek azotu (NO), należą do głównych czynników rozkurczających, regulujących filtrację kłębkową i hemodynamikę nerki [49, 50]. Cykliczny GMP indukuje też procesy wewnątrzkomórkowe modulujące transkrypcję i translację białek oraz proliferację komórek [46]. Podocyty mogą generować cGMP przez receptory związane z dwoma odrębnymi systemami cyklaz guanylanowych, wrażliwymi zarówno na działanie NP, jak i NO.

Zależny od tlenu azotu system generujący cGMP w podocytach obejmuje nie tylko rozpuszczalną cyklazę guanylanową [51, 52], ale też enzym katalizujący powstanie NO z L-argininy – syntazę NOS1 [52]. W wyrostkach stopowatych zlokalizowano też sprzężone z błonową cyklazą guanylanową receptory GC-A dla przedsionkowego czynnika natriuretycznego (*atrial natriuretic peptide*, ANP) [53], które w odpowiedzi na stymulację tym hormonem syntetyzowały cykliczny GMP [54]. Dalsze badania wykazały, że ludzkie podocyty posiadają także funkcjonujące receptory GC-B dla czynnika natriuretycznego CNP oraz metabolizujące (klirensowe) receptory NPR-C [55].

Większość cGMP wyprodukowanego przez podocyty opuszcza komórki przez błonę apikalną, skierowaną w stronę przestrzeni Bowmana [56, 57], co sugeruje, że przekaźnik ten działa parakrynnie, prawdopodobnie na komórki cewki bliższej. Wydaje się jednak, że generowany przez NO i ANP cykliczny GMP działa w dużej mierze w obrębie samych komórek podocytarnych, powodując reorganizację cytoszkieletu aktynowego [58], co może się wiązać z rozkurczającym działaniem tych czynników. Tlenek azotu zwiększa też stopień ufosforylowania tyrozyny w białkach podocytów, czemu towarzyszy wzrost przepuszczalności kłębuszków dla albuminy [59]. Przypuszczalnie, generowany przez NO cykliczny GMP indukuje fosforylację białek adhezyjnych podocytów i/lub białek błony szczelinowej, przez co zmieniają się właściwości bariery filtracyjnej. Wydaje się też wysoce prawdopodobne, że zasadniczą rolą cGMP indukowanego przez czynniki rozkurczające może być modulowanie działania hormonów obkurczających, a zwłaszcza angiotensyny II.

1.3.2. Rola angiotensyny II w komórkach podocytarnych

Hemodynamika kłębuszka nerkowego zależy od równowagi pomiędzy działaniem czynników rozkurczających i obkurczających. Angiotensyna II, jako hormon o działaniu obkurczającym, działający przeciwstawnie do systemów generujących cGMP, pełni zasadniczą rolę w regulacji przesączania kłębkowego. Ponadto, peptyd ten wykazuje cechy czynnika wzrostu i cytokiny, regulując ekspresję białek i aktywność innych hormonów oraz stymulując proliferację komórek [60]. Wzrost aktywności układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS), skutkujący zwiększoną syntezą angiotensyny II, odgrywa główną rolę w patogenezie nadciśnienia oraz nefropatii cukrzycowej.

Zarówno nie zróżnicowane, jak i zróżnicowane komórki podocytarne posiadają aktywne biologicznie receptory angiotensyny AT1 i AT2 [61, 62], poprzez które hormon ten reguluje funkcje podocytów. W odpowiedzi na Ang II, w cytozolu podocytów wzrasta stężenie wapnia, a jednocześnie dochodzi do depolaryzacji błony komórkowej [63, 64]. W obecności Ang II, podocyty zwiększają produkcję fosforanów inozytolu oraz syntezę DNA [62]. Angiotensyna II zmienia też strukturę błony szczelinowej, co wiąże się ze zwiększeniem przepuszczalności dla albuminy *in vitro* oraz z występowaniem białkomoczu *in vivo* [65-67]. Peptyd ten stymuluje w podocytach produkcję naczyniowego śródbłonkowego czynnika wzrostu (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), a indukując ekspresję receptora transformującego czynnika wzrostu beta (*transforming growth factor*, TGF β), zwiększa syntezę kolagenu IV α 3 przez te komórki [68]. Może to prowadzić do zmiany struktury i zgrubienia błony podstawnej, a także do wzrostu przepuszczalności dla białek śródbłonka naczyń.

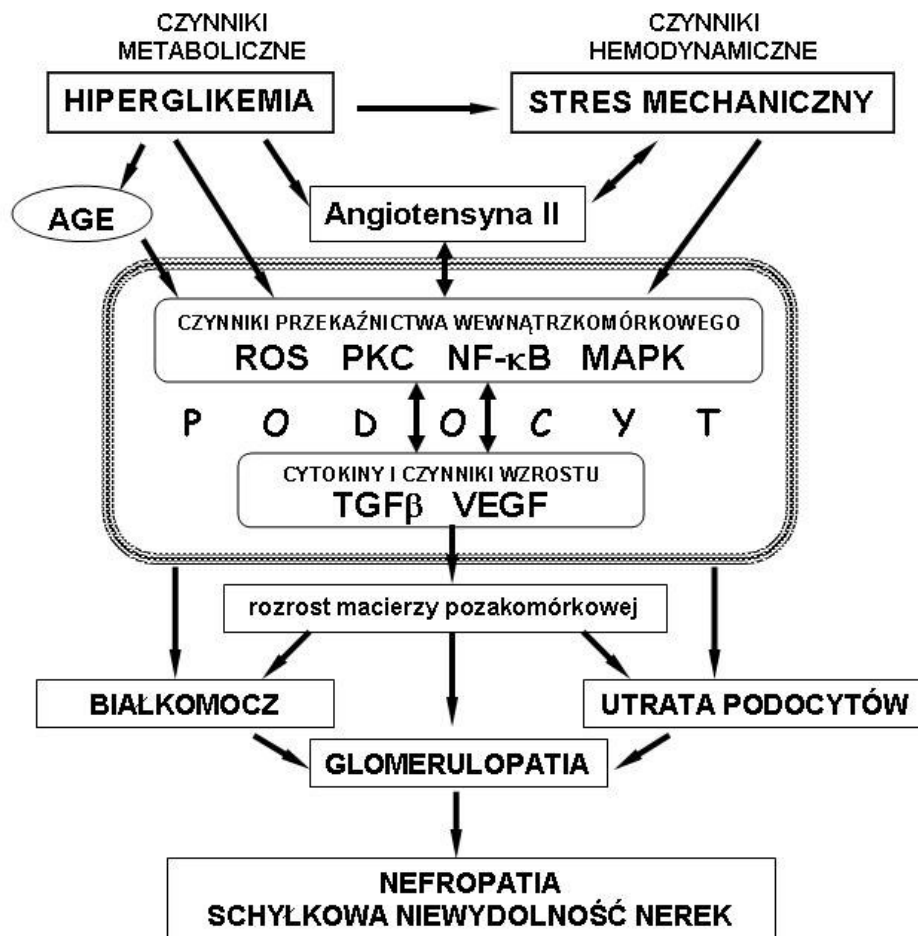
Oprócz hormonu pochodzenia systemowego, na podocyty działa również angiotensyna II produkowana przez lokalny układ renina-angiotensyna (RAS) [48, 69]. Pod wpływem stresu mechanicznego, związany z Ang II układ ulega aktywacji, prowadząc do zwiększenia ekspresji receptorów AT1 oraz syntezy angiotensyny II [70]. Przypuszcza się, że to właśnie autokrynnie działająca na podocyty Ang II, hamując ekspresję nefryny, zasadniczego składnika błony szczelinowej, jest główną przyczyną występowania proteinurii w cukrzycy [3].

1.4. Metabolizm i transport glukozy

1.4.1. Metabolizm glukozy

Glukoza, będąc głównym źródłem energii w komórkach eukariotycznych, pełni centralną rolę w ich metabolizmie. Z wyjątkiem erytrocytów, w komórkach ssaków podstawowym szlakiem przemiany glukozy jest beztlenowa glikoliza, po której następuje fosforylacja oksydacyjna związana z syntezą adenosynotryfosforanu (ATP). Pozostałe drogi utylizacji glukozy obejmują polimeryzację w celu utworzenia zapasu glikogenu oraz przemianę do cukrów i związków pochodnych, będących substratami w innych szlakach biosyntezy i metabolizmu komórkowego [71]. Niewielka pula glukozy (3 do 5%), jest wykorzystana w obocznym szlaku heksozaminowym do syntezy glikoprotein [72], oraz w szlaku polioliowym, gdzie fruktoza powstaje z wytworzonego uprzednio sorbitolu [73]. W warunkach hiperglikemii wzrasta aktywność szlaków obocznych metabolizmu glukozy, zwiększa się produkcja diacyloglicerolu i wolnych rodników tlenowych (*reactive oxygen species*, ROS) oraz nasila się proces nieenzymatycznej glikacji białek. Wszystkie te czynniki, modulując sygnalizację wewnątrzkomórkową oraz strukturę i funkcje komórek, są elementami patogenezy zmian występujących w cukrzycy [74]. Niektóre z aktywowanych w hiperglikemii elementów przekazywania wewnątrzkomórkowego, takie jak ROS, kinaza białkowa C (*protein kinase C*, PKC), cytokiny i czynniki transkrypcyjne, stymulowane są również przez angiotensynę II i stres mechaniczny (ryc. 3). Przyczynia się to prawdopodobnie do wzajemnego wzmocnienia skutków działania tych czynników, przy czym w kłębuszku nerkowym zmiany najwcześniej występują w podocytach. Nakładanie się efektów wywieranych przez hiperglikemii i stres mechaniczny prowadzi do przyspieszenia rozwoju nefropatii [31, 75-78]. Obserwacje te wykorzystuje się przy projektowaniu nowych substancji farmakologicznie czynnych, których zadaniem jest hamowanie aktywności elementów wspólnie indukowanych przez czynniki metaboliczne i hemodynamiczne [79]. Skuteczność takiej strategii potwierdzają wyniki badań w eksperymentalnej cukrzycy, gdzie inhibitory konwertazy angiotensyny (*angiotensin converting enzyme*, ACE)

hamowały aktywność PKC zależną nie tylko od AngII, ale i od hiperglikemii. W efekcie obserwowano zmniejszenie białkomoczu, a także nacieku makrofagów do mięszu nerek [80, 81].



Ryc.3. Schemat ilustrujący współdziałanie głównych czynników metabolicznych i hemodynamicznych uszkadzających podocyty i prowadzących do rozwoju nefropatii cukrzycowej

1.4.2. Transport glukozy

Hydrofobowa błona komórkowa jest nieprzepuszczalna dla cząsteczek hydrofilowych, transport glukozy do wnętrza odbywa się więc przy udziale przezbłonowych białek. Ze względu na strukturę i mechanizm działania, transportery heksoz dzielą się na dwie grupy: pośredniczące w transporcie wymuszonym ko-transportery zależne od sodu (*sodium-dependent glucose transporters*, SGLT) oraz białka ułatwiające dyfuzję zgodnie z gradientem stężeń (GLUT) [82]. Wykazują one specyficzność tkankową, a także różnią się powinowactwem do substratu, odpowiednio do zapotrzebowania metabolicznego tkanki (tabela 1).

Rodzina sodozależnych transporterów SGLT obejmuje białka, dla których siłą napędzającą wspólny transport glukozy i sodu jest wytwarzany przez Na^+ , K^+ -ATPazę gradient stężeń jonów Na^+ po obu stronach błony komórkowej [83]. Aktywność białek SGLT jest regulowana m.in. przez stężenie glukozy [84] i przez hormony działające za pośrednictwem kinaz białkowych PKA i PKC [85].

Białka z rodziny GLUT umożliwiają dyfuzję glukozy zgodnie z gradientem stężeń po obu stronach błony komórkowej, może to więc być kierunek do wnętrza (np. komórki β wysp trzustki), jak i na zewnątrz komórki (np. nabłonek cewki proksymalnej w nerce). Obecnie znanych jest czternaście form transportera GLUT, spośród których co najmniej siedem ma powinowactwo do D-glukozy [82]. Wśród nich najważniejszą rolę odgrywają białka od GLUT1 do GLUT4.

Tabela 1. Charakterystyka głównych transporterów glukozy

Transporter	Główna lokalizacja tkankowa	K_m [mM]	Źródło literaturowe
SGLT1	nerka, jelito, serce	0,4	[83]
SGLT2	nerka	2	
GLUT1	mózg, erytrocyty, ekspresja w prawie wszystkich tkankach	3	[86]
GLUT2	trzustka, wątroba, jelito, nerka	17	
GLUT3	mózg	1,4	
GLUT4	mięśnie szkieletowe, serce, adipocyty	5	

1.4.3. Czynniki modulujące transport glukozy

Wielkość transportu glukozy uzależniona jest nie tylko od aktywności enzymów uczestniczących w procesie glikolizy, ale też od ekspresji i aktywności białek transportujących, znajdujących się w błonie komórki. Zarówno synteza transporterów, jak i ich translokacja do błony komórkowej, są regulowane przez czynniki indukujące kaskady przekazywania wewnątrzkomórkowego, a więc przez hormony, stres mechaniczny, a także przez samą glukozę.

Regulacja hormonalna. Najważniejszym hormonem stymulującym transport glukozy jest insulina, która indukuje przemieszczanie się endosomalnych pęcherzyków zawierających GLUT4 z kompartmentów wewnątrzkomórkowych do błony. Ponadto, insulina stymuluje syntezę transportera GLUT4, a także GLUT1 i GLUT3 [87, 88].

Istotny wpływ na regulację transportu glukozy ma angiotensyna II, szczególnie zaś w warunkach wzmożonej aktywności układu RAS, a więc przede wszystkim w nadciśnieniu i w cukrzycy. Modulowanie ekspresji, translokacji i aktywności białek transportujących glukozę odbywa się zarówno bezpośrednio, przez zależne od AngII szlaki przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego, jak też pośrednio, przez regulację elementów przekaźnictwa zależnych od insuliny [89-91].

Hormony działające za pośrednictwem cyklicznych nukleotydów stanowią kolejną grupę czynników istotnie regulujących zaopatrzenie komórek w glukozę. Zarówno cAMP, jak i cGMP, poprzez kinazy białkowe PKA i PKG, modułują aktywność systemów transportujących glukozę, przy czym działanie tych nukleotydów może być antagonistyczne [91], bądź synergistyczne [92].

Regulacja przez stres mechaniczny. Wzrost transportu glukozy do komórek pod wpływem stresu mechanicznego został przebadany głównie w komórkach mięśni szkieletowych i w mięśniu serca. Zaobserwowano, że uznane za insulinozależne transportery GLUT4, pod wpływem wysiłku fizycznego przemieszczają się do błony komórkowej, zwiększając transport glukozy niezależnie od insuliny [93]. W procesie tym, przynajmniej w części, uczestniczy zależna od AMP kinaza AMPK (*AMP-activated protein kinase*), która jest wrażliwa na towarzyszący niedoborowi ATP wzrost stosunku stężeń AMP : ATP [94, 95]. Generowany przez nadciśnienie kłębuszkowe stres mechaniczny zwiększa też ekspresję transportera GLUT1 w komórkach mezangialnych, co jest związane ze wzrostem transportu glukozy do tych komórek [96].

Regulacja przez glukozę. Wewnątrzkomórkowe stężenie glukozy i jej metabolitów jest sygnałem modulującym nie tylko aktywność oraz tempo przemieszczania się transporterów do błony komórkowej i ich internalizacji, ale również transkrypcję i ekspresję białek transportujących [97]. Obniżona podaż glukozy powoduje szybki wzrost translokacji transporterów do błony komórkowej [98]. Jeśli stan hipoglikemii się przedłuża, następuje też synteza *de novo* białek transportujących glukozę [99, 100].

Wysokie stężenie glukozy, wywołując stres oksydacyjny, aktywując PKC oraz czynniki regulujące transkrypcję, hamuje ekspresję i aktywność systemów transportujących heksozy [101, 102]. Z drugiej jednak strony, hiperglikemia, za pośrednictwem PKC, może też stymulować transport glukozy do komórek, co sprzyja powstaniu patologicznych zmian obserwowanych w cukrzycy [103-105].

1.5. Wpływ hiperglikemii na funkcje podocytów

Hiperglikemia jest podstawowym warunkiem wystąpienia nefropatii cukrzycowej. Podocyty są w kłębuszku nerkowym komórkami, które najwcześniej ulegają zmianom wywołanym przez nadmierną podaż glukozy. Modulowana przez hiperglikemię ekspresja białek strukturalnych prowadzi do zaburzenia funkcji, bądź całkowitego zaniku błony szczelinowej, czemu towarzyszą zmiany morfologiczne komórek [32, 106-108]. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że przy wysokim stężeniu glukozy zahamowana jest ekspresja integryny $\alpha 3\beta 1$ oraz agryny, łączących podocyty z błoną podstawną [109, 110]. Jest to prawdopodobnie jedna z przyczyn obserwowanego w cukrzycy odrywania się tych komórek i wydalania ich z moczem [24]. Pod wpływem hiperglikemii zmienia się też zależna od podocytów produkcja białek wchodzących w skład błony podstawnej, takich jak siarczan heparanu, kolagen, czy fibronektyna [111-113]. Jednocześnie, zwiększenie przez te komórki produkcji czynników wzrostu transformującego (TGF β) oraz śródbłonkowego naczyniowego (VEGF) powoduje, że w warunkach wysokiego stężenia glukozy podocyty są odpowiedzialne za zmiany przepuszczalności bariery filtracyjnej i nagromadzenie się macierzy pozakomórkowej [113]. Mechanizm odpowiedzialny za wzrost ekspresji tych cytokin w hiperglikemii obejmuje zwiększoną produkcję ROS oraz aktywację kinazy białkowej PKC [114].

1.6. Regulacja funkcji komórek podocytarnych przez stres mechaniczny

1.6.1. Stres mechaniczny w kłębuszku nerkowym

Ściany naczyń włosowatych kłębuszka nerkowego poddawane są działaniu sił rozciągających, generowanych przez ciśnienie krwi przepływającej przez kapilary. Mechanizm autoregulacji pozwala na utrzymanie stałego ciśnienia krwi we włosniczkach kłębuszka, gdy ciśnienie tętnicze krwi obwodowej waha się w granicach od 80 do 170 mmHg (10,7-22,7 kPa). Wyższe ciśnienie skutkuje nadciśnieniem kłębuszkowym, a wówczas zarówno ściany naczyń, jak i wszystkie inne elementy struktury kłębuszka, narażone są na działanie silniejszego, niż fizjologiczny, stresu mechanicznego. Zaburzenia systemu autoregulacji w kłębuszku nerkowym wiążą się głównie ze wzrostem syntezy angiotensyny II przez aktywowany układ RAS oraz z hiperglikemią, powodującą zmiany naczyniowe. Nadciśnienie tętnicze i hiperglikemia, często występujące równocześnie, są podstawowymi elementami patogenezy nefropatii cukrzycowej [115-117].

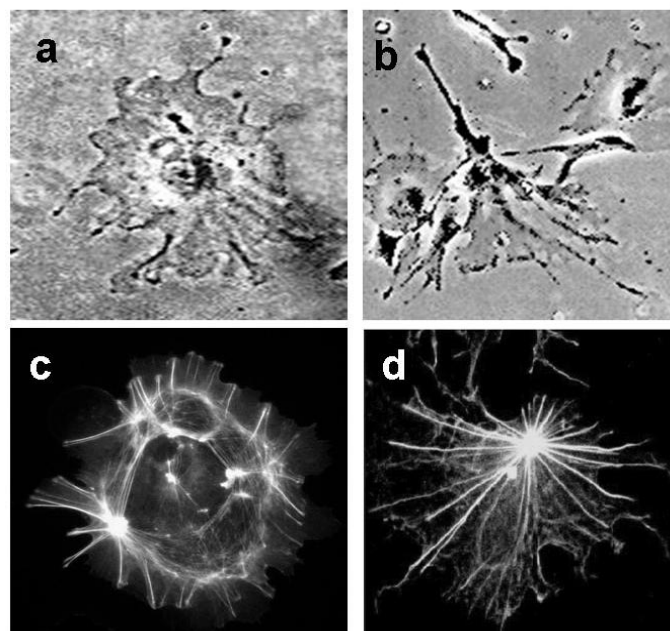
Stres mechaniczny jest bodźcem uruchamiającym kaskady przekazywania wewnątrz- i międzykomórkowego, w wyniku czego w komórkach zachodzą procesy adaptacyjne, jak np. reorganizacja cytoszkieletu, proliferacja, hipertrofia, czy regulacja transkrypcji i translacji

białek. Gdy poziom stresu przekracza wartości fizjologiczne, staje się on czynnikiem uszkadzającym, prowadzącym do dysfunkcji komórek, a nawet apoptozy [118, 119]. W kłębuszku nerkowym, wywołany nadciśnieniem wewnątrzkapilarnym stres mechaniczny powoduje hipertrofię komórek mezangialnych i stymuluje syntezę transformującego czynnika wzrostu TGF β przez te komórki [120]. Prowadzi to do nadmiernego nagromadzenia się macierzy pozakomórkowej, a w dalszej kolejności – do stwardnienia kłębuszków [121], co z kolei jest przyczyną różnego rodzaju nefropatii.

Obserwacje wskazują, że stres mechaniczny i hiperglikemia, niezależnie od siebie, mogą indukować podobne zmiany w komórkach. W istocie, powikłania obserwowane w glomerulopatii cukrzycowej są najczęściej wynikiem nakładania się i wzajemnego wzmocnienia efektów obu tych czynników [77, 78, 122].

1.6.2. Wrażliwość komórek podocytarnych na stres mechaniczny

W odpowiedzi na stres mechaniczny, w podocytach *in vitro* zmienia się ekspresja wielu białek związanych m.in. z przekaźnictwem wewnątrzkomórkowym, translacją i metabolizmem [123]. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że stres mechaniczny wywołuje zmiany morfologiczne tych komórek, czemu towarzyszy reorganizacja cytoszkieletu aktynowego (ryc. 4) [124].



Ryc.4. Wpływ stresu mechanicznego na strukturę mysich komórek podocytarnych. Zdjęcia (a) i (c) przedstawiają komórki kontrolne, nie poddawane stresowi mechanicznemu. (b): 24-godzinny stres mechaniczny powoduje obkurczenie się ciała komórek i wydłużenie wypustek oraz (d): reorganizację włókien spolimerizowanej aktyny. Zdjęcia (a) i (b) przedstawiają żywe komórki widziane w mikroskopie fazowo-kontrastowym, powiększenie 250x. Zdjęcia (c) i (d) przedstawiają preparaty komórkowe, widziane w mikroskopie fluorescencyjnym, powiększenie 400x. Źródło: (a,b,c) B. Lewko; (d) N. Endlich *et al* [124]

Maleje też liczba miejsc adhezji komórek do podłoża [125], co prawdopodobnie ułatwia adaptację cytoszkieletu do działających sił. Podobnie, jak w przypadku hiperglikemii, zostaje zahamowana ekspresja integryny $\alpha3\beta1$, łączącej wyrostki stopowate z błoną podstawną, oraz nefryny, będącej głównym białkiem błony szczelinowej [126]. Zahamowana zostaje też ekspresja białek regulujących cykl komórkowy- cyklin i zależnych od nich kinaz [127], co może wyjaśniać brak proliferacji podocytów *in vivo*. Towarzyszy temu hipertrofia komórek [128], obserwowana *in vivo* w przypadkach, gdy miejsce oderwanego od błony podstawnej podocyta pokrywane jest przez powiększające swoje rozmiary sąsiednie komórki. Wraz z zależną od stresu mechanicznego aktywacją lokalnego systemu RAS, obserwuje się apoptozę komórek podocytarnych, która może być wywołana przez wzmożone działanie angiotensyny II [70]. W efekcie, stres mechaniczny, podobnie jak hiperglikemia, może powodować utratę podocytów z kłębuszka nerkowego.

2. Cel podjętych badań

Hiperglikemia i stres mechaniczny są podstawowymi czynnikami powodującymi uszkodzenia struktury i funkcji podocytów w cukrzycy. Funkcjonowanie podocytów uzależnione jest od podaży glukozy, a jednocześnie w znacznej mierze jest kontrolowane przez hormony naczynioruchowe.

Powyższe przesłanki stały się podstawą do realizacji projektu naukowego, którego celem było:

- a) Scharakteryzowanie systemów odpowiedzialnych za transport glukozy do podocytów.
- b) Określenie wpływu hiperglikemii i stresu mechanicznego na zdolność podocytów do syntezy cGMP oraz na aktywność systemów transportujących glukozę do wnętrza komórek.
- c) Zbadanie wpływu czynników naczynioruchowych na syntezę cGMP w podocytach.

3. Materiał i metody

Wszystkie badania były wykonywane *in vitro*, na podocytach:

- z pierwotnej hodowli komórek izolowanych z kłębuszków nerkowych szczura;
- z linii K5D nieśmiertelnych podocytów mysich (otrzymanych od dr Petera Mundel, Albert Einstein University, N. Y., USA).

Identyfikacji oraz oceny stopnia zanieczyszczenia podocytów izolowanych z kłębuszków nerkowych szczura innego typu komórkami dokonywano przy użyciu metod immunofluorescencyjnych, z wykorzystaniem mikroskopu oraz cytometru przepływowego.

W zależności od typu doświadczeń, komórki były hodowane w podłożu RPMI1640 o standardowym lub modulowanym stężeniu glukozy. Badania z zastosowaniem stresu mechanicznego przeprowadzano na komórkach hodowanych w płytkach BioFlex[®], przy użyciu aparatu StretchCo. Elastyczne błony stanowiące dno studzienek były poruszane za pomocą pompy ssąco-tłoczącej, przy amplitudzie i częstotliwości drgań naśladującej warunki występujące w nadciśnieniu kłębuszkowym.

Wewnątrzkomórkowe stężenie glukozy określano metodą radioizotopową, przy użyciu licznika scyntylicyjnego promieniowania beta. Cykliczny 3',5'-guanozynomonofosforan oznaczano metodą radioimmunologiczną (RIA) [prace 5 i 6] oraz immunoenzymatyczną (ELISA) [praca 3]. Obecność mRNA analizowano metodą odwrotnej transkrypcji, po której następowała reakcja łańcuchowa polimerazy (RT-PCR). Do uwidocznienia ekspresji białek używano metody *Western blotting*, natomiast ilościowej oceny dystrybucji białek w cytozolu i błonach komórkowych dokonywano za pomocą cytometru przepływowego.

4. Dyskusja wyników badań

4.1. Charakterystyka systemu transportu glukozy do podocytów

Podstawowym warunkiem koniecznym do metabolizmu glukozy jest przetransportowanie jej przez błonę komórkową do cytozolu. Pomimo coraz liczniejszych doniesień opisujących wpływ hiperglikemii na funkcje podocytów, sam mechanizm przenoszenia glukozy do wnętrza tych komórek nie został dotychczas scharakteryzowany. Przeprowadzone przeze mnie doświadczenia miały na celu określenie podstawowych parametrów kinetycznych całego systemu transportu glukozy do podocytów oraz stwierdzenie, jakiego typu białka transportujące wchodzi w skład tego systemu [**praca 4**].

Wyniki badań wskazują, że komórki podocytarne posiadają wysoce zróżnicowany układ białek transportujących glukozę. Obejmuje on zarówno transportery z rodziny GLUT o wysokim i niskim powinowactwie, jak i jeden z transporterów sodozależnych- SGLT1. Sugeruje to, że podocyty są w stanie regulować podaż wewnątrzkomórkowej glukozy w zależności od zapotrzebowania metabolicznego. Ekspresja transportera GLUT3, charakteryzującego się bardzo wysokim powinowactwem do D-glukozy ($K_m \approx 1,4$ mM) wraz z transporterem GLUT2 o powinowactwie ponad dziesięciokrotnie niższym ($K_m \approx 17$ mM) wskazuje, jak duży jest zakres możliwości utylizacji glukozy w tych komórkach. Transport glukozy do podocytów jest częściowo uzależniony od insuliny, czego dowodzi zarówno zwiększona wewnątrzkomórkowa akumulacja glukozy w obecności tego hormonu, jak i obecność białka GLUT4. Co więcej, transporter GLUT1, uważany za białko powszechnie zapewniające komórkom podstawową podaż glukozy, w podocytach okazał się również być regulowany przez insulinę, co wykazały późniejsze badania zespołu z Uniwersytetu w Bristolu [129].

Sinusoidalny przebieg krzywej zależności szybkości transportu od stężenia glukozy był potwierdzeniem, że w podocytach glukoza jest transportowana przy udziale białek o zróżnicowanym powinowactwie do substratu. Stosując model kinetyki Hilla, można było obliczyć przybliżoną wartość współczynnika $S_{0,5} \approx 7,8$ mM, która określa powinowactwo glukozy do systemu transportującego, jako całości. Wyznaczona dla tego systemu wartość transportu maksymalnego V_{max} wyniosła 10 nmol/mg białka/min. Dane te sugerują, że w warunkach fizjologicznego stężenia glukozy (5,6 mM), wielkość napływu glukozy do podocytów osiąga w przybliżeniu połowę możliwości transportowych całego układu.

4.2. Wpływ hiperglikemii i stresu mechanicznego na funkcje podocytów

4.2.1. Modulacja transportu glukozy do podocytów

Wielkość transportu glukozy do komórek uwarunkowana jest przede wszystkim ich zapotrzebowaniem metabolicznym, które zależy od tempa utylizacji glukozy, a także od podaży glukozy zewnątrzkomórkowej. Stres mechaniczny, zwiększając zapotrzebowanie komórek na energię, uruchamia mechanizmy przyspieszające transport glukozy do cytozolu, polegające przede wszystkim na syntezie *de novo* białek transportujących i na ich mobilizacji z zasobów wewnątrzkomórkowych do błony [94, 96]. Z kolei, w warunkach hiperglikemii, komórki, zmniejszając syntezę i błonową ekspresję białek transportujących, mogą ograniczać napływ glukozy do swojego wnętrza [98, 130]. Nie jest to jednak mechanizm uniwersalny, ponieważ w komórkach mezangialnych kłębuszka nerkowego, w warunkach hiperglikemii obserwuje się zwiększenie ekspresji białka GLUT1 i towarzyszący mu wzrost pobierania glukozy przez te komórki [105]. Wydaje się prawdopodobne, że wzajemne wzmocnienie efektów wywieranych przez stres mechaniczny i hiperglikemię na transport i metabolizm glukozy w komórkach mezangium może przyspieszać proces sklerotyzacji kłębuszka nerkowego. Podocyty, podobnie jak mezangiocyty, w cukrzycy również są poddane działaniu obu tych czynników, przy czym niewiele wiadomo o skutkach ich wspólnego oddziaływania na te komórki. Stało się to przesłanką **pracy 5**, opisującej wyniki badań transportu glukozy w podocytach w warunkach hiperglikemii i stresu mechanicznego

Doświadczenia przeprowadzone na podocytach hodowanych w warunkach hipo- normo- i hiperglikemii wykazały, że stężenie glukozy *per se* miało niewielki wpływ na wielkość jej transportu do komórek. Stres mechaniczny zwiększył istotnie napływ glukozy do podocytów we wszystkich trzech grupach, przy czym w komórkach hodowanych w warunkach hiperglikemii wzrost ten był dwukrotnie silniejszy, niż w pozostałych grupach. Sugeruje to, że, podobnie jak w komórkach mezangialnych, hiperglikemia w połączeniu ze stresem mechanicznym mogły wywierać spotęgowany wpływ na transport glukozy do podocytów. Próbując wstępnie ocenić mechanizm tego zjawiska, sprawdziłam wpływ stresu mechanicznego oraz wpływ wysokiego stężenia glukozy na ekspresję transporterów GLUT w błonie komórkowej. W badaniach skupiłam się na dwóch formach białek transportujących: GLUT2 – białku o niskim powinowactwie do glukozy i o wysokiej wydajności transportu, oraz GLUT4 – białku o stosunkowo wysokim powinowactwie i niskiej wydajności.

Zarówno w środowisku normo-, jak i hiperglikemicznym, stres mechaniczny spowodował obniżenie błonowej puli transporterów GLUT4. Jest to wynik o tyle zaskakujący, że w mięśni

szkieletowym rozciąganie mechaniczne jest bodźcem stymulującym syntezę i translokację tego białka do błony komórkowej [131]. Jednocześnie jednak, w środowisku o normalnym stężeniu glukozy, stres mechaniczny zwiększył w błonach komórkowych podocytów ekspresję białka GLUT2. Można zatem przypuszczać, że obserwowany wzrost pobierania glukozy przez komórki mógł być w tych warunkach związany z aktywacją transportu zależnego od tego właśnie białka. Jednakże, w środowisku hiperglikemicznym, podobnie jak w przypadku GLUT4, w błonach komórek poddanych stresowi mechanicznemu ekspresja białek GLUT2 uległa obniżeniu. Sugeruje to, że za wzmocniony w tych warunkach napływ glukozy do cytozolu odpowiada jeszcze inne, co najmniej jedno, białko transportujące. Nie można wykluczyć, że podobnie do mezangiocytów, jest to GLUT1, którego ekspresja i aktywność transportowa wzrastają w tych komórkach pod wpływem stresu mechanicznego i hiperglikemii [96, 105]. W procesie tym może też uczestniczyć transporter GLUT8, którego ekspresja zwiększa się w podocytach poddanych działaniu glukozy o wysokim stężeniu [132].

4.2.2. Modulacja syntezy cGMP w podocytach

Podstawowe funkcje nerek są w dużej mierze regulowane przez zależne od peptydów natriuretycznych systemy generujące cGMP, a obserwowane w cukrzycy zmiany ich aktywności mogą przyczyniać się do rozwoju nefropatii cukrzycowej [133].

Zdolność podocytów do produkcji cGMP jest zjawiskiem znanym stosunkowo dawno, jakkolwiek większość tych obserwacji dotyczy odpowiedzi na przedsionkowy czynnik natriuretyczny ANP [53, 56, 57, 134, **praca 2**]. W ludzkich podocytach wykazano również ekspresję receptora dla peptydu natriuretycznego C [55], któremu w nerce przypisuje się rolę hormonu działającego zarówno para-, jak i autokrynnie. Sugerowało to, że aktywność CNP może mieć istotne znaczenie dla funkcji podocyta, dlatego też w **pracy 3** wstępnie scharakteryzowałam system zależny od tego peptydu.

Badania przeprowadzone na linii nieśmiertelnych podocytów mysich wykazały, że w komórki te posiadają biologicznie aktywny system związany z CNP. System ten obejmuje nie tylko receptory GC-B, indukujące syntezę cGMP, ale posiada też zdolność do produkcji samego hormonu. Sugeruje to, że w podocytach CNP może być czynnikiem działającym autokrynnie. Kilkukrotnie większa synteza cGMP w obecności CNP, niż w obecności ANP wskazywałby nawet, że w tych komórkach peptyd typu C odgrywa istotniejszą rolę, niż peptyd przedsionkowy. Nie można jednak wykluczyć, że zależy to od pochodzenia komórek, ponieważ w podocytach szczura działanie obu peptydów wydaje się być podobne (B. Lewko,

wyniki nie opublikowane). W przeciwieństwie do szczurzych, mysie podocyty nie syntetyzowały też cGMP w odpowiedzi na czynniki generujące tlenek azotu.

Stymulowana peptydami natriuretycznymi synteza cyklicznego GMP była modulowana zarówno przez stres mechaniczny, jak i przez hiperglikemię. Stres mechaniczny obniżał o połowę ilość cGMP generowanego w obecności ANP, a także CNP. Wyjaśnienie tego zjawiska może obejmować kilka mechanizmów: (i) zahamowanie ekspresji i/lub aktywności błonowej cyklazy guanylanowej, (ii) wzrost ekspresji receptorów metabolizujących NPR-C, pośredniczących w degradacji peptydów natriuretycznych, (iii) wzrost ekspresji i/lub aktywności obojętnej endopeptydazy (*neutral endopeptidase* NEP, 24.11), rozkładającej peptydy natriuretyczne, (iv) wzrost ekspresji i/lub aktywności fosfodiesteraz, hydrolizujących cGMP. Ponieważ doświadczenia były przeprowadzane w obecności inhibitora fosfodiesteraz, hydrolyza cGMP wydaje się najmniej prawdopodobną przyczyną tego zjawiska. Można natomiast przypuszczać, że ze względu na długi, 72-godzinny okres trwania stresu, nastąpiła zmiana ekspresji genów białek wpływających bezpośrednio lub pośrednio na ilość generowanego cGMP.

W przeciwieństwie do stresu mechanicznego, hiperglikemia dwukrotnie zwiększała zdolność podocytów do produkcji cyklicznego GMP w odpowiedzi na stymulację peptydem CNP. Ponieważ podwyższone stężenie glukozy aktywuje szlaki przekazywania wewnątrzkomórkowego, indukujące zmiany transkrypcji genów, można przypuszczać, że obserwowany wzrost produkcji cGMP związany był ze zmianą ekspresji białek regulujących poziom tego nukleotydu. Hipotezę tę potwierdzają wyniki badań *in vivo* i *in vitro*, które wykazują, że w warunkach hiperglikemii wzrasta ekspresja i aktywność błonowej cyklazy guanylanowej oraz zmniejsza się ekspresja receptorów metabolizujących NPR-C [134-136]. Obserwowany w niektórych doświadczeniach *in vivo* spadek w cukrzycy liczby receptorów sprzężonych z błonową cyklazą guanylanową [138] wydaje się być raczej bezpośrednią konsekwencją wzrostu stężenia ANP w krążeniu [138-140], niż samego stężenia glukozy. Z drugiej zaś strony, lokalne układy generujące cGMP w obrębie poszczególnych tkanek mogą wykazywać aktywność różniącą się od wypadkowej aktywności obserwowanej w całym narządzie.

Sekwencyjne zastosowanie stresu mechanicznego i hiperglikemii pozwoliło ocenić udział tych czynników w modulowaniu odpowiedzi podocytów na peptydy natriuretyczne. Ponieważ w cukrzycy hiperglikemii często towarzyszy nadciśnienie tętniskowe, sprawdziłam też, jak zmienia się zdolność do syntezy cGMP w podocytach poddanych stresowi mechanicznemu w obecności wysokiego stężenia glukozy. Zwiększona w warunkach hiperglikemii produkcja

cyklicznego GMP była hamowana przez stres mechaniczny do poziomu syntezy cGMP w komórkach pozostających w bezruchu, w środowisku normoglikemicznym. Można więc wnioskować, że w przypadku hiperglikemii połączonej ze stresem mechanicznym, ostateczna odpowiedź podocytów na działanie peptydów natriuretycznych jest wypadkową obu tych przeciwstawnie działających czynników. Wyniki te sugerują, że w cukrzycy kierunek zmian funkcji podocytów związanych z podażą cGMP uzależniony jest od stopnia równowagi pomiędzy wpływem hiperglikemii i nadciśnienia kłębuszkowego na syntezę tego cyklicznego nukleotydu.

4.3. Angiotensyna II jako czynnik modulujący syntezę cGMP w podocytach

Zarówno hiperglikemia, jak i stres mechaniczny, mogą zwiększać aktywność układu renina-angiotensyna (RAS), stymulując przez to powstawanie angiotensyny II [70, 141]. Obecność lokalnego układu RAS, ulegającego aktywacji w odpowiedzi na stres mechaniczny, stwierdzono również w komórkach podocytarnych. Wydaje się więc wysoce prawdopodobne, że na obserwowane przeze mnie zmiany zdolności podocytów do produkcji cGMP w warunkach stresu mechanicznego i hiperglikemii mogła mieć istotny wpływ zarówno para-, jak i autokrynnie działająca angiotensyna II. Aby sprawdzić tę hipotezę, zbadalam, czy i w jaki sposób hormon ten moduluje odpowiedź podocytów na czynniki stymulujące powstawanie cGMP [**prace 1 i 6**].

Angiotensyna II, za pośrednictwem kinazy białkowej C, obniżała zdolność podocytów do syntezy cyklicznego GMP [**praca 1**]. Jedną z możliwych przyczyn zmniejszenia produkcji cGMP mogło być hamowanie przez Ang II transportu tego nukleotydu przez błonę komórkową, a w konsekwencji, gromadzenie się go w cytozolu. Na korzyść tej hipotezy przemawiają wyniki doświadczeń wskazujące, że w warunkach, kiedy efekt hamowania syntezy cGMP przez Ang II był najsilniejszy, stosunek stężeń cGMP wewnątrzkomórkowego do zewnątrzkomórkowego był również najwyższy. Podobną tendencję obserwowałam w obecności specyficznego inhibitora transportu cGMP, gdzie proporcjonalnie większemu stężeniu wewnątrzkomórkowego cGMP towarzyszyło zahamowanie produkcji tego nukleotydu.

Interesującym spostrzeżeniem było, że jakkolwiek ANP i SNAP, związek uwalniający tlenek azotu, stymulują syntezę cGMP w podocytach, to, użyte jednocześnie, nie wywołują addytywnego efektu [**praca 6**]. Z drugiej zaś strony, w **pracy 1** wykazałam, że zahamowanie aktywności rozpuszczalnej cyklazy guanylanowej zwiększyło produkcję cGMP w odpowiedzi na ANP. Poprzednie nasze prace wskazują, że w kłębuszkach nerkowych systemy rozpuszczalnej

i błonowej cyklazy guanylanowej kontrolują wzajemnie swoją aktywność tak, aby nie dochodziło do nadmiernej syntezy cyklicznego GMP [142, 143]. Wyniki uzyskane w **pracach 1 i 6** pozwalają przypuszczać, że wzajemna regulacja obu tych systemów może mieć miejsce również w komórkach podocytarnych. Wydaje się również, że angiotensyna II prowadzi do rozkojarzenia wzajemnej kontroli aktywności obu cyklaz guanylanowych. Produkcja cGMP w odpowiedzi na jednoczesną stymulację za pomocą ANP i SNAP w obecności AngII była podwyższona i zbliżona do sumy efektów każdego aktywatora z osobna. Nie można wykluczyć, że jest to mechanizm mający na celu zachowanie równowagi pomiędzy antagonistycznie działającymi systemami zależnymi od angiotensyny II i od cyklicznego GMP.

Badania mechanizmu regulacji przez Ang II odpowiedzi podocytów na czynniki generujące cGMP wykazały, że w procesie tym uczestniczą zarówno receptory AT1, jak i AT2. Za pośrednictwem receptora AT1 angiotensyna II hamuje odpowiedź podocytów zależną od błonowej cyklazy i zwiększa odpowiedź zależną od rozpuszczalnej cyklazy guanylanowej. Działając przez receptor AT2, Ang II wydaje się natomiast nie tylko osłabiać efekty wywierane poprzez AT1, ale też zaburzać wzajemną regulację cyklaz guanylanowych w podocytach [**praca 6**].

W podocytach poddanych stresowi mechanicznemu wzrasta nie tylko synteza Ang II, ale też ekspresja receptorów AT1, natomiast ilość receptorów AT2 pozostaje nie zmieniona [70]. Mając na uwadze wyniki uzyskane w **pracach 1 i 6**, można więc przypuszczać, że obserwowane przeze mnie zmniejszenie syntezy cGMP w warunkach stresu mechanicznego [**praca 3**] spowodowane było nadekspresją receptorów AT1, na które oddziaływała endogennie wytwarzana angiotensyna II. Wpływ hiperglikemii na ekspresję receptorów Ang II nie został jeszcze opisany w odniesieniu do podocytów, natomiast w komórkach mezangialnych wysokie stężenie glukozy indukowało wysoką ekspresję receptorów AT2, przy nieznacznym tylko wzroście ekspresji AT1 [144]. Jeśli w podocytach hiperglikemia wpływałaby podobnie na transkrypcję białka receptorów Ang II, to obserwowany przeze mnie wzrost produkcji cGMP w odpowiedzi na stymulację peptydem CNP w warunkach wysokiego stężenia glukozy [**praca 3**] można by, przynajmniej częściowo, przypisać zwiększonej aktywności receptorów AT2, działających przeciwstawnie do AT1. Biorąc jednak pod uwagę różnorodność dróg przekazywania wewnątrzkomórkowego uruchamianych przez hiperglikemię, należy przypuszczać, że mechanizm tego zjawiska może być bardziej złożony.

5. Podsumowanie wyników i wnioski

Przeprowadzone przeze mnie badania podocytów *in vitro* wykazały, że:

- komórki te posiadają wysoce zróżnicowany system transportu glukozy, obejmujący białka z rodziny GLUT o wysokim i niskim powinowactwie do substratu, oraz zależny od sodu transporter SGLT1. Ponadto, mają one rozbudowany układ generujący cykliczny GMP, którego istotnym elementem jest peptyd natriuretyczny CNP, syntetyzowany przez podocyty;
- stres mechaniczny zwiększa napływ glukozy do wnętrza komórek, a hiperglikemia nasila ten efekt. Z drugiej zaś strony, oba te czynniki przeciwnie wpływają na zdolność do syntezy cGMP przez podocyty i w ten sposób modulują odpowiedź tych komórek na stymulację peptydami natriuretycznymi;
- odpowiedź na czynniki generujące cykliczny GMP w podocytach jest modulowana przez angiotensynę II. Hormon ten, działając za pośrednictwem receptorów AT1 i AT2, reguluje aktywność systemów cyklaz guanylanowych zależnych od peptydów natriuretycznych i od tlenu azotu.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań wskazują, że:

1. Stres mechaniczny i hiperglikemia mogą istotnie regulować funkcjonowanie podocytów. Oddziałyując na komórki jednocześnie, mogą one wywierać efekty zarówno synergistyczne, jak i antagonistyczne.
2. Zwielokrotniony przez wspólne oddziaływanie tych czynników napływ glukozy do wnętrza komórek może prowadzić, poprzez zmiany aktywności szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowego, do obserwowanych w cukrzycy zmian funkcji podocytów.
3. Przeciwnie efekty hiperglikemii i stresu mechanicznego wywierane na zdolność podocytów do syntezy cGMP mogą odzwierciedlać mechanizmy, mające na celu utrzymanie w cukrzycy równowagi pomiędzy aktywnościami systemów rozkurczających i obkurczających.
4. Istotną rolę w tym procesie wydaje się odgrywać układ związany z angiotensyną II, który reguluje podaż cyklicznego GMP przez modulowanie aktywności rozpuszczalnej i błonowej cyklazy guanylanowej.

6. Piśmiennictwo

- 1) Schieppatti A, Remuzzi G. Chronic renal diseases as a public health problem: epidemiology, social, and economic implications. *Kidney Int (Suppl 98)*: S7-S10, 2005
- 2) Alebiosu CO, Ayodele OE. The global burden of chronic kidney disease and the way forward. *Ethn Dis* 15: 418-423, 2005
- 3) Gross M-L, Dikow R, Ritz E. Diabetic nephropathy: recent insights into the pathophysiology and the progression of diabetic nephropathy. *Kidney Int* 67:(Suppl) 94: S-50-S53, 2005
- 4) Ravera M, Re M, Deferrari L, Vettoretti S, Deferrari G. Importance of blood pressure control in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 17: 98-103, 2006
- 5) Kluth DC, Rees AJ. New approaches to modify glomerular inflammation. *J Nephrol* 12: 66-75, 1999
- 6) Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int* 71:1205-1214, 2007
- 7) Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 54: 687-697, 1998
- 8) Ichikawa I, Ma J, Motojima M, Matsusaka T. Podocyte damage damages podocytes: autonomous vicious cycle that drives local spread of glomerular sclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14: 205-210, 2005
- 9) Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol* 17: 2974-2984, 2006
- 10) Navar LG. The role of the kidneys in hypertension. *J Clin Hypertens* 7: 542-549, 2005
- 11) Latta H. An approach to the structure and function of the glomerular mesangium. *J Am Soc Nephrol* 2: S65-S73, 1992
- 12) Stockand JD, Sansom SC. Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction. *Pharm Rev* 78: 723-744, 1998
- 13) Ninomiya H, Inomata T, Ogihara K. Glomerular vascular changes in KK-Ay mice with early diabetes: scanning electron microscopy of vascular resin casts. *J Vet Med Sci* 60:103-106, 1998
- 14) Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD. Structural determinants of glomerular permeability. *Am J Physiol* 281: F579-F596, 2001
- 15) Rostgaard J, Qvortrup K. Sieve plugs in fenestrae of glomerular capillaries-site of the filtration barrier? *Cells Tissues Organs* 170: 132-138, 2002
- 16) Kubosawa H, Kondo Y. Ultrastructural organization of the glomerular basement membrane as revealed by a deep-etch replica method. *Cell Tissue Res* 242: 33-39, 1985
- 17) Zimmermann KW. Über den Bau des Glomerulus der menschlichen Niere. *Z Mikr Anat Forsch* 18:520-552, 1929
- 18) Holthofer H, Sainio K, Miettinen A. Rat glomerular cells do not express podocytic markers when cultured in vitro. *Lab Invest* 65:5480557, 1991

- 19) Mundel P, Reiser J, Kriz W. Induction of differentiation in cultured rat and human podocytes. *J Am Soc Nephrol* 8: 697-705, 1997
- 20) Schiwiek D, Endlich N, Holzman L, Holthofer H, Kriz W, Endlich K. Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. *Kidney Int* 66: 91-101, 2004
- 21) Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, Ying Xing C, Ni L, Mathieson PW, Mundel P. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol* 13: 630-638, 2002
- 22) Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol* 192: 385-397, 1995
- 23) Kriz W. Progressive renal failure- inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 11:1738-1742, 1996
- 24) Patalugnan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplon NS, Sun L, Meyer TW. Podocyte loss and progressive glomerular injury in Type II diabetes. *J Clin Invest* 99: 342-348, 1997
- 25) Barisoni L, Kriz W, Mundel P, D'Agati V. The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 10:51-61, 1999
- 26) Nelson PJ, Sunamoto M, Husain M, Gelman IH. HIV-1 expression induces cyclin D1 expression and pRb phosphorylation in infected podocytes: cell-cycle mechanisms contributing to the proliferative phenotype in HIV-associated nephropathy. *BMC Microbiol* 2-26, 2002
- 27) Srivastava T, Garola RE, Singh HK. Cell-cycle regulatory proteins in the podocyte in collapsing glomerulopathy in children. *Kidney Int* 70: 529-535, 2006
- 28) Kubiak A, Niemir Y. 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 dojrzłości. *Postępy Hig Med. Dośw* 60:248-258, 2006
- 29) Gassler N, Elger M, Kranzlin B, Kriz W, Gretz N, Hahnel B, Hosser H, Hartmann I. Podocyte injury underlies progression of focal segmental glomerulosclerosis in the fa/fa Zucker rat. *Kidney Int* 60: 106-116, 2001
- 30) Hoshi S, Shu Y, Yoshida F, Inagaki T, Sonoda J, Watanabe T, Nomoto K, Nagata M. Podocyte injury promotes progressive nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Lab Invest* 82: 25-35, 2002
- 31) Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. Perspectives in diabetes. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease. Podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes* 54: 1626-1634, 2005
- 32) Kwok C, Shannon MB, Miner JH, Shaw A. Pathogenesis of nonimmune glomerulopathies. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 1: 349-374, 2006
- 33) Furukawa T, Ohno S, Oguchi H, Hora K, Tokunaga S, Furuta S. Morphometric study of glomerular slit diaphragms fixed by rapid-freezing and freeze-substitution. *Kidney Int* 40: 621-624, 1991

- 34) Wartiovaara J, Ofverstedt LG, Khohshnoodi J, Zhang J, Makela E, Sandin S, Ruotsalainen V, Cheng RH, Jalanko H, Skoglund U, Trygvasson K. Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest* 114: 1475-1483, 2004
- 35) Reiser J, von Gersdorff G, Simons M, Schwarz K, Faul C, Giardino L, Heider T, Loos M, Mundel P. Novel concepts in understanding and management of glomerular proteinuria. *Nephrol Dial Transplant* 17: 951-955, 2002
- 36) Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han GD, Orikasa M, Shimizu F. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology* 11:274-281, 2006
- 37) Patari-Sampo A, Ihalmo P, Holthofer H. Molecular basis of the glomerular filtration: nephrin and the emerging protein complex at the podocyte slit diaphragm. *Ann Med* 38: 483-492, 2006
- 38) Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 69:2131-2147, 2006
- 39) Morton MJ, Hutchinson K, Mathieson PW, Witherden IR, Saleem MA, Hunter M. Human podocytes possess a stretch-sensitive, Ca²⁺-activated K⁺ channel: potential implications for the control of glomerular filtration. *J Am Soc Nephrol* 15: 2981-2987, 2004
- 40) Kriz W, Kobayashi N, Elger M. New aspects of podocyte structure, function and pathology. *Clin Exp Nephrol* 2:85-99, 1998
- 41) Asanuma K, Shirato I, Ishidoh K, Kominami E, Tomino Y. Selective modulation of the secretion of proteinases and their inhibitors by growth factors in cultured differentiated podocytes. *Kidney Int* 62: 822-831, 2002
- 42) Satchell SC, Harper SJ, Tooke JE, Kerjaschki D, Saleem MA, Mathieson PW. Human podocytes express angiopoietin-1, a potential regulator of glomerular vascular endothelial growth factor. *J Am Soc Nephrol* 13: 544-550, 2002
- 43) Datta K, Karumanchi SA, Wang E, Rondeau E, Mukopadhyay D. regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF-A) expression in podocytes. *Kidney Int* 66: 1471-1478, 2004
- 44) Pavenstädt H. Roles of the podocyte in glomerular function. *Am J Physiol* 278:F173-F179, 2000
- 45) Montminy M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 66:807-822, 1997
- 46) Pilz RB, Casteel DE. Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res* 93:1034-1046, 2003
- 47) Endlich N, Nobling R, Kriz W, Endlich K. Expression and signaling of parathyroid-related protein in podocytes. *Exp Nephrol* 9: 436-443, 2001
- 48) Liebau MC, Lang D, Bohm J, Endlich N, Bek MJ, Witherden I, Mathieson PW, Saleem MA, Pavenstädt H, Fischer K-G. Functional expression of the renin angiotensin system in human podocytes. *Am J Physiol* 290:F710-719, 2006
- 49) Gunning ME, Brenner BM. Natriuretic peptides and the kidney: current concepts. *Kidney Int (Suppl 38): S127-S133*, 1992

- 50) Blantz RC, Deng A, Lortie M, Munger K, Vallon V, Gabbai FB, Thomson SC. The complex role of nitric oxide in the regulation of glomerular ultrafiltration. *Kidney Int* 61: 782-785, 2002
- 51) Mundel P, Gambaryan S, Bachmann S, Koesling D, Kriz W. Immunolocalization of soluble guanylyl cyclase subunits in rat kidney. *Histochem Cell Biol* 103:75-79, 1995
- 52) Jarry A, Renaudin K, Denis MG, Robard M, Buffin-Meyer B, Karam G, Buzelin F, Paris H, Laboisie CL, Vallette G. Expression of NOS1 and soluble guanylyl cyclase by human kidney epithelial cells: morphological evidence for an autocrine/paracrine action of nitric oxide. *Kidney Int* 64; 170-180, 2003
- 53) Bianchi C, Gutkowska J, Thibault G, Garcia R, Genest J, Cantin M. Distinct localization of atrial natriuretic factor and angiotensin II binding sites in the glomerulus. *Am J Physiol* 251: F594-F602, 1986
- 54) Rambotti MG, Saccardi C, Spreca A. Evidence for particulate guanylate cyclase in rat kidney after stimulation by atrial natriuretic factor. An ultracytochemical study. *Histochem J* 22: 469-474, 1990
- 55) Zhao J, Ardaillou N, Lu C-Y, Placier S, Pham P, Badre L, Cambar J, Ardaillou R. Characterization of C-type natriuretic peptide receptors in human mesangial cells. *Kidney Int* 46: 717-725, 1994
- 56) Ardaillou N, Lelongt B, Turner N, Piedagnel R, Baudouin B, Estrade S, Cassingena R, Ronco PM. Characterization of a simian virus 40-transformed human podocyte cell line producing type IV collagen and exhibiting polarized response to atrial natriuretic peptide. *J Cell Physiol* 152: 599-616, 1992
- 57) Ardaillou N, Placier S, Wahbe F, Ronco P, Ardaillou R. Release of cyclic nucleotides from the apical and basolateral poles of cultured human glomerular epithelial cells. *Exp Nephrol* 1: 253-60, 1993
- 58) Sharma R, Lovell HB, Wiegmann TB, Savin VJ. Vasoactive substances induce cytoskeletal changes in cultured rat glomerular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 3: 1131-1138, 1992
- 59) Li B, Yao J, Morioka T, Oite T. Nitric oxide increases albumin permeability of isolated rat glomeruli via a phosphorylation-dependent mechanism. *J Am Soc Nephrol* 12:2616-2624, 2001
- 60) Hyundai L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol* 20:953-970, 2006
- 61) Sharma M, Sharma R, Greene AS, McCarthy ET, Savin VJ. Documentation of angiotensin II receptors in glomerular epithelial cells. *Am J Physiol* 274:F623-F627, 1998
- 62) Wang L, Flannery PJ, Spurney RF. Characterization of angiotensin II-receptor subtypes in podocytes. *J Lab Clin Med* 142:313-321, 2003
- 63) Gloy J, Henger A, Fischer K-G, Nitschke R, Mundel P, Bleich M, Schollmeyer P, Greger R, Pavenstädt H. Angiotensin II depolarizes podocytes in the intact glomerulus of the rat. *J Clin Invest* 99:2772-2781, 1997
- 64) Nitschke R, Henger A, Ricken S, Gloy J, Muller V, Greger R, Pavenstaedt H: Angiotensin II increases the intracellular calcium activity in podocytes of the intact glomerulus. *Kidney Int* 57:41-49, 2000

- 65) Macconi D, Abbate M, Morigi M, Angioletti S, Mister M, Buelli S, Bonomelli M, Mundel P, Endlich K, Remuzzi A, Remuzzi G. Permselctive dysfunction of podocyte-podocyte contact upon angiotensin II unravels the molecuar target for renoprotective intervention. *Am J Pathol* 168:1073-1085, 2006
- 66) Langham RG, Kelly DJ, Cox AJ, Thomson NM, Holthofer H, Zaoui P, Pinel N, Cordonnier DJ, Gilbert RE. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *Diabetologia* 45:1572-1576, 2002
- 67) Langham RG, Kelly DJ, Cox AJ, Gow RM, Holthofer H, Gilbert RE. Angiotnsin II-induced proteinuria and expression of the podocyte slit pore membrane protein, nephrin. *Nephrol Dial Transplant* 19:262-263, 2004
- 68) Chen S, Lee JS, Iglesias-de la Cruz MC, Wang A, Izquierdo-Lahuerta A, Gandhi NK, Danesh FR, Wolf G, Ziyadeh FN. Angiotensin II stimulates alpha3(IV) collagen production in mouse podocytes via TGF-beta and VEGF signalling: implications for diabetic glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant* 20:1320-1328, 2005
- 69) Velez JC, Bland AM, Arthur JM, Raymond JR, Janech MG. Characterization of renin-angiotensin system enzyme activities in cultured mouse podocytes. *Am J Physiol* 293:F398-407, 2007
- 70) Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Mundel P, Pichler R, Griffin S, Couser WG, Shankland SJ. Activation of a local tissue angiotensin szstem in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int* 65:30-39, 2004
- 71) Bouche C, Serdy S, Kahn CR, Goldfine AB. The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. *Endocr Rev* 25: 807-830, 2004
- 72) Schleicher E, Weigert C. Role of hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int (Suppl 77)*, 58: S13-S18, 2000
- 73) Yabe-Nishimura C. Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacol Rev* 50: 21-33, 1998
- 74) Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int (Suppl 77)*: S26-S30, 2000
- 75) Chuang L-Y, Guh J-Y. Extracellular signals and intracellular pathways in diabetic nephropathy. *Nephrology* 6: 165-172, 2001
- 76) Dlugosz JA, Munk S, Kapor-Drezgic J, Goldberg HJ, Fantus IG, Scholey JW, Whiteside CI. Stretch-induced mesangial cell ERK1/ERK2 activation is enhanced in high glucose by decreased dephosphorylation. *Am J Physiol* 279:F688-F697, 2000
- 77) Cortes P, Yee J. Potentiation of glucose-mediated glomerular injury by mechanical strain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:149-152, 2002
- 78) D'Agord Schaan B, Irigoyen MC, Bertoluci MC, deLima NG, Passaglia J, Hermes E, Oliveira FR, Okamoto M, Machado UF. Increased urinary TGF- β 1 and cortical renal GLUT1 and GLUT2 levels: additive effects of hypertension and diabetes. *Nephron* 100:p43-p50, 2005
- 79) Fukami T, Yamagishi S, Ueda S, Okuda S. Novel therapeutic targets for diabetic nephropathy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 7:83-92, 2007

- 80) Pfaff IL, Vallon V. Protein kinase C beta isoenzymes in diabetic kidneys and their relation to nephroprotective actions of the ACE inhibitor Lisinopril. *Kidney Blood Press Res* 25: 329-340, 2002
- 81) Zhang L, Ma J, Gu Y, Lin S. Effects of Blocking the Renin-Angiotensin System on Expression and Translocation of Protein Kinase C Isoforms in the Kidney of Diabetic Rats. *Nephron Exp Nephrol*;104:e103-e111, 2006
- 82) Wood SI, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89:3-9, 2003
- 83) Wright EM. Renal Na⁺ glucose co-transporters. *Am J Physiol* 280:F10-F18, 2001
- 84) Nishizaki T, Matsuoka T. Low glucose enhances Na⁺/glucose transport in bovine brain artery endothelial cells. *Stroke* 29:844-849, 1998
- 85) Wright EM, Hirsch JR, Loo DDF, Zampighi GA. Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. *J Exp Biol* 200:287-293, 1997
- 86) Uldry M, Thorens B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch* 44: 480-489, 2004
- 87) Sargeant RJ, Paquet MR. Effect of insulin on the rate of synthesis and degradation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 290:913-919, 1993
- 88) Tahai C, Mitsumoto Y, Liu Z, Skolnik EY, Klip A. The insulin-dependent biosynthesis of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in L6 muscle cells is mediated by distinct pathways. *J Biol Chem* 270:24678-24681, 1995
- 89) Quinn LA, McCumbee WD. Regulation of glucose transport by angiotensin II and glucose in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 177:94-102, 1998
- 90) Nose A, Mori Y, Uchiyama-Tanaka Y, Kishimoto N, Maruyama K, Matsubara H, Iwasaka T. Regulation of glucose transporter (GLUT1) gene expression by angiotensin II in mesangial cells: involvement of HB-EGF and EGF receptor transactivation. *Hypertens Res* 26:67-73, 2003
- 91) Mac Kenzie CJ, Wakefield JM, Cairns F, Dominiczak AF, Gould GW. Regulation of glucose transport in aortic smooth muscles by cAMP and cGMP. *Biochem J* 353:513-519, 2001
- 92) Eriksson JW, Wesslau C, Smith U. The cGMP-inhabitable phosphodiesterase modulates glucose transport activation by insulin. *Biochim Biophys Acta* 1189:163-167, 1994
- 93) Douen AG, Ramlal T, Rastogi S, Bilan PJ, Cartee GD, Vranic M, Holloszy JO, Klip A. Exercise induces recruitment of the insulin-responsive glucose transporter. Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. *J Biol Chem* 265:13427-13430, 1990
- 94) Ihlemann J, Ploug T, Hellsten Y, Galbo H. Effect of tension on contraction-induced glucose transport in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 277: E208-E214, 1999
- 95) Ryder JW, Chibalin AV, Zierath JR. Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 171:249-257, 2001

- 96) Gnudi L, Viberti G, Raij L, Rodriguez V, Burt D, Cortes P, Hartley B, Thomas S, Maestrini S, Gruden G. GLUT-1 overexpression. Link between hemodynamic and metabolic factors in glomerular injury? *Hypertension* 42:19-24, 2003
- 97) Sasson S, Kaiser N, Dan-Goor M, Oron R, Koren S, Wertheimer E, Unluhizarci K, Cerasi E. Substrate autoregulation of glucose transport:hexose 6-phosphate mediates the cellular distribution of glucose transporters. *Diabetologia* 40:30-39, 1997
- 98) Mathoo JMR, Shi ZQ, Klip A, Vranic M. Opposite effects of acute hypoglycemia and acute hyperglycemia on glucose transport and glucose transporters in perfused rat skeletal muscle. *Diabetes* 48:1281-1288, 1999
- 99) Hara M, Matsuda Y, Okumura N, Hirai K, Nakagawa H. Effect of glucose starvation on glucose transport in neuronal cells in primary culture from rat brain. *J Neurochem* 52:909-912, 1989
- 100) Walker PS, Donovan JA, van Ness BG, Fellows RE, Pessin JE. Glucose-dependent regulation of glucose transport activity, protein, and mRNA in primary cultures of rat brain glial cells. *J Biol Chem* 263:15594-15601, 1988
- 101) Han HJ, Lee YJ, Park SH, Lee JH, Taub M. High glucose-induced oxidative stress inhibits Na⁺/glucose cotransporter activity in renal proximal tubule cells. *Am J Physiol* 288: F988-F996, 2005
- 102) Filippis A, Clark S, Proietto J. Increased flux through the hexosamine biosynthesis pathway inhibits glucose transport acutely by activation of protein kinase C. *Biochem J* 324: 981-985, 1997
- 103) Galante P, Mosthaf L, Kellerer M, Berti L, Tippmer S, Bossenmaier B, Fujiwara S, Okuno A, Horikoshi H, Haring HU. Acute hyperglycaemia provides an insulin-independent inducer for GLUT4 translocation in C2C12 myotubes and rat skeletal muscle. *Diabetes* 44: 646-651, 1995
- 104) Houdali B, Nguyen V, Ammon HPT, Haap M, Schechinger W, Machicao F, Rett K, Häring H-U, Schleicher ED. Prolonged glucose infusion into conscious rats inhibits early steps in insulin signalling and induces translocation of GLUT4 and protein kinase C in skeletal muscle. *Diabetologia* 45: 356-368, 2002
- 105) Brosius FC, Heilig CW. Glucose transporters in diabetic nephropathy. *Pediatr Nephrol* 20:447-451, 2005
- 106) Dai T, Natarajan R, Nast CC, LaPage J, Chuang P, Sim J, Tong L, Chamberlin M, Wang S, Adler SG. Glucose and diabetes: effects on podocyte and glomerular p38MAPK, heat shock protein 25, and actin cytoskeleton. *Kidney Int* 69:806-14, 2006
- 107) Economou CG, Kitsiou PV, Tzinia AK, Panagopolou E, Marinos E, Kershaw DB, Kerjaschki D, Tsilibary E. Enhanced podocalyxin expression alters the structure of podocyte basal surface. *J Cell Sci* 117: 3281-3294, 2004
- 108) Rincon-Choles H, Vasylyeva TL, Pergola PE, Bhandari B, Bhandari K, Zhang JH, Wang W, Gorin Y, Barnes JL, Abboud HE. ZO-1 expression and phosphorylation in diabetic nephropathy. *Diabetes* 55:894-900, 2006
- 109) Yard BA, Kahlert S, Engelleiter R, Resch S, Waldherr R, Groffen AJ, van den Heuvel LP, van der Born J, Berden JH, Kroger S, Hafner M, van der Woude FJ. Decreased glomerular expression of agrin in diabetic nephropathy and podocytes cultured in high glucose medium. *Exp Nephrol* 9: 214-222, 2001

- 110) Chen HC, Chen CA, Guh JY, Chang JM, Shin SJ, Lai YH. Altering expression of alpha3 beta1 integrin on podocytes of human and rats in diabetes. *Life Sci* 67: 2345-2353, 2000
- 111) Van Det NF, Verhagen NA, Tamsma JT, Berden JH, Bruijn JA, Daha MR, van der Woude FJ. Regulation of glomerular epithelial cell production of fibronectin and transforming growth factor-beta by high glucose, not by angiotensin II. *Diabetes* 46: 834-840, 1997
- 112) Morano S, Guidobaldi L, Cipriani R, Gabriele A, Pantellini F, Medici F, D'Ermr M, DiMario U. High glucose modifies heparansulphate synthesis by mouse glomerular epithelial cells. *Diabetes Metab Res Rev* 15: 13-20, 1999
- 113) Iglesias-de la Cruz MC, Ziyadeh FN, Isono M, Kouhahou M, Han DC, Kalluri R, Mundel P, Chen S. Effects of high glucose and TGF-beta on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney Int* 62: 901-913, 2002
- 114) Lee E-Y, Chung CH, Kim JH, joungh H-J, Hong SY. Antioxidants ameliorate the expression of vascular endothelial growth factor mediated by protein kinase C in diabetic podocytes, *Nephrol Dial Transplant* 12:1496-1503, 2006
- 115) Hashimoto Y : Ideura T : Yoshimura A : Koshikawa S. Autoregulation of renal blood flow in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 38:1109-1113, 1989
- 116) Arima S, Ito S. The mechanisms underlying altered vascular resistance of glomerular afferent and efferent arterioles in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 18:1966-1969, 2003
- 117) Forbes JM, Fukami K, Cooper ME. Diabetic nephropathy: where hemodynamics meets metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 115:69-84, 2007
- 118) Ko K, McCulloch CAG. Intercellular mechanotransduction: cellular circuits that coordinate tissue responses to mechanical loading. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1077-1083, 2001
- 119) Wang JH, Thampatty BP. An introductory review of cell mechanobiology. *Biomech Model Mechanobiol* 5:1-16, 2006
- 120) Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Grondin JM, Zee J, Narins RG. Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 11:25-38, 2000
- 121) Cortes P, Riser BL, Yee J, Narins RG. Mechanical strain of glomerular mesangial cells in the pathogenesis of glomerulosclerosis: clinical implications. *Nephrol Dial Transplant* 14:1351-1354, 1999
- 122) Cooper ME. Interaction of metabolic and hemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* 44:1957-1972, 2001
- 123) Endlich N, Sunohara M, Nietfeld W, Wolski EW, Schiwiek D, Kranzlin B, Gretz N, Kriz W, Eickhoff H, Endlich K. Analysis of differential gene expression in stretched podocytes: osteopontin enhances adaptation of podocytes to mechanical stress. *FASEB J* 16:1850-1852, 2002
- 124) Endlich N, Kress KR, Reiser J, Uttenweller D, Kriz W, Mundel P, Endlich K. Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol* 12:413-422, 2001

- 125) Endlich N, Endlich K. Stretch, tension and adhesion – adaptive mechanisms of the actin cytoskeleton in podocytes. *Eur J Cell Biol* 83: 229-234, 2006
- 126) Marshall SM. The podocyte: a mayor player in the development of diabetic nephropathy. *Horm Metab Res* 37:9-16, 2005
- 127) Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Monkawa T, Durvasula R, Couser WG, Shankland SJ. Mechanical stress reduces podocyte proliferation in vitro. *Kidney Int* 61:40-50, 2002
- 128) Petermann AT, Pippin J, Durvasula R, Pichler R, Hiromura K, Monkawa T, Couser WG, Shankland SJ. Mechanical stretch induces podocyte hypertrophy in vitro. *Kidney Int* 67: 157-166, 2005
- 129) Coward RJM, Welsh GI, Yang J, Tasman C, Lennon R, Koziell A, Satchell S, Holman GD, Kerjaschki D, Tavaré JM, Mathieson PW, Saleem MA. The human glomerular podocyte is a novel target for insulin action. *Diabetes* 54: 3095-3102, 2005
- 130) Alpert E, Gruzman A, Riahi Y, Blejter R, Aharoni P, Weisinger G, Eckel J, Kaiser N, Sasson S. Delayed autoregulation of glucose transport in vascular endothelial cells. *Diabetologia*. 48:752-755, 2005
- 131) Dohm L G. Regulation of skeletal muscle GLUT-4 expression by exercise. *J Appl Physiol* 93: 782-787, 2002
- 132) Schiffer M, Susztak K, Ranalletta M, Raff AC, Böttinger EP, Charron MJ. Localization of the GLUT8 glucose transporter in murine kidney and regulation in vivo in nondiabetic and diabetic conditions. *Am J Physiol* 289:F186-F193, 2005
- 133) Okwueze MI, Opgenorth TJ, von Geldern TW, Vari RC. Atrial natriuretic peptide and glomerular hyperfiltration during onset of spontaneous diabetes melitus. *Am J Physiol* 266: R572-R577, 1994
- 134) Berkelmans HS, Burton GA, Schipper J, de Vente J. Effects of atrial natriuretic factor, nitroprusside and acetylcholine on cGMP immunoreactivity in isolated perfused rat kidney. *Histochemistry* 96: 13-19, 1991
- 135) Haneda M, Kikkawa R, Koya D, Uzu T, Maeda S, Togawa M, Shigeta Y. Alteration of mesangial response to ANP and angiotensin II by glucose. *Kidney Int* 44:518-526, 1993
- 136) Shin S-J, Wen J-D, Lee Y-J, Chen I-H, Tsai J-H. Increased C-type natriuretic peptide mRNA expression in the kidney of diabetic rats. *J Endocrinol* 158: 35-42, 1998
- 137) Kook H, Lee JU, Kim SW, Kim SW, Baik YH. Augmented natriuretic peptide-induced guanylyl cyclase activity and vasodilatation in experimental hyperglycemic rats. *Jpn J Pharmacol* 88: 167-173, 2002
- 138) Obineche EN, Chandranath IS, Adeghate E, Benedict S, Fahim M, Adem A. Alterations in atrial natriuretic peptide and its receptor levels in long-term streptozocin-induced diabetes in rats. *Ann NY Acad Sci* 1084: 223-234, 2006
- 139) Sechi LA, Valentin JP, Griffin CA, Lee E, Bartoli E, Humphreys MH, Schambelan M. Receptors for atrial natriuretic peptide are decreased in the kidney of rats with streptozocin-induced diabetes mellitus. *J Clin Invest* 95: 2451-2457, 1995
- 140) Ortola F, Ballerman BJ, Anderson S, Mendez RE, Brenner BM. Elevated plasma atrial natriuretic peptide levels in diabetic rats: potential mediator of hyperfiltration. *J Clin Invest* 80: 670-674, 1987

- 141) Vidotti DB, Casarini DE, Cristovam PC, Leite CA, Schor N, Boim MA. High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. *Am J Physiol* 286: F1039-F1045, 2004
- 142) Lewko B, Wendt U, Szczepańska-Konkel M, Stepiński J, Drewnowska K, Angielski S. Inhibition of endogenous nitric oxide synthesis activates particulate guanylyl cyclase in the rat renal glomeruli. *Kidney Int* 52:654-659, 1997
- 143) Stepiński J, Wendt U, Lewko B, Angielski S. Co-operation between particulate and soluble guanylyl cyclase systems in the rat renal glomeruli. *J Physiol Pharmacol* 51:497-511, 2000
- 144) Chouinard RF, Meek RL, Cooney SK, Tuttle KR. Effects of amino acids and glucose on mesangial cell aminopeptidase A and angiotensin receptors. *Kidney Int* 61(Suppl 1):106-109, 2002