

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Katedra i Zakład Fizjopatologii

Aleksandra Jasiulewicz

Rozprawa doktorska pt.:

Limfocyty B u osób ze schyłkową  
niewydolnością nerek.

Promotor pracy: prof. dr hab. Jacek M. Witkowski

Gdańsk, 2014

Dziękuję wszystkim Dziewczynom, które nauczyły mnie metod (jeszcze w starym budynku) potrzebnych do badań oraz mojemu Promotorowi, który uporządkował nawał wyników, tekstu i grafik tak, że sens 4-letnich badań został wyłoniiony na pierwszy plan. Dziękuję również Annie Maryn, której obecność tuż obok w laboratorium dodawała mi skrzydeł.

Moją pracę dedykuję Katarzynie Lisowskiej.

## Spis treści

1. Wyjaśnienie skrótów. ....	5
2. Przewlekła choroba nerek- epidemiologia.....	7
3. Infekcje u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek. ....	10
4. Erytropoetyna i przewlekła choroba nerek. ....	12
5. Limfocyty B w ESRD. ....	13
6. Antygen CD40 oraz interleukiny 4, 5, 10. ....	14
7. BAFF i jego receptor. ....	17
8. Cel badań. ....	20
9. Materiał i Metody badań. ....	20
9.1 Osoby badane. ....	20
9.2 Uzyskiwanie PBMC. ....	21
9.3 Stymulacja PBMC in vitro. ....	21
9.4 Ocena stężeń przeciwciał. ....	23
9.5 Analiza statystyczna. ....	23
10. Wyniki. ....	24
10.1 Odpowiedź proliferacyjna i sekrecyjna limfocytów B. ....	24
10.1.1 Kinetyka proliferacji limfocytów B w hodowli in vitro. ....	24
10.1.2 Liczba podziałów limfocytów B. ....	25
10.1.3 Procent proliferujących limfocytów B. ....	26
10.1.4 Długość cyklu komórkowego limfocytów B i ich czas przejścia z fazy G0->G1. ....	28
10.2 Liczebność i apoptoza limfocytów B w hodowli PBMC. ....	30
10.3 Porównanie wielkości produkcji immunoglobulin IgM i IgG. ....	33
10.3.1 Stężenie przeciwciał IgM w surowicy oraz w supernatantach po hodowli in vitro. ....	33
10.3.2 Stężenie przeciwciał IgG w surowicy oraz w supernatantach po hodowli in vitro. ....	36
10.4 Zmiany w ekspresji receptorów powierzchniowych limfocytów B. ....	37
10.4.1 Porównanie ilości BAFF-R i wpływu Epo in vitro na jego ekspresję na limfocytach B osób zdrowych i pacjentów z ESRD. ....	38

10.4.2 Porównanie ilości CD40 i wpływu Epo in vitro na jego ekspresję na limfocytach B osób zdrowych i pacjentów z ESRD. ....	39
10.4.3 Porównanie ekspresji receptorów dla IL-4 (IL-4R), IL-5 (IL-5R) i IL-10 (IL-10R) na limfocytach B osób zdrowych i pacjentów z ESRD. ....	42
10.4.3.1 IL-4R na powierzchni limfocytów B. ....	42
10.4.3.2 IL-5R na powierzchni limfocytów B. ....	44
10.4.3.3 IL-10R na powierzchni limfocytów B. ....	47
10.4.4 Receptor dla Epo na limfocytach B osób zdrowych i pacjentów z ESRD. ....	51
10.5 Korelacje dotyczące poszczególnych antygenów oraz parametrów proliferacyjnych limfocytów B. ....	53
11. Dyskusja. ....	56
12. Wnioski. ....	67
13. Streszczenie. ....	68
14. Abstract. ....	70
15. Literatura. ....	72

## 1 Wyjaśnienie skrótów

**AMP**- peptyd przeciwdrobnoustrojowy; z ang. *anti microbial peptide*

**APC**- komórka prezentująca antygen; z ang. *antigen presenting cell*

**APRIL** - ligand aktywujący proliferację; z ang. *a proliferation-inducing ligand*

**BAFF**- czynnik aktywujący limfocyt B; z ang. *B-cell activating factor*

**BAFF-R** - receptor czynnika BAFF

**BCMA**- antygen dojrzewania limfocytów B; z ang. *B-cell maturation antigen*

**BCR**- receptor komórki B; z ang. *B cell receptor*

**CFSE**- ester dwuocianu sukcyimidu karboksylu fluoresceiny; z ang. *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*

**"CH Epo-"** - chorzy nieprzyjmujący erytropoetyny

**"CH Epo+"** - chorzy przyjmujący erytropoetyne

**CREA**- kreatynina

**DCT**- technika śledzenia dzielących się komórek; z ang. *Dividing Cell Tracking*

**DKD**- cukrzycowa choroba nerek; z ang. *diabetes kidney disease*

**DO**- dializa otrzewnowa

**EDTA**- kwas etyleno diamino tetraoctowy (kwas wersenowy)

**Epo**- erytropoetyna

**EpoR**- receptor dla erytropoetyny

**ESA**- czynniki stymulujące erytropoezę; z ang. *erythropoiesis stimulating agents*

**ESRD**- schyłkowa niewydolność nerek; z ang. *end-stage renal disease*

**FITC** - izotiocyanian fluoresceiny; z ang. *fluorescein isothiocyanate*

**GFR**- filtracja (przesączanie) kłębuszkowe; z ang. *glomerular filtration rate*

**Hb** - hemoglobina

**HD** - hemodializa

**IL** - interleukina

**IFN**- interferon

**JNC**- Joint National Committee of Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure

**KDOQI**- Kidney Disease Outcome Quality Initiative

**LPS** - lipopolisacharyd bakteryjny

**MFI** - średnia intensywność fluorescencji; z ang. *mean fluorescence intensity*

**NLPZ**- niesteroidowe leki przeciwzapalne

**PBS**- sól fizjologiczna buforowana fosforanem; z ang. *phosphate buffered saline*

**PChN**- przewlekła choroba nerek

**rtPA**- rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu; z ang. *recombinant tissue plasminogen activator*

**SLE**- toczeń układowy rumieniowaty (*systemic lupus erythematosus*)

**TACI**- transbłonowy aktywator i białko reagujące z ligandem cytofiliny modulowanym wapniem; z ang. *transmembrane activator and CAML interactor*

**TCR** - receptor limfocyту T; z ang. *T-cell receptor*

**TNF**- czynnik martwicy nowotworu; z ang. *tumour necrosis factor*

## 2 Przewlekła choroba nerek- epidemiologia.

Zgodnie z definicją ustanowioną przez Kidney Disease Outcome Quality Initiative (KDOQI; Stany Zjednoczone) w 2002r., przewlekła choroba nerek (PChN) to wielobjawowy zespół chorobowy powstały w wyniku trwałego uszkodzenia lub zmniejszenia liczby czynnych nefronów, niszczonych przez różnorodne procesy chorobowe toczące się w miąższu nerek<sup>1</sup>. Uszkodzenie nerek musi, zgodnie z definicją, utrzymywać się co najmniej 3 miesiące z lub bez spadku filtracji kłębuszkowej (z ang. GFR- *glomerular filtration rate*). Także sam spadek współczynnika GFR poniżej 60ml/min/1.73m<sup>2</sup> (przyjęta umownie powierzchnia ciała) utrzymujący się co najmniej 3 miesiące, pozwala na sklasyfikowanie patologii jako PChN. Przewlekła choroba nerek (PChN) stała się jedną z chorób cywilizacyjnych XXI w., której dodatkowo mogą towarzyszyć inne takie jak: nadciśnienie tętnicze, otyłość, cukrzyca, choroby sercowo-naczyniowe. Szacuje się, że na świecie przewlekła choroba nerek dotykać może nawet 873 milionów ludzi (z czego 6.2 miliona w Polsce), co równe jest 7-18% populacji świata (średnio 600 milionów osób)<sup>1</sup>.

Obecnie wyróżnia się pięć stadiów przewlekłej choroby nerek (Tabela 1). Ostatnie, V stadium choroby, jest określane mianem schyłkowej, krańcowej lub po prostu niewydolności nerek (z ang. ESRD, *end-stage renal disease*).

Stadium	Charakterystyka	GFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )
I	uszkodzenie nerek z prawidłowym lub podwyższoną GFR	> 90
II	uszkodzenie nerek z nieznacznym obniżeniem GFR	> 60-89
III	uszkodzenie nerek z umiarkowanym obniżeniem GFR	> 30-59
IV	uszkodzenie nerek z ciężkim obniżeniem GFR	15-29
V	niewydolność nerek	< 15 lub dializa

Tabela 1. Charakterystyka poszczególnych stadiów przewlekłej choroby nerek<sup>1-3</sup>.

Jak podaje KDOQI występowanie schyłkowej niewydolności nerek podwoiło się w ciągu ostatnich 10 lat i oczekuje się, że zapadalność ta będzie stale rosła w przyszłości. W 1998 roku US Renal Data System

(USRDS) doniósł, że w samych Stanach Zjednoczonych, ponad 320 000 osób zostało dotkniętych schyłkową niewydolnością nerek (stadium V PChN). 72% tych chorych zostało poddanych dializom (23% zmarło a główną przyczyną były powikłania sercowo-naczyniowe)<sup>4</sup>. 28% tych osób poddano przeszczepom nerek. Roczny koszt leczenia sięgnął wtedy 12 miliardów \$ (w 1997 roku przekroczył 15 miliardów \$). W 2008 roku koszt programu związanego z niewydolnością nerek (*ESRD program*) wyniósł ponad 39 miliardów \$ (sektor publiczny i prywatny)<sup>5</sup>. Śmiertelność, zapadalność, czas hospitalizacji, jakość życia (poza zaniżoną samooceną chorych<sup>6</sup>) i koszty opieki nad chorymi na PChN we wcześniejszych stadiach nie zostały, na dzień dzisiejszy, ocenione.

Pomimo tak wysokich kosztów leczenia, w Stanach Zjednoczonych nie ma zalecenia przesiewowego wykonywania badania moczu ani mierzenia poziomu kreatyniny (CREA) w osoczu u osób zdrowych, co pozwoliłoby na szybsze wyłowienie osób we wcześniejszych stadiach PChN. W Stanach Zjednoczonych najliczniejsza grupa osób z podniesionym stężeniem kreatyniny w osoczu ma I stadium nadciśnienia (140-159 mm Hg skurczowego lub 90-99 mm Hg rozkurczowego)<sup>4</sup>. Dlatego też eksperymentalne badania przesiewowe w kierunku PChN zostały skierowane na pacjentów z nadciśnieniem<sup>7</sup>. Okazuje się, że 75% pacjentów z nadciśnieniem i z podniesionym poziomem CREA w surowicy jest leczonych ze względu na nadciśnienie. Spośród nich tylko 36% ma ciśnienie krwi niższe od 140/90 mm Hg (jest to wartość rekomendowana przez JNC dla osób z nadciśnieniem bez uszkodzenia organów) a 14% ma ciśnienie krwi zredukowane poniżej 130/85 mm Hg (wartość rekomendowana przez JNC dla osób z nadciśnieniem i chorobą nerek)<sup>4</sup>. Łącznie, jedynie 11% osób z nadciśnieniem (leczeni i nieleczeni) i z podniesionym poziomem CREA w surowicy ma ciśnienie krwi zredukowane poniżej 130/85 mm Hg a 27% tych osób ma ciśnienie niższe od 140/90 mm Hg. Istnieje silna korelacja wieku osób z podwyższonym surowiczym poziomem CREA- 77% takich osób ma co najmniej 60 lat<sup>4</sup>. Podwyższone stężenie CREA w surowicy osób starszych jest zjawiskiem naturalnym, gdyż począwszy od ok. 20 roku życia wartość GFR spada o około 1ml/min rocznie. Jednak zdrowa starsza osoba nie będzie odczuwać żadnych fizycznych skutków obniżonej GFR, którą w tym przypadku można nazwać fizjologiczną.

W przeciwieństwie do Stanów Zjednoczonych, główną przyczyną PChN w Polsce, w końcowym stadium V, w 2005 roku była nefropatia cukrzycowa (27.16%), kłębuszkowe zapalenie nerek (18.57%) i nefropatia nadciśnieniowa (14.38%)<sup>1</sup>. Jak podkreślają polscy specjaliści, 9.61% przypadków V stadium PChN w Polsce jest niewiadomego pochodzenia a główną przyczyną takiego stanu rzeczy jest zbyt późnie rozpoznanie procesu chorobotwórczego nerek, który latami może toczyć się bezobjawowo<sup>1</sup>. Szacuje się, że koszt dializoterapii i przeszczepów nerek w naszym kraju<sup>11</sup> mógł wynieść w 2010 roku 1.5 mld zł. Podobnie jak w Stanach Zjednoczonych brak jest w Polsce danych dotyczących wcześniejszych stadiów PChN.



W literaturze występuje takie określenie jak cukrzycowa choroba nerek, z ang. *diabetic kidney disease* (DKD). Jest to choroba nerek o podłożu cukrzycowym (typ I i II). Rozwija się po co najmniej 5 latach cukrzycy a jej pierwszymi symptomami jest wydalanie z moczem od 30 do 299 mg albumin na dobę (tzw. mikroalbuminuria)<sup>12</sup>. Nieleczona prowadzi do V stadium PChN, czemu można całkowicie zapobiec kontrolując cukrzycę, stan ciśnienia tętniczego, dyslipidemię i dietę (przyjmowanie od 0.8-1.0 g białka na kilogram masy ciała na dobę).

Mimo, że liczby dotyczące PChN są alarmujące, nadając tej chorobie znamię epidemii, światowa świadomość zarówno lekarzy, co jest niepokojące, i pacjentów, dotycząca istotności prawidłowego leczenia nadciśnienia i cukrzycy jest znikoma. Zauważalny, nawet w samych, wyżej przedstawionych, danych statystycznych, jest brak powiązania nadciśnienia i cukrzycy z procesami patologicznymi toczącymi się w nerkach. Być może stąd wynika niedbałość prowadzenia tych pacjentów, którzy sami nie mając świadomości konsekwencji braku optymalizacji leczenia, w większości (75-80% dla nadciśnienia i 45% dla cukrzycy) kończą jako pacjenci cierpiący na PChN.

Nie wiadomo jaki odsetek PChN jest powodowany przewlekłym bezobjawowym zapaleniem cewkowo-śródmiąższowym nerek spowodowanym w 70-95% lekami (antybiotyki i NLPZ), w 15-20% powikłaniami zakażeń ogólnoustrojowych (np. przewlekłe odmiedniczkowe zapalenie nerek)<sup>13</sup>. Część przypadków śródmiąższowego zapalenia nerek łączona jest z chorobą immunologiczną jaką jest tu zespół Sjögrena. Dodatkowo 10% przypadków tego zapalenia ma nieznane przyczyny. Nowe dane, opisane zaledwie w dwóch pracach, zwracają uwagę na zapadalność na niewydolność nerek (stadium V PChN) u chorych z marskością wątroby<sup>14,15</sup>. Tego typu statystyki, w których nieznana jest przyczyna patologii przyczyniającej się w nieznanym procencie do PChN, dowodzą jak wiele niejasności, mimo niekwestionowanego postępu nauki i medycyny, pozostaje w aspekcie PChN, co jeszcze bardziej utrudnia opracowanie strategii mającej na celu wyłowienie chorych we wczesnych stadiach czy monitorowanie tych, którzy są szczególnie narażeni na zapadnięcie na PChN.

Jako główną przyczynę śmierci pacjentów PChN podaje się powikłania sercowo-naczyniowe, jednak od niedawna zwraca się również uwagę na dużą rolę zapadalności na infekcje we wzroście śmiertelności u tych pacjentów, co wskazuje na nieprawidłowości ze strony układu immunologicznego. Niestety, w świetle najnowszych badań<sup>16</sup>, wydaje się, że hemodializy (HD) mogą wpływać negatywnie na komórki układu odpornościowego, pogarszając tym samym stan pacjenta, co tym bardziej powinno zmusić świat medyczny jak i samych pacjentów do skrupulatnego monitorowania choćby nadciśnienia tętniczego i cukrzycy, aby zapobiec, początkowo bezobjawowemu, niszczeniu nerek.

### 3 Infekcje u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek.

Jedynym z poważniejszych problemów dotyczących osób cierpiących na PChN (szczególnie pacjentów hemodializowanych), poza oczywistymi powikłaniami związanymi z niedostateczną pracą nerek oraz znacznie obniżoną samooceną pacjentów<sup>6</sup>, są często występujące infekcje. Stanowią one drugą najczęstszą przyczynę śmierci pacjentów w V stadium choroby<sup>17</sup>.

Problem ten jest na tyle znaczący, że został zawarty we wskazówkach praktyki klinicznej przez Kanadyjskie Towarzystwo Nefrologiczne<sup>2</sup>. U pacjentów cierpiących na PChN odnajdywane są nieprawidłowe parametry odporności swoistej i nieswoistej jak: obniżony procent limfocytów T (CD4+, limfocyty T pomocnicze i CD8+, limfocyty T cytotoksyczne) i limfocytów B we krwi krążącej, nadreaktywność monocytów (z obniżoną funkcją fagocytozy makrofagów<sup>17</sup>) związana z nadprodukcją cytokin prozapalnych (TNF-alfa, IL-1, IL-6) oraz obniżona produkcja IL-2 w odpowiedzi na stymulację<sup>16,18</sup>. Nadprodukcja cytokin prozapalnych związana jest także z aktywacją limfocytów B poprzez TLR9. U pacjentów w V stadium PChN skutkuje to wyższą produkcją prozapalnych cytokin niż u osób zdrowych<sup>17</sup> (ludzkie limfocyty B produkują IL-6 i TNF-alfa)<sup>17,19</sup>. Zaburzona produkcja IL-2 ma dodatkowo związek z upośledzoną komunikacją limfocytów CD4+ tych pacjentów ze środowiskiem, związaną z obniżoną liczbą ich najważniejszych antygenów powierzchniowych: CD28 (główny antygen kostymulujący) i CD69 (antygen wczesnej aktywacji)<sup>16</sup>. Opisuje się także obniżoną produkcję przeciwciał przez komórki plazmatyczne wywodzące się z limfocytów B, co skutkuje słabą odpowiedzią na szczepienia<sup>16-18</sup>. Zaburzeniu ulega także prezentacja antygenów przez monocyty/makrofagi<sup>17</sup>.

Opisane nieprawidłowości skutkują wyższą od przeciętnej w populacji, zapadalnością na infekcje wywołane: bakteriami (najczęściej zakażającą chorych z PChN jest bakteria z rodzaju *Staphylococcus*), wirusy (najczęściej wirus grypy z rodziny *Orthomyxoviridae*, półpaśca - *Herpesvirus varicella* i zapalenia wątroby typu B - z rodziny *Hepadnaviridae*), grzybami (drożdżaki z rodzaju *Candida*; zajmują najczęściej okolice pochwy u kobiet z PChN, stopy, fałdy skórne i macierz paznokcia).

Drożdżycza u pacjentów z PChN jest groźna, kiedy zajmuje cewniki stosowane do hemodializ. Infekcja jest wtedy praktycznie niemożliwa do wyeliminowania i wymusza usunięcie cewnika. Grzybica paznokci jest trudniejsza w leczeniu u tych pacjentów niż pozostałe grzybicze i wymaga zazwyczaj kilku miesięcy terapii przeciwgrzybiczej.

Kolejną często pojawiającą się infekcją jest zakażenie dróg moczowych. Jednym z powodów jest zaburzona praca nerek, które w V stadium PChN produkują znacznie mniej moczu. Mocz naturalnie przemywa układ moczowy, wypłukując czynniki infekcyjne a mocz nawet zdrowego człowieka nie jest

jałowy. Zostało to udowodnione na grupie zdrowych kobiet, bez i z dolegliwościami moczowo-płciowymi, u których posiew moczu dawał ujemne rezultaty. Mocz kobiety zawiera przede wszystkim bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, ale i *Actinobaculum*, *Aerococcus*, *Atobopium*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Sneathia*, *Staphylococcus* i *Streptococcus*<sup>20</sup>. U chorych z PChN moczu jest często zbyt mało, co doprowadza do kolonizacji dróg moczowych przez patogeny, np. bakterie zasiedlające jelita (głównie *Escherichia coli*), ale nie można również wykluczyć kolonizacji przez bakterie odnajdywane w moczu zdrowych kobiet jak np. rodzaju *Staphylococcus* (najczęściej infekujący pacjentów z PChN) i *Streptococcus*. Nieprawidłowości w budowie układu moczowego u części chorych z PChN dodatkowo przyczyniają się do wyższej zapadalności na infekcje. Mowa tu o cystach w nerkach, które mogą być infekowane, obkurczeniu dróg moczowych, co wpływa na osłabiony ich drenaż i późniejsze zatrzymanie moczu oraz refluks pęcherzowy (mocz wraca z pęcherza do nerek, co może powodować infekcję bakteryjną pęcherza, która rozprzestrzenić się może do nerek i do krwi, w skrajnych przypadkach powodując posocznicę)<sup>21</sup>.

Pacjenci hemodializowani wykazują tendencję do zakażeń związanych z przetoką tętniczo-żylną, grafem lub cewnikiem, niezbędnymi do hemodializy. Najczęściej tego typu zakażenia dotyczą pacjentów z cukrzycą i narażają ich przede wszystkim na bakteryjne zapalenie wsierdza<sup>22</sup>, kończące się nawet w 70% śmiertelnością<sup>23</sup>. Powodem trudności w zwalczaniu tego typu zakażeń, poza otwartym dostępem patogenów przez skórę (w przypadku cewnika), jest to, że zarówno przetoka, graft jak i cewnik zawierają plastikowe elementy, które są niemożliwe do penetracji przez białe krwinki i z tego powodu stanowią optymalną powierzchnię do kolonizacji przez bakterie, które w tak sprzyjających warunkach potrafią tworzyć biofilm odporny na antybiotyki. Graft najczęściej jest infekowany z powodu powstającego w bliskiej odległości krwiaka (przeciek krwi z igły pod skórą w miejscu wkłucia), który zostaje zajęty przez bakterie. Jednakże, najwyższą zakaźność notuje się w dostępie cewnikowym do obiegu; m. in. z tego względu, jeśli to tylko możliwe, stosuje się u pacjenta przetokę tętniczo-żylną lub ewentualnie graft, jeżeli u pacjenta występuje zanik żył lub są one zbyt słabe, aby wytworzyć przetokę<sup>22</sup>.

Konieczność uzyskania dostępu do naczyń niesie ze sobą ryzyko powikłań, które dotyczy 36% pacjentów hemodializowanych. Poza infekcjami, stanowiącymi 50-80% przypadków wszystkich zakażeń u pacjentów hemodializowanych<sup>23</sup>, należą do nich: wczesna lub późna zakrzepica przetoki, odwrócenie kierunku przepływu krwi, zakażenia pooperacyjne związane z wykonaniem przetoki, powstanie tętniaka rzekomego w miejscu wkłucia. Przez pierwsze dwa lata dializoterapii ponad połowa chorych jest z tego powodu hospitalizowana. Ocenia się, że w USA (brak danych dotyczących Polski) koszty związane z leczeniem tych powikłań stanowią 20% leczenia nerkozastępczego, co daje około 1 miliarda \$ rocznie<sup>22</sup>.

Szacuje się, że 16-36% pacjentów hemodializowanych umiera z powodu infekcji<sup>23</sup>. Zakażenie u pacjentów z PChN ma szybszy przebieg, ale charakteryzuje się słabszymi objawami ogólnymi- np. u

pacjentów hemodializowanych często nie rozwija się gorączka a podawane leki (sole wapnia i magnezu, wodorotlenek glinu) chelatują fluorochinolony i tetracykliny, osłabiając ich wchłanianie. Leki o masie cząsteczkowej <500Da mogą przenikać przez błonę dializacyjną i ulegać eliminacji a co za tym idzie utrudniać wyznaczenie prawidłowej dawki leków, a w konsekwencji obniżyć ich skuteczność.

Nadal dyskusyjny jest wpływ błon dializacyjnych na antygeny powierzchniowe komórek układu odpornościowego oraz ich parametry proliferacyjne. Odkryto, że po kontakcie z błoną dializacyjną inicjowany jest proces apoptozy limfocytów T, prowadzący u tych pacjentów do limfopenii podczas zabiegu<sup>16</sup>. Dodatkowo, w ciągu 30 minut od rozpoczęcia hemodializy pojawia się uogólniona leukopenia<sup>23</sup> dotycząca również neutrofilów, u których ulega także zaburzeniu zdolność do fagocytozy<sup>23</sup>. Limfocyty Th pacjentów hemodializowanych gorzej reagują na stymulację *in vitro* i wykonują mniej podziałów niż limfocyty Th zdrowych osób<sup>16</sup>.

## 4 Erytropoetyna i przewlekła choroba nerek.

Erytropoetyna (Epo) jest glikoproteinowym hormonem o masie cząsteczkowej 34kDa produkowanym przez komórki okołocewkowe śródmiąższu nerki (80-90% produkcji), hepatocyty i komórki Ito (łącznie w wątrobie produkowanej jest ok. 10-20% Epo). mRNA Epo odnaleziono w płucach, jądrach, śledzionie, komórkach śródbłona naczyń, łożysku (Epo nie przenika przez nie), macicy i siatkówce oka. Transkrypt Epo stwierdzony został również w mózgu (hipokamp, kora mózgowia, astrocyty, mikroglej)<sup>39</sup>.

Ze względu na to, że głównym organem produkującym erytropoetynę jest nerka, chorzy z PChN, w przeważającej większości, cierpią na anemię spowodowaną niedoborem tego hormonu. Aktualnie (od 2007r.) zalecanym przez KDOQI stężeniem hemoglobiny (Hb) dla osób z PChN jest 11.0-12.0g/dl i nie powinno przekraczać 13g/dl<sup>48</sup>. Rekombinowana ludzka erytropoetyna podawana jest obecnie ponad 80% chorym z PChN<sup>43</sup>. Z wyższym stężeniem kreatyniny we krwi związana jest cięższa niedokrwistość, która pojawia się wraz z postępującym, początkowo często bezobjawowym, upośledzeniem czynności nerek<sup>44</sup>.

W roku 1989 zarejestrowano w Polsce pierwszą rekombinowaną ludzką erytropoetynę jako lek. Była to erytropoetyna firmy Cilag o nazwie handlowej alfa Eprex, która jest stosowana do dzisiaj. W 1990 roku zarejestrowano w naszym kraju produkt konkurencyjny jakim była, również stosowana do dzisiaj, erytropoetyna beta Recormon firmy Roche (ówczesnie Boehringer Mannheim). Dzisiaj znana jest także

erytropoetyna omega Epomax, darbapoetyna alfa i CERA (ciągły aktywator receptora erytropoezy, z ang. *Continuous Erythropoiesis Receptor Activator*). Poszukiwanie nowych preparatów pobudzających erytropoezę związane jest z próbą wydłużenia czasu działania leku oraz z eliminacją działań niepożądanych. Opisuje się między innymi wybiórczą aplazję szpiku czerwono krwinkowego, którą powiązano z preparatami erytropoetyny podawanymi podskórnymi. U części chorych, taka droga podania powoduje wytworzenie przeciwciał skierowanych przeciwko białkowej części erytropoetyny<sup>45</sup>. Już w 1992 roku stwierdzono znaczną poprawę w układzie czerwono krwinkowym u chorych na PChN leczonych zachowawczo i hemodializami. Po serii podań Epo podskórnymi, u wszystkich badanych pacjentów stężenie Hb i liczba erytrocytów wzrosły. Średnio Hb z 8.4g/dl do 10.3g/dl a erytrocyty z 2.69mln/ $\mu$ l do 3.31mln/ $\mu$ l. Okazało się również, że podawanie Epo doprowadziło do pozytywnych zmian strukturalnych (fosfolipidy ułożone regularniej a ich amplituda ruchów mniejsza) w dwuwarstwie fosfolipidowej błony erytrocytów a zmiany te były bardziej zauważalne u pacjentów HD<sup>47</sup>. Fakt ten może wskazywać na bardziej zaawansowane zmiany w erytrocytach tych pacjentów, spowodowane postępem choroby lub procesem powtarzalnej hemodializy. Górna (wspomniana wyżej) granica stężenia hemoglobiny została ustalona na podstawie metaanalizy badań z lat 1994-2007, które wykazały tendencję do występowania zdarzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów z PChN (dializowani i niedializowani), u których stężenie hemoglobiny było wyższe niż 13.0g/dl. Wydaje być się to ściśle związane z terapią czynnikami stymulującymi erytropoezę (ESA, z ang. *erythropoiesis stimulating agents*), gdyż podobne zjawisko zauważono w kontrolowanych próbach klinicznych u pacjentów z nowotworami (anemia wywołana chemioterapią).

Ważnym odkryciem, opisanym w 2010 roku, było odnalezienie receptora dla erytropoetyny (EpoR) na powierzchni limfocytów krwi obwodowej<sup>51</sup>. Badania te zwróciły uwagę na prawdopodobny bezpośredni wpływ Epo na komórki układu odpornościowego i tym samym rozszerzyły spektrum badań nad Epo poza leczenie anemii u pacjentów poddawanych terapii ESA.

## 5 Limfocyty B w ESRD.

Wiedza na temat limfocytów B u osób hemodializowanych z powodu ESRD jest niewielka. Najczęściej pojawiającymi się informacjami w publikacjach są te na temat proliferacji tych komórek oraz produkcji przeciwciał. Istnieją prace opisujące brak różnic (podobna siła proliferacji) między limfocytami B osób hemodializowanych i osób zdrowych oraz produkcję immunoglobulin na prawidłowym poziomie<sup>96,97</sup>. Z kolei autorzy innych publikacji mówią o zaburzonej proliferacji limfocytów B u osób chorych oraz obniżonej produkcji IgM, IgG i IgA<sup>97</sup>. Opisywana jest także limfopenia limfocytów B<sup>97</sup>. Dziwi fakt, że mimo braku szczegółowych badań dotyczących limfocytów B w PChN jako takiej, autorzy postulują bardzo popularną



umożliwia, m.in. różnicowanie komórki pamięci do plazmocytu<sup>60</sup> (Tab. 2). Zważywszy na to, że limfocyty B produkujące IL-10 są limfocytami B regulatorowymi (limfocyty B10<sup>61,62</sup>), prawdopodobnie produkcja IL-10 nie zachodzi przy pobudzeniu limfocytu B do produkcji przeciwciał. To być może tłumaczy brak reakcji limfocytów B na podanie samego anty-CD40. Mimo że IL-10 uznawana jest powszechnie za cytokinę przeciwzapalną (np. hamowanie produkcji IFN-gamma i IL-2), wywiera ona dokładnie przeciwny od wyciszającego efekt na limfocyty B. Jest on jednak, jak opisane, niejednorodny, gdyż wymaga jednoczesnego pobudzenia przez cząsteczkę CD40.

Ciekawostką jest, że obecność antygenu CD40 opisywana jest także w wielu schorzeniach. Odnajdywana jest w 70% guzów litych. Podobnie jak w limfocytach B, w komórkach nowotworowych CD40 broni je przed apoptozą współdziałając ze swoim ligandem CD40L, co dodatkowo stymuluje podziały złośliwych komórek, tworząc mikrośrodowisko nowotworzenia<sup>56</sup>. Interakcje CD40-CD40L zaangażowane są także w patofizjologię chorób autoimmunologicznych oraz wielu zapalnych chorób układu oddechowego (astma oskrzelowa, zespół ostrej stresowej niewydolności oddechowej, śródmiąższowe zapalenie płuc)<sup>56</sup>.

Sam receptor dla IL-10 jest dimerem składającym się z podjednostki 10R1 i 10R2, odnajdywanym na powierzchni limfocytów B, Th1, Th2, Treg (limfocyty T regulatorowe), komórek tucznych, makrofagów.

Kolejną ważną w biologii limfocytów B cytokiną jest IL-4. Udowodniono, że do stymulacji naiwnych limfocytów B wystarczy przeciwciało anty-CD40 i IL-4 (tylko występując wspólnie, podobnie jak w przypadku IL-10)<sup>63</sup>. IL-4 promuje zmianę klas przeciwciał do IgG1 i IgE<sup>64</sup>. Produkcja IL-4 stymulowana jest przez witaminę D3, której niedobór mają pacjenci z PChN poczynając już od stadium III. W tym stadium masa funkcjonujących kanalików proksymalnych w nerce, zawierających hydroksylazę CYP27B1, odpowiedzialną za przekształcenie 25-OH-D do 1,25-OH-D jest już za niska, aby podtrzymać produkcję witaminy D3 na poziomie zapotrzebowania organizmu<sup>25</sup>. Badania dowodzą także, że IL-4, IL-5 i IL-10 chronią limfocyty B przed apoptozą<sup>65,66</sup>. Produkcję poszczególnych typów interleukin przez komórki przedstawiono w tabeli 2. Poza kontekstem wpływu interleukin na np. limfocyty B, część komórek produkujących interleukiny pobudza także sama siebie. Dzieje się tak np. w przypadku komórek tucznych i produkowanej IL-4<sup>59</sup>. Co ciekawe, jak wspomniane wyżej, także limfocyt B produkuje IL-10 i posiada specyficzny dla tej cytokiny receptor.



	Komórki produkujące
IL-4	limfocyty Th2 limfocyty NK komórki tuczne bazofile
IL-5	limfocyty Th2 komórki tuczne eozynofile
IL-10	limfocyty Th2 regulatorowe limfocyty B monocyty makrofagi keratynocyty

**Tabela 2. Komórki produkujące dane typy interleukin<sup>59,64,67</sup>.**

Istnieją dwa typy heterodimerskiego receptora dla IL-4. Oba typy posiadają podjednostkę 4R $\alpha$ . Tym, co je różni jest podjednostka 4R $\gamma$ c (typ 1) lub 4R $\alpha$ 1 (typ 2)<sup>99</sup>. Poza limfocytami B, IL-4R występuje na powierzchni limfocytów z grupy Th2, komórek tucznych, bazofilów, i limfocytów T cytotoksycznych (CD8+)<sup>100</sup>.

Inną ważną interleukiną, która podobnie jak IL-4 jest w stanie wywołać dojrzewanie limfocytów B aktywowanych przez CD40, ich różnicowanie do plazmocytów<sup>68</sup> oraz zmianę klas przeciwciał na IgG1, jest IL-5<sup>64</sup>. IL-5 wzmacnia także spontaniczną apoptozę komórek białaczkowych w przewlekłej białaczce B-limfocytarnej, co hamowane jest przez działanie IL-4<sup>69</sup>. IL-4 reguluje 78 genów, których transkrypcja wzbudzana jest poprzez ścieżkę sygnalizacyjną z IL-5, podkreślając ścisłą współpracę tych dwóch cytokin. Stymulacja limfocytu B przez IL-4 i IL-5 wzbudza ekspresję 289 genów (dla IL-4) i 418 genów (dla IL-5)<sup>64</sup>-geny związane z dojrzewaniem limfocytu B oraz produkcją przeciwciał. Interleukiny te biorą udział także w wyciszaniu genów w limfocycie B a 97 wyciszanych genów jest wspólnych dla IL-4 i IL-5<sup>64</sup>.

Receptor dla IL-5 jest dimerem składającym się z podjednostki  $\alpha$  (5RA) oraz  $\beta$  ( $\beta$ c). Receptor ten znajduje się, na powierzchni limfocytów B, eozynofilów i bazofilów<sup>98</sup>.

Jak dotąd nie opisano nawet poziomów ekspresji receptorów dla: IL-4, IL-5R, IL-10R oraz cząsteczki CD40 w żadnym ze stadiów PChN.



## 7 BAFF i jego receptor.

BAFF czyli czynnik aktywujący limfocyty B (z ang. *B cell activating factor*) jest podstawowym czynnikiem, który poprzez wiązanie się ze swoim receptorem BAFF-R (inna najczęściej spotykana nazwa to BR3), aktywuje dojrzałe limfocyty B<sup>70,71</sup>. Produkowany jest przez: monocyty/makrofagi, komórki dendrytyczne (także te w centrach rozmnażania), aktywowane neutrofile<sup>72</sup> oraz limfocyty T<sup>73</sup>. Jest niezbędny do utrzymania homeostazy limfocytów B<sup>71</sup>. Jego inne nazwy to: TALL-1, THANK, BlyS, zTNF4<sup>70</sup>, TNFSF13<sup>71</sup>. Indukuje przełączanie klas przeciwciał i daje silny kostymulacyjny sygnał dla limfocytów T<sup>71</sup>. Udowodniono, że BAFF wspomaga odporność humoralną poprzez znaczące podniesienie poziomu przeciwciał, nawet kiedy podany jest 4 tygodnie po immunizacji<sup>71</sup>. Zwiększa także liczbę plazmocytów<sup>72</sup>. Sugeruje się więc potencjalne zastosowanie BAFF jako adiuwanta szczepionek<sup>71</sup>. Wpływa on także pozytywnie na przetrwanie limfocytów B i wzmacnia ich proliferację poprzez reakcje krzyżowe ze swoim receptorem BAFF-R i aktywację powiązaną z TLR<sup>71</sup> (TLR2, 7, 9)<sup>17,74,75</sup>. Brak zarówno BAFF i/lub jego receptora BAFF-R skutkuje brakiem rozwoju limfocytów B oraz niekompletną odpowiedzią na antygen<sup>71</sup>. BAFF odpowiada także za formowanie centrów rozmnażania w węzłach chłonnych i obwodowych tkankach limfatycznych<sup>72</sup>. Wzmacnia ekspresję Pax5/BSAP, czynnika transkrypcyjnego w limfocycie B oraz cząsteczki CD19<sup>72</sup>. Dodatkowo BAFF stymuluje syntezę CD40 a także fosforylację CD19 przez BCR<sup>72</sup>. Sprawia to, że CD40 staje się podatna na wiązanie z CD40L, co wpływa pozytywnie na aktywację limfocytu B. Limfocyty B bez BAFF nie są w stanie zwiększyć syntezy CD40<sup>72</sup>. Poza znaczącym wpływem na dojrzałe limfocyty B, sygnalizacja BAFF/BAFF-R ma, według niektórych, kluczowe znaczenie dla przetrwania niedojrzałych przejściowych limfocytów B (T1, z ang. *transitional type 1*; odnajdywane we krwi i śledzionie)<sup>72</sup>. Opisuje się także współpracę BAFF-R z BCR (receptor komórki B, z ang. *B cell receptor*), która jest określana jako BAFF-zależny potencjał przetrwania dla komórek B T2<sup>76</sup> (z ang. *transitional type 2*; odnajdywane wyłącznie w śledzionie). Należy jednak wspomnieć, że istnieją prace mówiące o braku wpływu BAFF na przetrwanie komórek T1<sup>77</sup>, z kolei inne wysuwają hipotezy, że przetrwiają te komórki T1, które stopniowo podniosą ekspresję BAFF-R i BCR<sup>76</sup>. Hipoteza ta wsparta jest faktem, że komórki T2 wykazują zwiększenie liczby m.in. cząsteczek BAFF-R na powierzchni w stosunku do młodszych komórek T1<sup>76</sup>. BAFF i jego receptor ze względu na wyżej opisane funkcje bierze udział w mechanizmie chorób autoimmunologicznych jak i nowotworów związanych z linią B-komórkową<sup>78</sup>. Opisuje się wysoki wzrost liczby komórek T1 u pacjentów z toczeniem układowym rumieniowatym (SLE)<sup>76</sup>. Także u transgenicznych myszy, które produkują podwyższone poziomy BAFF, w miarę starzenia się organizmu rozwija się SLE. W zespole Sjögrena monocyty produkują nadmiar BAFF, jednakże mechanizm autoimmunizacji związany nie jest z BAFF-R na limfocytach B (poziom normalny lub nawet obniżony) a z nadekspresją tego receptora w monocytach<sup>73,79</sup>.

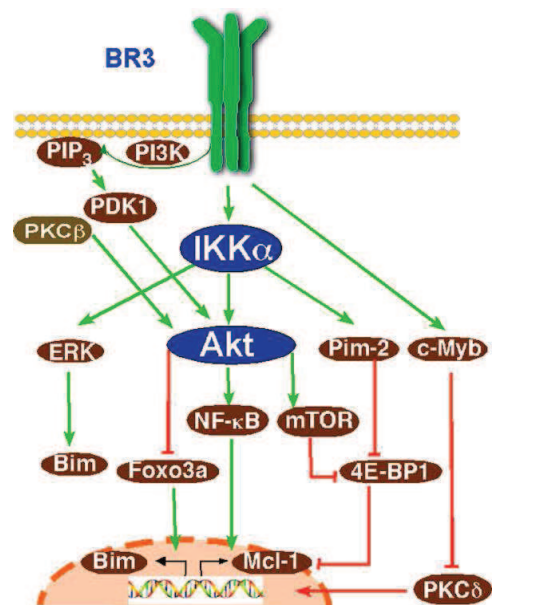
BAFF nie jest wiązany wyłącznie przez BAFF-R. Znane są jeszcze dwa dodatkowe jego receptory: BCMA (antygen dojrzewania limfocytów B; z ang. *B-cell maturation antigen*) oraz TACI (transbłonowy aktywator i białko reagujące z ligandem cytofiliny modulowanym wapniem [CAML]<sup>81,82</sup>; z ang. *transmembrane activator and CAML interactor*). BAFF-R i TACI występują we wszystkich subpopulacjach limfocytów B (najmniej na T1, najwięcej na T2 i na limfocytach strefy brzeżnej). TACI odnaleziony został również na limfocytach T<sup>82,83</sup>. BCMA opisywany jest jako receptor występujący głównie na plazmocytach<sup>81</sup>, jednakże inne prace mówią o braku przekonujących dowodów na obecność BCMA na limfocytach i wskazują, że głównym miejscem jego ekspresji jest aparat Golgiego<sup>82</sup>. BAFF-R, jako jedyny spośród receptorów wiążących BAFF, jest specyficzny wyłącznie dla BAFF. BCMA i TACI wiążą także inny czynnik z rodziny TNF - APRIL (ligand aktywujący proliferację; z ang. *a proliferation-inducing ligand*).

Sygnal z BAFF-R wpływa na wzrost oraz przetrwanie limfocyty B, promując jego przetrwanie jako sygnal antyapoptotyczny na wielu poziomach oraz poprzez mobilizację głównych ścieżek metabolicznych komórki. Opisane zostały 2 główne ścieżki antyapoptotyczne związane z BAFF/BAFF-R<sup>76</sup>:

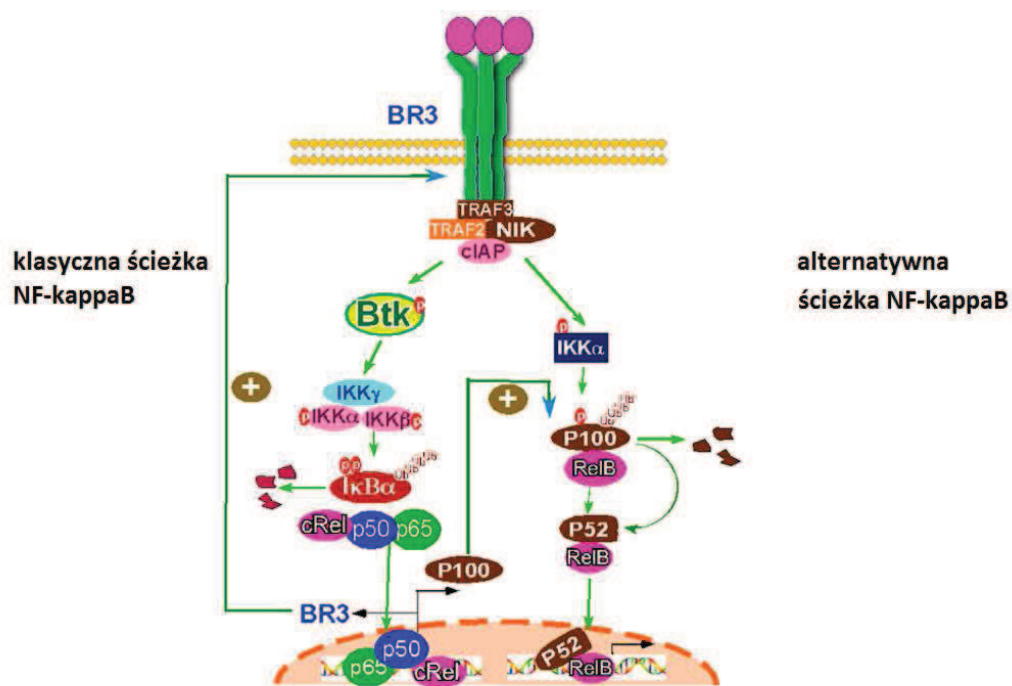
1. niezależna od NF-kappa B, włączająca kinazę mTOR pod kontrolą Akt (Rys. 1)
2. zależna od NF-kappa B (klasyczna i alternatywna) (Rysunek 2/Rys. 2)

Rysunek 1. Schemat sygnałów przetrwania z BAFF-R (BR3) w limfocycie B.

Związanie BAFF z jego receptorem na powierzchni komórki prowadzi do aktywacji kinazy fosfatydylo-3-inozytolu (PI3K)<sup>76</sup>. Kinazę tę aktywuje także Epo promując przetrwanie komórki<sup>84</sup>. W szlaku tym ulega następnie aktywacji podjednostka alfa kinazy inhibitora czynnika jądrowego kappa-B (IKK-alfa). Aktywacja najprawdopodobniej jest niezależna od ścieżki NF-kappa B<sup>76</sup>. IKK-alfa przekazuje sygnał białkowej kinazie B (PKB, lepiej znanej jako Akt), która promuje proliferację, przetrwanie oraz reguluje wiele ścieżek sygnałowych aby podtrzymać cykl komórkowy i oporność na apoptozę<sup>85</sup>. Co ciekawe sygnał z BAFF-R wykorzystuje ścieżkę poprzez kinazę mTOR zaangażowaną w regulację wzrostu, proliferacji oraz translacji i transkrypcji w komórce. Ścieżkę PI3K/Akt/mTOR bada się pod kątem działania przeciwnowotworowego<sup>85</sup>. Zobrazowana ścieżka prowadzi do indukcji antyapoptotycznego genu *mcl-1*. Ważnym elementem ścieżki z BAFF-R jest blokowanie wejścia białkowej kinazy C typu delta (PKC-delta) do jądra komórkowego. PKC-delta poprzez kaspazę 8 prowadzi bowiem do apoptozy komórki<sup>86</sup>.



Prawo autorskie dotyczące rysunku: Copyright 2009. The American Association of Immunologists, Inc.<sup>76</sup>



Rysunek 2. BAFF-R (BR3) jako jedyny z trzech znanych receptorów BAFF jest w stanie aktywować alternatywną ścieżkę NF-kappa-B (z wykorzystaniem IKK-alfa), która jest silniej aktywowana w limfocycie B niż ścieżka klasyczna poprzez kinazę tyrozynową Brutona (Btk)<sup>76</sup>. Obie ścieżki prowadzą do promowania przetrwania limfocytu B.

Prawo autorskie dotyczące rysunku: Copyright 2009. The American Association of Immunologists, Inc.<sup>76</sup>

Podsumowując, opisane wyżej receptory i związane z nimi ścieżki sygnalizacyjne są niezbędne dla prawidłowej aktywacji limfocytów B, prowadzącej do ich proliferacji i sekrecji immunoglobulin. Ponad 30 lat temu Lanzavecchia zaproponował, że homeostatyczne podtrzymanie proliferacji i czynności sekrecyjnej limfocytów B może następować także pod nieobecność swoistych antygenów, jednak dotychczasowa literatura nie dostarczyła przekonujących dowodów tego zjawiska, m.in. bazując na hodowlach limfocytów pochodzących ze śledziony oraz suplementacji tych hodowli egzogennymi cytokinami<sup>102</sup>. Nasze pilotowe badania wykazały, że faktycznie w hodowli ludzkich PBMC, w której jedynie limfocyty T są stymulowane przeciwciałem anti-CD3, można zaobserwować silną, poliklonalną proliferację limfocytów B i sekrecję przeciwciał. W związku z tym w niniejszych badaniach użyliśmy tego modelu homeostatycznej odpowiedzi limfocytów B.

## 8 Cel badań.

Z powodu słabo poznanej biologii limfocytów B w odniesieniu do schyłkowej niewydolności nerek i wysokiej zapadalności pacjentów na choroby infekcyjne, postanowiono ocenić rolę limfocytów B w tym stadium PChN, poprzez zbadanie siły ekspresji (MFI czyli średnia intensywność fluorescencji; z ang. *mean fluorescence intensity*) najważniejszych antygenów powierzchniowych tych komórek odpowiedzialnych za aktywację, proliferację, ochronę przed apoptozą oraz produkcję przeciwciał, ich parametrów proliferacyjnych w hodowli *in vitro* oraz produkcji przeciwciał, w porównaniu z parametrami limfocytów B osób zdrowych.

Ze względu na wcześniejsze prace naszego zespołu wskazujące na wpływ Epo na limfocyty T<sup>18</sup>, postanowiono do badań nad limfocytami B włączyć Epo, jako czynnik potencjalnie różnicujący reakcje komórek w hodowli *in vitro*.

## 9 Materiał i Metody badań.

### 9.1 Osoby badane.

Przebadano 36 osób, w tym 24 osoby chore ze schyłkową niewydolnością nerek i 12 osób zdrowych. Wszyscy chorzy byli w stadium V PChN (ESRD) i poddawani byli procesowi hemodializy 3 razy w tygodniu. użytymi podczas hemodializ były dializatory firmy NIPRO: niskoprzepływowo PES 150DL, 170DL, 210DL (membrana Diapes, wykonana z sulfonu polietylenowego; Polypore Inc., USA) oraz wysokoprzepływowo ELISIO 15H i 17H. W wyjątkowych sytuacjach klinicznych stosowany był dializator Evodial firmy Gambro z błoną dializacyjną wzbogaconą heparyną. Osoby chore zostały dodatkowo podzielone ze względu na przyjmowanie bądź nieprzyjmowanie preparatów erytropoetyny - chorzy przyjmujący Epo (12 osób; "CH Epo+") i chorzy nieprzyjmujący Epo (12 osób; "CH Epo-") - w obu grupach po 4 mężczyzn i 8 kobiet. W grupie zdrowych było 5 mężczyzn i 7 kobiet. Średnia wieku wszystkich chorych osób wyniosła  $58.3 \pm 14.67$  a średnia wieku zdrowych to  $56.4 \pm 18.09$ . U wszystkich badanych osób chorych i zdrowych wykonano badanie morfologiczne krwi oraz oznaczanie stężenia kreatyniny, które pozwoliło na wyliczenie filtracji kłębuszkowej a więc na ocenę funkcji filtracyjnej nerek.

Badania uzyskały zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

## 9.2 Uzyskiwanie PBMC.

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMCs, z ang. *peripheral blood mononuclear cells*) były izolowane z pełnej krwi żyłnej (30 ml) pobieranej u zdrowych ochotników na czczo, a u osób hemodializowanych tuż przed kolejnym zabiegiem (2 doby przerwy między dializami), w celu zminimalizowania wpływu procesu hemodializy i zastosowanej błony filtracyjnej hemodializatora na komórki. Izolacja PBMC odbywała się w gradiencie gęstości wytwarzanym przez płyn Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, USA) poprzez wirowanie przy 850 g przez 30 minut i serię płukań w PBS (z ang. *phosphate buffered saline*, czyli sól fizjologiczna buforowana fosforanem), po czym określano żywotność uzyskanych komórek testem wykluczania błękitu trypanu. Do dalszych testów używano PBMC o wyjściowej żywotności powyżej 95%. Tak uzyskane PBMC były przeliczone, zawieszono w PBS i poddawano dalszym testom.

Dodatkowo, od każdej osoby badanej pobrano, do probówki surowiczej, po 5 ml krwi, odwirowano (1900g przez 5 minut) surowicę, która zamrożono w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  w celu późniejszego oznaczenia poziomu IgM i IgG.

## 9.3 Stymulacja PBMC in vitro.

Na wcześniej opłaszczono przeciwciałem anti-CD3 (250 ng na dołek dla 1-2 miliona komórek) 24-dołkowe płytki hodowlane, dodawano PBMC w stężeniu nieprzekraczającym 2 mln komórek/ml pożywki (minimalne stężenie wynosiło 1 mln/ml), barwione przyżyciowo znacznikiem CFSE (ester dwuocianu sukcyminidu karboksylu fluoresceiny) zgodnie z wcześniej opracowaną procedurą<sup>16</sup>. Zastosowanie CFSE pozwala na przyżyciowe znakowanie komórek i śledzenie ich parametrów dynamicznych - np. liczby podziałów. Technika śledzenia dzielących się komórek to inaczej technika DCT (z ang. *Dividing Cell Tracking*)<sup>103</sup>. CFSE sprzężone z fluorochromem (w tym wypadku z FITC, czyli z izotiocyanianem fluoresceiny) wnika do komórki i przy podziale, do kolejnej generacji komórkowej, przekazywana jest dokładnie połowa ilości barwnika, czyli dokładnie połowa średniej geometrycznej fluorescencji populacji wyjściowej.

Do części dołków hodowlanych dodawano epoetynę alfa (genetycznie rekombinowana erytropoetyna) - Eprex (Janssen-Cilag, Australia) w stężeniu 0.1 U/ml (uznawane za fizjologiczne u dorosłego człowieka<sup>87</sup>) lub 50 U/ml (dużo wyższe od fizjologicznego i zastosowane we wcześniejszych badaniach naszego zespołu<sup>101</sup>). Komórki hodowano przez 120 godzin (5 dni) w standardowych warunkach

(37°C, 5% CO<sub>2</sub>) w pożywce RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA) z dodatkiem 10% inaktywowanej bydlęcej surowicy płodowej, L-glutaminy (stężenie końcowe 4mM), streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml) a antygeny (wymienione poniżej) na ich powierzchni oceniano ex vivo (tuż po pobraniu krwi), po 72 i 120 godzinie. Receptor dla Epo badany był ex vivo, po 24, 48, 72 i 120 godzinie (komórki hodowane były w tym przypadku w środowisku bez Epo) - schemat oparty na badaniach wcześniejszych<sup>51</sup>. Kontrolą były komórki niestymulowane przeciwciałem anti-CD3 (również barwione CFSE) poddawane takim samym barwieniom jak komórki stymulowane. Ocena obecności antygenów odbywała się za pomocą barwienia przeciwciałami monoklonalnymi sprzężonymi z fluorochromami (lista poniżej) a fluorescencję znakowanych komórek odczytywano za pomocą cytometru FACS Scan i oprogramowania CellQuest (Becton-Dickinson, USA). Każdorazowo starano się zbierać wyniki z co najmniej 50000 komórek jednojądrzastych identyfikowanych za pomocą parametrów wąskokątnego (FSC) i szerokokątnego (SSC) rozproszenia światła.

Przeciwciała użyte do oceny fenotypu powierzchni badanych komórek:

- Anty- CD19-PE-Cy5 (BD Pharmingen, USA) - do określenia populacji limfocytów B
- Anty- BAFF-R-PE (BD Pharmingen, USA)
- Anty- CD40-PE (BD Pharmingen, USA)
- Anty- IL-4R-PE (BD Pharmingen, USA)- skierowane przeciwko łańcuchowi alfa
- Anty- IL-5R-PE (BD Pharmingen, USA)- skierowane przeciwko łańcuchowi alfa
- Anty- IL-10R- PE (BD Pharmingen, USA)
- Anty- EpoR-PE (R&D Systems, USA)
- IgG2b-PE (R&D Systems, USA), kontrola izotypowa
- Aneksyna V- PE (BD Pharmingen, USA)

Odsetek badanych limfocytów B, które uległy apoptozie w trakcie uzyskiwania ex vivo lub po hodowli, badano oceniając cytometrycznie wiązanie sprzężonej z fikoerytryną aneksyny V z powierzchnią komórek CD19+ (limfocyty B).

Parametry proliferacyjne limfocytów B takie jak: liczba podziałów przypadająca na 1 komórkę dzielącą się, procent komórek proliferujących, czas przejścia limfocytów B z fazy G<sub>0</sub>--> G<sub>1</sub>, a także długość cyklu komórkowego limfocyty B obliczano za pomocą programu Progeny™ autorstwa Jacka Macieja Witkowskiego i Krzysztofa Pietruczuka, na podstawie metody opublikowanej wcześniej<sup>88</sup>.

## 9.4 Ocena stężeń przeciwciał.

W celu oceny stężeń wyprodukowanych przeciwciał IgM oraz IgG pobierano: surowicę, zebraną tuż po pobraniu krwi (godzina 0; ex vivo); supernatant po 72 i 120 godzinie hodowli stymulowanej anty-CD3 (zawiesinę z dołka hodowlanego odwirowywano przy 470g przez 5 minut). Do oceny stężeń przeciwciał posłużył zestaw Easy-Titer Antibody Assay Kit (Thermo Scientific, USA). użytymi standardami do tych testów były: pełna cząsteczka ludzkiej IgM (Thermo Scientific, USA) oraz pełna cząsteczka ludzkiej IgG (Thermo Scientific, USA). Odczyt odbywał się za pomocą spektrofotometru Epoch (Biotek, USA).

## 9.5 Analiza statystyczna.

Analizę statystyczną wykonano w programie Statistica wersja 10 (StatSoft, Polska). Zastosowane testy były testami nieparametrycznymi (opisane pod wykresami), ponieważ wyniki nie pochodziły z populacji cechującej się rozkładem normalnym, co sprawdzono testem Shapiro-Wilka.



## 10 Wyniki.

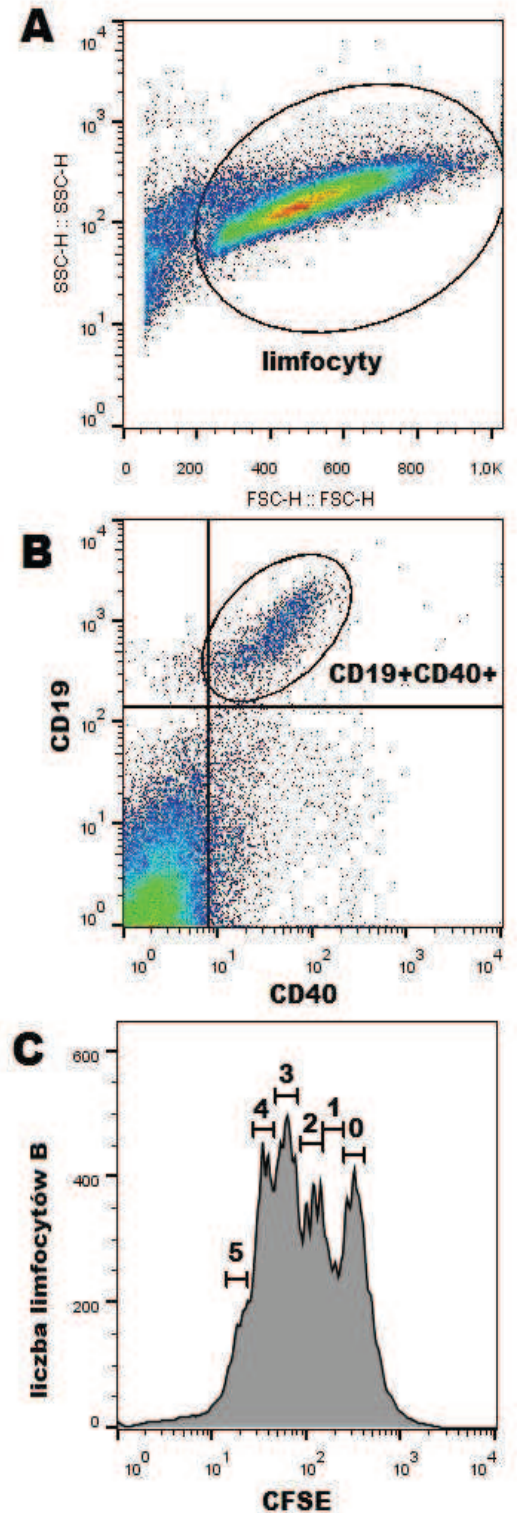
### 10.1 Odpowiedź proliferacyjna i sekrecyjna limfocytów B.

#### 10.1.1 Kinetyka proliferacji limfocytów B w hodowli in vitro.

W pracy zaobserwowano, że limfocyty B obecne w próbkach PBMC stymulowanych anty-CD3 przez 72 lub 120 godzin odpowiadają proliferacją pomimo braku swoistej (antygenowej) stymulacji tych komórek (Rys. 1).

Rys. 1 Poprzez zaznaczenie populacji limfocytów (A), następane wyodrębnienie z nich komórek CD19+/CD40+ (B), uzyskano histogram (C) pokazujący aktywację limfocytów B zdrowej kontroli w hodowli symulowanej anty-CD3. Cyframi oznaczono kolejne pokolenia komórek. Rysunek wykonany w programie FlowJo wersja 10 (TreeStar, USA).

Poniżej przedstawiono porównanie dynamicznych parametrów proliferacji limfocytów B z badanych grup pacjentów, ocenianych techniką DCT.

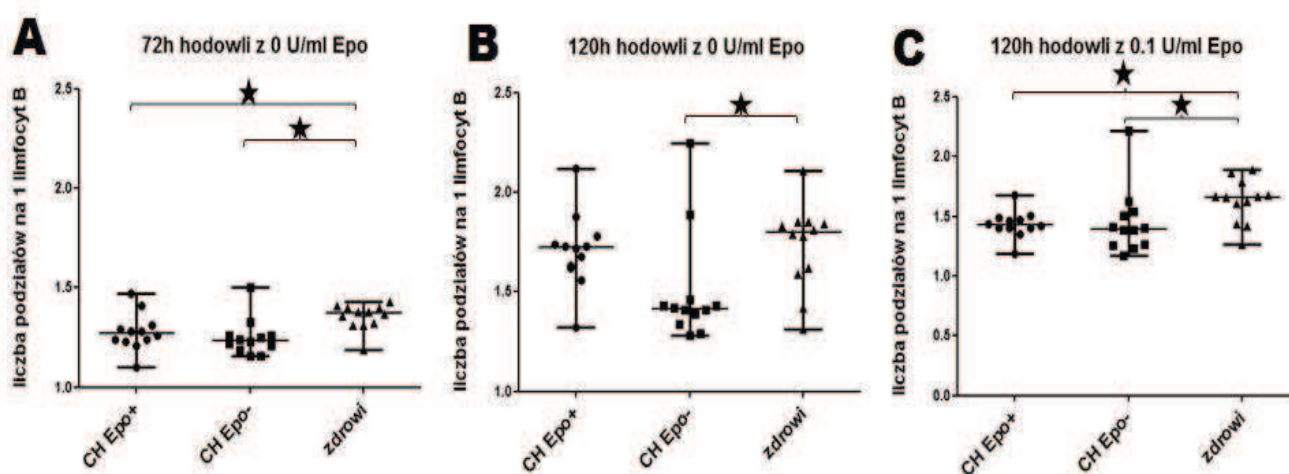




### 10.1.2 Liczba podziałów limfocytów B.

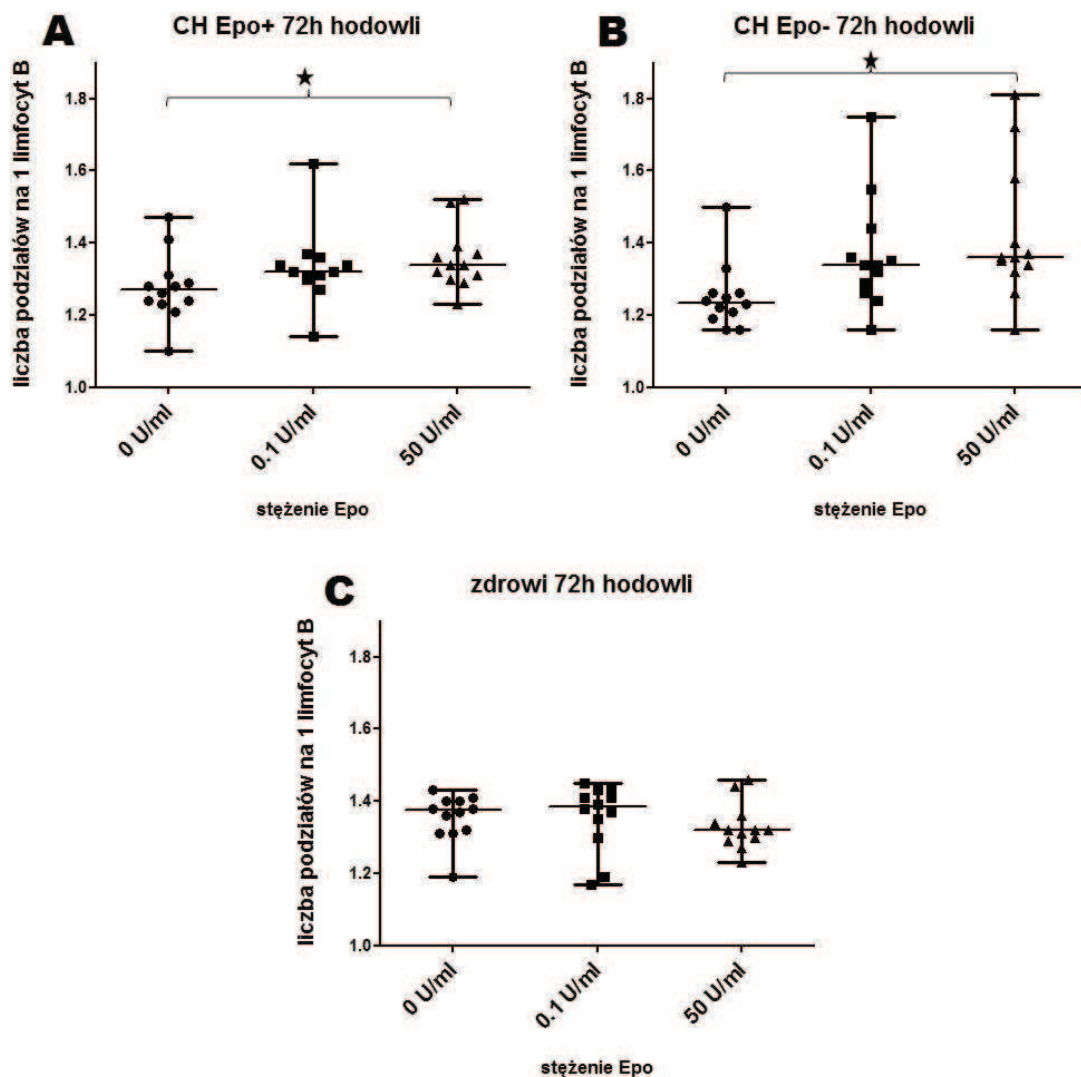
Średnia liczba podziałów przypadająca na 1 dzielący się limfocyt B u osób zdrowych po 72 godzinach hodowli wyniosła  $1.35 \pm 0.08$ . U osób chorych z ESRD liczba ta była istotnie niższa, niezależnie od tego czy otrzymywali Epo czy też nie (CH Epo+  $1.27 \pm 0.13$ , CH Epo-  $1.28 \pm 0.12$ ) (Rys. 2 A). Działo się tak jedynie w środowisku bez Epo. W środowisku z 0.1 U/ml i 50 U/ml po 72 godzinach hodowli, wszystkie grupy badane cechowała zbliżona liczba podziałów przypadająca na 1 limfocyt B (średnio  $1.33 \pm 0.11$  we wszystkich grupach). Po 120 godzinach hodowli liczba podziałów limfocytów B osób chorych przyjmujących Epo nie różniła się istotnie od liczby podziałów limfocytów osób zdrowych, natomiast pozostawała istotnie niższa w przypadku chorych nieleczonych Epo (Rys. 2 B).

W obecności 0.1 U/ml egzogennej Epo, liczba podziałów limfocytów B nie zmieniała się istotnie po 120 godzinach hodowli w żadnej z trzech badanych grup. Liczba podziałów limfocytów B osób chorych nieprzyjmujących Epo była nadal znacząco niższa niż u osób zdrowych (por. Rys. 2 B i Rys. 2 C).



Rysunek 2. Różnice w liczbie podziałów przypadającej na 1 limfocyt B w hodowli stymulowanej anty-CD3, między grupami badanymi: chorzy przyjmujący Epo (CH Epo+), chorzy nieprzyjmujący Epo (CH Epo-), zdrowi. Test post-hoc Dunna dla ANOVA Kruskala-Wallisa (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ). Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

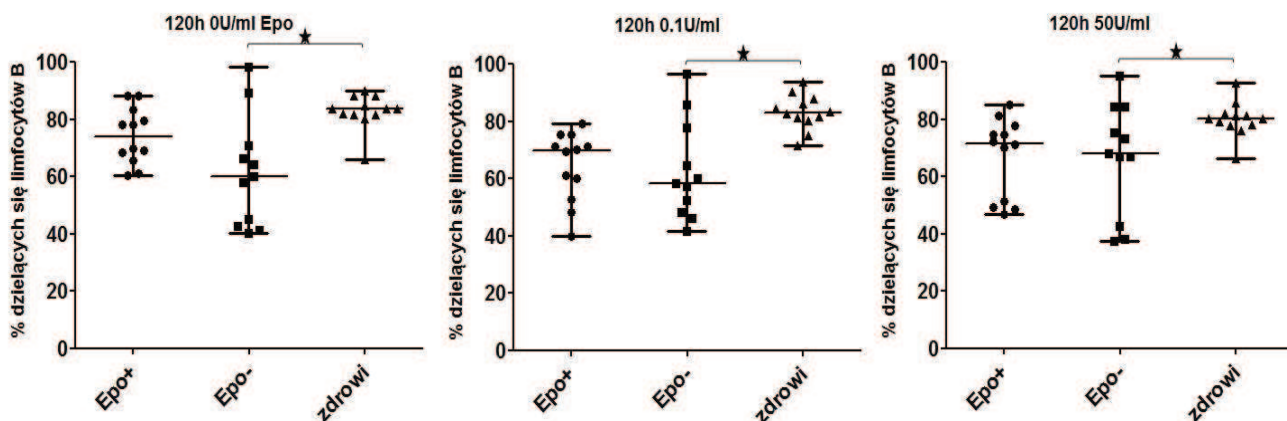
Inkubacja stymulowanych PBMC w obecności wysokiego (50 U/ml) stężenia Epo znacząco podnosiła liczbę podziałów komórek B osób chorych (nieleczonych jak też leczonych Epo) już po 72 godzinach hodowli (Rys. 3 A, B). Nie miała jednak wpływu na liczbę podziałów limfocytów B osób zdrowych (Rys. 3 C).



Rysunek 3. Wpływ Epo in vitro na liczbę podziałów przypadającą na 1 limfocyt B w grupie chorych przyjmujących Epo (A), chorych nieprzyjmujących Epo (B) i osób zdrowych (C). Test post-hoc Dunna dla ANOVA Friedmana (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ). Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

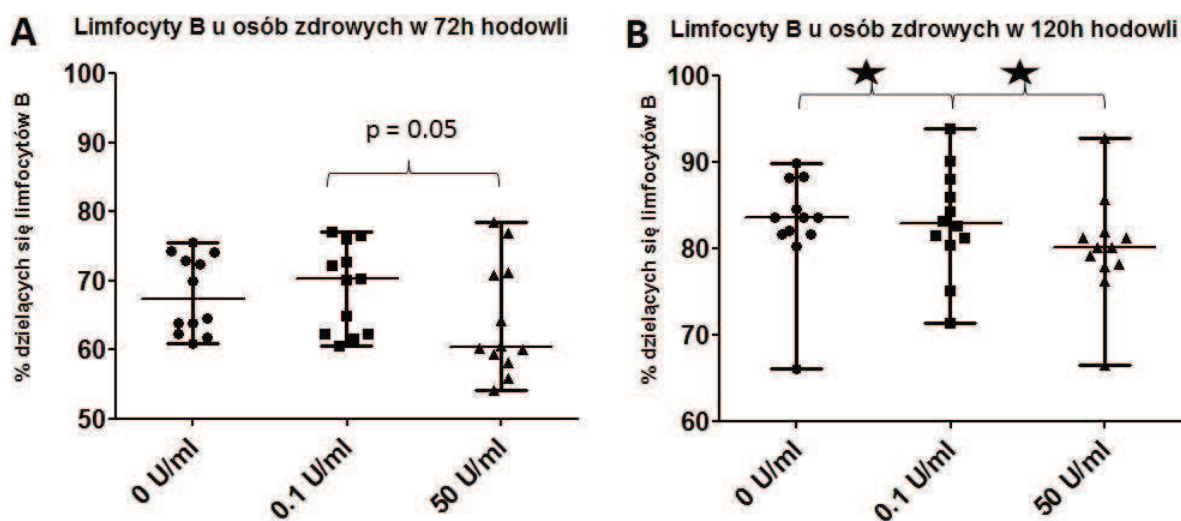
### 10.1.3 Procent proliferujących limfocytów B.

Kolejnym zbadanym dynamicznym parametrem proliferacji limfocytów B w warunkach stymulacji PBMC in vitro był odsetek limfocytów B, które podzieliły się co najmniej 1 raz, w całej próbce komórek B. Proporcja ta była istotnie niższa (około 50%) u chorych nieleczonych Epo niż u osób zdrowych (około 70%) po 72 godzinach hodowli bez Epo w środowisku (niepokazane). Po 120 godzinach hodowli procent proliferujących limfocytów B osób chorych przyjmujących Epo nie różnił się od tego u osób zdrowych. Znamienne niższy procent proliferujących komórek B odnajdywany był u osób z ESRD nieprzyjmujących Epo, zarówno po hodowli bez erytropoetyny, jak i w obecności 0.1 lub 50 U/ml Epo (Rys. 4 A, B, C).



Rysunek 4. Procent dzielących się limfocytów B w hodowli in vitro stymulowanej anty-CD3, po 120 godzinach z użyciem trzech stężeń Epo: A) 0 U/ml,  $p=0.007$ , B) 0.1 U/ml,  $p=0.0007$  C) 50 U/ml,  $p=0.03$ . Test post-hoc Dunn'a dla ANOVA Kruskala-Wallis'a. "Epo+" - pacjenci przyjmujący Epo, "Epo-" - pacjenci nieprzyjmujący Epo. Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

Wpływ Epo podanej w hodowli in vitro na proliferację limfocytów B odnajdywany jest wyłącznie u osób zdrowych. Epo dodana do hodowli powodowała u nich po 120 godzinach istotne zmiany odsetka proliferujących limfocytów B. Co ciekawe, inkubacja z 50 U/ml Epo powodowała istotne zmniejszenie odsetka dzielących się komórek B w porównaniu do efektu tego hormonu w stężeniu 0.1 U/ml (Rys. 5 A, B). Nie zaobserwowano takiego efektu dla komórek B pochodzących od chorych (niepokazane).

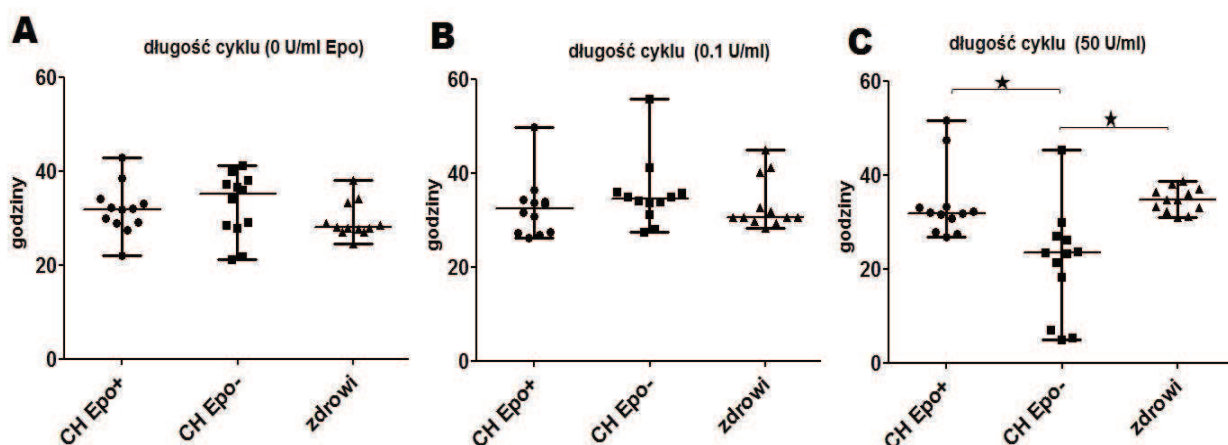


Rysunek 5. Wpływ Epo na proliferację limfocytów B osób zdrowych, w hodowli in vitro stymulowanej anty-CD3. A) po 72 godzinie hodowli, B) po 120 godzinie hodowli,  $p=0.02$ , test post-hoc Dunn'a dla ANOVA Friedmana. Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

#### 10.1.4 Długość cyklu komórkowego limfocytów B i ich czas przejścia z fazy G0 -> G1.

Istotnymi parametrami dynamiki cyklu komórkowego limfocytów, decydującymi o wydajnej produkcji komórek efektorowych w odpowiednim czasie, są długość cyklu i czas przejścia ze spoczynkowej fazy G0 do fazy G1 pierwszego cyklu (czas G0→G1).

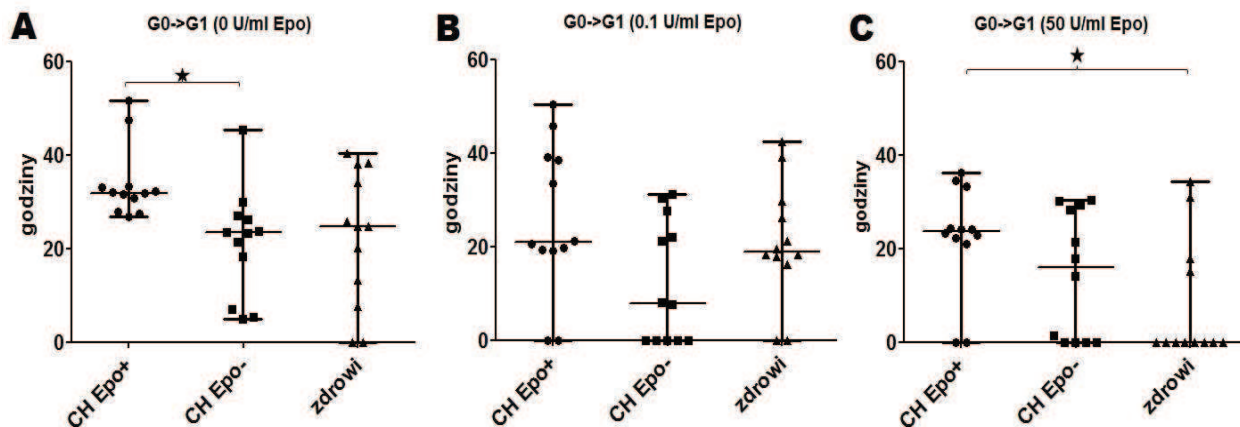
Długość cyklu komórkowego różniła się między badanymi grupami jedynie w środowisku z 50 U/ml Epo, w którym limfocyty B chorych nieprzyjmujących Epo miały znacząco najkrótszy cykl (Rys. 6 C). Takich różnic nie odnotowano przy braku Epo oraz w obecności 0.1 U/ml tego hormonu (Rys. 6 A, B).



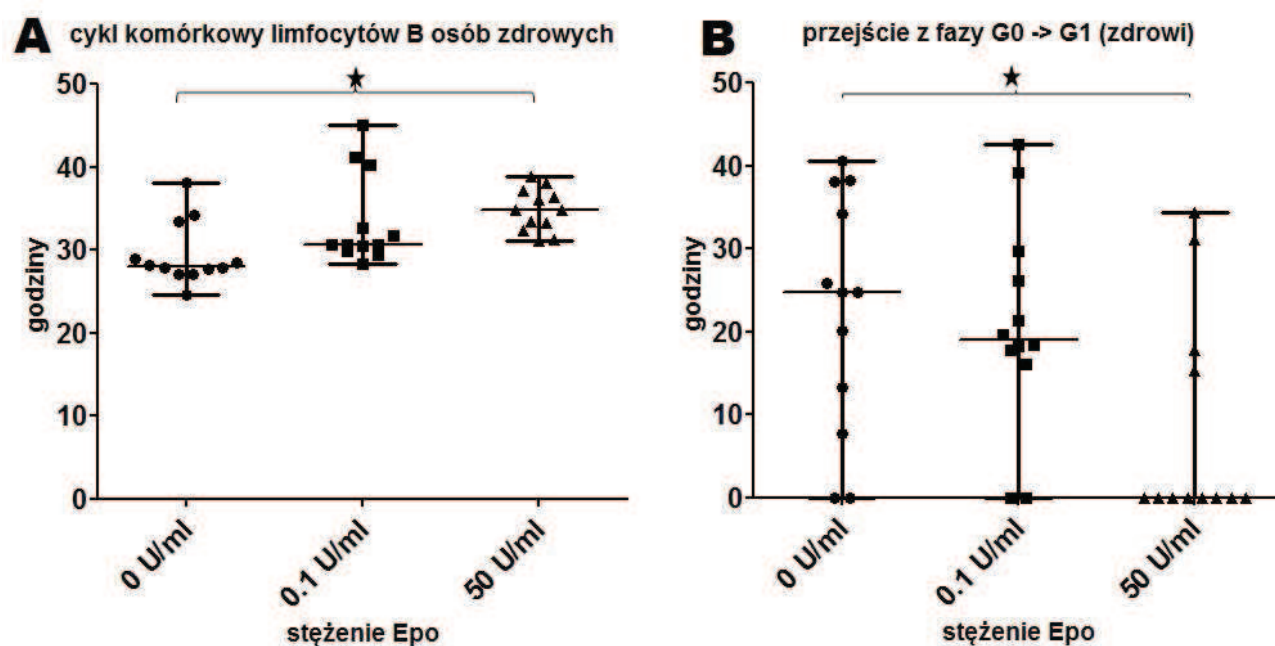
Rysunek 6. Długość cyklu komórkowego limfocytów B w hodowli stymulowanej anty-CD3. Gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ . Test post-hoc Dunna dla ANOVA Kruskala-Wallis. "CH Epo+" - chorzy przyjmujący Epo, "CH Epo-", chorzy nieprzyjmujący Epo. Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

Czas przejścia limfocytów B z fazy spoczynkowej G0 do G1 różni się istotnie w porównywanych grupach (Rys. 7). Chorzy nieprzyjmujący Epo mają znacząco krótszy czas przejścia limfocytów B do fazy G1 od chorych przyjmujących Epo w hodowli bez dodatku Epo (Rys. 7 A). Zauważalne jest także bardzo silne skrócenie czasu przejścia limfocytów B do fazy G1 u zdrowych przy 50 U/ml Epo (Rys 7 C). Warto podkreślić, że w obecności Epo (zwłaszcza w stężeniu 50 U/ml), także u części osób chorych doszło do maksymalnej redukcji czasu przejścia limfocytów B z G0→G1 (Rys. 7 B, C).

Jedynie u osób zdrowych zaobserwowano zależne od dawki Epo, istotne statystycznie wydłużenie cyklu komórkowego i skrócenie fazy przejścia G0→G1 (Rys. 8).



Rysunek 7. Czas przejścia limfocytów B z fazy G0 do G1 w hodowli in vitro stymulowanej anty-CD3 z: 0 U/ml (A), 0.1 U/ml (B), 50 U/ml (C) Epo. "CH Epo+" - chorzy przyjmujący Epo, "CH Epo-", chorzy nieprzyjmujący Epo. Test post-hoc Dunna dla ANOVA Kruskala-Wallis (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ). Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

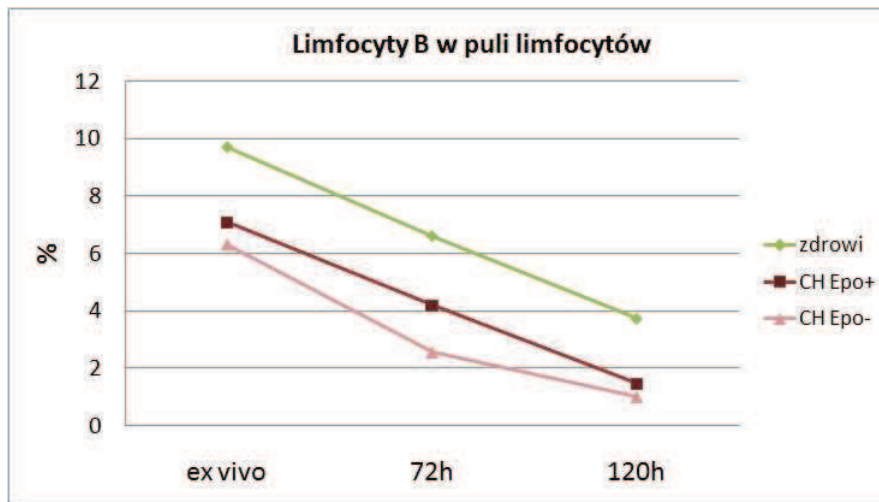


Rysunek 8. Długość cyklu komórkowego limfocytów B osób zdrowych (A) oraz czas przejścia limfocytów B z fazy G0 do G1 osób zdrowych (B) w zależności od stężenia Epo w hodowli in vitro. Test post-hoc Dunna dla ANOVA Friedmana (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ). Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.



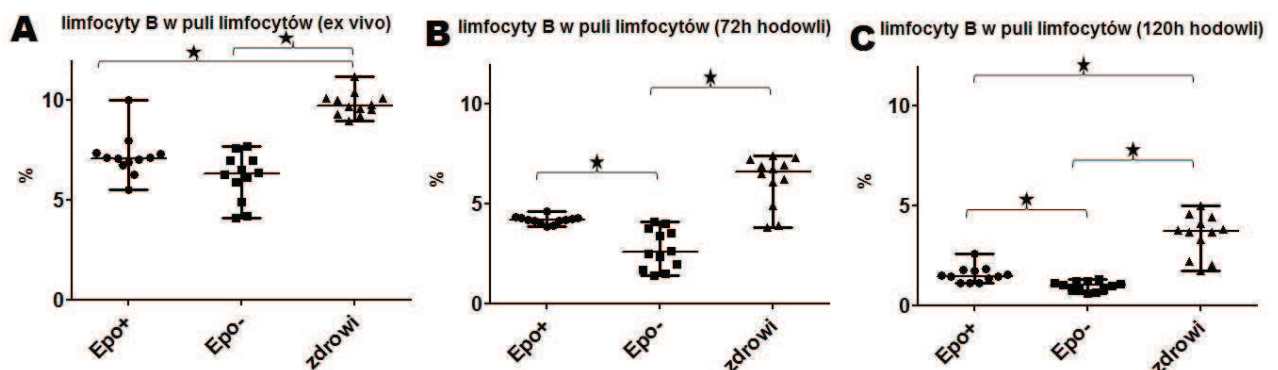
## 10.2 Liczebność i apoptoza limfocytów B w hodowlach PBMC.

W toku hodowli stymulowanej przez anty-CD3 odsetek limfocytów B spada we wszystkich badanych grupach (Rys. 9).



Rysunek 9. Limfocyty B w puli limfocytów w czasie hodowli komórkowej. Przedstawione wartości są medianami dla każdej z badanych grup. Różnice wraz z zakresami wartości opisują wykresy na rysunku 10.

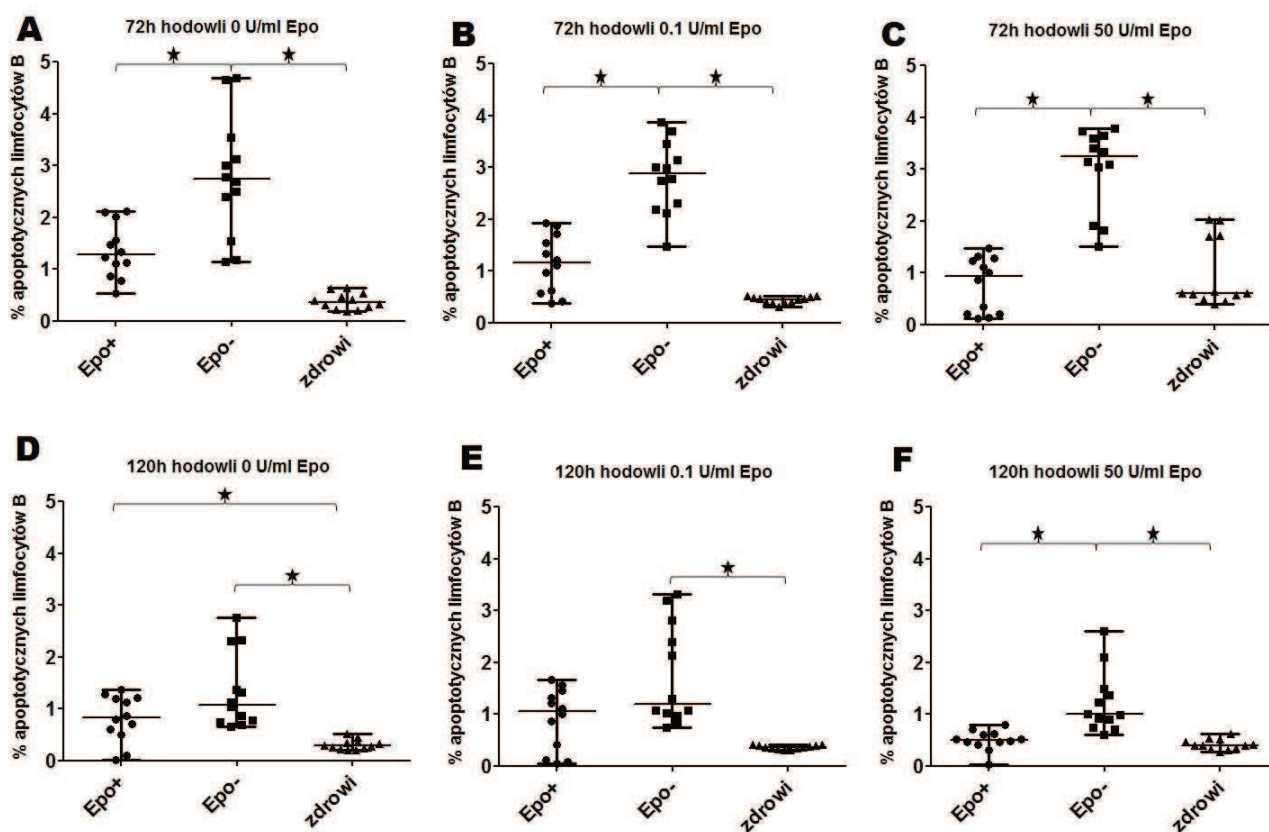
Limfocyty B stanowią u przebadanych zdrowych osób średnio 10% limfocytów krwi obwodowej ex vivo. U chorych hemodializowanych ten odsetek jest istotnie obniżony (Rys. 10). Najniższy odsetek limfocytów B odnajdywany jest u pacjentów nieprzyjmujących Epo, nie tylko ex vivo, ale także w trakcie stymulowanej anty-CD3 hodowli, po 72 i 120 godzinie (Rys. 10).



Rysunek 10. Odsetki limfocytów B w puli limfocytów krwi obwodowej badanych grup; ex vivo (A), po 72 godzinach (B) i po 120 godzinach hodowli (C). Test post-hoc Dunna dla ANOVA Kruskala-Wallis. Gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ . "Epo+" - chorzy przyjmujący Epo, "Epo-" - chorzy nieprzyjmujący Epo. Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

Wykazane powyżej zmniejszenie proporcji limfocytów B wśród PBMC, zarówno ex vivo w przypadku chorych z ESRD w porównaniu do zdrowych, jak też we wszystkich grupach po hodowli, może być skutkiem szybszego wzrostu liczby proliferujących limfocytów T, ale także nasilenia apoptozy limfocytów B. W związku z tym poniżej przedstawione są wyniki oceny apoptozy limfocytów B.

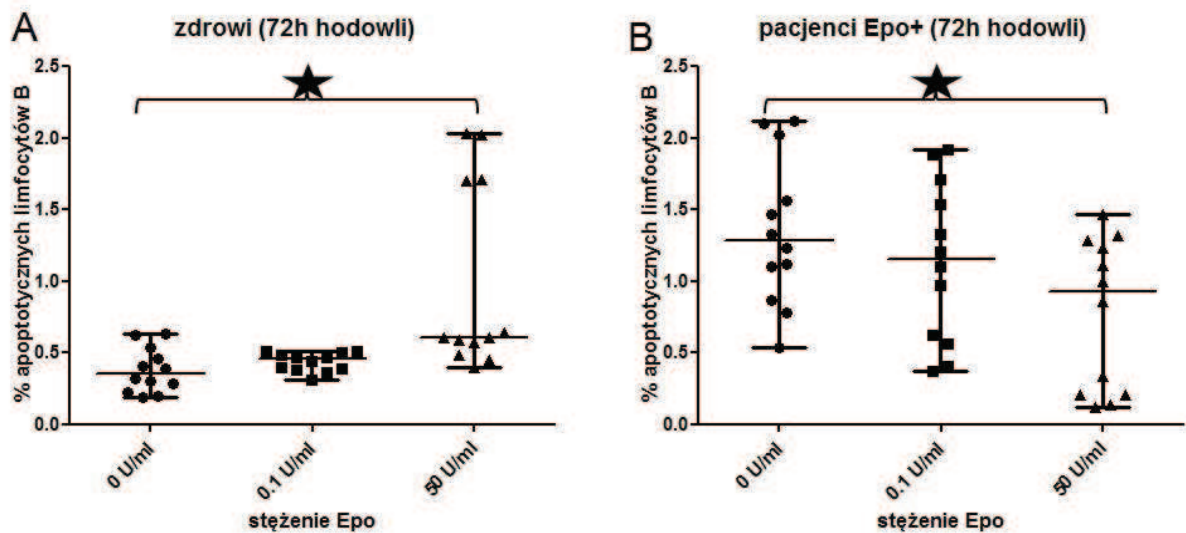
Zarówno w 72 jak i 120 godzinie hodowli, zmiernie najwyższym procentem apoptotycznych limfocytów B charakteryzowali się pacjenci nieprzyjmujący Epo, niezależnie od tego, czy hodowla prowadzona była bez czy w obecności Epo (Rys. 11).



Rysunek 11. Odsetek apoptotycznych limfocytów B w puli limfocytów B po 72 godzinach (A, B, C) i 120 godzinach (D, E, F) hodowli stymulowanej anty-CD3, przy: braku dodatku Epo (A, D), 0.1 U/ml Epo (B, E), 50 U/ml Epo (C, F). Test ANOVA Kruskala-Wallis i test post-hoc Dunna. Gwiazdka (różnica statystyczna), gdy  $p < 0.05$ . "Epo+" - pacjenci przyjmujący Epo, "Epo-" - pacjenci nieprzyjmujący Epo. Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

Odsetek apoptotycznych komórek B w materiale od osób leczonych Epo był także znamienne niższy niż w materiale od osób chorych nieprzyjmujących Epo (Rys. 11 A, B, C, F). Jedynym środowiskiem, w którym procent apoptozy limfocytów B osób z ESRD przyjmujących Epo był znacząco wyższy od tego odnajdywanego u osób zdrowych było środowisko bez Epo po 120 godzinie hodowli in vitro (Rys. 11 D).

Wysokie stężenie Epo (50 U/ml) znacząco podwyższało odsetek apoptotycznych limfocytów B w ogólnej puli limfocytów B osób zdrowych w 72-godzinnej hodowli. W grupie chorych przyjmujących Epo efekt ten jest przeciwny - im wyższe stężenie Epo w hodowli, tym odsetek apoptotycznych limfocytów B był niższy (Rys. 12). Wpływ Epo utrzymywał się po 120 godzinie hodowli jedynie w grupie zdrowych osób (niepokazane). Epo in vitro nie wpływało na procent apoptozy w populacji komórek B osób z ESRD nieprzyjmujących Epo.



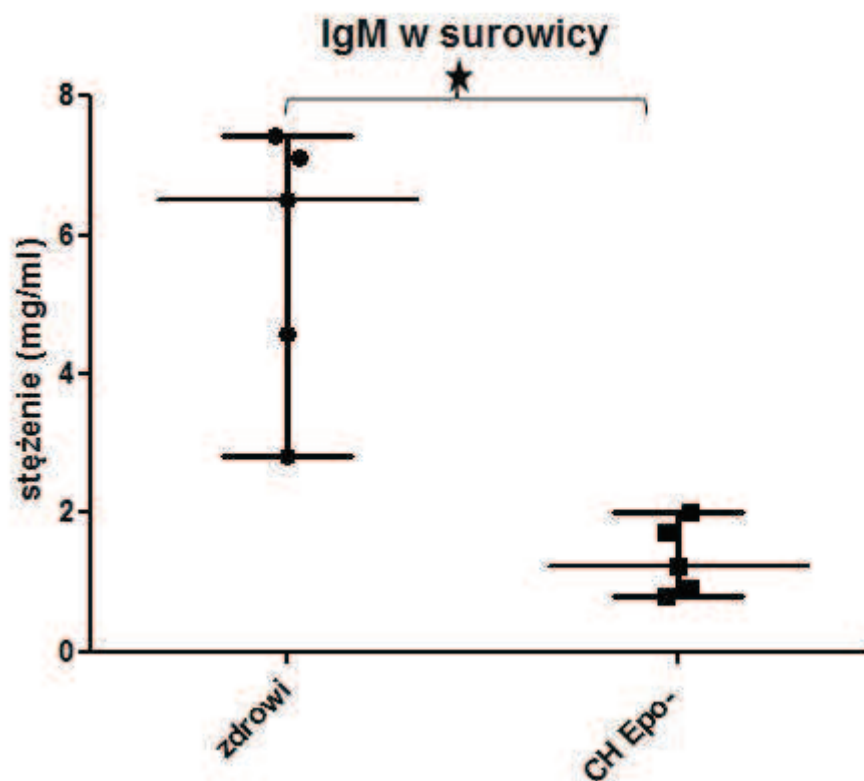
Rysunek 12. Wpływ Epo na apoptozę limfocytów B po 72 godzinach hodowli in vitro ze stymulacją anty-CD3. A) osoby zdrowe, B) pacjenci przyjmujący Epo. Test ANOVA Friedmana i test post-hoc Dunna. Gwiazdka (różnica statystyczna), gdy  $p < 0.05$ . Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.



## 10.3 Porównanie wielkości produkcji immunoglobulin IgM i IgG.

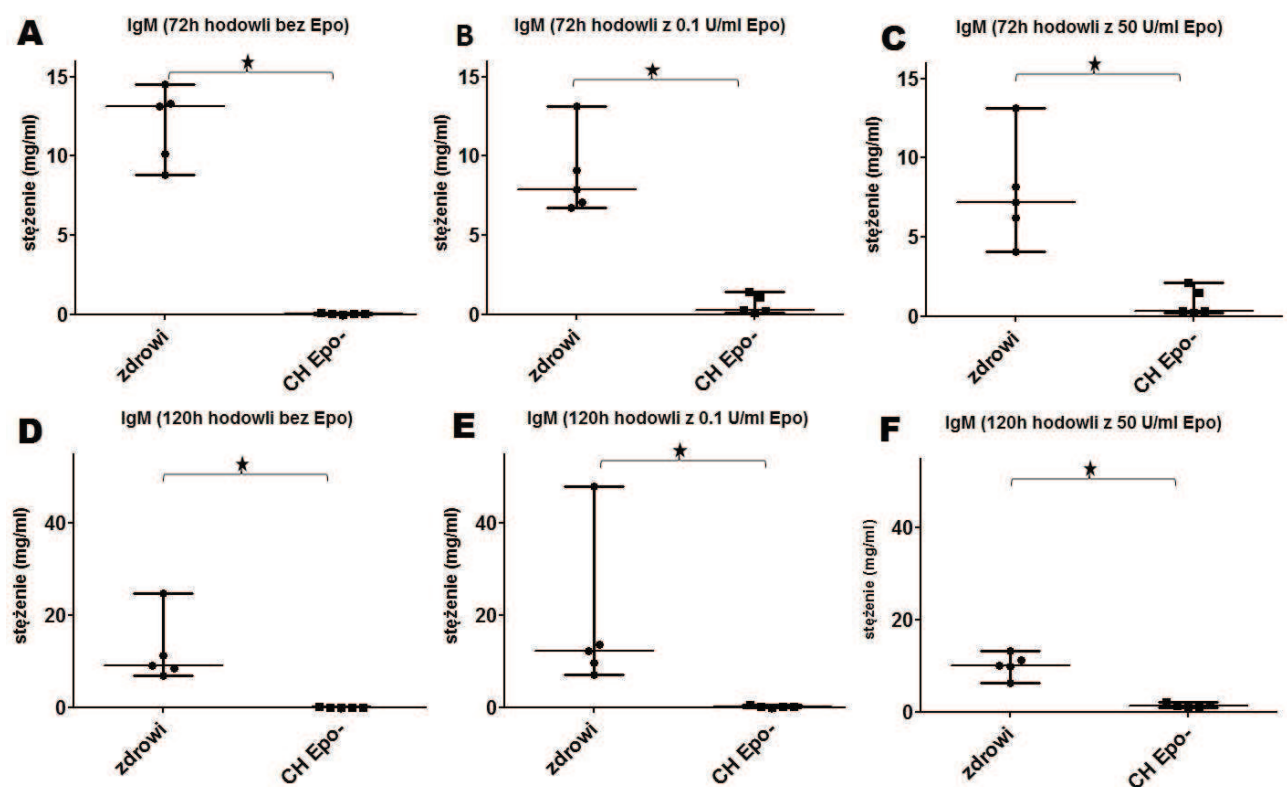
### 10.3.1 Stężenie przeciwciał IgM w surowicy oraz w supernatantach po hodowli in vitro.

Przeciwciała IgM, charakteryzujące wczesną fazę odpowiedzi humoralnej, wykrywane były w znamienne wyższym stężeniu w surowicy osób zdrowych niż u chorych (Rys. 13). W warunkach hodowli PBMC stymulowanych in vitro przeciwciałem anti-CD3, limfocyty B nie tylko, jak pokazano wyżej, ulegały kolejnym podziałom, ale produkowały IgM. Także w warunkach in vitro, znamienne wyższe stężenia IgM odnajdywane były w supernatantach hodowli komórek osób zdrowych po 72 jak i 120 godzinie (Rys. 14).



Rysunek 13. Stężenie IgM w surowicy krwi obwodowej u osób zdrowych i chorych nieprzyjmujących Epo. Test U Manna-Whitneya (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ). Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

Istotną obserwacją wydaje się stwierdzenie, że inkubacja z Epo in vitro podnosi produkcję IgM u osób chorych nieprzyjmujących Epo (Rys. 15 A). Takiego wpływu in vitro nie zaobserwowano u osób zdrowych (Rys. 15 B). Wpływ ten jest znaczący, jednak miana osiągnęte przez pacjentów nieprzyjmujących Epo są dalekie od tych, uzyskiwanych u osób zdrowych. Najwyższe miano IgM pacjenci uzyskali przy 50 U/ml Epo w hodowli a jego mediana wyniosła 1.25 mg/ml, podczas gdy mediana dla osób zdrowych wyniosła 15 mg/ml (Rys. 15 A, B).

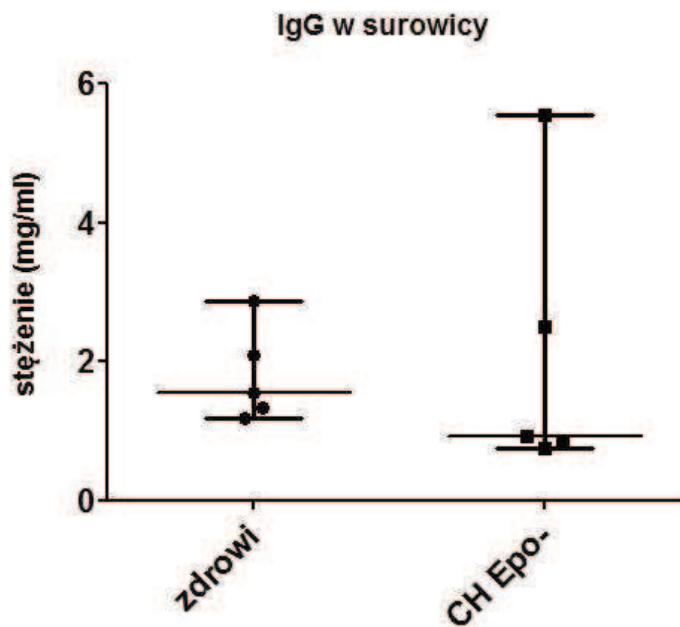


Rysunek 14. Stężenie przeciwciała IgM w supernatantach po 72 godzinie (A, B, C) oraz po 120 godzinie (D, E, F) hodowli stymulowanej anty-CD3, u osób zdrowych i chorych nieprzyjmujących Epo (CH Epo-) przy: braku dodatku Epo (A, D), 0.1 U/ml Epo (B, E), 50 U/ml Epo (C, F). Test U Manna-Whitneya (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ). Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

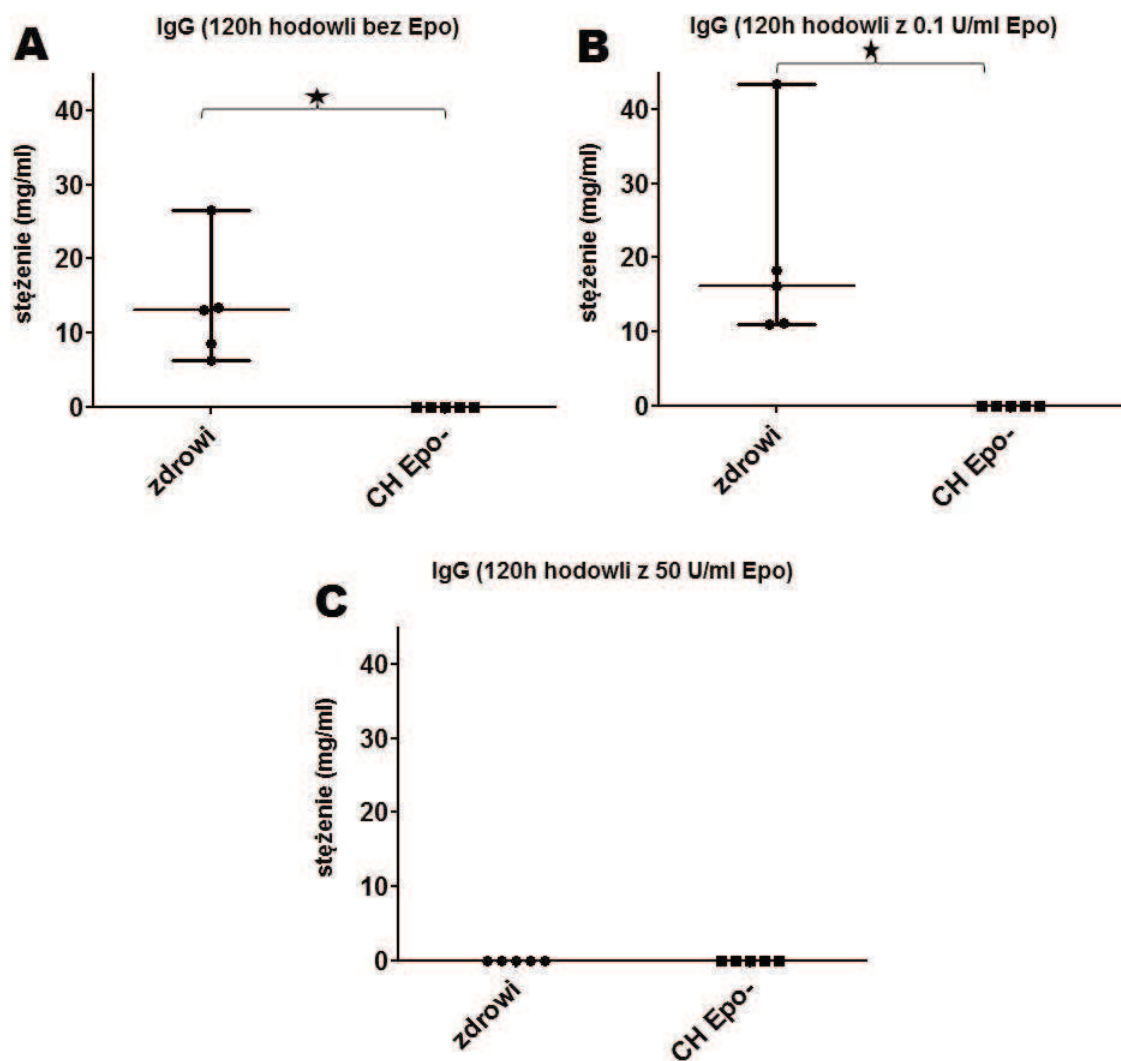


### 10.3.2 Stężenie przeciwciał IgG w surowicy oraz w supernatantach po hodowli in vitro.

Stężenia IgG w surowicach osób z obu porównywanych grup nie różniły się znacząco (Rys. 16). Po 72 godzinach hodowli nie wykryto stężeń IgG w supernatantach osób z żadnej grupy (niepokazane). Natomiast po 120 godzinach hodowli przeciwciała IgG wykryto jedynie u osób zdrowych (Rys. 17 A, B), z wyłączeniem środowiska z 50 U/ml Epo, w którym to nie wykryto przeciwciał klasy IgG (Rys. 17 C).



Rysunek 16. Stężenie IgG w surowicy krwi obwodowej u osób zdrowych i chorych nieprzyjmujących Epo (CH Epo-). Test U Manna-Whitneya (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ). Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.



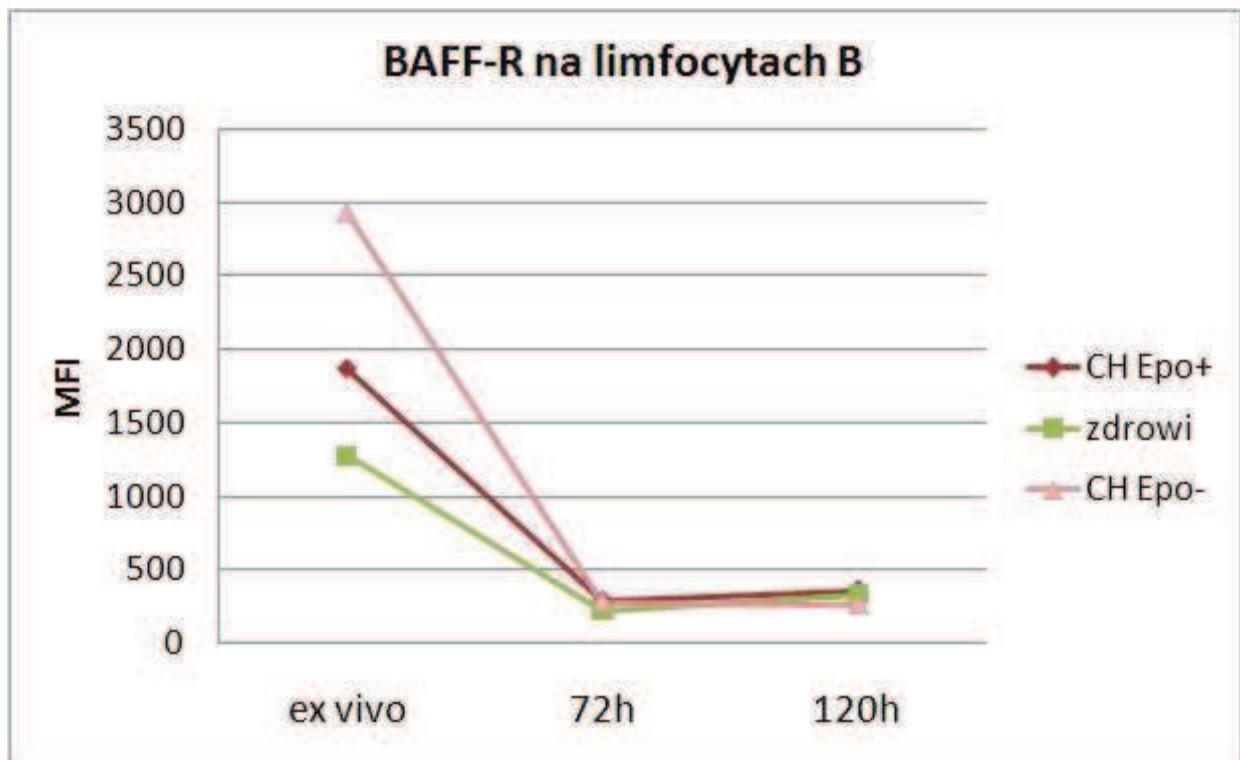
Rysunek 17. Stężenie przeciwciała IgG w supernatantach po 120 godzinie hodowli stymulowanej anty-CD3 hodowli, w zależności od stężenia Epo in vitro: 0 U/ml Epo (A), 0.1 U/ml Epo (B), 50 U/ml (C). Test U Manna-Whitneya (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ). Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

## 10.4 Zmiany w ekspresji receptorów powierzchniowych limfocytów B.

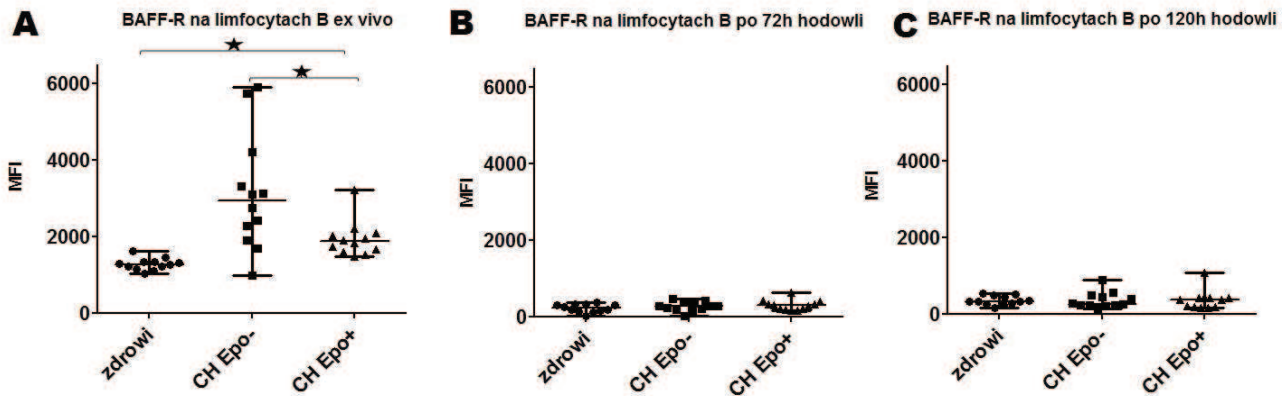
Powyżej udało się wykazać, że w warunkach hodowli PBMC, w której limfocyty T są stymulowane przeciwciałem anty-CD3, limfocyty B odpowiadają zarówno poprzez podziały komórkowe, jak też syntezę immunoglobulin oraz, że ta odpowiedź różni się jeśli porównujemy komórki osób zdrowych i chorych z ESRD. Powstało więc pytanie, czy znane mechanizmy molekularne kontroli proliferacji i sekrecji w limfocytach B mogą być odpowiedzialne za powyższe zjawiska. Poniżej opisane zostały wyniki badań receptorów BAFF-R i CD40, receptorów cytokin: IL-4R, IL-5R i IL-10R, oraz receptora EpoR na powierzchni limfocytów B ze wszystkich badanych grup.

#### 10.4.1 Porównanie ilości BAFF-R i wpływu Epo in vitro na jego ekspresję na limfocytach B osób zdrowych i pacjentów z ESRD.

BAFF-R okazuje się być receptorem bardzo obficie występujących na limfocytach B. Wszystkie limfocyty B we wszystkich badanych grupach posiadają BAFF-R na swojej powierzchni. Ex vivo, limfocyty chorych z ESRD posiadają na powierzchni znamienne więcej BAFF-R niż komórki osób zdrowych, przy czym najwyższe wartości fluorescencji związanej z BAFF-R obserwowano na komórkach od chorych nie otrzymujących Epo (Rys. 18). Zauważalny jest znamieny spadek ekspresji BAFF-R po 72 godzinach aktywacji, który utrzymuje się do końca czasu hodowli - powoduje to ujednocnienie ekspresji BAFF-R na komórkach B ze wszystkich trzech grup (Rys. 18, 19).



Rysunek 18. Zależność ekspresji BAFF-R na limfocytach B w stymulowanej hodowli bez dodatku erytropoetyny od czasu hodowli. Wykres przedstawia mediany MFI dla grup: chorych przyjmujących Epo (CH Epo+), chorych nieprzyjmujących Epo (CH Epo-) i zdrowych osób. Różnice statystyczne oraz zakresy danych przedstawiają wykresy na rysunku 19.

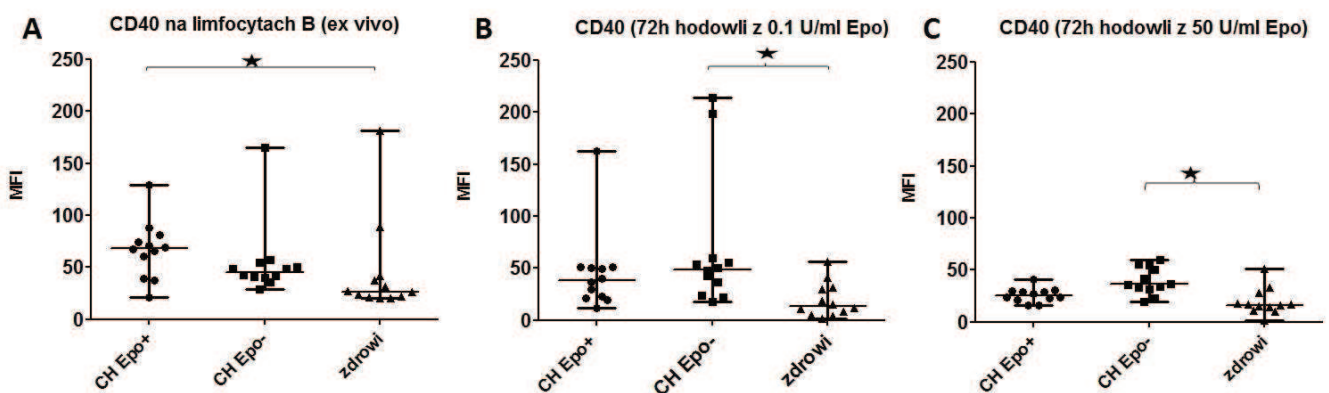


Rysunek 19. BAFF-R na limfocytach B grupach badanych: chorych przyjmujących Epo (CH Epo+), chorych nieprzyjmujących Epo (CH Epo-), zdrowych osób. Test post hoc dla ANOVA Kruskala-Wallis: "CH Epo-" a zdrowi p=0.004; "CH Epo+" a zdrowi p= 0.02.

Ilość BAFF-R na limfocytach B nie zmieniała się w obecności stosowanych stężeń Epo (0.1U/ml, 50U/ml), zarówno u chorych przyjmujących Epo, chorych nieleczonych Epo jak i osób zdrowych (niepokazane). W różnych stężeniach Epo nie ma także różnic między badanymi grupami.

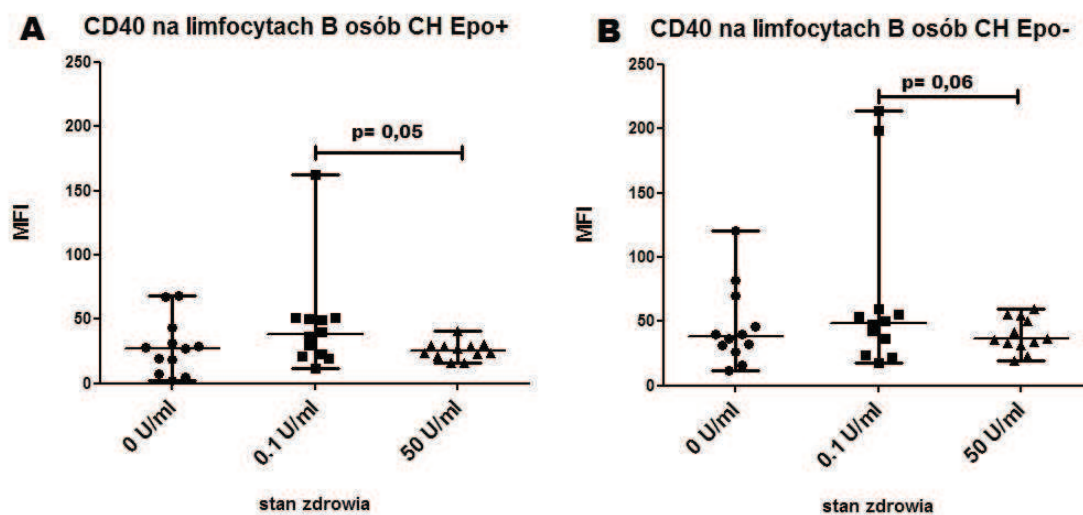
#### 10.4.2 Porównanie ilości CD40 i wpływu Epo in vitro na jego ekspresję na limfocytach B osób zdrowych i pacjentów z ESRD.

Ekspresja CD40 na powierzchni limfocytów B ex vivo była istotnie wyższa u chorych leczonych Epo niż u osób zdrowych, natomiast ekspresja tej cząsteczki u chorych nieleczonych Epo przyjmowała wartości pośrednie (Rys. 20 A). W hodowlach w obecności 0.1 i 50 U/ml Epo to pacjenci nieprzyjmujący Epo mieli na powierzchni limfocytów B znacząco więcej CD40 niż zdrowi (Rys. 20 B, C)



Rysunek 20. Ekspresja CD40 na limfocytach B ex vivo (A), po 72 hodowli w obecności 0.1 U/ml Epo (B) i 50 U/ml Epo (C) w trzech badanych grupach: chorzy przyjmujący Epo (CH Epo+), chorzy nieprzyjmujący Epo (CH Epo-) i osoby zdrowe. Test post-hoc Dunna dla ANOVA Kruskala-Wallis (gwiazdka, gdy p < 0.05). Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

W trakcie hodowli dochodziło do spadku ekspresji CD40 na limfocytach B osób z ESRD, która malała do końca jej trwania. Natomiast u osób zdrowych spadała do 72 godziny a po niej rosła, dochodząc do poziomu ex vivo (Rys. 22 A).



Rysunek 21. Wpływ Epo na ekspresję CD40 na limfocytach B u pacjentów z ESRD po 72 godzinach hodowli: A) przyjmujących Epo, B) nieprzyjmujących Epo. Test post-hoc Dunna dla ANOVA Friedmana. Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

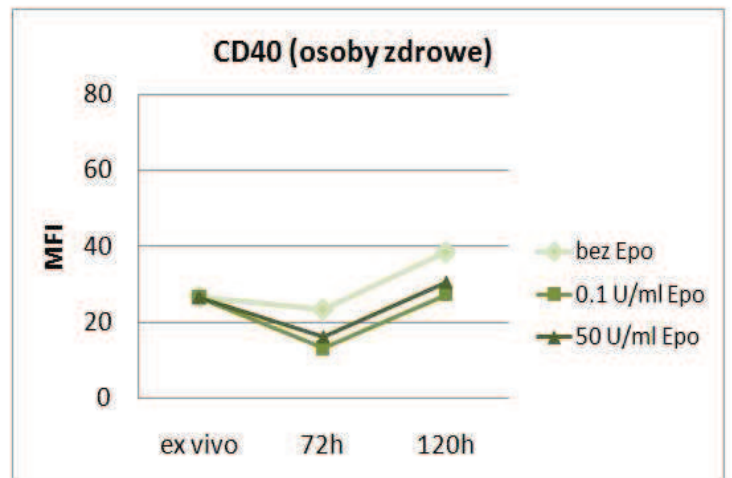
Hodowla w obecności 0.1 U/ml Epo przez 72 godziny nie powodowała istotnych zmian ekspresji CD40 na limfocytach osób chorych, zarówno nieleczonych jak i leczonych Epo (Rys. 21); hodowla w obecności 50 U/ml Epo powodowała spadek ekspresji (bliski istotności statystycznej) tego markera w komórkach obydwu grup chorych w porównaniu do środowiska z 0.1 U/ml (Rys. 21).



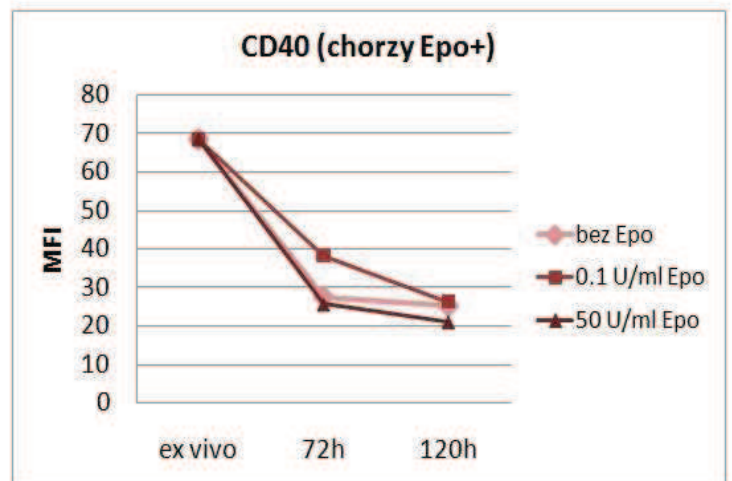
Różnice w reakcji limfocytów B pochodzących od osób zdrowych i chorych w hodowli in vitro obrazuje rysunek 22. U osób zdrowych można zauważyć redukcję ekspresji CD40 po 72 godzinach hodowli, a następnie powrót do poziomu ekspresji ex vivo po 120 godzinie (Rys. 22 A). Przebieg zmian ekspresji CD40 na limfocytach B osób chorych przyjmujących Epo polega na jej redukcji po 72 hodowli (podobnej do obserwowanej dla komórek zdrowych osób; jednak inaczej niż u zdrowych, ta redukcja ekspresji CD40 na komórkach B osób przyjmujących Epo postępuje aż do 120 godzin hodowli) (Rys. 22 B). Kierunki zmian ekspresji CD40 osób chorych nieprzyjmujących Epo (Rys. 22 C) są odwrócone w porównaniu z przebiegiem zmian u osób zdrowych i po 120 godzinie hodowli ekspresja ta jest, tak jak u chorych przyjmujących Epo, niższa od ekspresji ex vivo na limfocytach B.

Rysunek 22. Rozkład ekspresji (mediana MFI) cząsteczki CD40 na limfocytach B w czasie hodowli stymulowanej anty-CD3 w zależności od zastosowanego stężenia Epo. A) osoby zdrowe B) chorzy przyjmujący Epo (Epo+) C) chorzy nieprzyjmujący Epo (Epo-).

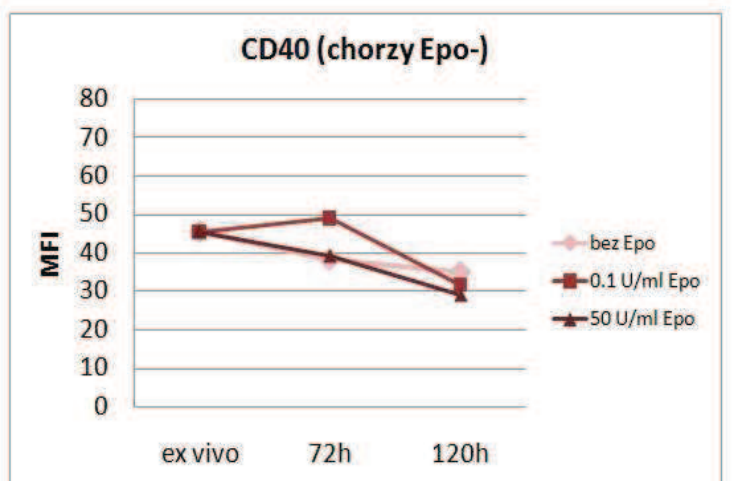
**A**



**B**



**C**



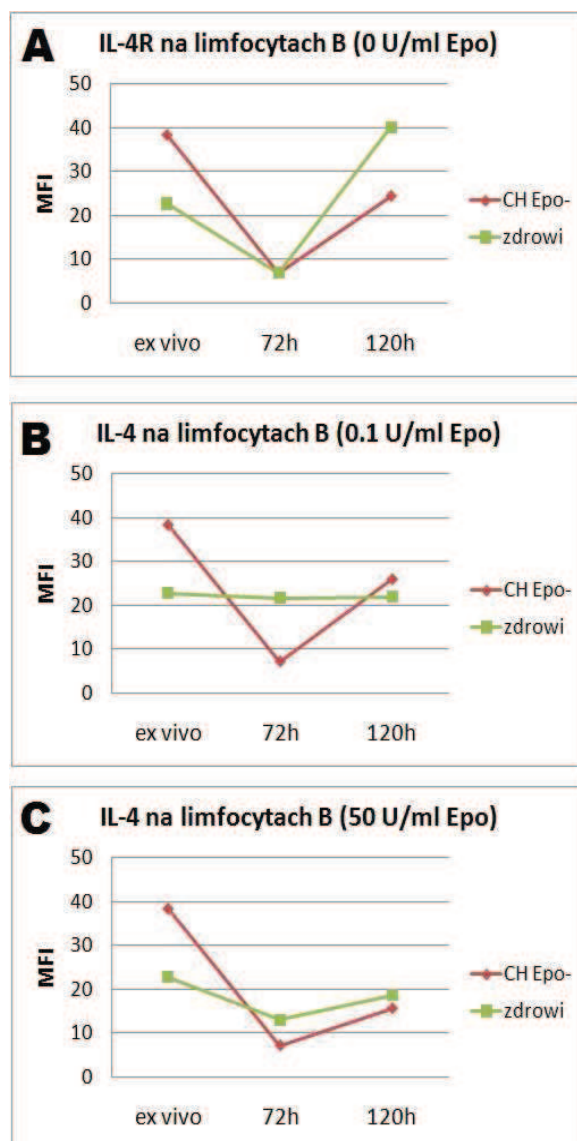
### 10.4.3 Porównanie ekspresji receptorów dla IL-4 (IL-4R), IL-5 (IL-5R) i IL-10 (IL-10R) na limfocytach B osób zdrowych i pacjentów z ESRD.

Działanie cytokin IL-4, IL-5 i IL-10 uważane jest za istotne dla biologii limfocytów B. Dlatego postanowiono zbadać poziom receptorów dla tych cytokin na tych komórkach. Do badania IL-4R i IL-5R, ze względu na ograniczenia finansowe, włączono pacjentów nieprzyjmujących Epo i osoby zdrowe. Do badań IL-10R włączono wszystkie trzy grupy badane.

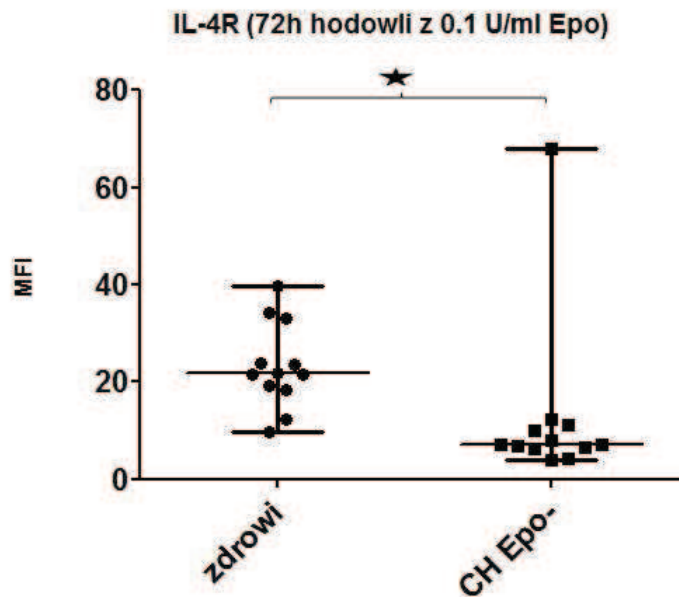
#### 10.4.3.1 IL-4R na powierzchni limfocytów B.

Wyjściowe (ex vivo) poziomy ekspresji IL-4R nie różniły się istotnie między osobami z ESRD nieprzyjmującymi Epo a osobami zdrowymi (na granicy istotności statystycznej;  $p = 0.08$  dla testu U Manna-Whitneya). Po 72 godzinie hodowli poziom receptora dla IL-4R na limfocytach B obniżał się w porównaniu do stanu ex vivo po czym wrastał w obu grupach, w hodowli bez Epo oraz przy stężeniu 50 U/ml Epo (Rys. 23 A, C). Wyjątkiem było stężenie fizjologiczne Epo, które utrzymywało poziom IL-4R na limfocytach B osób zdrowych na stałym poziomie przez cały czas hodowli (Rys. 23 B).

Rysunek 23. Zależność poziomu ekspresji IL-4R na limfocytach B osób chorych nieprzyjmujących Epo (CH Epo-) i u osób zdrowych, od czasu stymulacji hodowli komórkowej w trzech stężeniach Epo: 0U/ml (A), 0.1U/ml (B), 50U/ml (C).



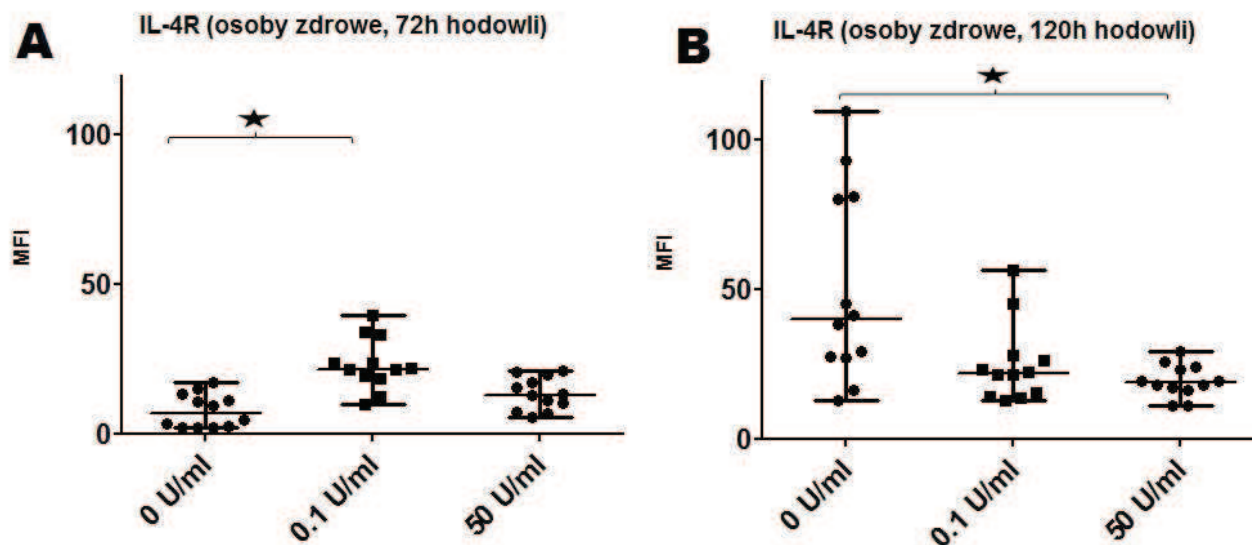
Jedyną różnicą o znaczeniu statystycznym, między osobami zdrowymi a chorymi nieprzyjmującymi Epo był poziom IL-4R na limfocytach po 72 godzinie hodowli z 0.1 U/ml Epo (Rys. 24).



Rysunek 24. Różnica poziomów IL-4R na limfocytach B osób zdrowych i chorych nieprzyjmujących Epo (CH Epo-) po 72 godzinie hodowli w stężeniu 0.1 U/ml Epo. Test U-Manna Whitney (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ). Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

Pod wpływem erytropoetyny poziom ekspresji IL-4R in vitro zmieniał się jedynie na limfocytach B osób zdrowych (Rys. 25). Wpływu Epo na ekspresję IL-4R nie obserwowano w przypadku limfocytów B osób chorych nieprzyjmujących Epo.

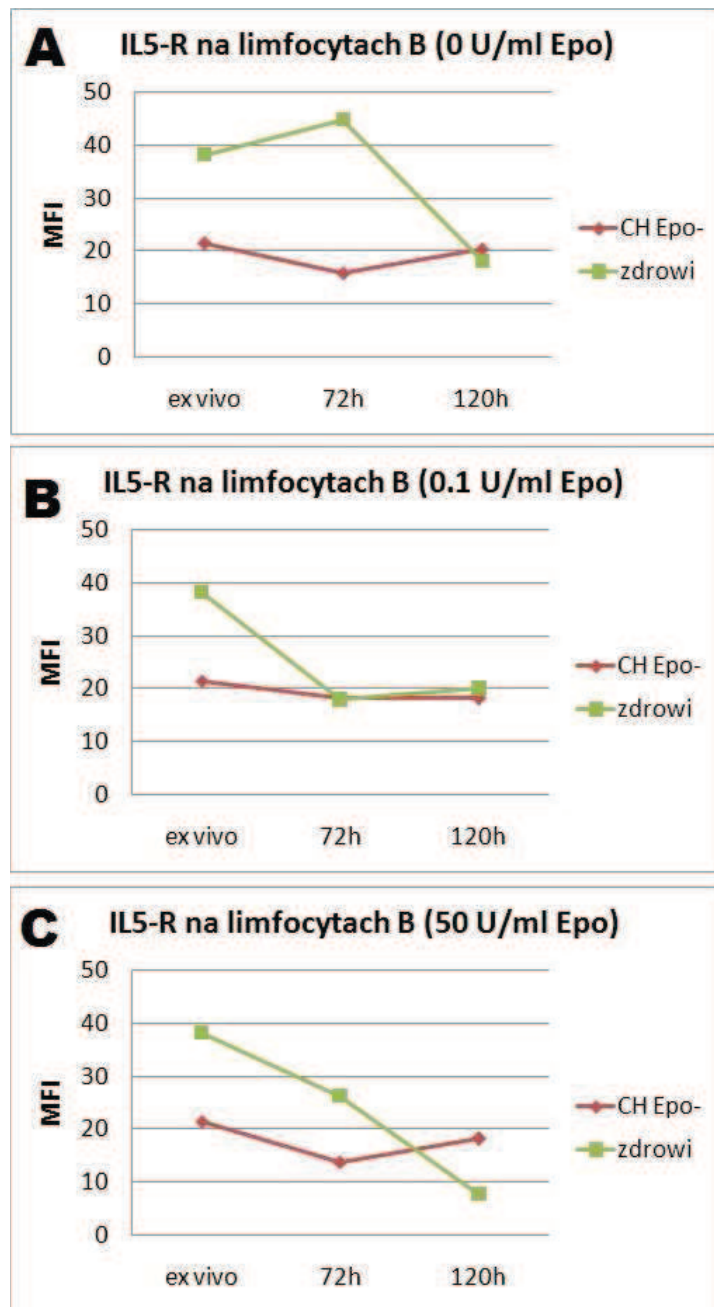
Najwięcej receptora IL-4R na limfocytach B osób zdrowych pojawiało się po 120 godzinach hodowli bez Epo. Hodowla komórkowa prowadzona w stężeniu 50 U/ml Epo utrzymywała poziom IL-4R na limfocytach B osób zdrowych na niskim poziomie.



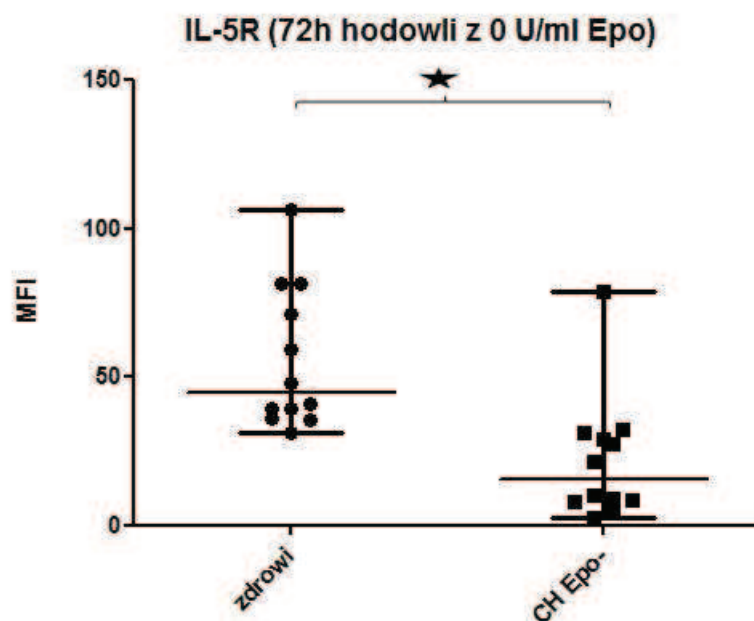
Rysunek 25. Poziom IL-4R na limfocytach B osób zdrowych po 72 godzinach (A) i 120 godzinach (B) hodowli stymulowanej anty-CD3, w trzech stężeniach Epo: 0 U/ml, 0.1 U/ml, 50 U/ml. Test Dunna jako post-hoc dla ANOVA Friedmana (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ). Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

#### 10.4.3.2 IL-5R na powierzchni limfocytów B.

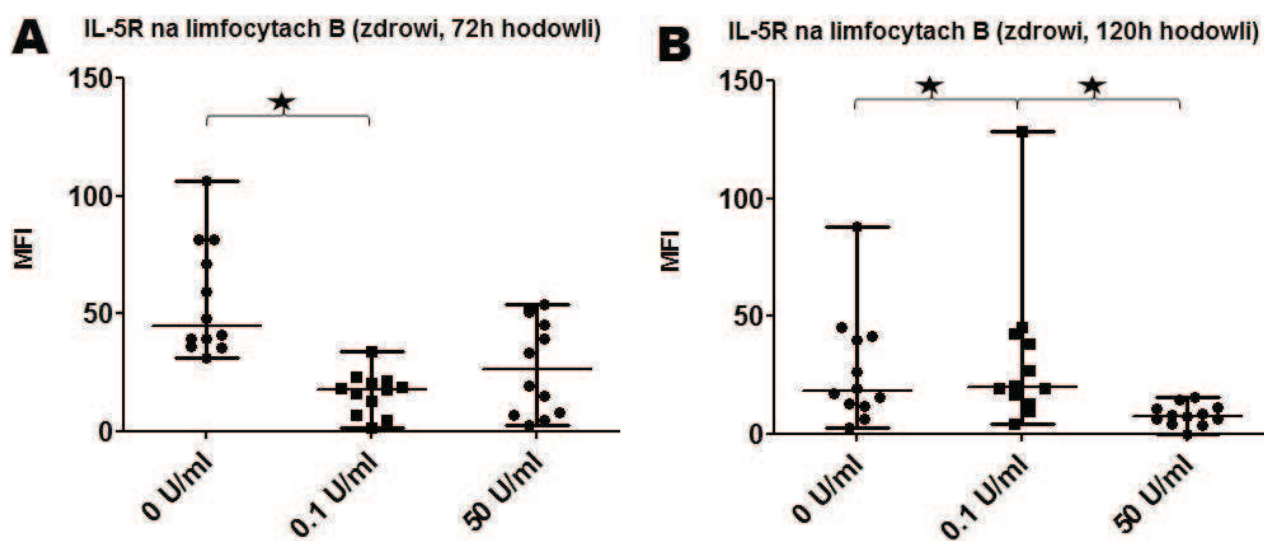
Zmiany poziomu receptora dla IL-5 (IL-5R) na powierzchni limfocytów B osób zdrowych i chorych Epo- w czasie hodowli in vitro bez lub w obecności Epo ilustruje rysunek 26. Limfocyty B osób zdrowych miały znacząco więcej tego receptora na swojej powierzchni po 72 godzinie hodowli z 0.1 U/ml Epo niż osoby chore nieprzyjmujące Epo (Rys. 27 B) i jest to jedyna znacząca statystycznie różnica między tymi dwoma grupami badanych osób. Widoczna różnica w poziomach tego receptora ex vivo, po 72 godzinie i 120 godzinie hodowli w środowisku 50 U/ml Epo (Rys. 26 C) nie przybiera znaczenia statystycznego, ale jest jemu bliska ( $p = 0.08$  dla testu U-Manna Whitneya). Poziom ekspresji IL-5R na powierzchni limfocytów B osób zdrowych, ulegał zależnemu od dawki zmniejszeniu w hodowlach w obecności Epo (Rys. 28). Ilość IL-5R na limfocytach B osób chorych nieprzyjmujących Epo utrzymywała się na podobnym poziomie przez cały czas trwania hodowli a Epo in vitro nie miało na nią wpływu (Rys. 26 A, B, C).



Rysunek 26. Zależność poziomu (mediana) ekspresji IL-5R na limfocytach B osób chorych nieprzyjmujących Epo (CH Epo-) i u osób zdrowych, od czasu stymulacji hodowli komórkowej w trzech stężeniach Epo: 0U/ml (A), 0.1U/ml (B), 50U/ml (C). Różnice statystyczne oraz zakres wartości pokazują wykresy na rysunku 27 i 28.



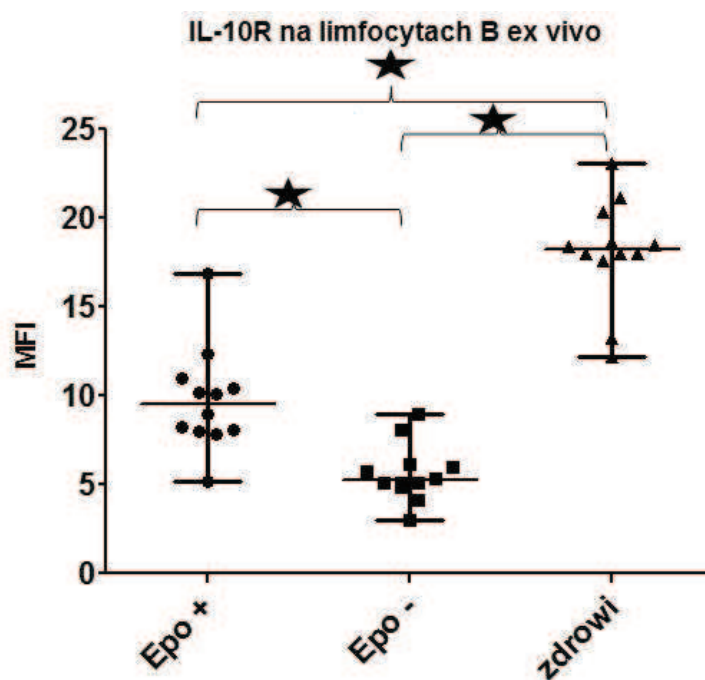
Rysunek 27. Poziom IL-5R na limfocytach B po 72h hodowli z 0.1U/ml Epo, w dwóch badanych grupach. Test U Manna-Whitneya (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ). Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.



Rysunek 28. Poziom IL-5R na limfocytach B osób zdrowych po 72 godzinach hodowli stymulowanej anty-CD3, w trzech stężeniach Epo: 0 U/ml, 0.1 U/ml, 50 U/ml. Test Dunna jako post-hoc dla ANOVA Friedmana (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ). Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

### 10.4.3.3 IL-10R na powierzchni limfocytów B.

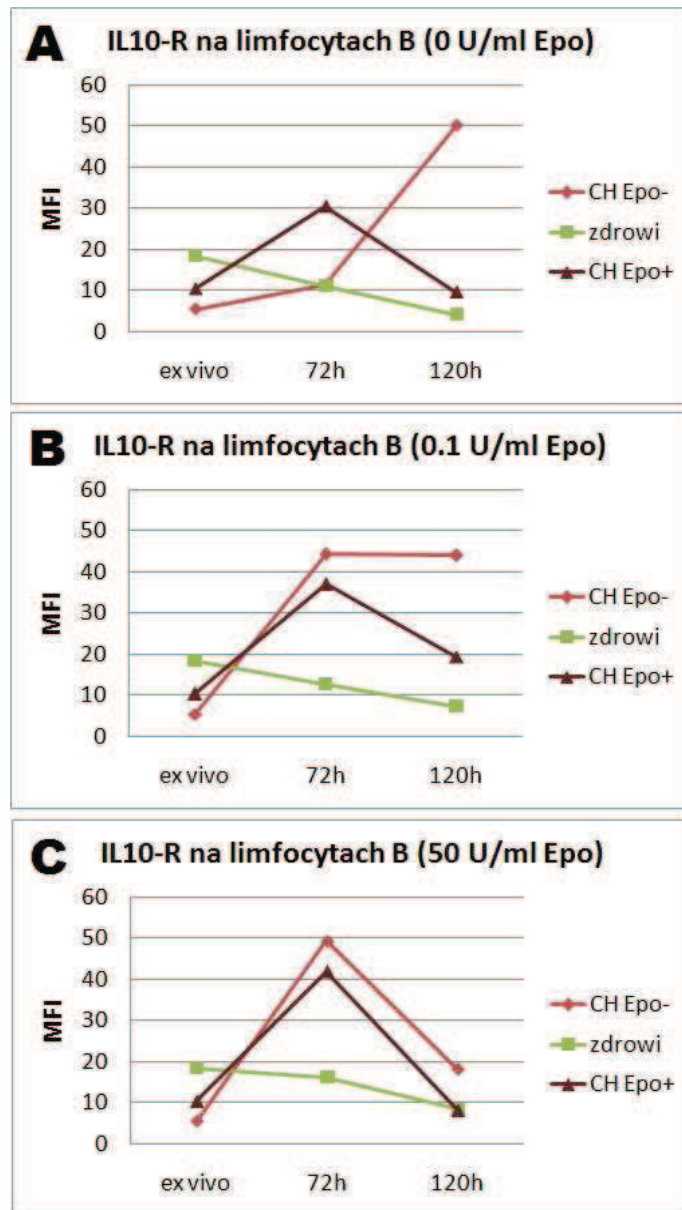
Ekspresja IL-10R różni się ex vivo znacząco między grupami badanych. Najwyższą ekspresję tego receptora ex vivo odnajduje się na limfocytach B osób zdrowych a najniższą u chorych nieprzyjmujących Epo. Mimo, że pacjenci przyjmujący Epo mają znacząco więcej cząsteczek receptora dla IL-10 na powierzchni limfocytów B ex vivo to jednak nadal znacząco mniej niż na limfocytach B osób zdrowych (Rys. 29).



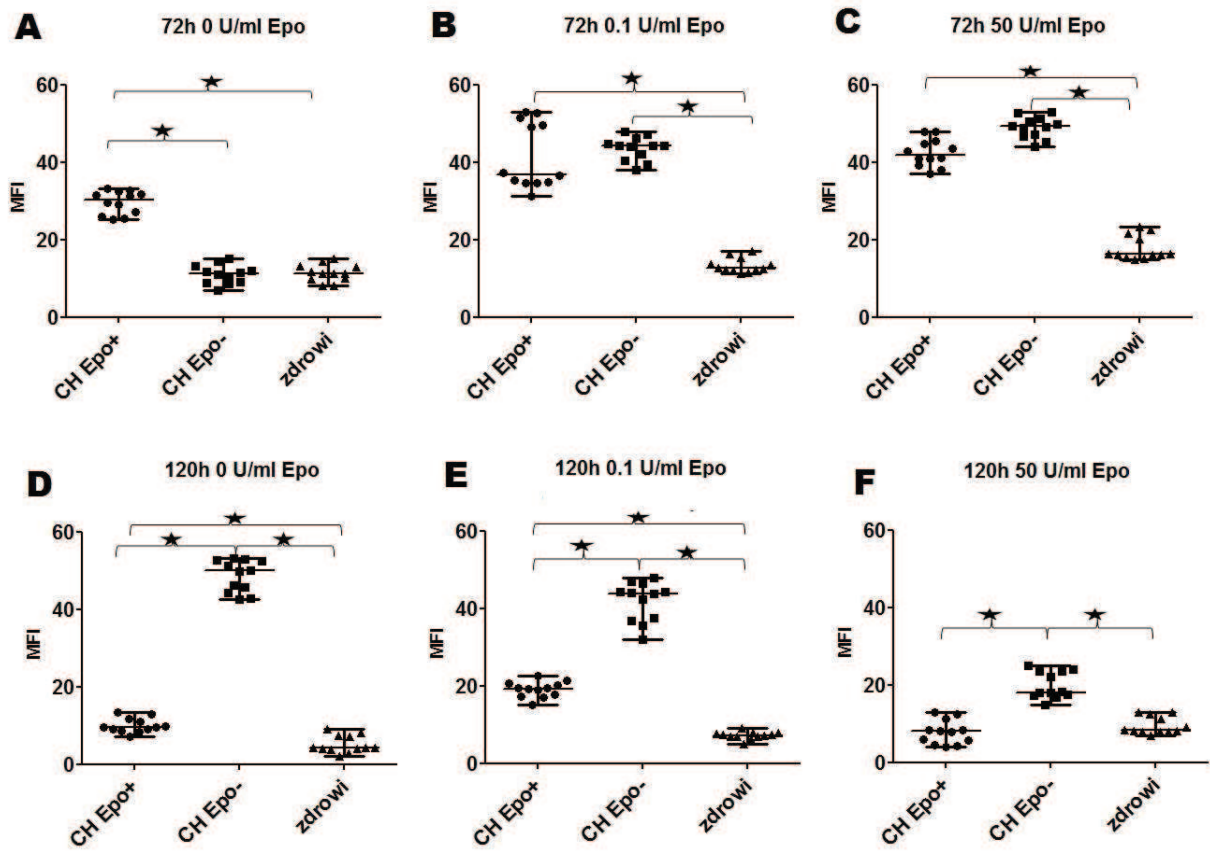
Rysunek 29. IL-10R na powierzchni limfocytów B ex vivo: osoby chore przyjmujące Epo (CH Epo+), osoby chore nieprzyjmujące Epo (CH Epo-), osoby zdrowe. Wąsy = zakres. Linia środkowa = mediana. Test post-hoc dla ANOVA Kruskala-Wallisa (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ).

Ogólny przebieg zmian poziomów ekspresji IL-10R na limfocytach B w trakcie hodowli PBMC in vitro przedstawia rysunek 30. Hodowla powoduje redukcję ekspresji IL-10R na zdrowych limfocytach B; obecność egzogennej Epo wydaje się mieć zależny od dawki hamujący wpływ na ten efekt (Rys. 30 por. Rys. 32). Hodowla PBMC od osób chorych (Epo- i Epo+) powodowała wzrost poziomu ekspresji IL-10R po 72 godzinie hodowli, słabszy w hodowlach bez egzogennej Epo i najsilniejszy w obecności 0.1 i 50 U/ml Epo w hodowli (Rys. 30, por. Rys. 31, Rys. 32). Natomiast po 120 godzinach hodowli z 50 U/ml Epo, ilość receptora dla IL-10 na limfocytach B osób chorych była znacząco niższa (Rys. 32 D, F).

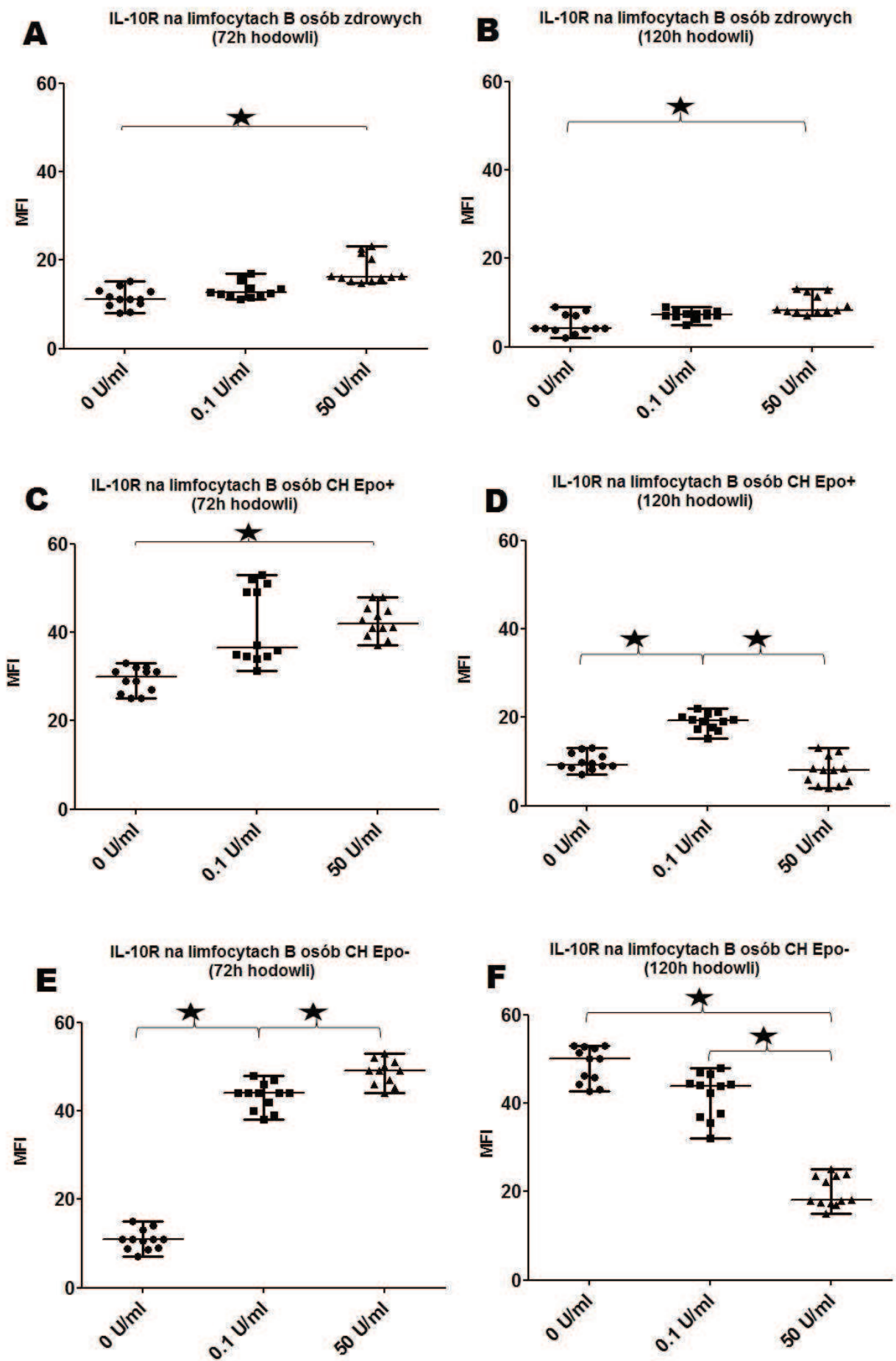




Rysunek 30. Zależność poziomu IL-10R (mediana) na limfocytach B od czasu hodowli stymulowanej anty-CD3, w trzech środowiskach Epo: 0 U/ml (A), 0,1 U/ml (B), 50 U/ml (C). Osoby chore przyjmujące Epo (CH Epo+), osoby chore nieprzyjmujące Epo (CH Epo-), osoby zdrowe. Różnice statystyczne oraz zakresy wartości danych pokazują wykresy na rysunkach 31 i 32.



Rysunek 31. IL-10R na powierzchni limfocytów B po 72 godzinach hodowli stymulowanej anty-CD3 w stężeniu 0 U/ml (A), 0.1 U/ml Epo (B), 50 U/ml Epo (C) oraz po 120 godzinach hodowli w stężeniu 0 U/ml (D), 0.1 U/ml (E), 50 U/ml Epo (F); osoby chore przyjmujące Epo (CH Epo+), osoby chore nieprzyjmujące Epo (CH Epo-), osoby zdrowe. Wąsy = zakres. Linia środkowa = mediana. Test post-hoc Dunna dla ANOVA Kruskala-Wallis (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ).

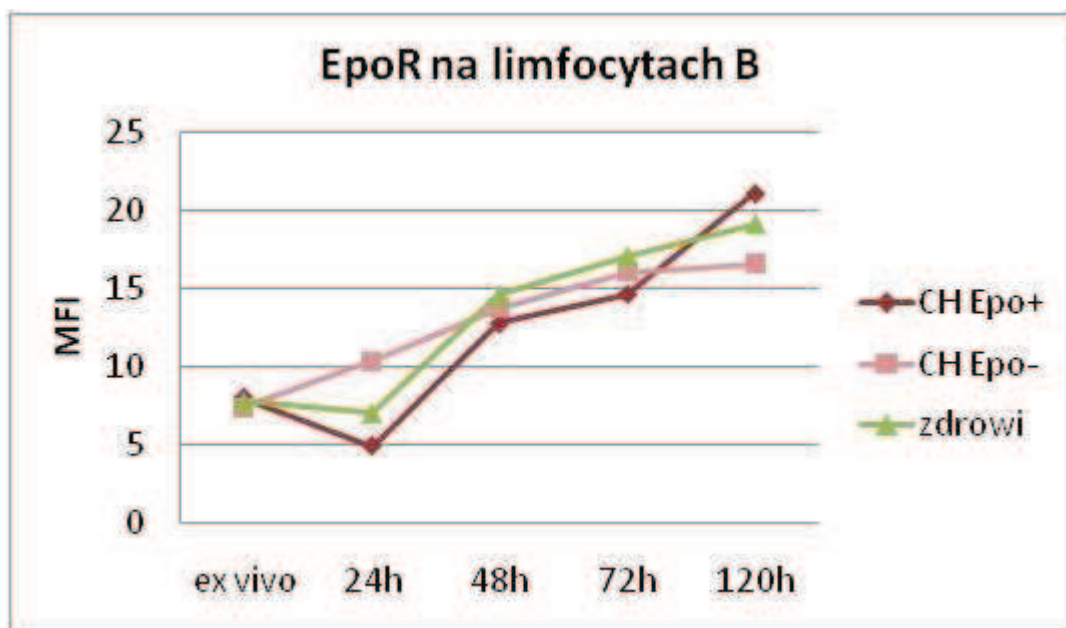


Rysunek 32. Poziom IL-10R na limfocytach B po 72 i 120 godzinach hodowli stymulowanej anti-CD3, w obecności trzech środowisk Epo, u: osób zdrowych (A, B), chorych Epo+ (C, D) i chorych Epo- (E, F). Test Dunna jako post-hoc dla ANOVA Friedmana (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ). Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

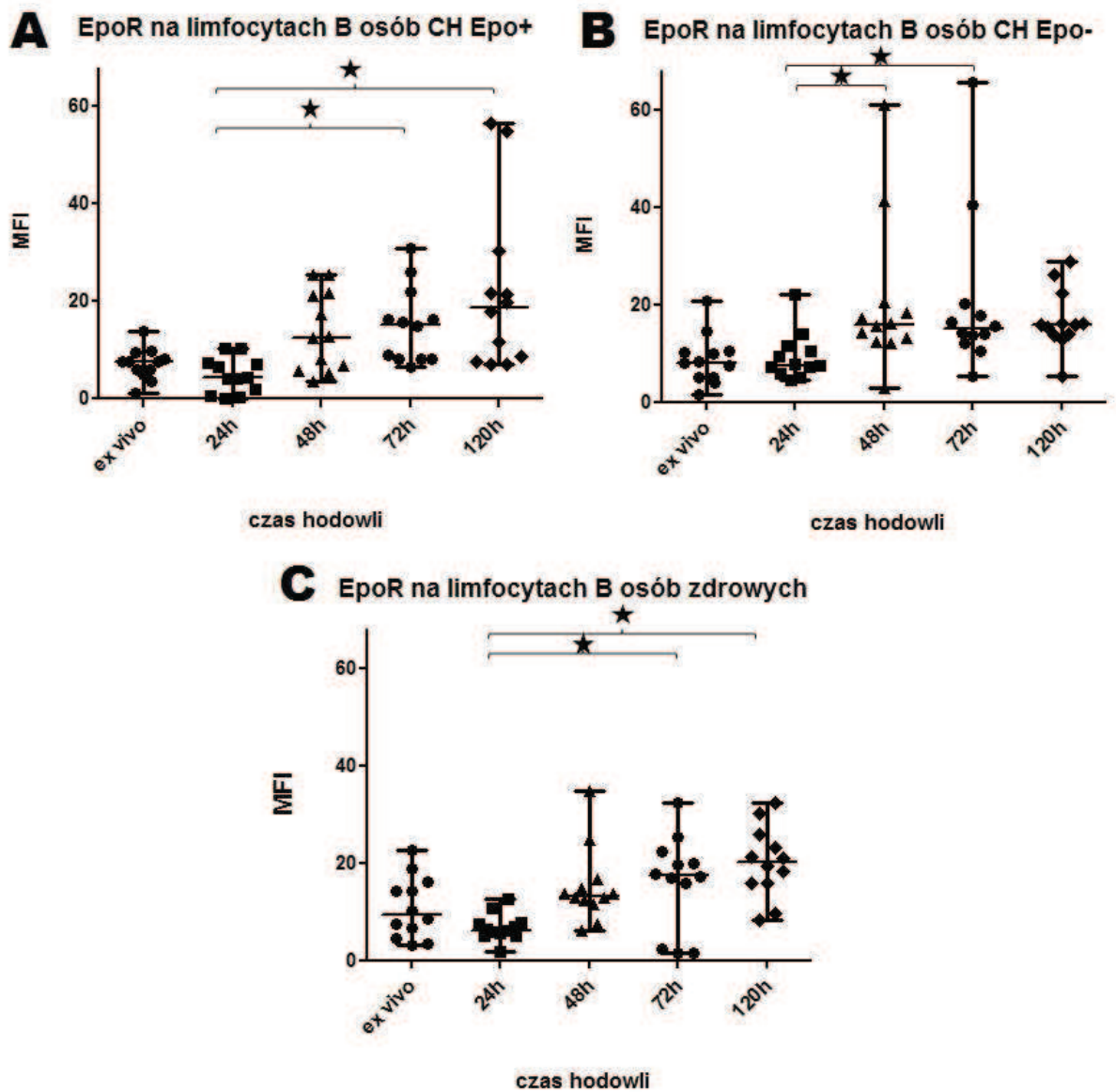
#### 10.4.4 Receptor dla Epo na limfocytach B osób zdrowych i pacjentów z ESRD.

Ze względu na zaobserwowany zróżnicowany wpływ egzogennej erytropoetyny na badane parametry limfocytów B od osób chorych i zdrowych, zbadano, czy poziom ekspresji receptorów dla tego hormonu (EpoR) różni się na komórkach z badanych grup.

Ekspresja receptora dla erytropoetyny (EpoR) na limfocytach B ex vivo była podobna u osób ze wszystkich badanych grup (Rys. 33). W kolejnych punktach czasowych obserwacji, po 24, 48, 72 i 120 godzinach (na podstawie wcześniejszych badań ekspresji EpoR na limfocytach T<sup>51</sup>), dochodziło do stopniowego wzrostu ekspresji EpoR (Rys. 33, 34).



Rysunek 33. Ekspresja EpoR na limfocytach B po 24 godzinach hodowli stymulowanej anty-CD3. Gwiazdka, gdy  $p < 0.05$  (test Kruskala-Wallis). "Z" - osoby zdrowe, "CH Epo+" - chorzy przyjmujący Epo, "CH Epo-" - chorzy nieprzyjmujący Epo. Różnice statystyczne oraz zakresy wartości danych pokazują wykresy na rysunku 34.

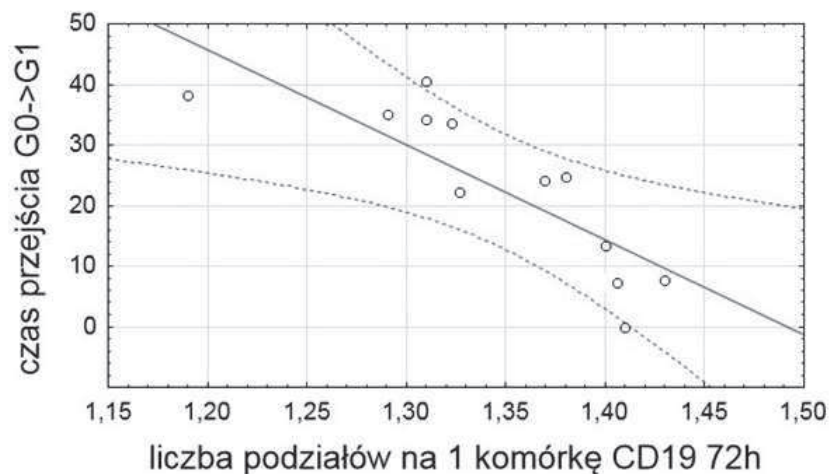


Rysunek 34. EpoR na powierzchni limfocytów B w trakcie hodowli stymulowanej anty-CD3: osoby chore przyjmujące Epo (A; CH Epo+), osoby chore nieprzyjmujące Epo (B; CH Epo-), osoby zdrowe (C). Test post-hoc Dunna dla ANOVA Friedmana (gwiazdka, gdy  $p < 0.05$ ). Linia środkowa to mediana. Wąsy góra-dół to zakres maksimum-minimum.

## 10.5 Korelacje dotyczące poszczególnych antygenów oraz parametrów proliferacyjnych limfocytów B.

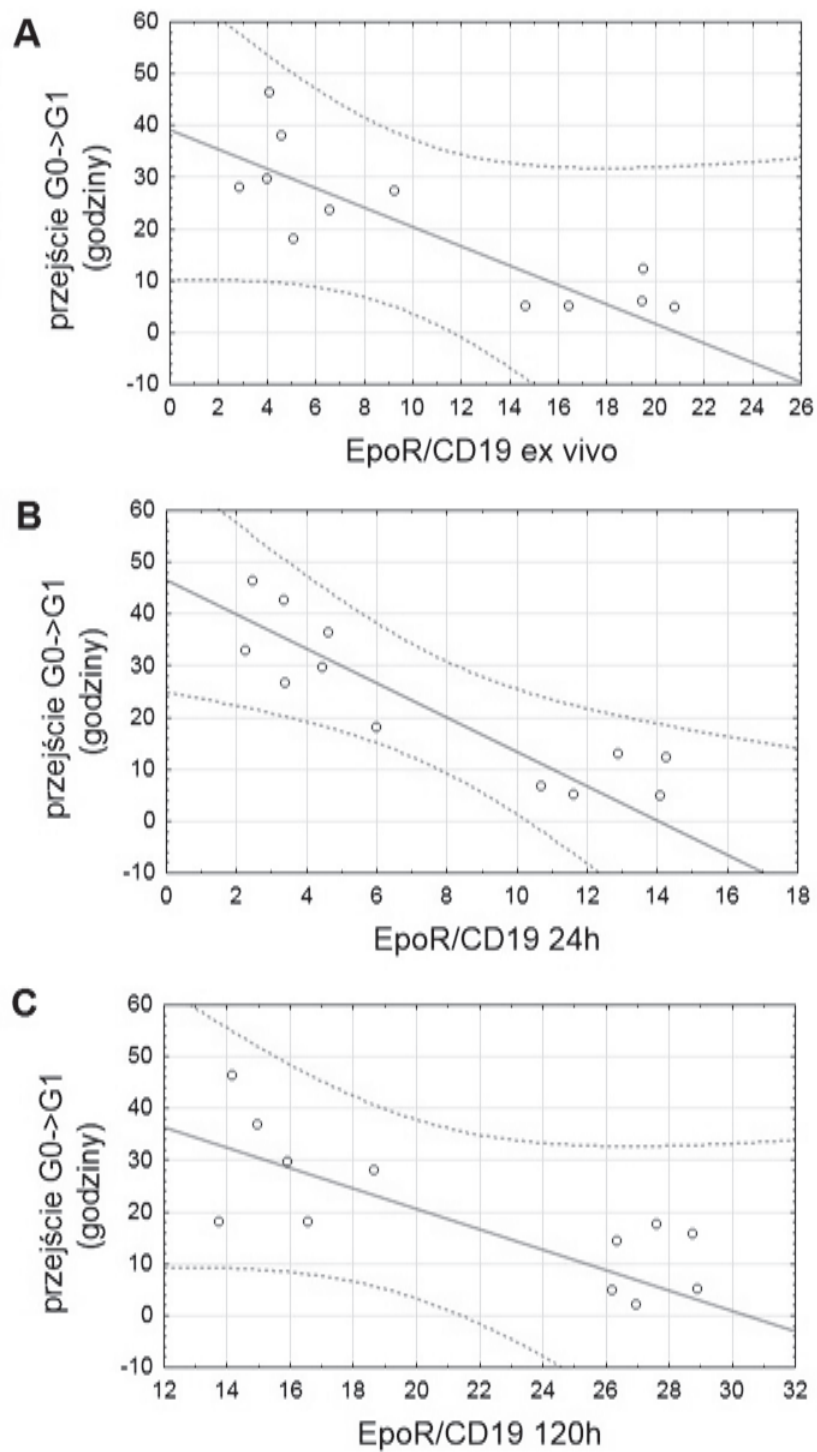
Następnie postanowiono sprawdzić, czy różniące się dynamiczne parametry proliferacji limfocytów B od osób zdrowych i chorych korelują ze sobą i/lub z zaobserwowanymi zmianami poziomów ekspresji istotnych receptorów powierzchniowych na tych komórkach.

Liczba podziałów przypadająca na jeden limfocyt B po 72 godzinie hodowli koreluje u osób zdrowych z czasem przejścia limfocyta B z fazy G0 do G1 cyklu komórkowego (Rys. 35). Im czas przejścia z fazy G0 do G1 był dłuższy tym mniej podziałów przypadło na 1 limfocyt B.



Rysunek 35. Negatywna korelacja, u osób zdrowych, czasu przejścia limfocyta B z fazy G0 do G1 z liczbą podziałów przypadającą na 1 limfocyt B po 72 godzinach hodowli ( $r = -0.83$ ).  $p < 0.05$ , korelacja porządku rang Spearmana.

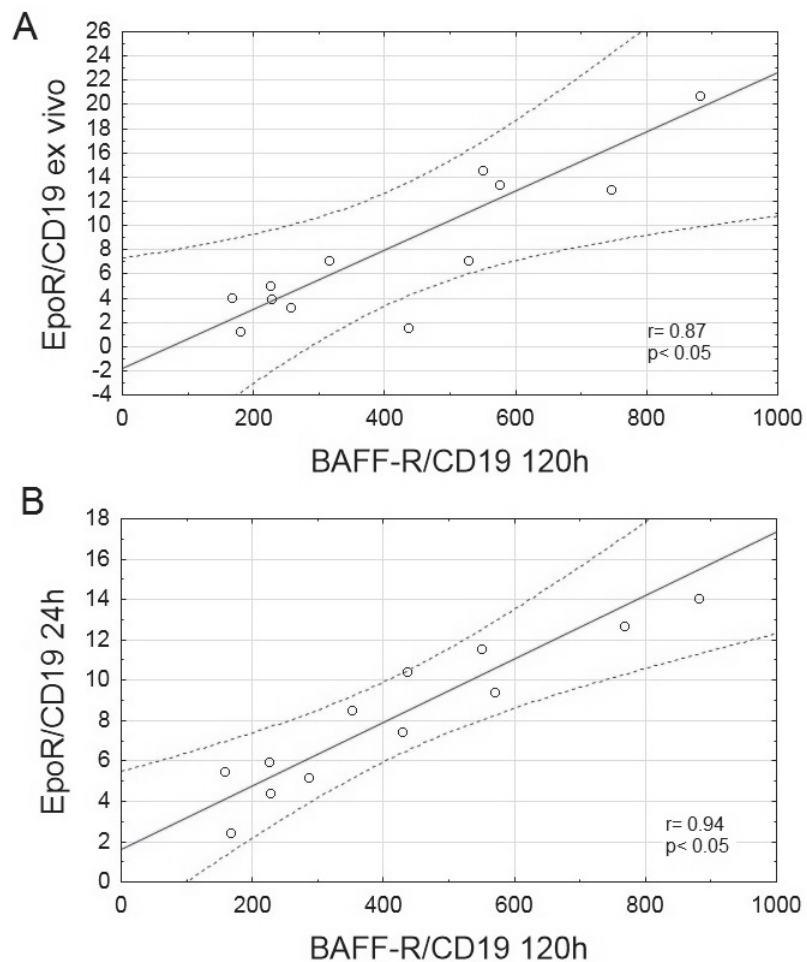
Liczba podziałów wykonanych przez pojedynczy dzielący się limfocyt B nie korelowała z żadnym z badanych poziomów ekspresji receptorów powierzchniowych dla żadnej z badanych grup (nie pokazane). Natomiast wykazano, że czas przejścia G0→G1 był tym dłuższy, im mniejsza była ekspresja receptora EpoR na badanych komórkach (Rys. 36 A, B, C).



Rysunek 36. Korelacje między czasem przejścia limfocytów B z fazy G0 do G1 a ekspresją EpoR na limfocytach B. A:  $r = -0.81$ , B:  $r = -0.93$  ( $p < 0.05$ , korelacja porządku rang Spearmana), C:  $r = -0.80$ .

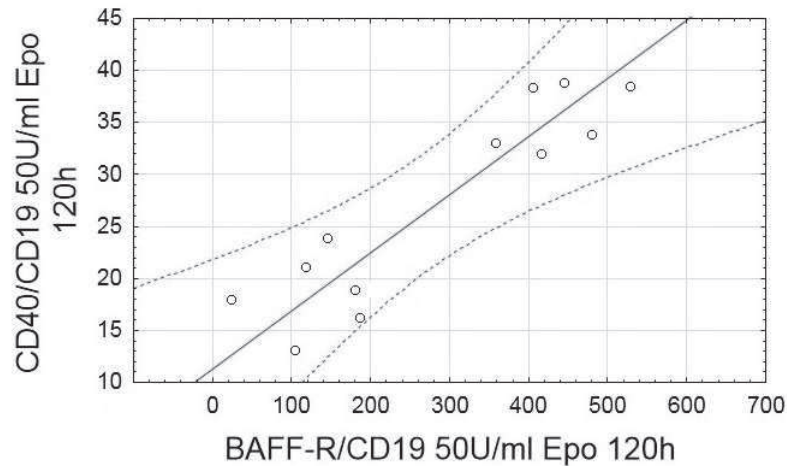


Z kolei, wyjściowa (ex vivo) ekspresja EpoR zmiennie korelowała z ekspresją receptora dla BAFF po 120 godzinach hodowli. Co ciekawe, taką istotną korelację udało się wykazać tylko w przypadku komórek pochodzących od osób chorych nieprzyjmujących Epo (Rys. 37).



Rysunek 37. Pozytywna korelacja ekspresji EpoR na limfocytach B ex vivo (A) i po 24 godzinie hodowli (B), z receptorem BAFF po 120 godzinie hodowli stymulowanej anty-CD3, u osób cierpiących na ESRD nieprzyjmujących Epo.  $p < 0.05$ , korelacja porządku rang Spearmana.

Ostatnią znaną korelacją o możliwym znaczeniu dla różnic w zachowaniu limfocytów B od osób chorych i zdrowych była pozytywna relacja między poziomami ekspresji CD40 i BAFF-R obserwowana w przypadku komórek zdrowych osób po 120 godzinach hodowli (Rys. 38). Takiej zależności nie obserwowano dla limfocytów B od osób chorych.



Rysunek 49. Pozytywna korelacja ekspresji cząsteczki CD40 z receptorem BAFF na limfocytach B osób zdrowych po 120 godzinie hodowli w 50U/ml Epo ( $r = 0.92$ ).  $p < 0.05$ , korelacja porządku rang Spearmana.

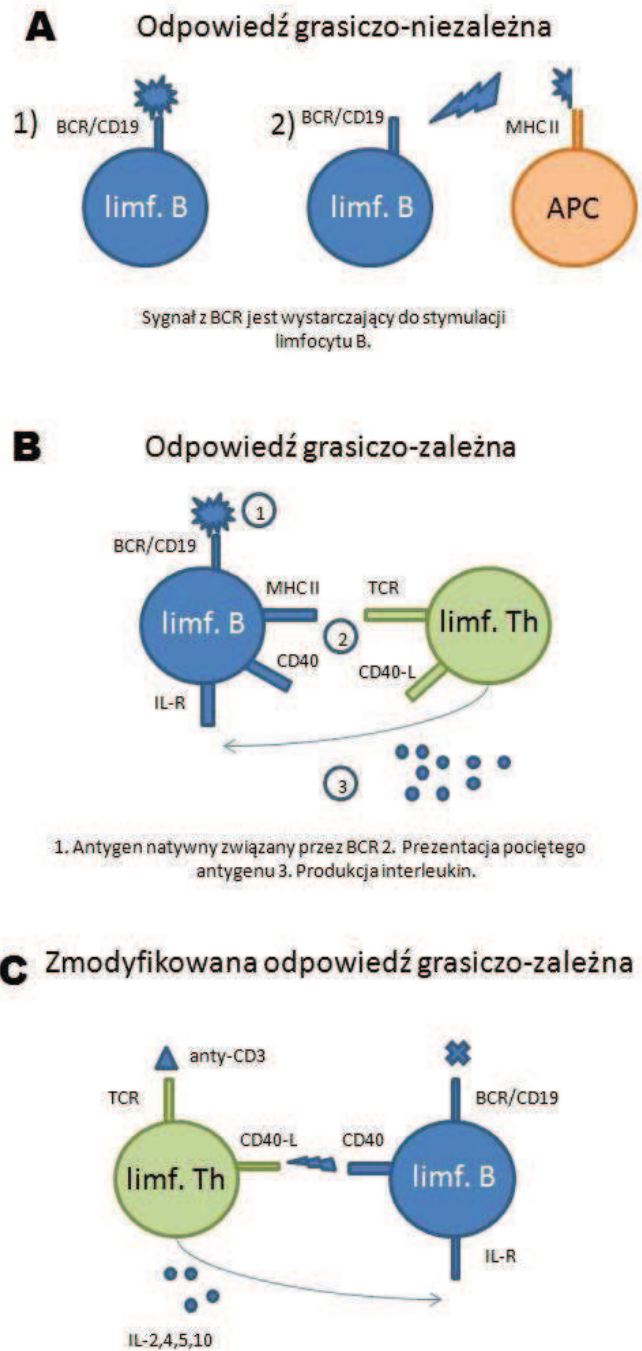
## 11 Dyskusja.

Niniejsza praca jest pierwszą tak wnikliwie opisującą biologię limfocytów B w przewlekłej chorobie nerek (skupiając się na stadium schyłkowej niewydolności nerek ESRD), która może dotyczyć nawet 873 milionów osób na świecie. Uzyskane wyniki wskazują, że komórki B osób chorych i zdrowych różnią się dynamiką proliferacji *in vitro* i wielkością produkcji przeciwciał, oraz że u chorych ma znaczenie fakt terapii erytropoetyną lub jej braku. W konsekwencji, badane komórki różnią się zarówno poziomem ekspresji receptora dla Epo (EpoR), jak też ekspresji istotnych receptorów dla ligandów stymulujących komórkę B, takich jak CD40, BAFF, a także cytokiny IL-4, 5 i 10. Przynajmniej w części poziomy ekspresji tych receptorów są podatne na modyfikację erytropoetyną zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*.

Zastosowany model użyty w hodowli komórek *in vitro*, w opisanych w tej pracy badaniach, zasługuje na uwagę. Do zawiesiny komórek krwi obwodowej dodawane było przeciwciało anty-CD3 aktywujące limfocyty T poprzez wiązanie do TCR (receptor limfocytu T; z ang. *T-cell receptor*). Wystymulowane limfocyty T proliferowały (model oparty na badaniach wcześniejszych<sup>16,18</sup>) i produkowały cytokiny<sup>54</sup>, czego rezultatem była stymulacja limfocytów B, opisana w takim modelu po raz pierwszy w tej pracy. Limfocyty B nie były stymulowane bezpośrednio poprzez dodanie specyficznego dla nich antygeny,

co sugeruje, że reagowały wyłącznie na skutki odpowiedzi limfocytów T (cytokiny, kontakt CD40 na limfocycie B z CD40L na limfocycie Th, CD80 na limfocycie B z CD28 na limfocycie Th). Dzięki zastosowaniu takiej drogi stymulacji komórek, możliwa była ocena współpracy populacji limfocytów B z populacją Th - w modelu bez bezpośredniej aktywacji limfocytów B; jest to unikatowa, wcześniej nieopisana obserwacja.

Wcześniejsze badania opisywały, że nawet bezpośrednia stymulacja limfocytów B, wymaga stałego dostarczania stymulanta - jednokrotne podanie stymulantów *in vitro* powoduje bowiem, że po pasażu komórek i niepodaniu ponownym stymulantów, limfocyty B mimo że aktywowane, szybko umierają<sup>63</sup>. To sugeruje potrzebę stałej komunikacji *in vivo* między pomocniczymi komórkami T produkującymi interleukiny a limfocytami B (Rys. 50).



Rysunek 50. Poglądowe przedstawienie dróg aktywacji limfocytu B. A) odpowiedź grasiczo-niezależna, B) odpowiedź grasiczo-zależna, C) zmodyfikowana odpowiedź grasiczo-zależna (model hodowli zastosowany podczas badań). Objasnienia skrótów: limf. B = limfocyt B, limf. Th = limfocyt Th, APC = komórka prezentująca antygen (z ang. *antigen presenting cell*).

Znana jest ścieżka aktywacji limfocytów B za pomocą antygenów T-niezależnych, przy udziale BCR oraz kinazy tyrozynowej Brutona (Btk). Do takich antygenów należą antygeny bakteryjne rozpoznawane dodatkowo przez TLR (z ang. *Toll-like receptor*) znajdujące się na powierzchni limfocyty B. Spekuluje się, że to właśnie ten ostatni odpowiedzialny jest za dostarczenie sygnału do produkcji przeciwciał<sup>95</sup>. W opisanym, w niniejszej pracy, badaniu cząsteczka BCR nie jest zaangażowana w proces aktywacji limfocyty B, ponieważ w hodowli nie został użyty antygen dla tego receptora (Rys. 50 C).

Ważną kwestią jest pochodzenie immunoglobulin wykrytych w tak zaprojektowanym badaniu, w którym nie dodaje się żadnego specyficznego antygeny, który mógłby bezpośrednio (jako antygen grasiczo-niezależny) czy pośrednio (jako antygen grasiczo-zależny) aktywować limfocyty B. 40% limfocytów B krwi obwodowej stanowią komórki B pamięci<sup>90</sup>, które odpowiedzialne są za reakcję wtórną do wcześniej napotkanego antygeny. Są one w stanie produkować wysokie miana specyficznych przeciwciał w ciągu 3-5 dni<sup>91</sup> (według niektórych nawet 1-3 dni<sup>92</sup>) od immunizacji. Warunkiem aktywacji komórki B pamięci jest jednak antygen pochodzenia białkowego. W moich badaniach jedynym stymulantem komórek było przeciwciało anti-CD3, które aktywuje limfocyty T. Najprawdopodobniej więc produkowane przeciwciała IgM i IgG pochodziły z plazmocyty wygenerowanych de novo w czasie hodowli komórkowej (we krwi obwodowej plazmoblasty stanowią jedynie 0.1% PBMC<sup>93</sup>). Prawdopodobnie uwidacznia to jak silnym i ważnym elementem odpowiedzi limfocytów B są sygnały limfocytów Th oraz monocytów (aktywowane przez limfocyty Th). Bez udziału specyficznego antygeny dla limfocytów B, same cytokiny i kontakt poprzez powierzchniowe cząsteczki z limfocytami Th, jest w stanie doprowadzić do aktywacji limfocytów B, ich podziałów a także wygenerować pulę plazmocyty produkujących przeciwciała nie tylko IgM, które stanowią główną pulę przeciwciał w odpowiedzi pierwotnej, ale i IgG. Można też wysnuć hipotezę, która dostarczy innej odpowiedzi dotyczącej produkcji przeciwciał. Być może komórki pamięci, wbrew temu, jak to się opisuje, nie potrzebują do podtrzymania swej aktywności sekrecyjnej specyficznego antygeny a wystarczy im silna stymulacja cytokinami i połączenie CD40 z CD40L oraz CD28 z CD80. Wtedy specyficzność przeciwciał zależałaby od pamięci limfocytów B. Jednak mogłoby oznaczać to, że przy infekcji jakimkolwiek patogenem in vivo następuje aktywacja także niespecyficznych limfocytów B pamięci. Podobną hipotezę (tzw. homeostatycznej aktywacji limfocytów B postawił już parę dekad temu Lanzavecchia, jednak jak do tej pory nie została ona poparta jednoznacznymi opublikowanymi wynikami<sup>104</sup>.

Opisany powyżej model okazał się przydatny do porównania biologii limfocytów B u osób z ESRD i zdrowych. We wcześniejszych badaniach<sup>16,17,18</sup> dowiedziono, że pacjenci z przewlekłą chorobą nerek charakteryzują się licznymi zaburzeniami odpowiedzi komórkowej, co skutkuje wyższą zapadalnością na infekcje niż u osób zdrowych. W pracy tej wykazano, że różnice są także zauważalne w odpowiedzi humoralnej a niektóre z nich znamienne statystycznie.

Wykazałam, że limfocyty B osób cierpiących na ESRD charakteryzują się wyższą ekspresją *ex vivo* głównych antygenów odpowiedzialnych za aktywację limfocytów B, nosząc znamiona profilu nadreaktywności - większa liczba takich cząsteczek jak BAFF-R czy CD40. Ekspresja antygeny CD40 i IL-10R na powierzchni limfocytów B w czasie hodowli u pacjentów silnie odbiega swoim wzorem od wzoru prezentowanego przez osoby zdrowe. Szczególnie widoczne jest to u chorych nieprzyjmujących Epo. Wykazana w tej pracy pozytywna korelacja zwraca uwagę na zależność liczby cząsteczek BAFF-R po 120 godzinie hodowli od liczby EpoR na powierzchni limfocytów B przed aktywacją i po 24 godzinach od niej. Udowadnia to związek ścieżki sygnalizacyjnej EpoR z ekspresją genów dla BAFF-R w limfocycie B.

Zmiany ekspresji cząsteczki CD40 obrazuje kolejne różnice. Pacjenci nieprzyjmujący Epo mają odwrócony wzór ekspresji cząsteczki CD40 na limfocytach B w porównaniu z osobami zdrowymi. Liczba cząsteczek CD40 na limfocytach B osób chorych jest wyższa przed stymulacją niż u osób zdrowych (znacząca różnica między osobami zdrowymi a chorymi przyjmującymi Epo). Po stymulacji antygenowej w hodowli *in vitro* obserwuje się spadek liczby cząsteczek CD40 na limfocytach osób chorych przyjmujących Epo. Podobna sytuacja ma miejsce na limfocytach B osób zdrowych. Natomiast liczba CD40 na limfocytach B osób chorych nieprzyjmujących Epo wzrasta po 72 godzinie stymulacji. Następnie po 120 godzinie stymulacji liczba cząsteczek CD40 na limfocytach B osób ze wszystkich grup jest bardzo zbliżona. Co ciekawe to charakterystyczne wybicie ekspresji CD40 po 72 godzinie stymulacji u osób chorych nieprzyjmujących Epo, odnajdywane jest w hodowli z dodatkiem Epo w stężeniu fizjologicznym. Inną zauważalną różnicą jest stały spadek liczby cząsteczek CD40 na limfocytach B chorych z obu grup, w czasie hodowli *in vitro*. Liczba cząsteczek CD40 na limfocytach B osób zdrowych, w 5 dniu hodowli stymulowanej anty-CD3 jest wyższa niż w dniu 3, w każdym z zastosowanych stężeń Epo. Może być to jednym z powodów, dla których pacjenci ci charakteryzują się częstszymi infekcjami oraz słabszymi odpowiedziami na szczepienia. Cząsteczka CD40 odpowiedzialna jest nie tylko za aktywowanie limfocytu B, ale również za formowanie centrów rozmnażania limfocytów B, zmianę klas przeciwciał i różnicowanie do komórek pamięci.

Pojawia się więc pytanie, dlaczego limfocyty B osób z ESRD proliferują po stymulacji w niższym odsetku, mają niższą liczbę podziałów przypadającą na jeden limfocyt oraz dłuższy czas przejścia do fazy G1 cyklu komórkowego (przy 0 U/ml Epo *in vitro*) niż limfocyty osób zdrowych, mimo posiadania znacznie wyższej wyjściowej (*ex vivo*) liczby cząsteczek CD40 na powierzchni limfocytu B? Najprawdopodobniej ta wysoka wyjściowa liczba cząsteczek CD40 na limfocytach B osób chorych jest kompensacją pozwalającą na aktywowanie limfocytu B. Limfocyty B osób z ESRD być może mają obniżony w ten sposób próg aktywacji. Dodatkowo Epo w hodowli *in vitro* niweluje (zwłaszcza w stężeniu fizjologicznym) różnicę w czasie aktywacji limfocytu B (przy 0.1 U/ml Epo brak jest różnic w przejściu z fazy G0->G1 między wszystkimi grupami badanymi). Można więc postulować, że wysoka liczba cząsteczek CD40 na limfocycie B osób z ESRD i

dodatek Epo wyrównują tempo reakcji na antygen - w tym przypadku na przyłączenie antygeny CD40L z limfocytu Th.

Epo jest podstawowym czynnikiem regulującym produkcję erytrocytów, ponieważ jest niezbędna do różnicowania progenitorów erytroidalnych (kontroluje ich dojrzewanie, proliferację i przetrwanie). Wykazuje także bardzo ważną funkcję neuroprotekcijną a dożylne podawanie Epo może chronić przed ostrymi uszkodzeniami organów takim jak: udar niedokrwienno mózgu (Epo przenika barierę krew-mózg; egzogenna zaledwie w 1% dawki), uraz kręgosłupa, konsekwencje tępego uderzenia głowy, stan niedokrwienia siatkówki<sup>40</sup>. Wykazano także ochronne działanie Epo w stwardnieniu rozsianym, w stanach padaczkowych<sup>39,40</sup>, chorobie Parkinsona<sup>39</sup> oraz w przejściowych i trwałych okluzjach tętnicy wieńcowej<sup>40</sup>. Wcześniejsze badania naszego zespołu wykazały, że receptory dla Epo (EpoR) można znaleźć na komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (w tym na limfocytach B) i że – przynajmniej w przypadku komórek T – kontakt z Epo aktywuje określone ścieżki sygnalizacyjne<sup>51</sup>.

Moje badania wykazały, że Epo in vitro nie wywiera wpływu na liczbę cząsteczek CD40 na limfocytach B w poszczególnych grupach badanych. Natomiast wzór ekspresji CD40 na limfocytach B osób chorych przyjmujących Epo jest zbliżony do tego opisywanego na limfocytach B osób zdrowych bez względu na zastosowane stężenie Epo w hodowli. Może to sugerować, że regulacyjny efekt terapii Epo wobec ekspresji CD40 ma bardziej złożony, pośredni mechanizm.

Fizjologiczne stężenie Epo użyte in vitro ma przeciwny wpływ na poziom ekspresji IL-4R (który podnosi) i IL-5R (który redukuje) na limfocytach B osób zdrowych. Brak jest natomiast obserwowanego wpływu Epo na ekspresję tych receptorów na limfocytach B chorych z ESRD.

W przypadku receptora dla IL-10 na powierzchni limfocytów B, także odnajdywany jest wpływ Epo in vitro. Co ciekawe, po 72 godzinie hodowli ze stymulacją w środowisku z 0.1 U/ml jak i z 50 U/ml Epo, pacjenci z obu grup mają cząsteczek IL-10R znacząco więcej na powierzchni limfocytów B niż osoby zdrowe, a więc nie występuje tu raczej defekt niedoboru sygnalizacji postulowany dla ścieżki prowadzącej do zmian ekspresji IL-4R i IL-5R. Zastanawiająca jest wysoka liczba cząsteczek IL-10R na limfocytach B osób nieprzyjmujących Epo po 120 godzinach hodowli w środowisku bez Epo, z 0.1 U/ml i 50 U/ml Epo. Może ona raczej wskazywać na względnie nadmierną siłę sygnalizacji z receptora Epo po przyłączeniu cząsteczki hormonu na powierzchni limfocytów tych chorych.

Epo in vitro nie wpływa na produkcję IgM u osób zdrowych. Natomiast zauważalny jest korzystny wpływ Epo in vitro na produkcję IgM u osób chorych nieprzyjmujących Epo. Otóż tak po 72 jak i 120 godzinie hodowli oznaczalne stężenie Epo opisywane jest przy 0.1 U/ml i 50 U/ml w hodowli, podczas gdy poziomy IgM w hodowli bez Epo są bardzo. Poziomy IgG nie są wykrywalne w supernatantach po hodowli



od osób chorych nieprzyjmujących Epo, co nie znaczy, że IgG nie było produkowane. Być może liczba limfocytów B przełączonych na produkcję IgG w próbkach od osób chorych nieprzyjmujących Epo była zbyt niska, aby uzyskać wykrywalne miano IgG (może się to wiązać z wysoką apoptozą in vitro limfocytów B u tych osób). Epo in vitro ma więc wpływ na produkcję przeciwciał in vitro, szczególnie korzystny u chorych z ESRD.

Epo okazuje się także wpływać na liczbę podziałów limfocytów B u pacjentów z ESRD przyjmujących i nieprzyjmujących Epo. Im wyższe stężenie Epo w hodowli in vitro (maksymalnie 50 U/ml Epo) tym więcej podziałów przypada na jeden limfocyt B. U osób chorych nie odnotowano statystycznych różnic związanych ze stężeniem Epo a procentem proliferujących limfocytów B, choć istnieje tendencja do wzrostu odsetka proliferujących limfocytów B wraz ze wzrostem stężenia Epo. U osób zdrowych limfocyty B najlepiej proliferują w stężeniu 0.1 U/ml Epo, uznawanym za fizjologiczne a najslabiej w 50 U/ml Epo. Hormon wpływa także na czas przejścia limfocytów B z fazy G0 do fazy G1. Najkrótsze przejście to jest w limfocytach B osób z ESRD przyjmujących Epo (znacząca krótsze niż u osób nieprzyjmujących Epo). In vitro dała się zaobserwować tendencja do skracania tego czasu wraz ze wzrostem stężenia Epo. We wszystkich grupach badanych czas ten skracał się przyjmując często wartości poniżej 1 godziny od aktywacji limfocytów Th przez anti-CD3. Epo wpływa na długość cyklu limfocytów B wyłącznie w grupie zdrowych osób. Cykl jest najdłuższy przy 50 U/ml Epo.

Trzeba jednak stwierdzić, że pomimo obserwacji EpoR na limfocytach B, wpływ erytropoetyny na proliferację tych komórek jest z pewnością bardziej złożony i częściowo pośredni (poprzez stymulację komórek Th do wydzielania cytokin stymulujących limfocyty B). Dodatkowym elementem może tu być wpływ Epo na przeżywalność tych komórek. Osoby z ESRD przyjmujące Epo mają znacząco niższy odsetek limfocytów B apoptotycznych od osób z ESRD nieprzyjmujących Epo. Ujawnia się tu długofalowy efekt podawania Epo, jako że wszyscy pacjenci przyjmujący Epo, byli nią suplementowani co najmniej przez 3 miesiące. Bardzo ciekawa zależność dotyczy stężenia Epo w hodowli in vitro i odsetka limfocytów B apoptotycznych. Epo in vitro działa ochronnie na limfocyty B osób z ESRD przyjmujących Epo. Przy 50 U/ml Epo osoby te mają najniższy odsetek limfocytów B apoptotycznych w swojej grupie. Z kolei limfocyty B osób zdrowych mają znacznie niższą apoptozę w niższych stężeniach Epo (najniższą przy braku Epo in vitro). Epo in vitro zdaje się natomiast nie wpływać na apoptozę limfocytów B osób chorych nieprzyjmujących Epo, u których niezależnie od zastosowanego stężenia Epo in vitro odsetek ten jest najwyższy ze wszystkich badanych grup.

Niniejsze badania dostarczają wielu informacji na temat zaangażowania Epo w biologię limfocytów B. Opisują znaczne różnice w poziomach ekspresji podstawowych antygenów powierzchniowych



limfocytów B, nie tylko między osobami zdrowymi a chorymi, ale także wskazują na różnice dotyczące limfocytów B osób z ESRD przyjmujących i nieprzyjmujących Epo.

Wpływ Epo in vitro na poszczególne antygeny i parametry limfocytów B został podsumowany w tabeli 3.

Do niedawna informacje na temat limfocytów B u osób hemodializowanych pojawiały się głównie w pracach przeglądowych, w których poświęcano im zwykle kilka, do tego często sprzecznych, zdań dotyczących produkcji immunoglobulin. Zawsze wyróżniano, że komórkami upośledzonymi w ESRD są głównie limfocyty T i komórki prezentujące antygeny (APC). Żaden z autorów nigdy nie podkreślił faktu, że informacje, dotyczące limfocytów B, nawet w najnowszych pracach przeglądowych pochodzą bardzo często z lat 80-tych ubiegłego wieku.

Jedynymi badaniami nawiązującymi do przedstawionego tematu są badania Pahl i współpracowników<sup>17</sup>. Różnią się one jednak znacząco od przedstawionych w tej rozprawie, z tego względu, że Pahl prowadzi badania w USA, gdzie niemal wszyscy pacjenci z ESRD otrzymują Epo. W Polsce decyzja o zastosowaniu Epo u danego chorego jest względnie późna, mimo dobroczynnych efektów hormonu na erytropoezę i w konsekwencji natlenowania narządów. Stwierdzono, że wzrost stężenia Hb o >1 g/dl na dwa tygodnie przyczynia się do zwiększonej częstości występowania zawału serca, udaru mózgu, zastoinowej niewydolności serca i zakrzepicy dostępu naczyniowego w hemodializie (dotyczy pacjentów z nowotworami jak i pacjentów hemodializowanych)<sup>49</sup>. W naszym kraju zaledwie 37.1% pacjentów PChN osiąga po 3 miesiącach leczenia Epo poziom hemoglobiny równy bądź wyższy 11 g/dl i stanowi to o połowę gorszy wynik niż w innych krajach objętych badaniem Europejskiego Programu Analizy Leczenia Niedokrwistości (ESAM II). W Polsce znacznie lepsze rezultaty osiąga się u pacjentów poddawanych dializom otrzewnowym (DO; zachowana resztkowa funkcja nerek) niż hemodializom- poziom co najmniej 11g/dl Hb osiąga się u 67.6% pacjentów DO i u 28.9% pacjentów HD<sup>50</sup>. Głównymi przyczynami takiego stanu rzeczy w naszym kraju są: późne włączanie leczenia Epo (dopiero przy stężeniu Hb<10 g/dl) i o ok. 50% niższa dawka Epo w porównaniu z innymi krajami. Oba te zjawiska wynikają ze złej sytuacji finansowej polskiej służby zdrowia. Mimo tych nienajlepszych wyników, w porównaniu z latami 90-tych XX wieku poczyniono w Polsce duży postęp w leczeniu anemii u pacjentów z PChN. Obecnie blisko 60% chorych w momencie włączenia terapii Epo ma stężenie Hb>10 g/dl (ówczesznie ok. 90% pacjentów miało stężenie Hb<10 g/dl)<sup>50</sup>.

Wpływ Epo in vitro na limfocyty B	Osoby zdrowe	CH Epo +	CH Epo-
BAFF-R	-	-	-
CD40	-	-	-
IL-4R	+	b.d.	-
IL-5R	+	b.d.	-
IL-10R	+	+	+
Produkcja przeciwciał	-	b.d.	+
Liczba podziałów	-	+	+
Proliferacja	+	-	-
G0->G1	+	-	-
Długość cyklu	+	-	-
Apoptoza	+	+	-

Tabela 3. Wpływ zastosowania Epo in vitro na antygeny i parametry limfocytów B we wszystkich grupach badanych, bez uwzględnienia stężenia Epo. "CH Epo +" - pacjenci z ESRD przyjmujący Epo, "CH Epo -" - pacjenci z ESRD nieprzyjmujący Epo. "B.d." - brak danych; w przypadku proliferacji i antygenu CD40 brak jest różnic istotnych statystycznie, ale istnieje zauważalna tendencja opisująca wzrost odsetka limfocytów B proliferujących wraz ze wzrostem stężenia Epo w hodowli.

Najprawdopodobniej z tego samego powodu (brak porównawczej grupy chorych nieleczonych Epo), badania Pahl nie wykazują różnic w produkcji IL-10 między zdrowymi a chorymi. Wcześniejsze prace naszego zespołu wykazały różnicę między zdrowymi a chorymi w produkcji IL-10, która niwelowana jest przez podanie Epo<sup>18</sup>. Pahl et al. wykazali, że pacjenci z ESRD mają podwyższone stężenia BAFF i IL-7 we krwi, w porównaniu z osobami zdrowymi<sup>17</sup>. W tej pracy wykazałam, że receptor dla BAFF obficie występuje na limfocytach B osób chorych nieprzyjmujących Epo. Jako że Pahl prowadziła badania w grupie chorych przyjmujących Epo, można sądzić, że podawanie Epo nie wpływa na komórki produkujące BAFF (komórki dendrytyczne, monocyty, limfocyty T<sup>105</sup>). W związku z wynikami badań naszego zespołu można wykluczyć z nich monocyty i limfocyty T, których produkcja cytokin jest normalizowana pod wpływem Epo<sup>18</sup>. Można więc podejrzewać, że głównymi komórkami odpowiedzialnymi za nadprodukcję BAFF u chorych na PChN są komórki dendrytyczne. Co za tym idzie - są prawdopodobnie Epo-niezależne, co potwierdza dotychczasowy brak wykrycia receptora dla Epo na ludzkich komórkach dendrytycznych (jedyna dostępna praca opisuje EpoR na niedojrzałych szpikowych komórkach dendrytycznych szczura<sup>106</sup>). Postulować więc można nadreaktywność tych komórek w PChN.

Pahl zauważa, że subpopulacja przejściowych limfocytów B T1 (CD19+CD10+) nie jest tak niefunkcjonalna, mimo obniżonej ekspresji BAFF-R, w stadium ESRD jak limfocyty B2 (konwencjonalne), postulując, że głównym problemem u pacjentów nie jest nieprawidłowa produkcja limfocytów B w szpiku kostnym a przewlekła uremia (m.in. wysoka zawartość azotynów we krwi). Aspekt wpływu hemodializy został odrzucony przez Pahl, ze względu na przytaczane badania, w których nie wykryto różnic między limfocytami B chorych niedializowanych, poddawanych hemodializie i dializie otrzewnowej<sup>17</sup>. Kwestia ta jest dyskusyjna, gdyż zaburzenia w przejściowych limfocytach B T1 być może nie są odnajdywane z tego względu, że ta subpopulacja nie krąży tak długo we krwi a co za tym idzie nie ma kontaktu z błoną dializacyjną (opuszcza szpik i trafia do drugorzędowych tkanek limfatycznych- śledziona, węzły chłonne, kępki Peyera). Badania naszego zespołu udowodniły negatywny wpływ hemodializy na limfocyty Th<sup>16</sup> a niniejsza praca dowodzi, że także limfocyty B są zmienione. Frakcja przejściowych limfocytów B jest „schowana” przed hemodializą w szpiku i tkankach, więc głównym problemem zdaje się być nie stan uremii a hemodializa, która negatywnie wpływa również na limfocyty B.

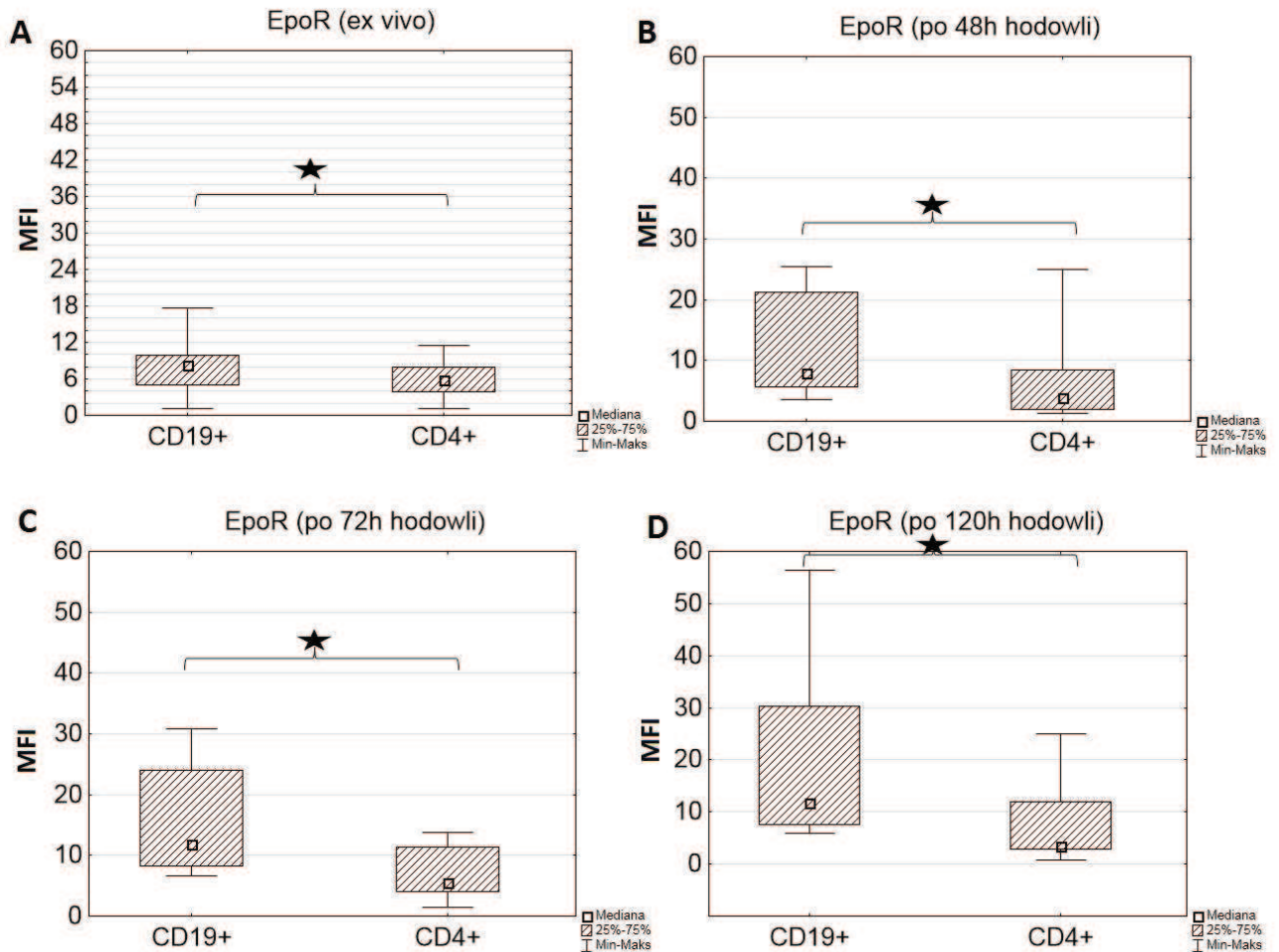
Niższą ekspresję BAFF-R na przejściowych limfocytach B osób hemodializowanych Pahl tłumaczy wysokim stężeniem BAFF na obwodzie. Gdyby to była rzeczywista przyczyna to dojrzałe obwodowe limfocyty B także miałyby obniżoną ekspresję BAFF-R. Jednakże moja praca wskazuje kolejny raz na rolę hemodializy, gdyż dojrzałe limfocyty B osób chorych nieprzyjmujących Epo charakteryzują się bardzo wysoką ekspresją BAFF-R. W kontekście moich wyników uzyskanych przy ocenie apoptozy komórek, wydaje się, że hemodializa wywiera długofalowy skutek na limfocyty B, gdyż nawet w hodowli komórkowej, wyższy odsetek limfocytów B umiera u osób chorych.

Nie posiadamy, na dzień dzisiejszy, potrzebnej wiedzy, aby ocenić wpływ każdego z zastosowanych materiałów tworzących błony dializacyjne na komórki krwi obwodowej, ale ostatnie badania dowodzą, że apoptoza tych komórek jest znacząco obniżona przy zastosowaniu wielowarstwowych błon dializacyjnych opłaszczonych witaminą E, która stopniowo uwalniana jest podczas hemodializy (błony dializacyjne pacjentów włączonych do moich badań nie były opłaszczone tą witaminą). Witamina E hamuje także apoptozę tych komórek *in vitro*<sup>24</sup>. Także suplementowanie pacjentów witaminą E wywiera dobry efekt na żywotność ich leukocytów, prawdopodobnie poprzez zmniejszanie stresu oksydacyjnego<sup>24</sup>.

Zastosowanie dializy otrzewnowej (DO), w której błonę filtracyjną stanowi otrzewna pacjenta, eliminuje problem przyspieszonej apoptozy leukocytów<sup>24</sup>. Mimo to w ostatnich latach ci pacjenci, którzy ze względu na stan zdrowia (zachowana resztkowa czynność nerek) mogą wybrać typ dializ, coraz rzadziej decydują się na ciągła ambulatoryjną dializę otrzewnową (CAPD) czy automatyczną dializę otrzewnową (ADO) i wybierają hemodializę (HD). Pacjenci, których limfocyty B badałam, byli poddawani wyłącznie hemodializie, która mogła spowodować wyższy odsetek apoptotycznych komórek B.

W niniejszych badaniach zwraca się uwagę na dwa efekty Epo: krótko- i długofalowe. Do krótkofalowych zaliczane są te obserwowane w ciągu 5-dniowej hodowli *in vitro*. Do długofalowych te, które rozróżniają parametry limfocytów B pacjentów przyjmujących i nieprzyjmujących Epo. Przy zastosowanym modelu nie da się jednoznacznie określić czy Epo wpływa bezpośrednio na limfocyty B czy pośrednio np. poprzez stymulację monocytów i/lub limfocytów T, które były obecne wśród PBMC. We wcześniejszych badaniach zespołu Katedry Fizjopatologii, dotyczących wpływu Epo na limfocyty Th (CD4+), udowodniono, że Epo *in vitro* zwiększa produkcję IFN- $\gamma$  i IL-10 natomiast nie wpływa na stężenie IL-4 i IL-5 u osób hemodializowanych<sup>54</sup>. Udowodniono także, że limfocyty Th osób hemodializowanych przyjmujących Epo wykazują w trakcie stymulowanej anty-CD3 hodowli *in vitro* większą liczbę cząsteczek CD40L oraz CD28 niż hemodializowani nieprzyjmujący Epo<sup>54</sup>. CD40L i CD28 są ligandami odpowiednio CD40 i CD80 na powierzchni limfocytu B, a więc za silniejszą odpowiedź limfocytów B może odpowiadać silniejsza odpowiedź limfocytów Th w obecności Epo. Dodatkowo nasz zespół wykazał słabszą proliferację limfocytów Th pacjentów hemodializowanych nieprzyjmujących Epo. Pacjenci hemodializowani nieprzyjmujący Epo mają także obniżony odsetek proliferujących limfocytów B w hodowli. Można wnioskować więc, że Epo wywiera bezpośredni efekt zarówno na limfocyty B jak i limfocyty Th poprzez receptor dla Epo na ich powierzchni. Efekt wydaje się być wzmożony w limfocytach B z tego względu, że stymulowane są one także pośrednio poprzez aktywowane limfocyty Th, które mają więcej cząsteczek CD40L i CD28 na swojej powierzchni. Wcześniejsze badania opisują także wpływ Epo na obniżenie odsetka apoptotycznych limfocytów Th2, jednakże w badaniach tych pacjenci hemodializowani nie zostali podzieleni na grupy przyjmujące i nieprzyjmujące Epo.

Porównanie ekspresji receptorów EpoR na limfocytach B i Th (we współpracy z dr Lisowską) u tych samych pacjentów ujawniło istotne statystycznie różnice w liczbie cząsteczek tego receptora na tych populacjach limfocytów w grupie osób hemodializowanych przyjmujących Epo (Rys. 56).



Rys. 51 Ekspresja EpoR na limfocytach B (CD19+) oraz limfocytach Th (CD4+) ex vivo (A) oraz w trakcie hodowli komórkowej stymulowanej anti-CD3 (B, C, D) u tych samych pacjentów hemodializowanych przyjmujących Epo. Gwiazdka, gdy  $p < 0.05$  (Test kolejności par Wilcoxon).

Z badań tych wynika, że limfocyty B osób z ESRD przyjmujących Epo (Epo+) mają znacząco więcej EpoR na powierzchni niż limfocyty Th. Różnica ta nie jest odnajdywana w grupie pacjentów ESRD nieprzyjmujących Epo i osób zdrowych. Z innych badań Lisowskiej et al. wiemy, że limfocyty Th osób chorych przyjmujących Epo charakteryzują się największą ekspresją EpoR na powierzchni tych komórek<sup>51</sup>. Badania niniejsze uzupełniają informacje dotyczące tych pacjentów wskazując na jeszcze większą ekspresję tego receptora na limfocytach B tych pacjentów. W zestawieniu z korzystnym wpływem egzogennej Epo m.in. na produkcję immunoglobulin wykazany w tej pracy, może to świadczyć o większym zapotrzebowaniu limfocytów B chorych na Epo, prawdopodobnie związanym z niedoborem erytropoetyny wynikającym z uszkodzenia nerek.

Przyjmowanie przez pacjentów z ESRD Epo, co najmniej przez 3 miesiące, przyczynia się do stabilizacji właściwości i funkcji limfocytów B.

Praca ta opisuje znaczące różnice w sile syntezy antygenów, znajdujących się na powierzchni limfocytów B między osobami zdrowymi a chorymi ze schyłkową niewydolnością nerek. Dodatkowo opisuje wpływ Epo in vitro oraz skutki długoterminowego podawania Epo in vivo na układ immunologiczny, dowodząc, że Epo moduluje, poza reakcją limfocytów Th, także odpowiedź limfocytów B.

## **12 Wnioski.**

1. Zmiana fenotypu limfocytów B może być jedną z przyczyn defektu układu odpornościowego u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek (ESRD).
2. Z badań in vitro wynika, że bardziej narażonymi pacjentami na choroby infekcyjne są pacjenci nieprzyjmujący Epo. Znane doniesienia opisujące słabą odpowiedź pacjentów z ESRD na szczepienia, dotyczą prawdopodobnie głównie tej, uprzednio niescharakteryzowanej, grupy pacjentów.
3. Ze względu na korzystny wpływ Epo na limfocyty B u osób ze schyłkową niewydolnością nerek, należałoby rozważyć podawanie Epo pacjentom z zaburzeniami odpowiedzi humoralnej (nawet przy niewielkich niedoborach w układzie czerwono krwinkowym, kiedy to jej podanie nie jest dzisiaj, w takim wypadku, wskazaniem). Byłoby to krokiem ku, tak bardzo potrzebnej, terapii indywidualnej.

## 13 Streszczenie.

Schyłkowa niewydolność nerek (ESRD) jest V najcięższym stadium przewlekłej choroby nerek, kiedy to współczynnik przesączania kłębuszkowego spada poniżej 15 ml/min. Jednym z poważniejszych problemów dotyczących osób cierpiących na ESRD, poza oczywistymi powikłaniami związanymi z niedostateczną pracą nerek, są często występujące infekcje, wynikające m.in. z niedoboru produkcji przeciwciał, co sugeruje zaburzenia dotyczące limfocytów B. W przeszłości opisano szereg zaburzeń związanych z wydajnością obronnej reakcji komórkowej u tych pacjentów (produkcja cytokin, funkcje makrofagów, limfocytów Th oraz Tc), jednakże opis reakcji humoralnej jak i funkcji limfocytów B jest nadal tematem bardzo słabo opisanym (nieliczne wzmianki o zaburzeniach produkcji przeciwciał i odsetku limfocytów B u chorych). W pilotowych doświadczeniach zauważono, że w stymulowanych immobilizowanym anty-CD3 hodowlach jednojądrzastych komórek krwi (PBMC), oprócz pobudzenia proliferacji limfocytów T, dochodzi także do zauważalnej proliferacji limfocytów B. Taka niebezpośrednia stymulacja spoczynkowych limfocytów B nie została wcześniej opisana. Dlatego w tej pracy postanowiono wykorzystać wyżej wymieniony model do porównania właściwości limfocytów B u osób chorych ze schyłkową niewydolnością nerek i u osób zdrowych. Ze względu na wcześniejsze obserwacje naszego zespołu, dotyczące wpływu erytropoetyny (Epo) na właściwości limfocytów T, postanowiono sprawdzić czy Epo (zarówno podawana chorem, jak też stosowana *in vitro*) ma wpływ na badane cechy komórek B.

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) izolowane od osób chorych w końcowym stadium przewlekłej choroby nerek i od odpowiednio dobranych zdrowych osób (kontroli), hodowane były w obecności anty-CD3. Komórki hodowane były przez 5 dni, bez lub w obecności Epo w stężeniu 0.1 U/ml i 50 U/ml. Fenotyp powierzchni limfocytów B oceniono przy zastosowaniu cytometru przepływowego oraz panelu przeciwciał monoklonalnych. Do oceny parametrów proliferacji zastosowano cytometryczną technikę Dividing Cell Tracing (DCT) i wcześniej opracowaną analizę matematyczną. Wielkość produkcji przeciwciał *in vitro* została określona techniką immunoenzymatyczną.

Niniejsze badania ujawniły szereg nieprawidłowości w limfocytach B osób chorych w porównaniu do zdrowych i dodatkowo wskazały na istotne różnice pomiędzy limfocytami B osób chorych przyjmujących rekombinowaną ludzką erytropoetynę (Epo+) z powodu anemii jak i tych nieprzyjmujących Epo (Epo-).

Odsetek limfocytów B w puli limfocytów w każdym punkcie czasowym hodowli był niższy u osób chorych niż u zdrowych; zmienione były także dynamiczne parametry ich proliferacji (czas wyjścia z G0 do G1, procent dzielących się komórek), co świadczy o poważnym defekcie proliferacji limfocytów B u chorych z ESRD. W konsekwencji, limfocytów B zwłaszcza u osób chorych Epo- powstawało znacząco mniej niż



limfocytów B chorych przyjmujących Epo (Epo+), co wskazuje na korzystną rolę suplementacji Epo in vivo. U chorych Epo- znajdowano także najwyższy odsetek limfocytów B ulegających apoptozie związanej z aktywacją in vitro. Już w fizjologicznym stężeniu 0.1 U/ml Epo in vitro obniżała apoptozę limfocytów B u chorych Epo+, nie chroniła jednak limfocytów B przed apoptozą w hodowli in vitro u osób chorych nieprzyjmujących Epo i, co dziwne, zwiększała apoptozę limfocytów B osób zdrowych w hodowli. Epo dodana in vitro normalizowała dynamiczne parametry proliferacji komórek B (np. czas przejścia limfocytów B z fazy G0->G1, długość cyklu komórkowego) we wszystkich badanych grupach.

Wysokie, нефизjologiczne stężenie Epo (50 U/ml) w hodowli in vitro miało negatywny wpływ na limfocyty B osób zdrowych - spadek odsetka proliferujących komórek, drastyczne skrócenie czasu przejścia z fazy G0->G1, wydłużenie cyklu komórkowego, wzrost odsetka komórek apoptotycznych, brak produkcji IgG. Natomiast u osób Epo- wysokie stężenie Epo w hodowli in vitro powodowało wzrost produkcji przeciwciała IgM (u osób zdrowych nie odnotowuje się takiego efektu). Stężenie przeciwciała IgM uzyskanego po hodowli stymulowanej anty-CD3 nawet w obecności Epo pozostawało jednak znacznie niższe u osób Epo- niż u osób zdrowych. Limfocyty B osób Epo- nie produkowały wykrywalnych stężeń przeciwciała IgG w żadnym ze stężeń Epo w hodowli. Ciekawostką jest, że w obecności 50 U/ml Epo w hodowli limfocyty B osób zdrowych także nie produkowały IgG w mianie wystarczającym do wykrycia.

Opisane powyżej różnice dotyczące proliferacji i sekrecji przeciwciał in vitro obserwowane u chorych z ESRD mogą zależeć od zmienionej reakcji limfocytów B na komórkowe (CD40L) i humoralne (BAFF, IL-4, IL-5, IL-10) czynniki warunkujące prawidłową kooperację z limfocytami T. W tej pracy wykazano znaczące różnice w ekspresji receptorów cytokin (IL-4R, IL-5R, IL-10R), a także receptorów BAFF-R i CD40 na limfocytach B między osobami zdrowymi a chorymi z ESRD, reagujące w różny sposób na terapeutyczną (in vivo) lub doświadczalną (in vitro) suplementację Epo.

Podsumowując, w pracy wykazano istotne różnice w dynamice proliferacji i sekrecji przeciwciał pomiędzy limfocytami osób chorych z ESRD i zdrowych (prawdopodobnie odpowiedzialne za niedobór odpowiedzi humoralnej u chorych), a także wskazano na możliwe mechanizmy tych różnic i możliwość ich przynajmniej częściowej normalizacji poprzez suplementację erytropoetyną.

## 14 Abstract.

End stage renal disease (ESRD) is the 5<sup>th</sup> most severe stage of chronic renal disease, when the glomerular filtration rate falls below 15 ml/min. One of the major problems of people suffering from ESRD, beyond the obvious complications associated with inadequate kidneys' function are frequent infections, resulting from - inter alia - antibody production deficiency, suggesting a B cell disorder. There is a number of disorders described as associated with immune cellular response performance in these patients (including problems with production of cytokines, the functions of macrophages, lymphocytes Th and Tc), but the description of the humoral response and B-cell function is still very poorly known (just a few references to antibody production disturbances and the percentage of B cells in patients found in the literature). In our pilot experiments, it was noted that cultured blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with immobilized anti-CD3, besides the stimulation of T-cell proliferation, lead also to noticeable proliferation of B cells. Such an indirect stimulation of resting B lymphocytes has not been previously described. Therefore, in this work it was decided to use the above-mentioned model to compare the properties of B cells in patients with end stage renal disease (ESRD) and healthy subjects. Due to the earlier observations of our team regarding the effect of erythropoietin (Epo) on the properties of T cells, it was decided to check whether Epo (both administered to the patient, and also used in vitro) has an impact on the B cell properties.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from patients with ESRD and appropriately selected healthy individuals (controls) were cultured in the presence of anti-CD3. The cells were cultured for 5 days without or in the presence of Epo concentration of 0.1 U/ml and 50 U/ml. B cell surface phenotype was assessed by flow cytometry and a panel of monoclonal antibodies. To assess the proliferation parameters a Dividing Cell Tracing (DCT) cytometry technique and the previously developed mathematical analysis were used. The production of antibodies in vitro was determined by enzyme immunoassay technique.

This study revealed a number of abnormalities in B cells of the patients compared to healthy controls and additionally showed a significant difference between the B cells of patients receiving recombinant human erythropoietin (Epo +) due to anemia compared to those not receiving Epo(Epo-).

The percentage of B cells among the PBMC lymphocytes in cultures at each time point was lower in patients than in healthy subjects; the dynamic parameters of their proliferation (time of transition from G0 to G1, the percentage of dividing cells) were also changed, which indicates a serious defect of B cell

proliferation in patients with ESRD. Consequently, B lymphocytes especially in Epo- patients arose significantly less than the B-lymphocytes of patients treated with Epo (Epo+), indicating the beneficial role of Epo supplementation in vivo. Epo- patients were also found to have the highest percentage of B cells undergoing apoptosis associated with activation in vitro. Already in the physiological concentration of 0.1 U/ml Epo in vitro, apoptosis of B cells decreased in Epo+ patients, but Epo did not protect against apoptosis of B cells cultured in vitro in patients not taking Epo and, oddly enough, increased B cell apoptosis in healthy individuals in culture. Epo added in vitro normalized dynamic parameters of B cell proliferation (e.g. B cells G0->G1 transition time, cell cycle length) in all groups.

High, non-physiological concentrations of Epo (50 U/ml) in the in vitro cultures had a negative impact on healthy B-cells - a decrease in the percentage of proliferating cells, a drastic shortening of the G0-> G1 transition, cell cycle elongation, increase in the percentage of apoptotic cells, and the lack of IgG production. However, in Epo- individuals, high concentrations of Epo in culture resulted in increased production of IgM antibodies (in healthy subjects such an effect was not recorded). The concentration of IgM antibody obtained after anti-CD3-stimulated culture, even in the presence of Epo remained extremely lower in Epo- patients than in healthy subjects. B cells of Epo- patients did not make detectable levels of IgG antibodies at either Epo concentration in culture. It is interesting that, in the presence of 50 U/ml Epo in the culture, B cells of healthy people also did not produce detectable IgG.

The differences in cell proliferation and antibody secretion in vitro between ESRD patients and healthy individuals described above may depend on the modified B-lymphocytes' response to cellular (CD40L) and humoral (BAFF, IL-4, IL-5, IL-10) factors affecting normal cooperation with the T cells. This work demonstrated the significant differences in the expression of cytokine receptors (IL-4R, IL-5R, IL-10R), as well as BAFF-R receptors, and CD40 on B cells between healthy individuals and patients with ESRD, reacting in different ways to therapeutic (in vivo) or experimental (in vitro) supplementation with Epo.

In summary, the study showed significant differences in the dynamics of cell proliferation and antibody secretion between the B lymphocytes of patients with ESRD and healthy people (probably responsible for the deficiency of humoral response in patients), and indicated the possible mechanisms of these differences and the ability to, at least partially, normalize them through the supplementation with erythropoietin.

## 15 Literatura.

1. Król E, Rutkowski B. Przewlekła choroba nerek- klasyfikacja, epidemiologia i diagnostyka. *Forum Nefrologiczne*, (1) 1: 1-6 (2008).
2. Levin A. et al. Guidelines for the management of chronic kidney disease. *Canadian Medical Association Journal*, 11 (179) (2008)
3. Initiative K. D. O. Q. KDOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for diabetes and chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*, 49: 12-154 (2007).
4. Coresh J. et al. Prevalence of high blood pressure and elevated serum creatinine level in the United States: Findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). *Arch Intern Med*, 161: 1207-1216 (2001).
5. National Kidney and Urologic Diseases Information Clearinghouse (NKUDIC) Kidney and Urologic Diseases Statistics for the United States. (2011) dostęp 24.04.2012 <http://kidney.niddk.nih.gov/kudiseases/pubs/kustats/#2>>
6. Dulko S, Ćwiek G. Przewlekła choroba nerek (PChN)- dializa otrzewnowej. *biomedical.pl* (2008) dostęp 11.10.2012 <http://www.biomedical.pl/zdrowie/przewlekla-choroba-nerek-pchn-dializa-otrzewnowej-219.html>>
7. National Kidney Foundation (2012) dostęp 7.07.2012 <http://www.pulsmedycyny.com.pl/index/archiwum/7872/1.html>>
8. Rutkowski B, Król E. Częstość występowania przewlekłej choroby nerek pośród uczestników badania przesiewowego 'Uwaga nerki' obejmującego mieszkańców Krakowa i Warszawy. *Nefrol Dial Pol*, 13: 198-202 (2009).
9. Ronald M, Goldin MD. Hypertension and CKD. *Kidney Beginnings: The Magazine*, (4) 1 (2005).
10. Zarzecki M. et al. Przyczyny przewlekłej niewydolności nerek i stan kliniczny chorych w chwili rozpoczęcia hemodializoterapii na obszarze Górnego Śląska. *Wiadomości Lekarskie*, LVII: 3-4 (2004).
11. Rutkowski B. PChN w praktyce lekarza poz. *Puls Medycyny* (2007) dostęp 13.04.12 <http://www.pulsmedycyny.com.pl/index/archiwum/7872/1.html>>
12. Cohen L et al. *American Association of Diabetes Educators (AADE) Position Statement- Diabetic Kidney Disease* (2009).
13. Czekalski S, Drabczyk R. Śródmiąższowe zapalenie nerek. dostęp 13.04.2012 <http://nefrologia.mp.pl/choroby/chorobyudoroslych/show.html?id=51930>>
14. Fasolato S et al. Renal Failure and Bacterial Infections in Patients with Cirrhosis: Epidemiology and Clinical Features. *Hepatology*, 45: 223-229 (2007).

15. Terra C et al. Renal failure in patients with cirrhosis and sepsis unrelated to spontaneous bacterial peritonitis: value of MELD score. *Gastroenterol*, 125: 1944-1953 (2005).
16. Lisowska K et al. Hemodialysis affects phenotype and proliferation of CD4-positive T lymphocytes. *J Clin Immunol* 32, 189–200 (2012).
17. Pahl MV et al. Effect of End-Stage Renal Disease on B Lymphocytes Subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. *Am J Nephrol*, (31) 3: 247-254 (2010).
18. Lisowska K et al. Recombinant human erythropoietin treatment of chronic renal failure patients normalizes altered phenotype and proliferation of CD4-positive T lymphocytes. *J Artif Organs*, 34 (3): 77-84 (2010).
19. Agrawal S et al. Leptin activates human B cells to secrete TNF-alpha, IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 signaling pathway. *J Clin Immunol*, 31, 472–478 (2011).
20. Wolfe A et al. Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder. *J Clin Microbiol*, 50 (4): 1376- 1383 (2012).
21. Patients of American Association of Kidney. *What kind of infections can occur in hemodialysis patients?* aakp RENALIFE, 18 (3) (2002).
22. Szmidi J, Grochowicki T. *Dializoterapia w praktyce lekarskiej* (Rutkowski B.) 527–537 (MAKmedia, 2004).
23. Smoleński O. *Dializoterapia w praktyce lekarskiej* (Rutkowski B.) 345–353 (MAKmed, 2004).
24. Galli F et al. Mononuclear leukocyte apoptosis in haemodialysis patients: the role of cell thiols and vitamin E. *Nephrol Dial Transplant*, 18, 1592-1600 (2003).
25. Beckman M, Downs R Vitamin D insufficiency- what the primary care provider needs to know. *CKD Update- Attacking Chronic Kidney Disease* (2006) dostęp 8.07.12<[http://www.imakenews.com/ckdupdate/e\\_article000556042.cfm?x=b11,0,w](http://www.imakenews.com/ckdupdate/e_article000556042.cfm?x=b11,0,w)>
26. Cannel JJ & Hollis BW Use of vitamin D in clinical practice. *Alternative Medicine Review* 13, 6–20 (2008).
27. Holick MF Vitamin D Deficiency. *N Eng J Med* 266–281 (2007).
28. Williams S, Malatesta K, Norris K Vitamin D and chronic kidney disease. *Ethn Dis* 19, S5–8–11 (2009).
29. Chen S et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol* 1634–1647 (2007).
30. Cantorna MT Why do T cells express the vitamin D receptor? *Ann N Y Acad Sci* 77–82 (2011).
31. Qi X-P, Li G, Sun Z & Li J-S 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates LPS-induced cytokine production and reduces mortality in rats. *World J Gastroenterol* 14, 3897–3902 (2008).
32. Deluca H & Cantorna M Vitamin D: its role and uses in immunology. *Th FASEB Journal* 15, 2579–2585 (2001).

33. Bryl E *et al.* The influence of recombinant human erythropoietin on tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 production by whole blood cell cultures in hemodialysis patients. *Artif Organs*, 22, 177–181 (1998).
34. Ashraf AP *et al.* Associations of C-reactive protein to indices of vascular health and the influence of serum 25(OH)D status in healthy humans. *J Nutr Metab* (2012) doi:10.1155/2012/475975
35. Urashima M *et al.* Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren. *Am J Clin Natur*, 91, 1255–1260 (2010).
36. Yusupov E *et al.* Vitamin D and serum cytokines in a randomized clinical trial. *International Journal of Endocrinology* ID 305054, (2010).
37. Wang T-T, Nestel FP & Bourdeau V Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression Cutting. *J Immunol*173, 2909–2912 (2004).
38. Mehrotra R *et al.* Hypovitaminosis D in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 1144–1151 (2008).
39. Saganowska R. Erythropoetyna- rola fizjologiczna i zastosowanie terapeutyczne. *Przegląd Pediatryczny*, 38 (4): 313-318 (2008).
40. Rossert, J, Eckardt, KU. Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrol Dial Transplant*, 20, 1025-1028 (2005).
41. Ehrenreich H. *et al.* Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *American Heart Association*, 40, 647-656 (2009).
42. Ehrenreich H. *et al.* Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Molecular Medicine*, 8 (8): 495-505 (2002).
43. Rutkowski B *et al.* *Erythropoetyna- od odkrycia do zastosowań klinicznych* (Rutkowski B.) 16–53 (MAKmed, 2001).
44. Jurkovitz C *et al.* Association of high serum creatinine and anemia increases the risk of coronary events: results from the prospective community-based atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *J Am Soc Nephrol*, 11, 2919-2925 (2003).
45. Formanowicz D. Niedokrwistość w schyłkowej niewydolności nerek- od odkrycia do czasów współczesnych. *Nowiny Lekarskie*, 75 (6): 576-581 (2006).
46. Grenda R, Rutkowski P, Rutkowski B, *Erythropoetyna- od odkrycia do zastosowań klinicznych, rozdz. Objawy niepożądane leczenia erythropoetyną- mity i fakty* (MAKmed, 2001).
47. Rutkowski B *et al.* Changes in erythrocytes (E) bilayer during erythropoietin (r-Epo) treatment. *Wichtig Editore*, 203-205 (1992).
48. KDOQI Clinical Practice Guideline and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease: 2007 Update of Hemoglobin Target. dostęp22.11.2012 [http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines\\_anemiaUP/guide1.htm#rationale211](http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_anemiaUP/guide1.htm#rationale211)>

49. Erythropoiesis stimulating proteins review. Provider Synergies, L.L.C. (2010).
50. Rutkowski B. *Optymalizacja terapii niedokrwistości erytropoetyną u pacjentów hemodializowanych, rozdz. Czynniki wpływające na efektywność leczenia niedokrwistości (analiza wyników ESAM i OPTIMA)* (Rutkowski B.) 9–22 (GRAPHICS W. Szkudlarek, 2004).
51. Lisowska KA et al. Erythropoietin receptor is expressed on human peripheral blood T and B lymphocytes and monocytes and is modulated by recombinant human erythropoietin treatment. *Artificial Organs*, 34 (8): 654–662 (2010).
52. Cazac BC, Roes J TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity*, 13, 443–451 (2000).
53. Yamada T et al. CD45 controls interleukin-4-mediated IgE class switch recombination in human B cells through its function as a Janus kinase phosphatase. *J Biol Chem*, 277, 28830–28835 (2002).
54. Lisowska KA et al. The influence of recombinant human erythropoietin on apoptosis and cytokine production of CD4+ lymphocytes from hemodialyzed patients. *J Clin Immunol*, 33 (3), 661–665 (2013)
55. Zarnegar B et al. Unique CD40-mediated biological program in B cell activation requires both type 1 and type 2 NF-kB activation pathways. 8108–8113 (2004).
56. Kawabe T et al. CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity. *Nagoya J Med Sci*, 73 (3-4): 69–78 (2011).
57. Ramsay L, Fuleihan MD Hyper IgM syndrome: the other side of the coin. *Curr Opin Pediatr* 528–532 (2001).
58. Nanoyama S et al. B cell activation via CD40 is required for specific antibody production by antigen-stimulated human B cells. *J Exp Med*, 178 (3): 1097–1102 (1993).
59. Gołąb J, Jakóbsiak M *Immunologia, rozdz. Cytokiny*, 108–152 (Wydawnictwo Naukowe PWN, 2009).
60. Fairfax KA, Kallies A, Nutt SL, Tarlinton DM Plasma cell development: From B-cell subsets to long-term survival niches. *Seminars in Immunology*, 20, 49–58 (2008).
61. Iwata Y et al. Characterization of a rare IL-10- competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 117, 530–541 (2011).
62. Yanaba K et al. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol*, 182, 7459–7472 (2009).
63. Rush JS, Hodgkin P. B cells activated via CD40 and IL-4 undergo a division burst but require continued stimulation to maintain division, survival and differentiation. *Eur J Immunol*, 31, 1150–9 (2001).
64. Horikawa K, Takatsu K Interleukin-5 regulates genes involved in B-cell terminal maturation. *Immunology*, 118, 497–508 (2006).
65. Nakanishi K et al. IL-4 and anti-CD40 protect against Fas-mediated B cell apoptosis and induce B cell growth and differentiation. *International Immunology*, 8, 791–798 (1996).



66. Husain Z et al. Increased apoptosis of CD20+ IgA+ B cells is the basis for IgA deficiency: the molecular mechanism for correction in vitro by IL-10 and CD40L. *J Clin Immunol*, 26, 113–125 (2006).
67. Moon B, Takaki S, Miyake K, Takatsu K The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production. *J Immunol*, 172, 6020–6029 (2004).
68. Kouro T, Takatsu K IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *International Immunology*, 21, 1303–1309 (2009).
69. Mainou-Fowler T et al. Interleukin-5 (IL-5) increases spontaneous apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro independently of bcl-2 expression and is inhibited by IL-4. *Blood*, 84, 2297–2304 (1994).
70. Rauch M, Tussiwand R, Bosco N, Rolink AG. *Crucial Role for BAFF-BAFF-R Signaling in the Survival and Maintenance of Mature B Cells*. (Open Access, 2009).
71. Tertilt C. et al. *Expression of B-cell activating factor enhances protective immunity of a vaccine against Pseudomonas aeruginosa*. 3044-3055 (Infection and Immunity, 2009).
72. Hase H et al. BAFF/BLys can potentiate B-cell selection with the B-cell coreceptor complex. *B103*, 2257–2265 (2003).
73. Yoshimoto K et al. Regulatory mechanisms for the production of BAFF and IL-6 are impaired in monocytes of patients with primary Sjogren’s syndrome. *Arthritis Research & Therapy*, 13:R170 (2011).
74. Obukhanych T, Nussenzweig M. T-independent type II immune responses generate memory B cells. *J Exp Med*, 203 (2): 305-310 (2006).
75. Jain S, Chodisetti SB, Agrewala N CD40 signaling synergizes with TLR-2 in the BCR independent activation o resting B cells. *PLOS One Open Access*, (2011).
76. Khan WN B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis. *J Immunol* 183, 3561–3567 (2009).
77. Sims GP et al. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 105, 4390–4398 (2005).
78. Endo T et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kB pathway. *Blood* 109, 703–710 (2007).
79. Mariette X How does BAFF activate B cells in patients with autoimmune diseases? *Arthritis Research & Therapy* 14, (2012).
80. Deng BP et al. Soluble BAFF-R produced by decidual stromal cells plays an inhibitory role in monocytes and macrophages. *Reprod biomed Online* 24, 654–663 (2012).
81. Rupniewska ZM, Bojarska-Junak A Stymulator limfocytów B z rodziny czynnika martwicy nowotworów i jego rola w regulacji komórki B. *Acta Haematologica Polonica* 287–300 (2003).
82. Novak AJ et al. Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood* 689–694 (2004).

83. Gross JA, Johnston J, Mudri S TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* 995–999 (2000).
84. Borysewicz-Sańczyk H, Szczepański M Mechanizmy ochronnego działania erytropoetyny w komórkach. *Pol. Merk. Lek.* XXX, 56–61 (2011).
85. Roccaro AM *et al.* Dual targeting of the PI3K/Akt/mTOR pathway as an antitumor strategy in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 559–569 (2010).
86. Gonzalez-Guerrico AM *et al.* Molecular mechanisms of protein kinase C-induced apoptosis in prostate cancer cells. *J Biochem Mol Biol*, 38, 639–645 (2005).
87. Abe T, Takaue Y, Kawano Y, Kuroda Y Effect of recombinant erythropoietin in interaction with stromal factors on cord blood hematopoiesis. *Blood* 87, 3212–3217 (1996).
88. Witkowski, J. *Advanced application of CFSE for cellular tracking.* *Curr Protoc Cytom* 9: 9.25 (2008).
89. Veneri D *et al.* Peripheral blood CD5-positive B lymphocytes (B-1a cells) after allogenic stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia in humans. *Blood Transfus* 220–224 (2008).
90. Weller S *et al.* Human blood IgM ‘memory’ B cells are circulating splicing marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 3647–3654 (2004).
91. Crotty S, Aubert RD, Glidewell J & Ahmed R Tracking human antigen-specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system. *J Immunol Methods* 111–122 (2004).
92. Rao S B cell activation and humoral immunity. at <www.mircorao.com>, dostęp 12.04.2013
93. Jego, G. *et al.* Reactive plasmacytosis are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* 94 (1999).
94. Eprex- intravenous & subcutaneous injection (product information). <www.janssen.com.au/files/Products/Eprex\_PI.pdf> dostęp 1.03.2014
95. Vos Q *et al.* B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev.* 154–170 (2000).
96. Girndt M *et al.* Molecular aspects of T- and B-cell function in uremia. *Kidney Int* 59, 206-211 (2001).
97. Contin-Bordes C, Lacraz A, de Precigout V. Potential role of the soluble form of CD40 in deficient immunological function of dialysis patients: new findings of its amelioration using polymethyl methacrylate (PMMA) membrane. *Clin Kidney J* 3, 20-27 (2010).
98. Patino E *et al.* Structure analysis of the IL-5 ligand-receptor complex reveals a wrench-like architecture for IL-5 $\alpha$ . *Cell* 19 (12), 1864-1875 (2011).
99. Mueller TD *et al.* Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochim Biophys Acta*, 1592 (3), 237-250 (2002).

100. Powers R et al. Three-dimensional solution structure of human interleukin-4 by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science*, 256 (1992).
101. Lisowska K et al. Flow cytometric analysis of STAT5 phosphorylation and CD95 expression in CD4+ T lymphocytes treated with recombinant human erythropoietin. *J Recept Sig Transd*, 31 (3): 241-246 (2011).
102. Witkowski JM, Micklem HS. Transmembrane electrical potential of lymphocytes in ageing mice. Flow cytometric analysis of mitogen-stimulated cells. *Mech Ageing Dev*, 62(2):167-79 (1992).
103. Witkowski JM. Niektóre praktyczne aplikacje oceny proliferacji komórek limfoidalnych techniką DCT. *Cytometria Polska*, 2 (1): 6-15 (2013).
104. Lanzavecchia A, Parodi B, Celada F. Activation of human B lymphocytes: frequency of antigen-specific B cells triggered by alloreactive or by antigen-specific T cell clones. *Eur J Immunol*, 13: 733-738 (1983).
105. Tangye SG et al. BAFF, APRIL and human B cell disorders. *Sem Immunol*, 28: 305-317 (2006).
106. Rocchetta F. Erythropoietin enhances immunostimulatory properties of immature dendritic cells. *Clin Exp Immunol*, 165 (2): 202-210 (2011).