

Akademia Medyczna w Gdańsku

Łukasz Marzec

**Białko Hsp72 jako marker komórkowej odpowiedzi stresowej u
pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek**

Praca na stopień doktora nauk medycznych
Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych
Kierownik: prof. dr hab. Bolesław Rutkowski

Promotor: Dr hab. Zbigniew Zdrojewski, prof. ndzw. AMG

Gdańsk 2007

*Składam serdeczne podziękowania:
Panu Profesorowi Bolesławowi Rutkowskiemu
za wsparcie i życzliwość,
Panu Docentowi Tomaszowi Liberkowi
za pomoc w wytyczeniu moich
naukowych zainteresowań,
Panom Profesorom Krzysztofowi Liberkowi
i Jackowi Witkowskiemu
za umożliwienie wykonywania oznaczeń.
Szczególnie dziękuję
Panu Profesorowi Zbigniewowi Zdrojewskiemu
za życzliwość, cierpliwość i fachową pomoc
bez których ta praca by nie powstała.*

Spis treści

1. Wykaz najczęściej stosowanych skrótów	5
2. Wstęp	6
2.1. Przewlekła niewydolność nerek	6
2.1.1. Stan zapalny oraz zespół MIA w przebiegu PNN.....	9
2.1.2. Hemodializa.....	10
2.1.3. Dializa otrzewnowa	11
2.2. Białka szoku termicznego	15
2.2.1. Ogólna charakterystyka białek szoku termicznego.....	15
2.2.2. Aktywacja odpowiedzi szoku termicznego.....	16
2.2.3. Charakterystyka białek z rodziny Hsp70.....	18
2.2.4. Funkcje białka Hsp72.....	18
2.2.5. Białko Hsp72 w przewlekłych chorobach nerek.....	20
3. Uzasadnienie wyboru tematu pracy.....	22
4. Cel pracy.....	23
5. Materiał i metody.....	24
5.1. Charakterystyka badanych grup	24
5.2. Protokoły badań	28
5.2.1. Analiza poziomu białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej oraz w leukocytach otrzewnowych.....	28
5.2.2. Analiza poziomu białka Hsp72 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej inkubowanych <i>in vitro</i> w płynach dializacyjnych.....	29
5.3. Izolacja komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej	29
5.4. Izolacja monocytów z komórek jednojądrzastych.....	30
5.5. Izolacja leukocytów z dializatu otrzewnowego.....	31
5.6. Oznaczanie poziomu białka Hsp72 metodą cytometrii przepływowej.....	31
5.7. Oznaczanie poziomu białka Hsp72 metodą Western – immunobloting.....	32
5.8. Oznaczanie poziomu mRNA genu <i>hsp72</i> metodą RT-PCR.....	33
5.9. Analiza statystyczna	35
6. Krytyczna ocena materiału i metod	37
7. Wyniki	39
7.1. Porównanie poziomu białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej badanych grup metodą cytometrii przepływowej.....	39

7.2. Porównanie poziomu mRNA genu <i>hsp72</i> w monocytach krwi obwodowej badanych grup	42
7.3. Zależności pomiędzy poziomem białka Hsp72, a wybranymi parametrami klinicznymi	45
7.4. Porównanie poziomu białka CD14 na powierzchni monocytów krwi obwodowej badanych grup.....	49
7.5. Analiza poziomu białka Hsp72 i mRNA genu <i>hsp72</i> w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej i leukocytach otrzewnowych pacjentów dializowanych otrzewnowo.....	51
7.6. Analiza poziomu białka Hsp72 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej inkubowanych <i>in vitro</i> w płynach dializacyjnych	53
7.7. Analiza poziomu białka Hsp72 w komórkach pacjentów, leczonych przy pomocy dwóch płynów dializacyjnych	55
8. Dyskusja	56
8.1. Wpływ przewlekłej niewydolności nerek na ekspresję białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej u pacjentów leczonych zachowawczo	56
8.2. Wpływ przewlekłej niewydolności nerek na ekspresję białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej u pacjentów leczonych hemodializami i CADO...59	
8.3. Wpływ stosowanych płynów dializacyjnych na ekspresję białka Hsp72 w komórkach pacjentów leczonych CADO	61
8.4. Kierunki dalszych badań	65
9. Wnioski.....	66
10. Streszczenie	67
11. Piśmiennictwo	72

1. Wykaz najczęściej stosowanych skrótów

BSA – *bovine serum albumine*; albumina surowicy bydlęcej

BUN – *blood urea nitrogen*; azot mocznika

CADO – ciągła ambulatoryjna dializa otrzewnowa

CRP – *C-reactive protein*; białko C-reaktywne

EDTA - *EthyleneDiamineTetraacetic Amid*; kwas etylenodiaminotetraoctowy

GFR – *glomerular filtration rate*, współczynnik przesączania kłębuszkowego

HD - hemodializa

HSF – *heat shock transcription factor*; czynnik transkrypcyjny genów białek Hsp

Hsp – *heat shock protein*; białko szoku termicznego

LO – leukocyty otrzewnowe

MIA – *malnutrition, inflammation, atherosclerosis*; niedożywienie, stan zapalny, miażdżycza

MFI – *mean fluorescence intensity*; średnia intensywność fluorescencji

PBMC – *peripheral blood mononuclear cells*; komórki jednojądrzaste krwi obwodowej

PBS – *phosphate buffered saline*; buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej

PChN – przewlekła choroba nerek

PD – płyn dializacyjny

PNN – przewlekła niewydolność nerek

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*; nazwa własna medium hodowlanego

RT-PCR – *reverse transcription polymerase chain reaction*; łańcuchowa reakcja polimerazy, poprzedzona reakcją odwrotnej transkrypcji

TNF α – *tumor necrosis factor α* ; czynnik martwiczy guza α

2. Wstęp

2.1. Przewlekła niewydolność nerek

Nerki spełniają w organizmie człowieka szereg istotnych zadań. Należą do nich: czynność wydalnicza, wewnątrzwydzielnicza, metaboliczna i inne. W kłębuszku nerkowym osocze krwi ulega przesączeniu, a powstający przesącz przemieszcza się do dalszych odcinków nefronu, gdzie zachodzi transport wody, elektrolitów, metabolitów, a także białek na drodze endocytozy, wydalanie końcowych produktów przemiany azotowej, wydzielanie jonu wodorowego i innych zbędnych dla organizmu substancji. W ten sposób powstaje mocz usuwany w czasie mikcji na zewnątrz ustroju.

Nerki są odpowiedzialne za utrzymanie stałej objętości oraz odpowiedniego składu płynów wewnątrzustrojowych. Odpowiadają za regulację gospodarki wodno – elektrolitowej, wapniowo-fosforanowej i kwasowo-zasadowej. Produkują również hormony regulujące ciśnienie krwi (renina) oraz czynnik stymulujący szpik do produkcji krwinek czerwonych (erytropoetyna). Ponadto są również miejscem hydroksylacji witaminy D₃, syntezy prostaglandyn i czynników natriuretycznych. Zachodzi w nich także metabolizm licznych hormonów. Postępujące uszkodzenie nerek prowadzi do ich niewydolności i zaburzeń funkcjonowania całego organizmu, jego zatrucia i licznych powikłań (m.in. nadciśnienia tętniczego, zaburzeń układu nerwowego, zaburzeń uwapnienia kości, niedokrwistości, kwasicy metabolicznej).

Przewlekła niewydolność nerek (PNN) jest zespołem chorobowym, który rozwija się jako następstwo zmniejszenia liczby czynnych nefronów niszczonych przez różnorodne procesy chorobowe, toczące się w miąższu nerek. Do najczęściej występujących należą kłębuszkowe zapalenie nerek, nefropatia cukrzycowa, nefropatia nadciśnieniowa, cewkowo-śródmiażdżowe zapalenie nerek i choroby uwarunkowane genetycznie. PNN charakteryzuje się postępującym niszczeniem wszystkich struktur nerek oraz stopniowym narastaniem upośledzenia czynności nerek.

Kryterium rozpoznawania PNN i jej progresji oparto na stopniu upośledzenia filtracji kłębuszkowej – GFR. Tradycyjnie wyróżnia się następujące okresy PNN (Czekalski 2004):

- Okres utajonej PNN – GFR od 80 do ok. 50 ml/min/1,73m² powierzchni ciała
- Okres wyrównanej PNN - GFR od 50 do 30 ml/min/1,73m² powierzchni ciała
- Okres niewyrównanej PNN - GFR od 30 do 15 ml/min/1,73m² powierzchni ciała

- Okres schyłkowej PNN - GFR < 15 ml/min/1,73m² powierzchni ciała lub dializoterapia

Ostatnio w Polsce, zgodnie z wytycznymi National Kidney Foundation (NKF) i Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego wprowadzono pojęcie przewlekłej choroby nerek (PChN). PChN zdefiniowano jako występowanie ponad trzy miesiące albuminurii powyżej 30 mg/g kreatyniny i/lub obniżenie GFR poniżej 60 ml/min/1,73m² powierzchni ciała.

Podziału PChN dokonano na 5 stadiów w oparciu o wielkość GFR (Czekalski 2004):

- Stadium 1 PChN – GFR \geq 90 ml/min/1,73m² powierzchni ciała
- Stadium 2 PChN – GFR od 60 do 89 ml/min/1,73m² powierzchni ciała
- Stadium 3 PChN – GFR od 30 do 59 ml/min/1,73m² powierzchni ciała
- Stadium 4 PChN – GFR od 15 do 29 ml/min/1,73m² powierzchni ciała
- Stadium 5 PChN – GFR < 15 ml/min/1,73m² powierzchni ciała lub dializoterapia

Tabela 2.1. Czynniki współuczestniczące w progresji PNN, niezależnie od aktywności procesu pierwotnie uszkodzającego nerki (Czekalski 2004)

1. Niekorzystne konsekwencje zmniejszonej liczby nefronów:

- Nadciśnienie wewnątrzkrębuszkowe i przerost mniej licznych kłębuszków
- Zwiększenie aktywności współczulnego układu nerwowego
- Mikroalbuminuria lub białkomocz

2. Czynniki progresji PNN:

- Niepodlegające modyfikacji terapeutycznej
 - Wrodzona zmniejszona liczba nefronów
 - Rasa czarna
 - Wiek podeszły
 - Płeć męska
- Podlegające modyfikacji terapeutycznej
 - Zaburzenia gospodarki wodno – sodowej
 - Zaburzenia gospodarki wapniowo – fosforanowej
 - Zaburzenia gospodarki potasowej
 - Nadciśnienie tętnicze
 - Dieta wysokobiałkowa
 - Toksyny mocznicowe

3. Choroby lub zaburzenia współistniejące z PNN:

- Cukrzyca
- Otyłość
- Leki i inne substancje nefrotoksyczne

W większości przypadków PNN, nawet mimo zahamowania choroby podstawowej, następuje progresywne upośledzenie czynności nerek, objawiające się obniżeniem GFR i nasileniem uszkodzenia nerek. Czynniki wpływające na progresję PNN, można podzielić na 3 grupy (tab. 2.1).

Toksyny mocznicowe to wszystkie substancje, które ulegają kumulacji w organizmie, w miarę postępowania upośledzenia GFR i które powodują zaburzenia metaboliczne. Przykłady takich toksyn przedstawia tabela 2.2.

Jako orientacyjną wskazówkę nasilenia toksemii mocznicowej, wykorzystuje się ocenę poziomu BUN (blood urea nitrogen, azot mocznika). W miarę zwiększania się stężenia toksyn mocznicowych w surowicy, nasila się ich niekorzystne działanie na metabolizm i czynność wielu tkanek, m.in. komórek krwi. Stwierdzono np. iż białko GIP II (granulocyte inhibitory protein II), odpowiadające budową β_2 -mikroglobulinie, zmniejsza metabolizm tlenowy neutrofilów oraz stymuluje monocyty do produkcji IL-1 β , IL-6 oraz TNF- α . (Haag-Weber, Cohen et al. 2000). Natomiast p - krezol zaburza funkcję granulocytów i monocytów poprzez upośledzenie produkcji reaktywnych związków tlenu (Vanholder, De Smet et al. 1995).

Tabela 2.2. Niektóre substancje o potencjalnej roli toksyn mocznicowych (Czekalski 2004)

Rozpuszczalne w wodzie substancje drobnocząsteczkowe (m.cz.<500 Da)	Substancje związane z białkami	Średnie cząsteczki (m.cz. 500-15000 Da)
Mocznik	Homocysteina	Parathormon
Kreatynina	Kwas hipurowy	Adrenomedulina
Kwas moczowy	Glioksal	β -endorfina
Hipoksantyna	Fruktozolina	Metenkefalina
Ksantyna	Siarczan indoksyłu	Cholecystokinina
Kreatynina	Kwas kinureninowy	Endotelina
Guanidyna	Pentozydyna	Leptyna
Cytydyna	Fenol	Neuropeptyd Y
Dialdehyd malonowy	Spermidyna	β_2 -mikroglobulina
Mioinozytol	Spermina	Czynnik D dopełniacza
Kwas octowy		Cystatyna C
Orotydyna		Kwas hialuronowy
Szczawiany		TNF- α
Alkohol benzyłowy		IL-1 β
		IL-6

2.1.1. Stan zapalny oraz zespół MIA w przebiegu PNN

Stymulacja komórek do produkcji cytokin prozapalnych oraz fakt, że IL-1, TNF- α oraz IL-6 są również toksynami mocznicowymi, wiąże się z następnym powikłaniem w przebiegu PNN, jakim jest przewlekły stan zapalny. Towarzyszy on PNN zarówno w okresie leczenia zachowawczego (przeddializacyjnego), jak i w trakcie leczenia nerkozastępczego. Stwierdzono, że ok. 25-35% pacjentów w okresie przeddializacyjnym oraz ok. 40-55% pacjentów hemodializowanych (HD) i leczonych metodą dializy otrzewnowej (DO), wykazuje wzrost laboratoryjnych wskaźników stanu zapalnego, będących jednocześnie jego mediatorami. Są nimi wspomniane wyżej cytokiny prozapalne oraz białko CRP (Stenvinkel 2002). Podwyższony poziom cytokin prozapalnych wynika nie tylko ze zmniejszonego ich wydalania, wskutek upośledzonej funkcji nerek, ale również ze zwiększonej ich produkcji. Czynnikiem stymulującymi komórki pacjentów z PNN do produkcji tych cytokin są: toksemia mocznicowa, stres oksydacyjny, stres karbonylowy, utajone ogniska zakażenia oraz kontakt z bioniezgodnymi materiałami w trakcie zabiegów dializy (Schomig, Eisenhardt et al. 2000). Najważniejszą rolę w indukcji stanu zapalnego w przebiegu mocznicy odgrywają monocyty i makrofagi tkankowe, które są głównym źródłem cytokin prozapalnych (Malaponte, Bevelacqua et al. 2002).

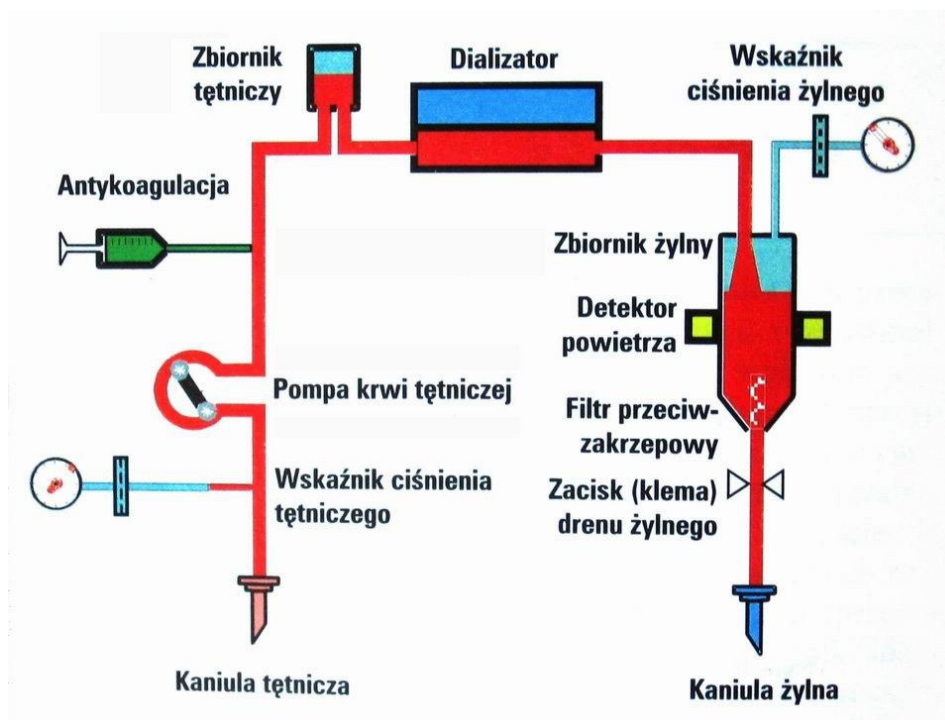
Okazuje się również, iż stan zapalny przyczynia się do rozwoju niedożywienia oraz miażdżycy u pacjentów z PNN. Powikłania sercowo – naczyniowe są głównym powodem wysokiej śmiertelności pacjentów z PNN, która jest 30-krotnie, a wśród 20-latków nawet 100-krotnie wyższa, niż w populacji ogólnej. Klasyczne czynniki ryzyka rozwoju miażdżycy, takie jak nadciśnienie, dyslipidemia czy palenie tytoniu, nie tłumaczą tak wysokiej częstości zachorowań w grupie pacjentów z PNN. Stwierdzono, że w tym przypadku stan zapalny oraz stres oksydacyjny mogą odgrywać ważniejszą rolę (Ross 1999). Mechanizm dzięki któremu stan zapalny przyspiesza rozwój miażdżycy wydaje się być znany. Dowiedziono m.in., iż cytokiny prozapalne mogą mieć wpływ na zmniejszenie wydzielania Apo E (Zuckerman and O'Neal 1994) i różnicowanie komórek naczyń krwionośnych w kierunku osteoblastów, co przyczynia się do uwapnienia tych naczyń (Tintut, Patel et al. 2000). Z kolei niedożywienie może być powodowane przyspieszonym katabolizmem białek, przemianą materii, zmniejszoną syntezą albumin, brakiem apetytu i zaburzoną motoryką przewodu pokarmowego. Na wszystkie te procesy cytokiny prozapalne również mają niekorzystny wpływ (Stenvinkel, Heimbürger et al. 2000). Jak widać zależność między tymi trzema stanami patologicznymi jest bardzo silna, dlatego też stan ten opisano jako zespół MIA (malnutrition – inflammation – atherosclerosis

syndrome). Obecność tego zespołu jest niezwykle istotna dla dalszego rokowania pacjentów z PNN. Śmiertelność w tej grupie pacjentów jest niestety porównywalna z chorymi na nowotwory złośliwe w stadium przerzutów (Stenvinkel 2001).

W okresie zaawansowanej niewydolności nerek (stadium 5 PChN) chory wymaga leczenia nerkozastępczego. Może być ono prowadzone za pomocą dwóch metod: dializoterapii i transplantacji nerek. Dializoterapia stwarza możliwość przeżycia w oczekiwaniu na przeszczep nerki. Niektórzy chorzy, u których takiego przeszczepu dokonać nie można, są leczeni dializą do końca życia. Stosowane są dwie metody dializ: hemodializa lub dializa otrzewnowa.

2.1.2. Hemodializa

Hemodializa to pozaustrojowy proces oczyszczania krwi polegający na usuwaniu toksyn mocznicowych, nadmiaru wody i wyrównywaniu gospodarki elektrolitowej i kwasowo-zasadowej w trakcie jej ekspozycji na działanie płynu dializacyjnego. Dwa przedziały (krew – płyn dializacyjny) rozdzielone są błoną półprzepuszczalną. Mogą przechodzić przez nią cząsteczki rozpuszczone w wodzie oraz cząsteczki o małej masie cząsteczkowej (kreatynina, mocznik). Natomiast cząsteczki o masie powyżej 15 kDa (np. albuminy), nie mogą przejść przez tę błonę. Substancje mogące pokonać barierę błony dializacyjnej, przemieszczają się wykorzystując zjawisko dyfuzji i ultrafiltracji. Dyfuzja to ruch cząsteczek rozpuszczonych w osoczu, poprzez pory błony półprzepuszczalnej z krwi do płynu dializacyjnego lub z płynu dializacyjnego do krwi, zgodnie z gradientem stężeń. Ultrafiltracja zaś, to ruch wody (wraz z rozpuszczonymi w niej niskocząsteczkowymi substancjami) z krwi do płynu, wynikający z gradientu ciśnienia hydrostatycznego. Zabiegi hemodializy przeprowadza się przy użyciu aparatu sztucznej nerki. Zbudowany jest on z pompy krwi, systemu zaopatrującego w płyn dializacyjny, systemu (czujniki) monitorującego proces dializy i dializatora, w którym zachodzą procesy dyfuzji i ultrafiltracji (ryc. 2.1). Błony półprzepuszczalne wykorzystywane obecnie w dializatorach to najczęściej błony zbudowane z modyfikowanej celulozy, błony syntetyczne zbudowane z poliakrylonitrylu lub polisulfonu. Oczywiście ekspozycja komórek krwi na błony, linie krwi i płyny dializacyjne, powoduje ich aktywację z wszystkimi tego następstwami. Ponadto kontakt ten aktywuje m.in. układ dopełniacza (szczególnie fragment C5, zwany toksyną anafilaktyczną), układ kontaktu bezpośredniego (zawierający czynnik XII, kininogen, prekalikreinę), układ krzepnięcia krwi oraz stymuluje syntezę cytokin prozapalnych (np. IL-1 i TNF- α).

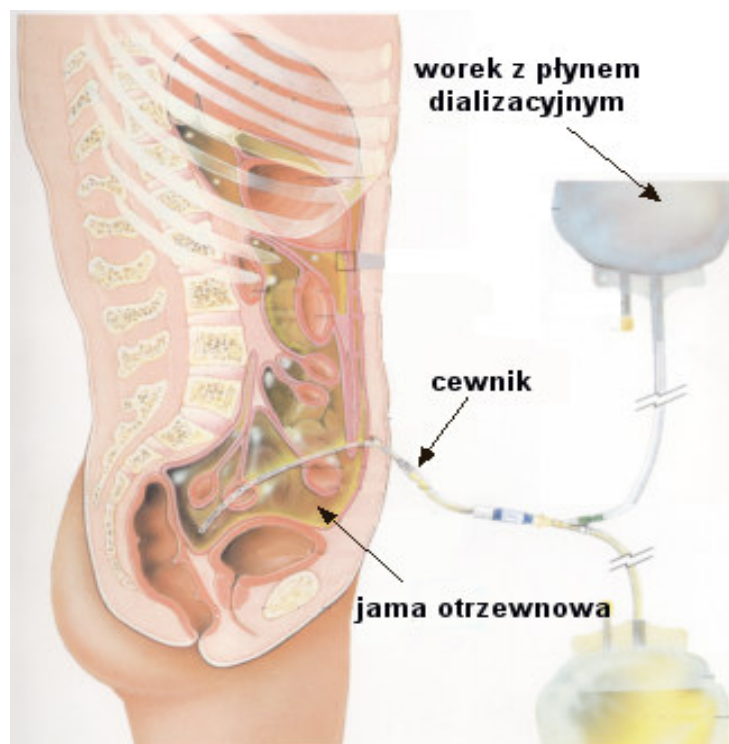


Ryc. 2.1. Schemat krążenia pozaustrojowego w czasie hemodializy (Zaluska and Ksiazek 2004).

2.1.3. Dializa otrzewnowa

Dializa otrzewnowa (DO) jest, w odróżnieniu od hemodializy, metodą oczyszczania krwi ze zbędnych i szkodliwych produktów przemiany materii, zachodzącą wewnątrz organizmu pacjenta. Jedną z odmian DO – ciągłą ambulatoryjną dializę otrzewnową (CADO) polega na kilkukrotnym w ciągu doby wprowadzeniu do jamy otrzewnej specjalnie przygotowanego płynu dializacyjnego, do którego z krwi przez błonę otrzewnową, na zasadzie osmozy i dyfuzji, przechodzą woda i zbędne produkty przemiany materii. Płyn podawany jest do jamy otrzewnowej poprzez cewnik Tenckhoffa, umieszczony na stałe w jamie brzusznej pacjenta (ryc. 2.2). Stosuje się również automatyczną wersję tej metody – ADO, która wymaga zastosowania specjalnego urządzenia zwanego cyklerem, dokonującego automatycznie wymiany płynu dializacyjnego w jamie otrzewnowej.

Obecnie metodę DO stosuje około 10% chorych wymagających dializoterapii.



Ryc. 2.2. Schemat CADO.

Jedną z największych zalet CADO jest fakt, że – w przeciwieństwie do sztucznych błon stosowanych w dializatorach – błona otrzewnowa jest strukturą całkowicie biokompatybilną (tab. 2.3). Jest to półprzepuszczalna błona wyściełająca ściany jamy brzusznej, zbudowana z płaskich komórek mezotelialnych (śródbłonkowych) leżących na łącznotkankowej warstwie, gdzie znajdują się naczynia krwionośne, chłonne oraz nerwy.

Podstawowym procesem zachodzącym podczas CADO jest transport wody i cząsteczek ze światła naczynia krwionośnego do przestrzeni jamy otrzewnej. Stwierdzono również migrację leukocytów w tym samym kierunku, nazwanych leukocytami otrzewnowymi. Są to głównie limfocyty, monocyty, makrofagi i neutrofile. Migracja ta jest procesem fizjologicznym, ale zachodzącym w znacznie większym stopniu u chorych leczonych dializą otrzewnową, niż u osób zdrowych (Cichocki, Hanicki et al. 1983). Dializa otrzewnowa jest metodą leczenia preferowaną u dzieci, chorych z cukrzycą, chorobą wieńcową i niewydolnością serca, skłonnością do niskiego ciśnienia tętniczego, zakażonych wirusami zapalenia wątroby (typu B i C), HIV oraz u tych pacjentów, u których nie można wytworzyć sprawnego dostępu naczyniowego do hemodializ.

Tabela 2.3. Wady i zalety CADO w porównaniu z hemodializą

Zalety
<ol style="list-style-type: none"> 1. Stałe usuwanie metabolitów, większa przepuszczalność dla cząsteczek średniej wielkości. 2. Technika łatwa do opanowania, możliwa do wykonania w warunkach domowych. 3. Mniejsze obciążenie układu krążenia, brak problemów z dostępem naczyniowym. 4. Dłuższe zachowanie resztkowej funkcji nerek. 5. Brak problemów związanych z biogodnością błony dializacyjnej.
Wady
<ol style="list-style-type: none"> 1. Duże ryzyko zapalenia otrzewnej. 2. Ograniczone możliwości zwiększania parametrów dializy. 3. Przewodna utrata białka i niedożywienie. 4. Trudność długookresowego utrzymania funkcji otrzewnej jako błony dializacyjnej. 5. Problemy psychologiczne związane z obecnością cewnika i reżimem dializowania.

Dzięki ciągłości terapii, stałemu oczyszczaniu krwi z substancji szkodliwych i odwadnianiu w regularnych odstępach czasu, dializa otrzewnowa pozwala na utrzymanie stałych wartości parametrów biochemicznych związanych z toksemią mocznicową i kontrolowanie przebiegu choroby, co jest istotne w okresie oczekiwania na przeszczep.

Największym problemem CADO jest ciężkie i/lub nawracające zapalenie otrzewnej oraz tzw. niewydolność ultrafiltracyjna otrzewnej. W wyniku tego po 8 latach od rozpoczęcia terapii stosuje ją tylko 1- 4 % chorych. Wynika to z faktu, iż ciągła i długotrwała ekspozycja na płyny dializacyjne przyczynia się do zmiany struktury otrzewnej i w konsekwencji zmniejszenia jej zdolności dializacyjnej (Davies, Phillips et al. 1998).

Wiele usprawnień w systemach drenów i cewników, a także dbałość o higienę podczas wprowadzania płynu do jamy otrzewnej pozwoliło zredukować częstość zapalenia otrzewnej. Jednak sam skład płynów pozostał praktycznie niezmienny i jest wyraźnie нефизиologiczny. Sytuacja taka jest wynikiem pogodzenia wymagań fizjologicznych, problemów technicznych i względów ekonomicznych. Większość stosowanych płynów to roztwory elektrolitowe, wzbogacone mleczanem i glukozą (tab. 2.4).

Tabela 2.4. Składniki typowego płynu dializacyjnego oraz stężenia tych samych związków w surowicy

Składnik/jednostka	Stężenie w płynie dializacyjnym	Stężenie w surowicy
Na ⁺ (mmol/l)	130 - 137	135 - 145
Cl ⁻ (mmol/l)	95 - 102	95 - 105
Ca ⁺⁺ (mmol/l)	0,75 – 1,75	2,1 – 2,6
Mg ⁺⁺ (mmol/l)	0,25 – 0,75	0,7 – 1
Mleczan (mmol/l)	35 - 40	0,5 - 5,0
Glukoza (mg/dl)	1360 - 3860	75 - 95

Wysokie stężenia glukozy ma na celu zwiększenie osmolarności do 340 - 500 mOsm/kg i w konsekwencji ultrafiltrację. Mleczan zaś wyrównuje kwasice metaboliczną – metabolizm mleczanu zachodzący w wątrobie i mięśniach prowadzi do powstania jonu dwuwęglanowego. Niskie pH (5,2 - 5,3) zapobiega karmelizacji glukozy podczas sterylizacji termicznej.

Przeprowadzono wiele badań dotyczących biogodności płynów dializacyjnych i ich wpływu na funkcje różnych komórek. Udowodniono m.in. że zahamowaniu ulegają funkcje leukocytów (izolowanych zarówno z krwi jak i jamy otrzewnej) takie jak: zdolność do fagocytozy, generowanie wolnych rodników tlenowych oraz synteza i sekrecja leukotrienów (Jorres, Topley et al. 1992; Liberek, Topley et al. 1993). Upośledzenie funkcji komórek układu odpornościowego, może być jedną z przyczyn powstawania procesu zapalnego. Natomiast badania wpływu PD na komórki mezotelium otrzewnowego zdają się wyjaśniać mechanizm upośledzenia ich funkcji dializacyjnej. Określono zmiany w biologii tychże komórek pod wpływem płynów dializacyjnych, które prowadzą do anomalii w funkcjonowaniu i w konsekwencji do zmniejszenia ultrafiltracji. Są to m.in.: zaburzenia w funkcjonowaniu Na⁺/K⁺- ATPazy komórkowej (Breborowicz, Witowski et al. 1993), białek transportujących glukozę GLUT 1 i GLUT 3 (Schroppel, Fischereeder et al. 1998) oraz zmniejszanie się warstwy fosfolipidów pokrywających komórki mezotelialne (Di Paolo, Sacchi et al. 1986).

Czynniki które w największym stopniu ograniczają biogodność płynów dializacyjnych to: niskie pH, wysokie stężenie glukozy, wysoka osmolarność, a także obecność produktów degradacji glukozy. W warunkach dializy otrzewnowej dochodzi do

stosunkowo szybkiego wyrównania stężenia składników płynu dializacyjnego z ich stężeniem w płynach ustrojowych (Topley 1995). Zjawisko to podważa znaczenie badań prowadzonych *in vitro*. Opracowano więc model, w którym badane są *ex vivo* funkcje leukocytów otrzewnowych poddanych działaniu płynu dializacyjnego *in vivo* (de Fijter, Verbrugh et al. 1993).

2.2. Białka szoku termicznego

2.2.1. Ogólna charakterystyka białek szoku termicznego

Białka szoku termicznego (ang. Heat shock proteins, Hsp) to ważne efekторы komórkowej odpowiedzi stresowej, występujące we wszystkich organizmach i niezwykle dobrze zachowane w procesie ewolucji. Zostały one podzielone na rodziny pod względem masy cząsteczkowej i pełnią różne funkcje w komórce (tab. 2.5).

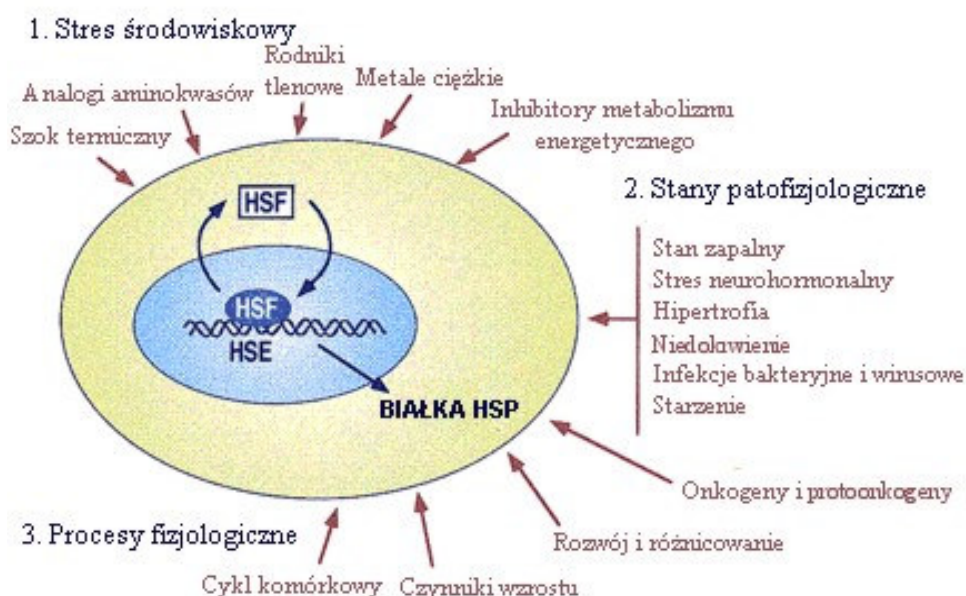
Nazwa	Masa cząsteczkowa (kDa)	Lokalizacja komórkowa	Funkcja
Ubikwityna	8	Cytosol / jądro	Degradacja białek
Hsp10	10	Mitochondria	Kofaktor dla Hsp60
Małe Hsp (sHsp)	20 – 30	Cytosol / jądro	Różnicowanie komórek
Hsp40	40	Cytosol / jądro	Kofaktor dla Hsp70
Hsp60	60	Mitochondria	Białko opiekuńcze
Hsp70	70	Cytosol / jądro	Białko opiekuńcze
Hsp90	90	Cytosol / jądro	Białko opiekuńcze

Zasadnicze funkcje białek szoku termicznego to (Whitley, Goldberg et al. 1999):

- udział w procesie formowania prawidłowej struktury białek, które powstają podczas translacji,
- udział w renaturacji lub degradacji białek zdenaturowanych lub uszkodzonych przez czynniki stresowe.

2.2.2. Aktywacja odpowiedzi szoku termicznego

Synteza białek szoku termicznego jest regulowana na poziomie transkrypcji. Transkrypcja genów białek Hsp jest indukowana przez bardzo wiele czynników, które zostały podzielone przez Morimoto na 3 grupy: stres środowiskowy, procesy fizjologiczne oraz procesy patofizjologiczne (ryc. 2.3).



Ryc.2.3. Czynniki indukujące ekspresję białek szoku termicznego (Morimoto 1998).

Transkrypcja genów białek Hsp, spowodowana czynnikami stresowymi, wymaga aktywacji czynnika transkrypcyjnego HSF (Heat Shock Transcription Factor), który występuje w 4 odmianach. HSF1, 2 i 4 występuje powszechnie u wszystkich kręgowców. Obecność HSF3 stwierdzono zaś tylko u ptaków (Morimoto 1998). Wszystkie rodzaje HSF ulegają konstytutywnej ekspresji i współpracują ze sobą.

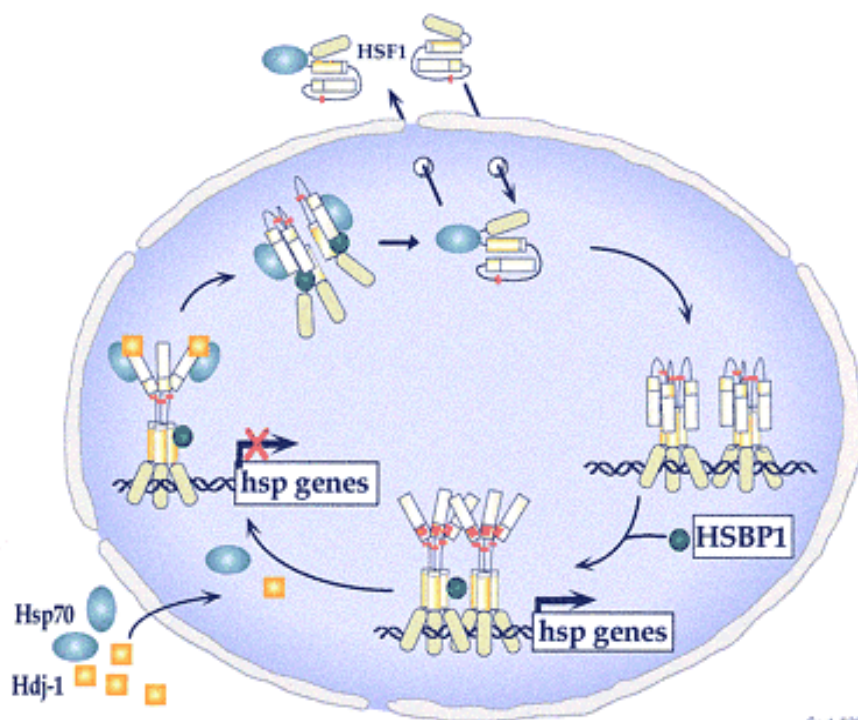
Czynnik transkrypcyjny HSF1 występuje w postaci nieaktywnego monomeru i jest uważany za główny czynnik odpowiedzi stresowej. Jego aktywacja następuje nawet po nieznacznym podwyższeniu temperatury oraz w wyniku zaistnienia wielu różnych warunków fizjologicznych i środowiskowych (Morimoto 1998). Czynnik transkrypcyjny HSF2 to nieaktywny dimer, który aktywowany jest przez typowe bodźce wywołujące stres komórki, z wyjątkiem inhibitorów proteosomów. Spełnia również ważną rolę w procesie embriogenezy i spermatogenezy (Rallu, Loones et al. 1997; Mathew and Morimoto 1998). Czynnik transkrypcyjny HSF3 występuje w postaci dimeru i jest ważnym regulatorem HSF1 podczas aktywacji przez hipertermię i stres chemiczny. HSF3 może oddziaływać z

innymi czynnikami transkrypcyjnymi, np. p53, c-Myb (Tanabe, Kawazoe et al. 1998; Tanikawa, Ichikawa-Iwata et al. 2000). Czynnik transkrypcyjny HSF4 ulega ekspresji przede wszystkim w mięśniach, mózgu i trzustce oraz wiąże się konstytutywnie z DNA, nawet przy braku warunków stresowych (Santoro 2000).

W komórkach nie poddanych stresowi czynnik transkrypcyjny HSF1 zlokalizowany jest w jądrze i w cytoplazmie (Brown and Rush 1999; Mercier, Winegarden et al. 1999).

Występuje w postaci niezwiązanej z DNA i nieaktywnej, co spowodowane jest wewnętrznymi wiązaniami typu helisa-helisa i oddziaływaniami z białkami opiekuńczymi np. Hsp70, Hsp90, Hdj1 (ryc. 2.4).

W warunkach stresowych pewna część znajdujących się w komórce białek ulega denaturacji, co powoduje wiązanie się do nich białek Hsp i tym samym uwolnienie czynnika HSF1. Jeśli znajdował się on w cytoplazmie, ulega translokacji do jądra dzięki obecności sekwencji kierującej (NLS - nuclear localisation sequence), która jest również niezbędna do przejścia formy nieaktywnej w aktywną. Aktywacja HSF1 następuje w wyniku trimeryzacji i fosforylacji, po czym zachodzi wiązanie się tego czynnika do DNA i transkrypcja genów szoku termicznego. Pod koniec odpowiedzi stresowej komórki, aktywność transkrypcyjna HSF1 jest hamowana przez bezpośrednie wiązanie Hsp70 i Hdj1 oraz białka HSBP1 (HSF1 binding protein). Prowadzi to do powrotu czynnika HSF1 do formy nieaktywnego monomeru (ryc. 2.4).



Ryc. 2.4. Cykl aktywacji czynnika HSF1.

2.2.3. Charakterystyka białek z rodziny Hsp70

Najlepiej poznaną dotychczas grupą białek szoku termicznego, jest rodzina białek Hsp70, której głównymi przedstawicielami w komórkach ssaków są:

- białko o masie 72 kDa (Hsp70, Hsp72), wysoce indukowane przez stres,
- białko o masie 73 kDa (Hsc70, Hsp73), ulegające konstytutywnie ekspresji we wszystkich komórkach i tkankach.

Białka te wykazują ponad 80% homologii i wspólną budowę. Wszystkie zbudowane są z domeny ATPazowej w części N-terminalnej (o masie 45 kDa), domeny C-terminalnej (15-18 kDa) wiążącej substrat oraz trzeciej domeny (o masie 10 kDa) z końcem karboksylowym, której funkcja jest jeszcze nieznana. (Bukau and Horwich 1998; Mayer and Bukau 2005). Aktywność i specyficzność substratowa Hsp72 jest modulowana przez inne białka opiekuńcze, np. Hsp40 (Liberek, Marszałek et al. 1991; Kelley 1998) czy Bag – 1 (Hohfeld 1998).

2.2.4. Funkcje białka Hsp72

Białko Hsp72 pełni w komórce szereg ważnych funkcji, m.in.:

- działa jako białko opiekuńcze w procesie formowania prawidłowej struktury białek (Hartl 1996; Bukau and Horwich 1998),
- bierze udział w reaktywacji białek po denaturacji (Ciavarra, Goldman et al. 1994),
- zapobiega niewłaściwym oddziaływaniom między białkami i tworzeniu się agregatów (Georgopoulos and Welch 1993),
- kieruje uszkodzone białka do degradacji (Hayes and Dice 1996),
- uczestniczy w transporcie białek przez błony poprzez rozwijanie i utrzymywanie rozwiniętej struktury transportowanych prekursorów białkowych (Ungermann, Neupert et al. 1994),
- wiąże się do różnych czynników transkrypcyjnych i kinaz białkowych biorących udział w sygnalizacji komórkowej i cyklu komórkowym (Helmbrecht, Zeise et al. 2000),
- odgrywa rolę w utrzymaniu kształtu komórki i transdukcji sygnału, wiążąc i stabilizując elementy cytoszkieletu (Beck, Neuhofer et al. 2000),
- ma działanie anti-apoptotyczne poprzez hamowanie aktywacji kinaz białkowych różnych kaskad sygnałowych (np. SAPK/JNK, p38) co w konsekwencji hamuje uwalnianie cytochromu c z mitochondriów lub hamuje

dalsze etapy apoptozy, poprzez blokowanie tworzenia apoptosomu i aktywacji kaspazy 3 (Gabai, Meriin et al. 1998; Beere 2004),

- hamuje syntezę cytokin prozapalnych, poprzez blokowanie kompleksu kinazy I κ B i w konsekwencji inhibicję czynnika NF- κ B (Jo, Ko et al. 2006; Kammanadiminti and Chadee 2006),
- odpowiada za tzw. termotolerancję komórek, co oznacza, że komórki poddane nieznacznemu szokowi termicznemu, a następnie regeneracji przeżywają działanie kolejnego stresu, który inaczej byłby dla nich letalny (Laszlo 1992).

Okazuje się, iż białko Hsp72 występuje nie tylko w cytoplazmie, ale również w przestrzeni międzykomórkowej. Może być do niej biernie uwalniane podczas nekrozy (Basu, Binder et al. 2000) lub wydzielane w procesie aktywnego transportu przez eksosomy (Lancaster and Febbraio 2005), pod wpływem m.in. IFN- γ i IL-10 (Asea 2005). Obecność białka Hsp72, jak również przeciwciał anti-Hsp72 potwierdzono w surowicy krwi zdrowych osób (Pockley, Shepherd et al. 1998), a jego podwyższony poziom występował u osób z chorobą naczyń nerkowych (Wright, Corton et al. 2000).

Uwolnione białko Hsp72 może wiązać się do różnych komórek m.in. NK, dendrytycznych, makrofagów, monocytów i limfocytów B (Asea 2005). Receptorami dla tego białka są: receptor TLR (toll like receptor) 2 i 4 i ich kofaktor CD14 (Asea, Rehli et al. 2002), a także CD36 (Nakamura, Hinagata et al. 2002), CD40 (Becker, Hartl et al. 2002) CD91, Lox-1 i SR-A (Asea 2005). Wiązanie Hsp72 do monocytów powoduje z kolei wzrost stężenia wewnątrzkomórkowych jonów Ca²⁺, następnie aktywację czynnika NF- κ B i w konsekwencji aktywację transkrypcji genów cytokin prozapalnych (Asea 2005). Białka Hsp, szczególnie z rodziny Hsp70, posiadają także wysoką zdolność do immunizacji układu odpornościowego - są jednym z głównych epitopów bakteryjnych, rozpoznawanych przez ludzkie limfocyty. Niestety, również własne białka Hsp stymulują układ odpornościowy i uczestniczą w patogenezie chorób autoimmunologicznych np. młodzieńczego zapalenia stawów czy stwardnienia rozsianego (Pockley 2001). Coraz większa zewnątrzkomórkowa rola, jaką przypisuje się ostatnio białku Hsp72, spowodowała, iż jest ono określane już nie tylko jako białko chaperonowe (opiekuńcze), ale już przede wszystkim jako białko chaperokinowe – białko opiekuńcze o aktywności cytokinowej.

W związku z tym, że białka szoku termicznego są tak niezwykle istotne dla homeostazy komórkowej, a ich synteza jest indukowana również przez stany patofizjologiczne, zbadano poziom ekspresji tych białek w komórkach pacjentów cierpiących na różne choroby. Powyżej wspomniano o roli białek Hsp w chorobie naczyń nerkowych, ponadto stwierdzono korelację między poziomem komórkowych białek Hsp, zwłaszcza z rodziny Hsp70, a m.in. występowaniem wielu nowotworów (Ciocca, Clark et al. 1993; Helmbrecht, Zeise et al. 2000), choroby Alzheimera (Dewji and Do 1996) czy chorób naczyniowo – sercowych (Zhu, Quyyumi et al. 2003) i chorób nerek.

2.2.5. Białko Hsp72 w przewlekłych chorobach nerek

Dane dotyczące ekspresji białka Hsp72 (i innych białek szoku termicznego) w przewlekłej niewydolności nerek (PNN) oraz chorobach, które mogą do niej prowadzić, są bardzo skąpe. Nieliczne, ostatnie badania prowadzone na myszach, ujawniły rolę białka Hsp72 w immunizacji komórek układu odpornościowego w przebiegu kłębuszkowego zapalenia nerek (Hsu, Zhou et al. 2006) i toczniowego zapalenia nerek (Chen, Aosai et al. 2004), sugerując również terapeutyczną rolę przeciwciał anti-Hsp72. Pozostałe badania, prowadzone *in vitro*, dotyczą głównie ochronnej roli, jaką pełni białko Hsp72 w komórkach mezangialnych, cewkowych i podocytach, w warunkach stresu oksydacyjnego towarzyszącego przewlekłej niewydolności nerek (Yokoo and Kitamura 1997; Chen, Guh et al. 1999; Komatsuda, Wakui et al. 1999). Brak jest danych dotyczących ekspresji białka Hsp72 w komórkach krwi chorych z PNN leczonych zachowawczo lub hemodializami. Tymczasem hemodializa jest znanym czynnikiem stresowym, aktywującym komórki krwi w krążeniu pozaustrojowym (linie krwi, błony dializacyjne) (Malaponte, Bevelacqua et al. 2002). Dostępność tych komórek oraz metody oznaczania w nich poziomu białek są dużo łatwiejsze niż w przypadku komórek nerki. Toksyny mocznicowe są także znanym czynnikiem indukującym odpowiedź szoku termicznego w komórkach poddanych ich działaniu *in vitro* lub *in vivo* w modelach zwierzęcych (Maddock and Westenfelder 1996). Jednakże do tej pory nie opisano ich wpływu na ekspresję białek Hsp w komórkach krwi, chorych z ONN lub PNN leczonych zachowawczo i dializami. Biorąc pod uwagę ważną rolę jaką odgrywa białko Hsp72 w indukcji stanu zapalnego i miażdżycy (Pockley 2001), które bardzo często towarzyszą PNN, badania takie mogłyby przyczynić się do znalezienia przyczyn tych powikłań. Wstępne wyniki badań prowadzonych w kraju, wykazujące korelację pomiędzy poziomem przeciwciał anti-Hsp72, a ryzykiem wystąpienia stanu

zapalnego w przebiegu PNN, zdają się potwierdzać słuszność poszukiwań prowadzonych w tym kierunku (Musial, Zwolinska et al. 2006).

Jedyną grupą chorych z PNN, w której dość dobrze zbadano ekspresję białka Hsp72 są pacjenci leczeni ciągłą ambulatoryjną dializą otrzewnową (CADO). Jak już wcześniej wspomniano, jednym z głównych ograniczeń CADO jest pogorszenie morfologicznych i czynnościowych właściwości błony otrzewnej, co w konsekwencji prowadzi do zakończenia leczenia tą metodą. Podstawowym czynnikiem negatywnie wpływającym na błonę otrzewną są bioniezgodne właściwości płynów dializacyjnych (PD): niskie pH, wysoka osmolarność, wysokie stężenie glukozy, mleczanu i produktów degradacji glukozy (Jorres, Topley et al. 1992; Liberek, Topley et al. 1993; Morgan, Wieslander et al. 2003). Skład i co za tym idzie właściwości płynów dializacyjnych są ciągle ulepszone, jakkolwiek sama zasada działania tej metody leczenia wyklucza stworzenie całkowicie biozgodnych płynów. CADO, jak już opisano to wcześniej, polega na powtarzanym wprowadzaniu do jamy otrzewnej roztworów o dużej osmolarności, stąd też komórki poddane działaniu płynu, zawsze będą narażone na ostre warunki stresowe. W związku z tym, należało się spodziewać, iż w komórkach jamy otrzewnej (komórkach mezotelium, leukocytach otrzewnowych) będzie następować indukcja białek Hsp w odpowiedzi na stres związany z obecnością płynów. Liczne badania udowodniły wzrost poziomu Hsp72 m.in. w komórkach mezotelialnych poddanych działaniu PD *in vitro* (Arbeiter, Bidmon et al. 2001; Aufricht, Endemann et al. 2001) oraz *in vivo* (Lopez-Cotarelo, Sellhaus et al. 2000; Arbeiter, Bidmon et al. 2003). Wyniki te potwierdzają przydatność badania poziomu Hsp72 do oceny biozgodności płynów dializacyjnych. Jakkolwiek dalsze eksperymenty *in vitro* określiły rolę białka Hsp72 nie tylko jako markera toksyczności płynów, ale również jako białka o funkcji ochronnej. Okazuje się, iż umiarkowany (czyli nie będący letalny) stres powodujący wzrost poziomu Hsp72, przystosowywał komórki na niekorzystne działanie PD. Ludzkie komórki mezotelialne poddane wcześniejszemu, niewielkiemu szokowi cieplnemu lub krótkotrwałej ekspozycji na płyny dializacyjne, wykazywały dużo wyższą tolerancję na długotrwałe działanie PD, niż komórki niepoddane wstępnemu szokowi. Transfekcja badanych komórek przy użyciu *hsp72* cDNA potwierdziła bezpośredni udział białka Hsp72 w obserwowanym mechanizmie cytoprotekcyjnym (Bidmon, Endemann et al. 2004).

3. Uzasadnienie wyboru tematu pracy

Dotychczasowe badania jednoznacznie określają ważną rolę białka Hsp72 w funkcji licznych komórek ustroju. Dość dobrze poznana jest ich rola opiekuńcza, mniej natomiast wiadomo o działaniu cytokinowym. Przewlekła niewydolność nerek jest zespołem chorobowym, w którym dochodzi pod wpływem wielu toksyn mocznicowych do nasilenia stanu zapalnego, stresu oksydacyjnego i szeregu innych zaburzeń metabolicznych uszkadzających białka, DNA oraz lipidy w obrębie struktur komórkowych. Stosowanie różnych metod dializoterapii, z jednej strony zmniejsza toksemię mocznicową, ale również w wyniku bioniezgodności płynów dializacyjnych, dializatorów i linii krwi aktywuje szereg procesów patologicznych. Oddzielenie tych zjawisk mogłoby przyczynić się do właściwej oceny stosowanych metod terapeutycznych. Tymczasem dotychczasowe badania nie pozwalają na właściwą ich ocenę. Wobec powyższego zasadne wydaje się podjęcie badań mających na celu ocenę ekspresji białka Hsp72 pod wpływem toksemii mocznicowej oraz wpływu hemodializy i dializy otrzewnowej na to zjawisko.

4. Cel pracy

Celem pracy były:

1. Ocena ekspresji białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej chorych z przewlekłą niewydolnością nerek w okresie przeddializacyjnym (ocena wpływu toksemii mocznicowej) oraz leczonych ciągłą ambulatoryjną dializą otrzewnową i hemodializą (ocena wpływu różnych metod leczenia nerkozastępczego).
2. Ocena wpływu pojedynczego zabiegu hemodializy na ekspresję białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej.
3. Określenie przydatności oceny poziomu ekspresji białka Hsp72 do badania biogodności płynów dializacyjnych stosowanych w dializie otrzewnowej.
 - 3.1. Ocena ekspresji białka Hsp72 w makrofagach otrzewnowych izolowanych od pacjentów leczonych CADO w porównaniu z ekspresją w monocytach krwi obwodowej tych pacjentów.
 - 3.2. Ocena wpływu dwóch różnych płynów dializacyjnych na ekspresję białka Hsp72 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej inkubowanych *in vitro* oraz makrofagach otrzewnowych izolowanych *ex vivo* od pacjentów leczonych CADO.
4. Próba wyjaśnienia mechanizmów ewentualnych różnic w ekspresji białka Hsp72 w badanych grupach pacjentów.

5. Materiał i metody

5.1. Charakterystyka badanych grup

Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku. Badanie przeprowadzono u 93 chorych z przewlekłą niewydolnością nerek. 30 z nich było leczonych zachowawczo, 33 przy pomocy ciągłej ambulatoryjnej dializy otrzewnowej, natomiast 30 było hemodializowanych. Pacjenci z grupy leczonej zachowawczo pozostawali pod opieką Poradni Chorób Nerek SPSK nr 1 ACK AMG lub byli hospitalizowanymi w Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych AMG. Pacjenci dializowani, leczeni byli w Ośrodku Dializy Otrzewnowej i na Oddziale Hemodializy tej samej kliniki. Ogólną charakterystykę badanych grup przedstawia tabela 5.1.

Grupa badana	Liczba osób	płeć	wiek
Leczona zachowawczo	30	20♀ 10♂	od 22 do 94; średnia – 64,9
Leczona CADO	33	16♀ 17♂	od 29 do 79; średnia – 60,1
Leczona hemodializą	30	16♀ 14♂	od 34 do 85; średnia - 64,9
Kontrolna	30	16♀ 14♂	od 23 do 78; średnia – 54,06

Przyczyna PNN	Liczba pacjentów leczonych:		
	Zachowawczo	CADO	HD
Kłębuszkowe zap. nerek	8	5	7
Nefropatia cukrzycowa	5	15	7
Nefropatia nadciśnieniowa	1	1	1
Wielotorbielowatość nerek	1	-	2
Śródmiąższowe zap. nerek	1	1	1
Nefropatia zatorowo - zakrzepowa	2	-	-
Nefropatia miażdżycowa	2	-	-
Nefrektomia (rak nerki)	1	-	2
Ziarniniakowatość Wegenera	-	-	1
Nieustalona etiologia	9	11	9

Przyczyny przewlekłej niewydolności nerek badanych grup pacjentów zestawiono w tabeli 5.2.

Do uczestnictwa w badaniu nie kwalifikowano osób z jawnym klinicznie, aktywnym procesem zapalnym, infekcyjnym lub immunologicznym, leczonych immunosupresyjnie lub stosujących antybiotykoterapię. Tabela 5.3 przedstawia podstawowe wskaźniki kliniczne i laboratoryjne badanych grup. W przypadku pacjentów hemodializowanych, wszystkie oznaczenia dokonano w krwi pobranej przed zabiegiem hemodializy, chyba, że zaznaczono inaczej.

Tabela 5.3. Wskaźniki laboratoryjne badanych grup				
Parametr	Średnia wartość; wartości min. – max.			Wartości referencyjne
	Zachowawczo	HD	CADO	
Kreatynina [mg/dl]	4,23 [0,93-9]	Przed 8,46 [4,8 – 14,2] Po 3,43 [1,1 – 7,2]	6,94 [1,28 – 14,7]	<1,3
GFR [ml/min]	17,96 [4,8 – 87,8]	-	-	90 - 120
BUN [mg/dl]	72,2 [10 – 160]	Przed 58,5 [11 – 93] Po 19,07 [9 – 45]	49,75 [18 – 83]	9,8 – 20,1
Kt/V	-	1,47 [0,76 – 2,1] (1 zabieg)	2,28 [1,3 – 3,09] (tygodniowy)	
Hb [g/dl]	11,26 [7,6 – 14]	11,48 [9,2 – 13,9]	11,15 [8,24 – 14,35]	11 – 15,6
Ht [%]	33,8 [23,1 – 41,4]	35 [27,5 – 42,2]	33,3 [24,2 – 42,9]	30 – 49,5
RBC [T/l]	3,82 [2,5 – 4,7]	3,75 [2,8 – 4,6]	3,62 [2,6 – 4,6]	3,5 – 5,2
WBC [G/l]	9,76 [5,11 – 18,8]	7,6 [4,6 – 14,3]	8,34 [3,79 – 23,16]	4,5 – 11
Granulocyty [G/l]	7,28 [2,9 – 17,47]	5,12 [2,1 – 11,6]	4,78 [2,1 – 8,9]	1,8 – 8,9
Limfocyty [G/l]	1,6 [0,59 – 2,6]	1,6 [0,84 – 2,54]	1,77 [0,42 – 5,36]	0,9 – 5,0
Monocyty [G/l]	0,71 [0,12 – 1,6]	0,7 [0,3 – 1,69]	0,62 [0,17 – 1,3]	0,2 – 0,8
Sód [mEq/l]	140,32 [130 – 147]	138,3 [131 – 145]	141 [134 – 148]	135 – 145
Potas [mEq/l]	4,35 [3,2 – 5,5]	5,27 [3,7 – 7]	4,08 [3,1 – 5,2]	3,5 – 5,0
Wapń [mg/dl]	8,01 [5,1 – 10,3]	9,3 [5,2 – 11,3]	9,06 [7,4 – 11,3]	8,6 – 10,2
Fosforany [mg/dl]	5,4 [3,5 – 8,6]	5,46 [2,7 – 9]	4,93 [3,4 – 7,4]	2,7 – 4,5
PTH [pg/ml]	307,7 [14 – 708]	164 [8 – 428]	346 [46 – 695]	10 – 26
Białko całkowite [g/l]	65,4 [55 – 79]	65 [55 – 73]	66,9 [48 – 85]	60 – 80
Albuminy [g/l]	37,5 [16 – 49]	36,9 [30 – 43,3]	40,9 [26 – 72]	35 – 50
Cholesterol całkowity [mg/dl]	189,3 [54 – 408]	186,8 [151 – 270]	207,8 [141 -333]	120 – 200
HDL [mg/dl]	46,6 [8 – 106]	52,5 [14 – 100]	65,47 [24 – 195]	♀>50; ♂>35
LDL [mg/dl]	118,3 [26 – 288]	105,2 [65 – 179]	119,6 [38 – 217]	< 130
Trójglicerydy [mg/dl]	124 [39 – 258]	200,5 [120 – 331]	167 [91 – 256]	<150
CRP [mg/l]	47,14 [0,56 – 170]	23,17 [2,5 – 52]	40,9 [1,25 – 231]	< 9

Niedokrwistość z poziomem hemoglobiny poniżej 11 g/dl stwierdzono u 13 pacjentów leczonych zachowawczo, 11 hemodializowanych i 10 dializowanych otrzewnowo. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w poziomie hemoglobiny między badanymi grupami.

Hiperfosfatemię $> 5,5$ mg/dl stwierdzono u 7 pacjentów w okresie przeddializacyjnym, 14 pacjentów hemodializowanych i 9 pacjentów leczonych CADO. Iloczyn wapniowo – fosforanowy > 55 mg²/dl² zaobserwowano u 4 pacjentów leczonych zachowawczo, 8 hemodializowanych i 4 leczonych CADO. Stężenie PTH powyżej > 300 pg/ml zauważono u 2 pacjentów leczonych zachowawczo 2 hemodializowanych i 4 leczonych CADO. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w stężeniu wapnia, fosforanów i PTH między poszczególnymi grupami pacjentów z PNN.

Hipoalbuminemia < 35 g/l wystąpiła u 5 pacjentów leczonych zachowawczo, 6 hemodializowanych i 4 leczonych CADO. Poziom albuminy również nie różnił się między grupami.

U 19 pacjentów hemodializowanych stwierdzono hiperkaliemię powyżej 5 mEq/l przed zabiegiem hemodializy. Po zabiegu hemodializy hiperkaliemii nie stwierdzono u żadnego z pacjentów. W grupie pacjentów leczonych CADO hiperkaliemię stwierdzono u dwóch pacjentów, zaś w grupie leczonej zachowawczo również u dwóch pacjentów. Średnie stężenie potasu w surowicy pacjentów wszystkich grup (w grupie leczonej hemodializami oznaczane po zabiegu) nie różnił się istotnie. Nie stwierdzono odchyień w stężeniu sodu w surowicy żadnego z pacjentów.

Spośród pacjentów hemodializowanych hipercholesterolemię > 200 mg/dl stwierdzono u 8 pacjentów hemodializowanych, 9 pacjentów leczonych CADO i 5 leczonych zachowawczo. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między poszczególnymi grupami. Hipertrójglicydemię > 150 mg/dl stwierdzono u 10 pacjentów hemodializowanych, 5 leczonych zachowawczo i 10 leczonych CADO. Poziom trójglicerydów był istotnie niższy w grupie pacjentów leczonych zachowawczo w porównaniu do 2 pozostałych grup pacjentów z PNN.

Stwierdzono również, iż poziom azotu mocznika (BUN) był istotnie statystycznie niższy w przypadku pacjentów leczonych CADO niż hemodializowanych (przed HD, $p=0,03$) i leczonych zachowawczo ($p=0,001$)

Stadium PChN rozpoznawano na podstawie obniżonego współczynnika przesączania kłębuszkowego – GFR, który wyliczano na podstawie uproszczonego wzoru MDRD:

$$\text{GFR} = 186,3 \times \text{stężenie kreatyniny [mg/dl]}^{-1,14} \times \text{wiek}^{-0,203} \\ \times 0,742, \text{ jeśli pacjentka jest kobietą}$$

W tabeli 5.4 przedstawiono parametry funkcji nerek pacjentów w okresie przedializacyjnym, w zależności od stadium zaawansowania PChN wg. kryteriów NKF.

Tabela 5.4. Wskaźniki funkcji nerek pacjentów leczonych zachowawczo (średnie, min. – maks.)

Stadium PChN	Liczba pacjentów	GFR (ml/min)	Stężenie kreatyniny w surowicy (mg/dl)	Stężenie BUN w surowicy (mg/dl)
Stadium 2 PChN $60 \leq \text{GFR (ml/min)} \leq 89$	1	87,8	0,93	10
Stadium 3 PChN $30 \leq \text{GFR (ml/min)} \leq 59$	3	32,24 (30 – 34)	2,4 (1,9 – 3,2)	56,6 (21 – 76)
Stadium 4 PChN $29 \leq \text{GFR (ml/min)} \leq 15$	10	19,9 (17 – 27)	3,1 (2,1 – 4,3)	66,5 (30 – 117)
Stadium 5 PChN $\text{GFR (ml/min)} < 15$	16	9,7 (4,8 – 14,3)	5,5 (3,6 – 9,0)	82,5 (32 – 160)

Hemodializoterapia prowadzona była według ogólnie przyjętych standardów (Rutkowski 2004), przy użyciu polisulfonowych dializatorów i wodorowęglanowego płynu dializacyjnego. Okres dializoterapii wynosił od 5 do 312 miesięcy (średnio 70,4). Pacjenci dializowani otrzewnowo byli leczeni przy użyciu trzech różnych płynów dializacyjnych – 27 przy użyciu płynu Stay Safe (Fresenius Medical Care, Niemcy), a 5 przy użyciu płynów Dianeal i Physioneal 40 (Baxter, Polska) (por. dalej – 5.2. Protokoły badań). Ich skład przedstawia tabela 5.5. Okres dializoterapii wynosił od 1 do 127 miesięcy (średnio 34,6).

Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych, niepalących ochotników w wieku od 23 do 78 lat (średnio 54,06). Stanowili ją pracownicy Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych AMG, Katedry Fizjopatologii AMG oraz studenci Uniwersytetu Trzeciego Wieku w Gdańsku.

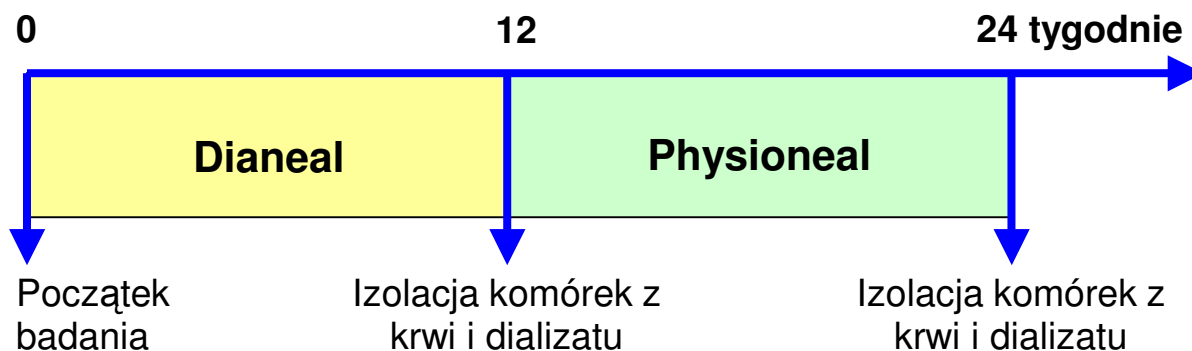
Tabela 5.5. Skład płynów dializacyjnych użytych w badaniu			
Składnik	Dianeal PD4	Physioneal 40	Stay Safe
Glukoza bezwodna (%)	1,36	1,36	1,5
Na ⁺ (mmol/l)	132	132	134
Ca ⁺⁺ (mmol/l)	1,25	1,25	1,25
Mg ⁺⁺ (mmol/l)	0,25	0,25	0,5
Cl ⁻ (mmol/l)	95	95	102,5
Mleczan (mmol/l)	40	15	35
Dwuwęglan (mmol/l)	-	25	-
Osmolarność (mosmol/l)	344	344	356
pH	5,5	7,4	5,5

5.2. Protokoły badań

5.2.1. Analiza poziomu białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej oraz w leukocytach otrzewnowych

Oznaczenia poziomu białka Hsp72 dokonano w komórkach izolowanych z krwi żyłnej pacjentów wszystkich badanych grup. W grupie pacjentów dializowanych otrzewnowo poziom Hsp72 oznaczano w leukocytach otrzewnowych (LO), izolowanych z dializatu otrzewnowego. Krew żylną w ilości 10 ml, pobierano z żyły odłokciowej do probówek BD Vacutainer. W grupie pacjentów leczonych hemodializami krew pobierano bezpośrednio przed i po zabiegu hemodializy.

Aby ocenić wpływ 2 różnych płynów, Physioneal i Dianeal, na ekspresję białka Hsp72, w grupie 5 pacjentów leczonych metodą CADO, krew oraz dializat otrzewnowy pobierano po minimum 12 tygodniach leczenia płynem Dianeal. Następnie płyn zmieniano na Physioneal i po 12 tygodniach powtarzano procedurę izolacji komórek z krwi i dializatu otrzewnowego. Do badania zostało zakwalifikowanych w sumie 10 pacjentów - jeden zmarł, u jednego wykonano przeszczep nerki, u dwóch zmieniono formę leczenia hemodializę, a jeden pacjent wycofał zgodę na badanie. Schemat tego badania przedstawia rycina 5.1.



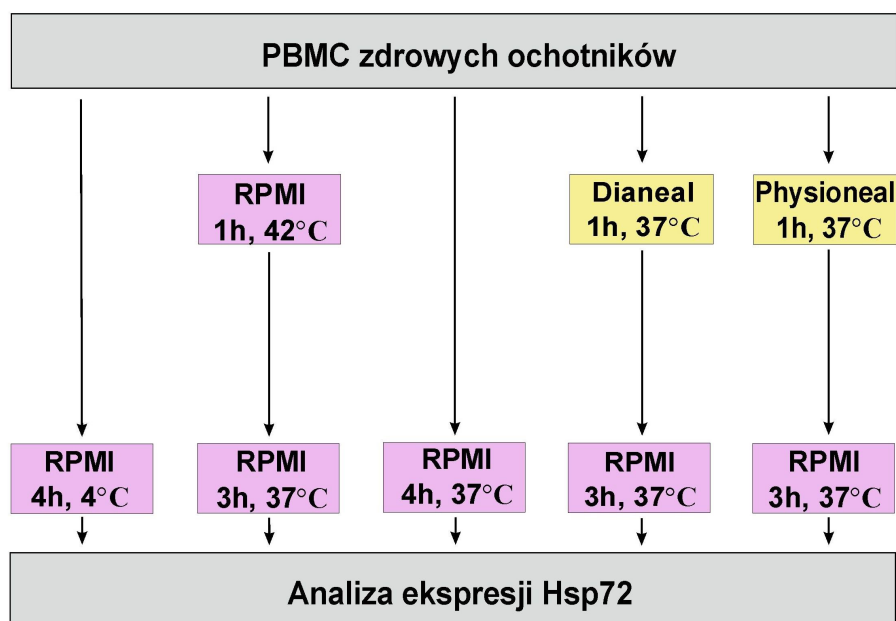
Ryc. 5.1. Schemat badania ekspresji Hsp72 u pacjentów leczonych 2 różnymi płynami dializacyjnymi.

5.2.2. Analiza poziomu białka Hsp72 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) inkubowanych *in vitro* w płynach dializacyjnych

Wyizolowane z krwi obwodowej zdrowych ochotników komórki jednojądrzaste były inkubowane w 2 płynach dializacyjnych (Dianeal i Physioneal) przez 1h w 37°C, następnie osadzane przez wirowanie i zawieszane w pożywce RPMI (Sigma Aldrich, Niemcy) na 3h w 37 °C . Następnie analizowano poziom ekspresji białka Hsp72 w tych komórkach za pomocą metody Western-blotting. Jako kontrola pozytywna służyły komórki poddane szokowi termicznemu w 42°C przez 1h. Kontrola negatywną były PBMC inkubowane 4h w 37°C oraz PBMC inkubowane 4h w 4°C. Schemat doświadczeń *in vitro* przedstawia rycina 5.2.

5.3. Izolacja komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej

10 ml krwi obwodowej rozcieńczano z buforem PBS w stosunku 1:1. Tak przygotowaną mieszaninę наносono na 10 ml odczynnika Histopaque (Sigma-Aldrich, Niemcy) w probówkach o pojemności 50 ml i wirowano przy 800 x g przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Po skończonym wirowaniu zbierano środkową warstwę (ang. interface) i płukano trzykrotnie w buforze PBS, przez wirowanie 7 min. przy 340 x g w temperaturze pokojowej. Osad komórkowy zawieszano w 5 ml buforu PBS i określano liczbę komórek przy użyciu aparatu stosowanego do oznaczania morfologii krwi. Wydajność izolacji wynosiła średnio 18×10^6 PBMC z 10 ml pełnej krwi.



Ryc. 5.2. Schemat inkubacji PBMC *in vitro* w płynach dializacyjnych.

5.4. Izolacja monocytów z komórek jednojądrzastych

Izolację przeprowadzano przy użyciu zestawu Dynal Monocyte Negative Isolation Kit (Dynal Biotech, USA). Zasada działania tego zestawu opiera się na izolacji z komórek jednojądrzastych (przy użyciu przeciwciał i ziaren przyciąganych przez magnes), komórek nie będących monocytami (limfocyty T, B, komórki NK, granulocyty) i tym samym pozostawienie nietkniętych monocytów. 10 mln PBMC zawieszano w 100 μ l buforu 1 (PBS zawierający 0,1% BSA i 2 mM EDTA, pH = 7.4), następnie dodawano 20 μ l mieszaniny mysich przeciwciał, specyficznych dla komórek nie będących monocytami (anty - CD2, CD7, CD6, CD19, CD56) oraz 20 μ l odczynnika blokującego niespecyficzne wiązanie się przeciwciał (gamma globulina). Tak przygotowaną mieszaninę inkubowano przez 20 min. w 4°C. Następnie mieszaninę płukano przy użyciu bufora 1 (300 x g, 8 minut, 4°C), zawieszano ponownie w 900 μ l buforu 1. Do zawiesiny dodawano 100 μ l mieszaniny polistyrenowych ziaren opłaszczonych przeciwciałami przeciwko mysim białkom IgG i inkubowano przez 15 minut w 4°C. Po tym czasie próbkę z mieszaniną umieszczano w magnecie. Ziarna wraz z komórkami nie będącymi monocytami, przyciągnięte przez magnes tworzyły osad na ścianie próbówki, zaś zawiesinę zawierającą monocyty używano do dalszych badań. Uzyskiwano ok. 2 mln komórek z 10 mln wyjściowych PBMC, z czego ok. 75-80% stanowiły monocyty.

5.5. Izolacja leukocytów z dializatu otrzewnowego.

Całość 4 - godzinnego dializatu otrzewnowego, pobranego z jamy otrzewnej pacjenta rozdzielano do probówek o pojemności 50 ml i wirowano 30 min. przy 800 x g w 4°C, w wirówce Heraeus (typ Megafuge 3.0R). Po zebraniu osadu komórkowego do jednej probówki, płukano go dwukrotnie w buforze PBS przez wirowanie 10 min., przy 340 x g, w 4°C w tej samej wirówce. Tak zwirowane komórki zawieszano w 5 ml buforu PBS i określano liczbę komórek za pomocą aparatu stosowanego do oznaczania morfologii krwi. Liczba komórek uzyskanych od poszczególnych pacjentów różniła się dość znacznie i wahała się od 0.3×10^7 do 10×10^7 . Makrofagi stanowiły średnio 74% wyizolowanych komórek. Na pozostałe komórki składały się głównie limfocyty, granulocyty obojętnochłone oraz komórki śródbłonna.

5.6. Oznaczanie poziomu białka Hsp72 metodą cytometrii przepływowej.

1 mln PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej lub 1 mln leukocytów otrzewnowych przenoszono do probówek cytometrycznych i zawieszano w 100 µl PBS. W celu późniejszej identyfikacji populacji monocytów/makrofagów do probówek dodawano 5 µl przeciwciała anti-CD14 (BD Biosciences, Pharmingen, USA). Taką mieszaninę inkubowano przez 15 min. w 4°C. Następnie po płukaniu komórek roztworem PBS, utrwalano je przez 10-cio minutową inkubację w 2% roztworze paraformaldehydu. Po powtórным płukaniu, komórki zawieszano w 100 µl PBSu z dodatkiem saponiny (permeabilizującej komórki), dodawano 10 µl roztworu ludzkiej immunoglobuliny (w celu uniknięcia niespecyficznego wiązania przeciwciał) i inkubowano przez 15 minut w 4°C. Po ponownym przepłukaniu komórek inkubowano je z monoklonalnymi, mysimi przeciwciałami anti – Hsp72 (SPA-810, Stressgen Bioreagents, Kanada) w 4°C przez 30 min. Następnie komórki znowu płukano w buforze PBS z saponiną i inkubowano przez 30 min w 4°C z II – rzędowymi przeciwciałami anti-mysimi, sprzęgniętymi z barwnikiem fluorescencyjnym (fikoerytryną). Fluorescencję tak przygotowanych komórek odczytywano przy użyciu cytometru przepływowego (FACScan, Becton-Dickinson, USA). Zebrane dane były później analizowane i przedstawiane w postaci graficznej, przy pomocy programu WinMDI 2.8 (© Joseph Trotter, USA).

5.7. Oznaczanie poziomu białka Hsp72 metodą Western – immunobloting

5.7.1. Liza komórek

Komórki osadzano poprzez wirowanie (12000 x g, 5 min., 4°C). Po usunięciu supernatantu, komórki inkubowano w buforze lizującym (50 mM Tris HCl, pH 8,0 150mM NaCl, 1 % NP40, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 4 µl/ml aprotinina) przez 40 min. na lodzie, mieszając zawiesinę co kilka minut. Zawiesinę następnie wirowano (12000 x g, 5 min., 4°C) i zbierano supernatant, w którym oznaczano stężenie całkowite białek.

5.7.2. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka określano metodą Bradforda, stosując odczynnik BioRad Protein Assay (Biorad, USA). Do pięciokrotnie rozcieńczonego odczynnika dodawano 1 µl lizatu białkowego i mierzono absorbancję tak przygotowanego roztworu przy długości fali $\lambda = 595$ nm. Stężenie białka odczytywano z krzywej wzorcowej, przygotowanej dla roztworów 2, 4, 8 i 12 µg BSA w odczynniku Bradforda.

5.7.3. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (SDS – PAGE: Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Electrophoresis)

Do próbek zawierających równe ilości całkowitego białka (20 µg) dodawano czterokrotnie stężony bufor obciążający (0,125 M Tris – HCl, pH 6,8, 5% SDS 10 % β - merkaptoetanol, 20 % glicerol, błękit bromofenolowy) i наносzono na 12,5% żel poliakrylamidowy. Elektroforezę prowadzono pod napięciem 190V do czasu dojścia błękitu bromofenolowego do końca żelu.

5.7.4. Przenoszenie białek z żelu na membranę

Rozdzielone elektroforetycznie białka były przenoszone na membranę nitrocelulozową za pomocą tzw. transferu mokrego w buforze B (0,26% Tris-HCl, 1,24% glicyna), przez 2 godziny, przy stałym natężeniu prądu 0,8 mA/cm² powierzchni błony. Po transferze błonę wybarwiano roztworem barwnika Ponceau, w celu potwierdzenia prawidłowego transferu i równej ilości całkowitego białka w każdej z próbek.

5.7.5. Blokowanie

Błonę blokowano przez 60 minutową inkubację w 5% roztworze odłuszczonego mleka w buforze TBS (2,5% Tris-HCl, 0,8% NaCl) z dodatkiem detergentu Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA), w stężeniu końcowym 0,05 %.

5.7.6. Inkubacja z przeciwciałami pierwszorzędowymi

Poliklonalne, królicze, przeciwciała anty – Hsp72 (SPA-811, Stressgen Bioreagents, Kanada) rozcieńczono w roztworze odtłuszczonego mleka w stosunku 1:1000. W tak przygotowanym roztworze błona była inkubowana w 4°C przez 12h.

5.7.7. Detekcja białka na błonie.

W celu detekcji białka zastosowano metodę chemiluminescencyjną przy pomocy zestawu SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, USA). Po dokładnym opłukaniu błony buforem TBS - Tween 20, inkubowano ją przez 1 godzinę w temp. pokojowej z drugorzędowymi, kozimi przeciwciałami anty-króliczymi, sprzęgniętymi z peroksydazą chrzanową (nr. Kat. 172-1019, BioRad, USA) w rozcieńczeniu 1:2500. Następnie kilkakrotnie płukano błonę dużymi objętościami buforu TBS – Tween, by pozbyć się nadmiaru przeciwciał. Końcowym etapem była 5 minutowa inkubacja z substratem dla peroksydazy chrzanowej w ilości 0,05 ml/cm² powierzchni błony, a następnie ekspozycja na kliszy rentgenowskiej. Wywołane klisze były następnie skanowane i zapisywane w postaci elektronicznej. Analiza densytometryczna prążków była przeprowadzona przy użyciu programu ScionImage 2005 (Scion, Frederick, Maryland, USA). Wyniki tej analizy zostały przedstawione jako średnia wartości skali szarości (ang. gray scale, gdzie kolor biały ma wartość 0, a czarny 255), wszystkich pikseli prążka.

5.8. Oznaczanie poziomu mRNA genu *hsp72* metodą RT-PCR

5.8.1. Izolacja całkowitego RNA z leukocytów.

RNA z leukocytów izolowano przy pomocy zestawu Total RNA prep plus (A and A Biotechnology, Polska). Do ok. 2 mln. leukocytów dodawano 800 µl fenozolu, mieszano przez pipetowanie, aż do całkowitej lizy komórek i inkubowano 5 min. w temperaturze 50°C. Do tak przygotowanej próbki dodawano 200 µl chloroformu i wirowano ją 10 min. przy 11000 x g. Następnie zbierano górną frakcję z próbki i dodawano do niej 250 µl izopropanolu. Po wymieszaniu całość nanoszono na minikolumnę do izolacji RNA i wirowano 1 min. przy 11000 x g. Następnie na kolumnę nanoszono roztwór płuczący A1 i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Czynność tę powtarzano 3-krotnie. Następnie na kolumnę nanoszono 100 µl wody destylowanej, wolnej od nukleaz i ponownie wirowano w tych samych warunkach, po czym kolumnę usuwano. Wyizolowany RNA rozcieńczano 50 -

krotnie i mierzono jego absorbancję przy długości fali $\lambda = 260\text{nm}$ oraz $\lambda = 280\text{nm}$, po czym obliczano stężenie, korzystając z zależności, że dla $A_{260}=1$ stężenie RNA wynosi $40\text{ ng}/\mu\text{l}$. Stosunek A_{260}/A_{280} świadczy o zanieczyszczeniu próbki białkami i próbki dla których był on mniejszy od 1,7 były odrzucane. Oznaczane próbki zamrażano w ciekłym azocie i przetrzymywano w $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do czasu dalszych analiz.

5.8.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano za pomocą zestawu RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Litwa). W próbówce do reakcji PCR przygotowywano na lodzie mieszaninę zawierającą $1\text{ }\mu\text{g}$ RNA, $1\text{ }\mu\text{l}$ oligo $(\text{dt})_{18}$ primera oraz różną ilość wody dejonizowanej, tak aby końcowa objętość wynosiła $12\text{ }\mu\text{l}$. Tak przygotowaną próbkę inkubowano 5 min. w 70°C . Następnie dodawano $4\text{ }\mu\text{l}$ buforu reakcyjnego, $1\text{ }\mu\text{l}$ inhibitora rybonukleaz i $2\text{ }\mu\text{l}$ 10 mM mieszaniny nukleotydów. Całość inkubowano 5 min. w 37°C , po czym dodawano $1\text{ }\mu\text{l}$ odwrotnej transkryptazy. Tak przygotowane $20\text{ }\mu\text{l}$ mieszaniny reakcyjnej inkubowano 60 min. w 42°C . Ostatnim etapem było zatrzymanie reakcji przez ogrzanie próbki przez 10 min. w 70°C . Tak zsyntetyzowane cDNA było przechowywane w -20°C do czasu dalszych analiz.

5.8.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Reakcje PCR przeprowadzano w całkowitej objętości $25\text{ }\mu\text{l}$. Składały się na nią $5\text{ }\mu\text{l}$ cDNA powstałego w czasie procesu odwrotnej transkrypcji oraz $20\text{ }\mu\text{l}$ mieszaniny „master mix”. Sekwencje starterów dla genu *hsp72* oraz dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*gapdh*), będącego genem referencyjnym, zaczerpnięto z publikacji (Lopez-Cotarelo, Sellhaus et al. 2000). Sekwencje starterów zestawiono w tabeli 5.5, zaś skład całej mieszaniny w tabeli 5.6.

Tabela 5.5. Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR	
Nazwa startera	Sekwencja startera
<i>hsp72</i> sens	5' – ATGCGGCCAAGAACCAGGTG- 3'
<i>hsp72</i> antysens	5' – GCGCTGCGAGTCGTTGAAGT – 3'
<i>gapdh</i> sens	5' – CACCCATGGCAAATTCATGGC – 3'
<i>gapdh</i> antysens.	5' - TCTAGACGGCAGGTCAGGTCC – 3'

Tabela 5.6. Skład mieszaniny użytej do reakcji PCR

	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	V w 25 μ l (μ l)
cDNA	-	-	5
H ₂ O	-	-	9,5
Starter dla <i>hsp72</i> sens.	30 μ M	0,84 μ M	0,7
Starter dla <i>hsp72</i> antysens.	30 μ M	0,84 μ M	0,7
Starter dla <i>gapdh</i> sens	30 μ M	0,84 μ M	0,7
Starter dla <i>gapdh</i> antysens.	30 μ M	0,84 μ M	0,7
Polimeraza Taq rec	1u / μ l	0,7 u	0,7
dNTP mix	2mM	2mM	2,5
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2
Bufor reakcyjny	10x	1x	2,5

Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler personal (Eppendorf, Niemcy). Po wstępnej denaturacji w temperaturze 94°C przez 4 minuty, następowało 30 cykli według schematu: 94°C /4 min., 63°C/30 s., 74°C/1 min., a na zakończenie 74°C/4 min. Po zakończonej reakcji mieszano 5 μ l produktu PCR z 3 μ l buforu obciążającego, którą to mieszaninę poddawano elektroforezie w 1% żelu agarozowym, barwionym bromkiem etydy (1 μ g/ml) pod napięciem 75V. Żel fotografowano w świetle ultrafioletowym i jego negatyw poddawano analizie densytometrycznej, wykorzystując program ScionImage 2005 (por. ppkt 5.7.7).

5.9. Analiza statystyczna

Weryfikacji o zgodności pomiędzy zbiorem wartości badanej próby, a rozkładem normalnym, dokonano przy użyciu testu Shapiro – Wilka. W zależności od tego czy rozkład był normalny czy też nie, wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe lub jako wartość mediany z podanymi wartościami minimalnymi i maksymalnymi.

Weryfikację statystyczną istotności między średnimi poszczególnych prób niezależnych, przeprowadzano za pomocą testu T-studenta. Dla weryfikacji istotności wartości median użyto testu U Manna – Whitneya (dla prób niezależnych), testu kolejności par Wilcozona (dla prób zależnych), a więc testów nieparametrycznych.

Zależności między ocenianymi zmiennymi, oceniano przy pomocy współczynnika R korelacji dla zmiennych nieparametrycznych Spearmana.

Wszystkie analizy były istotne statystycznie dla $p < 0,05$. Obliczeń dokonywano przy pomocy programu Statistica 7.0, firmy StatSoft Inc. (USA).

6. Krytyczna ocena materiału i metod

Pomimo starań jakie zostały dołożone w celu odpowiedniego doboru badanych grup, zaplanowania doświadczeń i optymalizacji użytych metod, nie udało się uniknąć kilku niedociągnięć.

Średni wiek osób wchodzących w skład grupy kontrolnej był niższy, niż średni wiek poszczególnych grup pacjentów. Różnice te były statystycznie istotne w przypadku grupy pacjentów leczonych zachowawczo i hemodializami w porównaniu z grupą kontrolną. Niestety znalezienie zdrowych osób w wieku powyżej 60 lat, chętnych do wzięcia udziału w badaniach okazało się bardzo trudne. Mogło to mieć znaczenie dla wyników niniejszej pracy, jako, że ekspresja białka Hsp72 zmniejsza się wraz z wiekiem (Singh, Kolvraa et al. 2006). Szerzej problem ten omówiono w dyskusji. Ze względów finansowych nie zdecydowano się na pełny panel badań laboratoryjnych u osób z grupy kontrolnej.

Wobec niewystarczającej ilości uzyskiwanego mRNA i białka, izolowanych z badanych komórek, co z kolei wynikało z małej liczby tych komórek, u części badanych pacjentów nie zdołano oznaczyć poziomu białka Hsp72 i mRNA powstałego w procesie transkrypcji jego genu wszystkimi zaplanowanymi metodami.

Wskutek braku dostępu do odpowiedniej aparatury, nie udało się wyizolować makrofagów otrzewnowych z całej populacji leukocytów otrzewnowych uzyskiwanych z płynów dializacyjnych pacjentów leczonych metodą CADO. W związku z tym białko oznaczane metodą Western – immunoblotting oraz mRNA, metodą RT-PCR, pochodziło nie tylko z makrofagów otrzewnowych, ale również z innych komórek (limfocyty, komórki mezotelium), które stanowiły ok. 25% leukocytów otrzewnowych. Obniżyło to więc wiarygodność porównania ekspresji białka Hsp72 z monocytami krwi obwodowej.

Niestety, wskutek braku dostępu do odpowiedniej aparatury nie zdołano użyć bardziej czulej metody oznaczania poziomu mRNA, polegającej na mierzeniu poziomu produktów reakcji PCR w czasie rzeczywistym (ang. Real Time PCR). Wada tradycyjnej metody PCR, użytej w niniejszej pracy w porównaniu z techniką *real time* polega na tym, że po pewnej liczbie cykli substraty ulegają zużyciu i reakcja osiąga plateau, czyli pomimo kolejnych cykli ilość produktów nie zwiększa się. Spowodowane jest to także hybrydizacją produktów ze sobą. Nie ma więc możliwości bardzo dokładnego określenia początkowej liczby kopii badanego fragmentu DNA, mierząc ilość produktu na końcu reakcji PCR.

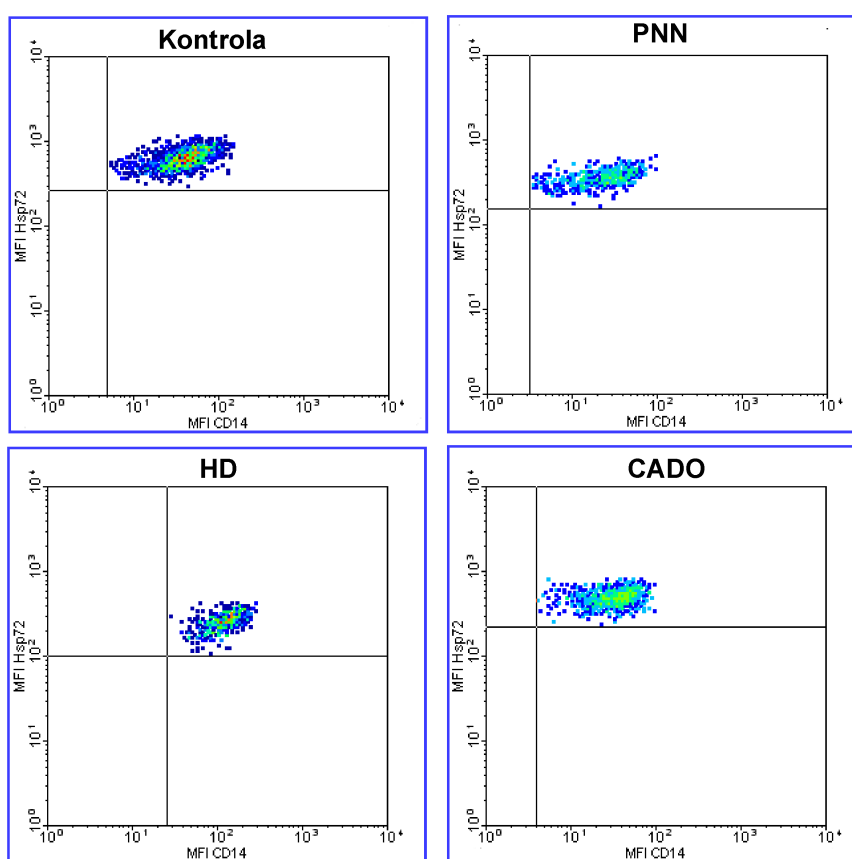
Badanie kliniczne polegające na leczeniu pacjentów dializowanych otrzewnowo dwoma różnymi płynami (Dianeal i Physioneal), powinno zostać rozszerzone o etap ponownej 12 tygodniowej kuracji pierwszym płynem. Ze względów etycznych oraz bardzo małej grupy badanej, odstąpiono od kontynuowania badania. Z różnych powodów niemożliwe było zwiększenie grupy pacjentów leczonych tymi płynami, co istotnie obniżyło statystyczną wartość uzyskanych wyników.

Stężenie białka C-reaktywnego oznaczano standardową metodą. Użycie metody wysokoczułej (high sensitivity CRP, hsCRP), która charakteryzuje się dokładniejszym pomiarem poniżej 10 mg/l, byłoby bardziej wiarygodne.

7. Wyniki

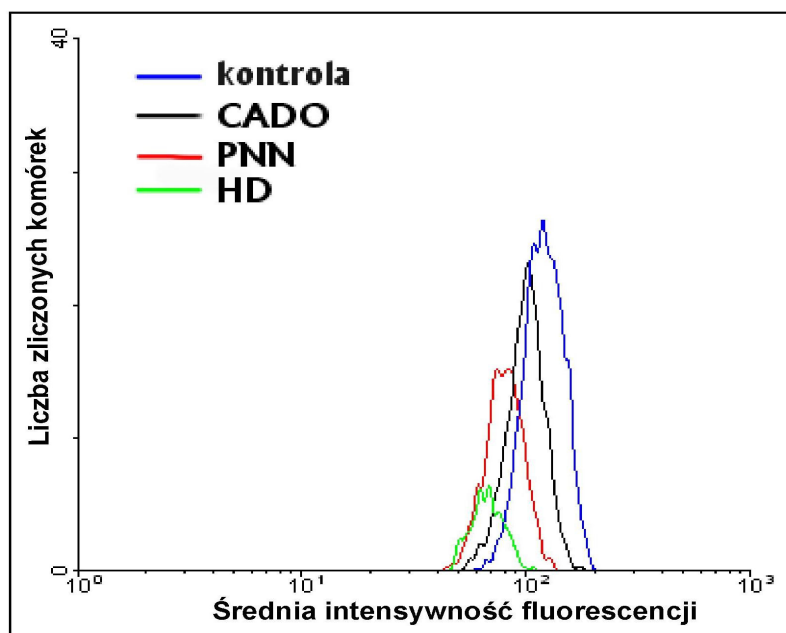
7.1. Porównanie poziomu białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej badanych grup metodą cytometrii przepływowej

Rycina 7.1. przedstawia przykładowe wykresy punktowe (ang. dotplot), będące graficzną postacią danych zebranych przy pomocy cytometru, podczas odczytywania fluorescencji monocytów izolowanych z krwi 1 osoby z każdej grupy. Oś X to średnia intensywność fluorescencji (MFI) przeciwciała dla receptora CD14, zaś Y przeciwciała anti-Hsp72. Monocyty były identyfikowane jako komórki CD14 pozytywne (prawa, górna ćwiartka każdego wykresu) i w tej populacji określano intensywność fluorescencji przeciwciała anti-Hsp72.



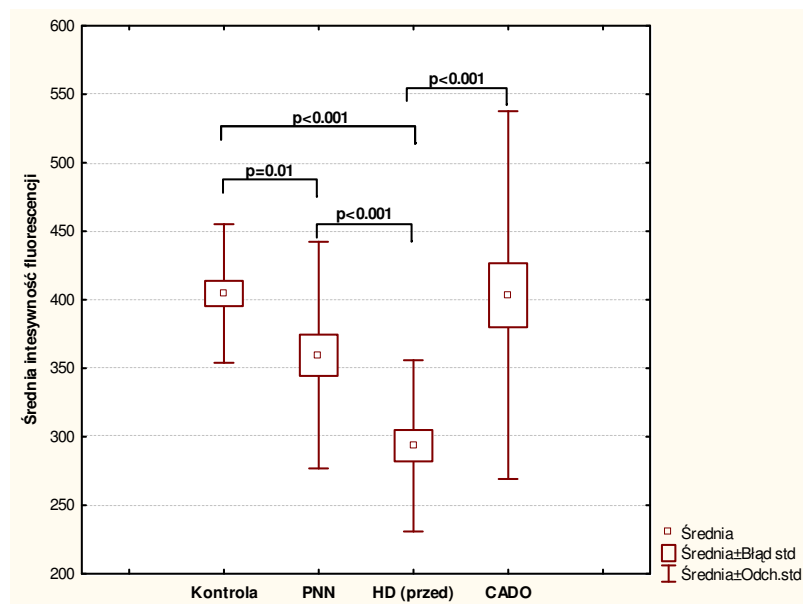
Ryc. 7.1. Przykładowe wykresy średniej intensywności fluorescencji dla każdej z badanej grup.

Histogram, czyli wykresy liczby komórek w funkcji wartości ich fluorescencji przeciwciała anti-Hsp72, dla każdej z badanych grup przedstawiono na rycinie 7.2. Im wykres jest bardziej przesunięty w prawo na osi OX, tym większa jest średnia intensywność fluorescencji wszystkich zliczonych komórek, których ilość przedstawia oś OY.



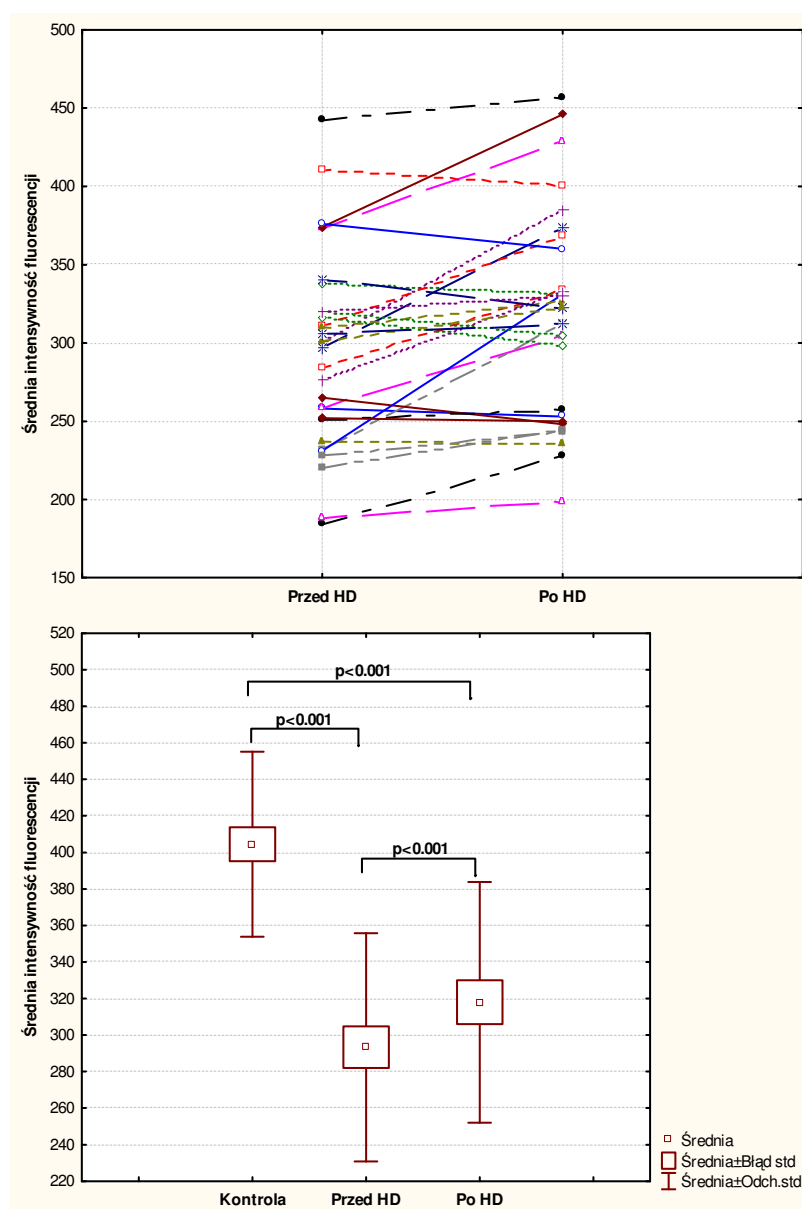
Ryc. 7.2. Przykładowe histogramy średniej intensywności fluorescencji przeciwciała anti-Hsp72 w monocytach każdej z badanych grup.

Poziom białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej, mierzony jako średnia intensywność fluorescencji, był statystycznie istotnie niższy w grupie pacjentów z PNN leczonych zachowawczo i leczonych hemodializami w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio $359 \pm 82,6$ vs. $404,5 \pm 50,6$ i $293,3 \pm 62,4$ vs. $404,5 \pm 50,6$) (ryc. 7.3).



Ryc. 7.3. Porównanie ekspresji białka Hsp72 w monocytach pacjentów z PNN oraz w monocytach grupy kontrolnej.

Natomiast nie znaleziono statystycznie istotnej różnicy w poziomie białka Hsp72 oznaczanego metodą cytometrii przepływowej, w monocytach grupy kontrolnej i grupy pacjentów dializowanej otrzewnowo (odpowiednio $404,5 \pm 50,6$ vs $403,3 \pm 134,27$) (ryc. 7.3). Statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami pacjentów z PNN stwierdzono w przypadku pacjentów hemodializowanych, u których poziom białka Hsp72 w monocytach był niższy zarówno w porównaniu do pacjentów leczonych CADO, jak i zachowawczo (ryc. 7.3).

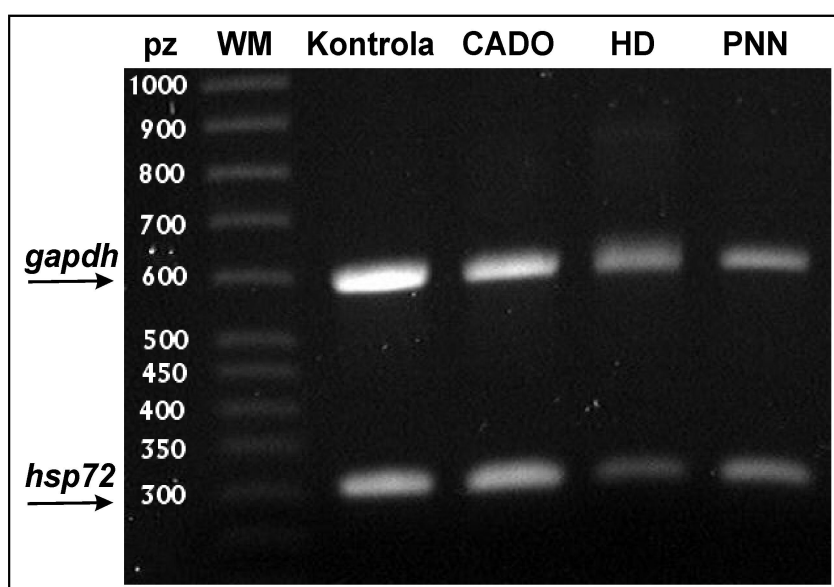


Ryc. 7.4. Porównanie ekspresji Hsp72 w monocytach krwi obwodowej izolowanej przed i po zabiegu hemodializy od tych samych pacjentów. Każda linia reprezentuje jednego pacjenta (górny panel).

Monocyty izolowane z krwi pobranej po zabiegu hemodializy, wykazywały znacząco wyższy poziom Hsp72 w porównaniu do monocytów izolowanych z krwi pobranych przed zabiegiem hemodializy od tych samych pacjentów (odpowiednio $317 \pm 65,9$ vs $293,3 \pm 62,4$). Jednakże poziom ten był również statystycznie znacznie niższy w porównaniu do kontroli (ryc. 7.4).

7.2. Porównanie poziomu mRNA genu *hsp72* w monocytach krwi obwodowej badanych grup

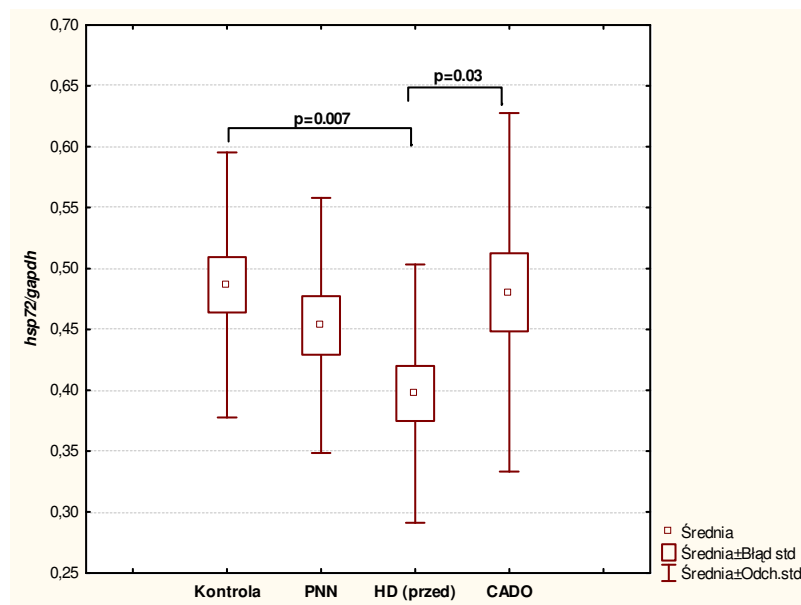
W celu porównania ekspresji genu *hsp72*, wyrażanej poziomem mRNA powstającego w procesie transkrypcji, w monocytach krwi obwodowej pacjentów z PNN i grupy kontrolnej zastosowano metodę RT-PCR. Rycina 7.5 ilustruje przykładowy wynik oznaczania poziomu mRNA w monocytach krwi obwodowej, w postaci żelu agarozowego z rozdzielonymi elektroforetycznie produktami reakcji RT-PCR.



Ryc. 7.5. Przykładowy żel agarozowy przedstawiający produkty reakcji RT-PCR dla jednego z pacjentów z każdej badanej grupy. WM - molekularny wzorzec masowy, pz - liczba par zasad odpowiadająca danemu prążkowi wzorca masowego.

Stosunek poziomu mRNA genu *hsp72* i mRNA genu *gapdh* (gen referencyjny), czyli względna ilość mRNA genu *hsp72*, był statystycznie istotnie niższy tylko w przypadku grupy pacjentów hemodializowanych w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 7.6). Ponadto, istotną różnicę stwierdzono pomiędzy grupą pacjentów hemodializowanych i pacjentów dializowanych otrzewnowo (ryc. 7.6). Średnia wartość stosunku *hsp72/gapdh* w grupie kontrolnej wynosiła $0,48 \pm 0,1$ ($n=23$, $\text{min.}=0,3$, $\text{max.}=0,69$), w grupie pacjentów

hemodializowanych $0,39 \pm 0,1$ ($n=22$, $\text{min.}=0,21$, $\text{max.}=0,6$), w grupie pacjentów leczonych metodą CADO $0,48 \pm 0,14$ ($n=21$, $\text{min.}=0,21$, $\text{max.}=0,8$) zaś w grupie pacjentów leczonych zachowawczo $0,45 \pm 0,1$ ($n=22$, $\text{min.}=0,29$, $\text{max.}=0,68$).

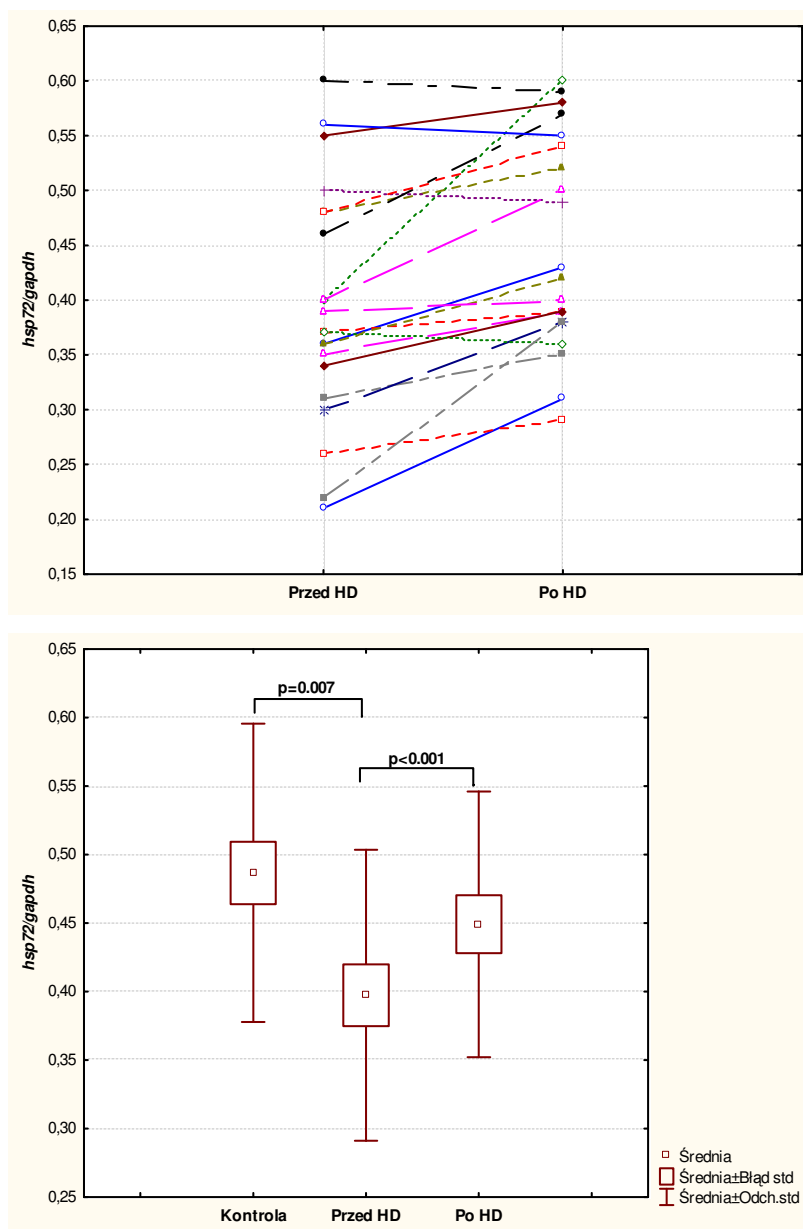


Ryc. 7.6. Porównanie poziomu mRNA genu *hsp72* w monocytach krwi obwodowej grupy kontrolnej oraz pacjentów każdej z badanych grup.

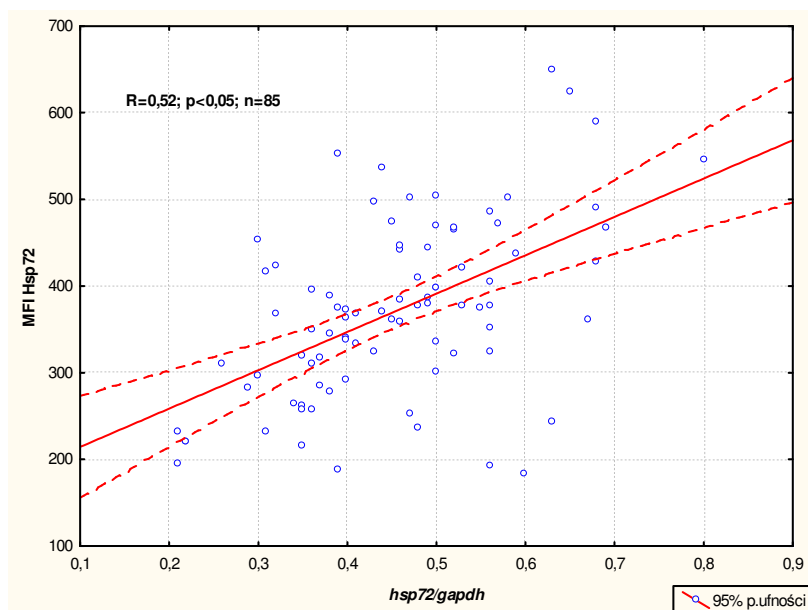
Ekspresja genu *hsp72* wyrażana poziomem mRNA w monocytach krwi pobranej przed zabiegiem hemodializy, była niższa niż po zabiegu ($0,39 \pm 0,1$ vs. $0,44 \pm 0,09$, $p=0,008$, $n=22$) (ryc. 7.7). Należy zaznaczyć, że w odróżnieniu od pomiarów poziomu białka, dokonywanych przy pomocy cytometrii przepływowej, nie zaobserwowano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy ekspresją genu *hsp72* wyrażaną poziomem mRNA w monocytach osób zdrowych i monocytach pacjentów izolowanych z krwi pobranej po zabiegu hemodializy.

Stwierdzono statystycznie istotną korelację pomiędzy poziomem mRNA genu *hsp72* (mierzonego jako stosunek gęstości prążka *hsp72* i genu referencyjnego *gapdh*), a poziomem białka, obliczoną dla wszystkich badanych osób (ryc. 7.8).

W poszczególnych grupach korelacja ta była statystycznie istotna w przypadku pacjentów leczonych zachowawczo ($R=0,45$; $p=0,049$; $n=19$) i leczonych metodą CADO ($R=0,61$; $p=0,003$; $n=21$). W grupie pacjentów leczonych HD korelacji takiej nie stwierdzono.



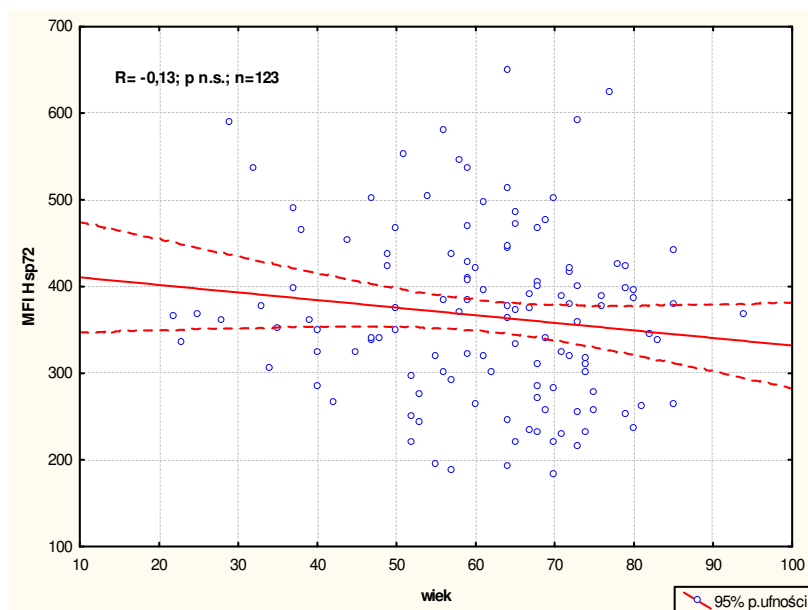
Ryc. 7.7. Porównanie ekspresji genu *hsp72* wyrażanej poziomem mRNA w monocytach krwi obwodowej izolowanej przed i po zabiegu hemodializy od tych samych pacjentów. Każda linia reprezentuje jednego pacjenta (górny panel).



Ryc. 7.8. Zależność pomiędzy poziomem białka Hsp72, a poziomem mRNA genu *hsp72* w monocytach krwi obwodowej. Wykres prezentuje dane wszystkich osób z każdej grupy, u których mierzono poziom mRNA.

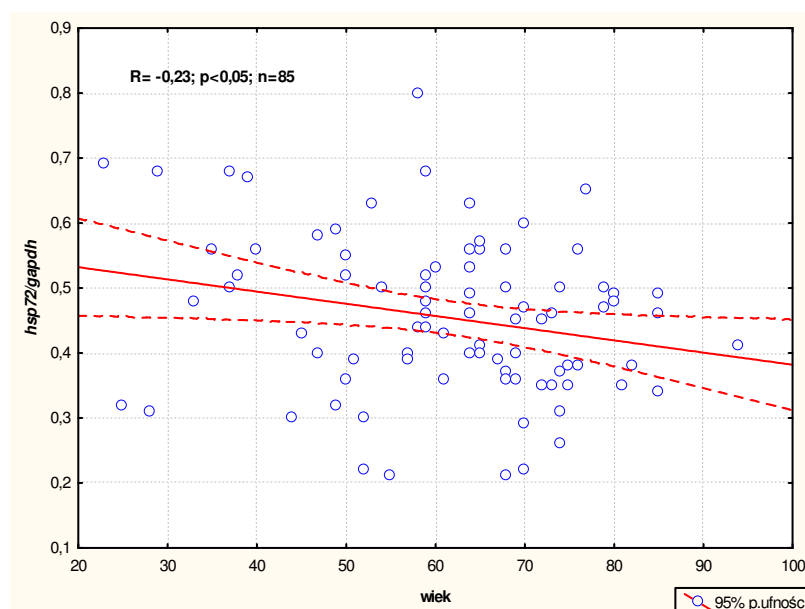
7.3. Zależności pomiędzy poziomem białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej, a wybranymi parametrami klinicznymi

Nie stwierdzono, znamiennej korelacji pomiędzy poziomem białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej, a wiekiem badanych osób (ryc. 7.9). Obserwacja ta dotyczy również obliczeń dokonanych w obrębie poszczególnych grup badanych pacjentów i zdrowych ochotników.



Ryc. 7.9. Zależność pomiędzy wiekiem, a poziomem białka Hsp72 osób wszystkich badanych grup.

Poziom mRNA genu *hsp72* wykazuje istotnie statystyczną korelację z wiekiem wszystkich osób, u których wykonano badania. Jakkolwiek współczynnik korelacji jest niewielki (ryc. 7.10). Zależności tej nie stwierdzono w żadnej z poszczególnych badanych grup.

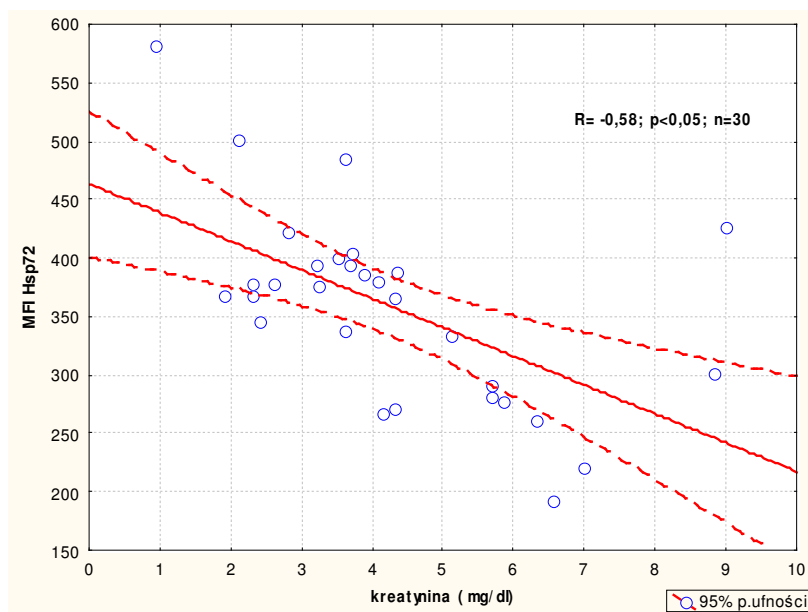


Ryc. 7.10. Zależność pomiędzy wiekiem, a poziomem mRNA genu *hsp72* w monocytach krwi obwodowej wszystkich badanych osób.

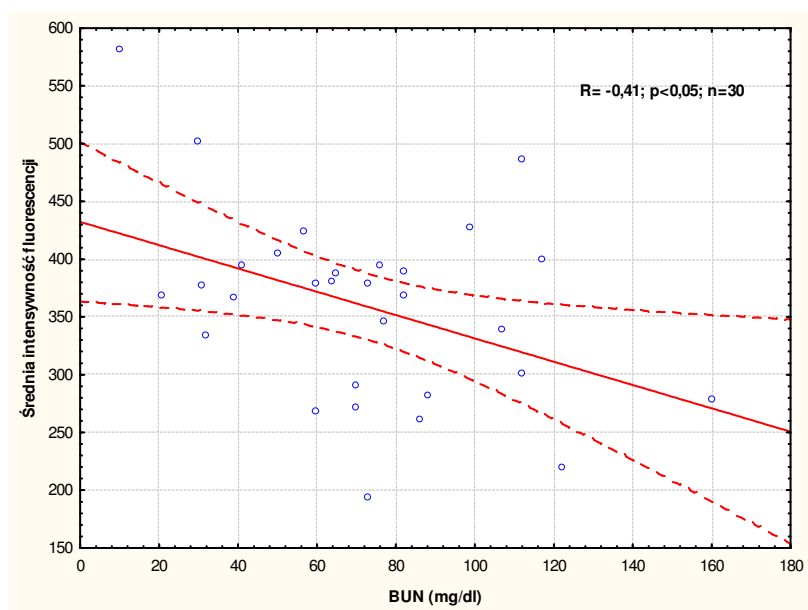
Nie stwierdzono statystycznie istotnej korelacji pomiędzy długością okresu dializoterapii (hemodializy i CADO) oraz czasem jaki upłynął od momentu rozpoznania PNN, a poziomem białka Hsp72 i mRNA genu *hsp72* w monocytach krwi obwodowej.

W grupie pacjentów leczonych zachowawczo stwierdzono, iż poziom białka Hsp72 ujemnie korelował z poziomem kreatyniny (ryc. 7.11), BUN (ryc. 7.12) i białka C-reaktywnego (ryc. 7.13), a dodatnią korelację zaobserwowano w przypadku wskaźnika GFR (ryc. 7.14.). Nie stwierdzono żadnej zależności pomiędzy pozostałymi parametrami laboratoryjnymi i klinicznymi, a poziomem białka Hsp72, jak również poziomem mRNA genu *hsp72*.

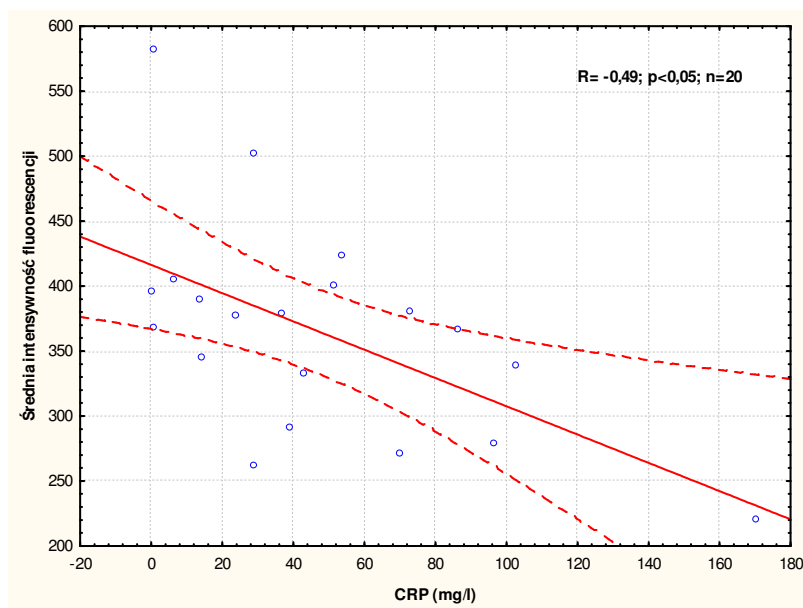
Ponadto w tej grupie pacjentów stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy poziomem białka CRP, a poziomem kreatyniny ($R=0,54$; $p<0,05$; $n=20$) oraz pomiędzy poziomem białka CRP, a poziomem BUN ($R=0,45$; $p<0,05$; $n=20$).



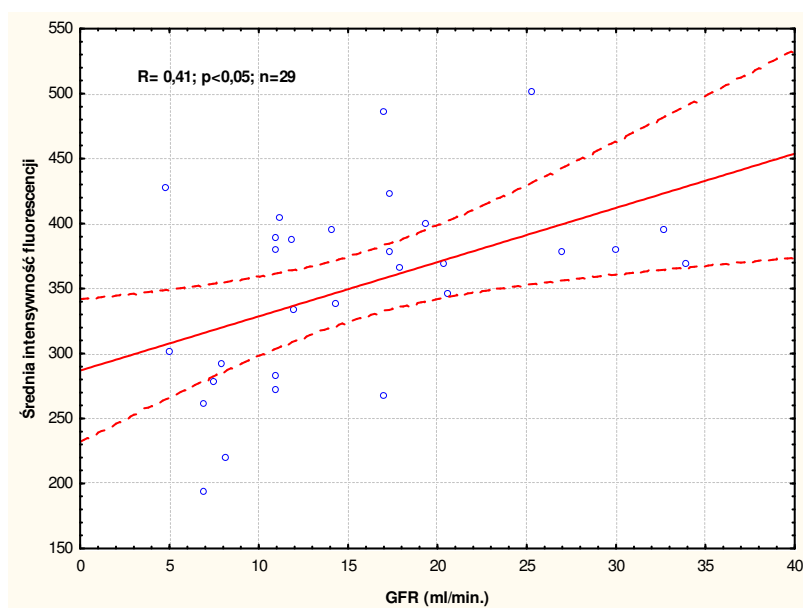
Ryc. 7.11. Zależność pomiędzy poziomem kreatyniny, a poziomem białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej pacjentów leczonych zachowawczo.



Ryc. 7.12. Zależność pomiędzy poziomem BUN, a poziomem białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej pacjentów leczonych zachowawczo.



Ryc. 7.13. Zależność pomiędzy poziomem CRP, a poziomem białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej pacjentów leczonych zachowawczo.

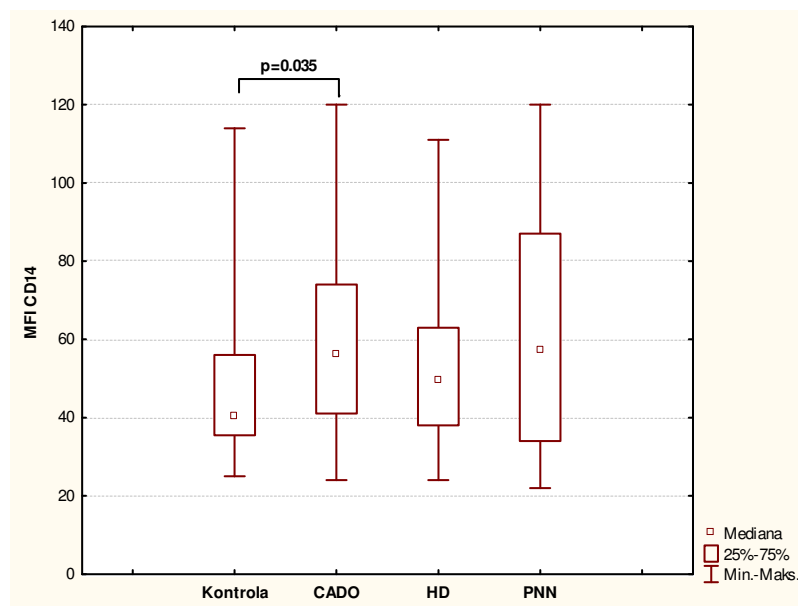


Ryc. 7.14. Zależność pomiędzy wskaźnikiem GFR, a poziomem białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej pacjentów leczonych zachowawczo.

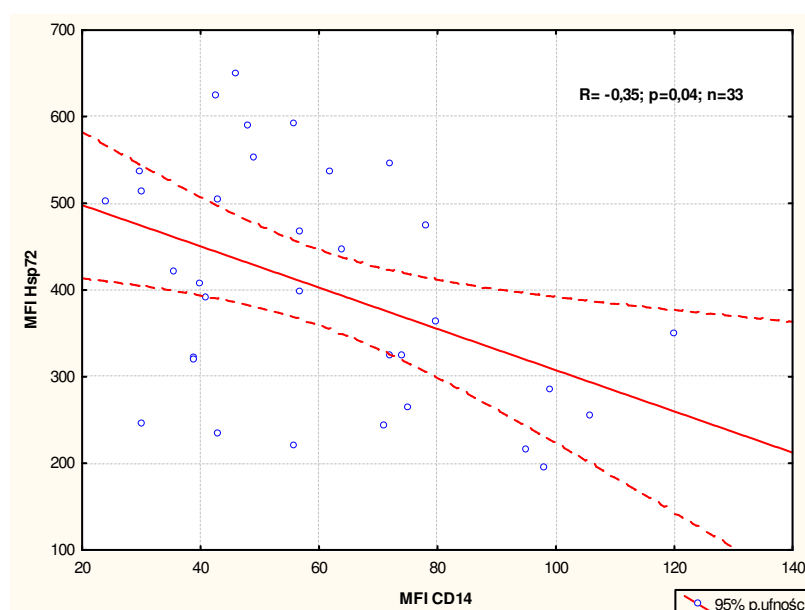
Parametry laboratoryjne i kliniczne pacjentów hemodializowanych i dializowanych otrzewnowo nie korelowały w sposób statystycznie istotny, zarówno z poziomem białka, jak i poziomem mRNA genu *hsp72* w monocytach krwi obwodowej.

7.4. Porównanie poziomu białka CD14 na powierzchni monocytów krwi obwodowej badanych grup

Ponieważ poziom receptora CD14 może ulegać zwiększeniu pod wpływem stymulacji monocytów między innymi przez LPS, pomiar jego ilości może posłużyć do oceny stopnia aktywacji monocytów, co zostanie szerzej omówione w dyskusji. I w tym właśnie celu wykonano poniższą analizę.



Ryc. 7.15. Porównanie poziomu białka CD14 na powierzchni monocytów krwi obwodowej wszystkich badanych grup.



Ryc. 7.16. Zależność pomiędzy poziomem receptora CD14, a poziomem białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej pacjentów dializowanych otrzewnowo.

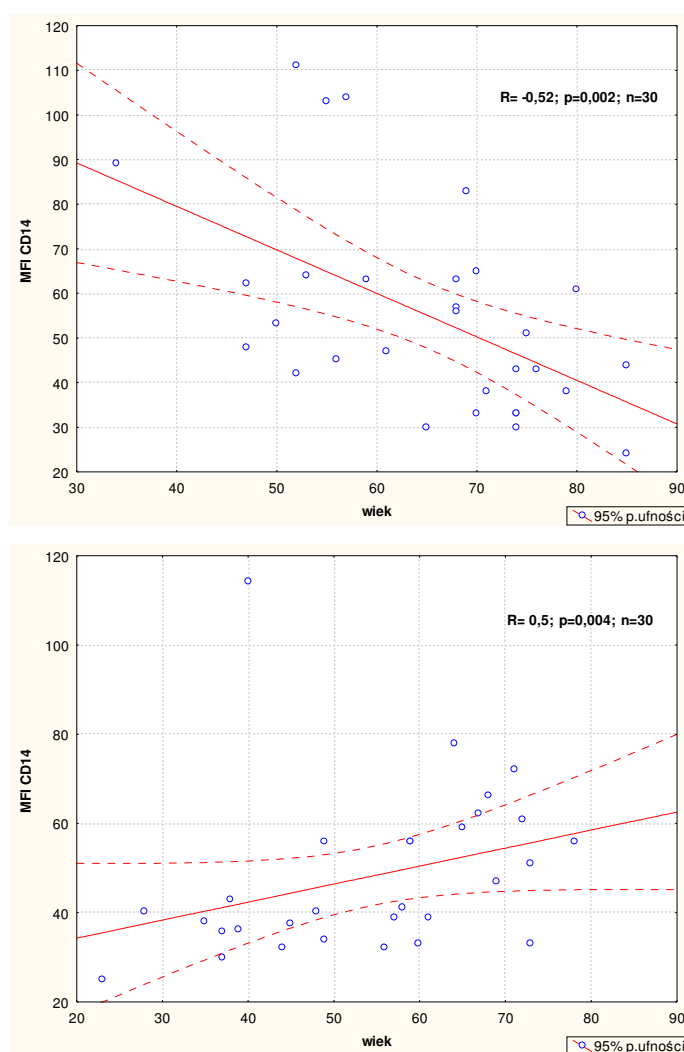
Statystycznie istotną różnicę w poziomie receptora CD14 zaobserwowano tylko pomiędzy grupą kontrolną i grupą pacjentów dializowanych otrzewnowo.

Mediana grupy kontrolnej wyniosła 40,5 (min.- 25, max. – 114, n=30), zaś grupy dializowanej otrzewnowo 56 (min. – 24, max. – 120, n=28)(ryc. 7.15).

Nie zaobserwowano żadnych różnic w ekspresji receptora CD14 na powierzchni monocytów izolowanych z krwi przed i po zabiegu hemodializy.

W grupie pacjentów dializowanych otrzewnowo stwierdzono, iż poziom białka Hsp72 ujemnie korelował z poziomem receptora CD14 (ryc. 7.16). Korelacji tej nie stwierdzono w żadnej innej badanej grupie oraz biorąc pod uwagę całą badaną populację.

Stwierdzono, iż poziom białka CD14 nie korelował znamienne z wiekiem wszystkich badanych osób (n=123). Statystycznie istotną ujemną korelację zauważono w grupie pacjentów hemodializowanych, zaś w grupie kontrolnej – korelację dodatnią (ryc. 7.17).



Ryc. 7.17. Zależność pomiędzy wiekiem, a poziomem receptora CD14 w grupie pacjentów hemodializowanych (górny panel) i grupie kontrolnej (dolny panel).

Nie znaleziono korelacji pomiędzy poziomem receptora CD14, a żadnym innym parametrem w żadnej z grup.

7.5. Analiza poziomu białka Hsp72 i mRNA genu *hsp72* w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej i leukocytach otrzewnowych pacjentów dializowanych otrzewnowo

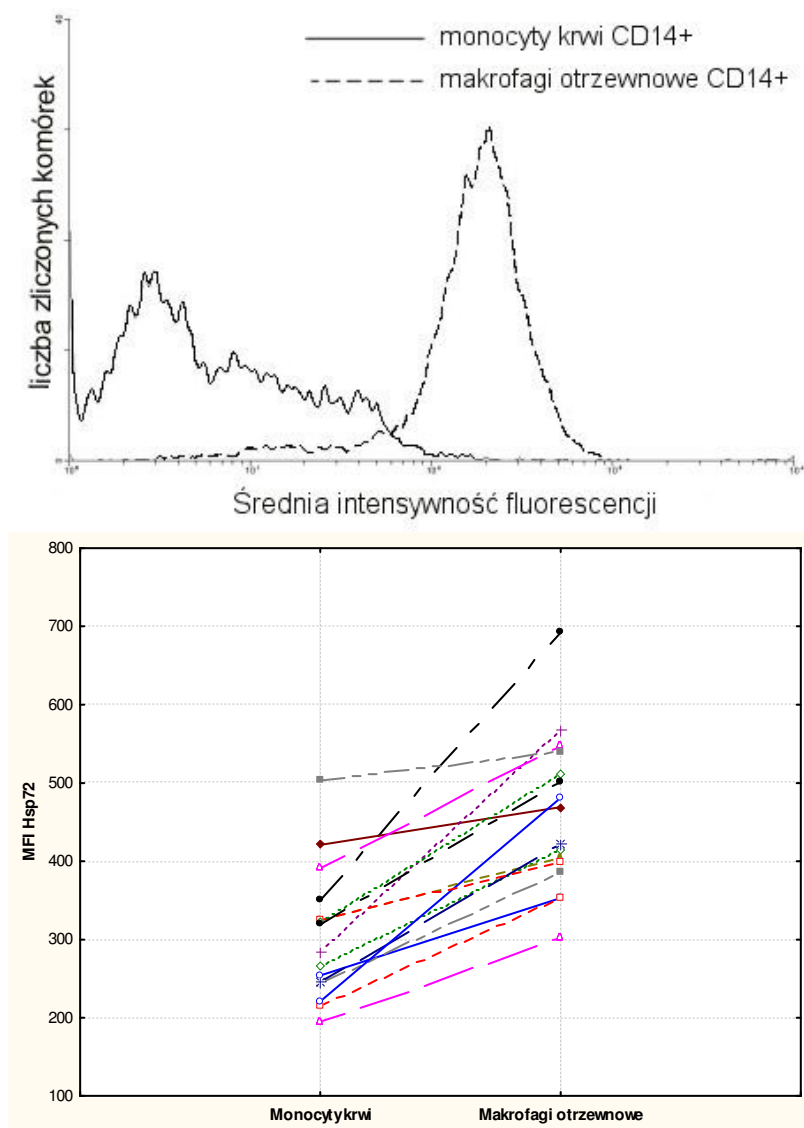
W celu oceny poziomu białka Hsp72 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej i leukocytach otrzewnowych, posłużono się metodą cytometrii przepływowej, western-immunoblotting oraz RT-PCR.

Rycina 7.18 przedstawia przykładowy histogram pokazujący średnią intensywność fluorescencji monocytów krwi obwodowej i makrofagów otrzewnowych izolowanych z płynu poddializacyjnego tego samego pacjenta. Pokazuje on, iż ekspresja białka Hsp72 w makrofagach otrzewnowych jest wyższa. Różnica ta jest statystycznie istotna. Średnia intensywność fluorescencji w monocytach krwi wyniosła $304,93 \pm 82,4$, zaś w makrofagach otrzewnowych - $458,56 \pm 99,4$ ($p < 0.001$, $n=16$).

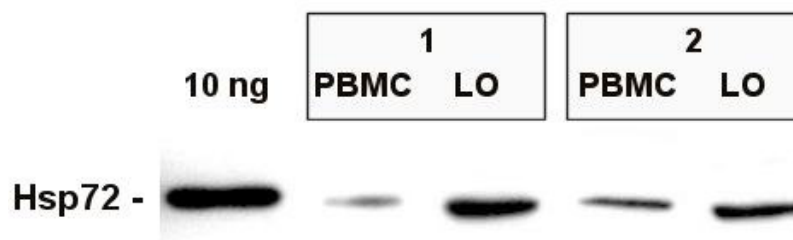
Różnicę tę potwierdziło badanie poziomu białka Hsp72 metodą western-immunoblotting, przeprowadzone na grupie 6 pacjentów. Jakkolwiek, w wyniku braku możliwości izolacji komórek CD14+, porównywano komórki jednojądrzaste krwi z całą populacją leukocytów otrzewnowych tych samych pacjentów (ryc. 7.19). Ilość białka Hsp72 mierzona skalą szarości (por. ppkt. 5.7.7) była istotnie wyższa w leukocytach otrzewnowych, niż w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (odpowiednio $115,42 \pm 22,4$ wobec $64,96 \pm 17,69$, $p=0,01$, $n=6$).

Badania poziomu mRNA dokonano również w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej i w całej populacji leukocytów otrzewnowych. Średnia stosunku *hsp72/gapdh* w leukocytach otrzewnowych była istotnie wyższa niż w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (odpowiednio $0,58 \pm 0,19$ vs. $0,42 \pm 0,12$, $p < 0,001$, $n=13$) (ryc. 7.20).

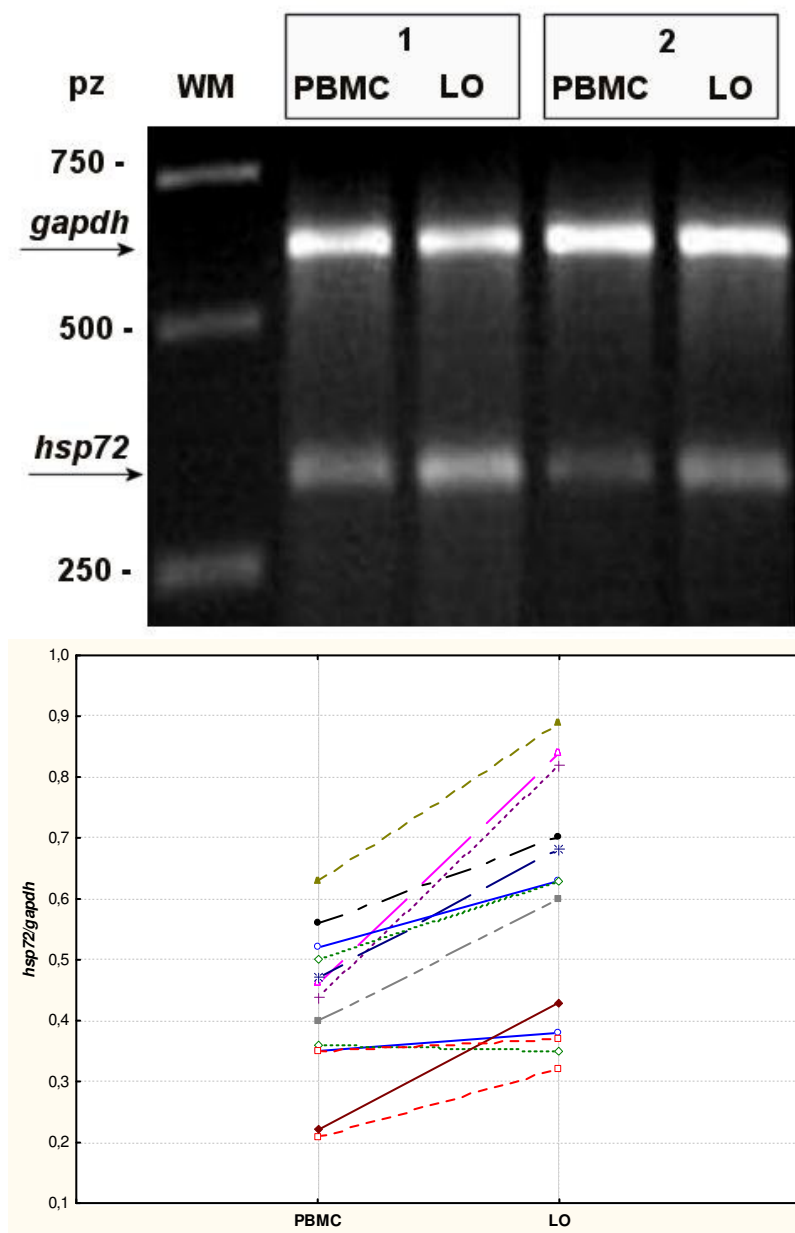
Badanie przy użyciu cytometru przepływowego, nie wykazało istotnych różnic w poziomie białka CD14 na powierzchni monocytów krwi obwodowej i makrofagów otrzewnowych.



Ryc. 7.18. Przykładowy histogram porównujący MFI monocytów krwi oraz makrofagów otrzewnowych jednego pacjenta (górny panel) oraz porównanie ekspresji Hsp72 w monocytach krwi i makrofagach otrzewnowych izolowanych od tych samych pacjentów. Każda linia reprezentuje jednego pacjenta (dolny panel).



Ryc. 7.19. Zdjęcie przykładowej błony nitrocelulozowej, otrzymanej podczas oznaczania poziomu białka Hsp72 u 2 pacjentów metodą western-blotting. 10 ng – 10ng oczyszczonego białka Hsp72; PMBC – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej; LO –leukocyty otrzewnowe

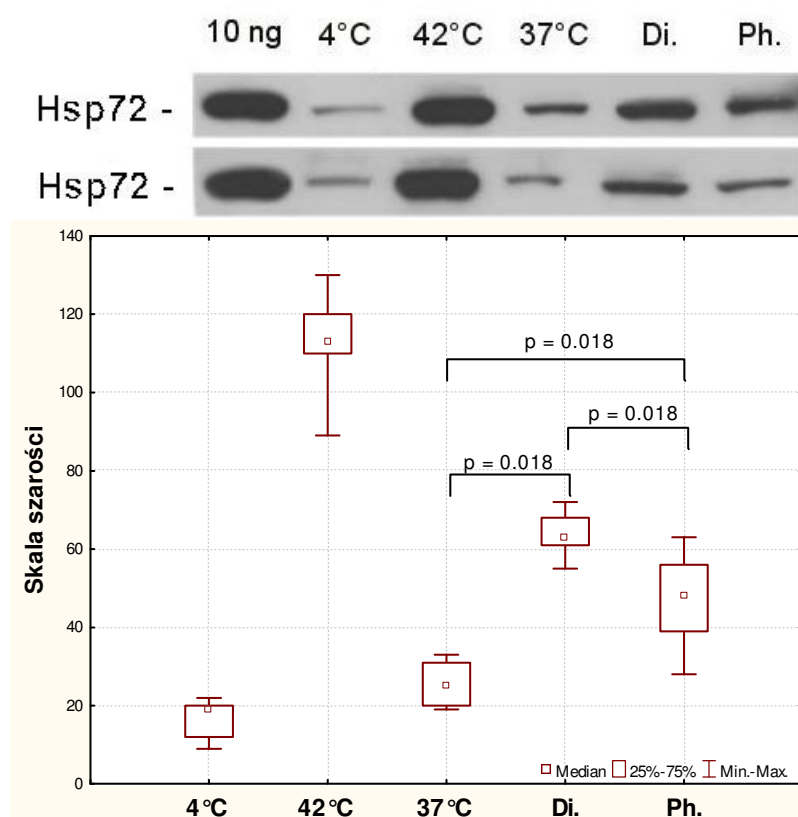


Ryc. 7.20. Górny panel - przykładowy żel agarozowy przedstawiający produkty reakcji RT-PCR dla 2 pacjentów. WM - molekularny wzorec masowy, pz - liczba par zasad odpowiadające danemu prążkowi wzorca masowego, PBMC – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, LO – leukocyty otrzewnowe. Dolny panel – porównanie poziomu mRNA *hsp72* mierzonego jako stosunek *hsp72/gapdh* w komórkach jednojądrzastych krwi oraz leukocytach otrzewnowych. Każda linia reprezentuje jednego pacjenta.

7.6. Analiza poziomu białka Hsp72 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej inkubowanych *in vitro* w płynach dializacyjnych

W celu potwierdzenia, iż zwiększona ilość białka Hsp72 w leukocytach otrzewnowych jest spowodowana działaniem płynu dializacyjnego, komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC) zdrowych ochotników zostały poddane działaniu płynów dializacyjnych *in vitro*. Porównano również wpływ 2 różnych płynów dializacyjnych,

buforowanych mleczanem (Dianeal) oraz dwuwęglanem (Physioneal). Schemat badania został opisany w ppkt. 4.4.2. Zaobserwowano statystycznie istotną większą ekspresję białka Hsp72 w komórkach poddanych działaniu obu płynów dializacyjnych w porównaniu do kontroli, jaką były komórki inkubowane w pożywce RPMI w 37°C (dla kontroli mediana skali szarości wynosiła 25, min. – 19, max. – 33). Poziom białka Hsp72 w komórkach poddanych działaniu płynu Physioneal stanowił 192% poziomu kontroli (mediana=48, min. – 28, max. – 63) i 252% poziomu kontroli w przypadku płynu Dianeal (mediana = 63, min. – 55, max. – 72; $p=0,018$ dla obu porównań, $n=7$)(ryc. 7.21). Ekspresja w komórkach jednojądrzastych poddanych działaniu płynu buforowanego mleczanem (Dianeal) była znacząco wyższa, niż w komórkach poddanych działaniu płynu dializacyjnego buforowanego dwuwęglanem (Physioneal); $p=0,018$, $n=7$. (ryc. 7.21).



Ryc. 7.21. Górny panel – zdjęcie przykładowej błony nitrocelulozowej, otrzymanej podczas oznaczania poziomu białka Hsp72 w dwóch eksperymentach *in vitro*, metodą western-blotting. 10 ng – 10ng oczyszczonego białka Hsp72; 4°C – komórki inkubowane w RPMI przez 4h w 4°C; 42°C – komórki inkubowane w RPMI przez 1h w 42°C, a następnie przez 3h w 37°C; 37°C – komórki inkubowane w RPMI przez 4h w 37°C; Di. i Ph. – komórki inkubowane przez 1h w 37°C w płynie Dianeal i Physioneal (odpowiednio), a następnie w RPMI przez 3h w 37°C; Dolny panel – analiza statystyczna otrzymanych wyników, $n=7$.

7.7. Analiza poziomu białka Hsp72 w komórkach pacjentów, leczonych przy pomocy dwóch płynów dializacyjnych

Poziom białka Hsp72 został oznaczony w monocytach krwi obwodowej oraz makrofagach otrzewnowych 5 pacjentów, leczonych najpierw płynem Dianeal, a następnie płynem Physioneal – por. ppkt. 5.2.1 oraz rycinę 5.1. Różnica w poziomie Hsp72 (mierzona jako średnia intensywność fluorescencji, MFI) w makrofagach izolowanych z płynu Dianeal i Physioneal nie była istotna statystycznie ($p>0.05$) – u 3 pacjentów zanotowano wzrost ekspresji po zmianie płynów, u 2 spadek. Mediana MFI makrofagów izolowanych z Dianeal wyniosła 367 (min. – 298, maks. – 698), a izolowanych z Physioneal – 426 (min. – 360, maks. – 498). Również nie znaleziono statystycznie znaczących różnic w ilości białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej – u 3 pacjentów ekspresja Hsp72 wzrosła po 12 tygodniowym leczeniu płynem Physioneal, a u 2 spadła, w porównaniu do komórek izolowanych po leczeniu płynem Dianeal. Mediana MFI wyniosła odpowiednio 235 (min.- 195, maks. - 350) i 256 (min. – 189, max. – 301).

8. Dyskusja

Indukcja białek szoku termicznego w warunkach stresowych była wykorzystana w ocenie toksyczności wielu różnych substancji. W wyniku inhalacji ozonu i kwasu azotowego przez szczury, dochodziło w komórkach pęcherzyków płucnych do wzrostu poziomu białka Hsp72, który był zależny od dawki wdychanej substancji (Wong, Bonakdar et al. 1996). Ekspozycja *in vitro* ludzkich monocytów i komórek endotelialnych na dym tytoniowy, indukowała syntezę białka Hsp72, powodowała utratę potencjału błony mitochondrialnej, a następnie śmierć komórki (Vayssier, Favatier et al. 1998). Ekspresję białka Hsp72 w komórkach małych bezkręgowców glebowych wykorzystano także jako marker zanieczyszczenia gleby nawozami sztucznymi (Nadeau, Corneau et al. 2001; Staempfli, Becker-Van Slooten et al. 2002). Istnieje również wiele prac opisujących odpowiedź stresową wywołaną przez działanie metali ciężkich na różnego rodzaju komórki: monocyty (Noda, Wataha et al. 2003), keratynocyty (Nordlind 2002) oraz komórki endotelialne (Wagner, Hermanns et al. 1999).

Biorąc pod uwagę przytoczone powyżej prace, można stwierdzić, że białko Hsp72 wydaje się być dobrym markerem cytotoxyczności różnych substancji oraz stanów patofizjologicznych działających na organizmy żywe. W związku z powyższym postanowiono przeprowadzić analizę ekspresji białek szoku termicznego w toksemii mocznicowej i wpływu różnych procedur dializacyjnych na komórki pacjenta, a w szczególności ocenę przydatności oznaczania poziomu ekspresji białka Hsp72 do badań biozgodności płynów dializacyjnych.

8.1. Wpływ przewlekłej niewydolności nerek na ekspresję białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej u pacjentów leczonych zachowawczo

W trakcie badań stanowiących przedmiot niniejszej pracy zaobserwowano statystycznie istotne różnice w poziomie białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej pacjentów z PNN leczonych zachowawczo w porównaniu z grupą kontrolną. Mianowicie komórki te wykazywały znacznie niższy poziom ekspresji białka Hsp72 mierzony metodą cytometrii przepływowej (ryc. 7.3). Różnicy statystycznie istotnej nie stwierdzono w przypadku pomiaru poziomu mRNA genu *hsp72* metodą RT-PCR (ryc. 7.6). Poziom komórkowego białka Hsp72 w monocytach pacjentów w okresie przeddializacyjnym był tym niższy, im bardziej podwyższone były markery toksemii mocznicowej (kreatynina,

BUN) i obniżona filtracja kłębuszkowa. Świadczy o tym ujemna korelacja pomiędzy poziomem białka Hsp72, a stężeniem kreatyniny (ryc. 7.11) i azotu mocznika (BUN) w surowicy (ryc. 7.12) oraz dodatnia korelacja pomiędzy poziomem białka Hsp72, a wskaźnikiem GFR (ryc. 7.14). Biorąc pod uwagę podane powyżej przykłady użycia ekspresji Hsp72 jako markera wpływu czynników stresowych i stanów patologicznych działających na organizmy żywe, wyniki te wydają się być zaskakujące. Należało się spodziewać, iż czynnik stresowy, jakim jest niewątpliwie toksemia mocznicowa, będzie powodował wzrost poziomu białka Hsp72. Tymczasem obserwacja wynikająca z przeprowadzonych badań jest zupełnie odwrotna.

Wyjaśnienia tego zjawiska można upatrywać w tym, że białko Hsp72 spełnia nie tylko funkcję chaperonową (opiekuńczą), ale również wykazuje aktywność cytokinową. Ta druga funkcja, będąca przedmiotem intensywnych badań w ostatnich latach, pozwala na postawienie hipotezy tłumaczącej przyczynę obniżonej ekspresji białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej chorych z PNN.

Pacjenci z PNN leczeni zachowawczo oraz nerkozastępczo, wykazują objawy upośledzonej odpowiedzi immunologicznej, zarówno komórkowej jak i humoralnej (Matsumoto, Shinzato et al. 1998; Daichou, Kurashige et al. 1999). Skutkuje to m.in. zwiększoną podatnością na infekcję, upośledzoną funkcją fagocytarną, zaburzoną aktywnością limfocytów NK, niską odpowiedzią na szczepionkę przeciw WZW typu B czy w końcu zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworu. Zmiana w produkcji i wydzielaniu cytokin prozapalnych (IL-1, TNF- α , IL-6) oraz białek ostrej fazy może przyczyniać się do rozwoju blaszki miażdżycowej oraz zwiększenia ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych (Zimmermann, Herrlinger et al. 1999). Z czym wiąże się również opisany wcześniej zespół MIA.

Monocyty biorą udział w prezentacji antygenów, oddziałują z limfocytami T i B, produkują i wydzielają liczne cytokiny. Z jednej strony funkcja monocytów jest hamowana poprzez toksyny mocznicowe lub bioniezdadne właściwości błon dializacyjnych, ale z drugiej strony aktywacja monocytów powoduje stan zapalny oraz zaburzenia w układzie immunologicznym pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek (Nockher and Scherberich 1995).

Biorąc pod uwagę przytoczone powyżej informacje, można przypuszczać, iż na ekspresję białek szoku termicznego w monocytach pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek, wpływają nie tylko czynniki stresowe, które w dotychczasowym pojęciu

stymulowałyby tylko syntezę białek Hsp72, ale również złożone procesy patologiczne związane z toksenią mocznicową, które prawdopodobnie hamują ekspresję tych białek.

Obniżona ekspresja białka Hsp72 w monocytach chorych z PNN mogłaby wiązać się ze zwiększoną produkcją cytokin prozapalnych. Jak już wspomniano we wstępie niniejszej pracy białko Hsp72 hamuje syntezę cytokin prozapalnych, poprzez blokowanie kompleksu kinazy I κ B i w konsekwencji inhibicję czynnika NF- κ B (Jo, Ko et al. 2006; Kammanadiminti and Chadee 2006). Okazuje się również, iż czynnik HSF1 jest odpowiedzialny nie tylko za regulację syntezy białek Hsp, ale również cytokin prozapalnych (Wirth, Bureau et al. 2004). Przy czym w tych dwóch procesach działa przeciwnie – stymuluje transkrypcję genów Hsp, równocześnie hamując wiązanie czynnika NF- κ B do DNA i tym samym syntezę cytokin prozapalnych. W sytuacji zmniejszonej ekspresji czynnika HSF1, co prawdopodobnie jest efektem przewlekłego działania toksyn mocznicowych, zmniejszeniu ulegałaby synteza białek Hsp, zaś zwiększeniu synteza cytokin prozapalnych. Taką sytuację obserwujemy właśnie w przypadku chorych z PNN. Potwierdzeniem tej hipotezy jest obniżenie poziomu białka Hsp72 wraz ze wzrostem stężenia białka c-reaktywnego w surowicy pacjentów z PNN leczonych zachowawczo (ryc. 7.13), będącego markerem stanu zapalnego.

Nie można wykluczyć również, iż zmniejszony poziom komórkowego Hsp72 wynika z wydzielania tego białka do przestrzeni międzykomórkowej. Stwierdzono bowiem, iż poziom mRNA genu *hsp72*, w przeciwieństwie do poziomu białka, nie różnił się istotnie od grupy kontrolnej i nie korelował z parametrami opisującymi stopień zaawansowania PNN w grupie pacjentów leczonych zachowawczo. Sugeruje to, że niski poziom białka nie jest wynikiem regulacji ekspresji, która odbywa się na poziomie transkrypcji. Jakkolwiek stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy ekspresją genu, a poziomem białka Hsp72 w tej grupie chorych. Te sprzeczne obserwacje wymagają wyjaśnienia w toku dalszych badań.

Prowadzone badania *in vitro* potwierdzają mechanizm, w którym komórki krwi pod wpływem specyficznych czynników stresowych aktywnie wydzielają białko Hsp72 na zewnątrz komórki, co skutkuje jego zmniejszonym poziomem wewnątrz komórki (Hunter-Lavin, Davies et al. 2004). Niewykluczone, iż taki mechanizm zachodzi w komórkach poddanych działaniu toksyn mocznicowych. Uwolnione białko Hsp72 również może stymulować produkcję cytokin prozapalnych i tłumaczyć w ten sposób fakt korelacji z białkiem c-reaktywnym. Udowodniono, iż białka Hsp, w tym Hsp72, uwalniane w procesie ropadu komórki lub aktywnego transportu, mogą być potencjalnymi czynnikami aktywującymi układ odpornościowy (Wallin, Lundqvist et al. 2002). Aktywacja ta

polegała m.in. na stymulacji monocytów i makrofagów do produkcji cytokin prozapalnych i tlenu azotu, poprzez wiązanie się białek Hsp do receptora CD14 występującego na ich powierzchni. Białko CD14 jest cząsteczką o masie 55 kDa, zakotwiczoną w błonie komórkowej przy pomocy glikofosfatydylo-inozytolu i stanowi główny receptor dla lipopolisacharydu (LPS), który stymuluje jego ekspresję (Stelter 2000). Z kolei leki immunosupresyjne tą ekspresję hamują. Ponadto białko CD14 odpowiada za rozpoznawanie i fagocytozę ciałek apoptotycznych (Nockher and Scherberich 1995). Można więc uznać, iż oznaczanie ekspresji receptora CD14 na powierzchni monocytów może służyć nie tylko do identyfikacji tej populacji komórek, ale również jako marker ich aktywacji. W sytuacji, w której uwolnione białko Hsp72 miałyby stymulować komórki układu odpornościowego, badane przez nas monocyty stanowiłyby więc zarówno źródło, jak i cel białka Hsp72, które zwiększałyby ekspresję białka CD14. W przeprowadzonych badaniach mediany ekspresji CD14 w monocytach wszystkich grup pacjentów z PNN były wyższe niż w grupie kontrolnej (ryc. 5.15). Jakkolwiek brak znamienności statystycznej obserwowanych różnic oraz brak korelacji między poziomem białek Hsp72 i CD14 w grupie pacjentów leczonych zachowawczo sprawia, że hipoteza mówiąca o sekrecji białka Hsp72 pod wpływem toksyn mocznicowych oraz jego roli w aktywacji monocytów wymaga potwierdzenia w toku dalszych badań.

8.2. Wpływ przewlekłej niewydolności nerek na ekspresję białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej u pacjentów leczonych hemodializami i CADO

Monocyty krwi obwodowej pacjentów hemodializowanych wykazywały znacznie niższy poziom białka Hsp72 mierzony metodą cytometrii przepływową, jak i poziom mRNA, mierzony metodą RT-PCR niż monocyty osób zdrowych. Wy tłumaczeniem tego faktu, mógłby być również wpływ toksemii mocznicowej oraz mechanizmy opisane w przypadku pacjentów leczonych zachowawczo. Jednakże poziom białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej pacjentów hemodializowanych, jak i mRNA, był znacząco niższy, niż w grupie pacjentów leczonych zachowawczo, mimo iż średni poziom BUN, będący głównym wskaźnikiem toksemii mocznicowej był również niższy u pacjentów hemodializowanych. W grupie tych pacjentów nie stwierdzono również korelacji pomiędzy poziomem Hsp72, a stężeniem azotu mocznika, jak również współczynnikiem Kt/V, określającym adekwatność hemodializy. Analizując wpływ pojedynczego zabiegu hemodializy na poziom białka Hsp72 i mRNA genu *hsp72*, stwierdzono ich istotny wzrost u prawie wszystkich pacjentów (ryc. 7.4). Sugeruje to, że procesy zachodzące podczas

krażenia pozaustrojowego opisane we wstępie pracy, świadczące o bioniezgodności zabiegu, nasilają ekspresję białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej. Do tego stopnia, iż poziom mRNA nie różnił się istotnie od poziomu mRNA w monocytach grupy kontrolnej. Należy zaznaczyć, że próbka krwi do badań była pobierana w chwili zakończenia dializy. Gdyby odroczone czas pobrania próbki krwi, wówczas w wyniku zachodzącej translacji w monocytach, poziom białka mógłby być jeszcze wyższy.

Można przypuszczać, iż niższy poziom białka Hsp72 u pacjentów hemodializowanych, może być wynikiem ciągłej stymulacji monocytów. Częsty kontakt z błonami dializatorów i liniami krwi i tym samym ciągła aktywacja odpowiedzi szoku termicznego, może prowadzić do osłabienia syntezy białek Hsp72 w odpowiedzi na kolejne bodźce. Podobne zjawisko opisano w komórkach mięśni szczurów. Nagły wysiłek fizyczny powodował mniejszy wzrost poziomu białka Hsp72 u szczurów, które regularnie „trenowały”, niż u szczurów zwykle nieaktywnych fizycznie (Gonzalez, Hernando et al. 2000). Podobne zjawisko zaobserwowano w trakcie badań *in vitro*, w których komórki neuroblastyczne poddawane stałemu działaniu mocznika wykazywały zwiększenie ekspresji białka Hsp72. Jednak wraz z upływem czasu inkubacji, poziom Hsp72 malał, zaś ponowna stymulacja podczas następnego eksperymentu skutkowała niższym poziomem odpowiedzi szoku termicznego. Wg autorów może to świadczyć o dostosowywaniu się komórek układu nerwowego do przewlekłych warunków stresowych, w tym przypadku mocznicy, skutkujące poprawą ich funkcji. Może to tłumaczyć łagodniejsze objawy neurologiczne encefalopatii u pacjentów z PNN niż u pacjentów z ostrą niewydolnością nerek (Maddock and Westenfelder 1996).

Jakkolwiek zaobserwowany w trakcie badań brak różnic w ekspresji receptora CD14 na powierzchni komórek izolowanych przed i po zabiegu hemodializy, mogącej odzwierciedlać stopień aktywacji komórek i ich wyczerpania, jest niejasny.

Wyjaśnienia wymaga również kwestia, dlaczego u pacjentów dializowanych otrzewnowo poziom białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej był niemal identyczny jak w grupie kontrolnej i wyższy niż w grupie pacjentów hemodializowanych i leczonych zachowawczo. Niewątpliwie wytłumaczeniem może być mniejszy wpływ toksemii mocznicowej, jako, że poziom BUN był statystycznie istotnie niższy, niż w grupach pacjentów leczonych zachowawczo i hemodializowanych (przed zabiegiem). Być może jest to spowodowane tym, iż dializa otrzewnowa jest metodą bardziej biozgodną, aniżeli hemodializa, a stymulacja komórek krwi obwodowej niższa. Istotną rolę w wyjaśnieniu

obserwowanych różnic, może odgrywać efektywniejsze usuwanie cząsteczek o średniej wielkości w czasie DO, które mogłyby być potencjalnymi toksynami dla monocytów.

Być może wpływ na wyższą ekspresję białka Hsp72 miał fakt, iż w grupie pacjentów leczonych CADO u prawie połowy pacjentów nefropatia cukrzycowa stanowiła przyczynę PNN, a cukrzyca występowała dwa razy częściej niż w grupie pacjentów hemodializowanych i trzy razy częściej niż w grupie pacjentów leczonych zachowawczo. Okazuje się bowiem, iż komórki jednojądrzaste krwi obwodowej chorych na cukrzycę wykazują wyższy poziom białka Hsp72, niż osoby zdrowe (Yabunaka, Ohtsuka et al. 1995). Możliwe więc jest, iż cukrzyca w pewnym stopniu wpływa odwrotnie na ekspresję białka Hsp72 niż toksemia mocznicowa. Jednakże porównując w niniejszej pracy, poziom białka Hsp72 w grupie chorych z nefropatią cukrzycową z poziomem tego białka w grupie, w której przyczyną PNN była nefropatia niecukrzycowa, nie stwierdzono znamienych różnic.

Stwierdzona ujemna korelacja pomiędzy poziomem mRNA genu *hsp72*, a wiekiem oraz dostępna literatura (Singh, Kolvraa et al. 2006), sugerują iż zdolność do produkcji białka Hsp72 obniża się wraz z wiekiem. Jakkolwiek niewielka różnica wieku między badanymi grupami i duże różnice w poziomie ekspresji białka Hsp72, nie obserwowane w przypadku zacytowanych badań, dotyczących korelacji tej ekspresji z wiekiem, zdają się wykluczać wpływ tego czynnika w przedstawionym badaniu.

Niejasna pozostaje zaobserwowana ujemna korelacja poziomu białka Hsp72, a poziomem białka CD14 na powierzchni monocytów pacjentów leczonych CADO. Przyjmując dla białka Hsp72 rolę zewnątrzkomórkowego aktywatora monocytów, co skutkowało by zwiększeniem ekspresji CD14, moglibyśmy mieć tutaj do czynienia z mechanizmem sprzężenia zwrotnego, w którym białko CD14 w nieznanym jeszcze sposób hamowałoby syntezę białka Hsp72. Ale fakt, iż zarówno poziom białek Hsp72 i CD14 był najwyższy u pacjentów dializowanych otrzewnowo, wśród wszystkich badanych grup stanowi zaprzeczenie tej hipotezy. W dostępnej literaturze brak jest danych mówiących o związku między poziomem ekspresji białka Hsp72 i receptora CD14.

8.3. Wpływ stosowanych płynów dializacyjnych na ekspresję białka Hsp72 w komórkach pacjentów leczonych CADO

Dotychczasowe badania wykazały rolę białek szoku termicznego jako markerów stresu komórkowego związanego z dializą otrzewnową. Zauważono, że ekspresja białka Hsp47 w błonie otrzewnej korelowała z długością dializoterapii, częstością występowania epizodów

zapalenia jamy otrzewnej oraz spadkiem ultrafiltracji (Shiohita, Miyazaki et al. 2000), a także z progresją włóknienia błony otrzewnej (Mishima, Miyazaki et al. 2003). Przytoczone we wstępie badania *in vitro* (Arbeiter, Bidmon et al. 2001; Aufricht, Endemann et al. 2001) potwierdziły przydatność oceny ekspresji Hsp72 (zarówno na poziomie mRNA, jak i białka) w komórkach mezotelialnych, inkubowanych w płynach dializacyjnych, w celu identyfikacji czynników odpowiedzialnych za toksyczne właściwości. Były to głównie niskie pH płynu dializacyjnego oraz produkty degradacji glukozy w nim zawarte. Jednak, jak przyznają sami autorzy tych prac, tak zaprojektowany model *in vitro* symuluje tylko krótki moment rzeczywistej terapii, tuż po wprowadzeniu płynu dializacyjnego do jamy otrzewnej pacjenta. Wynika to z tego, że w trakcie dializy otrzewnowej dochodzi do szybkiej ekwilibracji płynu dializacyjnego, czyli wyrównania nefizjologicznych stężeń jego składników z płynami ustrojowymi. Co w konsekwencji powoduje podwyższenie pH płynu do wartości fizjologicznych i zmniejszenie jego toksycznych właściwości.

Dlatego też opracowano model *in vivo*, w którym badano wpływ płynów dializacyjnych na ekspresję białek Hsp w komórkach mezotelialnych błony otrzewnej (Lopez-Cotarelo, Sellhaus et al. 2000). Wadą tej metody z kolei okazała się trudność z pozyskaniem materiału do badań, tzn. komórek mezotelium. Ze względów praktycznych i etycznych, komórki te izoluje się tylko przy okazji innych niż dializa zabiegów, np. chirurgicznego wycinania zrostów pooperacyjnych. Fakt ten uniemożliwia dokładne zaplanowanie eksperymentów i przebadania większej liczby pacjentów. Dlatego też, z wyżej wymienionych powodów został opracowany model w którym badane są *ex vivo* leukocyty poddane *in vivo* działaniu płynu dializacyjnego (de Fijter, Verbrugh et al. 1993; Mackenzie, Jones et al. 2000).

W niniejszej pracy, po raz pierwszy badano odpowiedź szoku termicznego, używając do badania komórki uzyskane przy użyciu powyższego modelu. W przedstawionym badaniu wykazano, iż standardowa terapia przy użyciu dializy otrzewnowej, powoduje indukcję ekspresji białka Hsp72 w leukocytach migrujących do jamy otrzewnowej. Przy pomocy cytometrii przepływowej stwierdzono, iż makrofagi otrzewnowe wykazują większą ekspresję białka Hsp72 niż monocyty krwi obwodowej tego samego pacjenta. Używając w tej metodzie równoczesnego znakowania komórek przeciwciałem anty - CD14, określono ekspresję białka Hsp72 w populacji makrofagów i monocytów (ryc. 7.18). Niestety, w związku z uzyskiwaniem niewystarczającej liczby komórek z dializatu otrzewnowego, analizę ekspresji Hsp72 w makrofagach otrzewnowych udało się

przeprowadzić tylko u 16 pacjentów dializowanych otrzewnowo. Używając z kolei metody Western-immunobloting potwierdzono wyniki uzyskane przy pomocy cytometru przepływowego. Jakkolwiek, wyższa ekspresja białka Hsp72 w tym wypadku została zaobserwowana w całej populacji leukocytów otrzewnowych i została porównana do populacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (ryc. 7.19). Niestety, nie udało nam się opracować metody izolacji makrofagów otrzewnowych z całej populacji komórek otrzewnowych, co skutkowało mniejszą, w porównaniu do metody cytometrii przepływowej, specyficznością uzyskanych wyników. W tych samych populacjach komórek wykazano indukcję ekspresji białka Hsp72 na poziomie genu, przy użyciu metody RT-PCR. Wszystkie te wyniki, jednoznacznie wskazują, iż ekspozycja leukocytów otrzewnowych na płyny dializacyjne w trakcie dializy otrzewnowej, skutkuje wzrostem ekspresji białka Hsp72.

Bezpośredni wpływ płynów dializacyjnych na ekspresję białka Hsp72 potwierdzono analizując wyniki eksperymentu *in vitro*, w którym odpowiedź szoku termicznego była indukowana poprzez ekspozycję komórek jednojądrzastych krwi obwodowej na płyny dializacyjne. Doświadczenie to potwierdziło również, iż Dianeal, czyli płyn dializacyjny buforowany mleczanem, zawierający więcej produktów degradacji glukozy, powoduje silniejszą odpowiedź szoku termicznego, niż bardziej biozgodny płyn Physioneal, buforowany dwuwęglanem i mleczanem i charakteryzujący się fizjologicznym pH.

W celu potwierdzenia różnic w biozgodności płynów Dianeal i Physioneal, przeprowadzono badanie kliniczne *in vivo*. Badanie to polegało na ocenie ekspresji białka Hsp72 w leukocytach otrzewnowych izolowanych od pacjentów po 12 tygodniowym leczeniu CADO z użyciem płynu Dianeal, a następnie u tych samych pacjentów po dalszym 12 tygodniowym leczeniu CADO z użyciem płynu Physioneal. Nie stwierdzono żadnych statystycznie istotnych różnic w poziomie białka Hsp72 w komórkach izolowanych z płynów dializacyjnych Dianeal i Physioneal po 4 godzinnej obecności płynów w jamie otrzewnej, jak również w monocytach krwi obwodowej. Prawdopodobnie wynikało to ze zbyt małej liczby pacjentów, którzy ukończyli badanie (pięciu). Nie można wykluczyć jednak, iż opisany wcześniej proces ekwilibracji płynów dializacyjnych powodujący wyrównanie się stężeń ich składników z płynami ustrojowymi, powoduje zacieranie się różnic w biozgodności (zwłaszcza pH) między płynami. Co z kolei przy 12 tygodniowym okresie leczenia, może okazać się niewystarczające do zaobserwowania różnic w ekspresji białka Hsp72. Badanie to powinno zostać powtórzone na odpowiednio

dużej liczbie pacjentów, przy jednoczesnym wydłużeniu okresu dializoterapii, z użyciem każdego z płynów.

Procesy transportu substancji oraz migracji komórek przez błonę otrzewnej są złożone i wzajemnie oddziałują na siebie. Dlatego też, nie można wykluczyć, iż sam proces migracji monocytów do jamy otrzewnej oraz ich różnicowania w makrofagi aktywuje odpowiedź szoku termicznego (Teshima, Rokutan et al. 1996). Nie jest jeszcze jasne, czy aktywacja ekspresji białek szoku termicznego jest skutkiem, czy też jednym z mechanizmów powodującym różnicowanie się makrofagów.

Można więc stwierdzić, iż nasze obserwacje potwierdzają wyniki badań biozgodności płynów dializacyjnych prowadzone *in vitro* w komórkach mezotelialnych w innych ośrodkach (Arbeiter, Bidmon et al. 2001). Ponadto pozwalają one na zastosowanie oceny ekspresji białek szoku termicznego do badań klinicznych uwzględniających ekwilibrację płynów. Warto podkreślić, iż przy użyciu prostego i nieinwazyjnego sposobu pozyskiwania komórek do badań (leukocyty otrzewnowe) oraz precyzyjnej i powtarzalnej metody oznaczania poziomu białka, jaką jest cytometria przepływowa, można uzyskać ważne z klinicznego punktu widzenia informacje.

Dotychczasowe eksperymenty *in vitro* prowadzone na całym świecie, określiły rolę białka Hsp72 nie tylko jako markera toksyczności płynów, ale również jako białka o funkcji ochronnej. Podobnie jak w przypadku ostrej niewydolności nerek wywołanej niedokrwieniem/reperfuzją, umiarkowany stres powodujący wzrost poziomu Hsp72, przystosowywał komórki na niekorzystne działanie PD. Mianowicie ludzkie komórki mezotelialne poddane umiarkowanemu szokowi cieplnemu lub ekspozycji na płyny dializacyjne wykazywały dużo wyższą tolerancję na toksyczność PD, niż komórki niepoddane wstępnemu szokowi. Transfekcja badanych komórek *hsp72* cDNA potwierdziła bezpośredni udział białka Hsp72 w obserwowanym mechanizmie cytoprotekcyjnym (Bidmon, Endemann et al. 2004).

Można więc stwierdzić, iż ostatnio opublikowane badania określiły rolę białka Hsp72 nie tylko jako wskaźnika biozgodności płynów dializacyjnych, ale również wskazały jego ważną funkcję w mechanizmie chroniącym komórki poddane toksycznemu działaniu tych płynów. Jakkolwiek w warunkach klinicznych transfekcja cDNA lub kontrolowane „podgrzanie” komórek jamy otrzewnej jest niemożliwe, ewentualne wykorzystanie fizjologicznych mechanizmów regulujących poziom białka Hsp72 mogłoby zwiększyć tolerancję na stosowane płyny i tym samym zredukować ich efekty uboczne. Obecnie znane są przykłady wykorzystania farmakologicznej indukcji syntezy białka Hsp72 dla

złagodzenia skutków różnych procesów patologicznych np. udaru mózgu czy choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy. Można to osiągnąć poprzez wywołanie warunków stresowych np. zwiększenie ilości zdenaturowanych białek lub poprzez nasilenie fizjologicznych mechanizmów, np. wydłużenie czasu wiązania czynnika HSF1 do DNA (Soti, Nagy et al. 2005). Wydaje się, iż tylko kwestią czasu jest przeprowadzenie prób farmakologicznej stymulacji odpowiedzi szoku termicznego u pacjentów leczonych dializą otrzewnową. Łatwe do przeprowadzenia badanie oceniające efektywność takiej stymulacji, polegające np. na ocenie ekspresji białka Hsp72 w leukocytach otrzewnowych, mogłoby mieć potencjalnie dużą wartość diagnostyczną.

8.4. Kierunki dalszych badań

Wyniki niniejszej pracy wniosły szereg nowych danych, ale jednocześnie zrodziły szereg nowych pytań i wskazały dalsze kierunki badań.

Konieczne jest powtórzenie badania poziomu mRNA przy pomocy techniki real-time PCR, która jest dużo czulsza w porównaniu do zastosowanej metody. Pozwoliłoby to, razem z wynikami pomiaru poziomu cytoplazmatycznego białka Hsp72, dać odpowiedź na pytanie, czy zmniejszony poziom białka Hsp72 w komórkach pacjentów z PNN wynika z jego wydzielania czy też zmniejszonej ekspresji, regulowanej na poziomie transkrypcji. Wykazanie związku pomiędzy poziomem cytoplazmatycznego białka Hsp72 z markerami stanu zapalnego, pozwoliłoby określić jego udział w patogenezie zespołu MIA.

Biorąc pod uwagę doniesienia o polimorfizmie genu *hsp72* i jego wpływie na poziom ekspresji (Singh, Kolvraa et al. 2006), warto byłoby w przyszłości podjąć podobne badanie w grupie chorych z PNN.

Nie ulega również wątpliwości, iż zwiększenie liczebności grup badanych chorych pozwoliłoby zwiększyć statystyczną siłę poczynionych obserwacji.

9. Wnioski

1. Ekspresja białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej chorych z przewlekłą niewydolnością nerek w okresie przeddializacyjnym jest obniżona i wykazuje zależność z nasileniem toksemii mocznicowej i stanu zapalnego. Najniższy poziom białka Hsp72 stwierdzono w monocytach krwi obwodowej pacjentów leczonych hemodializą, natomiast nie stwierdzono różnic w jego poziomie w grupie chorych leczonych dializą otrzewnową w porównaniu z ludźmi zdrowymi.
2. Pojedynczy zabieg hemodializy wzmacnia ekspresję genu *hsp72* i białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej, co może świadczyć o bioniezgodności zabiegu.
3. Przyczyną obniżonego poziomu białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej pacjentów hemodializowanych jest prawdopodobnie przystosowanie się komórek krwi do przewlekłych warunków stresowych wywołanych toksamią mocznicową i bioniezgodnością poszczególnych elementów krążenia pozaustrojowego.
4. Makrofagi izolowane z płynu dializacyjnego wykazują znamienne wyższy poziom mRNA genu *hsp72* i białka Hsp72, w porównaniu z monocytami krwi obwodowej u tych samych pacjentów leczonych ciągłą ambulatoryjną dializą otrzewnową.
5. Badania *in vitro* wykazały zmniejszoną ekspresję białka Hsp72 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej inkubowanych z płynem dializacyjnym buforowanym dwuwęglanem w porównaniu z płynem buforowanym mleczanem, co świadczy o lepszej biozgodności płynu dializacyjnego wodowęglanowego.
6. Wydaje się, iż model oceny poziomu białka Hsp72 uwzględniający zjawisko ekwilibracji płynów zastosowany w przedstawionej pracy może być przydatny do oceny biozgodności płynów dializacyjnych.
7. Konieczne są dalsze badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów zmniejszonej ekspresji białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek oraz jego ewentualnej roli w patogenezie powikłań związanych z tym zespołem chorobowym.

10. Streszczenie

Ekspresja białek szoku termicznego (Hsp) jest jednym z głównych i najlepiej poznanych mechanizmów przeciwdziałających uszkodzeniu komórki. Niektóre z białek Hsp podlegają ciągłej ekspresji, inne, m.in. Hsp72, tylko w warunkach stresowych. Białko Hsp72 odgrywa istotną rolę w prawidłowym fałdowaniu nowopowstałych białek oraz w degradacji białek uszkodzonych. Jego synteza jest regulowana przez czynnik transkrypcyjny HSF1. Ostatnie badania udowodniły wzrost poziomu Hsp72 m.in. w komórkach mezotelialnych poddanych działaniu płynów dializacyjnych *in vitro* oraz *in vivo*, co określiło rolę białka Hsp72 jako markera biozgodności tych płynów. Stosunkowo niewiele natomiast wiadomo o wpływie przewlekłej niewydolności nerek oraz poszczególnych metod leczenia nerkozastępczego na odpowiedź szoku termicznego.

Celem niniejszej pracy była ocena poziomu białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej chorych z przewlekłą niewydolnością nerek w okresie przeddializacyjnym (ocena wpływu toksemii mocznicowej) oraz leczonych ciągłą ambulatoryjną dializą otrzewnową i hemodializą (ocena wpływu różnych procedur leczenia nerkozastępczego). A także określenie przydatności oceny poziomu ekspresji białka Hsp72 do badania biozgodności płynów dializacyjnych stosowanych w dializie otrzewnowej.

Badanie przeprowadzono u 93 chorych z przewlekłą niewydolnością nerek. 30 z nich było leczonych zachowawczo, 33 przy pomocy ciągłej ambulatoryjnej dializy otrzewnowej, 30 – hemodializy. Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych, niepalących ochotników.

Materiał do badań stanowiły leukocyty otrzewnowe, wyizolowane przy pomocy wirowania z płynu dializacyjnego oraz komórki jednojądrzaste wyizolowane z krwi obwodowej.

Oznaczenia poziomu białka dokonano metodą cytometrii przepływowej i western-immunoblotting, a poziom mRNA genu *hsp72* metodą RT-PCR.

Ekspresja białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej była znacząco niższa w grupie pacjentów leczonych hemodializami i zachowawczo w porównaniu do grupy kontrolnej. Być może jest to spowodowane obniżoną ekspresją czynnika HSF1, która byłaby odpowiedzialna nie tylko za obniżenie odpowiedzi szoku termicznego, ale również za przewlekły stan zapalny. Okazuje się bowiem, iż HSF1 hamuje transkrypcję genów cytokin prozapalnych. Innym możliwym wytłumaczeniem jest sekrecja białka Hsp72 do przestrzeni międzykomórkowej. Jako, że białko Hsp72 może działać również jako cytokina

prozapalna, to zjawisko również mogłoby tłumaczyć stan zapalny często towarzyszący PNN.

Nie zaobserwowano różnicy w ekspresji białka Hsp72 między grupą pacjentów leczonych CADO i kontrolną. Zauważono, iż pojedynczy zabieg hemodializy powodował istotny wzrost poziomu białka Hsp72 monocytach krwi obwodowej. Ponadto stwierdzono odwrotną zależność między poziomem białka Hsp72, a stężeniem kreatyniny, BUN i białka c-reaktywnego w surowicy pacjentów leczonych zachowawczo.

Zaobserwowano znacząco wyższą ekspresję białka Hsp72, zarówno na poziomie translacji jak i transkrypcji, w leukocytach otrzewnowych w porównaniu z monocytami krwi obwodowej tych samych pacjentów. W badaniu *in vitro* zauważono istotnie wyższą ekspresję białka Hsp72 w komórkach inkubowanych w płynie dializacyjnym buforowanym mleczanem, niż w komórkach inkubowanych w płynie buforowanym mleczanem i dwuwęglanem. Różnicy w ekspresji białka Hsp72 nie zaobserwowano w trakcie badania *in vivo*, jakim była 12 tygodniowa terapia 5 pacjentów przy użyciu obydwu płynów.

Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Ekspresja białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej chorych z przewlekłą niewydolnością nerek w okresie przeddializacyjnym jest obniżona i wykazuje zależność z nasileniem toksemii mocznicowej i stanu zapalnego.
2. Pojedynczy zabieg hemodializy wzmacnia ekspresję genu *hsp72* i białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej, co może świadczyć o bioniezgodności zabiegu.
3. Przyczyną obniżonego poziomu białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej pacjentów hemodializowanych jest prawdopodobnie przystosowanie się komórek krwi do przewlekłych warunków stresowych wywołanych toksemią mocznicową i bioniezgodnością poszczególnych elementów krążenia pozaustrojowego.
4. Badania *in vitro* wykazały zmniejszoną ekspresję białka Hsp72 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej inkubowanych z płynem dializacyjnym buforowanym dwuwęglanem w porównaniu z płynem buforowanym mleczanem, co świadczy o lepszej biozgodności płynu dializacyjnego wodowęglanowego.
5. Wydaje się, iż model oceny poziomu białka Hsp72 uwzględniający zjawisko ekwilibracji płynów zastosowany w przedstawionej pracy może być przydatny do oceny biozgodności płynów dializacyjnych.
6. Konieczne są dalsze badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów zmniejszonej ekspresji białka Hsp72 w monocytach krwi obwodowej pacjentów z

przewlekłą niewydolnością nerek oraz jej ewentualnej roli w patogenezie powikłań związanych z tym zespołem chorobowym.

Abstract

Expression of Heat shock proteins (Hsps) is known as a major and one of the best studied mechanisms against cellular injury. Some of Hsps are constitutively expressed in cells, other, like Hsp72 only upon stress condition. Hsp72 plays important role in assisting in proper folding of newly translated proteins and in refolding or degradation of denatured proteins. Its synthesis is regulated by heat shock transcription factor (HSF1). Recent studies revealed elevated level of Hsp72 in mesothelial cells exposed *in vitro* and *in vivo* to peritoneal dialysis fluids (PDF), which suggests a role of Hsp72, as a marker of toxicity of PDF. Relatively little is known about influence of chronic renal failure (CRF) and particular methods of CRF treatment on heat shock response.

The aim of this study was to estimate of Hsp72 level in blood monocytes of patients with chronic renal failure during pre-dialysis period (estimation of uremic toxicity influence) and patients treated with hemodialysis and peritoneal dialysis (estimation of influence of renal replacement therapy). The other goal was to verify, if estimation of Hsp72 level can be used, as a reliable marker of dialysis fluids' biocompatibility used in peritoneal dialysis.

The study was conducted in 93 patients with chronic renal failure. 30 of them were in pre-dialysis period, 33 were treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis and 30 treated with hemodialysis. Control group were 30 healthy, non-smoking volunteers.

Study material consisted of peritoneal leukocytes isolated from nocturnal dialysis fluid by means of centrifugation and mononuclear cells isolated from peripheral blood.

Expression of Hsp72 protein was assessed by flow cytometry and western-immunoblotting. mRNA level was assessed by RT-PCR.

Expression of Hsp72 in blood monocytes was significantly lower in patients treated with hemodialysis and in pre-dialysis patients compared to control group. We speculate, that this could be caused by decreased expression of heat shock transcription factor HSF1. Which could also contribute to chronic inflammation, as HSF1 is responsible for suppression of pro-inflammatory cytokines genes' transcription. Other possible explanation could be secretion of Hsp72 into extracellular space. Considering the fact, that Hsp72 may act also as a proinflammatory cytokine, secretion of Hsp72 could also explain chronic inflammation which often occurs during chronic renal failure.

No such difference between patients treated with peritoneal dialysis and control group was observed. It was noticed, that single hemodialysis procedure significantly increased Hsp72 level in blood monocytes. It was also found, that Hsp72 level negatively correlated with serum creatinine, BUN and C-reactive protein concentration, a of patients on pre-dialysis period.

Expression of Hsp72, both at the transcription and translation level, was significantly higher in peritoneal leukocytes when compared to blood monocytes of the same patients. In *in vitro* study, significantly higher expression Hsp72 in cells incubated in dialysis fluid buffered with lactate than in cells incubated in dialysis fluid buffered with bicarbonate/lactate was observed. There was no difference in Hsp72 expression in peritoneal leukocytes during *in vivo* study, which was 12 weeks treatment of 5 patients using both dialysis fluids.

Based on the results of this study one may draw following conclusions:

1. Expression of Hsp72 in blood monocytes of pre-dialysis CRF patients is decreased and it shows negative correlation with intensification of uremic toxicity and inflammatory state.
2. Single hemodialysis procedure increases Hsp72 protein level and *hsp72* gene expression in blood monocytes, what can be evidence for bioincompatibility of this procedure.
3. The possible reason of decreased level of Hsp72 in blood monocytes of hemodialysis patients could be fact of cells' adaptation to chronic stress conditions, caused by uremic toxicity and bioincompatibility of particular elements of extracorporeal blood circulation.
4. The *in vitro* study showed decreased Hsp72 expression in peripheral blood mononuclear cells incubated in dialysis fluids buffered with bicarbonate, when compared to dialysis fluids buffered with lactate, what proves better biocompatibility of bicarbonate buffered fluid.
5. It seems, that model of Hsp72 expression's estimation proposed in this thesis, can be useful to verification of biocompatibility profile of dialysis fluids, with compliance of the dialysis fluids equilibration phenomenon.
6. Further studies, which would allow to explain mechanisms underlying of decreased expression of Hsp72 in CRF patients and Hsp72 possible role in pathogenesis of complications related to CRF, are necessary.

11. Piśmiennictwo

1. Arbeiter, K., B. Bidmon, et al. (2001). "Peritoneal dialysate fluid composition determines heat shock protein expression patterns in human mesothelial cells." *Kidney Int* 60(5): 1930-7.
2. Arbeiter, K., B. Bidmon, et al. (2003). "Induction of mesothelial HSP-72 upon in vivo exposure to peritoneal dialysis fluid." *Perit Dial Int* 23(5): 499-501.
3. Asea, A. (2005). "Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of hsp72." *Exerc Immunol Rev* 11: 34-45.
4. Asea, A., M. Rehli, et al. (2002). "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4." *J Biol Chem* 277(17): 15028-34.
5. Aufricht, C., M. Endemann, et al. (2001). "Peritoneal dialysis fluids induce the stress response in human mesothelial cells." *Perit Dial Int* 21(1): 85-8.
6. Basu, S., R. J. Binder, et al. (2000). "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." *Int Immunol* 12(11): 1539-46.
7. Beck, F. X., W. Neuhofer, et al. (2000). "Molecular chaperones in the kidney: distribution, putative roles, and regulation." *Am J Physiol Renal Physiol* 279(2): F203-15.
8. Becker, T., F. U. Hartl, et al. (2002). "CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes." *J Cell Biol* 158(7): 1277-85.
9. Beere, H. M. (2004). ""The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis." *J Cell Sci* 117(Pt 13): 2641-51.
10. Bidmon, B., M. Endemann, et al. (2004). "Overexpression of HSP-72 confers cytoprotection in experimental peritoneal dialysis." *Kidney Int* 66(6): 2300-7.
11. Breborowicz, A., J. Witowski, et al. (1993). "In vitro study of the mechanism of potassium transport into human mesothelial cells. I: Effect of hyperosmolality." *Perit Dial Int* 13(3): 201-7.
12. Brown, I. R. and S. J. Rush (1999). "Cellular localization of the heat shock transcription factors HSF1 and HSF2 in the rat brain during postnatal development and following hyperthermia." *Brain Res* 821(2): 333-40.
13. Bukau, B. and A. L. Horwich (1998). "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines." *Cell* 92(3): 351-66

14. Chen, H. C., J. Y. Guh, et al. (1999). "Induction of heat shock protein 70 protects mesangial cells against oxidative injury." *Kidney Int* 56(4): 1270-3.
15. Chen, M., F. Aosai, et al. (2004). "Toxoplasma gondii infection inhibits the development of lupus-like syndrome in autoimmune (New Zealand Black x New Zealand White) F1 mice." *Int Immunol* 16(7): 937-46.
16. Ciavarra, R. P., C. Goldman, et al. (1994). "Heat stress induces hsc70/nuclear topoisomerase I complex formation in vivo: evidence for hsc70-mediated, ATP-independent reactivation in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(5): 1751-5.
17. Cichocki, T., Z. Hanicki, et al. (1983). "Output of peritoneal cells into peritoneal dialysate. Cytochemical and functional studies." *Nephron* 35(3): 175-82.
18. Ciocca, D. R., G. M. Clark, et al. (1993). "Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications." *J Natl Cancer Inst* 85(7): 570-4.
19. Czekalski, S. (2004). "Przewlekła niewydolność nerek (stadia progresji przewlekłej choroby nerek)." *Nefrologia*, Andrzej Książek i Bolesław Rutkowski (red), Czelej, Lublin.
20. Daichou, Y., S. Kurashige, et al. (1999). "Characteristic cytokine products of Th1 and Th2 cells in hemodialysis patients." *Nephron* 83(3): 237-45.
21. Davies, S. J., L. Phillips, et al. (1998). "What really happens to people on long-term peritoneal dialysis?" *Kidney Int* 54(6): 2207-17.
22. de Fijter, C. W., H. A. Verbrugh, et al. (1993). "In vivo exposure to the currently available peritoneal dialysis fluids decreases the function of peritoneal macrophages in CAPD." *Clin Nephrol* 39(2): 75-80.
23. Dewji, N. N. and C. Do (1996). "Heat shock factor-1 mediates the transcriptional activation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein gene in response to stress." *Brain Res Mol Brain Res* 35(1-2): 325-8.
24. Di Paolo, N., G. Sacchi, et al. (1986). "Morphology of the peritoneal membrane during continuous ambulatory peritoneal dialysis." *Nephron* 44(3): 204-11.
25. Gabai, V. L., A. B. Meriin, et al. (1998). "Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging." *FEBS Lett* 438(1-2): 1-4.
26. Georgopoulos, C. and W. J. Welch (1993). "Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones." *Annu Rev Cell Biol* 9: 601-34.

27. Gonzalez, B., R. Hernando, et al. (2000). "Stress proteins of 70 kDa in chronically exercised skeletal muscle." *Pflugers Arch* 440(1): 42-9.
28. Haag-Weber, M., G. Cohen, et al. (2000). "Clinical significance of granulocyte-inhibiting proteins." *Nephrol Dial Transplant* 15 Suppl 1: 15-6.
29. Hartl, F. U. (1996). "Molecular chaperones in cellular protein folding." *Nature* 381(6583): 571-9.
30. Hayes, S. A. and J. F. Dice (1996). "Roles of molecular chaperones in protein degradation." *J Cell Biol* 132(3): 255-8.
31. Helmbrecht, K., E. Zeise, et al. (2000). "Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review." *Cell Prolif* 33(6): 341-65.
32. Hohfeld, J. (1998). "Regulation of the heat shock conjugate Hsc70 in the mammalian cell: the characterization of the anti-apoptotic protein BAG-1 provides novel insights." *Biol Chem* 379(3): 269-74.
33. Hsu, H. C., T. Zhou, et al. (2006). "Production of a novel class of polyreactive pathogenic autoantibodies in BXD2 mice causes glomerulonephritis and arthritis." *Arthritis Rheum* 54(1): 343-55.
34. Hunter-Lavin, C., E. L. Davies, et al. (2004). "Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells." *Biochem Biophys Res Commun* 324(2): 511-7.
35. Jo, S. K., G. J. Ko, et al. (2006). "Heat preconditioning attenuates renal injury in ischemic ARF in rats: role of heat-shock protein 70 on NF-kappaB-mediated inflammation and on tubular cell injury." *J Am Soc Nephrol* 17(11): 3082-92.
36. Jorres, A., N. Topley, et al. (1992). "Biocompatibility of peritoneal dialysis fluids." *Int J Artif Organs* 15(2): 79-83.
37. Kammanadiminti, S. J. and K. Chadee (2006). "Suppression of NF-kappaB activation by *Entamoeba histolytica* in intestinal epithelial cells is mediated by heat shock protein 27." *J Biol Chem* 281(36): 26112-20.
38. Kelley, W. L. (1998). "The J-domain family and the recruitment of chaperone power." *Trends Biochem Sci* 23(6): 222-7.
39. Komatsuda, A., H. Wakui, et al. (1999). "Overexpression of the human 72 kDa heat shock protein in renal tubular cells confers resistance against oxidative injury and cisplatin toxicity." *Nephrol Dial Transplant* 14(6): 1385-90.

40. Lancaster, G. I. and M. A. Febbraio (2005). "Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins." *J Biol Chem* 280(24): 23349-55.
41. Laszlo, A. (1992). "The effects of hyperthermia on mammalian cell structure and function." *Cell Prolif* 25(2): 59-87.
42. Liberek, K., J. Marszalek, et al. (1991). "Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(7): 2874-8.
43. Liberek, T., N. Topley, et al. (1993). "Peritoneal dialysis fluid inhibition of phagocyte function: effects of osmolality and glucose concentration." *J Am Soc Nephrol* 3(8): 1508-15.
44. Lopez-Cotarelo, C., B. Sellhaus, et al. (2000). "Expression of heat shock proteins 72/73 in human peritoneal mesothelial cells in vivo and in vitro." *Nephron* 85(2): 148-55.
45. Mackenzie, R. K., S. Jones, et al. (2000). "In vivo exposure to bicarbonate/lactate- and bicarbonate-buffered peritoneal dialysis fluids improves ex vivo peritoneal macrophage function." *Am J Kidney Dis* 35(1): 112-21.
46. Maddock, A. L. and C. Westenfelder (1996). "Urea induces the heat shock response in human neuroblastoma cells." *J Am Soc Nephrol* 7(2): 275-82.
47. Malaponte, G., V. Bevelacqua, et al. (2002). "IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 release from monocytes in haemodialysis patients in relation to dialytic age." *Nephrol Dial Transplant* 17(11): 1964-70.
48. Mathew, A. and R. I. Morimoto (1998). "Role of the heat-shock response in the life and death of proteins." *Ann N Y Acad Sci* 851: 99-111.
49. Matsumoto, Y., T. Shinzato, et al. (1998). "Peripheral deletion of gammadelta T cells in haemodialysis patients." *Nephrol Dial Transplant* 13(11): 2861-6.
50. Mayer, M. P. and B. Bukau (2005). "Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism." *Cell Mol Life Sci* 62(6): 670-84.
51. Mercier, P. A., N. A. Winegarden, et al. (1999). "Human heat shock factor 1 is predominantly a nuclear protein before and after heat stress." *J Cell Sci* 112 (Pt 16): 2765-74.
52. Mishima, Y., M. Miyazaki, et al. (2003). "Enhanced expression of heat shock protein 47 in rat model of peritoneal fibrosis." *Perit Dial Int* 23(1): 14-22.

-
53. Morgan, L. W., A. Wieslander, et al. (2003). "Glucose degradation products (GDP) retard remesothelialization independently of D-glucose concentration." *Kidney Int* 64(5): 1854-66.
54. Morimoto, R. I. (1998). "Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators." *Genes Dev* 12(24): 3788-96.
55. Musial, K., D. Zwolinska, et al. (2006). "[Antibodies against heat shock proteins (HSP) in children with chronic renal failure (CRF)--preliminary results]." *Przegl Lek* 63 Suppl 3: 60-2.
56. Nadeau, D., S. Corneau, et al. (2001). "Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*." *Cell Stress Chaperones* 6(2): 153-63.
57. Nakamura, T., J. Hinagata, et al. (2002). "HSP90, HSP70, and GAPDH directly interact with the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors." *Biochem Biophys Res Commun* 290(2): 858-64.
58. Nockher, W. A. and J. E. Scherberich (1995). "Monocyte cell-surface CD14 expression and soluble CD14 antigen in hemodialysis: evidence for chronic exposure to LPS." *Kidney Int* 48(5): 1469-76.
59. Noda, M., J. C. Wataha, et al. (2003). "Hg²⁺ and Ni²⁺ alter induction of heat shock protein-72 in THP-1 human monocytes." *J Biomed Mater Res A* 67(1): 240-5.
60. Nordlind, K. (2002). "Expression of heat shock proteins in heavy metal-provoked inflamed human skin." *Immunopharmacol Immunotoxicol* 24(3): 383-94.
61. Pockley, A. G. (2001). "Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents?" *Expert Rev Mol Med* 2001: 1-21.
62. Pockley, A. G., J. Shepherd, et al. (1998). "Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals." *Immunol Invest* 27(6): 367-77.
63. Rallu, M., M. Loones, et al. (1997). "Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6): 2392-7.
64. Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." *N Engl J Med* 340(2): 115-26.
65. Rutkowski, B. (2004). "Dializoterapia w praktyce lekarskiej." Makmed, Gdańsk.

-
66. Santoro, M. G. (2000). "Heat shock factors and the control of the stress response." *Biochem Pharmacol* 59(1): 55-63.
67. Schomig, M., A. Eisenhardt, et al. (2000). "The microinflammatory state of uremia." *Blood Purif* 18(4): 327-32.
68. Schroppel, B., M. Fischereider, et al. (1998). "Expression of glucose transporters in human peritoneal mesothelial cells." *Kidney Int* 53(5): 1278-87.
69. Shiohita, K., M. Miyazaki, et al. (2000). "Expression of heat shock proteins 47 and 70 in the peritoneum of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis." *Kidney Int* 57(2): 619-31.
70. Singh, R., S. Kolvraa, et al. (2006). "Reduced heat shock response in human mononuclear cells during aging and its association with polymorphisms in HSP70 genes." *Cell Stress Chaperones* 11(3): 208-15.
71. Soti, C., E. Nagy, et al. (2005). "Heat shock proteins as emerging therapeutic targets." *Br J Pharmacol* 146(6): 769-80.
72. Staempfli, C., K. Becker-Van Slooten, et al. (2002). "Hsp70 instability and induction by a pesticide in *Folsomia candida*." *Biomarkers* 7(1): 68-79.
73. Stelter, F. (2000). "Structure/function relationships of CD14." *Chem Immunol* 74: 25-41.
74. Stenvinkel, P. (2001). "Inflammatory and atherosclerotic interactions in the depleted uremic patient." *Blood Purif* 19(1): 53-61.
75. Stenvinkel, P. (2002). "Inflammation in end-stage renal failure: could it be treated?" *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 8: 33-8; discussion 40.
76. Stenvinkel, P., O. Heimbürger, et al. (2000). "Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome)." *Nephrol Dial Transplant* 15(7): 953-60.
77. Tanabe, M., Y. Kawazoe, et al. (1998). "Disruption of the HSF3 gene results in the severe reduction of heat shock gene expression and loss of thermotolerance." *Embo J* 17(6): 1750-8.
78. Tanikawa, J., E. Ichikawa-Iwata, et al. (2000). "p53 suppresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3." *J Biol Chem* 275(20): 15578-85.

-
79. Teshima, S., K. Rokutan, et al. (1996). "Induction of heat shock proteins and their possible roles in macrophages during activation by macrophage colony-stimulating factor." *Biochem J* 315 (Pt 2): 497-504.
80. Tintut, Y., J. Patel, et al. (2000). "Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway." *Circulation* 102(21): 2636-42.
81. Topley, N. (1995). "What is the ideal technique for testing the biocompatibility of peritoneal dialysis solutions?" *Perit Dial Int* 15(6): 205-9.
82. Ungermann, C., W. Neupert, et al. (1994). "The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria." *Science* 266(5188): 1250-3.
83. Vanholder, R., R. De Smet, et al. (1995). "Mechanisms of uremic inhibition of phagocyte reactive species production: characterization of the role of p-cresol." *Kidney Int* 47(2): 510-7.
84. Vayssier, M., F. Favatier, et al. (1998). "Tobacco smoke induces coordinate activation of HSF and inhibition of NFkappaB in human monocytes: effects on TNFalpha release." *Biochem Biophys Res Commun* 252(1): 249-56.
85. Wagner, M., I. Hermanns, et al. (1999). "Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock." *Am J Physiol* 277(5 Pt 1): L1026-33.
86. Wallin, R. P., A. Lundqvist, et al. (2002). "Heat-shock proteins as activators of the innate immune system." *Trends Immunol* 23(3): 130-5.
87. Whitley, D., S. P. Goldberg, et al. (1999). "Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones." *J Vasc Surg* 29(4): 748-51.
88. Wirth, D., F. Bureau, et al. (2004). "Evidence for a role of heat shock factor 1 in inhibition of NF-kappaB pathway during heat shock response-mediated lung protection." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287(5): L953-61.
89. Wong, C. G., M. Bonakdar, et al. (1996). "Chronic inhalation exposure to ozone and nitric acid elevates stress-inducible heat shock protein 70 in the rat lung." *Toxicology* 107(2): 111-9.
90. Wright, B. H., J. M. Corton, et al. (2000). "Elevated levels of circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in peripheral and renal vascular disease." *Heart Vessels* 15(1): 18-22.

91. Yabunaka, N., Y. Ohtsuka, et al. (1995). "Elevated levels of heat-shock protein 70 (HSP70) in the mononuclear cells of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus." *Diabetes Res Clin Pract* 30(2): 143-7.
92. Yokoo, T. and M. Kitamura (1997). "IL-1beta depresses expression of the 70-kilodalton heat shock protein and sensitizes glomerular cells to oxidant-initiated apoptosis." *J Immunol* 159(6): 2886-92.
93. Zaluska, W. and A. Ksiazek (2004). "Hemodializa." *Nefrologia, Andrzej Książek i Bolesław Rutkowski (red), Czelej, Lublin.*
94. Zhu, J., A. A. Quyyumi, et al. (2003). "Increased serum levels of heat shock protein 70 are associated with low risk of coronary artery disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(6): 1055-9.
95. Zimmermann, J., S. Herrlinger, et al. (1999). "Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients." *Kidney Int* 55(2): 648-58.
96. Zuckerman, S. H. and L. O'Neal (1994). "Endotoxin and GM-CSF-mediated down-regulation of macrophage apo E secretion is inhibited by a TNF-specific monoclonal antibody." *J Leukoc Biol* 55(6): 743-8.