

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Katarzyna Aleksandra LISOWSKA

**WPLYW LECZENIA REKOMBINOWANĄ LUDZKĄ
ERYTROPOETYNĄ (rhEPO) NA DYNAMIKĘ AKTYWACJI
I PROLIFERACJI LIMFOCYTÓW T CD4⁺ U CHORYCH
HEMODIALIZOWANYCH I PRZEWIDZIANYCH DO
PRZESZCZEPU NERKI**

Rozprawa doktorska

**Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych
Akademii Medycznej w Gdańsku**

Promotor pracy: dr hab. Alicja Dębska-Ślizień, prof. nadzw. AMG

GDAŃSK 2007

PODZIĘKOWANIE

Składam serdeczne podziękowanie profesorowi Bolesławowi Rutkowskiemu za możliwość pracy nad tym projektem.

Dziękuję panu profesorowi Jackowi M. Witkowskiemu z Katedry i Zakładu Fizjopatologii AMG za cenne uwagi i pomoc okazaną mi w czasie wykonywania niniejszej pracy.

Serdecznie dziękuję Zosi Puchalskiej i Paulinie Łopatniuk a także całemu Zespołowi za okazaną mi pomoc i stworzenie wspaniałej atmosfery.

Z całego serca dziękuję kochanym Rodzicom i kochanemu Maćkowi za wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość.

*Pracę tę dedykuję mojej
Mamie*

SPIS TREŚCI

WYJAŚNIENIE SKRÓTÓW	5
1. WSTĘP	7
1.1. Przewlekła niewydolność nerek	7
1.1.1. Etiopatogeneza przewlekłej niewydolności nerek	7
1.1.2. Zaburzenia immunologiczne w przewlekłej niewydolności nerek	9
1.1.3. Patogeneza niedokrwistości w przewlekłej niewydolności nerek	12
1.2. Erytropoetyna	14
1.2.1. Budowa i regulacja biosyntezy erytropoetyny	14
1.2.2. Charakterystyka receptora dla erytropoetyny	17
1.2.3. Ścieżki sygnalizacyjne aktywowane przez EPO/EPO-R	18
1.2.4. Rola erytropoetyny w organizmie	22
1.2.5. Rekombinowana ludzka erytropoetyna (rhEPO) w leczeniu niedokrwistości u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek	24
1.2.6. Wpływ rekombinowanej ludzkiej erytropoetyny na układ immunologiczny u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek	25
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	31
3. MATERIAŁY I METODY	32
3.1. Materiał do badań	32
3.2. Izolacja komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej	37
3.3. Zakładanie hodowli komórkowych	37
3.4. Izolacja komórek CD4 ⁺ metodą kolumnowej negatywnej selekcji magnetycznej (Miltenyi Biotec MACS, CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit)	39
3.5. Cytometria przepływowa	40
3.5.1. Ocena proliferacji i ekspresji antygenów powierzchniowych limfocytów CD4 ⁺ po hodowli ze stymulatorami	41
3.5.2. Ocena procentowa głównych subpopulacji limfocytów <i>ex vivo</i>	42
3.5.3. Ocena ekspresji receptora dla erytropoetyny na limfocytach i monocytach <i>ex vivo</i>	42
3.5.4. Pomiar cytometyryczne i analiza wyników	43
3.6. Wykrywanie mRNA genu EPO-R techniką łańcuchowej reakcji polimerazy (RT-PCR)	44
3.6.1 Izolacja RNA	44
3.6.2. Odwrotna transkrypcja	45

3.6.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)	46
3.6.4. Rozdział produktów PCR	48
3.7. Obliczenia statystyczne	48
4. KRYTYCZNA OCENA MATERIAŁU I METOD	50
5. WYNIKI	52
5.1. Cytometryczna ocena składu procentowego głównych populacji CD4 ⁺ <i>ex vivo</i> u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek	52
5.2. Cytometryczna ocena fenotypu powierzchniowego limfocytów CD4 ⁺ u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek	54
5.2.1. Obniżona ekspresja antygenu CD28 na limfocytach CD4 ⁺ u pacjentów nieleczonych epoetyną	55
5.2.2. Obniżona ekspresja antygenu CD69 na limfocytach CD4 ⁺ u pacjentów nieleczonych epoetyną	59
5.2.3. Podwyższona ekspresja antygenu CD40L na limfocytach CD4 ⁺ u pacjentów leczonych epoetyną	62
5.3. Cytometryczna ocena zmian parametrów proliferacyjnych limfocytów CD4 ⁺ u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek	65
5.4. Ekspresja receptora dla erytropoetyny (EPO-R) na limfocytach i monocytach osób zdrowych i pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek	73
5.5. Ekspresja genu EPO-R w limfocytach CD4 ⁺ oraz PBMC	78
6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW	80
7. DYSKUSJA	82
8. WNIOSKI	98
STRESZCZENIE	99
ABSTRACT	101
BIBLIOGRAFIA	103

WYJAŚNIENIE SKRÓTÓW

APC: komórki prezentujące antygen (ang. *antigen presenting cells*)

BSA: albumina surowicy wołowej (ang. *bovine serum albumin*)

CD: antygen różnicowania limfocytów T (ang. *cluster of differentiation*)

CFSE: ester sukcyνοimidylowy dwuoctanu karboksylfluoresceiny (ang. *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*)

EPO: erytropoetyna (ang. *erythropoietin*)

EPO-R: receptor dla erytropoetyny (ang. *erythropoietin receptor*)

FBS: wołowa surowica płodowa (ang. *fetal bovine serum*)

FITC: izotiocyanian fluoresceiny (ang. *fluorescein isothiocyanate*)

GFR: filtracja kłębuszkowa (ang. *glomerular filtration rate*)

HD: hemodializa

HDrhEPO-: grupa pacjentów hemodializowanych nieotrzymujących epoetyny

HDrhEPO+: grupa pacjentów hemodializowanych otrzymujących epoetyne

kb: jednostka odpowiadająca tysiącu par zasad (ang. *kilobase*)

kDa: kilodalton

IL: interleukina (ang. *interleukin*)

μg: mikrogram

μl: mikrolitr

μM: stężenie mikromolarne

MFI: średnia fluorescencja (ang. *mean fluorescence intensity*)

ml: mililitr

mln: miliony

obr./min.: obroty na minutę

PBS: buforowana fosforanami sól fizjologiczna (ang. *phosphate buffered saline*)

PBMC: jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cell*)

RPE: fikoerytryna (ang. *phycoerythrin*)

RPE-Cy5: fikoerytryna-cyjanina 5 (ang. *phycoerythrin-cyanin 5*)

PNN: przewlekła niewydolność nerek

rhEPO: epoetyna, rekombinowana ludzka erytropoetyna (ang. *recombinant human erythropoietin*)

TCR: receptor komórek T (ang. *T cell receptor*)

U/ml: jednostki na mililitr

1. WSTĘP

1.1. Przewlekła niewydolność nerek

1.1.1. Etiopatogeneza przewlekłej niewydolności nerek

Przewlekła niewydolność nerek (PNN) jest wielobjawowym zespołem chorobowym rozwijającym się w następstwie postępującego niszczenia wszystkich struktur nerek przez przewlekły proces chorobowy, charakteryzującym się stopniowym narastaniem upośledzenia funkcji układu moczowego (Manitius, 1997). Postępujące niszczenie czynnych nefronów wpływa na zaburzenie czynności nerek regulujących skład i objętość płynów ustrojowych, co w końcowym rezultacie prowadzi do zakłóceń w wydzielaniu produktów przemian azotowych i czynności metabolicznej oraz wewnątrzwydzielniczej nerek, co jest bezpośrednią przyczyną wystąpienia tzw. toksemii mocznicowej (Manitius, 1997).

U podstaw niewydolności nerek leży większość pierwotnych i wtórnych nefropatii. Spośród pierwotnych przyczyn należałoby wymienić między innymi kłębuszkowe zapalenia nerek oraz cewkowo-śródmiąższowe nefropatie, podczas gdy nefropatia cukrzycowa jest najczęstszą z wtórnych przyczyn rozwoju PNN (Tabela 1) (Rutkowski, 2006). Bez względu na przyczynę, choroba zawsze rozwija się stopniowo i dopiero przy nasileniu zaburzeń metabolicznych dochodzi do manifestacji objawów klinicznych (Manitius, 1992).

Upośledzenie czynności nerek przyczynia się do zaburzeń metabolicznych wynikających z pogarszania się filtracji i upośledzenia resorpcji zwrotnej (Vanholder, 2003). To z kolei prowadzi do gromadzenia wielu substancji nazywanych toksynami mocznicowymi, które nie mogą zostać usunięte z organizmu ze względu na stopień uszkodzenia nefronów (Vanholder, 2003). Wiele z nich stanowi produkty metabolizmu białek endo- i egzogennych, podczas gdy inne są rezultatem zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej, wapniowo-fosforanowej, hormonalnej i innych (Czekalski, 2004; Rutkowski, 2004).

Tabela 1. Przyczyny niewydolności nerek u dializowanych pacjentów w Polsce (dane z 31.12.2005) (Rutkowski, 2006).

Przyczyny	Procent
Nefropatia cukrzycowa	27.16
Przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek	18.57
Nefropatia nadciśnieniowa	14.38
Przyczyny nieznane i niedokładnie określone	9.61
Wielotorbielowatość nerek	5.10
Śródmiąższowe zapalenie nerek bakteryjne - inne	4.88
Śródmiąższowe zapalenie nerek niebakteryjne	3.60
Śródmiąższowe zapalenie nerek bakteryjne – kamica dróg moczowych	3.38
Choroba nowotworowa układu moczowego	2.92
Szpiczak mnogi	2.09
Inne choroby	9.31

Kryterium rozpoznania PNN jest trwałe (trwające ponad 3 miesiące) zmniejszenie **filtracji kłębuszkowej** (GFR – *glomerular filtration rate*) do i poniżej 80 ml/min/1.73 m² powierzchni ciała. GFR obliczany jest ze wzoru Cocrofta-Gaulta lub MDRD (Rutkowski, 2004).

Obecnie wprowadzono pojęcie przewlekłej choroby nerek (PChN). Definicja PChN opiera się na dwóch następujących kryteriach:

1. Uszkodzenie nerek utrzymujące się 3 lub więcej miesięcy, definiowane na podstawie obecności strukturalnych lub czynnościowych nieprawidłowości nerek, z prawidłowym lub zmniejszonym GFR, co objawia się nieprawidłowościami morfologicznymi lub wskaźnikami uszkodzenia nerek, w tym nieprawidłowościami w składzie krwi lub moczu lub nieprawidłowymi wynikami badań dodatkowych;
2. GFR mniejsze od 60 ml/min/1.73 m² przez więcej niż 3 miesiące z uszkodzeniem lub bez uszkodzenia nerek (Czekalski, 2007).

Wyróżnia się następujące fazy PChN:

- **I faza przewlekłej choroby nerek** charakteryzujący się GFR ≥ 90 ml/min/1.73 m² powierzchni ciała oraz białkomoczem;

- **II faza przewlekłej choroby nerek** (tzw. **niewielka niewydolność nerek, utajona niewydolność nerek**), w czasie którego wartość GFR znajduje się między 89 a 60 ml/min/1.73 m² powierzchni ciała;
- **III faza przewlekłej choroby nerek** (**umiarkowana niewydolność nerek, wyrównana niewydolność nerek**) charakteryzujący się wartościami GFR w zakresie 59-30 ml/min/1.73 m² powierzchni ciała;
- **IV faza przewlekłej choroby nerek** (**ciężka niewydolność nerek, niewyrównana niewydolność nerek**) to wartości pomiędzy 29 a 15 ml/min/1.73 m² powierzchni ciała;
- **V faza przewlekłej niewydolności nerek** (**schyłkowa niewydolność nerek**), w której GFR osiąga wartości poniżej 15 ml/min/1.73 m² powierzchni ciała (Czekalski, 2004).

W PChN dochodzi do rozwoju zaburzeń dotyczących niemal wszystkich narządów i układów, między innymi do upośledzenia odpowiedzi immunologicznej. Zagadnienia te są szerzej omawiane w niniejszej pracy.

1.1.2. Zaburzenia immunologiczne w przewlekłej niewydolności nerek

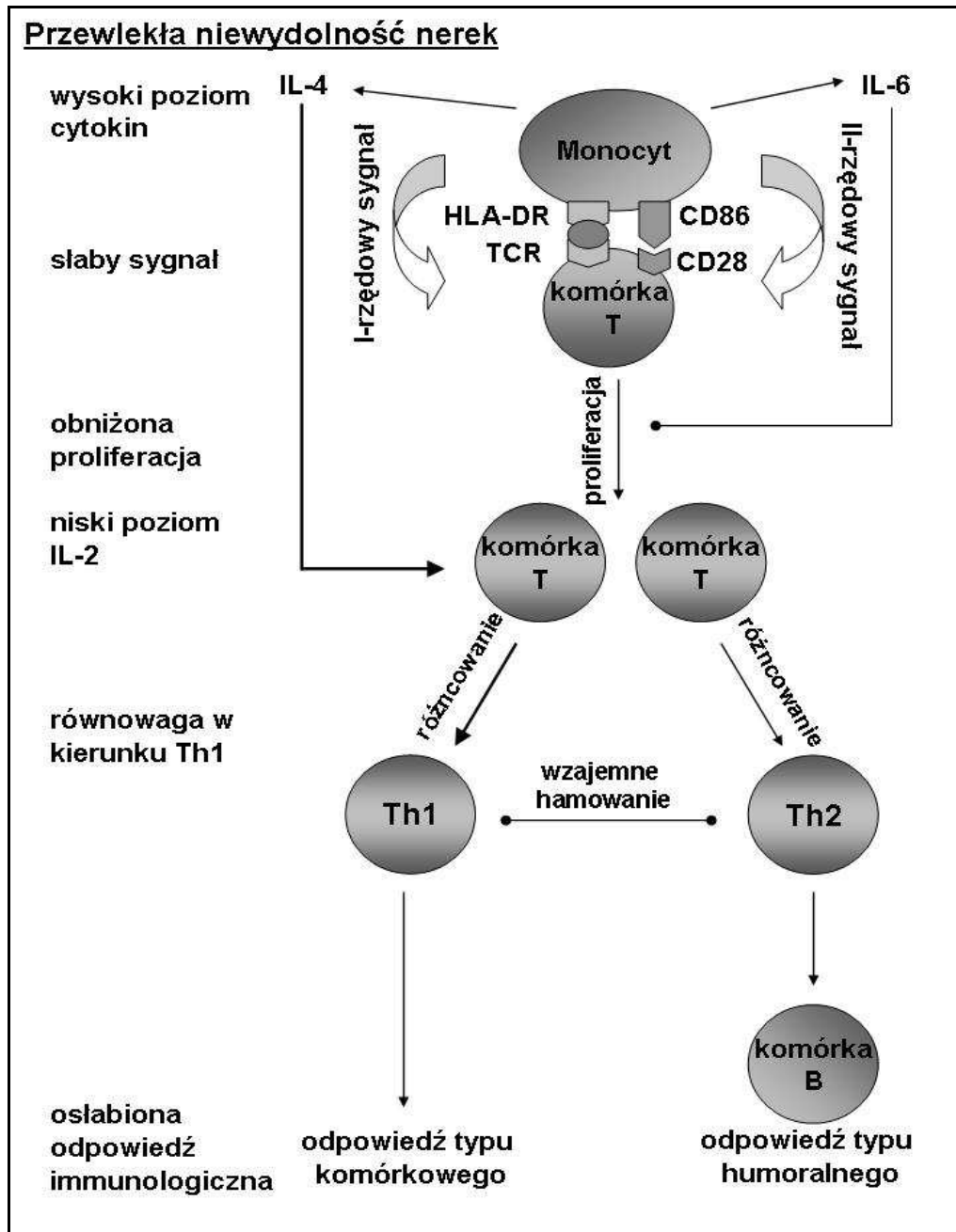
W przebiegu PNN obserwuje się wiele zaburzeń w zakresie gospodarki wodno-elektrolitowej, kwasowo-zasadowej, wapniowo-fosforanowej czy hormonalnej (Czekalski, 2004). Obserwuje się też zakłócenie pracy wielu układów, co w szczególności dotyczy układu sercowo-naczyniowego (Czekalski, 2004). Ponadto poważnym problemem w tym schorzeniu są liczne defekty w zakresie odporności nieswoistej jak i swoistej wpływające na zwiększenie podatności na zakażenia. Prawdopodobnie zaburzenia te wynikają z wpływu toksyn mocznicowych na komórki układu immunologicznego.

U pacjentów z PNN dochodzi do zaburzeń w odpowiedzi immunologicznej nieswoistej, komórkowej i humoralnej. Zaburzenia w odpowiedzi nieswoistej związane są z nadmierną produkcją cytokin prozapalnych: czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α – *tumor necrosis factor α*), interleukiny 1 (IL-1 – *interleukin 1*) oraz interleukiny 6 (IL-6 – *interleukin 6*) (Cavaillon, 1991; Herbelin, 1990), co wynika z nadmiernej aktywności monocytów (Herbelin, 1991). Komórki te wyizolowane z krwi pacjentów

hemodializowanych, hodowane bez stymulatorów po 20 godzinach wydzielały IL-1 oraz TNF- α w ilościach większych niż te obserwowane u osób zdrowych (Herbelin, 1991). Nieprawidłowości te są rezultatem przewlekłego stanu zapalnego będącego następstwem postępującej mocznicy a dodatkowo są pogłębione przez proces hemodializy (Girndt, 1999). Ponadto monocyty charakteryzują się obniżonym poziomem antygenu CD14 w stosunku do osób zdrowych (Nockher, 1995). Antygen CD14 jest głównym receptorem dla lipopolisacharydu (LPS – *lipopolysaccharide*), peptydoglikanu, fosfolipidów z Gram-dodatnich bakterii. LPS jest niezbędny dla prawidłowej aktywacji monocytów, które w odpowiedzi na stymulację peptydoglikanem wydzielają cytokiny, enzymy i wolne rodniki (Haziot, 1996, 1993). Jego ilość na powierzchni monocytów jest pozytywnie skorelowana z ilością związanej endotoksyny. Uważa się, że w przypadku pacjentów hemodializowanych obserwowany spadek poziomu antygenu CD14 jest wynikiem przewlekłej stymulacji monocytów przez endotoksyny i niskocząsteczkowe fragmenty LPS przechodzące przez barierę krew/błona dializacyjna (Lonnemann, 1998). Przewlekła stymulacja z kolei prowadzi do wydzielania cytokin prozapalnych przez te komórki (Girndt, 1998).

W odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego istotna jest **aktywacja limfocytów T CD4⁺** (tzw. limfocytów pomocniczych), która prowadzi do ich różnicowania się na kilka linii różniących się pod względem pełnionych funkcji. Limfocyty CD4⁺ mogą różnicować się do komórek Th1 (*T helper 1 cells* – komórki „pomocnicze” typu 1) i Th2 (*T helper 2 cells* – komórki „pomocnicze” typu 2). Komórki Th1 poprzez produkcję interferonu (IFN- γ) przyczyniają się do promowania odpowiedzi typu komórkowego, podczas gdy Th2 stymulują komórki B do produkcji przeciwciał (Swain, 1999). U pacjentów z PNN obserwuje się zmiany w składzie i funkcjonowaniu subpopulacji Th1 i Th2 przyczyniające się tym samym do zaburzeń w wydzielaniu cytokin (Sester, 2000). Obydwie linie charakteryzują się obniżoną reakcją przejawiającą się m. in. obniżoną produkcją IL-2 oraz IFN- γ w odpowiedzi na stymulację mitogenową (Gerez, 1991). Paradoksalnie właśnie komórki Th1 są u chorych z PNN subpopulacją dominującą a jednocześnie produkują mniejszą ilość cytokin, które pobudzałyby odpowiedź typu komórkowego (Sester, 2000) (Ryc. 1). Obniżona aktywność i proliferacja limfocytów T jest między

innym rezultatem działania IL-6 produkowanej w dużej ilości przez zaktywowane monocyty (Cavaillon, 1991).



Rycina 1. Zmiany w odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek.

Zaburzenia w PNN dotyczą również odpowiedzi humoralnej, która zależy od krążących we krwi immunoglobulin wydzielanych przez limfocyty B. Limfocyty B u pacjentów z PNN charakteryzują się zmniejszoną zdolnością do produkcji przeciwciał, czego klinicznym wyrazem jest osłabiona zdolność do wytwarzania przeciwciał w odpowiedzi na szczepienia przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B oraz zwiększona skłonność do zakażeń (Docci, 1990). Kolejną cechą komórek B w niewydolności nerek jest obniżona ekspresja antygenów kostymulujących, przede wszystkim antygeny CD86, który z kolei wiąże się z antygenem CD28 na limfocytach T (Girndt, 2001). CD86 bezpośrednio pobudza produkcję IL-2, która u pacjentów z PNN ulega znamiennej obniżeniu (Girndt, 2001; Gerez, 1991). Obniżoną ekspresję tego antygeny obserwuje się również na komórkach prezentujących antygen (APCs – *antigen presenting cells*) (Girndt, 2001).

1.1.3. Patogeneza niedokrwistości w przewlekłej niewydolności nerek

Niedokrwistość zazwyczaj pojawia się na etapie niewyrównanej niewydolności nerek, gdy filtracja kłębuszkowa osiąga wartości poniżej 20-30 ml/min i jest niezależna od rodzaju choroby nerek (z wyjątkiem wielotorbielowatego zwyrodnienia nerek) (Więcek, 2001). Rozwija się ona praktycznie u wszystkich pacjentów, ale w zależności od etiologii choroby podstawowej może się rozwinąć dużo wcześniej, np. w nefropatii cukrzycowej nawet przy GFR powyżej 70 ml/min/1.73 m² powierzchni ciała (Bosman, 2001).

Obecnie wyróżnia się trzy główne grupy czynników uczestniczących w patogenezie niedokrwistości w chorobach nerek:

- a) niedostateczna erytropoeza,
- b) skrócenie czasu przeżycia erytrocytów,
- c) zwiększona utrata krwi (Więcek, 2001; Manitius, 1992).

Zasadniczą rolę w patogenezie niedokrwistości odgrywa niedostateczna erytropoeza wynikająca przede wszystkim z niedostatecznej produkcji erytropoetyny (EPO – *erythropoietin*) (Więcek, 2001; Eckardt, 1994; Manitius, 1992). EPO jest produkowana przez komórki śródmiąższowe nerki i komórki Ito w wątrobie (Eckardt, 1996) a jej niedobór spowodowany jest zniszczeniem miąższu nerek przez postępującą chorobę (Więcek, 2001; Manitius, 1992). U chorych obserwuje się wprawdzie wzrost

produkcji EPO w wątrobie, jednak jest to wzrost nieadekwatny do stopnia niedokrwistości występującej w przebiegu PNN (Więcek, 2001). Niedostateczna produkcja erytropoetyny jest bezpośrednią przyczyną zmniejszonego pobudzenia szpiku kostnego do produkcji erytrocytów (Eckardt, 1994).

Oprócz niedostatecznej erytropoezy w PNN mamy również do czynienia z obecnością tzw. inhibitorów erytropoezy (Więcek, 2001; Means i Dessypris, 1992). Zaliczane są do nich między innymi inhibitory mocznicowe (Więcek, 2001) oraz niektóre z cytokin zaangażowanych z procesy zapalne i zakażenia (Means i Krantz, 1992). Rola inhibitorów mocznicowych nie została jeszcze dokładnie poznana, jednak badania *in vitro* wykazują, że surowica od pacjentów z PNN powoduje zahamowanie wzrostu prekursorów krwinek czerwonych BFU-E (*burst-forming units – erythroid*) i CFU-E (*colony-forming units – erythroid*) (Freedman i Cattran, 1983). Postuluje się, że działanie takie mogą wykazywać poliaminy (takie jak spermina, spermidyna czy putrescyna) (Saito, 1983; Campbell, 1978), parathormon (Meytes, 1981) czy rybonukleaza (Freedman i Saunders, 1983). Z kolei TNF- α , który u pacjentów z PNN jest produkowany w nadmiernej ilości (Herbelin, 1990), hamuje formowanie się kolonii komórek BFU-E i CFU-E (Roodman, 1987). Również IL-1 oraz IFN- γ wykazują hamujący wpływ na rozwój erytrocytów (Means i Dessypris, 1992; Maury, 1988). Cytokiny prozapalne oddziałują również na metabolizm żelaza przyczyniając się do rozwoju tzw. czynnościowego niedoboru żelaza charakteryzującego się upośledzeniem wykorzystania zgromadzonego żelaza i wiązania się pierwiastka z transferyną (Więcek, 2001; Moldawer, 1989).

Porównując czas przeżycia krwinek czerwonych osób zdrowych i osób chorych na PNN można zauważyć, że u chorych czas ten jest skrócony o 1/3 (Więcek, 2001). Skrócenie czasu przeżycia erytrocytów wynika z oddziaływania na nie toksyn mocznicowych w osoczu (Więcek, 2001; Manitius, 1992). Ponadto dochodzi również do zaburzeń metabolicznych, które zwiększają wrażliwość krwinek na stres oksydacyjny bądź osmotyczny jednocześnie zmniejszając ich zdolność do przejściowych zmian kształtu. Ta ostatnia cecha sprawia, że erytrocyty łatwiej ulegają uszkodzeniu mechanicznemu podczas przepływu krwi przez układ dializacyjny (Więcek, 2001; Eckardt, 2000).

Kolejnym poważnym problemem sprzyjającym rozwojowi niedokrwistości u pacjentów z PNN jest zwiększona utrata krwi, która związana jest z wykonywaniem zabiegów

hemodializy oraz częstym pobieraniem krwi do badań laboratoryjnych (Więcek, 2001). Inną przyczyną utraty krwi u chorych to przewlekłe krwawienia, przede wszystkim z błon śluzowych układu pokarmowego, u kobiet z narządów rodnych (Więcek, 2001). U podstaw tych krwawień leży wiele czynników związanych z samą chorobą bądź też wynikających z występowania różnych patologii naczyniowych, takich jak upośledzenie czynności płytek krwi (Więcek, 2001).

Pacjenci hemodializowani cechują się większym stopniem niedokrwistości w porównaniu do chorych z PNN leczonych zachowawczo lub dializowanych otrzewnowo. Wynika to z mechanicznego uszkodzenia erytrocytów podczas przepływu komórek przez układ dializacyjny, niemożności odzyskania wszystkich krwinek po zabiegu oraz z częstego pobierania krwi do badań (Więcek, 2001).

1.2. Erytropoetyna

1.2.1. Budowa i regulacja biosyntezy erytropoetyny

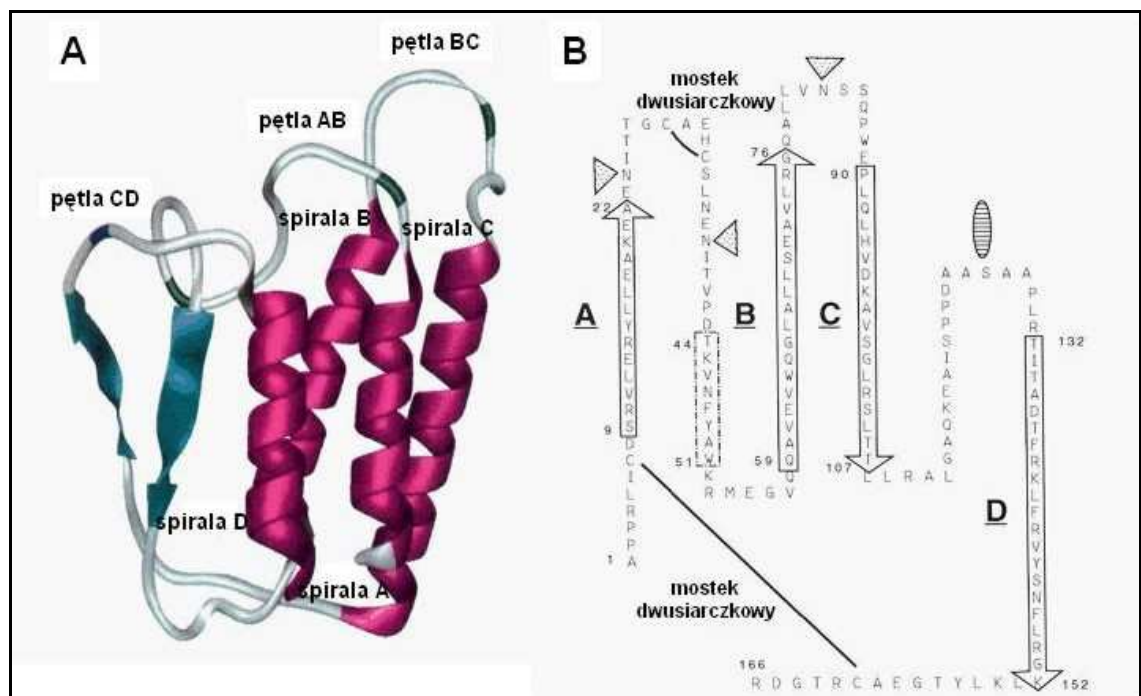
Endogenna erytropoetyna jest glikoproteiną o masie 34 kDa zbudowaną ze 166 aminokwasów (Miyake, 1977). Hormon ten w 40 % zbudowany jest z węglowodanów, co jest niezbędne dla pełnej aktywności biologicznej oraz stabilności hormonu (Dordal, 1985). Kwas sialowy, który stanowi około 11% węglowodanów (Dordal, 1985), jest konieczny dla prawidłowego funkcjonowania EPO (Sytkowski, 1980). W części białkowej znajdują się trzy miejsca, które ulegają *N*-glikozyłacji i jedno podlegające *O*-glikozyłacji (Boissel, 1993) (Ryc. 2). Ich rola nie została do końca poznana, ale uważa się, że są niezbędne dla prawidłowej syntezy i sekrecji EPO (Yamaguchi, 1991; Dube, 1988). Cztery reszty cysteiny występujące w cząsteczce EPO tworzą dwa wiązania dwusiarczkowe, które stabilizują II-rzędową strukturę białka (Moritz, 1997. Boissel, 1993).

EPO jest produkowana **80-90 % przez komórki śródmiąższowe nerki** i w 10-20% komórki Ito w wątrobie (Eckardt, 1996). Niewielkie ilości mRNA hormonu wykazano również w mózgu (Marti, 1996), płucach i śledzionie (Fandrey, 1993).

Gen ludzkiej erytropoetyny jest zlokalizowany na chromosomie 7 (Watkins, 1986) i składa się z 4 intronów i 5 eksonów, które kodują 193-aminokwasowy peptyd (Lai,

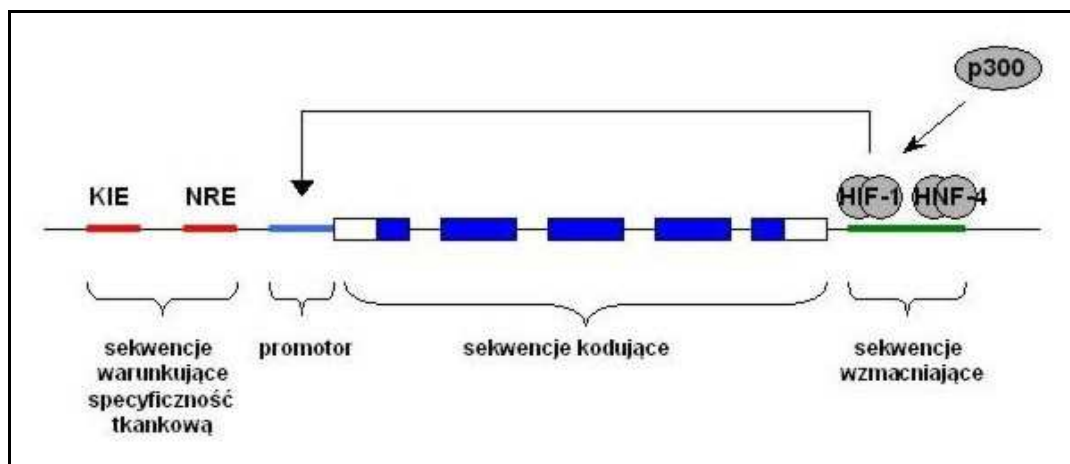
1986). 27-aminokwasowa sekwencja liderowa znajdująca się na N-końcu umożliwia transport nowo syntetyzowanego białka przez błony subkomórkowe i jest odcinana w czasie modyfikacji potranslacyjnych (Lai, 1986).

Czynnikiem regulującym produkcję EPO w nerce jest stężenie tlenu (Schuster, 1989). W nerce nie ma wewnątrzkomórkowych zapasów EPO, więc regulacja ta odbywa się na poziomie DNA. W genie kodującym EPO znajdują się sekwencje DNA, które warunkują jego tkankową specyficzność i ekspresję zależną od hipoksji (Ryc. 3). Promotor jest poprzedzony sekwencją odpowiedzialną za ekspresję genu w nerce, tzw. KIE (*kidney inducible element*), która jest położona w rejonie 9500-14000 par zasad od końca 5' (Lacombe, 1998; Semenza, 1991). W rejonie 400-6000 par zasad, bliżej miejsca transkrypcji obecna z kolei jest sekwencja, która odpowiada za brak ekspresji genu EPO w innych tkankach i narządach (NRE – *negative regulatory element*) (Lacombe, 1998).



Rycina 2. Budowa erytropoetyny. Schemat A przedstawia przewidywaną strukturę II-rzędową hormonu. Schemat B stanowi strukturę I-rzędową, czarne linie reprezentują mostki dwusiarczkowe, trójkąty wskazują miejsca N-glikozylacji, owal – miejsce O-glikozylacji (J. B. Boissel *J. Biochem.* 268 (1993): 15986; zmieniony).

W skład sekwencji wzmacniających znajdujących się na końcu 3' genu wchodzi ściśle konserwowana sekwencja (5'-TACGTGCT-3'), do której wiąże się czynnik transkrypcyjny HIF-1 (*hypoxia inducible factor 1*) (Wang, 1993). Do sekwencji 5'-YGACCY-3'' (gdzie Y = C lub T) wiąże się czynnik HNF-4 (*hepatocyte nuclear factor 4*) (Galson, 1995). Oba czynniki wiążąc się z DNA stymulują ekspresję genu kodującego EPO (Galson, 1995; Wang, 1993). Dodatkowo, do sekwencji regulatorowych, poprzez czynnik HIF-1, przyłącza się białko p300 (Arany, 1996). Hipoksja prowadzi do powstania kompleksu białek, które wiążąc się z wymienionymi sekwencjami stymulują ekspresję EPO. Wykazano, że nadekspresja białka p300 zwiększa syntezę EPO w warunkach hipoksji (Arany, 1996).



Rycina 3. Schemat budowy i regulacji ekspresji genu kodującego EPO (opis w tekście).

Odkrycie białka HIF-1 jako czynnika transkrypcyjnego pozwoliło na zrozumienie funkcjonowania sekwencji wzmacniających. Wykazano, że HIF-1 jest heterodimerem składającym się z dwóch podjednostek: HIF-1 α i HIF-1 β (Wang, 1995). W warunkach hipoksji poziom mRNA obu podjednostek nie ulega zmianie a aktywność białek jest regulowana potranskrypcyjnie (Kallio, 1997). W warunkach prawidłowego stężenia tlenu podjednostka HIF-1 α jest modyfikowana oksydacyjnie przez α -hydroksylazę prolilową, co pozwala na przyłączenie kompleksu ligazy ubikwityny (Salceda, 1997). Dochodzi do degradacji HIF-1 α a tym samym do zahamowania biosyntezy EPO, gdyż niemożliwe jest utworzenie kompleksu transkrypcyjnego (Salceda, 1997). W warunkach hipoksji

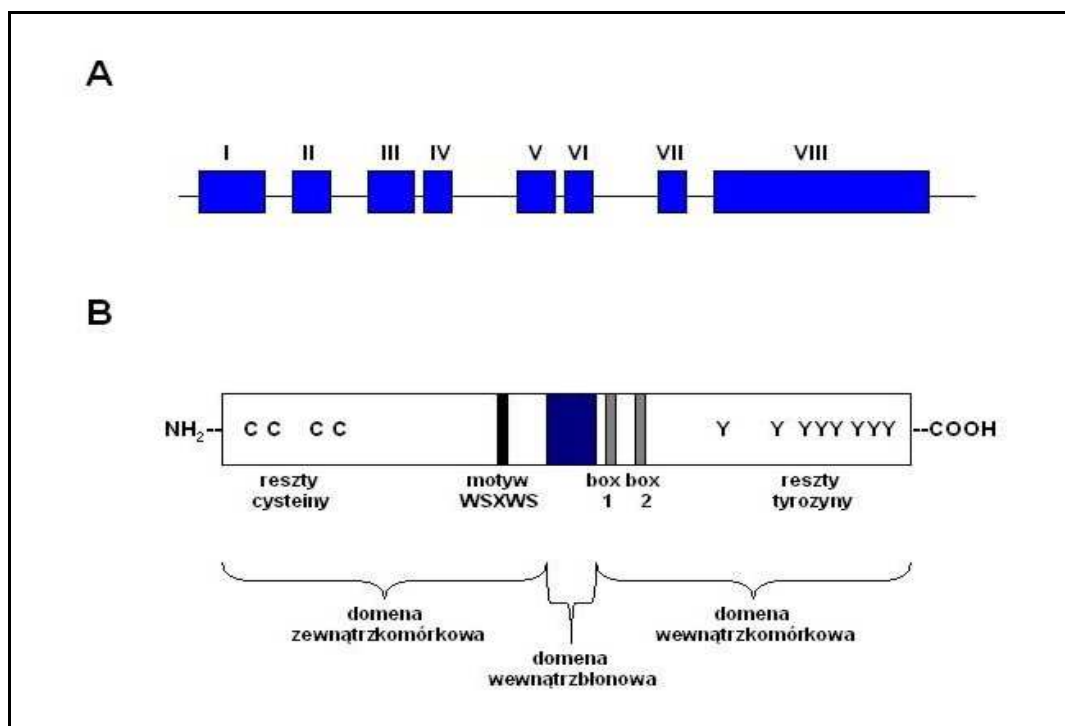
α -hydroksylaza prolilowa jest nieaktywna, co pozwala na utworzenie kompleksu HIF-1 α /HIF-1 β , który przyłącza się do sekwencji wzmacniającej genu EPO i inicjuje jego transkrypcję (Salceda, 1997).

1.2.2. Charakterystyka receptora dla erytropoetyny

Receptor dla erytropoetyny (ang. *erythropoietin receptor* – EPO-R) należy do rodziny receptorów cytokin typu I, tzw. **receptorów dla hematopoetyn**, do których zaliczane są między innymi receptory dla IL-13, IL-3, IL-5, IL-2 czy GM-CSF (Tilbrook, 1999; Ihle, 1995). Gen kodujący EPO-R zlokalizowany jest na chromosomie 19 i w wyniku jego transkrypcji powstaje białko zbudowane z 507 aminokwasów (Youssoufian, 1993; Jones, 1990). Receptor ten zbudowany jest z trzech podstawowych domen: N-końcowej domeny zewnątrzkomórkowej, pojedynczej hydrofobowej domeny wewnątrz błonowej i C-końcowej domeny zewnątrzkomórkowej (Tilbrook, 1999) (Ryc. 4). Domena zewnątrzkomórkowa charakteryzuje się obecnością motywu tryptofan-seryna-dowolny aminokwas-tryptofan-seryna (WSXWS) i czterech reszt cystein (Tilbrook, 1999; Youssoufian, 1993). Silnie konserwowany ewolucyjnie w rodzinie receptorów cytokin motyw WSXWS jest uważany za miejsce wiązania liganda (Bazan, 1989). Domenę wewnątrzkomórkową cechuje obecność dwóch fragmentów box-1 i box-2, które są charakterystyczne również dla innych receptorów z tej rodziny (Tilbrook, 1999; Ihle, 1995). Fragment box-1 odpowiada za interakcję z kinazą tyrozynową JAK2 (*Janus like kinase*) (Witthuhn, 1993). Ponadto, w obrębie tej domeny znajdują się również reszty tyrozynowe w postaci motywu ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif*), do którego wiążą się białka sygnalizacyjne zawierające motyw SH2 (*src homology 2 domains*) (Klingmüller, 1997; Witthuhn, 1993).

Receptor dla EPO pojawia się we wczesnych progenitorach erytropoezy, komórkach BFU-E (Sawada, 1990). Następnie jego gęstość wzrasta w komórkach CFU-E do około 1000 cząsteczek EPO-R na komórkę (D'Andrea, 1990; Sawada, 1988) i spada wraz z dalszym dojrzewaniem erytroblastów (Tilbrook, 1999). Jednakże również w wielopotencjalnych komórkach macierzystych hematopoezy oraz embrionalnych komórkach macierzystych wykryto mRNA genu dla EPO-R (Heberlein, 1992). Inna

lokalizacja receptora to m. in. komórki śródbłonna naczyń krwionośnych (Anagnostou, 1994), komórki Leydiga (Mioni, 1992), megakariocyty (Fraser, 1989) czy granulocyty (Sela, 2001). EPO-R występuje również w komórkach białaczkowych (Takeshita, 2000) oraz innych typach nowotworów, takich jak nowotwory piersi (Arcasoy, 2002) bądź nerki (Westenfelder, 2000). EPO-R został ponadto zidentyfikowany w komórkach nerwowych w mózgu i liniach komórkowych wykazujących cechy charakterystyczne dla neuronów (Masuda, 1993).



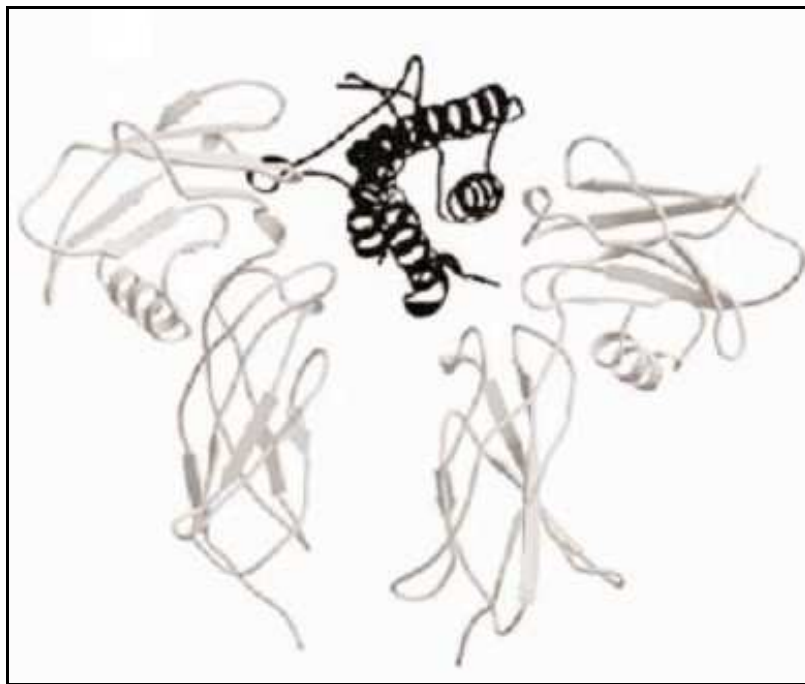
Rycina 4. Schemat budowy genu kodującego receptor dla EPO-R (A) i oraz receptora (B) (opis w tekście).

1.2.3. Ścieżki sygnalizacyjne aktywowane przez EPO/EPO-R

Pierwszy etap działania EPO polega na przyłączeniu się do receptora, co przyczynia się do jego homodimeryzacji (Watowich, 1994) (Ryc. 5). EPO-R, jak inne receptory z rodziny receptorów dla hematopoetyń, nie posiada wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej a przyłączenie EPO aktywuje dwie kinazy tyrozynowe JAK2, które są związane z receptorem (Witthuhn, 1993). Uważa się, że homodimeryzacja EPO-R umożliwia

kontakt kinaz ze sobą i wzajemną fosforylację, co jest kluczowym etapem w mechanizmie działania EPO (Remy 1999). Aktywne kinazy fosforylują następnie reszty tyrozynowe wewnątrzkomórkowej domeny receptora, które w tym momencie stają się miejscem wiążącym białka posiadające w swej budowie domeny SH2, które też ulegają fosforylacji (Klingmüller, 1997). To zapoczątkowuje kaskadę ścieżek sygnalizacyjnych, które prowadzą do hamowania apoptozy prekursorów krwinek czerwonych.

Wyróżnia się cztery główne ścieżki sygnalizacyjne aktywowane w wyniku przyłączenia EPO do receptora i fosforylacji kinaz JAK2 (Ryc. 6). Pierwsza z nich jest jednym ze specyficznych systemów transdukcji sygnału w komórkach szeregu erytroidalnego. Jest to system z udziałem czynnika STAT5 z rodziny czynników transkrypcyjnych STAT (*signal transducer and activator of transcription*) (Wakao, 1995). Po związaniu się EPO z receptorem białka te ulegają fosforylacji przez JAK2 i łączą się w homodimery (Klingmüller, 1996). W tej formie przemieszczane są do jądra komórkowego, gdzie regulują ekspresję różnych genów, między innymi genu kodującego antyapoptotyczne białko Bcl-X_L (Ryc. 6, schemat A) (Silva, 1999).

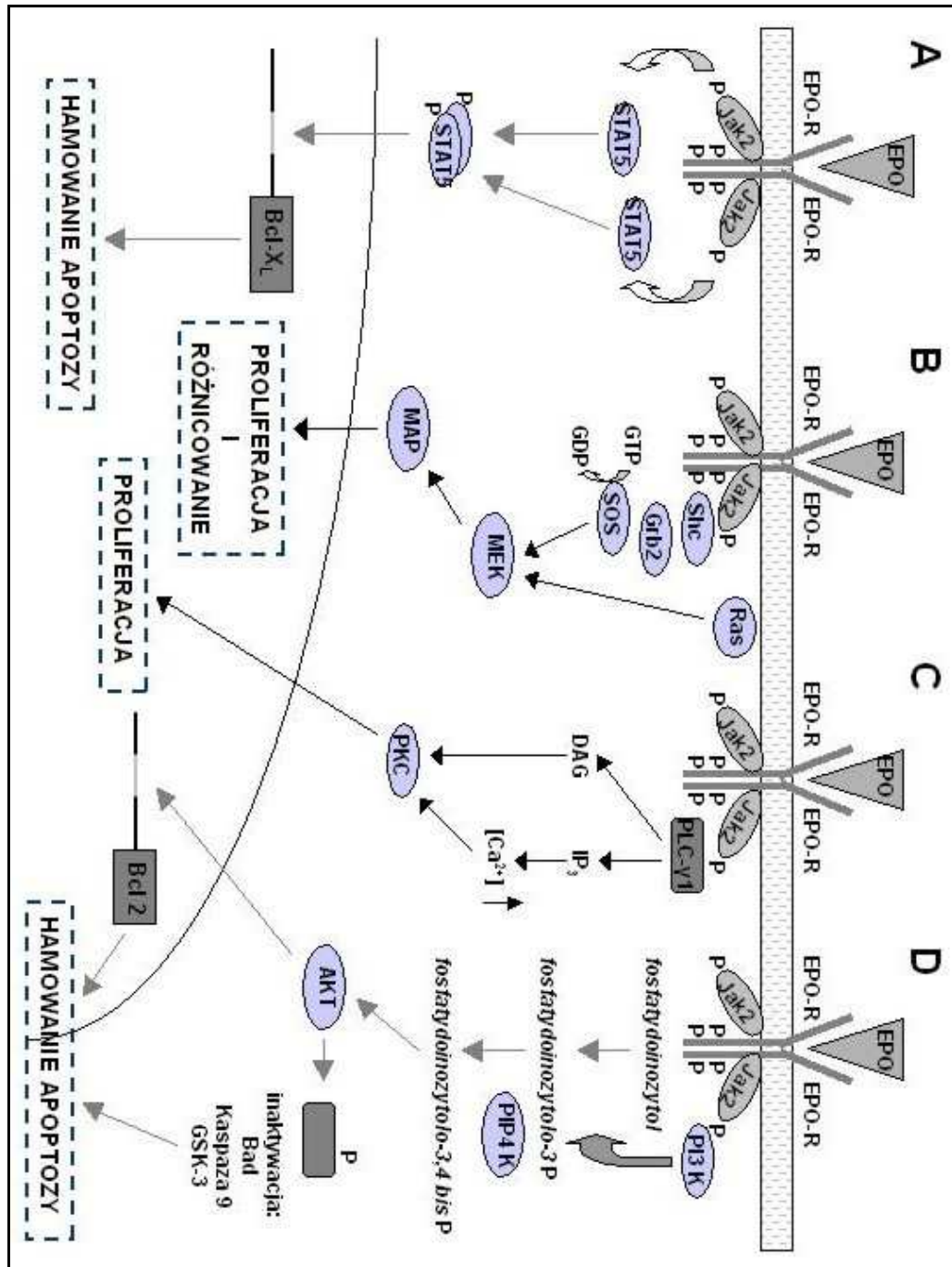


Rycina 5. Struktura kompleksu składającego się z EPO i dwóch cząsteczek receptora EPO-R (M. C. Deller *Curr. Opin. Struc. Biol.* 10 (2000): 215).

Schemat B na Ryc. 6 przedstawia drugą ścieżkę, w której udział biorą kinazy Ras i MAP (*mitogen-activated protein kinase*). Aktywacja tej drogi następuje poprzez związanie się białka adoptorowego Shc z ufosforylowanym EPO-R (Damen i Liu, 1993). Białko to następnie zostaje ufosforylowane przez kinazę JAK2, co pozwala na przyłączenie się białka Grb2 (Damen i Liu, 1993). Do niego wiąże się białko Sos, które z kolei aktywuje białko Ras (Miura, 1994). Ras aktywuje serynowo/treoninową kinazę Raf, która stymuluje kinazę MEK. Substratem MEK jest kinaza MAP (Gobert, 1995). Ufosforylowana MAP ulega przemieszczeniu do jądra komórkowego, gdzie aktywuje różne czynniki transkrypcyjne (Tilbrook, 1999). W wyniku jej działania dochodzi do transkrypcji genów odpowiedzialnych za różnicowanie i proliferację prekursorów krwinek czerwonych, m. in. c-fos, c-myc, c-jun (Gobert, 1995; Miura, 1994).

Trzecia ścieżka, która ulega aktywacji na skutek przyłączenia EPO do receptora, mobilizuje fosfolipazę C γ 1 (PLC γ 1 – *phospholipase C γ 1*) (Halupa, 2005) i białkową kinazę C (PKC – *protein kinase C*) (Beckman, 1996). Aktywna PLC γ 1 hydrolizuje fosfatydyloinozytol do diacyloglicerolu (DAG) i inozytolo-1,4,5-trifosforanu (IP $_3$). IP $_3$ powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia a wapń, wraz z DAG, aktywują białkową kinazę C, która fosforylując odpowiednie substraty zapoczątkowuje kaskady kinaz (Beckman, 1996). To w końcowym rezultacie prowadzi do inicjacji transkrypcji wielu różnych genów, również tych odpowiedzialnych za proliferację komórek (Ryc. 6, schemat C).

Czwarta ścieżka sygnalizacyjna odbywa się z udziałem kinazy 3-fosfatydyloinozytoli (PI-3K – *phosphatidylinositol 3-kinase*) jest kolejną, która uruchamiana jest w następnie oddziaływania EPO/EPO-R (Ryc. 6, schemat D) (Damen i Mui, 1993; Mayeux, 1993). Fosforylacja PI-3K umożliwia przemianę fosfatydyloinozytoli do 3-fosforanu fosfatydyloinozytoli, który z kolei ulega fosforylacji do 3,4-bisfosforanu fosfatydyloinozytoli (Franke, 1997). Ten ostatni jest aktywatorem kinazy Akt, która z kolei indukuje transkrypcję genów kodujących białka antyapoptotyczne z rodziny Bcl 2 (Franke, 1997). W ten sposób dochodzi do hamownia apoptozy progenitorów erytropoezy, co umożliwia ich dalsze różnicowanie (Franke, 1997).



Rycina 6. Ścieżki sygnałowe aktywowane w wyniku przyłączenia się EPO do receptora (opis w tekście).

Wiele badań wskazuje na to, że stymulacja receptora dla EPO prowadzi również do zaangażowania czynnika transkrypcyjnego, nazywanego NF- κ B (*nuclear factor kappaB*) (Sae-ung, 2005; Zhang, 1998), który pierwotnie zaangażowany jest w odpowiedź immunologiczną i pod wpływem odpowiedniej stymulacji przyczynia się do transkrypcji genów kodujących białka antyapoptotyczne w limfocytach (Lisowska, 2003; Makarov, 2000). W progenitorach erytropoezy dochodzi do stymulacji NF- κ B oraz białka antyapoptotycznego Bcl-X_L pod wpływem EPO, co sugeruje, że ścieżka ta może mieć również istotne znaczenie w procesie erytropoezy (Sae-ung, 2005). Do jego aktywacji dochodzi najprawdopodobniej w wyniku ufosforylowania jego inhibitorów, tzw. I κ B (*inhibitor of κ B*) przez kinazy JAK2. Ufosforylowane I κ B uwalniają NF- κ B, dzięki czemu czynnik ten może przejść do jądra komórkowego (Sae-ung, 2005). Innym czynnikiem, który może aktywować NF- κ B, jest poprzednio wymieniona kinaza Akt. Również ona może uwolnić NF- κ B poprzez fosforylację I κ B (Rossert, 2005). Dotychczasowe badania sugerują, że ścieżka z udziałem NF- κ B może być kluczowa dla przeżycia progenitorów erytropoezy (Sae-ung, 2005).

Rola EPO najwyraźniej skupiona jest na aktywacji ścieżek sygnalizacyjnych promujących transkrypcję genów kodujących białka antyapoptotyczne, co chroni prekursor erytrocytów przed programowaną śmiercią komórkową i zwiększa ich szansę na dalsze różnicowanie. Aby nie doszło do zainicjowania apoptozy, musi dojść do zsynchronizowanej aktywacji wszystkich wyżej wymienionych ścieżek.

1.2.4. Rola erytropoetyny w organizmie

Wytwarzanie krwinek czerwonych (tzw. erytropoeza) jest procesem, od którego zależy prawidłowy transport tlenu i usuwanie dwutlenku węgla w naszym organizmie. Erytropoeza zachodzi najbardziej intensywnie w okresie życia płodowego a jego intensywność, zarówno w tym czasie, jak i u dorosłego człowieka zależy od wpływu erytropoetyny (Dudenhausen, 1997). Produkcja EPO w życiu płodowym odbywa się głównie w wątrobie a jej zwiększona intensywność jest wynikiem mniejszej ekspozycji na tlen niż po urodzeniu (Dudenhausen, 1997).

EPO działa na komórki macierzyste erytrocytów, tzw. progenitory erytropoezy (komórki CFU-E i BFU-E), regulując ich proliferację i promując przeżycie w odpowiedzi na niskie stężenie tlenu, czyli tzw. hipoksję (Moritz, 1997). EPO wytwarzana w nerkach przechodzi do osocza krwi, stąd do szpiku kostnego, gdzie wiąże się ze swoim receptorami na powierzchni komórek macierzystych (Moritz, 1997). Komórki BFU-E wywodzące się z wielopotencjalnej komórki macierzystej (Krantz, 1991) charakteryzują się rzadkimi podziałami (Gregory, 1978) i do różnicowania się i proliferacji wymagają obecności EPO, IL-3 oraz GM-CSF (*granulocytes-macrophage colony stimulating factor* – czynnik stymulujący kolonie granulocytów i makrofagów) (Emerson, 1988). Tymczasem komórki CFU-E wywodzące się z BFU-E dzielą się intensywnie i do prawidłowego wzrostu wymagają jedynie niewielkich ilości EPO (Krantz, 1990). Rola erytropoetyny skupiona jest na aktywacji ścieżek sygnalizacyjnych promujących transkrypcję genów kodujących białka antyapoptotyczne, co chroni progenitory erytropoezy przed programowaną śmiercią komórkową (Sui, 2000; Koury, 1988). W końcowym rezultacie mamy do czynienia z dalszym różnicowaniem erytroblastów a następnie ze zwiększeniem puli krwinek czerwonych (Krantz, 1991).

Produkowane głównie w wątrobie w okresie życia płodowego EPO jest z kolei czynnikiem niezbędnym dla przetrwania embrionu (Masuda, 1999; Krantz, 1991). Mysie embriony charakteryzujące się brakiem genu kodującego EPO lub EPO-R umierały po kilkunastu dniach mimo obecności progenitorów erytropoezy (komórek CFU-E i BFU-E) w wyniku braku sygnałów antyapoptotycznych, jakich dostarcza erytropoetyna (Wu, 1995). Embriony te ponadto wykazywały również inne wady rozwoju wynikające ze wzmożonej apoptozy w wątrobie, wsierdciu czy mięśniu sercowym (Wu, 1999).

Do tej pory rola układu EPO/EPO-R sprowadzana była tylko do procesu erytropoezy, ale wydaje się, że może on również pełnić inne funkcje, gdyż jego obecność zidentyfikowano na wielu innych komórkach w ludzkim organizmie. EPO-R został zidentyfikowany m. in. w **komórkach nerwowych w mózgu** i liniach komórkowych wykazujących cechy charakterystyczne dla neuronów (Masuda, 1993). Co ciekawe, w warunkach doświadczalnych hipoksja prowadzi również do wzrostu poziomu mRNA genu dla EPO w neuronach a co istotne poziom ten utrzymuje się przez ponad 24 godziny, podczas gdy w nerce zaledwie 8 godzin (Chikuma, 2000). Ponadto erytropoetyna jest

również w stanie przekraczać barierę krew-mózg i chronić neurony w różnych modelach doświadczalnych, m. in. przed konsekwencjami niedokrwienia (Celik, 2002; Brines, 2000; Sakanaka, 1998). Wydaje się więc, że w mózgu może istnieć niezależny system EPO/EPO-R, który najprawdopodobniej ma za zadanie chronić komórki układu nerwowego przed apoptozą będącą odpowiedzią na niedotlenienie. Rola tego systemu polega na aktywacji ścieżek sygnalizacyjnych z udziałem czynnika STAT5 oraz NF- κ B, co prowadzi do zahamowania apoptozy komórek nerwowych (Sola, 2005; Digicaylioglu, 2001).

Erytropoetyna ma też swój udział w procesie tzw. **angiogenezy**, czyli procesie tworzenia nowych naczyń włosowatych (Anagnostou, 1990). Komórki śródbłonna naczyń również charakteryzują się obecnością EPO-R na swojej powierzchni (Anagnostou, 1990).

1.2.5. Rekombinowana ludzka erytropoetyna (rhEPO) w leczeniu niedokrwistości u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek

W 1977 roku erytropoetyna została wyizolowana w moczu pacjentów z niedokrwistością złośliwą (Miyake, 1977). Ten krok pozwolił na wyizolowanie i sklonowanie genu kodującego EPO, czego dokonali Lin i wsp. oraz Jacobs i wsp. w 1985 (Jacobs, 1985; Lin, 1985). W 1987 Eschbach przedstawił wyniki I i II fazy badań klinicznych nad rekombinowaną ludzką erytropoetyną (rhEPO – *recombinant human erythropoietin*), które wskazywały na wzrost hematokrytu u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek (Eschbach, 1987). Natomiast w 2000 roku po raz pierwszy zostały określone zasady leczenia niedokrwistości za pomocą rhEPO u pacjentów z PNN. Obecnie sprecyzowane są dokładne zalecenia dotyczące stosowania rhEPO w EBPG (*European Best Practice Guideline*) oraz NKF DOQI (*National Kidney Foundation Dialysis Outcomes Quality Initiative*) (Eschbach, 2000).

Najczęściej podawane docelowe wartości hematokrytu/hemoglobiny w czasie leczenia za pomocą rhEPO u pacjentów przewlekle hemodializowanych wynoszą od 33% (11g/dl) do 36% (12g/dl). 33% hematokrytu to najniższa prawidłowa wartość dla kobiet przed menopauzą i u pacjentów przed okresem dojrzewania a 36% jest najniższym poziomem, którego spodziewać się można u dorosłych mężczyzn i kobiet po menopauzie (Locatelli,

2004). Dokładna wartość hemoglobiny, większa od 11g/dl powinna być indywidualizowana w zależności od konkretnego pacjenta, biorąc pod uwagę płeć, wiek, aktywność oraz choroby współistniejące (Locatelli, 2004).

Różnica pomiędzy rekombinowaną ludzką erytropoetyną (inaczej nazywaną epoetyną) a naturalną EPO dotyczy większej ilości reszt kwasu sialowego w rhEPO, który ulega glikozylacji niezbędnej dla biologicznej aktywności hormonu (Sasaki, 1987). W leczeniu niedokrwistości używane powszechnie są dwie formy zsyntetyzowanej epoetyny: alfa i beta, które również między sobą różnią się ilością kwasu sialowego (Sasaki, 1987). Darbepoetyna jest dłużej działającym analogiem epoetyny alfa. Charakteryzuje się dwoma dodatkowymi łańcuchami węglowodanowymi oraz zwiększoną ilością reszt kwasu sialowego (Egrie, 2001). Prawdopodobnie te cechy odpowiadają za jej długi okres półtrwania oraz podwyższoną aktywność biologiczną (Elliott, 2004; Cheung, 2001; Egrie, 2001).

1.2.6. Wpływ rekombinowanej ludzkiej erytropoetyny na układ immunologiczny u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek

Podawanie epoetyny, obok działania bezpośredniego na układ czerwonokrwinkowy prowadzącego do pobudzenia tego układu do produkcji czerwonych krwinek, powoduje wiele innych zmian w organizmie, które trudno wytłumaczyć jedynie korekcją niedokrwistości. Istnieją badania wskazujące między innymi na immunomodulacyjne właściwości EPO. Poniżej przytoczono dotychczasowe dane dotyczące wpływu epoetyny na układ immunologiczny u chorych przewlekłe hemodializowanych.

Wykazano wpływ epoetyny na poziom takich cytokin jak IL-10 oraz TNF- α . Poziom TNF- α ulegał spadkowi w ciągu pierwszych tygodni od podania epoetyny i utrzymywał się na obniżonym poziomie przez dwa miesiące, podczas gdy poziom anty-zapalnej IL-10 ulegał wzrostowi (Bryl, 1998). Spadek TNF- α jest najprawdopodobniej efektem działania IL-10, której rola polega na hamowaniu produkcji TNF i IL-1 wydzielanych przez zaktywowane makrofagi (Fiorentino, 1991). Epoetyna wpływa na odpowiedź nieswoistą

również poprzez zmniejszenie charakteryzującej pacjentów hemodializowanych cytotoksyczności komórek NK (Baj, 1992).

U osób przewlekle hemodializowanych po podaniu epoetyny wykazano wzrost stężenia IL-2 (Bryl, 1999). Efekt ten był obserwowany zarówno po stymulacji za pomocą fitohemaglutaniny (PHA – *phytohemagglutinin*), jak i epoetyny w stężeniu zbliżonym do fizjologicznego (0,05 IU/ml) (Bryl, 1999). IL-2 jest cytokiną pośredniczącą w odpowiedzi komórkowej i nieznanym jest mechanizm, w jaki epoetyna mogłaby pobudzać jej produkcję. Jedną z hipotez mówi o działaniu epoetyny na podjednostkę beta receptora dla IL-2 (IL-2R – *interleukin 2 receptor*). Łańcuch beta receptora oraz receptor dla EPO należą do jednej rodziny receptorów dla hematopoetyn i charakteryzują się obecnością konserwowanej ewolucyjnie sekwencji aminokwasowej w domenie cytoplazmatycznej, która jest niezbędna dla przekazywania sygnału do jądra komórki (Tilbrook, 1999; Ihle, 1995). Być może również na limfocytach istnieje niezależny receptor dla EPO, na co może wskazywać fakt, iż kontakt epoetyny z komórkami linii limfoidalnych aktywuje czynnik STAT5 i fosforylację białek (Pallard, 1995).

Kolejnym efektem podawania hemodializowanym pacjentom epoetyny jest spadek odsetka komórek CD8⁺CD152⁺ (Trzonkowski, 2002), które wykazują działanie supresyjne polegające na hamowaniu aktywacji limfocytów T poprzez wiązanie się z CD80/CD86 na komórkach APC, co uniemożliwia ich interakcję z antygenem CD28 (Srahna, 2005; Walunas, 1994). Antygen CD152, znany również jako antygen 4 cytotoksycznych limfocytów T (CTLA-4 – *cytotoxic T lymphocytes antigen 4*), może wiązać cząsteczkę CD80 kilkadziesiąt razy silniej niż antygen CD28 a tym samym zakłócać odpowiedź limfocytów T na stymulację antygenową bądź mitogenową (Linsley, 1992). U pacjentów hemodializowanych krążące we krwi limfocyty CD8⁺CD152⁺ mogłyby więc być bezpośrednią przyczyną zmniejszonej stymulacji limfocytów T i obniżonej produkcji IL-2 (Girndt, 2001). W odpowiedzi na leczenie epoetyną w populacji komórek CD8⁺CD152⁺ dochodzi do wzrostu odsetka komórek apoptotycznych zarówno *ex vivo*, jak i pod wpływem kamptotecyny czy samej epoetyny (Trzonkowski, 2005). Efekt ten jest odmienny od wywieranego przez EPO na komórki układu czerwonokrwinkowego, gdzie hormon ten chroni prekursorzy linii erytrocytarnych przed apoptozą i umożliwia ich dalsze różnicowanie się (Moritz, 1997).

Za pomocą metody izotopowej oceniającej wbudowywanie radioaktywnej tymidyny do jądra komórkowego ustalono, że limfocyty T pobrane od pacjentów hemodializowanych charakteryzują się obniżoną zdolnością do proliferacji w odpowiedzi na stymulację za pomocą PHA, konkawaliny A (ConA – *concavalin A*) czy przeciwciała anti-CD3 (Shurtz-Swirski, 1996). Proliferacja ta ulegała poprawie po podaniu epoetyny (Shurtz-Swirski, 1996).

Dalsze obserwacje dotyczyły poprawy w zakresie odpowiedzi humoralnej przejawiające się lepszą odpowiedzią na szczepienie przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B u pacjentów hemodializowanych leczonych epoetyną (Schaefer, 1992). Ponadto badania *in vitro* wykazały pobudzenie proliferacji limfocytów B oraz zwiększoną produkcję immunoglobulin (IgG, IgM i IgA) w obecności epoetyny (Kimata, 1991). Ten efekt z kolei może być następstwem obserwowanego u pacjentów wzrostu IL-10 (Bryl, 1998), której rola polega między innymi na stymulowaniu komórek B do produkcji przeciwciał (Itoh, 1995).

Powyższe badania są dowodem na to, że erytropoetyna oddziałuje na komórki układu immunologicznego. Nieznany jest jednak mechanizm tego działania. Można założyć, że na komórkach układu odpornościowego jest, podobnie jak na komórkach linii erytrocytarnej, obecny jest receptor dla EPO. Jednak do tej pory EPO-R został wykryty jedynie na granulocytach (Sela, 2001). Prawdopodobnie metody dotychczas stosowane nie były wystarczająco czułe, bądź receptor pojawia się na limfocytach na skrajnie niskim poziomie. Erytropoetyna mogłaby też działać na komórki T bądź B oddziałując poprzez inne receptory z rodziny receptorów cytokin typu I (np. przez podjednostkę beta receptora dla IL-2), które charakteryzują się podobną budową i przekazują sygnał przez podobny system sygnalizacyjny w komórce, o czym wspomniano wcześniej.

Opisane wcześniej zaburzenia w odpowiedzi limfocytów B oraz w produkcji cytokin u pacjentów z PNN wskazują na niekorzystne zmiany funkcjonowania limfocytów T, w szczególności limfocytów pomocniczych T CD4⁺. Limfocyty CD4⁺ są niezbędne do pobudzenia limfocytów B do wejścia w cykl komórkowy, różnicowania się i wydzielania immunoglobulin (Noelle, 1991). Niewiadomo, czy zwiększona produkcja cytokin takich jak IL-10 czy IL-2 jest wyrazem bezpośredniego działania epoetyny na limfocyty T, czy

wpływ ten jest pośredni – poprzez działanie na inne komórki, np. granulocyty, na których potwierdzono obecność EPO-R. Brak jest szczegółowych danych dotyczących wpływu leczenia za pomocą epoetyny na fenotyp powierzchniowy limfocytów T, który świadczy o ich aktywacji w odpowiedzi na stymulację antygenową czy mitogenową. **Dynamika aktywacji limfocytów T** wiąże się z pojawianiem w ich błonie komórkowej swoistych antygenów aktywacyjnych, do których zalicza się m. in. CD28, CD25, CD69, HLA-DR czy CD40L. Białka te wiążąc się z odpowiednimi cząsteczkami na innych limfocytach i komórkach APC indukują specyficzne ścieżki sygnalizacyjne. W ten sposób przyczyniają się do proliferacji, różnicowania czy wydzielania specyficznych cytokin zarówno przez same limfocyty T, jak i komórki je otaczające. Antygen CD28 jest tzw. antygenem kostymulującym, który jest niezbędny dla zainicjowania prawidłowej odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów T (Bocko, 2002; Burr, 2001). W wyniku interakcji pomiędzy CD28 na limfocycie T CD4⁺ a CD86 na limfocycie B bądź komórce APC dochodzi do indukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych, które aktywują czynniki transkrypcyjne rozpoznające tzw. region CD28RE (*CD28-responsive element*) w obrębie promotorów różnych genów, między innymi genu kodującego IL-2 (Shapiro, 1997; Fraser, 1991). U pacjentów hemodializowanych leczonych epoetyną przy spadku puli komórek CD8⁺CD152⁺ dochodzi jednocześnie do wzrostu puli naiwnych komórek T CD8⁺ charakteryzujących się obecnością CD28 (Trzonkowski, 2007). Skoro widać zmiany w proporcjach komórek CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻, istnieje możliwość, że podobne zależności dotyczą również komórek CD4⁺. Poziom ekspresji antygeny CD28, jak i innych wcześniej wymienionych antygenów powierzchniowych świadczy o poziomie aktywacji limfocytu T a tym samym stanowi źródło informacji o zdolności komórek do kontaktu z otaczającymi je innymi limfocytami oraz komórkami APC.

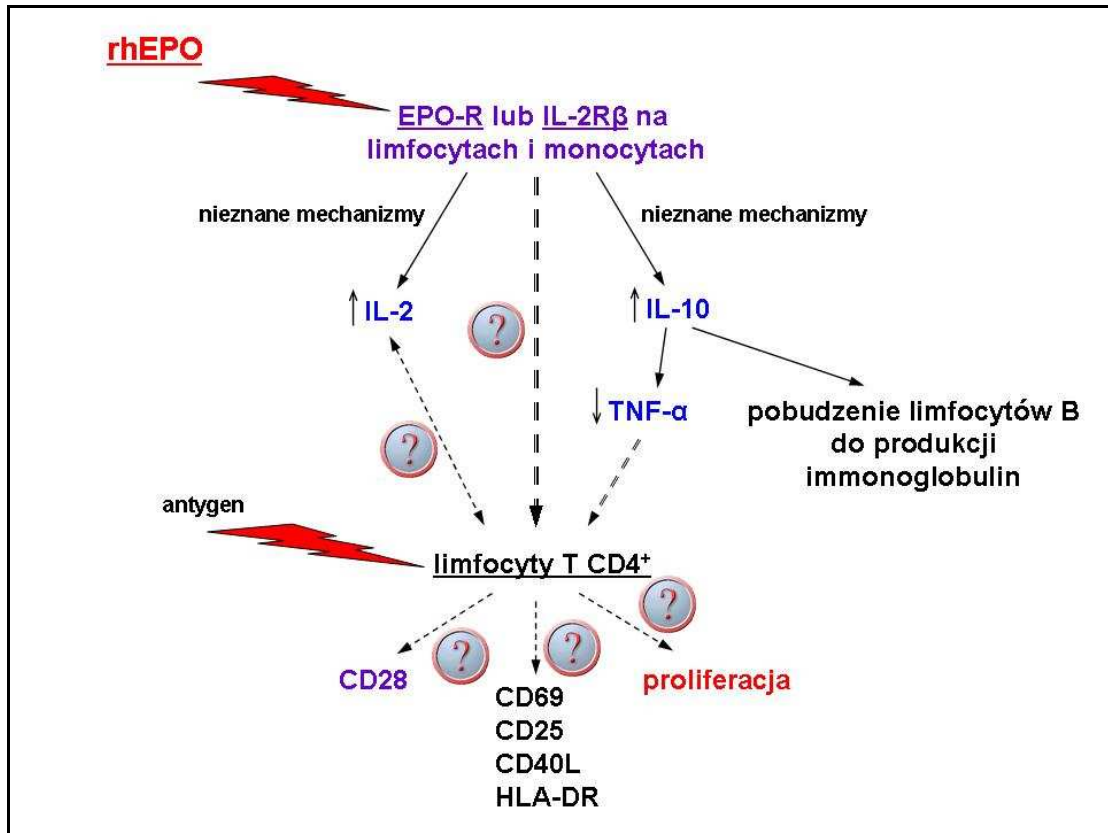
Kolejna cecha świadcząca o aktywacji limfocytów CD4⁺ to **zdolność do proliferacji** w odpowiedzi na stymulację mitogenową bądź antygenową. Znana jest na razie tylko jedna publikacja opisująca obniżoną zdolnością do proliferacji limfocytów T od pacjentów hemodializowanych (Shurtz-Swirski, 1996), która jednak nie wyjaśnia, co leży u podstaw tego defektu. Ponadto opisana przez autorów proliferacja limfocytów dotyczy całej populacji komórek T i nie opisuje dokładnie wszystkich parametrów proliferacyjnych limfocytów CD4⁺, co wynika z ograniczeń wykorzystanej w tych badaniach metody.

Dotychczas proliferację komórek określano poprzez ocenę wbudowywania radioaktywnej tymidyny do DNA, co pozwalało jedynie ocenić intensywność, z jaką zachodzi synteza materiału genetycznego w fazie cyklu S. Metoda ta natomiast nie pozwalała ocenić, czy powstają komórki potomne, ile ich powstaje, jakie jest tempo podziałów oraz jaki jest fenotyp komórek dzielących się.

Powyższe informacje dotyczące wpływu epoetyny na układ immunologiczny nie pozwalają na poznanie mechanizmu jej działania. Pojawia się więc konieczność zastosowania nowych, wnikliwszych metod umożliwiających ocenę funkcji komórek układu immunologicznego a tym samym metod umożliwiających badanie wpływu epoetyny na te komórki. Opracowana parę lat temu metoda oceny proliferacji limfocytów przy pomocy cytometrii przepływowej określana mianem DCT (*Dividing Cell Tracking*) (Hasbold, 1999) pozwala śledzić podziały komórkowe za pomocą barwnika fluorescencyjnego CFSE (ang. *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*). CFSE jest trwale wiązany przez białka znajdujące się w cytoplazmie i w czasie każdego podziału jest rozdzielany równomiernie do komórek potomnych a pomiar jego fluorescencji umożliwia ocenę liczby podziałów komórkowych (Hasbold, 1999). Możliwa jest również analiza zarówno fenotypu powierzchniowego dzielących się komórek, jak i tempa podziału poszczególnych subpopulacji komórkowych (Hasbold, 1999).

Obserwacja zmian w fenotypie powierzchniowym limfocytów T CD4⁺ przy jednoczesnej analizie parametrów proliferacyjnych pozwala na ocenę zaburzenia czynności tych komórek u pacjentów hemodializowanych oraz na analizę wpływu epoetyny na powyższe parametry. To może dostarczyć dodatkowych informacji o zmianach w układzie immunologicznym u pacjentów z PNN i ewentualnych konsekwencjach leczenia epoetyną. Wreszcie niezbędna dla zrozumienia mechanizmu wpływu leczenia epoetyną na limfocyty T jest odpowiedź na pytanie, czy na tych komórkach jest zlokalizowany EPO-R, poprzez który to epoetyna mogłaby pobudzać sygnały wewnątrzkomórkowe.

Na rycinie 7 przedstawiono schematycznie poznane efekty działania epoetyny w układzie immunologicznym oraz założono kolejne hipotetyczne punkty uchwytu. Obecna praca jest bowiem dalszą próbą wyjaśnienia mechanizmów działania epoetyny w układzie immunologicznym.



Rycina 7. Nieznane efekty wpływu epoetyny na różne aspekty dynamiki aktywacji limfocytów T.

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Klinicznym wyrazem upośledzonej funkcji układu immunologicznego chorych z PNN jest osłabiona zdolność do wytwarzania przeciwciał w odpowiedzi na szczepienia oraz zakażenia. Można więc przypuszczać, że defekt limfocytów B w jakimś stopniu może zależeć od zaburzeń funkcjonowania limfocytów pomocniczych T CD4⁺. Niewiele jest wiadomo o wpływie leczenia za pomocą epoetyny na fenotyp powierzchniowy limfocytów T, zwłaszcza ekspresję antygenów aktywacyjnych i kostymulujących, które są niezbędne dla kontaktu z innymi komórkami. Ważne jest też zbadanie jednej z najważniejszych funkcji komórek CD4⁺, jaką jest ich zdolność do proliferacji w odpowiedzi na stymulację. Proliferacja oraz fenotyp tych komórek to dwie główne cechy świadczące o ich aktywacji w odpowiedzi na pojawiający się w organizmie antygen. Niewiadomo też, czy zwiększona produkcja cytokin jest wyrazem bezpośredniego działania epoetyny (poprzez receptor dla EPO obecny na ich powierzchni), czy wpływ ten jest pośredni (np. będący wynikiem działania epoetyny na granulocyty bądź monocyty).

W związku z tym głównymi celami tej pracy są:

1. Ocena zaburzeń proliferacji i zmian fenotypu powierzchniowego limfocytów T CD4⁺ u pacjentów z PNN poddanych leczeniu powtarzanymi hemodializami;
2. Ocena wpływu leczenia za pomocą epoetyny na zmiany czynnościowe limfocytów T CD4⁺;
3. Próba zidentyfikowania receptora dla EPO na powierzchni wybranych komórek układu immunologicznego.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiał do badań

Materiałem do badań była krew obwodowa pacjentów leczonych w Katedrze i Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Gdańsku oraz w Poradni Nefrologicznej Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego w Gdańsku. Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku. Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy w odpowiednim wieku.

I cykl badań dotyczył wpływu stosowania epoetyny na fenotyp powierzchniowy oraz proliferację limfocytów CD4⁺. Grupę pacjentów z PNN wybranych do tej serii doświadczeń stanowiło 44 osób, w wieku od 29 do 83 lat, średnia wieku 60.09 ± 14.42 lat. Pacjenci ci zostali następnie podzieleni na trzy grupy scharakteryzowane w Tabeli 2:

1. pacjenci przewlekle hemodializowani nieleczeni rhEPO – **HDrhEPO-**;
2. pacjenci przewlekle hemodializowani leczeni rhEPO – **HDrhEPO+**.

W grupie **HDrhEPO-** znalazło się 25 chorych w wieku 29-83 (średnio 60.81 ± 14.83) lat, przewlekle hemodializowanych od 0.5 do 10 (średnio 1.87 ± 2.08) miesięcy.

W grupie **HDrhEPO+** znalazło się 19 chorych w wieku 33-77 (średnio 59.24 ± 13.09) lat, przewlekle hemodializowanych od 2 do 288 (średnio 59.24 ± 13.09) miesięcy. Pacjenci z powodu znacznej niedokrwistości otrzymywali epoetynę przez okres od 6 do 120 (średnio 39.31 ± 32.54) miesięcy. 7 osób otrzymywało epoetynę beta (NeoRecormon, Hoffmann La Roche Ltd, Szwajcaria), 11 – epoetynę alfa (Eprex, Janssen-Cilag, Belgia) a 1 – darbepoetynę (Aranesp, Amgen, Holandia).

Grupę osób zdrowych w tym cyklu badań stanowiło 20 ochotników (5 kobiet, 15 mężczyzn), w wieku od 32 do 78 lat, średnia wieku: 50.36 ± 16.53 lat.

Tabela 2. Charakterystyka pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek zakwalifikowanych do I cyklu badań.

	Pacjenci HD		Zdrowi
	rhEPO (-)	rhEPO (+)	
Liczba osób	25	19	20
Wiek (lata)	60.81 ± 14.83	59.24 ± 13.09	50.36 ± 16.53
Płeć (K/M)	6/19	9/10	5/15
Czas HD (miesiące)	1.87 ± 2.08 *	59.65 ± 71.97	0
Czas terapii rhEPO (miesiące)	0	39.31 ± 32.54	0

HD, hemodializowany; rhEPO, rekombinowana ludzka erytropoetyna

* p<0.0005 vs pacjenci HDrhEPO+, test T Studenta dla prób niezależnych

Oznaczenie parametrów morfologicznych miało na celu ocenę wpływu leczenia za pomocą rekombinowanej ludzkiej erytropoetyny (rhEPO, epoetyny) na poziom hemoglobiny, czerwonych krwinek i podstawowych populacji komórek układu immunologicznego. Badania przeprowadzone w grupach pacjentów wybranych do **I cyklu badań** wykazały istotnie niższy poziom hemoglobiny u pacjentów hemodializowanych, którzy nie dostawali w tym czasie erytropoetyny – HDrhEPO-, w stosunku do zdrowej kontroli (Tabela 3). Średni poziom hemoglobiny u pacjentów HD leczonych epoetyną – HDrhEPO+ – wciąż utrzymywał się na niskim poziomie w stosunku do osób zdrowych (10.40 ± 1.04 g/dl względem 14.33 ± 1.17 g/dl, $p < 0.0005$), ale był wyższy niż w grupie chorych hemodializowanych nieleczonych epoetyną. Podobna sytuacja dotyczyła poziomu hematokrytu oraz krwinek czerwonych.

U pacjentów HDrhEPO- zaobserwowano wyższy odsetek neutrocytów (63.21 ± 9.78 % względem 57.69 ± 8.31 % u osób zdrowych, $p < 0.05$). Z kolei pacjenci HDrhEPO+ charakteryzowali się podwyższonym odsetkiem monocytów w porównaniu do zdrowej kontroli (10.48 ± 2.14 % względem 7.93 ± 3.06 %, $p < 0.05$). Zarówno w grupie HDrhEPO-, jak i HDrhEPO+ odsetek limfocytów był obniżony w stosunku do zdrowej kontroli.

Tabela 3. Różnice w parametrach morfologicznych pomiędzy pacjentami z PNN a osobami zdrowymi w I cyklu badań.

	Pacjenci HD		Zdrowi N=20
	rhEPO (-) N=25	rhEPO (+) N=19	
Hemoglobina (g/dl)	9.92 ± 1.03 *	10.40 ± 1.04 *	14.33 ± 1.17
Dawki epoetyny (IU/tydzień)	0	6933.33 ± 2344.20	0
Krwinki białe (G/l)	7.63 ± 2.83 *	6.41 ± 1.50	5.92 ± 1.42
Neutrocyty (%)	63.21 ± 9.78 *	62.28 ± 8.01	57.69 ± 8.31
Limfocyty (%)	22.80 ± 8.12 *	23.02 ± 7.09 *	30.65 ± 7.71
Monocyty (%)	9.03 ± 2.99	10.48 ± 2.14 *	7.93 ± 3.06

* p<0.05 vs zdrowa kontrola, test T Studenta dla prób niezależnych

II cykl badań miał na celu wykrycie receptora dla EPO na powierzchni wybranych subpopulacji limfocytów oraz monocytów. Grupę pacjentów z PNN wybranych do tej serii doświadczeń stanowiły 24 osoby, w wieku od 25 do 81 lat, średnia wieku 58.22 ± 15.34. Pacjenci ci zostali następnie podzieleni na dwie grupy scharakteryzowane w Tabeli 4:

1. pacjenci przewlekle hemodializowani nieleczeni rhEPO – **HDrhEPO-**;
2. pacjenci hemodializowani leczeni rhEPO – **HDrhEPO+**.

W grupie **HDrhEPO-** znalazło się 9 chorych w wieku 26-71 (średnio 54.86 ± 14.40) lat, przewlekle hemodializowanych od 2 do 120 (średnio 46.33 ± 38.05) miesięcy.

W grupie **HDrhEPO+** znalazło się 15 chorych w wieku 48-78 (średnio 61.60 ± 9.91) lat, przewlekle hemodializowanych od 10 do 144 (średnio 57.14 ± 48.05) miesięcy. Pacjenci z powodu znacznej niedokrwistości otrzymywali epoetynę przez okres od 9 do 132 (średnio 39.91 ± 39.63) miesięcy. 7 osób otrzymywało epoetynę beta (NeoRecormon, Hoffmann La Roche Ltd, Szwajcaria), 4 – epoetynę alfa (Eprex, Janssen-Cilag, Belgia) a 4 – darbepoetynę (Aranesp, Amgen, Holandia).

Grupę osób zdrowych w tym cyklu badań stanowiło 12 ochotników (8 kobiet, 4 mężczyzn), w wieku od 25 do 54 lat, średnia wieku: 36.11 ± 10.89 lat.

Tabela 4. Charakterystyka pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek zakwalifikowanych do II cyklu badań.

	Pacjenci HD		Zdrowi
	rhEPO (-)	rhEPO (+)	
<i>Liczba osób</i>	9	15	12
<i>Wiek (lata)</i>	54.86 ± 14.40	61.60 ± 9.91	36.11 ± 10.89
<i>Płeć (K/M)</i>	2/7	7/8	8/4
<i>Czas HD (miesiące)</i>	46.33 ± 38.05	57.14 ± 48.05	0
<i>Czas terapii rhEPO (miesiące)</i>	0	39.91 ± 39.63	0

HD, hemodializowany; rhEPO, rekombinowana ludzka erytropoetyna

Tabela 5. Różnice w parametrach morfologicznych pomiędzy pacjentami z PNN a osobami zdrowymi w II cyklu badań.

	Pacjenci HD		Zdrowi <i>N=12</i>
	rhEPO (-) <i>N=9</i>	rhEPO (+) <i>N=15</i>	
<i>Hemoglobina (g/dl)</i>	$11.53 \pm 1.51^*$	$10.89 \pm 1.68^*$	13.89 ± 1.48
<i>Dawki epoetyny (IU/tydzień)</i>	0	9428.57 ± 2699.21	0
<i>Krwinki białe (G/l)</i>	7.97 ± 3.92	7.44 ± 2.08	6.94 ± 1.35
<i>Neutrocyty (%)</i>	66.54 ± 7.94	61.05 ± 11.26	59.26 ± 12.24
<i>Limfocyty (%)</i>	$19.91 \pm 6.24^*$	25.84 ± 9.92	31.78 ± 12.10
<i>Monocyty (%)</i>	9.54 ± 2.16	10.37 ± 2.50	7.99 ± 2.33

* $p < 0.05$ vs zdrowa kontrola, test T Studenta dla prób niezależnych

Również w tych grupach oznaczono parametry morfologiczne. Wykazano istotnie niższy poziom hemoglobiny, zarówno w grupie pacjentów u pacjentów, którzy nie otrzymywali erytropoetyny – HDrhEPO-, jak i leczonych epoetyną – HDrhEPO+, w stosunku do zdrowej kontroli (Tabela 5). W grupie HDrhEPO- odsetek limfocytów był obniżony w stosunku do zdrowej kontroli

Przewlekła niewydolność nerek, bez względu na przyczynę, rozwija się stopniowo i dopiero przy nasileniu zaburzeń metabolicznych dochodzi do manifestacji objawów klinicznych, w związku z tym czas rzeczywistego trwania choroby jest trudny do określenia. Tymczasem najkrótszy czas leczenia za pomocą powtarzalnych hemodializ wynosił 0.5 miesiąca, najdłuższy – 24 lata. Pacjenci byli hemodializowani trzy razy w tygodniu a średni czas trwania jednego zabiegu hemodializy wynosił 4.32 ± 0.61 godzin. Stopień adekwatności dializy oceniano przy pomocy wskaźnika Kt/V (klirensu objętości dystrybucji), który wynosił średnio 1.38 ± 0.24 .

Chorzy leczeni epoetyną otrzymywali żelazo, kwas foliowy i witaminę C według ogólnie przyjętych zasad. Wszyscy chorzy w czasie, gdy przeprowadzono badania byli w dobrym stanie ogólnym. Nie stwierdzano u nich przewlekłych krwawień, chorób infekcyjnych i innych współistniejących chorób w przebiegu, których mogłoby dojść do nasilenia niedokrwistości i ewidentnych zmian w układzie białokrwinkowym. Do podstawowych grup leków, jakie otrzymywali, należały leki hipotensyjne, moczopędne, preparaty wapnia i witaminy D. Dawki przewlekle przyjmowanych leków podlegały zmianom w zależności od sytuacji klinicznej.

75% wszystkich pacjentów z PNN miało zdiagnozowane nadciśnienie tętnicze, 45% – cukrzycę, która w przypadku 23% wszystkich pacjentów była pierwotną przyczyną PNN. U 33% pacjentów przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek leżało u podstaw choroby, nefropatia nadciśnieniowa – u 13%.

3.2. Izolacja komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej od osób zdrowych i chorych na PNN

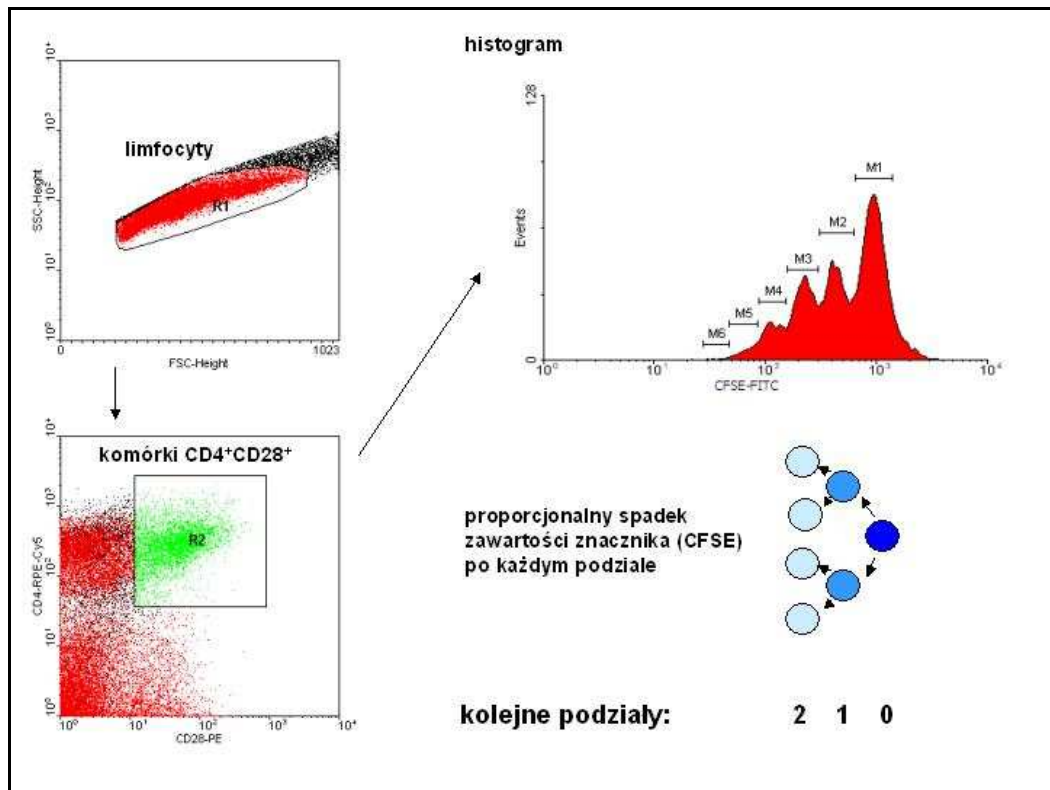
Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (monocyty i limfocyty), tzw. PBMC (ang. *peripheral blood mononuclear cell*) izolowano z krwi żyłnej pobranej na EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy, POCh „Chemia”, Gliwice) jałowo metodą wirowania na gradiencie płynu do izolacji limfocytów (HistopaqueTM 1077, Sigma Chemical Co., USA). Uzyskane w ten sposób komórki (limfocyty i monocyty), opłukane z płynu izolacyjnego, zawieszano w jałowym, kompletnym środowisku hodowlanym złożonym z 90% RPMI-1640 MEDIUM (Sigma Chemical Co., USA), 10% wołowej surowicy płodowej (Sigma Chemical Co., USA), 2 mM L-glutaminy (Sigma Chemical Co., USA) oraz antybiotyków: 10 U/ml penicyliny i 10 µg/ml streptomycyny (Sigma Chemical Co., USA). Komórki liczono przy użyciu kamery hematologicznej Bürkera oraz oceniano żywotność komórek przy użyciu metody barwienia błękitem trypanu (Sigma Chemical Co., USA).

Tak przygotowane komórki były hodowane w obecności stymulatorów (przeciwciała anti-CD3 oraz jego kombinacji z przeciwciałem anti-CD28) w celu oceny proliferacji limfocytów CD4⁺ oraz poziomu ekspresji antygenu kostymulującego CD28 oraz wybranych antygenów aktywacyjnych metodą cytometrii przepływowej. Ponadto, w przypadku wybranych pacjentów 2 mln komórek zostało zamrożone w ciekłym azocie i przeniesione do temperatury -80°C celem późniejszej izolacji mRNA.

3.3. Zakładanie hodowli komórkowych

Metoda określana mianem DCT (*Dividing Cell Tracking*) została opracowana parę lat temu w celu oceny proliferacji limfocytów przy pomocy cytometrii przepływowej (Hasbold, 1999). Umożliwia ona śledzenie podziałów komórkowych za pomocą barwnika fluorescencyjnego CFSE (ang. *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*), który jest trwale wiązany przez białka znajdujące się w cytoplazmie i w czasie każdego podziału jest rozdzielany równomiernie do komórek potomnych. Pozwala to zaobserwować liczbę podziałów komórkowych, liczbę komórek prekursorowych, które odpowiedziały na

stymulację, czas trwania pojedynczego cyklu komórkowego jak również czas przejścia limfocytów T spoczynkowych z fazy G_0 do aktywnej fazy G_1 cyklu komórkowego (Hasbold, 1999) (Ryc. 8). Zaletą tej metody jest możliwość równoczesnej analizy fenotypu powierzchniowego dzielących się komórek, jak i tempa podziału poszczególnych subpopulacji komórkowych (Hasbold, 1999).



Rycina 8. Ilościowe oznaczenie komórek proliferujących za pomocą metody DCT. Histogram przedstawia komórki CD4⁺CD28⁺ barwione za pomocą CFSE po 72 godzinach stymulacji mitogenowej. Komórki, które się nie podzieliły stanowią pierwszy pik oznaczony jako M1 (pokolenie 0). Kolejne piki (M2, M3 itd.) stanowią kolejne pokolenia komórek, które uległy podziałom.

Sterylnie, 24-dołkowe, hodowlane płytki plastikowe (24 Well Cell Culture Cluster, Corning Incorporated, USA), pokrywano przeciwciałem anti-CD3 (stężenie wyjściowe 1mg/ml, BD-Pharmingen, USA) w stężeniu 1 µg/ml/2 mln komórek (250 ng/dołek) i pozostawiano na 24 godziny w temperaturze 4°C w celu związania przeciwciała z powierzchnią plastiku (tzw. immobilizacja). Po tym czasie nadmiar przeciwciała

usuwano, a dołki przepłukiwano buforowaną fosforanami solą fizjologiczną (PBS, Biomed, Lublin). Tak przygotowane płytki były używane do hodowli PBMC.

Komórki PBMC w ilości 12 milionów w 1 ml jałowego kompletnego środowiska hodowlanego z 0.5% wołową surowicą płodową inkubowane przez 15 minut w ciemnościach, w temperaturze 37°C z 2µM CFSE (Sigma Chemical Co., USA) zawieszano w kompletnym środowisku hodowlanym i nanoszono do dołków w płytkach hodowlanych uprzednio opłaszczonych przeciwciałem anti-CD3 oraz do dołków nie opłaszczonych traktowanych jako kontrola, w ilości 2 x 10⁶/dołek. Część komórek poddawana była stymulacji kombinacją przeciwciała anti-CD3 z przeciwciałem anti-CD28 w stężeniu 125 ng/1 ml/2 mln komórek (stężenie wyjściowe 1mg/ml, BD-Pharmingen, USA). Komórki inkubowano w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂ o 100% wilgotności. Hodowla prowadzona była przez 5 dni (120 godzin) a komórki pobierano z płytki po 72 i 120 godzinach, płukano w PBS, liczono, a następnie oceniano parametry cyklu komórkowego i fenotyp powierzchniowy limfocytów T metodą cytometrii przepływowej (DCT). Obliczenia dotyczące parametrów proliferacji na podstawie danych wykonywano programem Progeny[®] 16.3 (autor J.M. Witkowski, AM Gdańsk). W celu odróżnienia populacji proliferujących limfocytów umożliwiającego ich dalszą analizę, po zakończeniu hodowli zawiesinę komórek znakowanych CFSE barwiono zewnątrzkomórkowo odpowiednimi kombinacjami przeciwciał: RPE-Cy5/anti-CD4 (DAKO, Dania), PE/anti-CD28 (DAKO, Dania; BD-Pharmingen, USA), PE/anti-CD25 (DAKO, Dania), PE/anti-CD40L (BD-Pharmingen, USA) oraz PE/anti-CD69 (BD-Pharmingen, USA) i poddawano analizie cytometrycznej.

3.4. Izolacja komórek CD4⁺ metodą kolumnowej negatywnej selekcji magnetycznej (Miltenyi Biotec MACS, CD4⁺ T Cell Isolation Kit)

Izolacja limfocytów CD4⁺ prowadzona była po izolacji PBMC. Komórki oczyszczane były metodą kolumnowej negatywnej selekcji magnetycznej (za pomocą separatora kolumnowego MACS, USA). Czystość populacji uzyskanych w ten sposób komórek CD4⁺ oscylowała pomiędzy 90-96% (ocena cytometryczna). Badano również żywotność komórek metodą barwienia błękitem trypanu, która podobnie jak w przypadku

świeżo izolowanych komórek PBMC wynosiła zawsze powyżej 95%. Na komórkach CD4⁺, pochodzących z PBMC (*ex vivo*, bez hodowli) wykonano doświadczenia celem wykrycia ekspresji genu kodującego EPO-R.

Metoda negatywnej selekcji magnetycznej polega na bezpośrednim wyizolowaniu komórek CD4⁺ pochodzących z ludzkich PBMC. Pozostałe komórki, takie jak limfocyty B, komórki CD8⁺, monocyty, komórki NK, komórki dendrytyczne, są magnetycznie usuwane przy użyciu mieszaniny przeciwciał (odpowiednio anty-CD19, anty-CD8, anty-CD16, anty-CD56, anty-CD11b, CD4 T Cell Hapten-Antibody Cocktail, Miltenyi Biotec MACS, USA), z którymi łączą się tzw. ziarna magnetyczne (CD4 T Cell Anti-Hapten MicroBeads, Miltenyi Biotec MACS, USA), co powoduje, że tak wyznakowane komórki są zatrzymywane w siatce ferromagnetycznej na kolumnie w przyłożonym zewnętrznym polu magnetycznym.

Po wyizolowaniu PBMC z krwi obwodowej osad z 1×10^7 komórek zawieszono w buforze do izolacji: PBS (Biomed, Lublin), 0.5% albumina wołowa (Sigma Chemical Co., USA) i 2 mM EDTA. Następnie dodano mieszaninę przeciwciał (CD4 T Cell Hapten-Antibody Cocktail, Miltenyi Biotec, USA) i inkubowano przez 10 minut w temp. 6-12°C. Po wypłukaniu i odwirowaniu komórek, do zawiesiny dodano ziarna magnetyczne (CD4 T Cell Anti-Hapten MicroBeads, Miltenyi Biotec, USA) i ponownie inkubowano 15 minut w temp. 6-12°C. Wypłukane i odwirowane komórki zawieszono w buforze do izolacji a następnie nanoszono na uprzednio przygotowaną kolumnę. Zbierano eluat jako negatywną frakcję reprezentującą komórki CD4⁺. Komórki policzono oraz wypłukano. Następnie część z nich została użyta do cytometrycznego oznaczenia powierzchniowego przeciwciałami monoklonalnymi celem sprawdzenia czystości zebranych komórek CD4⁺, natomiast resztę komórek, po usunięciu supernatantu, poddano głębokiemu mrożeniu w temperaturze -80°C celem izolacji mRNA.

3.5. Cytometria przepływowa

Cechy fenotypowe limfocytów oraz proliferacja komórek CD4⁺ były oceniane cytometrycznie. Cytometria przepływowa jest metodą półilościową, która polega na zautomatyzowanym pomiarze rozproszenia światła oraz intensywności wzbudzonej

fluorescencji znacznika oddzielnie dla każdej z badanych komórek. W ten sposób jest możliwe określenie, zarówno poziomu ekspresji antygenów, jak i proporcji liczebności subpopulacji komórek. Ponadto dzięki metodzie DCT (opisanej w rozdziale 3.3) możliwa jest również ocena parametrów proliferacyjnych limfocytów stymulowanych mitogenami. Rozmieszczenie określonej cechy wśród badanych komórek można wyrazić w analizie poprzez wykres funkcyjny, tzw. histogram, gdzie na osi odciętych wyrażona jest wielkość danej cechy (zwykle jako intensywność fluorescencji wyrażona w skali logarytmicznej), natomiast na osi rzędnych zaznaczona jest liczba badanych cząsteczek, lub w postaci dwuwymiarowych wykresów punktowych (dot-plot), w których każdej komórce odpowiada punkt umieszczony w miejscu wykresu, którego współrzędne odpowiadają wartościom dwóch lub trzech badanych parametrów.

3.5.1. Ocena proliferacji i ekspresji antygenów powierzchniowych limfocytów CD4⁺ po hodowli ze stymulatorami

Komórki PBMC po hodowli z przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28 z barwnikiem przeżyciowym CFSE (Rozdział 3.3) płukano dwukrotnie w PBS poprzez wirowanie przez 7 minut przy 1300 obr./min. (wirówka Eppendorf Centrifuge 5810R). Próbkę do znakowania przeciwciałami stanowiło 200 tys. komórek zawieszonych w 100 µl PBS w probówkach cytometrycznych (Falcon, Becton Dickinson, USA). Komórki inkubowano przez 30 minut na lodzie, w ciemności z przeciwciałami: RPE-Cy5/anty-CD4 (DAKO, Dania), PE/anty-CD28 (DAKO, Dania), PE/anty-CD25 (DAKO, Dania), PE/anty-CD40L (BD-Pharmingen, USA) oraz PE/anty-CD69 (BD-Pharmingen, USA) w ilości 5 µl na próbkę, w celu określenia cech fenotypowych i oceny zmian ekspresji antygenów w wyniku stymulacji. Po upływie 30 minut komórki płukano w 3 ml PBS poprzez wirowanie przy 1300 obr./min. przez 7 minut (wirówka Eppendorf Centrifuge 5810R), zawieszano w PBS i przechowywano na lodzie do momentu analizy cytometrycznej.

3.5.2. Ocena procentowa głównych subpopulacji limfocytów *ex vivo*

Cytometryczne oznaczanie subpopulacji limfocytów *ex vivo* przeprowadzano na krwi żyłnej pobranej na EDTA. Próbkę badaną stanowiło ok. 200-300 tysięcy komórek (100 µl pełnej krwi). Komórki inkubowano przez 20 minut, w ciemnościach w obecności przeciwciał FITC/anty-CD3, RPE-Cy5/anty-CD4 (DAKO, Dania), PE/anty-CD28, PE/anty-CD25, PE/anty-CD69, PE/anty-CD95, FITC/CD3 + PE/anty-HLA-DR (BD-Pharmingen, USA) w ilości 5 µl przeciwciała na próbkę. Jako kontrolę izotypową używano mieszaninę przeciwciał sprzężonych z fluorochromami mysich immunoglobulin bez swoistości antygenowej (FITC/IgG1 + PE/IgG2A + RPE-Cy5/IgG1, DAKO, Dania) również w ilości 5 µl na próbkę.

Po inkubacji przeprowadzano lizę erytrocytów przez 15 minut, w temperaturze pokojowej za pomocą 2 ml roztworu do lizy (0.83 g NH₄Cl, 0.1 g KHCO₃ w 100 ml wody destylowanej). Po tym czasie próbki odwirowywano przy 2000 obr./min. i usuwano dokładnie supernatant. Następnie komórki płukano za pomocą roztworu PBS (100 ml PBS – roztworu macierzystego: 14.24 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 2.76 g NaH₂PO₄ x H₂O, 87.60 g NaCl, 2 g NaN₃ w 1 l wody destylowanej, 2 g albuminy wołowej, uzupełnione do 1 l wodą destylowaną) poprzez wirowanie przez 5 minut przy 2000 obr./min. Komórki zawieszano w PBS i przechowywano na lodzie do momentu analizy cytometrycznej.

3.5.3. Ocena ekspresji receptora dla erytropoetyny na limfocytach i monocytach *ex vivo*

Ocenę cytometryczną poziomu receptora dla EPO dokonywano również *ex vivo* na krwi żyłnej pobranej na EDTA. Przed barwieniem komórki (w ilości ok. 200 tysięcy na próbkę) były dwukrotnie płukane za pomocą roztworu PBS poprzez wirowanie przez 5 minut z prędkością 2000 obr./min. Następnie komórki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut w obecności 2 µg endobuliny w celu zablokowania łańcucha Fc (Baxter AG, Austria), do którego mogłoby się niespecyficznie wiązać przeciwciało anty-EpoR. Tak przygotowane komórki inkubowano potem przez 40 minut, na lodzie, w ciemnościach w obecności przeciwciał w następujących kombinacjach:

- RPE-Cy5/anty-CD4 (DAKO, Dania);
- RPE-Cy5/anty-CD4 + PE/anty-EpoR (R&D Systems, Niemcy);
- RPE-Cy5/anty-CD8 (DAKO, Dania);
- RPE-Cy5/anty-CD8 + PE/anty-EpoR;
- RPE-Cy5/anty-CD19 (DAKO, Dania);
- RPE-Cy5/anty-CD19 + PE/anty-EpoR;
- PE-Cy5/anty-CD14 (ImmunoTools, Niemcy);
- PE-Cy5/anty-CD14 + PE/anty-EpoR.

Przeciwciała RPE-Cy5/anty-CD4, RPE-Cy5/anty-CD8, RPE-Cy5/anty-CD19, RPE-Cy5/anty-CD14, PE-Cy5/anty-CD14 podawane były w ilości 5 μ l na próbkę. Tymczasem przeciwciało anty-EpoR podane było w ilości 10 μ l przeciwciała na próbkę, zgodnie z zaleceniem producenta (R&D Systems, Niemcy).

Po inkubacji z przeciwciałami krew poddano lizie w sposób opisany w rozdziale 3.5.2. Tak przygotowane próbki były analizowane metodą ilościowej cytometrii przepływowej z użyciem zestawu ziaren kalibracyjnych z różnymi, ściśle określonymi ilościami cząsteczek fikoerytryny (PE) na powierzchni (QuantiBrite™, BD Biosciences, Kanada).

3.5.4. Pomiary cytometryczne i analiza wyników

Ekspresję powierzchniową antygenów badano metodą cytometrii przepływowej używając cytometru FACScan (Becton Dickinson, USA) w Zakładzie Fizjopatologii Akademii Medycznej w Gdańsku, dzięki uprzejmości profesora J. M. Witkowskiego. Dane dla próbek zbierano z:

- 30 tysięcy PBMC po hodowli z CFSE;
- 10 tysięcy komórek z pełnej krwi w przypadku oceny procentowej głównych subpopulacji limfocytów *ex vivo*;
- 300 tysięcy komórek dla oceny ekspresji receptora dla EPO *ex vivo*.

Wyniki analizowano z użyciem programu komputerowego WinMDI w. 2.9 (J. Trotter, The Scripps Research Institute, USA) oraz oprogramowania CellQuest (Becton Dickinson, USA). Programy te umożliwiają ocenę odsetka komórek różniących się fenotypem oraz graficzne przedstawienie dystrybucji znakowanych komórek.

Obliczenia dotyczące parametrów proliferacji (procent komórek dzielących się, długość czasu $G_0 \rightarrow G_1$, na podstawie uzyskanych danych wykonywano za pomocą programu Progeny[®] 16.3 autorstwa prof. Jacka Witkowskiego (Katedra i Zakład Fizjopatologii Akademii Medycznej w Gdańsku).

Obliczenia dotyczące ilości receptora dla EPO na limfocytach i monocytach wykonywano z użyciem programu wchodzącego w skład zestawu ziaren kalibracyjnych QuantiBrite™ (BD Biosciences, Kanada) wykorzystującego oprogramowanie CellQuest i QuantiCALC™ (Becton Dickinson, USA).

3.6. Wykrywanie mRNA genu *EPO-R* techniką łańcuchowej reakcji polimerazy (RT-PCR)

Izolacja matrycowego RNA (mRNA – *messenger RNA*) oraz reakcja RT-PCR była przeprowadzana celem wykrycia genu receptora dla erytropoetyny (*EPO-R*) w PBMC (limfocytach i monocytach) oraz limfocytach CD4⁺. W celu odnalezienia sekwencji genu przeszukano bazę danych GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

3.6.1 Izolacja RNA

Ze wszystkich zamrożonych porcji komórek (2 mln) izolowano całkowite RNA za pomocą odczynnika TRI-REAGENT (Sigma Chemical, Co., USA) zgodnie z protokołem producenta.

Po odwirowaniu próbek (wirówka Sigma 2K15) z szybkością 2500 obr./min. przez 3 minuty dodawano 1 ml odczynnika TRI-REAGENT do każdej próbki i inkubowano wytrząsając w temperaturze pokojowej przez 5 min. Następnie dodawano 200 μ l chloroformizoalkoholu (Sigma Chemical Co., USA). W międzyczasie przygotowywano nowe próbki z 500 μ l izopropanolu (Sigma Chemical, Co., USA), które przechowywano w temp. -20°C. Po zwirowaniu próbek (szybkość 13000 obr./min. przez 30 minut), zebrano czystą wodną warstwę górną zawierającą RNA wolne od białka oraz

DNA i przeniesiono do próbek z przygotowanym wcześniej izopropanolem i umieszczono w temperaturze -80°C przez noc.

Po 24 godzinach próbki zwirowano (13000 obr./min. przez 30 minut w temp. 4°C) celem zebrania kondensatu RNA. Po czym usunięto supernatant a do pozostałego na dnie osadu RNA dodano 1 ml 75% alkoholu etylowego (POCh „Chemia”, Gliwice) i energicznie mieszano w celu oczyszczenia materiału genetycznego. Próbki odwirowano (13000 obr./min. przez 10 minut w temp. 4°C) i usunięto supernatant powtarzając powyższą procedurę. Tak wyflukane próbki wysuszono przy użyciu wirówki próżniowej (JW Electronic, Polska) w temp. 30°C przez 15 min.

Stężenie uzyskanego RNA oceniano na podstawie stosunku gęstości optycznych przy długościach fali 260 nm i 280 nm przy użyciu spektrofotometru (BioPhotometer, Eppendorf, USA).

3.6.2. Odwrotna transkrypcja

Przy użyciu matrycowego RNA, uzyskanego jak w pkt. 3.6.1., przeprowadzano reakcję syntezy komplementarnego DNA (ang. *complementary DNA* – cDNA) standardową techniką odwrotnej transkrypcji, stosując zestawy: ImProm-II™ Reverse Transcription System i PCR Core System II firmy Promega.

Pierwszy etap syntezy cDNA to łączenie matrycowego RNA (stężenie końcowe ok. $0.02\ \mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ mieszaniny reakcyjnej) i primera cDNA oligo-dT w stężeniu końcowym $0.5\ \mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ mieszaniny (stężenie wyjściowe $500\ \mu\text{g}/\text{ml}$, Promega, USA). Probówki umieszczano w rozgrzanym do 70°C płaszczu grzewczym (Thermo Block TDB-120, Biosan, Łotwa) na 5 min. i po tym czasie natychmiast schładzano na lodzie przez kolejne 5 min. Następnie próbki wirowano przez 10 sekund, aby zebrać kondensat. Probki trzymane na lodzie do momentu dodania mieszaniny z odwrotną transkryptazą.

Drugi etap reakcji to odwrotna transkrypcja przeprowadzana przy użyciu enzymu odwrotnej transkryptazy ($100\ \mu\text{l}$, Promega, USA) w obecności inhibitora rybonukleazy (RNasin® o stężeniu $40\ \text{u}/\mu\text{l}$, Promega, USA), mieszaniny nukleotydów (dNTP o stężeniu

10 mM każdy rodzaj nukleotydów, Promega, USA), jonów chlorku magnezu ($MgCl_2$ stężeniu 25 mM, Promega, USA), buforu do reakcji (ImProm-II™ Bufor Reakcyjny 5 x stężony, Promega, USA) oraz wody wolnej od nukleaz (Promega, USA). Końcowe stężenie poszczególnych odczynników w 15 μ l mieszaniny reakcyjnej wynosiło:

- 6 mM $MgCl_2$;
- 1 x stężony bufor do reakcji;
- 0.5 mM każdy rodzaj nukleotydów w mieszaninie dNTP;
- 20 u/15 μ l inhibitora rybonukleazy;
- 0.5 μ l/15 μ l odwrotnej transkryptazy.

Przygotowane wcześniej próbki z matrycą RNA (stężenie ok. 2 μ g/5 μ l) i primerem cDNA oligo-dT mieszano z mieszaniną do syntezy cDNA a następnie umieszczano w bloku grzewczym w temperaturze 25°C na 5 min. Etap zwany wydłużaniem odbywał się w temp. 42°C przez 60 min. Na końcu próbki inkubowano 15 min. w temperaturze 70°C, aby inaktywować odwrotną transkryptazę. Otrzymane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania łańcuchowej reakcji polimerazy.

3.6.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Łańcuchową reakcję polimerazy (ang. *polimerase chain reaction* – PCR) ze starterami dla genu kodującego receptor dla EPO (*EPO-R*) przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler Personal (Eppendorf, USA).

Sekwencje starterów dla genu *EPO-R* zostały zaprojektowane za pomocą programu Primer3 Input (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Swoistość starterów dla ludzkich genów została potwierdzona za pomocą programu NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). W przypadku genu β -aktyny zastosowano parę starterów oferowanych przez firmę Promega.

Startery użyte w reakcji PCR zostały podane w Tabeli 6.

Tabela 6. Charakterystyka zastosowanych starterów oraz wielkości spodziewanych produktów.

Gen	Sekwencje starterów	Długość produktu (par y zasad)
<i>EPO-R (1)</i>	S 5'-GAGCATGCCAGGATACCTA-3' A 5'-TACTCAAAGCTGGCAGCAGA-3' (DNA-Gdansk II, Gdańsk)	194
<i>EPO-R (2)</i>	S 5'-CTCATCCTCGTGGTCATCCT-3' A 5'-TACTCAAAGCTGGCAGCAGA-3' (DNA-Gdansk II, Gdańsk)	508
β -AKTYNA	S 5'-CACCTTCACCGTTCCAGTTT-3' A 5'-GTCCACCTTCCAGCAGATGT-3' (Promega, USA)	256

S – sekwencja sensowna, A – sekwencja antysensowna

Reakcję przeprowadzono z użyciem następujących odczynników: buforu do reakcji (Bufor Reakcyjny 10 x stężony, bez MgCl₂, Promega, USA), jonów chlorku magnezu (MgCl₂ o stężeniu 25 mM, Promega, USA), mieszaniny nukleotydów (dNTP, o stężeniu 10 mM każdy rodzaj nukleotydów, Promega, USA), termostabilnej polimerazy Taq (o stężeniu 5 u/μl, Promega, USA) oraz wody wolnej od nukleaz (Promega, USA), które zmieszano z uzyskanym cDNA oraz primerami. Końcowe stężenie poszczególnych odczynników w 50 μl mieszaniny reakcyjnej wynosiło:

- 1.5 mM MgCl₂;
- 1 x stężony bufor do reakcji;
- 0.2 mM każdy rodzaj nukleotydów w mieszaninie dNTP;
- 1.25 u/50μl polimerazy Taq;
- 1 μM każdy z primerów;
- ok. 0.4 μg/50μl cDNA.

Ostatecznie stosowano następujące warunki reakcji

- wstępna denaturacja w temp. 94°C przez 10 minut;
- 35 cykli, na które składały się: 30 sekund denaturacji w temp. 94°C, 30 sekund przyłączania w temp. 59°C, 30 sekund wydłużania w temp. 72°C;

– terminacja reakcji w temperaturze 72°C przez 10 min.

Próbki przechowywano w 4°C.

3.6.4. Rozdział produktów PCR

Do oceny produktów RT-PCR zastosowano metodę rozdzielania elektroforetycznego w 1.6 % żelu agarozowym (agaroz – Sigma Chemical Co., USA) z bromkiem etydyny (2 µl 10mg/ml, Sigma Chemical Co., USA) z buforem 5% TBE (54 g Tris – Bio-Rad Laboratories, Niemcy; 27.5 g kwas borowy – POCh „Chemia”, Gliwice; 0.5 M EDTA – POCh „Chemia”, Gliwice; w 1 litrze wody destylowanej, pH=8.3).

Przed umieszczeniem na żelu do próbek zostało dodane 2 µl buforu obciążającego (Sigma Chemical Co., USA). Próbki nanoszono w ilości 12 µl na studzienkę. Równocześnie prowadzono rozdzielanie wzorca masowego 50-3000 bp (Sigma Chemical Co., USA). Elektroforetyczny rozdzielanie produktów było prowadzone w aparacie do elektroforezy SUBMINI (Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne, Polska), przy stałym napięciu 90 V przez 1.5 godziny. Po przeprowadzeniu elektroforezy fluorescencja substratu była indukowana światłem UV i zbierana w aparacie do archiwizacji żeli GDS-8000 System (UVP BioImaging System, Wielka Brytania). Uzyskane obrazy były zapisywane komputerowo w formie cyfrowej.

3.7. Obliczenia statystyczne

Analiza statystyczna była przeprowadzana z pomocą programu Statistica 7.1. (StatSoft, Inc., USA), w którym wyliczono średnie statystyczne dla badanych grup, odchylenia standardowe, mediany. Założenia o normalności rozkładu sprawdzano przy pomocy testów: Kołmogorowa-Smirnova z poprawką Lillieforsa i Shapiro-Wilka. Założenie jednorodności wariancji sprawdzano testem F i testem Levene'a. W przypadku zmiennych mających rozkład normalny, grupy porównywano testem T Studenta dla prób niezależnych a w przypadku odstępstw od założenia o normalności rozkładu stosowano test U Manna-Whitneya.

Obliczenia dotyczące ilości receptora dla EPO na limfocytach i monocytach wykonywano z użyciem programu wchodzącego w skład zestawu ziaren kalibracyjnych QuantiBrite™ (BD Biosciences, Kanada) wykorzystującego oprogramowanie CellQuest i QuantiCALC™ (Becton Dickinson, USA).

Ryciny były tworzone z użyciem programu Statistica 7.1. oraz arkusza kalkulacyjnego Exel (Microsoft Corporation).

4. KRYTYCZNA OCENA MATERIAŁU I METOD

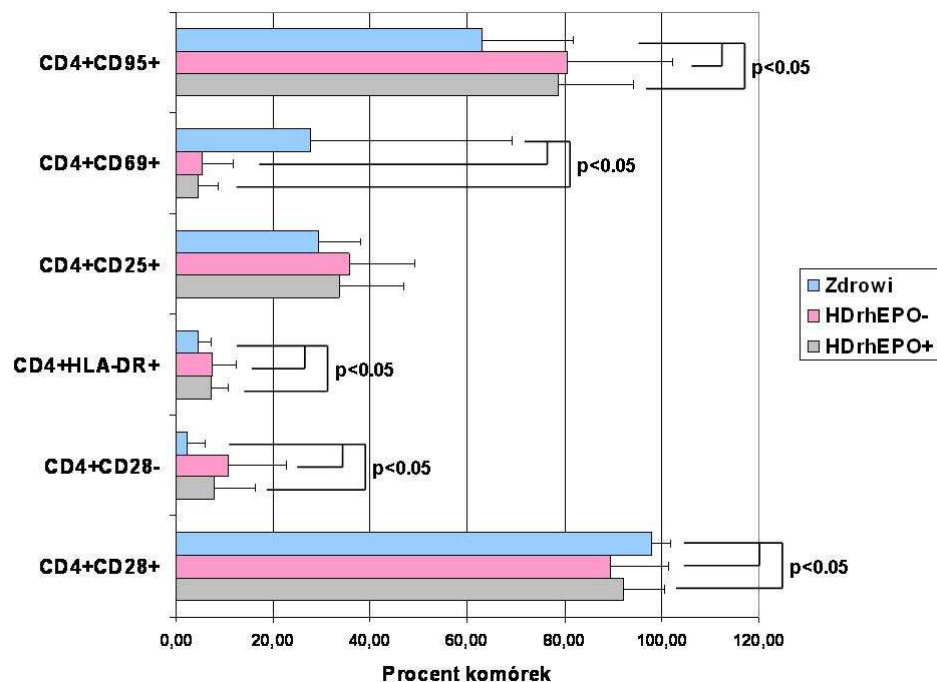
1. Wszystkie badane grupy chorych (I i II cykl badań) nie były jednorodne pod kątem etiologii przewlekłej niewydolności nerek. Wyselekcjonowanie pacjentów z populacji chorych HD do tych grup sprawiało dużo trudności. Ze względu na założenia pracy zostały jednak wykluczone osoby, u których przyczyną PNN były: wtórne kłębuszkowe zapalenia nerek lub choroby rozrostowe układu chłonnego, np. gammadopatie monoklonalne lub szpiczak mnogi.
2. Wszystkie badane grupy chorych (I i II cykl badań) nie były jednorodne pod względem czasu dializoterapii. Przy obecnych standardach leczenia niedokrwistości pacjenci hemodializowani nieleczeni epoetyną stanowią mało liczną grupę. Stąd różnica w czasie HD pomiędzy pacjentami leczonymi a nieleczonymi tym hormonem. Trudność zebrania grupy pacjentów hemodializowanych nieleczonych epoetyną a także duży koszt badań były głównym powodem tego, że grupy te są mało liczne.
3. Badania nie były prospektywne i dotyczyły różnych chorych. Wyróżniono grupę pacjentów nieleczonych epoetyną oraz grupę chorych leczonych epoetyną od paru miesięcy a wyniki porównywano do grupy kontrolnej.
4. Badania I i II cyklu były przeprowadzone w oddzielnych grupach chorych w różnym czasie. Taki układ pracy wynika z faktu, że głównym celem pracy były oznaczenia fenotypowe i proliferacyjne limfocytów T. Uzyskane jednak w I cyklu badań wyniki pozwoliły na postawienie tezy o obecności receptora dla EPO na komórkach układu immunologicznego i skłoniły do przeprowadzenia badań cyklu II. Grupy w tym cyklu badań są mniej liczne, co wynika między innymi z trudności zebrania grupy pacjentów hemodializowanych nieleczonych epoetyną oraz wysokich cen przeciwciał monoklonalnych użytych do oznaczeń cytometrycznych.
5. Oznaczanie stężenia EPO w grupach chorych i zdrowych pod kątem zależności stężenia tego hormonu z liczbą EPO-R być może byłoby dodatkowym

potwierdzeniem, że taki związek istnieje. Należy jednak pamiętać, że stężenia EPO w PNN mogą wahać się w bardzo szerokich granicach i mogą też przekraczać wartości „prawidłowe”, tzw. spoczynkowe (4-30 mU/ml) (Więcek, 2001). Związek liniowy pomiędzy stężeniem hemoglobiny a EPO u ludzi ze zdrowymi nerkami pojawia się dopiero, gdy stężenie hemoglobiny spada poniżej 10.5 g/dl (Jelkmann, 2000). Uważano zatem, że oznaczanie stężenia EPO na potrzeby tej pracy wykonanej w mało licznych grupach chorych mogłoby doprowadzić do błędnych wniosków co do zależności pomiędzy stężeniem EPO a liczbą EPO-R. Wskazane jest opracowanie dodatkowego modelu badań, aby te zależności potwierdzić.

5. WYNIKI

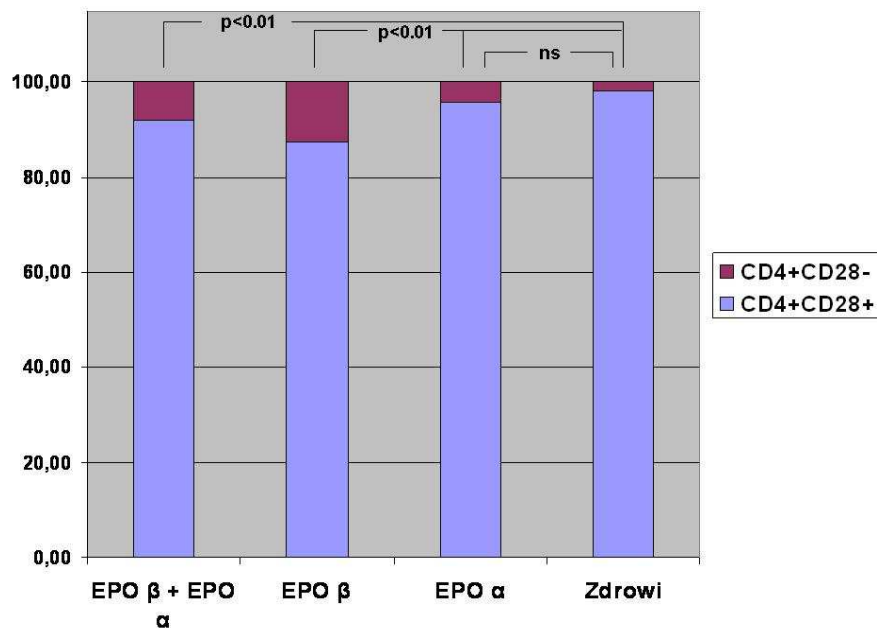
5.1. Cytometryczna ocena składu procentowego głównych populacji CD4⁺ *ex vivo* u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek

Porównanie głównych subpopulacji komórek CD4⁺ ze szczególnym uwzględnieniem markerów aktywacji *ex vivo* wykazało, że wszyscy pacjenci z PNN charakteryzują się podwyższonym odsetkiem komórek CD4⁺CD95⁺, podczas gdy odsetek komórek CD4⁺CD69⁺ jest niższy niż u osób zdrowych (Ryc. 9). Odsetek komórek CD4⁺HLA-DR⁺ również się różnił istotnie między pacjentami hemodializowanymi i osobami zdrowymi i wynosił: 7.42 ± 4.92 % dla grupy hemodializowanych nieleczonych epoetyną (HDrhEPO-), 7.20 ± 3.42 % dla pacjentów hemodializowanych leczonych epoetyną (HDrhEPO+) i 4.64 ± 2.60 dla zdrowej kontroli (p<0.05).

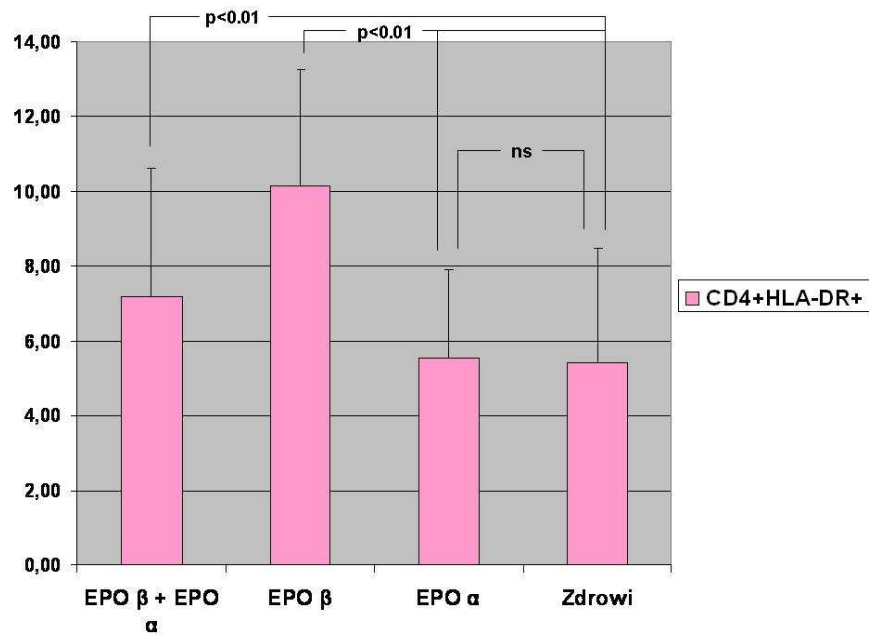


Rycina 9. Porównanie odsetka głównych populacji komórek CD4⁺ z uwzględnieniem antygenów aktywacyjnych oraz kostymulującego antygeny CD28 u 20 osób zdrowych, 24 pacjentów hemodializowanych nieleczonych rhEPO (HDrhEPO-) oraz 19 pacjentów hemodializowanych leczonych rhEPO (HDrhEPO+), test T Studenta dla prób niezależnych.

Kolejna różnica pomiędzy pacjentami a osobami zdrowymi dotyczyła odsetka limfocytów $CD4^+$ wykazujących powierzchniową ekspresję antygenu kostymulującego CD28. Wszyscy pacjenci charakteryzowali się obniżonym odsetkiem komórek $CD4^+CD28^+$ w stosunku do osób zdrowych, który wynosił: 89.40 ± 12.01 % dla osób HDrhEPO-, 92.17 ± 8.30 % dla osób HDrhEPO+ i 97.99 ± 3.97 % dla osób zdrowych ($p < 0.05$). Spadkowi temu towarzyszył wzrost odsetka komórek $CD4^+CD28^-$. U pacjentów HDrhEPO+ zaobserwowano tendencje wzrostowe w populacji komórek $CD4^+CD28^+$, jednak różnice te wciąż były istotne statystycznie. Wykazano, że odsetek komórek $CD4^+CD28^+$ u pacjentów hemodializowanych otrzymujących epoetynę beta wynosił 87.42 ± 10.69 %, podczas gdy u pacjentów leczonych za pomocą epoetyny alfa odsetek ten nie różnił się od tego obserwowanego u osób zdrowych (95.90 ± 3.55 %) (Ryc. 10). Pacjenci hemodializowani leczeni epoetyną beta charakteryzowali się także podwyższonym odsetkiem komórek $CD4^+HLA-DR^+$ w stosunku do osób zdrowych i pacjentów leczonych epoetyną alfa (Ryc. 11).



Rycina 10. Porównanie odsetka komórek $CD4^+CD28^+/CD4^+CD28^-$ między pacjentami hemodializowanymi leczonymi dwoma rodzajami epoetyny (alfa – α , $N=11$; beta – β , $N=7$) a osobami zdrowymi, test T Studenta dla prób niezależnych.



Rycina 11. Porównanie odsetka komórek CD4⁺HLA-DR⁺ między pacjentami hemodializowanymi leczonymi dwoma rodzajami epoetyny (alfa – α , $N=11$; beta – β , $N=7$) a osobami zdrowymi, test T Studenta dla prób niezależnych.

5.2. Cytometryczna ocena fenotypu powierzchniowego limfocytów CD4⁺ u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek

Stymulacja limfocytów T przy pomocy mitogenów pozwala na sprawdzenie, jak się zmienia ich fenotyp powierzchniowy, w szczególności poziom antygenu kostymulującego CD28 oraz antygenów aktywacyjnych, takich jak CD25, CD69 czy CD40L. Wszelkie zmiany w poziomie ekspresji markerów świadczą o aktywacji komórek i ewentualnych zaburzeniach w ich funkcjonowaniu.

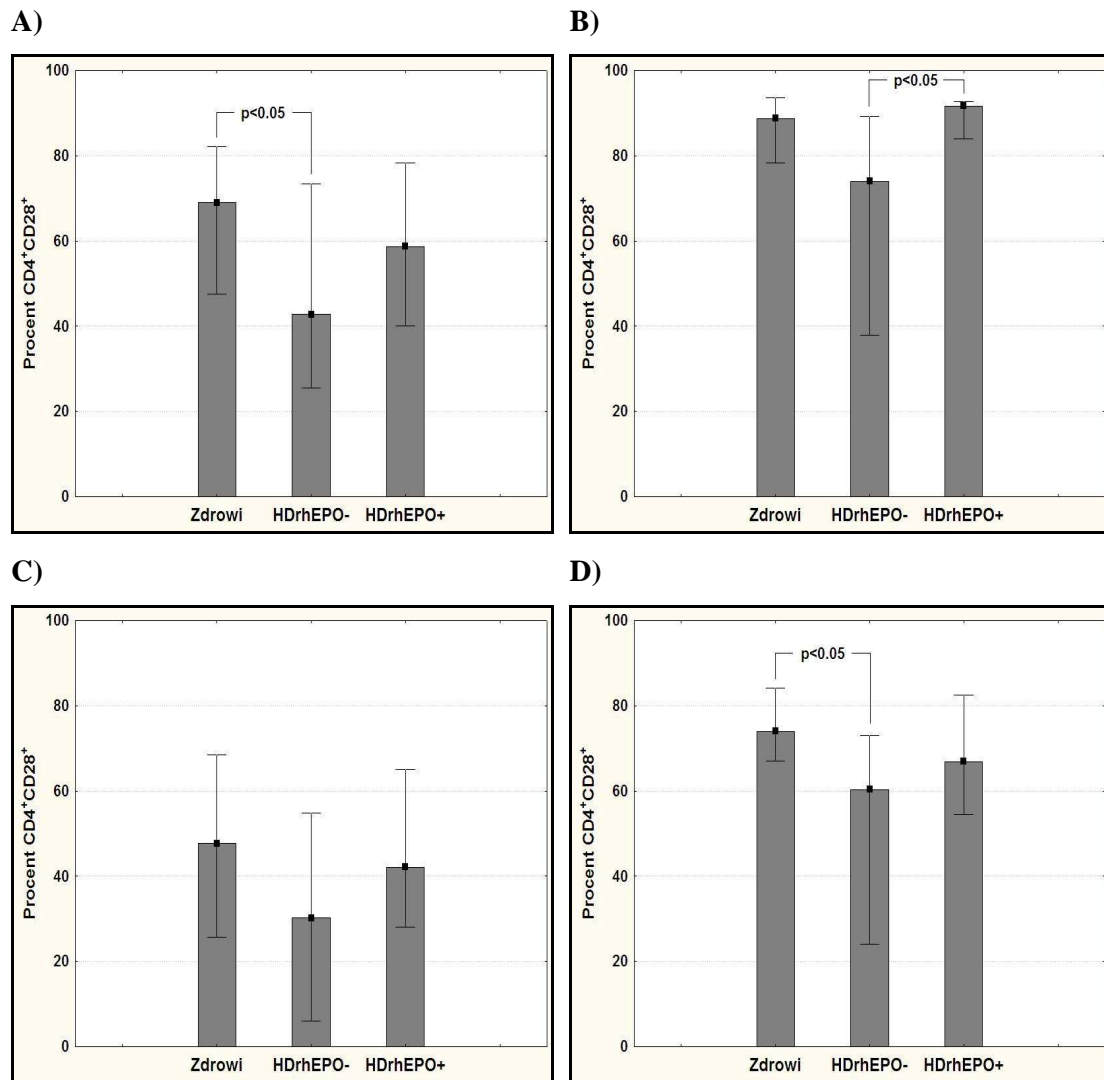
Limfocyty były stymulowane przeciwciałem anti-CD3 oraz jego mieszaniną z przeciwciałem anti-CD28 w medium hodowlanym przez okres 72 i 120 godzin. Po tym czasie dokonywano cytometrycznej oceny odsetka subpopulacji komórek CD4⁺ oraz poziomu ekspresji wybranych antygenów w wybranych grupach pacjentów.

5.2.1. Obniżona ekspresja antygenu CD28 na limfocytach CD4⁺ u pacjentów nieleczonych epoetyną

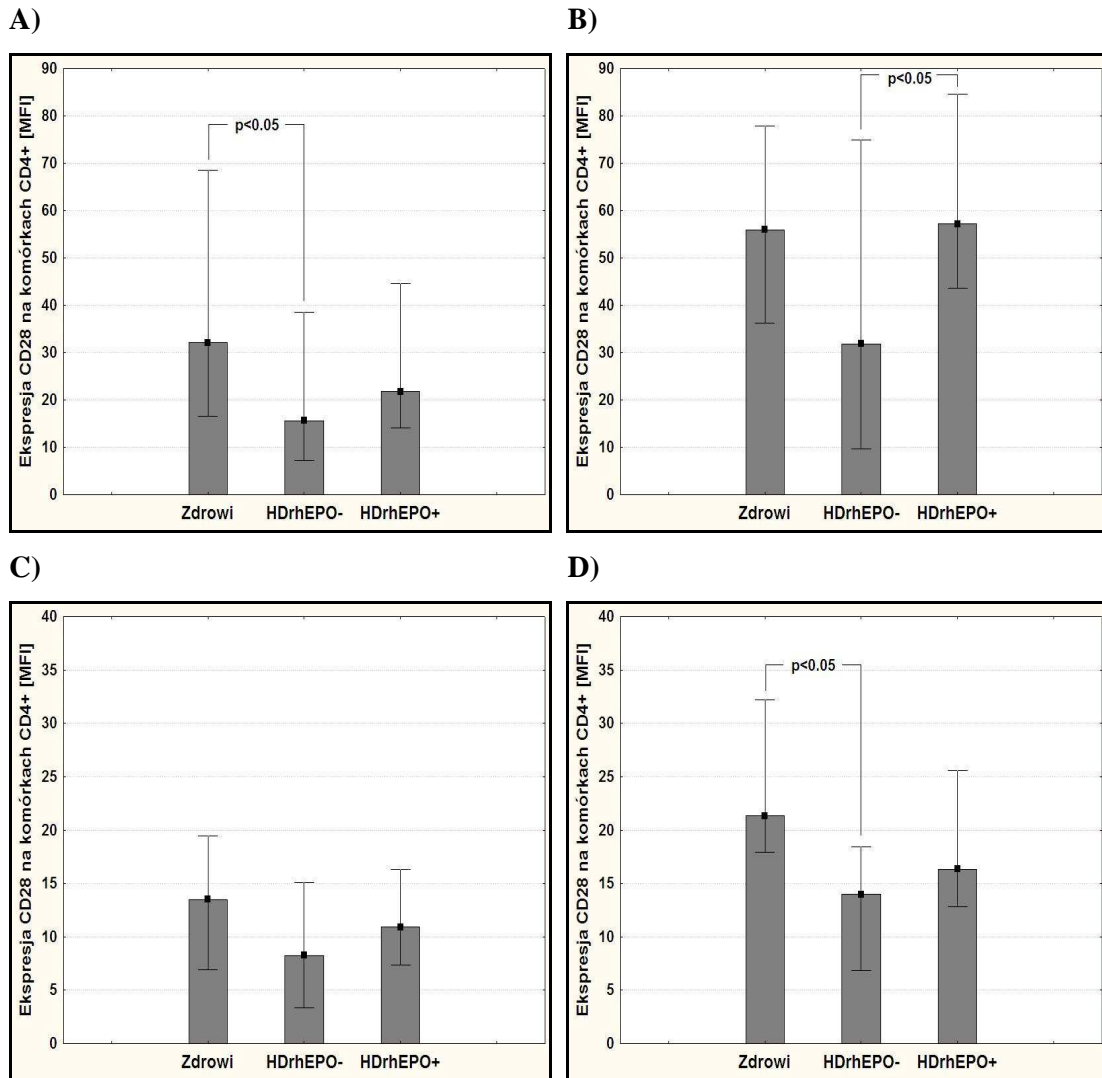
Porównanie odsetka komórek CD4⁺CD28⁺ po 72 i 120 godzinach stymulacji za pomocą przeciwciała anti-CD3 (Ryc. 12, wykres A i B) oraz jego kombinacji z przeciwciałem anti-CD28 (Ryc. 12, wykres C i D) w poszczególnych grupach chorych wykazało, że jest on niski u pacjentów HDrhEPO- w porównaniu do osób zdrowych i osób leczonych za pomocą epoetyny.

Również poziom ekspresji antygenu CD28 (oznaczanej jako średnia fluorescencja: MFI – *mean fluorescence intensity*) na komórkach CD4⁺ po 72 i 120 godzinach stymulacji za pomocą przeciwciała anti-CD3 (Ryc. 13, wykres A i B) oraz jego mieszaniny z anti-CD28 (Ryc. 13, wykres C i D) jest statystycznie niższy u pacjentów HDrhEPO-, gdy porównujemy go do poziomu obserwowanego u osób zdrowych bądź leczonych za pomocą epoetyny.

Stwierdzenie niższego odsetka komórek CD4⁺CD28⁺ u pacjentów HDrhEPO- w odpowiedzi na stymulację mitogenną oraz niższego poziomu ekspresji antygenu CD28 na komórkach CD4⁺ u tych samych chorych pozwoliło na postawienie hipotezy o istnieniu zależności między tymi dwoma parametrami. Rycina 14 przedstawia istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy odsetkiem komórek CD4⁺CD28⁺ a poziomem ekspresji CD28 u pacjentów HDrhEPO-, zarówno w przypadku stymulacji za pomocą przeciwciała anti-CD3 (korelacja porządku rang Spearmana, $r=0.986448$, $p<0.05$), jak i jego kombinacji z przeciwciałem anti-CD28 ($r=0.977922$, $p<0.05$).

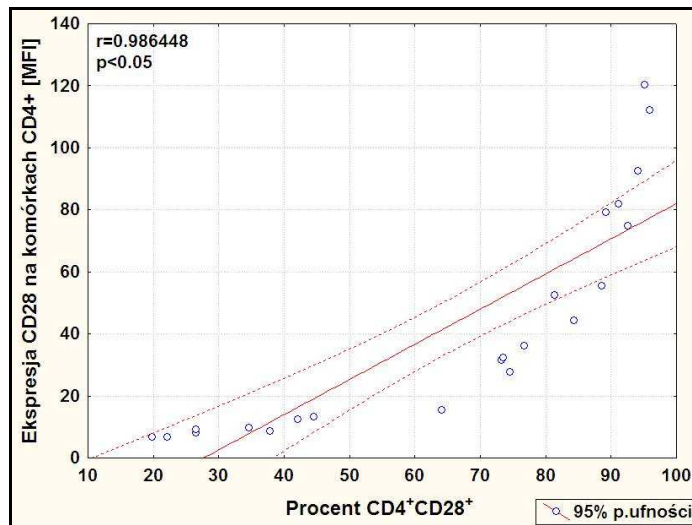


Rycina 12. Porównanie odsetka komórek CD4⁺CD28⁺ po 72 godzinach (A) oraz po 120 godzinach (B) stymulacji anti-CD3 oraz po 72 godzinach (C) oraz po 120 godzinach (D) stymulacji anti-CD3 + anti-CD28 u 20 osób zdrowych, 24 pacjentów hemodializowanych nieleczonych rhEPO (HDrhEPO-), 19 pacjentów hemodializowanych leczonych rhEPO (HDrhEPO+). Wykres przedstawia medianę wartości dla danej grupy, wąsy oznaczają 25 i 75 percentyl, test U Manna-Whitneya.

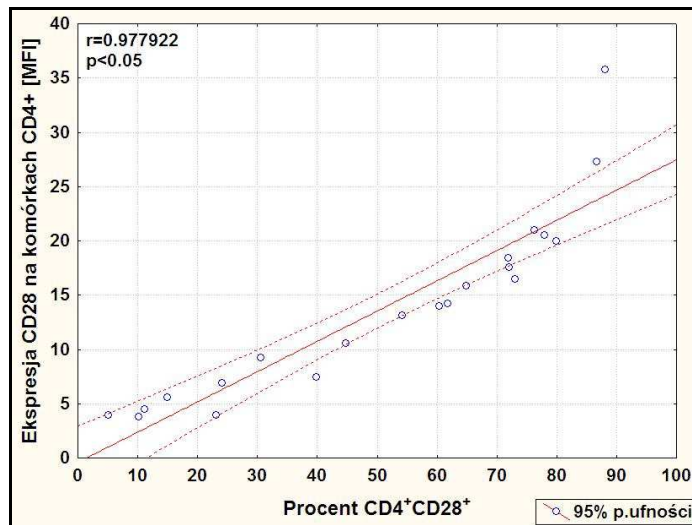


Rycina 13. Porównanie poziomu ekspresji CD28 na komórkach CD4⁺ po 72 godzinach (A) oraz po 120 godzinach (B) stymulacji anti-CD3 oraz po 72 godzinach (A) oraz po 120 godzinach (B) stymulacji anti-CD3 + anti-CD28 u 20 osób zdrowych, 24 pacjentów HDrhEPO-, 19 pacjentów HDrhEPO+. Wykres przedstawia medianę wartości dla danej grupy, wąsy oznaczają 25 i 75 percentyl, test U Manna-Whitneya.

A)



B)

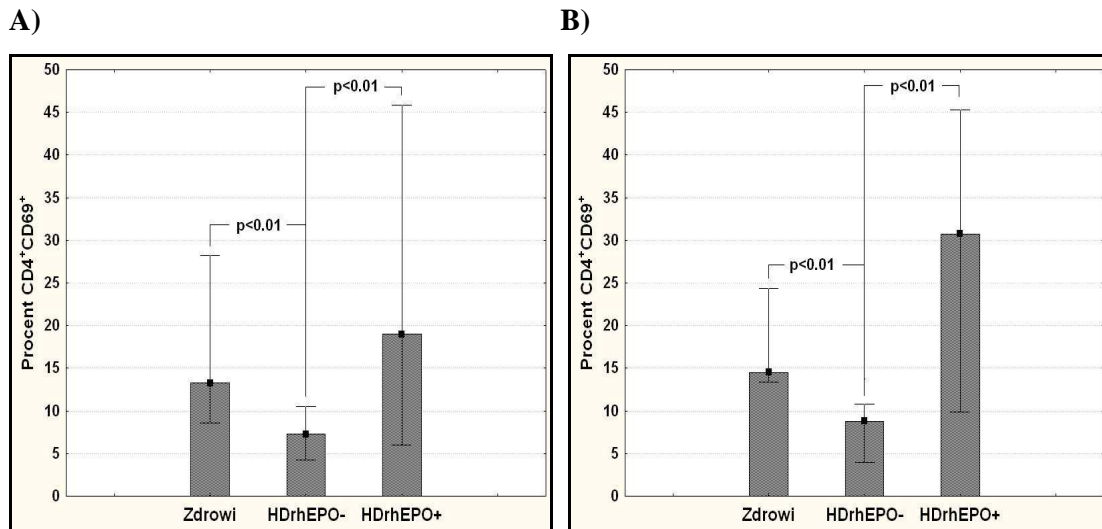


Rycina 14. Korelacja pomiędzy poziomem ekspresji CD28 na komórkach CD4⁺ a procentem komórek CD4⁺CD28⁺ u 22 pacjentów hemodializowanych, nieleczonych epoetyną (120-godzinna stymulacja: A – anty-CD3, B – stymulacja anty-CD3 + anty-CD28).

5.2.2. Obniżona ekspresja antygenu CD69 na limfocytach CD4⁺ u pacjentów nieleczonych epoetyną

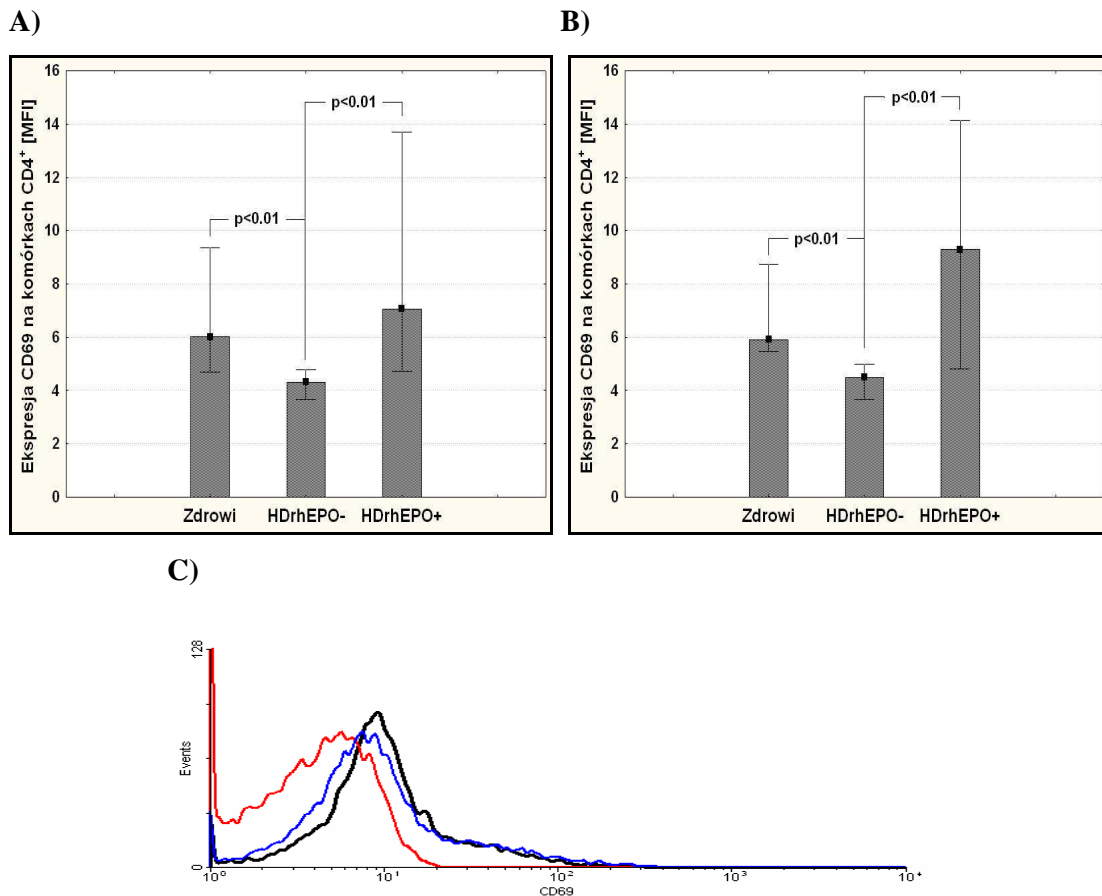
Stymulacja za pomocą przeciwciał anti-CD3 i anti-CD28 wykazała też zmiany w odsetkach komórek CD4⁺ wykazujących ekspresję markera aktywacyjnego CD69 u pacjentów z PNN.

Porównanie odsetka komórek CD4⁺CD69⁺ po 120 godzinach stymulacji za pomocą przeciwciała anti-CD3 (Ryc. 15, wykres A) i jego mieszaniny z anti-CD28 (Ryc. 15, wykres B) w poszczególnych grupach chorych wykazało, że jest on znamienne niższy u HDRhEPO- w porównaniu do osób zdrowych i osób leczonych za pomocą epoetyny. U chorych HDRhEPO+ odsetek ten jest nawet wyższy od tego obserwowanego u osób zdrowych, jednak zmiana ta nie jest statystycznie istotna.



Rycina 15. Porównanie odsetka komórek CD4⁺CD69⁺ po 120 godzinach stymulacji anti-CD3 (A) oraz anti-CD3 + anti-CD28 (B) u 20 osób zdrowych, 22 pacjentów HDRhEPO-, 19 pacjentów HDRhEPO+. Wykres przedstawia medianę wartości dla danej grupy, wąsy oznaczają 25 i 75 percentyl, test U Manna-Whitneya.

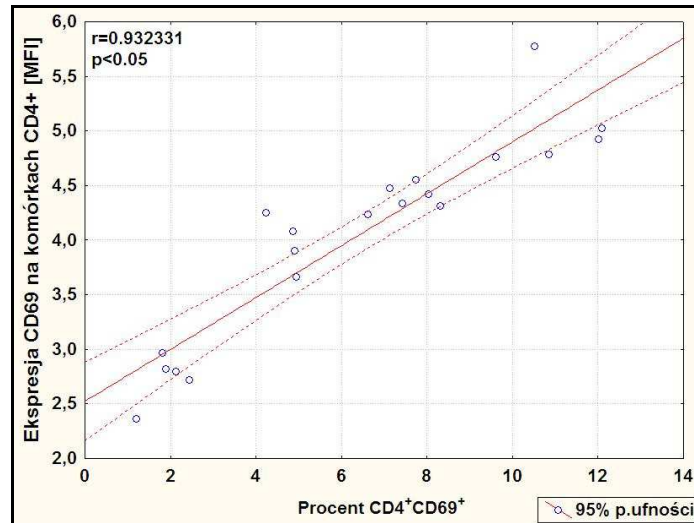
Również poziom ekspresji antygenu CD69 na komórkach CD4⁺ po 120 godzinach stymulacji za pomocą przeciwciała anti-CD3 (Ryc. 16, wykres A) oraz jego mieszaniny z przeciwciałem anti-CD28 (Ryc. 16, wykres B) był statystycznie obniżony u pacjentów HDrhEPO-, gdy go porównać do poziomu obserwowanego u osób zdrowych i pacjentów leczonych za pomocą epoetyny.



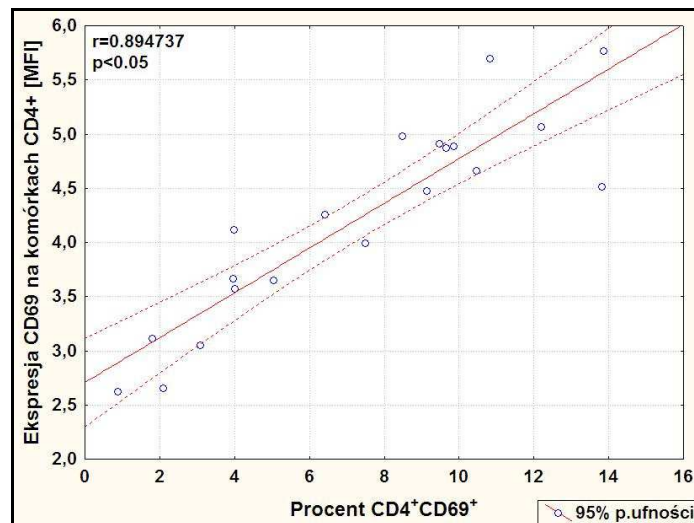
Rycina 16. Porównanie poziomu ekspresji CD69 na komórkach CD4⁺ po 120 godzinach stymulacji anti-CD3 (A) oraz anti-CD3 + anti-CD28 (B) u 20 osób zdrowych, 22 pacjentów HDrhEPO-, 19 pacjentów HDrhEPO+. Wykres przedstawia medianę wartości dla danej grupy, wąsy oznaczają 25 i 75 percentyl, test U Manna-Whitneya. Rysunek C przedstawia przykładowy histogram, czarna linia prezentuje osobę zdrową, czerwona – pacjenta nieleczzonego rhEPO, niebieska – pacjenta leczzonego rhEPO.

Obniżony poziom antygenu CD69 u pacjentów HDRhEPO- był dodatnio skorelowany z obniżonym odsetkiem komórek CD4⁺CD69⁺ zarówno w przypadku stymulacji za pomocą przeciwciała anti-CD3 (korelacja porządku rang Spearmana, $r=0.932331$, $p<0.05$), jak i w przypadku jego kombinacji z przeciwciałem anti-CD28 ($r=0.894737$, $p<0.05$), co świadczy o zależności między tymi dwoma parametrami (Ryc. 17).

A)



B)

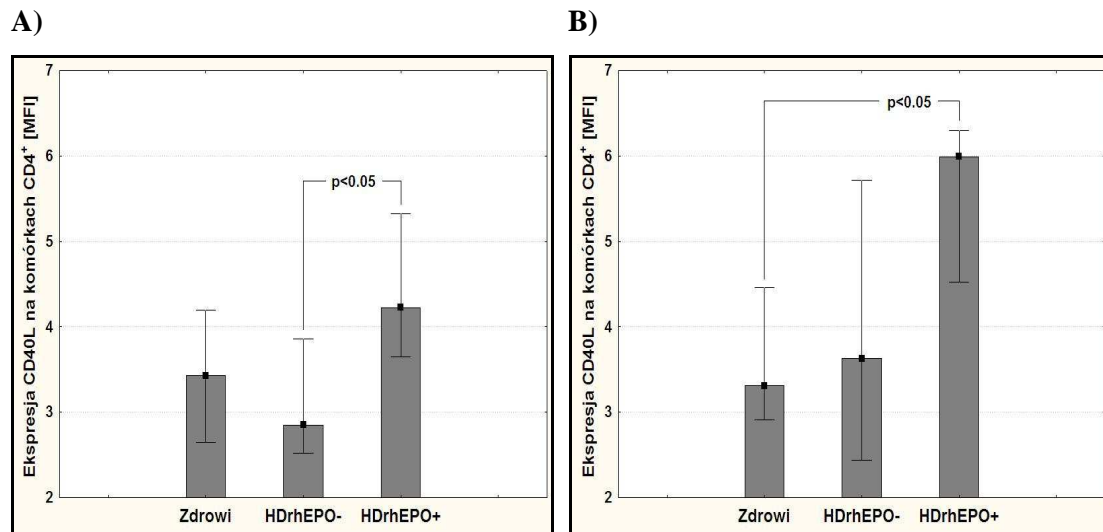


Rycina 17. Korelacja pomiędzy poziomem ekspresji CD69 na komórkach CD4⁺ a procentem komórek CD4⁺CD69⁺ u 20 pacjentów hemodializowanych, nieleczonych epoetyną (120-godzinna stymulacja: A – anti-CD3, B – stymulacja anti-CD3 + anti-CD28).

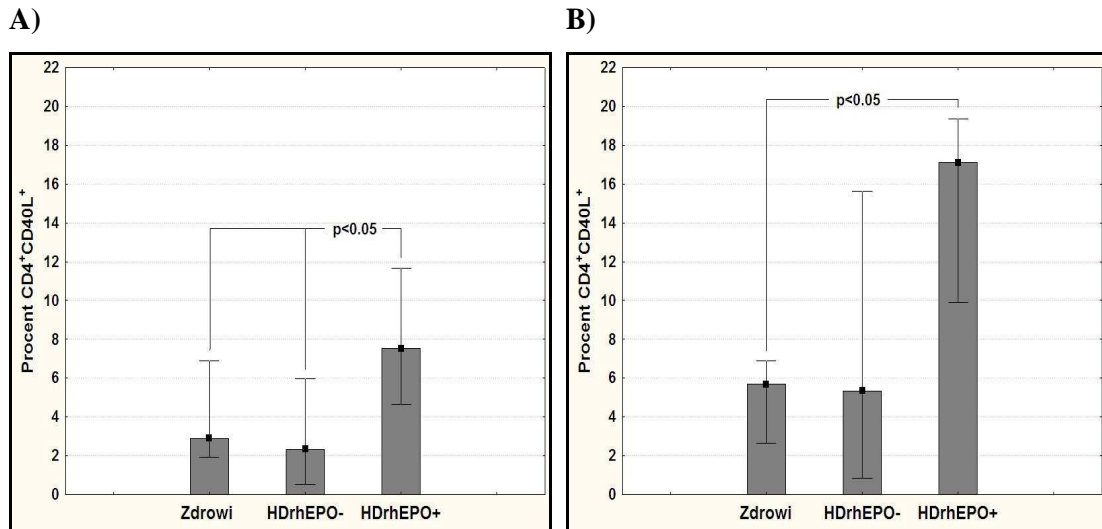
5.2.3. Podwyższona ekspresja antygenu CD40L na limfocytach CD4⁺ u pacjentów leczonych epoetyną

Kolejne zmiany dotyczyły poziomu ekspresji antygenu CD40L, odpowiadającego za kontakt z limfocytami B.

Poziom ekspresji tego antygenu na komórkach CD4⁺ był znacząco wyższy u pacjentów HDRhEPO+ po 72 godzinach stymulacji za pomocą przeciwciała anti-CD3 (Ryc. 18, wykres A) bądź jego mieszaniny z przeciwciałem anti-CD28 (Ryc. 18, wykres B), jeśli go porównać do poziomu obserwowanego u osób zdrowych bądź pacjentów HDRhEPO-. Odsetek komórek CD4⁺CD40L⁺ był znamienne podwyższony w tej samej grupie w porównaniu do obu pozostałych grup badanych (Rys. 19).



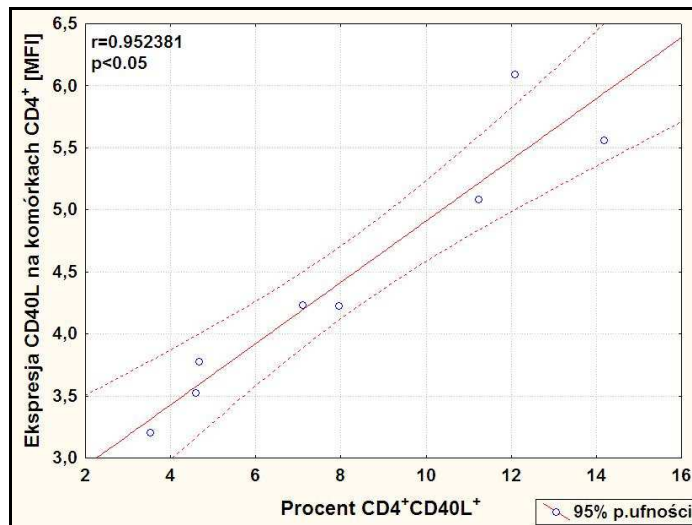
Rycina 18. Porównanie poziomu ekspresji CD40L na komórkach CD4⁺ po 72 godzinach stymulacji anti-CD3 (A) oraz anti-CD3 + anti-CD28 (B) u 12 osób zdrowych, 17 pacjentów HDRhEPO-, 8 pacjentów HDRhEPO+. Wykres przedstawia medianę wartości dla danej grupy, wąsy oznaczają 25 i 75 percentyl, test U Manna-Whitneya.



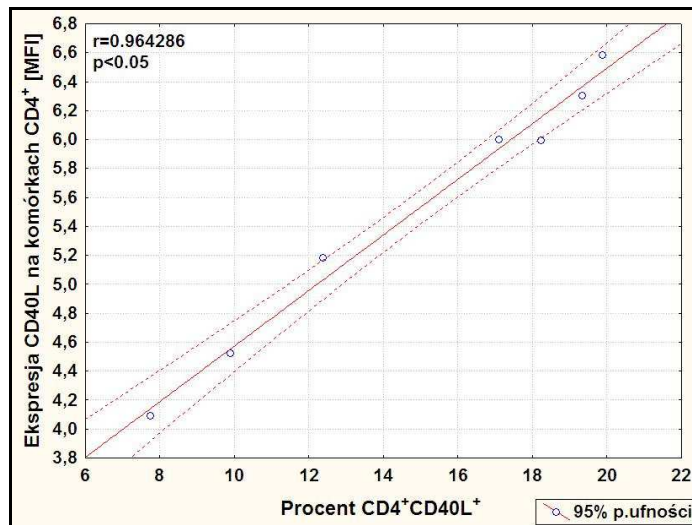
Rycina 19. Porównanie procenta komórek CD4⁺CD40L⁺ po 72 godzinach stymulacji anti-CD3 (A) oraz anti-CD3 + anti-CD28 (B) u 12 osób zdrowych, 17 pacjentów HDrhEPO-, 8 pacjentów HDrhEPO+. Wykres przedstawia medianę wartości dla danej grupy, wąsy oznaczają 25 i 75 percentyl, test U Manna-Whitneya.

Między znamienne podwyższonym odsetkiem komórek CD4⁺CD40L⁺ a poziomem ekspresji CD40L u pacjentów HDrhEPO+ istniała znamienna dodatnia korelacja, zarówno po stymulacji za pomocą przeciwciała anti-CD3 (korelacja porządku rang Spearmana, $r=0.952381$, $p<0.05$) (Ryc. 20, wykres A), jak i jego kombinacji z przeciwciałem anti-CD28 ($r=0.964286$, $p<0.05$), co świadczy o zależności między tymi zmiennymi (Ryc. 20, wykres B).

A)



B)

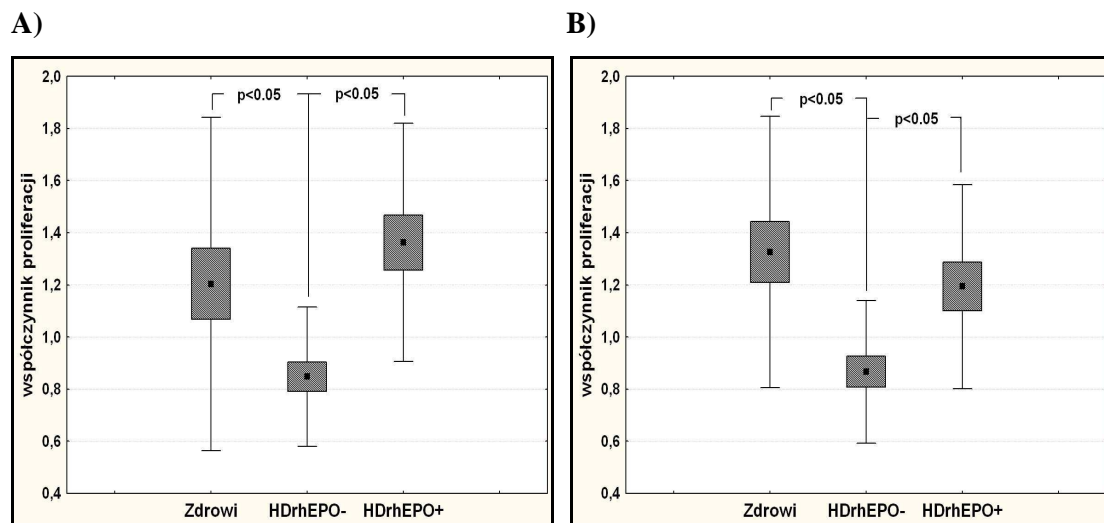


Rycina 20. Korelacja pomiędzy poziomem ekspresji CD40L na komórkach CD4⁺ a procentem komórek CD4⁺CD40L⁺ u 8 pacjentów hemodializowanych leczonych za pomocą epoetyny (72-godzinna stymulacja: A – anty-CD3, B – stymulacja anty-CD3 + anty-CD28).

5.3. Cytometryczna ocena zmian parametrów proliferacyjnych limfocytów CD4⁺ u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek

Jednym z parametrów określającym proliferację limfocytów w hodowli ze stymulatorami jest współczynnik proliferacji, który jest liczony jako ilość komórek po 120 godzinach hodowli podzielona przez wyjściową ilość komórek włożonych do hodowli. Współczynnik ten mówi nam wstępnie o tym, ile komórek uległo proliferacji i czy nastąpił przyrost liczby komórek w hodowli (wartość współczynnika powyżej 1).

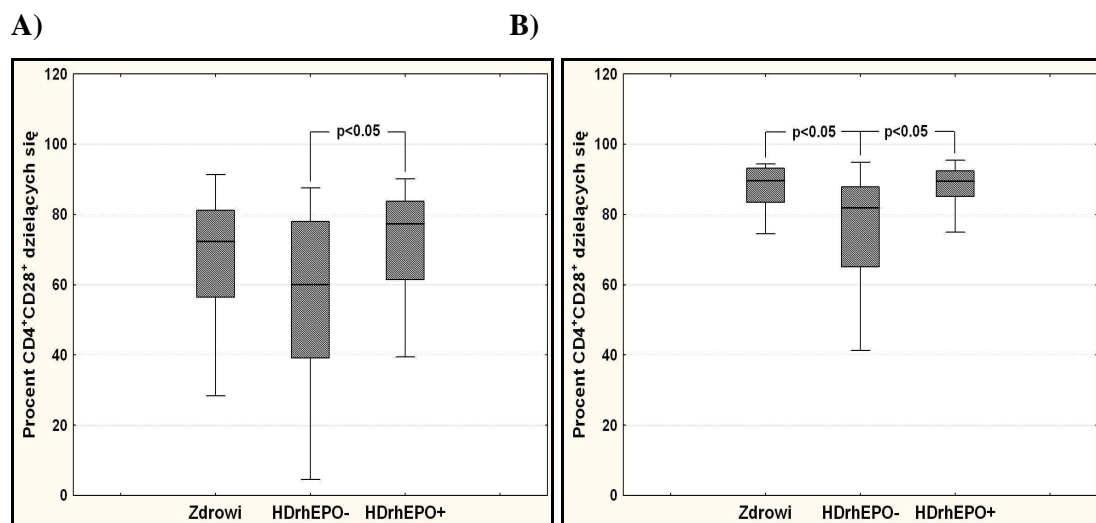
Porównanie współczynnika proliferacji izolowanych komórek jednojądrzastych krwi (monocytów i limfocytów) pomiędzy osobami zdrowymi a chorymi hemodializowanymi wykazało, że jest on niższy u pacjentów z grupy HDrhEPO- niż u zdrowej kontroli i pacjentów HD rhEPO+, zarówno po stymulacji za pomocą przeciwciała anti-CD3 (Ryc. 21, wykres A), jak i jego mieszaniną z anti-CD28 (Ryc. 21, wykres B). Wynik ten świadczy o małym przyroście komórek w hodowli w grupie pacjentów nieleczonych epoetyną. Jest to jednak parametr, który dotyczy puli komórek jednojądrzastych, więc liczone są nie tylko limfocyty, ale i monocyty.



Rycina 21. Porównanie współczynnika proliferacji PBMC po 120 godzinach stymulacji anti-CD3 (A) oraz anti-CD3, anti-CD28 (B) u 20 osób zdrowych, 24 pacjentów HDrhEPO- oraz 19 pacjentów HDrhEPO+. Wykres przedstawia średnią wartości dla danej grupy, ramki oznaczają błąd standardowy a wąsy oznaczają odchylenie standardowe, test T Studenta.

Parametry dotyczące bezpośrednio proliferacji limfocytów $CD4^+$ badane były metodą DCT wykorzystującą znacznik CFSE. Barwnik ten jest trwale wiązany przez białka znajdujące się w cytoplazmie i w czasie każdego podziału jest rozdzielany równomiernie do komórek potomnych (metoda opisana w rozdziale 3.3, Ryc. 8). Limfocyty znakowane CFSE były inkubowane z przeciwciałem anti-CD3 bądź jego mieszaniną z przeciwciałem anti-CD28 przez 120 godzin. Po 72 godzinach i 120 godzinach komórki były znakowane przeciwciałami monoklonalnymi w celu oznaczenia populacji komórek $CD4^+CD28^+$ i cytometrycznej analizy parametrów proliferacyjnych. Na podstawie otrzymanych histogramów w poszczególnych grupach badanych obliczano odsetki komórek $CD4^+CD28^+$ dzielących się pod wpływem stymulacji, za 100% przyjmując komórki z bramki R2 (Rozdział 3.3, Ryc. 8).

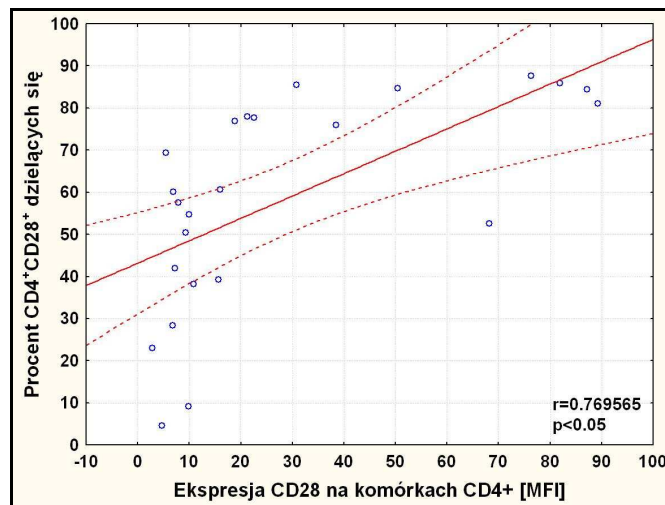
Rycina 22 przedstawia różnicę w odsetku komórek $CD4^+CD28^+$ dzielących się w poszczególnych badanych grupach. Pacjenci HDRhEPO- charakteryzują się znamienne niższym odsetkiem komórek $CD4^+CD28^+$ proliferujących w porównaniu do osób zdrowych i chorych HDRhEPO+ po 72 godzinach od stymulacji bez względu na rodzaj zastosowanej stymulacji (za pomocą przeciwciała anti-CD3 bądź jego mieszaniny z anti-CD28).



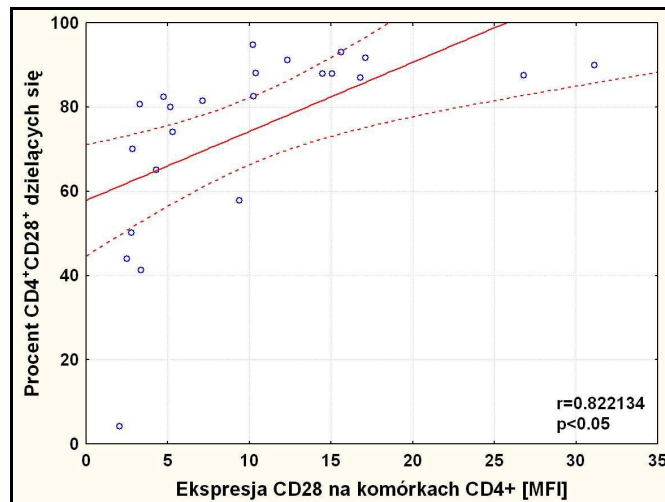
Rycina 22. Porównanie odsetka dzielących się komórek $CD4^+CD28^+$ po 72 godzinach stymulacji anti-CD3 (A) oraz stymulacji anti-CD3 + anti-CD28 (B) u 19 osób zdrowych, 24 pacjentów HDRhEPO-, 19 pacjentów HDRhEPO+. Wykres przedstawia medianę wartości dla danej grupy, ramka – 25 i 75 percentyl a wąsy – zakres wyników nieodstających, test U Manna-Whitneya.

Obserwacja niskiego odsetka proliferujących komórek $CD4^+CD28^+$ u pacjentów HDRhEPO- oraz niskiej ekspresji antygenu CD28 na komórkach $CD4^+$ u tych samych chorych pozwoliła na postawienie hipotezy o istnieniu zależności między tymi parametrami. Rycina 23 przedstawia znamienne dodatnią korelację między zmiennymi po stymulacji przeciwciałem anti-CD3 (korelacja porządku rang Spearmana, $r=0.769565$, $p<0.05$) oraz jego kombinacją z przeciwciałem anti-CD28 ($r=0.822134$, $p<0.05$).

A)



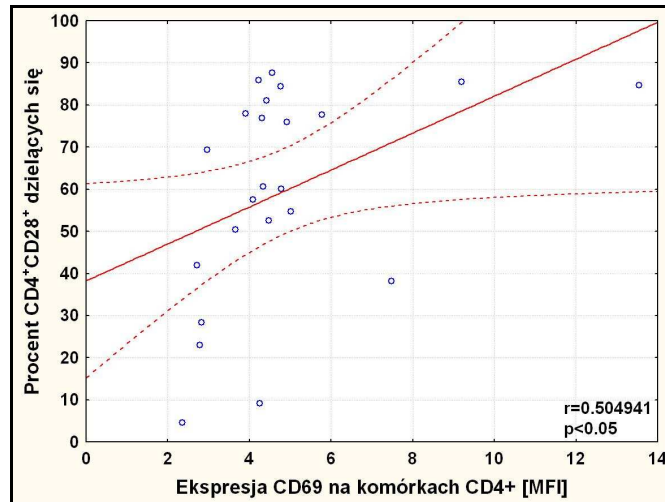
B)



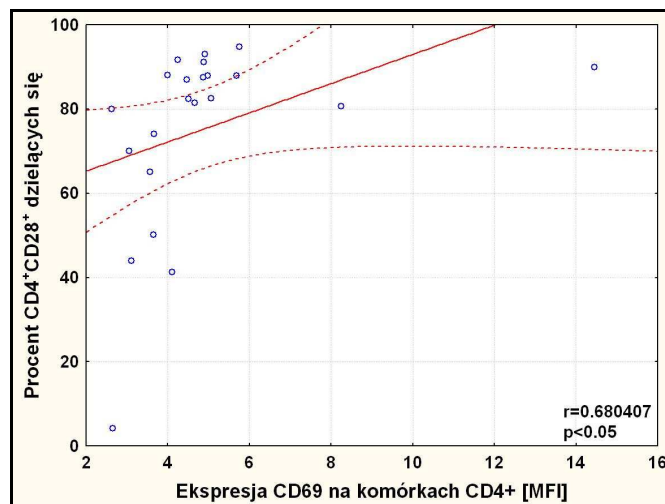
Rycina 23. Korelacja pomiędzy procentem komórek $CD4^+CD28^+$ dzielących się a poziomem ekspresji CD28 na komórkach $CD4^+$ u 24 pacjentów hemodializowanych, nieleczonych epoetyną (72-godzinna stymulacja: A – anti-CD3, B – anti-CD3 + anti-CD28).

Podobna zależność istniała pomiędzy odsetkiem proliferujących komórek $CD4^+CD28^+$ u pacjentów HDRhEPO- a niską ekspresją antygenu CD69 na komórkach $CD4^+$ u tych samych chorych. Rycina 24 przedstawia znamienne dodatnią korelację między zmiennymi po stymulacji przeciwciałem anti-CD3 (korelacja porządku rang Spearmana, $r=0.504941$, $p<0.05$) oraz jego kombinacją z przeciwciałem anti-CD28 ($r=0.680407$, $p<0.05$).

A)



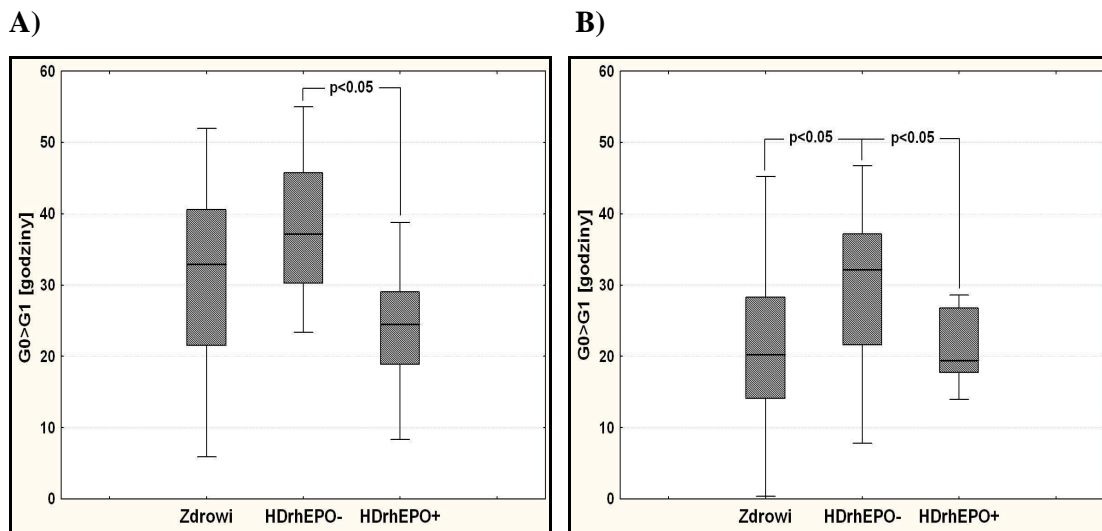
B)



Rycina 24. Korelacja pomiędzy procentem komórek $CD4^+CD28^+$ dzielących się a poziomem ekspresji CD69 na komórkach $CD4^+$ u 23 pacjentów hemodializowanych, nieleczonych epoetyną (72-godzinna stymulacja: A – anti-CD3, B – anti-CD3 + anti-CD28).

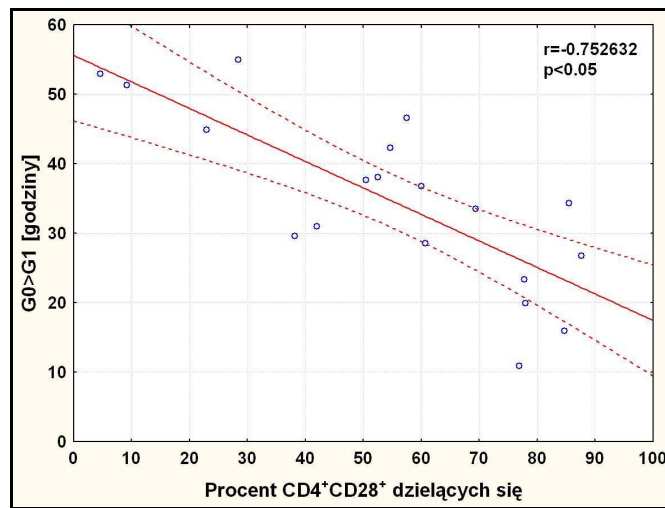
Obserwacja niskiego odsetka komórek $CD4^+CD28^+$ proliferujących w odpowiedzi na stymulację za pomocą przeciwciał u pacjentów HDRhEPO- zwróciła uwagę na możliwość zmian w czasie trwania jednego podziału bądź w czasie, jaki minął od stymulacji do rozpoczęcia pierwszego podziału komórek, czyli tzw. przejście z fazy G_0 (fazy spoczynkowej) do G_1 (pierwszej fazy cyklu komórkowego) (czas $G_0 \rightarrow G_1$).

Stwierdzono istotną zmianę w dynamice podziałów między limfocytami $CD4^+CD28^+$ od osób zdrowych, pacjentów nieleczonych i leczonych za pomocą rhEPO. Główna różnica polega na wydłużeniu czasu, który upływa od stymulacji przeciwciałami do wejścia komórek w cykl komórkowy. Czas ten okazał się znamienne dłuższy dla limfocytów $CD4^+CD28^+$ pacjentów HDRhEPO- (Ryc. 25). Dłuższy czas przejścia z fazy G_0 do G_1 , jak przewidywano, był ujemnie skorelowany z obniżonym odsetkiem komórek proliferujących (Ryc. 26). Ponadto, dłuższy czas przejścia z fazy G_0 do G_1 obserwowany u pacjentów HDRhEPO- był też ujemnie skorelowany z obniżonym odsetkiem komórek $CD4^+CD28^+$ (Ryc. 27, wykres A) oraz niskim poziomem antygenu CD28 na powierzchni komórek $CD4^+$ (Ryc. 27, wykres B).

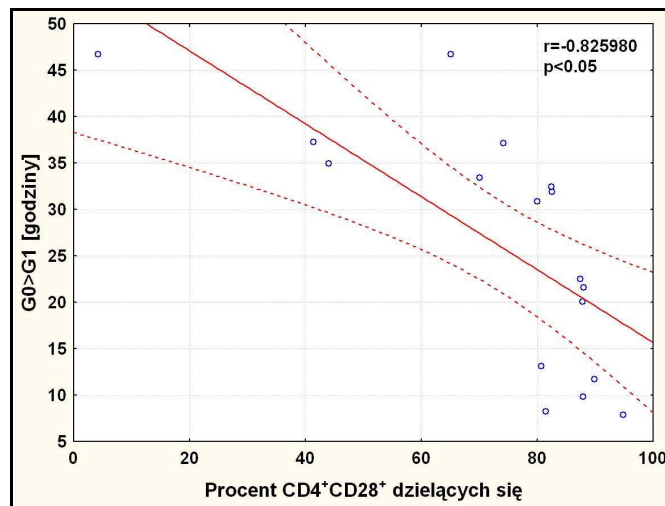


Rycina 25. Porównanie ilości godzin potrzebnych do przejścia z fazy G_0 do fazy G_1 dla komórek $CD4^+CD28^+$ po stymulacji anti-CD3 (A) oraz anti-CD3 + anti-CD28 (B) u 19 osób zdrowych, 21 pacjentów HDRhEPO- oraz 17 pacjentów HDRhEPO+. Wykres przedstawia medianę wartości dla danej grupy, ramka oznacza 25 i 75 percentyl a wąsy – zakres wyników nieodstających, test U Manna-Whitneya.

A)

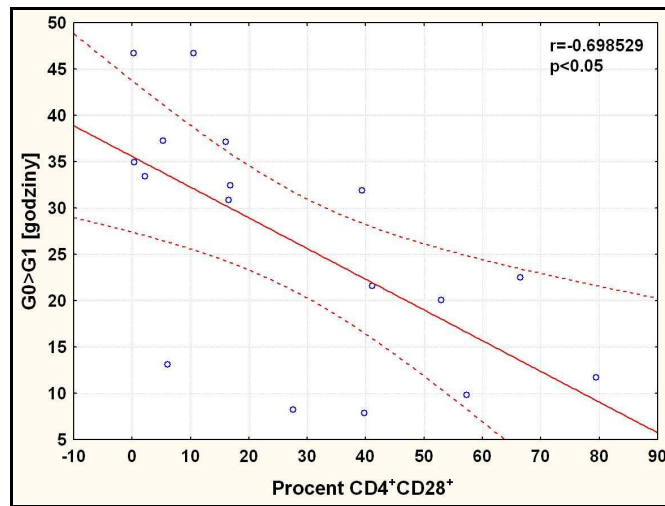


B)

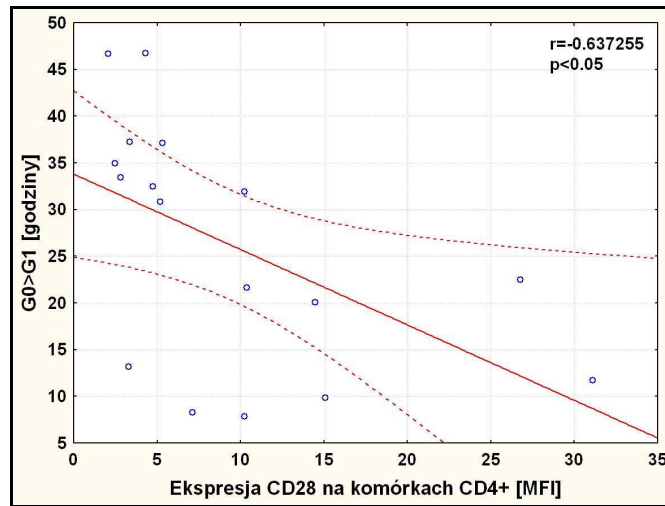


Rycina 26. Korelacja pomiędzy czasem przejścia z fazy G₀ do G₁ a procentem komórek CD4⁺CD28⁺ dzielących się w 72 godzinie stymulacji za pomocą anti-CD3 (A) anti-CD3 + anti-CD28 (B) u 19 pacjentów hemodializowanych, nieleczonych epoetyną.

A)



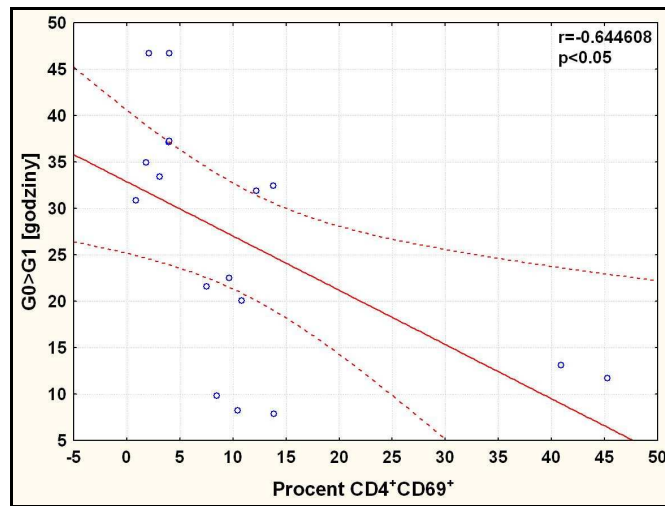
B)



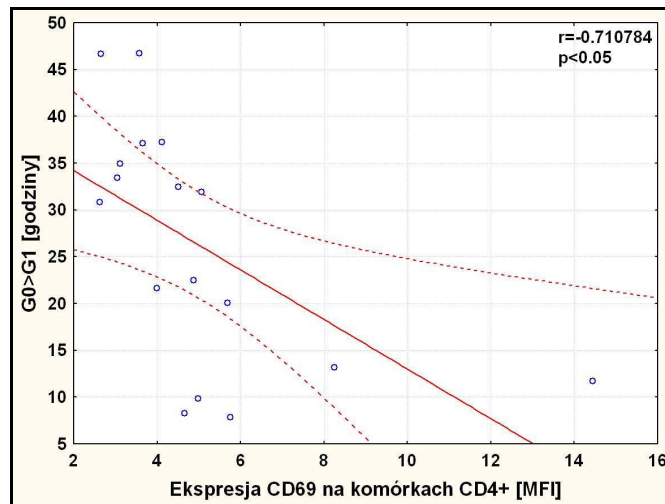
Rycina 27. Korelacja pomiędzy czasem przejścia z fazy G₀ do G₁ a procentem komórek CD4⁺CD28⁺ (A) oraz poziomem ekspresji CD28 na komórkach CD4⁺ (B) po stymulacji za pomocą anty-CD3 + anty-CD28 u 17 pacjentów hemodializowanych, nieleczonych epoetyną.

Dłuższy czas przejścia z fazy G_0 do G_1 obserwowany u pacjentów HDRhEPO- był ponadto ujemnie skorelowany z obniżonym odsetkiem komórek $CD4^+CD69^+$ (Ryc. 28, wykres A) oraz niskim poziomem antygenu CD69 na powierzchni komórek $CD4^+$ (Ryc. 28, wykres B) u tych samych chorych.

A)



B)



Rycina 28. Korelacja pomiędzy czasem przejścia z fazy G_0 do G_1 a procentem komórek $CD4^+CD69^+$ (A) oraz poziomem ekspresji CD69 na komórkach $CD4^+$ (B) po stymulacji za pomocą anty-CD3 + anty-CD28 u 17 pacjentów hemodializowanych, nieleczonych epoetyną.

5.4. Ekspresja receptora dla erytropoetyny (EPO-R) na limfocytach i monocytach osób zdrowych i pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek

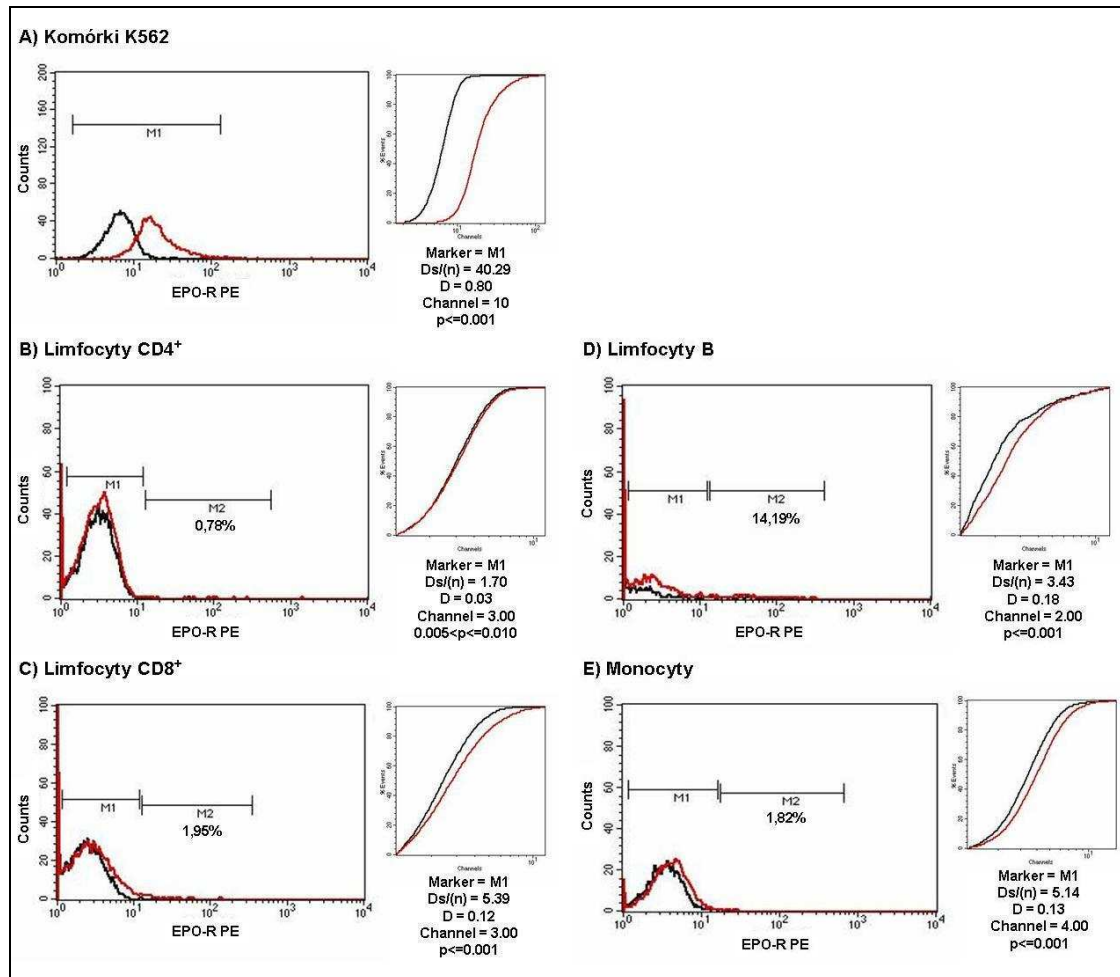
Zaobserwowane zmiany w fenotypie powierzchniowym limfocytów CD4⁺ u pacjentów z PNN, leczonych za pomocą rekombinowanej erytropoetyny pociągnęły za sobą następujące pytanie: czy komórki układu odpornościowego charakteryzują się obecnością EPO-R, poprzez który EPO mogłaby wpływać na te komórki, co pociągałoby za sobą obserwowane zmiany fenotypowe i proliferacyjne limfocytów T.

Dostępność monoklonalnego przeciwciała przeciwko ludzkiemu EPO-R umożliwiła wykrycie receptora na wybranych komórkach układu immunologicznego metodą ilościowej cytometrii przepływowej. Użycie ziaren kalibracyjnych z określoną liczbą cząsteczek fikoerytryny (PE) na powierzchni (metoda opisana w rozdziale 3.5.3) pozwoliło na pomiar liczby cząsteczek EPO-R na powierzchni pojedynczej komórki w poszczególnych populacjach. Rycina 29 przedstawia reprezentatywne histogramy przedstawiające komórki wybranych populacji barwione przeciwciałem przeciwko EPO-R sprzężonym z fikoerytryną. Posługując się testem Kołmogorowa-Smirnowa, poprzez porównanie przesunięcia średniej fluorescencji komórek barwionych przeciwciałem anti-EPO-R względem komórek niebarwionych, wykazano, że całe populacje limfocytów CD4⁺ oraz CD8⁺, populacja limfocytów B oznaczane jako komórki CD19⁺ oraz monocyty oznaczane jako komórki CD14⁺ charakteryzują się ekspresją EPO-R. Komórki K562 są erytroidalną linią komórkową, która stanowiła pozytywną kontrolę ze względu na potwierdzoną w piśmiennictwie obecność EPO-R na swojej powierzchni (Abdel-Mageed, 2003). Receptor dla EPO został wykryty na populacjach limfocytów CD4⁺ oraz CD8⁺, limfocytach B oraz monocytach, zarówno u osób zdrowych, jak i chorych z PNN.

Analiza uzyskanych wyników z użyciem programu QuantiCALC™ (Becton Dickinson, USA) wchodzącego w skład zestawu ziaren kalibracyjnych QuantiBrite™ (BD Biosciences, Kanada) umożliwiła dokładne oznaczenie liczby cząsteczek EPO-R na pojedynczej komórce w danej populacji z dokładnością do 2 cząsteczek na pojedynczej komórce. Średnia liczba cząsteczek receptora u wszystkich badanych osób (zarówno chorych, jak i zdrowych) wynosiła 12.06 ± 10.50 dla limfocytów CD4⁺, 17.14 ± 13.15 dla

limfocytów CD8⁺, 41.917 ± 26.17 dla limfocytów B oraz 102.44 ± 88.87 dla monocytów.

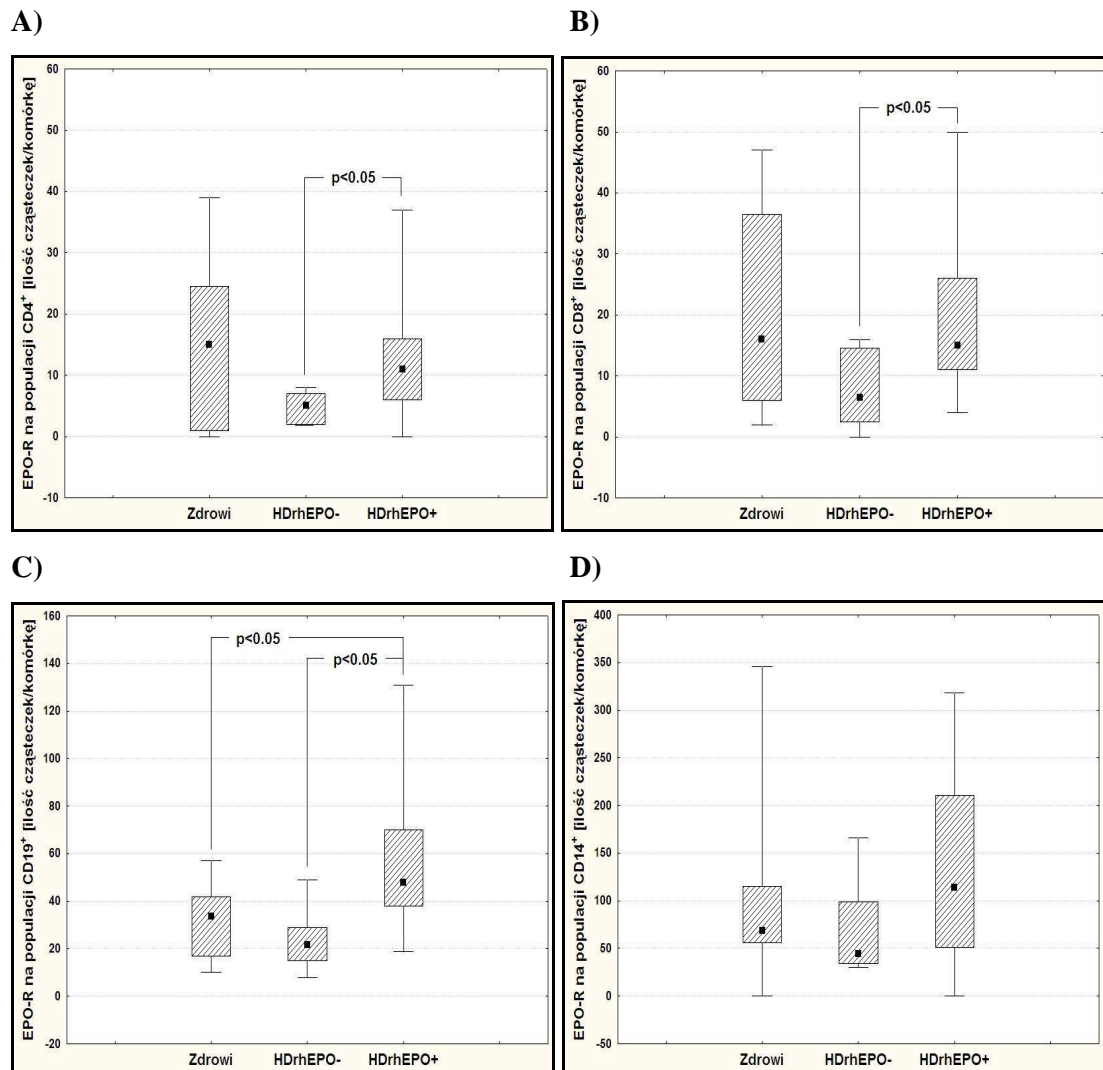
Były też przypadki osób, u których w danej populacji nie wykrywano EPO-R.



Rycina 29. Ekspresja EPO-R na ludzkich limfocytach CD4⁺ i CD8⁺, na limfocytach B (komórki CD19⁺) oraz na monocytach (komórki CD14⁺). Wykresy przedstawiają reprezentatywne histogramy z 30 doświadczeń. Ekspresja EPO-R (linia czerwona) oznaczana była jako przesunięcie średniej fluorescencji na komórkach względem kontroli niebarwionej przeciwciałem przeciwko EPO-R (linia czarna), p < 0.05, test Kolmogorowa-Smirnowa.

Rycina 30 przedstawia porównanie liczby cząsteczek EPO-R przypadających na jedną komórkę w populacjach limfocytów CD4⁺, CD8⁺, limfocytów B oraz monocytów u osób zdrowych, chorych HDrhEPO- oraz HDrhEPO+. Na komórkach CD4⁺ pacjentów HDrhEPO- wykazano mniejszą liczbę cząsteczek receptora w porównaniu do komórek CD4⁺ pacjentów HDrhEPO+ (Ryc. 30, wykres A). Obserwowano również znamienne

mniej cząsteczek EPO-R na limfocytach $CD8^+$ u pacjentów HDRhEPO- w porównaniu do HDRhEPO+ (Ryc. 30, wykres B). W przypadku limfocytów B spadek liczby cząsteczek receptora zaobserwowano zarówno u osób zdrowych, jak i pacjentów HDRhEPO- (Ryc. 30, wykres C). W przypadku monocytów nie wykazano znamienych różnic pomiędzy grupami badanymi, jedynie tendencję do wzrostu liczby EPO-R w grupie pacjentów HDRhEPO+ (Ryc. 30, wykres D)



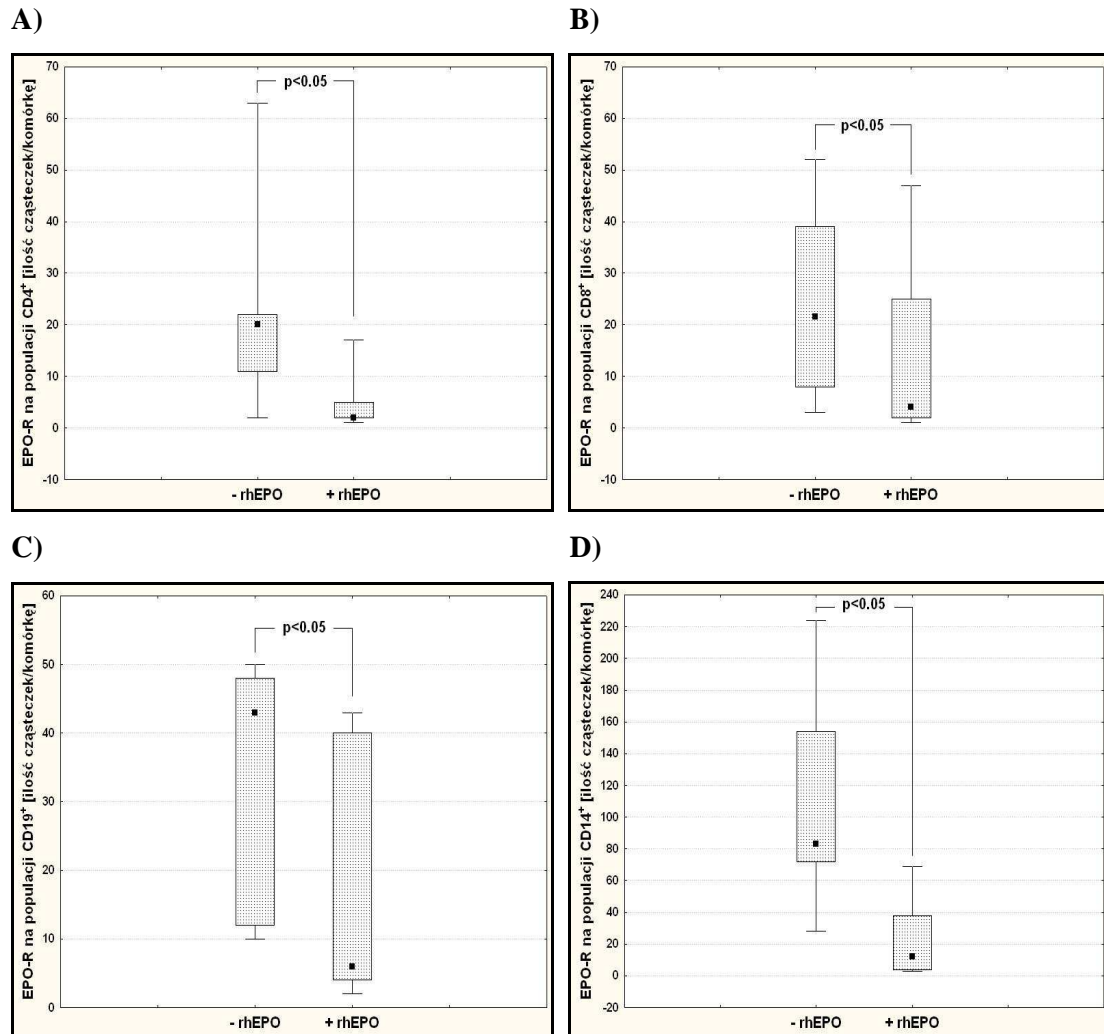
Rycina 30. Porównanie liczby cząsteczek EPO-R przypadających na jedną komórkę w populacjach limfocytów $CD4^+$ (A), $CD8^+$ (B), limfocytów B (C) oraz monocytów (D) u 12 osób zdrowych, 9 pacjentów HDRhEPO- oraz 15 pacjentów HDRhEPO+. Wykresy przedstawiają medianę wartości dla danej grupy, ramka oznacza 25 i 75 percentyl a wąsy – wynik minimalny i maksymalny, test U Manna-Whitneya.

Tabela 7. Odsetki limfocytów (komórki CD4⁺, CD8⁺ oraz CD19⁺) i monocytów (komórki CD14⁺) charakteryzujących się wysoką ekspresją receptora dla EPO uzyskane u osób zdrowych i pacjentów hemodializowanych.

	Pacjenci HD		Zdrowi N=12
	rhEPO (-) N=9	rhEPO (+) N=15	
CD4⁺EPO-R⁺			
średnia(min, max)	1.18 (0.51, 3.16)	0.82 (0.41, 2.64)	1.51 (0, 5.23)
# EPO-R			
mediana (min, max)	1883 (1347, 7446) *	1890 (1409, 9260) *	1402.5 (0, 2088)
CD8⁺EPO-R⁺			
średnia (min, max)	1.41 (0.59, 2.95)	1.43 (0.34, 4.98)	2.04 (0.35, 6.46)
# EPO-R			
mediana (min, max)	1868 (1318, 3453)	1760 (736, 8845)	1434 (820, 9427)
CD19⁺EPO-R⁺			
średnia (min, max)	15.96 (1.09, 36.99)	16.82 (4.23, 68.11)	9.67 (3.37, 36.4)
# EPO-R			
mediana (min, max)	2201 (894, 3444)	2811 (1106, 3925)	2512.5 (512, 5149)
CD14⁺EPO-R⁺			
średnia (min, max)	4.39 (0.72, 8.52)	7.40 (0, 26.83)	13.63 (0.58, 43.21)
# EPO-R			
mediana (min, max)	2263 (1135, 4026)	2758 (0, 8129) *	1765 (795, 3236)

* p<0.05 vs zdrowa kontrola, test U Manna-Whitneya

Aby sprawdzić, czy wykryty na limfocytach i monocytach receptor dla EPO może pełnić jakąś funkcję, przeprowadzono, przed oznaczeniem liczby EPO-R, inkubację komórek z epoetyną. Rycina 31 przedstawia liczbę EPO-R w poszczególnych populacjach komórek na limfocytach bądź monocytach inkubowanych („+ rhEPO”) oraz nieinkubowanych z epoetyną („- rhEPO”). Test kolejności par Wilcozona wykazał, że spadek liczby cząsteczek EPO-R po inkubacji z epoetyną jest statystycznie znamienne.



Rycina 31. Porównanie liczby cząsteczek receptora dla EPO przypadających na jedną komórkę w populacjach limfocytów CD4⁺ (A), CD8⁺ (B), limfocytów B (C) oraz monocytów (D) nieinkubowanych (- rhEPO) oraz inkubowanych z epoetyną (+ rhEPO) u 6 badanych osób. Wykresy przedstawia medianę wartości dla danej grupy, ramka oznacza 25 i 75 percentyl a wąsy – wynik minimalny i maksymalny, test kolejności par Wilcoxon.

5.5. Ekspresja genu *EPO-R* w limfocytach CD4⁺ oraz PBMC

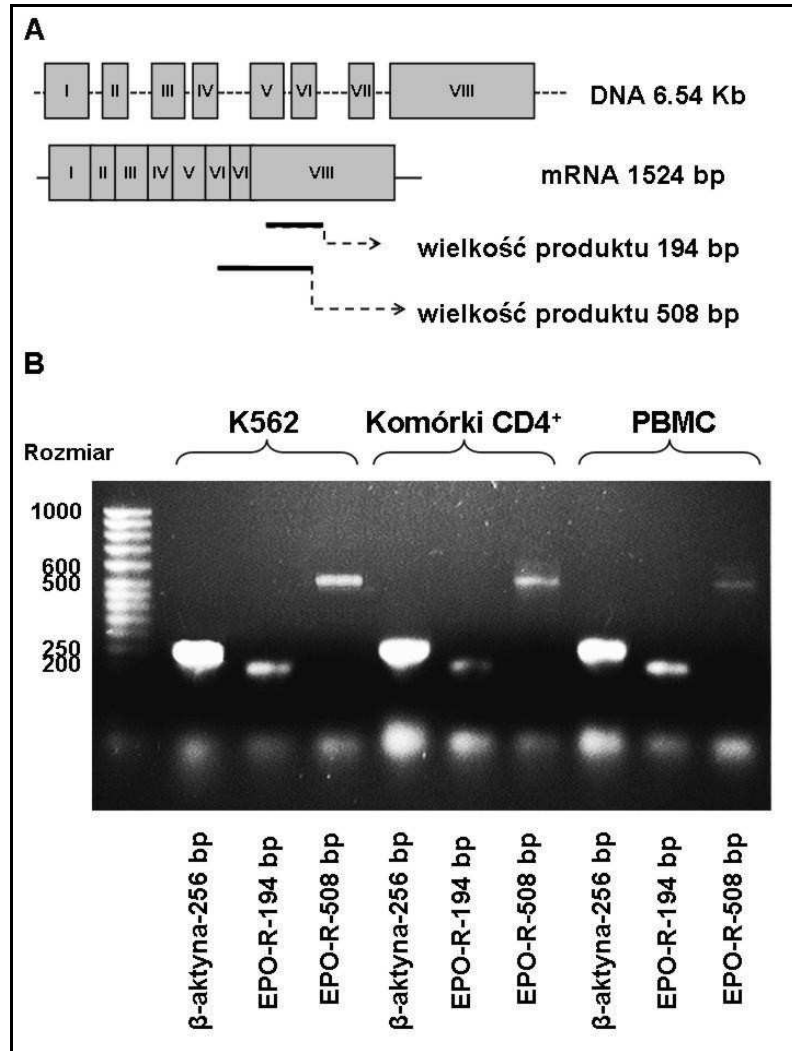
Kolejny etap pracy miał na celu potwierdzić obecność transkrybowanego genu *EPO-R*. Z komórek K562, wyizolowanych PBMC oraz komórek CD4⁺ uprzednio zamrożonych w -80°C wyizolowano całkowite RNA. Komórki K562 ponownie stanowiły pozytywną kontrolę ze względu na potwierdzoną w piśmiennictwie obecność mRNA dla receptora (Abdel-Mageed, 2003). Po wyizolowaniu mRNA przeprowadzono reakcję syntezy cDNA oraz łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) ze starterami dla genów β -AKTYNY i *EPO-R* (metoda opisana w rozdziale 3.6). Startery dla genu kodującego receptor zostały zestawione w dwóch parach tak, aby uzyskać dwa produkty:

- pierwszy o długości 508 par zasad, obejmujący trzy eksony (fragment eksonu 6, cały ekson 7 oraz początkową połowę eksonu 8);
- drugi o długości 194 par zasad, obejmujący fragment w eksonu 8, drugi odcinek wchodził w skład pierwszego (Ryc.32, schemat A).

Schemat A na Ryc. 32 przedstawia schemat genu *EPO-R*, na który składa się osiem eksonów przedzielonych intronami. Ekson 6 zawiera informację o sekwencji domeny transmembranowej a eksony 7 i 8 – o sekwencji domeny wewnątrzkomórkowej (Tilbrook, 1999). W wyniku transkrypcji powstaje odcinek mRNA wielkości 1524 par zasad. Wskutek przeprowadzenia reakcji PCR powstają dwa produkty o długości 508 i 194 par zasad. Takie zestawienie starterów potwierdzało obecność mRNA genu *EPO-R* w badanych komórkach, wykluczając jednocześnie zanieczyszczenie próbki genomowym DNA. Ponadto możliwe było sprawdzenie, czy mRNA uzyskane od limfocytów zawiera informację o budowie domeny wewnątrzkomórkowej i transmembranowej, co warunkuje przekazywanie sygnału do wnętrza komórki (Tilbrook, 1999; Bazan, 1989). Ponadto, wyeliminowano możliwość występowania w limfocytach formy t*EPO-R* (ang. *truncated EPO-R*), która charakteryzuje się kawałkiem intronu pomiędzy eksonem 7 a 8, co prowadzi do powstania białka pozbawionego domeny wewnątrzkomórkowej (Shimizu, 1999).

W wyniku reakcji RT-PCR uzyskano oczekiwane fragmenty DNA genu *EPO-R*. Otrzymano fragment obejmujący część eksonu 8, który zawiera informację o budowie

domeny wewnątrzkomórkowej receptora dla EPO w linii komórkowej K562, ludzkich limfocytach CD4⁺ oraz ludzkich komórkach jednojądrzastych. Uzyskano również produkt obejmujący trzy wyżej wymienione eksony. Schemat B na Ryc. 32 przedstawia przykładowy wynik badania RT-PCR.



Rycina 32. Ekspresja genu EPO-R w K562, ludzkich limfocytach CD4⁺ i ludzkich PBMC. Przykładowy wynik badania RT-PCR reprezentatywny dla 8 doświadczeń (opis w tekście).

6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Badania I cyklu mające na celu ocenę zaburzeń proliferacji i zmian fenotypu powierzchniowego limfocytów T CD4⁺ u pacjentów z PNN poddanych leczeniu powtarzanymi hemodializami wykazały, że:

- pacjenci hemodializowani nieleczeni epoetyną charakteryzują się zaburzeniami w proporcjach głównych subpopulacji limfocytów CD4⁺ *ex vivo* (obserwuje się wzrost odsetka komórek CD4⁺CD95⁺, CD4⁺HLA-DR⁺ przy jednoczesnym spadku komórek CD4⁺CD28⁺, CD4⁺CD69⁺);
- pacjenci leczeni epoetyną alfa cechują się prawidłowym odsetkiem komórek CD4⁺CD28⁺ oraz CD4⁺HLA-DR⁺ w porównaniu do pacjentów leczonych epoetyną beta, u których odsetek obu populacji jest zbliżony do obserwowanego u osób nieleczonych epoetyną.

Stymulacja izolowanych PBMC za pomocą przeciwciał anti-CD3 i anti-CD28 wykazała:

- obniżenia odsetka komórek CD4⁺CD28⁺ oraz CD4⁺CD69⁺ u pacjentów nieleczonych epoetyną;
- istnienie dodatniej korelacji pomiędzy obniżoną ekspresją antygenów aktywacyjnych CD28 i CD69 a obniżeniem odsetka odpowiednio: komórek CD4⁺CD28⁺ oraz CD4⁺CD69⁺ u pacjentów przed terapią epoetyną;
- u pacjentów nieleczonych epoetyną w pierwszych 72 godzinach stymulacji za pomocą przeciwciał znamiennie niższy odsetek proliferujących komórek CD4⁺CD28⁺;
- u pacjentów nieleczonych epoetyną dłuższy czas G₀→G₁ dla proliferujących komórek CD4⁺CD28⁺;
- istnienie ujemnej korelacji pomiędzy długim czasem G₀→G₁ a obniżoną ekspresją CD28 oraz CD69 na komórkach CD4⁺ u pacjentów nieleczonych epoetyną.

Pacjenci leczeni epoetyną charakteryzowali się:

- odsetkiem komórek CD4⁺CD28⁺ oraz CD4⁺CD69⁺ zbliżonym do wartości obserwowanych u osób zdrowych oraz poziomem antygenów CD28 i CD69 porównywalnym do poziomu tych antygenów u osób zdrowych;

- odsetkiem proliferujących komórek $CD4^+CD28^+$ a także czasem $G_0 \rightarrow G_1$ dla tych komórek zbliżonym do wartości obserwowanych u osób zdrowych.

Badania II cyklu mające na celu zidentyfikowanie receptora dla EPO na powierzchni wybranych komórek układu immunologicznego wykazały, że:

- receptor dla EPO jest obecny na: limfocytach T ($CD4^+$ i $CD8^+$), limfocytach B oraz monocytach;
- liczba cząsteczek EPO-R jest znamienne niższa na limfocytach $CD4^+$, $CD8^+$ oraz limfocytach B u pacjentów nieleczonych epoetyną w porównaniu do osób leczonych.

7. DYSKUSJA

Podawanie epoetyny pacjentom z przewlekłą niewydolnością nerek ma na celu korekcję niedokrwistości. Wiele obserwacji prowadzonych u chorych z PNN wskazuje na to, że hormon ten posiada również właściwości immunomodulacyjne. Epoetyna wpływa między innymi na poziom IL-10 oraz TNF- α . Poziom TNF- α ulega spadkowi w ciągu pierwszych tygodni od rozpoczęcia leczenia, podczas gdy poziom anty-zapalnej IL-10 wzrasta (Bryl, 1998). Ponadto epoetyna stymuluje syntezę IL-2 u osób przewlekle hemodializowanych (Bryl, 1999). Efekt ten był obserwowany *ex vivo* a także *in vitro*, zarówno po stymulacji za pomocą fitohemaglutaniny, jak i epoetyny w stężeniu zbliżonym do fizjologicznego (0,05 IU/ml). Powyższe badania wskazują na to, że poza właściwościami krwiotwórczymi erytropoetyna oddziałuje, jak dotąd w sposób niewyjaśniony, na komórki układu odpornościowego. Do tej pory niewiele było wiadomo na temat wpływu leczenia epoetyną na funkcjonowanie pomocniczych limfocytów T CD4⁺. U pacjentów z PNN komórki te najprawdopodobniej charakteryzują się jakimiś zaburzeniami, czego wyrazem jest spadek produkcji IL-2. Nie ma jednak żadnych danych dotyczących charakterystyki limfocytów CD4⁺ u pacjentów hemodializowanych a zagadnienie to jest istotne, ponieważ komórki te stanowią centrum odpowiedzi immunologicznej. Komórki CD4⁺ wydzielając różnorodne cytokiny wpływają na liczne procesy, np. oddziałują na limfocyty B, przez co stymulują ich proliferację i dojrzewanie w obecności antygeny (Clark, 1996). Regulują również funkcjonowanie cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺ i makrofagów (Gerloni, 2000). W związku z licznymi wątpliwościami dotyczącymi wpływu epoetyny na układ immunologiczny w I cyklu badań określono fenotyp i proliferację pomocniczych limfocytów T CD4⁺ u pacjentów z PNN poddanych leczeniu powtarzanymi hemodializami a także oceniono wpływ leczenia epoetyną na te komórki. Pacjenci i zdrowa kontrola zostali dobrani pod względem wieku, gdyż są prace wskazujące na zmianę proporcji komórek CD4⁺CD28⁺/CD4⁺CD28⁻ oraz spadek poziomu antygeny CD28 pod wpływem starzenia (Bryl, 2004).

Omówienie wyników I cyklu badań.

W I cyklu badań doświadczenia przeprowadzone *ex vivo* miały na celu ocenę proporcji głównych subpopulacji komórek CD4⁺ u pacjentów z PNN. U pacjentów z PNN wykazano wzrost odsetka komórek CD4⁺CD95⁺ oraz CD4⁺HLA-DR⁺, w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 9). Antygen CD95 (inaczej nazywany białkiem Fas) należy do tzw. receptorów „śmierci” i uważany jest za najistotniejszego przedstawiciela tej rodziny (Krueger, 2003). Aktywowany przez białko CD95L (FasL) tworzy z innymi białkami (kaspazą 8, kaspazą 10 oraz białkiem FADD) kompleks sygnalizacyjny indukujący śmierć komórki, tzw. DISC (ang. *death inducing signaling complex*) (Kischkel, 1995). U wszystkich pacjentów hemodializowanych zaobserwowano wzrost komórek CD4⁺CD95⁺ (Ryc. 9). Inni autorzy opisywali już wzrost poziomu CD95 w całej populacji limfocytów T pobranych od pacjentów hemodializowanych. Wzrost ten jest kojarzony ze zwiększonym odsetkiem komórek T ulegających apoptozie (Ankersmit, 2001). Z kolei, wykryty w prezentowanych badaniach wzrost odsetka komórek CD4⁺HLA-DR⁺ u pacjentów hemodializowanych świadczy o aktywacji komórek pomocniczych (Vilella, 1989). Wzrost komórek CD4⁺HLA-DR⁺ może być związany z przewlekłym stanem zapalnym, który jest obecny u pacjentów z PNN, w tym u chorych dializowanych (Isbel, 2001).

Kolejna zmiana obserwowana *ex vivo* dotyczyła zaburzeń proporcji komórek CD4⁺ wykazujących ekspresję białka kostymulującego CD28, które jest niezbędne dla zainicjowania prawidłowej odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów T (Bocko, 2002; Burr, 2001). U wszystkich pacjentów hemodializowanych zaobserwowano wzrost puli komórek CD4⁺CD28⁺, jednak w przypadku pacjentów nieleczonych epoetyną wzrost ten był największy (Ryc. 9). Wzrost odsetka krążących we krwi populacji komórek CD4⁺ charakteryzujących się brakiem tego ważnego kostymulatora może być wynikiem przewlekłego działania TNF- α , którego stężenie u pacjentów hemodializowanych jest znacznie podwyższone (Cavaillon, 1991; Herbelin, 1990). TNF- α wpływa na poziom antygeny CD28 hamując aktywność promotora dla genu CD28, czyli działając bezpośrednio na mechanizm transkrypcji tego genu (Bryl, 2001). Wpływ TNF- α na CD28 jest jednak odwracalny (Bryl, 2001) a u pacjentów hemodializowanych leczonych epoetyną obserwuje się przejściowy spadek poziomu tej cytokiny (Bryl, 1998). Prezentowane w tej pracy wyniki wskazują na to, że pacjenci z grupy leczonych epoetyną

wykazują tendencję do spadku odsetka komórek $CD4^+CD28^-$ na korzyść wzrostu puli komórek $CD4^+CD28^+$. Jednak mimo tego wyraźnego trendu, wartości nie osiągają tych obserwowanych u badanej grupie osób zdrowych. Dalsze analizy wykazały, że różnice te mogą zależeć od rodzaju stosowanej epoetyny. Pacjenci leczeni epoetyną alfa charakteryzowali się prawidłowym stosunkiem komórek $CD4^+CD28^+/CD4^+CD28^-$, podczas gdy pacjenci leczeni epoetyną beta charakteryzowali się obniżeniem odsetka komórek $CD4^+CD28^+$ na korzyść puli komórek $CD4^+CD28^-$ (Ryc. 10). Ta sama prawidłowość dotyczyła również populacji $CD4^+HLA-DR^+$, ponieważ pacjenci hemodializowani leczeni epoetyną beta charakteryzowali się także podwyższonym odsetkiem tej subpopulacji limfocytów w stosunku do osób zdrowych i pacjentów leczonych epoetyną alfa (Ryc. 11). W leczeniu niedokrwistości używane powszechnie są dwie formy rekombinowanej epoetyny: alfa i beta. Te rekombinowane hormony charakteryzują się różną ilością izoform, które są definiowane jako formy epoetyny o różnej ilości kwasu sialowego, który determinuje ładunek negatywny cząsteczki (Egrie, 2001). Epoetyna beta ma więcej izoform, w związku z tym charakteryzuje się wyższą aktywnością biologiczną, dłuższym okresem półtrwania a także krótszym czasem wiązania się z receptorem (Egrie, 2001). Mimo, że różnica w ilości kwasu wydaje się nie mieć żadnego znaczenia dla ilości hemoglobiny (nie wykazano różnic w poziomie hemoglobiny pomiędzy pacjentami leczonymi epoetyną alfa a leczonymi epoetyną beta), jednak najwyraźniej może mieć wpływ na właściwości immunomodulacyjne hormonu.

Pacjenci hemodializowani charakteryzowali się również spadkiem odsetka komórek $CD4^+CD69^+$ względem osób zdrowych (Ryc. 9). Białko CD69 jest tzw. antygenem aktywacyjnym wczesnym, który staje się cząsteczką kostymulującą, kiedy ulega ekspresji na powierzchni limfocyta T (Ziegler, 1994). Mimo, że nie został poznany ligand, z którym CD69 reaguje, antygen ten wydaje się odgrywać ważną rolę w trakcie aktywacji limfocytów T, choć nie jest cząsteczką niezbędną dla ich funkcjonowania (Lauzurica, 2000). Antygen CD69 wpływa m. in. na mobilizację wewnątrzkomórkowych zapasów wapnia oraz regulację syntezy cytokin i ich receptorów (Tugores, 1992). Ponadto aktywacja CD69 za pomocą przeciwciała anti-CD69 w kombinacji z aktywatorem białkowej kinazy C pobudza syntezę DNA i proliferację (Tugores, 1992). Obniżona ekspresja CD69 idąca w parze z obniżoną ekspresją antygeny CD28 mogłaby więc być

jednym z powodów obniżonej aktywności limfocytów T u chorych z PNN, czego następstwem są między innymi zaburzenia produkcji cytokin typu IL-2.

Reasumując, w badaniach *ex vivo* u chorych hemodializowanych wykazano zaburzenia w proporcjach głównych subpopulacji limfocytów CD4⁺ objawiające się wzrostem odsetka komórek CD4⁺CD95⁺, CD4⁺HLA-DR⁺ oraz spadkiem komórek CD4⁺CD28⁺, CD4⁺CD69⁺. Świadczy to o zakłóceniu równowagi immunologicznej u tych chorych. Stan ten może wynikać z kilku powodów. Jednym z nich jest zapewne wpływ narastającej z postępem choroby ilości toksyn mocznicowych, ale również przewlekłe hemodializy poprzez powtarzany kontakt z materiałami syntetycznymi, czyli tzw. plastycyzernami, do których zalicza się dializatory oraz dreny, przyczyniają się do powstania stanu zapalnego. Następstwem zaburzeń w subpopulacjach limfocytów CD4⁺ mogą być zaburzenia odpowiedzi limfocytów B, ale też limfocytów cytotoksycznych CD8⁺, co wynika z roli, jaką pełnią pomocnicze limfocyty CD4⁺. Komórki te są pobudzane przez komórki APC, co prowadzi do ich dalszego różnicowania się na różne subpopulacje (Th1 i Th2), które wpływają na odpowiedź typu komórkowego oraz humoralnego jednocześnie regulując wzajemny rozwój. Zaburzenia w odsetku poszczególnych subpopulacji charakteryzujących się obecnością różnych antygenów będą więc wpływały na jakość kontaktu z otaczającymi je innymi populacjami limfocytów, na poziom wydzielanych przez nie cytokin a także na ich dalszy rozwój.

W związku z obserwacjami dotyczącymi zmian ekspresji podstawowych antygenów aktywacyjnych limfocytów CD4⁺ *ex vivo*, zbadano też wpływ stymulacji mitogenowej na wybrane cząsteczki. Zmiany w ekspresji antygenów pełniących rolę kostymulujące czy aktywacyjne wskazują na zaburzenia funkcjonowania limfocytów T, co może się przekładać na odpowiedź tych komórek w obecności antygeny. Stymulacja limfocytów T przy użyciu przeciwciał anti-CD3 i anti-CD28 jest analogiczna do działania swoistego antygeny i sygnału kostymulującego w warunkach fizjologicznych. To pozwala obserwować, w jaki sposób zmieniają się dwa główne parametry czynnościowe limfocytów: fenotyp powierzchniowy oraz proliferacja w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Wykazano, że u pacjentów nieleczonych epoetyną, u których wcześniej *ex vivo* wykazano spadek odsetka komórek CD4⁺CD28⁺, dochodzi również do istotnego statystycznie obniżenia poziomu ekspresji antygeny CD28 na komórkach CD4⁺

w odpowiedzi na stymulację przeciwciałem anti-CD3 bądź jego mieszaniną z przeciwciałem anti-CD28 (Ryc. 13). Tymczasem u chorych leczonych epoetyną poziom ten był zbliżony do obserwowanego u osób zdrowych. Również sam odsetek komórek CD4⁺CD28⁺ w odpowiedzi na stymulację był obniżony u pacjentów nieleczonych (Ryc. 12) a spadek ten był skorelowany ze spadkiem poziomu CD28 (Ryc. 14), co świadczy o istniejącej między tymi parametrami zależności. Odsetek komórek i ekspresja antygeny stanowią dwa różne parametry. Przy niskim odsetku komórek można by było zaobserwować większą ekspresję danego antygeny, która mogłaby rekompensować w ten sposób spadek puli komórek danej subpopulacji limfocytów. Jednak u pacjentów nieleczonych epoetyną nie tylko dochodzi do spadku puli komórek CD4⁺CD28⁺, ale także spadku ekspresji antygeny CD28. Prawidłowy poziom CD28 jest niezbędny dla produkcji IL-2, gdyż związanie tego antygeny z antygenem CD86 na komórkach B jest jednym z ważniejszych czynników pobudzających produkcję tej cytokiny przez komórki T (Girndt, 2001; Jenkins, 1991). W wyniku interakcji pomiędzy CD28 a CD86 dochodzi do indukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych, które aktywują czynniki transkrypcyjne rozpoznające tzw. region CD28RE (ang. *CD28-responsive element*) w obrębie promotora genu kodującego IL-2 (Shapiro, 1997; Fraser, 1991). Zaobserwowana obniżona ekspresja antygeny CD28 może więc przyczyniać się do udokumentowanego wcześniej spadku poziomu IL-2 (Bryl, 1999).

Istnieje też teoria sugerująca, że obniżona ekspresja antygeny CD28 oraz spadek puli krążących we krwi limfocytów T charakteryzujących się jego obecnością na swojej powierzchni mogą mieć wpływ na odpowiedź pacjentów hemodializowanych na podawanie epoetyny (Cooper, 2003). Zła odpowiedź na epoetynę w dawce 296 ± 147 jednostek/kg/tydzień to, wg. Coopera i wsp., utrzymywanie poziomu hemoglobiny poniżej 10 g/dl. Podział badanej grupy pacjentów na tych, którzy dobrze odpowiadają na terapię i na tych, u których poziom hemoglobiny nie przekraczał 10g/dl mimo zastosowanego leczenia, nie wykazał różnic statystycznych w odsetku komórek CD4⁺CD28⁺/CD4⁺CD28⁻ oraz w poziomie ekspresji CD28 na komórkach CD4⁺, ani też żadnej korelacji z tymi parametrami. Ponadto dawki epoetyny stosowane w badanej grupie chorych były znacznie niższe niż w cytowanej pracy i stąd nie można porównywać uzyskanych wyników w kontekście odpowiedzi na lek jak również zmian immunologicznych. Cooper i wsp.

tłumaczy obecność komórek $CD4^+CD28^-$ stanem zapalnym u pacjentów hemodializowanych oraz sugeruje, że właśnie te komórki mogą być źródłem dużych ilości IFN- γ , jednej z cytokin hamujących wzrost progenitorów erytropoezy (Allen, 1999). Biorąc pod uwagę wyniki Coopera oraz uzyskane w prezentowanej pracy, wydaje się, że obniżona ekspresja antygenu CD28, będąca między innymi wynikiem stanu zapalnego, jest zjawiskiem występującym równoległe z gorszą odpowiedzią na epoetynę a nie przyczyną tejże gorszej odpowiedzi. Prawdopodobnie zarówno obniżona ekspresja CD28, jak i gorsza odpowiedź na epoetynę są skutkiem stanu zapalnego.

In vitro u pacjentów nieleczonych epoetyną dochodzi również do obniżenia poziomu ekspresji antygenu CD69 na komórkach $CD4^+$ w odpowiedzi na stymulację przeciwciałem anti-CD3 oraz jego mieszaniną z przeciwciałem anti-CD28 (Ryc. 16). Spadek ten jest dodatkowo skorelowany z obniżonym odsetkiem komórek $CD4^+CD69^+$ (Ryc. 17). Mamy więc do czynienia zarówno ze spadkiem puli komórek $CD4^+CD69^+$ (Ryc. 15), ale też i ze spadkiem poziomu ekspresji CD69 na powierzchni tychże komórek. Ta obserwacja zgadza się z obserwacjami *ex vivo*, które wykazały spadek odsetka komórek $CD4^+CD69^+$ u chorych nieleczonych epoetyną. Funkcja białka CD69 nie jest dokładnie poznana, ale wiadomo, że pełni rolę kostymulującą, kiedy ulega ekspresji na powierzchni komórki T. Wpływa na wewnątrzkomórkową sygnalizację między innymi poprzez mobilizację jonów wapnia (Tugores, 1992).

Wykazano również, że poziom antygenu CD40L u pacjentów nieleczonych epoetyną jest na poziomie obserwowanym u zdrowych, tymczasem u pacjentów leczonych przewlekłe epoetyną po 72 godzinach stymulacji za pomocą przeciwciał anti-CD3 i anti-CD28 jest on podwyższony (Ryc. 18). Podwyższony jest również odsetek komórek $CD4^+CD40L^+$ (Ryc. 19), co koreluje ze zmianą w ekspresji antygenu na powierzchni komórek $CD4^+$ (Ryc. 20). Obecność CD40L na powierzchni komórek $CD4^+$ jest istotnym czynnikiem pobudzającym limfocyty B do proliferacji i produkcji immunoglobulin (Clark, 1996). Oddziaływanie pomiędzy białkiem CD40L a CD40 jest też decydującym sygnałem dla formowania się limfocytów B pamięci immunologicznej i dziewiczych klonów (Gray, 1997), co jest istotne w przypadku wtórnego kontaktu organizmu z danym antygenem. Podwyższona ekspresja CD40L na tych komórkach mogłaby wraz z podwyższoną produkcją IL-10 przyczyniać się więc do poprawy odpowiedzi humoralnej u tych

pacjentów. Co więcej, podwyższona ekspresja białka, które pojawia się tylko na zaktywowanych limfocytach CD4⁺, u pacjentów leczonych epoetyną świadczy o bezpośrednim działaniu hormonu na którąś ze ścieżek sygnalizacyjnych w tych komórkach. Wydaje się to możliwe, jeśli spojrzymy na drogi sygnałów przekazywanych przez EPO-R. W progenitorach erytropoezy dochodzi pod wpływem EPO do stymulacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB (Sae-ung, 2005). Czynnikiem ten jest drugim, po czynniku transkrypcyjnym aktywowanych limfocytów T – NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*), ważnym białkiem regulującym ekspresję CD40L (Srahna, 2001). Zablockowanie jego wiązania do promotora genu kodującego antygen CD40L powoduje obniżenie ekspresji tego białka w aktywowanych limfocytach (Srahna, 2001). Sygnał przekazywany przez epoetynę za pośrednictwem EPO-R lub innego receptora z tej rodziny mógłby więc dodatkowo wzmacniać ekspresję CD40L poprzez ścieżkę sygnalizacyjną przechodzącą przez NF-κB. Kostymulacja poprzez antygen CD28 na limfocytach CD4⁺ również jest istotna dla ekspresji białka CD40L. Związane jest to z obecnością w promotorze genu kodującego CD40L regionu CD28RE (Parra, 2001), który wiąże różne czynniki transkrypcyjne przez co w znaczący sposób wydłuża czas ekspresji CD40L na powierzchni komórki (Johnson-Léger, 1998). Możliwe więc, że poprawa ekspresji antygeny CD28 u chorych leczonych epoetyną ma też wpływ na poziom ekspresji antygeny CD40L.

W chwili obecnej uważa się, że poprawa odpowiedzi immunologicznej po podaniu epoetyny nie ma bezpośredniego wpływu na wyniki przeszczepiania nerki, chociaż Vasquez i wsp. zaobserwowali częste opóźnione podjęcie funkcji przeszczepu w grupie chorych leczonych w okresie dializacyjnym epoetyną (Vasquez, 1996). W kontekście powyższych danych, podwyższony poziom antygeny CD40L, przynajmniej teoretycznie mógłby mieć wpływ na losy przeszczepianej nerki. Jednakże podstawowymi lekami zapobiegającymi odrzuceniu przeszczepionego organu są inhibitory kalcyneuryny (cyklosporyna A, takrolimus), które to poprzez blokowanie kalcyneuryny hamują fosfatazę aktywującą kluczowy dla indukcji transkrypcji genu kodującego antygen CD40L czynnik transkrypcyjny NF-AT (Fuleihan, 1994; Fruman, 1992). Wydaje się więc, że jest to skuteczny sposób na zniwelowanie efektu podwyższonej ekspresji tego białka u pacjentów leczonych epoetyną. Może należałoby zastanowić się, czy stosowanie protokołów immunosupresyjnych bez inhibitora kalcyneuryny, np. opartych na antymetabolitach typu

azatiopryna oraz inhibitorach kinazy mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*) takich jak sirolimus, jest również skuteczne w tym kontekście.

Kolejnym celem pracy była ocena proliferacji limfocytów T CD4⁺ u pacjentów z PNN poddanych leczeniu powtarzanymi hemodializami. Dotychczasowa ocena wpływu epoetyny na proliferację limfocytów T opierała się głównie na metodzie izotopowej, z oceną wbudowywania radioaktywnej tymidyny (Shurtz-Swirski, 1996). Przy pomocy tej metody można ocenić jedynie całkowitą zdolność komórek do wbudowywania tymidyny bez oceny fenotypowej komórek. Ponadto metoda ta nie pozwala na sprawdzenie, czy komórki się dzielą oraz jakie jest tempo tych podziałów. Metoda DCT opisana w rozdziale 3.3 wykorzystuje znacznik CFSE, który jest trwale wiązany przez białka znajdujące się w cytoplazmie i w czasie każdego podziału jest rozdzielany równomiernie do komórek potomnych (Hasbold, 1999). Cytometryczny pomiar fluorescencji komórek pozwala ocenić, ile razy limfocyty należące do danej populacji podzieliły się w określonym czasie. Użycie tej metody w prezentowanej pracy pozwoliło stwierdzić, że, poza znamienne niższym współczynnikiem proliferacji (Ryc. 21), pacjenci nieleczeni epoetyną charakteryzują się niższym odsetkiem komórek CD4⁺CD28⁺ proliferujących w odpowiedzi na stymulację za pomocą przeciwciała anti-CD3 bądź jego kombinacji z przeciwciałem anti-CD28 w porównaniu do osób zdrowych i chorych leczonych epoetyną (Ryc. 22). Co ciekawe, niższy odsetek komórek CD4⁺CD28⁺ proliferujących obserwowany był jedynie w pierwszych 72 godzinach hodowli, podczas gdy po 120 godzinach te różnice zanikały. Dalsze obliczenia wykazały, że spadek odsetka komórek dzielących się może być następstwem obniżonego poziomu ekspresji antygenów CD28 oraz CD69, gdyż wykazano zależność pomiędzy tymi zmiennymi (odpowiednio Ryc. 23 i 24). Użycie programu Progeny[®] 16.3 pozwoliło obliczyć wiele parametrów opisujących cykl komórkowy, między innymi czas przejścia z fazy G₀ (fazy spoczynku komórek) do fazy G₁ (pierwszej fazy cyklu komórkowego). Okazało się, że komórki CD4⁺CD28⁺ od pacjentów nieleczonych epoetyną charakteryzowały się dłuższym czasem przejścia z fazy G₀ do G₁ (Ryc. 25) i również ta zmienna była skorelowana z obniżoną ekspresją CD28 oraz CD69 u tych pacjentów (odpowiednio Ryc. 27 i 28). Jest to pierwsze tego typu badanie dotyczące zmian w proliferacji limfocytów T CD4⁺ u pacjentów hemodializowanych. Potwierdziło ono wcześniejsze obserwacje dotyczące obniżonej proliferacji całej populacji limfocytów T u

chorych nieleczonych epoetyną (Shurtz-Swirski, 1996), ale pozwoliło również wykazać związek między ekspresją antygenów CD28 oraz CD69 a czasem pomiędzy fazą G_0 a G_1 . Niższy u pacjentów nieleczonych epoetyną poziom antygeny CD28 może zatem wpływać na proliferację populacji limfocytów $CD4^+CD28^+$ poprzez wydłużenie czasu $G_0 \rightarrow G_1$, co jest zgodne z teorią sumowania się sygnałów aktywacyjnych (Lanzavecchia, 2001). Istnienie zależności pomiędzy parametrami proliferacyjnymi limfocytów $CD4^+$ u pacjentów nieleczonych epoetyną a niskim poziomem ekspresji antygeny CD69 zdaje się potwierdzać wpływ kostymulacji poprzez ten antygen na proliferację limfocytów T (Tugores, 1992). Potwierdza to też obserwacja zmiany dynamiki proliferacji w tej populacji w kierunku normalizacji badanych parametrów u pacjentów leczonych epoetyną, którzy charakteryzują się prawidłowym poziomem ekspresji CD28 i CD69. Antygen CD28, jak wspomniano wcześniej, jest ważną cząsteczką kostymulującą, która dostarcza dodatkowych sygnałów aktywacyjnych. Wykazano, że obok sygnału z kompleksu TCR/CD3 dopiero kostymulacja poprzez ten antygen powoduje nie tylko wzrost ekspresji cykliny D3 (cykliny fazy G_1), ale także wzrost aktywności enzymatycznej czwartej kinazy cyklino-zależnej (CDK4 – *cyklin-dependent kinase 4*), czyli białek umożliwiających przejście komórki z jednej fazy cyklu komórkowego do drugiej (Appleman, 2002). Kostymulacja ta jest również niezbędna dla obniżenia poziomu białka $p27^{kip1}$, które jest inhibitorem kinaz cyklino-zależnych (Appleman, 2002). Efekty te są zależne od ścieżek z udziałem kinazy 3-fosfatydyloinozytoli (PI3K – *phosphatidylinositol 3-kinase*) oraz kinazy MEK (kinazy kinaz MAPK/ERK – *mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases*) (Appleman, 2002).

Otrzymane wyniki wspierają dotychczasowe obserwacje sugerujące, że leczenie za pomocą epoetyny może wywierać wpływ na różne elementy układu immunologicznego, dzięki czemu mamy do czynienia z ogólną poprawą w zakresie odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Wykazane przez Trzonkowskiego i wsp. obniżenie odsetka komórek $CD8^+CD152^+$ w odpowiedzi na leczenie epoetyną powoduje uwolnienie białek CD80/CD86 na APC (Trzonkowski, 2002). Z kolei spadek poziomu TNF- α (Bryl, 1998) jest prawdopodobnie jedną z przyczyn wzrostu ekspresji antygeny CD28 u pacjentów leczonych epoetyną, który to wzrost wykazano w tej pracy. Trzonkowski i wsp.

przedstawili natomiast badania wskazujące również na wzrost puli naiwnych komórek T CD8⁺ charakteryzujących się obecnością CD28 (Trzonkowski, 2007). Limfocyty CD4⁺ o prawidłowym poziomie antygeny CD28 mogą prawidłowo reagować na pojawienie się antygeny bądź mitogenu, co przejawia się poprawą ich proliferacji wykazaną w prezentowanej pracy a także wzrostem produkcji IL-2 (Bryl, 1999). Wiele innych badań potwierdza, że kilkumiesięczne leczenie epoetyną zwiększa stosunek komórek CD4⁺ do komórek CD8⁺ (Yorioka, 1993), poprawia produkcję immunoglobulin (Kimata, 1991), co prawdopodobnie wynika z podwyższenia poziomu IL-10 oraz poprawy w zakresie odpowiedzi limfocytów T. Mimo różnych doniesień, wciąż niewiele jest wiadomo na temat mechanizmów, które rządzą obserwowanymi zmianami. W ten sposób dochodzimy do pytania, czy poprawę odpowiedzi immunologicznej można tłumaczyć samą korekcją niedokrwistości, czy epoetyna rzeczywiście wykazuje jakiś bezpośredni wpływ na komórki układu odpornościowego? Stopniowa poprawa w zakresie odpowiedzi immunologicznej była obserwowana wraz ze wzrostem poziomu hemoglobiny po podaniu epoetyny, ale również pod wpływem przetoczenia czerwonych krwinek (Gaftor, 1994). Jednak praca Prutchi-Sagiv i wsp. (Prutchi-Sagiv, 2006) wykonana u pacjentów ze szpiczakiem mnogim nieleczonych i leczonych epoetyną, ale charakteryzujących się zbliżonymi parametrami morfologicznymi, wykazała, że poprawa odpowiedzi immunologicznej nie jest zależna tylko od prawidłowego poziomu hemoglobiny. Poprawa ta polega na polepszeniu proliferacji mononuklearnych komórek krwi obwodowej i wzroście odsetka komórek CD8⁺CD28⁺. Autor również zastanawia się nad tym, w jaki sposób może działać epoetyna, czy jest to efekt pośredni czy bezpośredni. Hodowla limfocytów *in vitro* w obecności różnych dawek epoetyny nie wykazała jednak żadnego wpływu na aktywację i proliferację limfocytów, co potwierdzają również obserwacje przedstawione w obecnej pracy.

Zaprezentowane wyniki I cyklu badań dowiodły, że u pacjentów z PNN przewlekle hemodializowanych mamy do czynienia z zaburzeniami w proporcjach głównych subpopulacji limfocytów CD4⁺ *ex vivo* objawiające się wzrostem odsetka komórek CD4⁺CD95⁺, CD4⁺HLA-DR⁺ oraz spadkiem komórek CD4⁺CD28⁺, CD4⁺CD69⁺, co potwierdza dotychczasowe obserwacje wskazujące na zakłócenia równowagi immunologicznej w tej grupie chorych. Co więcej, badania *in vitro* polegające na

stymulacji limfocytów przeciwciałami anti-CD3 oraz anti-CD28 wykazały obniżenie ekspresji antygenów aktywacyjnych CD28 i CD69 u pacjentów nieleczonych epoetyną. Tymczasem ekspresja tych antygenów u pacjentów leczonych długo epoetyną była zbliżona do tej obserwowanej u osób zdrowych. Subpopulacja komórek CD4⁺CD28⁺ pacjentów nieleczonych epoetyną charakteryzowała się dłuższym czasem G₀→G₁, co wydaje się leżeć u podstaw obniżonej proliferacji tych komórek.

Omówienie wyników II cyklu badań.

Z punktu widzenia fizjologii rola erytropoetyny polega przede wszystkim na promowaniu przeżycia komórek macierzystych erytrocytów. Wydaje się jednak, że hormon ten może wywierać wpływ również na ścieżki sygnalizacyjne limfocytów, czego odzwierciedleniem są korzystne zmiany w układzie immunologicznym hemodializowanych pacjentów. Wpływ ten mógłby być pośredni – poprzez działanie na komórki krwi obwodowej, np. granulocyty, monocyty. Erytropoetyna działając na te komórki poprzez receptor mogłaby modulować ich aktywność, produkcję cytokin i w ten sposób wpływać na limfocyty. Wpływ bezpośredni mógłby się odbywać przez receptor na powierzchni limfocytów, np. EPO-R lub podjednostkę beta receptora dla IL-2. Receptor dla IL-2 charakteryzuje się obecnością konserwowanej ewolucyjnie sekwencji aminokwasowej w domenie cytoplazmatycznej, która jest niezbędna dla przekazywania sygnału do jądra komórki (Tilbrook, 1999; Ihle, 1995). Ekspresja EPO-R na powierzchni komórek układu odpornościowego może być na tyle niska, że dostępne do tej pory metody nie były wystarczające do jej wykrycia. Na możliwość istnienia EPO-R na limfocytach wskazuje również fakt, iż kontakt epoetyny z komórkami linii limfoidalnych aktywuje czynnik STAT5 (Pallard, 1995) oraz NF-κB (Sae-ung, 2005). W związku z tym w II cyklu badań podjęto próbę wykrycia EPO-R na limfocytach T, B oraz monocytach metodą cytometrii przepływowej przy użyciu monoklonalnego przeciwciała przeciwko temu receptorowi. Poziom receptora badano u pacjentów leczonych oraz nieleczonych epoetyną a także w grupie zdrowych ochotników. Na rycinie 29 zostały przedstawione reprezentatywne histogramy uzyskane od pacjenta hemodializowanego, na których przedstawiono poziom ekspresji EPO-R na populacjach limfocytów T i B oraz monocytów. Komórki K562 stanowią pozytywną kontrolę ze względu na potwierdzoną

w piśmiennictwie obecność EPO-R na swojej powierzchni (Abdel-Mageed, 2003). EPO-R został wykryty na limfocytach T ($CD4^+$ oraz $CD8^+$), limfocytach B (oznaczanych jako komórki $CD19^+$) oraz monocytach (oznaczanych jako komórki $CD14^+$), zarówno u osób zdrowych, jak i chorych na PNN. Zastosowanie czułego testu Kołmogorowa-Smirnowa dla dwóch prób pozwoliło wykazać, że całe populacje wybranych komórek są pozytywne pod względem obecności receptora. Metoda ilościowej cytometrii przepływowej z użyciem ziaren kalibracyjnych (metoda opisana w rozdziale 3.5.3) pozwoliła oszacować liczbę cząsteczek EPO-R na powierzchni pojedynczej komórki w poszczególnych populacjach limfocytów. Okazało się, że liczba cząsteczek EPO-R we wszystkich badanych grupach była skrajnie niska, co tłumaczyłoby, czemu jest tak trudna do wykrycia. Użycie jednak analizy wykorzystującej oprogramowanie CellQuest (Becton Dickinson, USA) pozwoliło oznaczyć liczbę EPO-R z dokładnością do 2 cząsteczek na pojedynczej komórce. Średnia liczba cząsteczek receptora u wszystkich badanych osób (zarówno chorych, jak i zdrowych) wahała się od 12.06 ± 10.50 dla limfocytów $CD4^+$ do 102.44 ± 88.87 dla monocytów. Ta obserwacja sugeruje, że, po pierwsze, liczba cząsteczek może się różnić w sposób osobniczy a, po drugie, jest ona różna dla różnych populacji komórek, co może się przekładać na różną rolę, jaką pełni EPO-R w tychże komórkach. Trzeba jednak pamiętać, że okres półtrwania receptora wynosi około 45-60 minut (Neumann, 1993) – bardzo krótko, jeśli porównać go do okresu półtrwania innych znanych receptorów, np. dla insuliny, która jest degradowana dopiero po 7-10 godzinach (Knutson, 1991). Najprawdopodobniej to jest głównym powodem wykrywania EPO-R w tak małych ilościach na powierzchni komórek i w tak małym odsetku (5%) komórek macierzystych erytrocytów (Youssoufian, 1993). Nie wykryto korelacji pomiędzy poziomem hemoglobiny bądź liczbą czerwonych krwinek a liczbą cząsteczek EPO-R, natomiast analiza statystyczna wykazała, że na limfocytach $CD4^+$, $CD8^+$ od pacjentów nieleczonych epoetyną liczba cząsteczek receptora jest niższa w porównaniu do pacjentów leczonych epoetyną (Ryc. 30). Niższa była również w stosunku do osób zdrowych, jednak różnica ta nie była znamienne statystycznie, co może wynikać z tego, że grupy badane nie były wystarczająco liczne. Znamienne niższa była również liczba EPO-R na limfocytach B u pacjentów nieleczonych epoetyną w porównaniu do pacjentów leczonych epoetyną (Ryc. 30). Liczba EPO-R na monocytach i limfocytach B od osób zdrowych była na poziomie zbliżonym do

obserwowanego u chorych nieleczonych epoetyną (Ryc. 30). Ta obserwacja sugeruje występowanie związku pomiędzy liczbą cząsteczek receptora na powierzchni tych komórek a dostępnością epoetyny krążącej we krwi. Prawidłowe stężenie EPO w surowicy wynosi 10-30 mU/ml (Więcek, 2001). Jednak u pacjentów z PNN stężenie EPO może być zbliżone do tego obserwowanego u osób zdrowych (Więcek, 2001). Stężenie EPO u chorych leczonych mogłoby być wyższe nie tylko od stężenia obserwowanego u chorych nieleczonych, ale także również tego charakteryzującego osoby zdrowe. Możliwe więc, że podana epoetyna wiążąc się z tą niewielką liczbą EPO-R na powierzchni limfocytów dostarcza sygnału, który w końcowym etapie przyczynia się do wzrostu ekspresji receptora. Powyższe rozważania jednak nie tłumaczą w pełni, czemu na limfocytach T od osób zdrowych liczba EPO-R również jest wysoka, podczas gdy na limfocytach B i monocytach od tych samych osób jest na takim samym poziomie, jak u chorych nieleczonych epoetyną. Prawdopodobnie przeprowadzenie badań w większych grupach chorych pozwoliłoby na wyjaśnienie tych wątpliwości.

Poziom ekspresji genu EPO-R nie jest na poziomie zbliżonym do poziomu ekspresji genu dla β -aktyny (Ryc. 32), ale świadczy o obecności pewnej ilości mRNA w komórce. Jednak ilość materiału genetycznego nie przekłada się na poziom białka. Może być więc tak, że sygnał od epoetyny jest niezbędny dla pobudzenia procesu translacji, czego rezultatem jest przejściowy wzrost ekspresji EPO-R na powierzchni komórki, co widzimy w postaci wzrostu liczby cząsteczek EPO-R na limfocytach od pacjentów poddanych terapii. Trzeba też wziąć pod uwagę to, że okres półtrwania receptora jest krótki, więc może czas pomiędzy pobraniem krwi od pacjenta a inkubacją z przeciwciałem przeciwko EPO-R jest zbyt długi, by uzyskać pełną informację o faktycznym poziomie ekspresji receptora. Wydaje się jednak, że nawet przy tak niewielkiej liczbie EPO-R na komórkach układu immunologicznego pełni jakąś funkcję. W każdym razie jest w stanie związać epoetynę. Hodowanie limfocytów *ex vivo* przez godzinę z epoetyną przed oznaczaniem ilości EPO-R oraz analiza porównawcza z ekspresją receptora na tych samych komórkach nieinkubowanych z hormonem wykazała, że w poszczególnych populacjach komórek dochodzi do statystycznie znamiennej spadku liczby EPO-R (Ryc. 31). Może to być wynik rywalizacji przeciwciała skierowanego przeciwko EPO-R, w celu oznaczenia liczby cząsteczek receptora na komórkach, z epoetyną o miejsce wiązania, albo efekt degradacji

zaktywowanego receptora przez proteosomy i lizosomy. Obserwacja ta w żadnym wypadku nie zaprzecza powyższym wynikom, w których wykazano wzrost liczby EPO-R na limfocytach u pacjentów leczonych epoetyną. Doświadczenie miało wykazać, że EPO-R jest w stanie wiązać epoetynę. Badania Walrafena i wsp. wykazały, że w następstwie stymulacji epoetyną w ciągu 30 minut dochodzi do tzw. internalizacji, czyli usunięcia EPO-R z błony komórkowej oraz aktywacji proteosomów i lizosomów, których enzymy następnie rozkładają receptor (Walrafen, 2005). Tymczasem podwyższona ekspresja EPO-R na limfocytach u pacjentów długo leczonych epoetyną może rezultatem ciągłych interakcji pomiędzy hormonem a receptorem, w wyniku których dochodzi do aktywacji ścieżek sygnalizacyjnych pobudzających między innymi transkrypcję bądź translację genu *EPO-R*. Wykazano już wpływ stymulacji epoetyną w warunkach hipoksji na wzrost stężenia mRNA genu *EPO-R* w komórkach śródbłonna (Beleslin-Cokic, 2004) oraz w komórkach czerniaka (Kumar, 2006).

Dalsza analiza wykazała obecność w każdej badanej populacji niskiego odsetka komórek charakteryzujących się wysoką liczbą cząsteczek EPO-R na swojej powierzchni w porównaniu do reszty komórek. W tabeli 7 przedstawiono odsetki poszczególnych populacji limfocytów T ($CD4^+$ oraz $CD8^+$), limfocytów B i monocytów, u których mediana liczby cząsteczek EPO-R wyniosła około 2000. Co więcej, odsetki te nie różniły się pomiędzy badanymi grupami, ale wykazano, że subpopulacje limfocytów $CD4^+$ oraz monocytów pacjentów leczonych epoetyną mają znamienne więcej cząsteczek EPO-R na swojej powierzchni w porównaniu do osób zdrowych. To po raz kolejny potwierdza istnienie związku między dostępnością epoetyny a liczbą EPO-R na powierzchni tych komórek oraz dodatkowo wnioskuje o istnieniu jakiejś grupy komórek układu immunologicznego o szczególnej funkcji zależnej od erytropoetyny. Wydaje się, że podana epoetyna dostarcza kluczowego sygnału, który ma wpływ na liczbę cząsteczek receptora na limfocytach i monocytach.

Wyniki otrzymane w II cyklu badań dowiodły, że limfocyty T oraz B a także monocyty charakteryzują się obecnością funkcjonalnego receptora dla EPO. Obserwacja ta dotyczyła zarówno osób zdrowych, jak i chorych na PNN. Co więcej, wydaje się, że na liczbę cząsteczek EPO-R na powierzchni komórek układu odpornościowego wpływa wiele

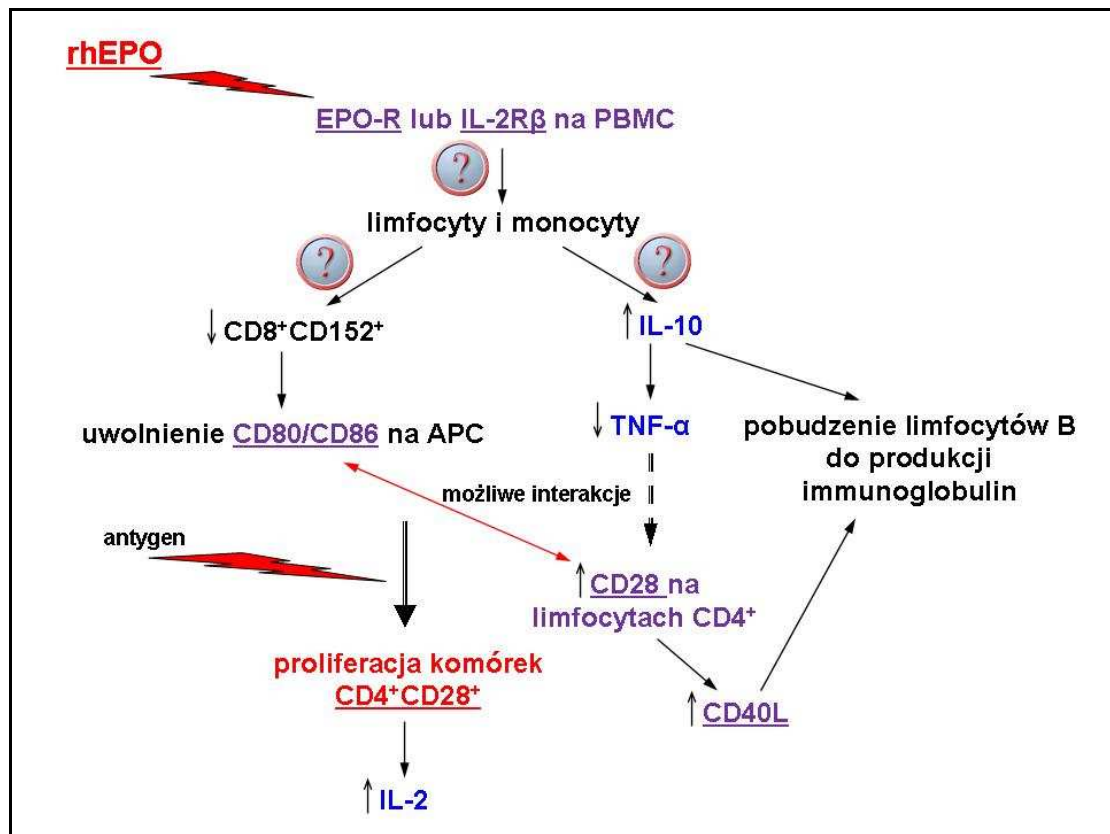
czynników, wśród których należy wymienić dostępność epoetyny krążącej we krwi oraz, być może, uwarunkowania osobnicze. To ostatnie stwierdzenie podyktowane jest obserwacją, że wśród badanych osób (chorych oraz zdrowych) były takie, u których w danej populacji komórek nie wykrywano EPO-R. Na uwagę zasługuje również obserwowane zwiększenie liczby EPO-R na komórkach układu immunologicznego u pacjentów leczonych epoetyną przez dłuższy okres czasu (ponad 6 miesięcy).

Wykazanie obecności funkcjonalnego receptora dla erytropoetyny na limfocytach CD4⁺ dowodzi, że hormon ten mógłby bezpośrednio modulować ścieżki sygnalizacyjne tych komórek. Również inne komórki układu immunologicznego charakteryzują się obecnością EPO-R na swojej powierzchni. Co więcej, limfocyty T oraz B pacjentów nieleczonych epoetyną charakteryzują się niską liczbą cząsteczek EPO-R w porównaniu do pacjentów długo otrzymujących hormon, co sugeruje występowanie zależności pomiędzy jego dostępnością we krwi a ilością receptora na powierzchni limfocytów.

Przypuszczalny mechanizm działania epoetyny w układzie immunologicznym.

Przypuszczalny schemat funkcjonowania epoetyny w układzie immunologicznym został przedstawiony na rycinie 33. Leczenie epoetyną wpływa na obniżenie odsetka komórek CD8⁺CD152⁺, co powoduje uwolnienie antygenów CD80/CD86 na APC (Trzonkowski, 2002). Kolejnym następstwem leczenia jest wzrost stężenia IL-10 przy jednoczesnym spadku stężenia TNF- α (Bryl, 1998) który może przyczyniać się do wzrostu ekspresji antygeny CD28 na limfocytach CD4⁺, który to wzrost wykazano w tej pracy. Limfocyty CD4⁺ o prawidłowym poziomie antygeny CD28 mogą prawidłowo reagować na pojawienie się antygeny bądź mitogenu, co przejawia się poprawą ich proliferacji wykazaną w prezentowanej pracy a także wzrostem produkcji IL-2 (Bryl, 1999). Wzrost stężenia IL-10 może być jednym z czynników stymulujących ludzkie komórki B do produkcji przeciwciał (Itoh, 1995). Mamy więc do czynienia z wieloma mechanizmami poprawy odpowiedzi immunologicznej u pacjentów leczonych epoetyną, czego klinicznym wyrazem jest polepszenie odpowiedzi komórkowej, humoralnej oraz nieswoistej badanych osób. Możliwe więc, że hormon ten w układzie odpornościowym naśladuje działanie innych cytokin, tym samym modulując odpowiedź pomocniczych limfocytów T CD4⁺. Takie wielokierunkowe działanie erytropoetyny jest możliwe najprawdopodobniej dzięki

obecności receptora na komórkach układu immunologicznego. Niewykluczone jednak, że erytropoetyna działa również poprzez inne receptory z rodziny receptorów cytokin typu I, które charakteryzują się obecnością podobnych sekwencji odpowiedzialnych za wiązanie liganda oraz przekazują sygnał poprzez system JAK2-STAT5 (Klingmüller, 1996; Witthuhn, 1993). Konieczne są jednak dalsze badania, które będą w stanie wyjaśnić, w jaki sposób erytropoetyna może modulować aktywność limfocytów T CD4⁺. Pytania, jakie należy sobie przedstawić, zostały przedstawione na rycinie 33. Po pierwsze, należy wyjaśnić, czy rzeczywiście EPO jest w stanie modulować ścieżki sygnalizacyjne limfocytów T i na jakiej zasadzie to się odbywa. Nie wyjaśniono też, w jaki sposób epoetyna moduluje stężenia cytokin (IL-10, TNF- α). Można jedynie przypuszczać, że hormon ten rzeczywiście jest w stanie modyfikować odpowiedź, nie tylko pomocniczych limfocytów T CD4⁺, ale i cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺ a także limfocytów B oraz monocytów.



Rycina 33. Proponowany schemat reakcji układu immunologicznego na podanie epoetyny.

8. WNIOSKI

1. Pacjenci z PNN przewlekle hemodializowani charakteryzują się zaburzeniami w proporcji głównych subpopulacji limfocytów T CD4⁺ *ex vivo*.
2. Pacjenci nieleczeni epoetyną charakteryzują się obniżoną ekspresją antygenów CD28 oraz CD69 a także niższym odsetkiem komórek CD4⁺CD28⁺ proliferujących w odpowiedzi na stymulację mitogenową.
3. Leczenie za pomocą epoetyny wydaje się wpływać korzystnie na zaburzenia funkcjonowania limfocytów T CD4⁺, bowiem u chorych leczonych obserwuje się prawidłowy poziom ekspresji antygenów CD28 oraz CD69 oraz właściwe parametry proliferacyjne.
4. Receptor dla EPO jest obecny na:
 - a) limfocytach T: CD4⁺ i CD8⁺;
 - b) limfocytach B;
 - c) monocytach.
5. Obecność EPO-R na różnych komórkach układu immunologicznego może tłumaczyć immunomodulujące działanie epoetyny.

STRESZCZENIE

U pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek (PNN) obserwuje się zaburzenia funkcjonowania układu immunologicznego, które przejawiają się między innymi nadmierną produkcją cytokin prozapalnych TNF- α , IL-1 czy IL-6 a także obniżoną produkcją IL-2 oraz IFN- γ w przypadku pomocniczych limfocytów T CD4⁺. Klinicznym wyrazem upośledzonej funkcji układu immunologicznego chorych z PNN jest słaba zdolność do produkcji przeciwciał w odpowiedzi na szczepienia oraz większa predyspozycja do różnych zakażeń. Przypuszcza się, że ten defekt limfocytów B w jakimś stopniu może zależeć od zaburzeń funkcjonowania limfocytów CD4⁺. Nie ma jednak żadnych danych dotyczących charakterystyki limfocytów CD4⁺ u pacjentów hemodializowanych oraz wpływu leczenia epoetyną na ekspresję ich antygenów aktywacyjnych i kostymulujących, które są niezbędne dla kontaktu z innymi komórkami. Wiadomo jednak, że epoetyna stymuluje syntezę IL-2 i IL-10 u osób przewlekle hemodializowanych a limfocyty B chorych leczonych charakteryzują się poprawą proliferacji oraz zwiększoną produkcją immunoglobulin.

Celem prezentowanej pracy była ocena zaburzeń proliferacji i zmian fenotypu powierzchniowego limfocytów T CD4⁺ u pacjentów z PNN poddanych leczeniu powtarzanymi hemodializami oraz wpływu leczenia za pomocą epoetyny na zmiany czynnościowe tychże limfocytów. Niewiadomo, czy zwiększona produkcja cytokin mogłaby być wyrazem bezpośredniego działania epoetyny na limfocyty, w związku z tym podjęto też próbę identyfikacji receptora dla EPO na powierzchni wybranych komórek układu immunologicznego.

Dzięki zastosowaniu metody cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko wybranym antygenom powierzchniowym wykazano, że pacjenci hemodializowani charakteryzują się zaburzeniami w proporcjach głównych subpopulacji limfocytów CD4⁺ *ex vivo*. Obserwowano wzrost odsetka komórek CD4⁺CD95⁺, CD4⁺HLA-DR⁺ przy jednoczesnym spadku komórek CD4⁺CD28⁺, CD4⁺CD69⁺. Stymulacja izolowanych komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej za pomocą przeciwciał anti-CD3 i anti-CD28 dowiodła obniżenia odsetka komórek CD4⁺CD28⁺ oraz CD4⁺CD69⁺ u pacjentów nieleczonych epoetyną. U tych samych

chorych istniała dodatnia korelacja pomiędzy obniżoną ekspresją antygenów CD28 i CD69 a obniżonym odsetkiem odpowiednio: komórek CD4⁺CD28⁺ oraz CD4⁺CD69⁺. U tych też pacjentów w pierwszych 72 godzinach stymulacji za pomocą przeciwciał występował znamienne niższy odsetek proliferujących komórek CD4⁺CD28⁺. Komórki te charakteryzował dłuższy czas G₀→G₁ a ujemna korelacja pomiędzy tym czasem a obniżoną ekspresją CD28 i CD69 wskazywała na zależność między tymi zmiennymi.

Pacjenci leczeni epoetyną charakteryzowali się zbliżonym do wartości obserwowanych u osób zdrowych zarówno odsetkiem komórek CD4⁺CD28⁺ oraz CD4⁺CD69⁺, jak i poziomem antygenów CD28 i CD69. Również odsetek proliferujących komórek CD4⁺CD28⁺ a także czas G₀→G₁ komórek pacjentów leczonych epoetyną był zbliżony do wartości obserwowanych u osób zdrowych.

Następnie podjęto się próby wykrycia receptora dla EPO (EPO-R) na komórkach układu immunologicznego. Metodą cytometrii przepływowej zidentyfikowano EPO-R na powierzchni limfocytów CD4⁺, CD8⁺, limfocytów B oraz monocytów. Za pomocą techniki RT-PCR dodatkowo potwierdzono obecność aktywnie transkrybowanego genu kodującego EPO-R w limfocytach CD4⁺ a także w całej populacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej. Wykazano, że limfocyty CD4⁺, CD8⁺ oraz limfocyty B od pacjentów nieleczonych epoetyną charakteryzują się znamienne niższą liczbą cząsteczek EPO-R na swojej powierzchni w stosunku do chorych leczonych.

Na podstawie powyższych wyników stwierdzono, że leczenie epoetyną wpływa korzystnie na ekspresję antygeny CD28 oraz antygenów aktywacyjnych limfocytów T CD4⁺ u pacjentów z PNN zarówno *ex vivo* jak i *in vitro*. Konsekwencją obniżonej ekspresji CD28 u pacjentów nieleczonych epoetyną wydaje się być osłabiona proliferacja komórek CD4⁺CD28⁺ w odpowiedzi na stymulację mitogenową. EPO-R jest obecny na komórkach układu immunologicznego (zarówno na limfocytach T i B, jak i monocytach). Wzrost jego liczby na limfocytach T CD4⁺ u pacjentów leczonych epoetyną może tłumaczyć immunomodulujące działanie tego hormonu.

ABSTRACT

Patients with chronic renal failure (CRF) present an impaired immunological response, which occur as high level of proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1 and IL-6. At the same time deficient reactions of T lymphocytes described as decreased IL-2 and IFN- γ production are observed. Immunological imbalance leads to increased incidences of infections, which are the result of disturbances of B lymphocytes' function. Decreased B lymphocytes' proliferation and immunoglobulins' production could, at least in some part, depend on T CD4⁺ lymphocytes that are involved in both cell-mediated and humoral immune responses. There is still little known about influence of epoietin therapy on the expression of the activation antigens and proliferation of T lymphocytes. What we know is that epoietin is able to restore IL-2 and IL-10 production. Probably it can also influence phenotype and proliferation of T lymphocytes.

The purpose of the presented study was to investigate disturbances of the T CD4⁺ lymphocytes' surface phenotype and proliferation and response to epoietin therapy in maintenance hemodialysis (HD) patients. Nobody knows if the increased cytokines' production could be a result of direct stimulation of lymphocytes by epoietin that is why the possibility of expression of EPO-R on human lymphocytes and monocytes was investigated.

The expression of chosen surface antigens on the T CD4⁺ lymphocytes was measured with flow cytometry. *Ex vivo*, HD patients presented disturbances in lymphocytes' subpopulation. We observed a significantly higher percentage of CD4⁺CD95⁺, CD4⁺HLA-DR⁺ cells and lowered percentage of CD4⁺CD69⁺ and CD4⁺CD28⁺ cells, when compared to healthy control. Lymphocytes obtained from patients not receiving epoietin, presented decreased expressions of CD28 in response to stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. CD69 expression on lymphocytes was also decreased after mitogen stimulation in that group of patients, when compared to patients receiving epoietin and healthy control. Percentage of CD4⁺CD28⁺ cells proliferating after stimulation with mitogens was also decreased in case of patients not receiving epoietin. Calculation of time between G₀ and G₁ phase revealed that those cells were characterized by longer time G₀→G₁, what was negatively correlated with lowered expression of CD28 and CD69 in that group of patients.

Contrary to patients not receiving epoietin, lymphocytes obtained from patients treated with that hormone presented level of antigens' expression similar to that observed in healthy control. Also, percentage of CD4⁺CD28⁺ cells proliferating after stimulation with mitogens was comparable with that of healthy control.

Again, using quantitative flow cytometry, populations of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, B lymphocytes and monocytes demonstrating some level of EPO-R expression on their surface were discovered. Expression of transcribed EPO-R coding gene was confirmed with RT-PCR method. Statistical analysis revealed that patients not receiving epoietin were characterized by decrease in number of EPO-R on CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes and B lymphocytes when compared to patients receiving epoietin.

Presented study revealed that epoietin therapy influences activation parameters of T CD4⁺ lymphocytes obtained from CRF patients, both *ex vivo* and *in vitro*. One of the consequences of CD28 decreased expression on CD4⁺ lymphocytes in patients not receiving epoietin could be a decrease in percentage of proliferating CD4⁺CD28⁺ subpopulation in response to mitogen stimulation. Expression of EPO-R on T and B lymphocytes and monocytes together with its increased expression on CD4⁺ population of patients treated with epoietin may be responsible for immunomodulating properties of epoietin.

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Mageed, A. B., Zhao, F., Rider, B. J., Agrawal, K. C. 2003. Erythropoietin-induced metallothionein gene expression: Role in proliferation of K562 cells. *Exp. Biol. Med.* 228: 1033-1039.
- Allen, D. A., Breen, C., Yaqoob, M. M., Macdougall, I. C. 1999. Inhibition of CFU-E colony formation in uremic patients with inflammatory disease: Role of IFN-gamma and TNF-alpha. *J. Investig. Med.* 47: 204-211.
- Anagnostou, A., Lee, E. S., Kessimian, N., Levinson, R., Steiner, M. 1990. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 5978-5982.
- Anagnostou, A., Liu, Z., Steiner, M., Chin, K., Lee, E. S., Kessimian, N., Noguchi, C. T. 1994. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 3974-3978.
- Ankersmit, H. J., Deicher, R., Moser, B., Teufel, I., Roth, G., Gerlitz, S., Itescu, S., Wolner, E., Boltz-Nitulescu, G., Kovarik, J. 2001. Impaired T cell proliferation, increased soluble death-inducing receptors and activation-induced T cell death in patients undergoing haemodialysis. *Clin. Exp. Immunol.* 125: 142-148.
- Appleman, L. J., Van Puijenbroek, A. A., Shu, K. M., Nadler, L. M., Boussiotis, V. A. 2002. CD28 costimulation mediates down-regulation of p27^{kip1} and cell cycle progression by activation of the PI3K/PKB signaling pathway in primary human T cells. *J. Immunol.* 168: 2729-2736.
- Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A., Bunn, H. F., Livingston, D. M. 1996. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 12969-12973.
- Baj, Z., Pokoca, L., Majewska, E., Luciak, M., Tchórzewski, H. 1992. T lymphocytes subsets and NK cell cytotoxicity in chronic hemodialysis patients. The effect of recombinant human erythropoietin (rHu-EPO) treatment. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 40: 201-206.
- Bazan, J. F. 1989. A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 788-795.
- Beckman, B. S., Mallia, C., Clejan, S. 1996. Molecular species of phospholipids in a murine stem-cell line responsive to erythropoietin. *Biochem. J.* 314: 861-867.

- Beleslin-Cokic, B. B., Cokic, V. P., Yu, X., Weksler, B. B., Schechter, A. N., Noguchi, C. T. 2004. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood*. 104: 2073-2080.
- Bocko, D., Kosmaczewska, A., Ciszak, L., Teodorowska, R., Frydecka, I. 2002. CD28 costimulatory molecule – expression, structure and function. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 50: 169-177.
- Boissel, J. B., Lee, W. R., Presnell, S. R., Cohen, F. E., Bunn, H. F. 1993. Erythropoietin structure-function relationships. Mutant proteins that test a model of tertiary structure. *J. Biol. Chem.* 268: 15983-15993.
- Bosman, D. R., Winkler, A. S., Marsden, J. T., Macdougall, I. C., Watkins, P. J. 2001. Anemia with erythropoietin deficiency occurs early in diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. 24: 495-499.
- Brines, M. L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., De Lanerolle, N. C., Cerami, C., Itri, L. M., Cerami, A. 2000. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 10526-10531.
- Bryl, E., Myśliwska, J., Dębska-Ślizień, A., Rachoń, D., Bułło, B., Lizakowski, S., Myśliwski, A., Rutkowski, B. 1998. The influence of recombinant human erythropoietin on tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 production by whole blood cell culture in hemodialysis patients. *Artif. Organs*. 22: 177-181.
- Bryl, E., Myśliwska, J., Dębska-Ślizień, A., Trzonkowski, P., Rachoń, D., Bułło, B., Zdrojewski, Z., Myśliwski, A., Rutkowski, B. 1999. Recombinant human erythropoietin stimulates production of interleukin 2 by whole blood cell cultures of hemodialysis patients. *Artif. Organs*. 23: 809-816.
- Bryl, E., Vallejo, A. N., Weyand, C. M., Goronzy, J. J. 2001. Down-regulation of CD28 expression by TNF-alpha. *J. Immunol.* 167: 3231-3238.
- Bryl, E., Witkowski, J. M. 2004. Decreased proliferative capability of CD4(+) cells of elderly people is associated with faster loss of activation-related antigens and accumulation of regulatory T cells. *Exp. Gerontol.* 39: 587-595.
- Burr, J. S., Savage, N. D., Messah, G. E., Kimzey, S. L., Shaw, A. S., Arch, R. H., Green, J. M. 2001. Cutting edge: Distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-X_L. *J. Immunol.* 166: 5331-5335.
- Campbell, R., Talwalker, Y., Bartos, D. 1978. Polyamines, uremia and hemodialysis. W: *Advances in polyamine research* (vol. 2) pod red. Campbell R. Raven Press, New York.
- Cavaillon, J. M., Poinet, J. L., Fitting, C., Delons, S. 1991. Serum interleukin-6 in long-term hemodialyzed patients. *Nephron*. 60: 307-313.

- Celik, M., Gokmen, N., Erbayraktar, S., Akhisaroglu, M., Konakc, S., Ulukus, C., Genc, S., Genc, K., Sagioglu, E., Cerami, A., Brines, M. 2002. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 2258-2263.
- Cheung, W., Minton, N., Gunawardena, K. 2001. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa once weekly and three times weekly. *Eur. J. Pharmacol.* 57: 411-418.
- Chikuma, M., Masuda, S., Kobayashi, T., Nagao, M., Sasaki, R. 2000. Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279: E1242-W1248.
- Clark, L. B., Foy, T. M., Noelle, R. J. 1996. CD40 and its ligand. *Adv. Immunol.* 63: 43-78.
- Cooper, A. C., Breen, C. P., Vyas, B., Ochola, J., Kemeny, D. M., Macdougall, I. C. 2003. Poor response to recombinant erythropoietin is associated with loss of T-lymphocytes CD28 expression and altered interleukin-10 production. *Nephrol. Dial. Transplant.* 18: 133-140.
- Czekalski, S. 2004. Przewlekła niewydolność nerek. W: *Nefrologia* pod red. Książek, A., Rutkowski, B. Wydawnictwo CZELEJ, wydanie I, Lublin.
- Czekalski, S. 2007. Przewlekła choroba nerek - przewlekła niewydolność nerek w Polsce i na świecie. *Przew. Lek.* 1: 10-16.
- D'Andrea, A. D., Zon, L. I. 1990. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J. Clin. Invest.* 86: 681-687.
- Damen, J. E., Liu, L., Cutler, R. L., Krystal, G. 1993. Erythropoietin stimulates the tyrosine phosphorylation of Shc and its association with Grb2 and a 145-Kd tyrosine phosphorylated protein. *Blood.* 82: 2296-2303.
- Damen, J. E., Mui, A. L. F., Puil, L., Pawson, T., Krystal, G. 1993. Phosphatidylinositol 3-kinase associates, via its Src homology 2 domains, with the activated erythropoietin receptor. *Blood.* 81: 3204-3210.
- Digicaylioglu, M., Lipton, S. A. 2001. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature.* 412: 641-647.
- Docci, D., Cipolloni, P. A., Baldrati, L., Capponcini, C., Turci, F., Feletti, C. 1990. Immune response to a recombinant hepatitis B vaccine in hemodialysis patients. *Int. J. Artif. Organs.* 13:451-453.
- Dordal, M. S., Wang, F. F., Goldwasser, E. 1985. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology.* 116: 2293-2299.

- Dube, S., Fisher, J. W., Powell, J. S. 1988. Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion and biological function. *J. Biol. Chem.* 263: 17516-17521.
- Dudenhause, J. W., Luhr, C., Dimer, I. S. 1997. Umbilical artery blood gases in healthy term newborn infants. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 57: 251-258.
- Eckardt, K. U. 1994. Erythropoietin: oxygen-dependent control of erythropoiesis and its failure in renal disease. *Nephron.* 67: 7-23.
- Eckardt, K. U. 1996. Erythropoietin production in liver and kidneys. *Curr. Opinion Nephrol.Hypertens.* 5: 28-34.
- Eckardt, K. U. 2000. Pathophysiology of renal anaemia. *Clin. Nephrol. Suppl.1.* 53: S2-S8.
- Egrie, J. C., Browne, J. K. 2001. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol. Dial. Transplant.* 16: 3-13.
- Elliott, S., Egrie, J., Browne, J., Lorenzini, T., Busse, L., Rogers, N., Ponting, I. 2004. Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. *Exp. Hematol.* 32: 1146-55.
- Emerson, S. G., Yang, Y. C., Clark, S. C., Long, M. W. 1988. Human recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 3 have overlapping but distinct hematopoietic activities. *J. Clin. Invest.* 82: 1282-1287.
- Eschbach, J. W. 2000. Current concepts of anemia management in chronic renal failure: impact of NKF-DOQI. *Semin. Nephrol.* 20: 320-329.
- Eschbach, J. W., Egrie, J. C., Downing, M. R., Browne, J. K., Adamson, J. W. 1987. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. *N. Engl. J. Med.* 316: 73-78.
- Fandrey, J., Bunn, H. F. 1993. In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction. *Blood.* 81: 617-623.
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M., O'Garra, A. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 147: 3815-3822.
- Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C. 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell.* 88: 435-437.
- Fraser, J. D., Irving, B. A., Crabtree, G. R., Weiss, A. 1991. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by T cell accessory molecule CD28. *Science.* 251: 313-316.

- Fraser, J. K., Tan, A. S., Lin, F. K., Berridge, M. V. 1989. Expression of specific high-affinity binding sites for erythropoietin on rat and mouse megakaryocytes. *Exp. Hematol.* 17: 10-16.
- Freedman, M. H., Cattran, D. C., Saunders, E. F. 1983. Anemia of chronic renal failure: inhibition of erythropoiesis by uremic serum. *Nephron.* 35: 15-19.
- Freedman, M. H., Saunders, E. F., Cattran, D. C., Rabin, E. Z. 1983. Ribonuclease inhibition of erythropoiesis in anemia of uremia. *Am. J. Kidney Dis.* 2: 530-533.
- Fruman, D. A., Klee, C. B., Bierer, B. E., Burakoff, S. J. 1992. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 3686-3690.
- Fuleihan, R., Ramesh, N., Horner, A., Ahern, D., Belshaw, P. J., Alberg, D. G., Stamenkovic, I., Harmon, W., Geha, R. S. 1994. Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 93: 1315-1320.
- Gafter, U., Kalechman, Y., Orlin, J. B., Levi, J., Sredni, B. 1994. Anemia of uremia is associated with reduced in vitro cytokine secretion: immunopotentiating activity of red blood cells. *Kidney Inter.* 45: 224-231.
- Galson, D. L., Tsuchiya, T., Tendler, D. S., Huang, L. E., Ren, Y., Ogura, T., Bunn, H. F. 1995. The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1. *Mol. Cell Biol.* 15: 2135-2144.
- Gerez, L., Madar, L., Shkolnik, T., Kristal, B., Arad, G., Reshef, A., Steinberger, A., Ketzinel, M., Sayar, D., Shasha, S., Kaempfer, R. 1991. Regulation of interleukin-2 and interferon-gamma gene expression in renal failure. *Kidney Int.* 40: 266-272.
- Gerloni, M., Xiong, S., Mukerjee, S., Schoenberger, S. P., Croft, M., Zanetti, M. 2000. Functional cooperation between T helper cell determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 13269-13274.
- Girndt, M., Sester, M., Sester, U., Kaul, H., Kohler, H. 2001. Defective expression of B7-2 (CD86) on monocytes of dialysis patients correlates to the uremia-associated immune defect. *Kidney Int.* 59: 1382-1389.
- Girndt, M., Sester, U., Kaul, H., Kohler, H. 1998. Production of proinflammatory and regulatory monokines in hemodialysis patients shown at a single-cell level. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9: 1689-1696.
- Girndt, M., Sester, U., Sester, M., Kaul, H., Kohler, H. 1999. Impaired cellular immune function in patients with end-stage renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14: 2807-2810.

- Gobert, S., Duprez, V., Lacombe, C., Gisselbrecht, S., Mayeux, P. 1995. The signal transduction pathway of erythropoietin involves three forms of mitogen-activated protein (MAP) kinase in UT7 erythroleukemia cells. *Eur. J. Biochem.* 234: 75-83.
- Gray, D., Bergthorsdottir S., Van Essen, D., Wykes, M., Poudrier, J., Siepmann, K. 1997. Observation on memory B-cell development. *Sem. Immunol.* 9: 249-254.
- Gregory, C. J., Eaves, A. C. 1978. Three stages of erythropoietic cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood.* 51: 527-537.
- Halupa, A., Chohan, M., Stickle, N. H., Beattie, B. K., Miller, B. A., Barber, D. L. 2005. Erythropoietin receptor Y479 couples to ERK1/2 activation via recruitment of phospholipase Cgamma. *Exp. Cell Res.* 309: 1-11.
- Hasbold, J., Gett, A. V., Rush, J. S., Deenick, E., Avery, D., Jun, J., Hodgkin, P. D. 1999. Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol. Cell Biol.* 77: 516-522.
- Haziot, A., Ferrero, E., Kontgen, F., Hijiyama, N., Yamamoto, S., Silver, J., Stewart, C. L., Goyert, S. M. 1996. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of Gram-negative bacteria in CD14-deficient mouse. *Immunity.* 4: 407-414.
- Haziot, A., Tsuberi, B., Goyert, S. M. 1993. Neutrophil CD14: biochemical properties and role in secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 150: 5556-5565.
- Heberlein, C., Fischer, K. D., Stoffel, M., Nowock, J., Ford, A., Tessmer, U., Stocking, C. 1992. The gene for erythropoietin receptor is expressed in multipotential hematopoietic and embryonal stem cells: evidence for differentiation stage-specific regulation. *Mol. Cell Biol.* 12: 1815-1826.
- Herbelin, A., Nguyen, A. T., Zingraff, J., Urena, P., Descamp-Latscha, B. 1990. Influence of uremia and hemodialysis on circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Kidney Int.* 37: 116-125.
- Herbelin, A., Urena, P., Nguyen, A. T., Zingraff, J., Descamps-Latscha, B. 1991. Influence of first and long-term dialysis on uremia-associated increased basal production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by circulating monocytes. *Nephrol. Dial. Transplant.* 6: 349-357.
- Ihle, J. N. 1995. Cytokine receptor signaling. *Nature.* 377: 591-594.
- Isbel, N. M., Hill, P. A., Foti, R., Mu, W., Hurst, L. A., Stambe, C., Lan, H. Y., Atkins, R. C., Nikolic-Paterson, D. J. 2001. Tubules are the major site of M-CSF production in experimental kidney disease: correlation with local macrophage proliferation. *Kidney Int.* 60: 614-625.

- Itoh, K., Hirohata, S. 1995. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation and differentiation. *J. Immunol.* 154: 4341-4350.
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S. D., Kaufman, R. J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S. S., Hewick, R., Fritsch, E. F. 1985. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature.* 313: 806-810.
- Jelkmann, W. 2000. Use of recombinant human erythropoietin as an antianemic and performance enhancing drug. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 1: 11-31.
- Jenkins, M. K., Taylor, P. S., Norton, S. D., Urdahl, K. B. 1991. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J. Immunol.* 147: 2461-2466.
- Johnson-Léger, C., Christensen, J., Klaus, G. G. 1998. CD28 co-stimulation stabilizes the expression of the CD40 ligand on T cells. *Int. Immunol.* 10: 1083-1091.
- Jones, S. S., D'Andrea, A. D., Haines, L. L., Wong, G. G. 1990. Human erythropoietin receptor: cloning, expression and biologic characterization. *Blood.* 76: 31-35.
- Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., Poellinger, L. 1997. Activation of hypoxia-inducible factor 1 alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 5667-5672.
- Kimata, H., Yoshida, A., Ishioka, C., Masuda, S., Sasaki, R., Mikawa, H. 1991. Human recombinant erythropoietin directly stimulates B cells immunoglobulin production and proliferation in serum-free medium. *Clin. Exp. Immunol.* 85: 151-156.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14: 5579-5588.
- Klingmüller, U. 1997. The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells – signals emanating from the erythropoietin receptor. *Eur. J. Biochem.* 249: 637-647.
- Klingmüller, U., Bergelson, S., Hsiao, J. G., Lodish, H. C. 1996. Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 8324-8328.
- Knutson, V. P. 1991. Cellular trafficking and processing of the insulin receptor. *FASEB J.* 5: 2130-2138.
- Koury, M. J., Bondurant, M. C. 1988. Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells. *J. Cell Physiol.* 137: 65-74.

- Krantz, S. B. 1991. Erythropoietin. *Blood*. 77: 419-434.
- Krantz, S. B., Sawada, K. I. 1990. Growth of highly purified human CFU-E in serum-free medium. *Prog. Clin. Biol. Res.* 352: 9-20.
- Kumar, S. M., Yu, H., Fong, D., Acs, G., Xu, X. 2006. Erythropoietin activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human melanoma cells. *Melanoma Res.* 16: 275-283.
- Lacombe, C., Mayeux, P. 1998. Biology of erythropoietin. *Haematologica.* 83: 724-732.
- Lai, P. H., Everett, R., Wang, F. F., Arakawa, T., Goldwasser, E. 1986. Structural characterization of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 261: 3116-3121.
- Lanzavecchia, A., Sallusto, F. 2001. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat. Immunol.* 2: 487-492.
- Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., Chen, K. K., Fox, G. M., Martin, F., Stabinsky, Z., Badrawi, S. M., Lai, P.-H., Goldwasser, E. 1985. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 7580-7584.
- Linsley, P. S., Greene, J. L., Tan, P., Bradshaw, J., Ledbetter, J. A., Anasetti, C., Damle, N. K. 1992. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 176: 1595-1604.
- Lisowska, K., Witkowski, J. M. 2003. Viral strategies in modulation of NF-kappaB activity. *Archiv. Immunol. Ther. Exp.* 51: 367-375.
- Locatelli, F., Aljama, P., Barany, P., Canaud, B., Carrera, F., Eckardt, K. U., Horl, W. H., Macdougall, I. C., Macleod, A., Więcek, A., Cameron, S; European Best Practice Guidelines Working Group. 2004. Revised European Best Practice Guidelines for the Management of Anaemia in Patients with Chronic Renal Failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 19 (Suppl. 2): S1-47.
- Lonnemann, G., Linnenweber, S., Burg, M., Koch, K. M. 1998. Transfer of endogenous pyrogens across artificial membranes? *Kidney Int. Suppl.* 53: S43-S46.
- Makarov, S. S. 2000. NF- κ B as a therapeutical target in chronic inflammation: recent advances. *Mol. Med. Today.* 6: 441-448.
- Manitius, A. 1992. Przewlekła niewydolność nerek. Mocznica przewlekła. W: *Choroby nerek* pod red. Orłowski, T. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, wydanie III, Warszawa.
- Manitius, J. 1997. Przewlekła niewydolność nerek. W: *Choroby nerek* pod red. Orłowski, T. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, wydanie IV, Warszawa.

- Marti, H. H., Wenger, R. H., Rivas, L., Straumann, U., Digicaylioglu, M., Henn, V., Yonekawa, Y., Bauer, C., Gassman, M. 1996. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur. J. Neurosci.* 8: 666-676.
- Masuda, S., Nagao, M., Sasaki, R. 1999. Erythropoietic, neurotrophic, and angiogenic functions of erythropoietin and regulation of erythropoietin production. *Int. J. Hematol.* 70: 1-6.
- Masuda, S., Nagao, M., Takahata, K., Konishi, Y., Gallyas, F., Tabira, T., Sasaki, R. 1993. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristic. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J. Biol. Chem.* 268: 11208-11216.
- Maury, C. P. J., Andersson, L. C., Teppo, A. M., Partanen, S., Juvonen, E. 1988. Mechanism of the anaemia in reumathoid arthritis: Demonstartion of raised interleukin 1 beta concentrations in anaemic patiens adn of interleukin 1 mediated suppression of normal erythropoiesis and proliferation of human erythroleukaemia (HEL) cells in vitro. *Ann. Rheum. Dis.* 47: 972-978.
- Mayeux, P., Dusanter-Fourt, I., Muller, O., Mauduit, P., Sabbah, M., Druker, B., Vainchenker, W., Fischer, S., Lacombe, C., Gisselbrecht, S. 1993. Erythropoietin induces the association of phosphatidylinositol 3'-kinase with a tyrosine-phosphorylated complex containing the erythropoietin receptor. *Eur. J. Biochem.* 216: 821-828.
- Means, R. T., Dessypris, E. N., Krantz, S. B. 1992. Inhibition of human erythroid colony-forming units by interleukin-1 is mediated by gamma interferon. *J. Cell Physiol.* 150: 59-64.
- Means, R. T., Krantz, S. B. 1992. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic diseases. *Blood.* 80: 1639-1647.
- Meytes, D., Bogin, E., Ma, A., Dukes, P. P., Massry, S. G. 1981. Effect of parathyroid hormone on erythropoiesis. *J. Clin. Invest.* 67: 1263-1269.
- Miura, Y., Miura, O., Ihle, J. N., Aoki, N. 1994. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 29962-29969.
- Miyake, T., Kung, C. K. H., Goldwasser, E. 1977. Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 252: 5558-5564.
- Moldawer, L. L., Marano, M. A., Wei, H., Fong Y., Silen, M. L., Kuo, G., Manogue, K. R., Vlassara, H., Cohen, H., Cerami, A., Lowry, S. F. 1989. Cachectin/tumor necrosis factor alters red blood cell kinetics and induces anemia in vivo. *FASEB J.* 3: 1637-1643.
- Moritz, K. M., Lim, G. B., Wintour, E. M. 1997. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am. J. Physiol.* 273: R1829-R1844.

- Neumann, D., Wikström, L., Watowich, S. S., Lodish, H. F. 1993. Intermediates in degradation of the erythropoietin receptor accumulate and are degraded in lysosomes. *J. Biol. Chem.* 268: 13639-13649.
- Nockher, W. A., Scherberich, J. E. 1995. Monocyte cell-surface CD14 expression and soluble CD14 antigen in hemodialysis: evidence of for chronic exposure to LPS. *Kidney Int.* 48: 1469-1475.
- Noelle, R. J., Snow, E. C. 1991. T helper cell-dependent B cell activation. *FASEB J.* 5: 2770-2776.
- Pallard, C., Gouilleux, F., Charon, M., Groner, B., Gisselbrecht, S., Dusanter-Fourt, I. 1995. Interleukin-3, erythropoietin and prolactin activate a STAT5-like factor in lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* 270: 15942-15945.
- Parra, E., Mustelin, T., Dohlsten, M., Mercola, D. 2001. Identification of a CD28 response element in the CD40 ligand promoter. *J. Immunol.* 166: 2437-2443.
- Prutchi-Sagiv, S., Golishevsky, N., Oster, H. S., Katz, O., Cohen, A., Naparstek, E., Neumann, D., Mittelman, M. 2006. Erythropoietin treatment in advanced multiple myeloma is associated with improved immunological functions: could it be beneficial in early disease? *Br. J. Haematol.* 135: 660-672.
- Remy, I., Wilson, I. A., Michnick, S. W. 1999. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science.* 283: 990-993.
- Roodman, G. D., Bird, A., Hutzler, D., Montgomery, W. 1987. Tumor necrosis factor-alpha and hematopoietic progenitors: effects of tumor necrosis factor on the growth of erythroid progenitors CFU-E and BFU-E and the hematopoietic cell lines K562, HL60 and HEL cells. *Exp. Hematol.* 15: 928-935.
- Rossert, J., Eckardt, K. U. 2005. Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20: 1025-1028.
- Rutkowski, B., Król, E. 2004. Przewlekła niewydolność nerek. W: *Dializoterapia w praktyce lekarskiej* pod red. Rutkowski, B. Wydawnictwo MAKmedia, wydanie III, Gdańsk.
- Rutkowski, B., Lichodziejeska-Niemierko, M., Grenda, R., Czekalski, S., Duplik, M., Lao, M., Rowiński, W., Bautembach, S. 2006. Raport o stanie leczenia nerkozastępczego w Polsce – 2005. Wydawnictwo Drukonsul, Gdańsk.
- Sae-ung, N., Matsushima, T., Choi, I., Abe, Y., Winichagoon, P., Fucharoen, S., Nawata, H., Muta, K. 2005. Role of NF-κB in regulation of apoptosis of erythroid progenitor cells. *Eur. J. Haematol.* 74: 315-323.

- Saito, A., Takagi, T., Chung, T. G., Ohta, K. 1983. Serum levels of polyamines in patients with chronic renal failure. *Kidney Int. Suppl.* 24: S234-S237.
- Sakanaka, M., Wen, T. C., Matsuda, S., Matsuda, S., Morishita, E., Nagao, M., Sasaki, R. 1998. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 4635-4640.
- Salceda, S., Caro, J. 1997. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 272: 22642-22647.
- Sasaki, H., Bothner, B., Dell, A., Fukuda, M. 1987. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J. Biol. Chem.* 262: 12059-12076.
- Sawada, K., Krantz, S. B., Dai, C. H., Koury, S. T., Horn, S. T., Glick, A. D., Civin, C. I. 1990. Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J. Cell Physiol.* 142: 219-230.
- Sawada, K., Krantz, S. B., Sawyer, S. T., Civin, C. I. 1988. Quantitation of specific binding of erythropoietin to human erythroid colony-forming cells. *J. Cell Physiol.* 137: 337-345.
- Schaefer, R. M., Paczek, L., Berthold, G., Gilge, U., Heidland, A. 1992. Improved immunoglobulin production in dialysis patients treated with recombinant erythropoietin. *Int. J. Artif. Organs.* 15: 204-208.
- Schuster, S. J., Badiavas, E. V., Costa-Giomi, P., Weinmann, R., Erslev, A. J., Caro, J. 1989. Stimulation of erythropoietin gene transcription during hypoxia and cobalt exposure. *Blood.* 73: 13-16.
- Sela, S., Shurtz-Swirski, R., Sharon, R., Manaster, J., Chezari, J., Shkolnik, G., Shapiro, G., Shasha, S. M., Mershaw, S., Kristal, B. 2001. The polymorphonuclear leucocyte – a new target for erythropoietin. *Nephron.* 88: 205-210.
- Semenza, G. L., Koury, S. T., Nejfelt, M. K., Gearhart, J. D., Antonarakis, S. E. 1991. Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 8725-8729.
- Sester, U., Sester, M., Hauk, M., Kaul, H., Kohler, H., Girndt, M. 2000. T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15: 1217-1223.

- Shapiro, V. S., Truitt, K. E., Imboden, J. B., Weiss, A. 1997. CD28 mediates transcriptional upregulation of the interleukin-2 (IL-2) promoter through a composite element containing the CD28RE and NF-IL-2B AP-1 sites. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4051-4058.
- Shimizu, R., Komatsu, N., Miura, Y. 1999. Dominant negative effect of a truncated erythropoietin receptor (EPOR-T) on erythropoietin-induced erythroid differentiation: possible involvement of EPOR-T in ineffective erythropoiesis of myelodysplastic syndrome. *Exp. Hematol.* 27: 229-233.
- Shurtz-Swirski, R., Kristal, B., Shkolnik, T., Weissman, I., Shapiro, G., Shasha, S. M. 1996. Short-term effect of erythropoietin on T-cell mitogenic proliferation in chronic renal failure patients. *Nephron.* 72: 27-29.
- Silva, M., Benito, A., Sanz, C., Prosper, F., Ekhterae, D., Nunez, G., Fernandez-Luna, J. L. 1999. Erythropoietin can induce the expression of Bcl-x_L through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J. Biol. Chem.* 274: 22165-22169.
- Sola, A., Rogido, M., Lee, B. H., Genetta, T., Wen, T. C. 2005. Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr. Res.* 57: 481-487.
- Srahna, M., Remacle, J. E., Annamalai, K., Pype, S., Huylebroeck, D., Boogaerts, M. A., Vandenberghe, P. 2001. NF- κ B is involved in the regulation of CD154 (CD40 ligand) expression in primary human T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 125: 229-236.
- Srahna, M., Van Grunsven, L. A., Remacle, J. E., Vandenberghe, P. 2005. CTLA-4 interacts with STAT5 and inhibits STAT5-mediated transcription. *Immunology.* 117: 396-401.
- Sui, X., Krantz, S. B., Zhao, Z. J. 2000. Stem cell factor and erythropoietin inhibit apoptosis of human erythroid progenitor cells through different signalling pathways. *Br. J. Haematol.* 110: 63-70.
- Swain, S. L. 1999. Helper T cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 180-185.
- Sytkowski, A. J. 1980. Denaturation and renaturation of human erythropoietin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96: 143-149.
- Tilbrook, P. A., Klinken, S. P. 1999. The erythropoietin receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 1001-1005.
- Trzonkowski, P., Myśliwska, J., Dębska-Ślizień, A., Bryl, E., Rachoń, D., Myśliwski, A., Rutkowski, B. 2002. Long-term therapy with recombinant human erythropoietin decreases percentage of CD152(+) lymphocytes in primary glomerulonephritis haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 17: 1070-1080.

- Trzonkowski, P., Dębska-Ślizień, A., Myśliwski, A., Rutkowski B. 2007. Treatment with recombinant human erythropoietin is associated with rejuvenation of CD8⁺ T cell compartment in chronic renal failure patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 25 [w druku].
- Trzonkowski, P., Dębska-Ślizień, A., Szmit, E., Myśliwska, J., Szymańska, K., Hak, Ł., Myśliwski, A., Rutkowski, B. 2005. Long-term therapy with recombinant human erythropoietin increases CD8⁺ T-cell apoptosis in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20: 367-376.
- Tugores, A., Alonso, M. A., Sanchez-Madrid, F., De Landazuri, M. O. 1992. Human T cell activation through the activation-inducer molecule/CD69 enhances the activity of transcription factor AP-1. *J. Immunol.* 148: 2300-2306.
- Vanholder, R., De Smet, R., Glorieux, G., Argiles, A., Baurmeister, U., Brunet, P., Clark, W., Cohen, G., De Dayn, P. P., Deppisch, R., Descamps-Latscha, B., Henle, T., Jörres, A., Lemke, H. D., Massy, Z. A., Passlick-Deetjen, J., Rodriguez, M., Stegmayr, B., Stenvinkel, P., Tetta, C., Wanner, C., Zidek, W. European Uremic Toxin Work Group (EUTox). 2003. Review on uremic toxins: classification, concentration and interindividual variability. *Kidney Int.* 63: 1934-1943.
- Vilella, R., Mila, J., Sole, J., Vives, J. 1989. Sequential appearance of the activation antigens. W: *Leukocyte typing IV* pod red. Knapp, W. Oxford University Press, Oxford.
- Wakao, H., Harada, N., Kitamura, T., Mui, A. L., Miyajima, A. 1995. Interleukin 2 and erythropoietin activate STAT5/MGF via distinct pathways. *EMBO J.* 14: 2527-2535.
- Walrafen, P., Verdier, F., Kadri, Z., Chrétien, S., Lacombe, C., Mayeux, P. 2005. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood.* 105: 600-608.
- Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., Thompson, C. B., Bluestone, J. A. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* 1: 405-413.
- Wang, G. L., Semenza, G. L. 1993. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 268: 21513-21518.
- Wang, G. L., Semenza, G. L. 1995. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 270: 1230-1237.
- Watkins, P. C., Eddy, R., Hoffman, N., Stanislovitis, P., Beck, A. K., Galli, J., Velluci, V., Gusella, J. F., Shows, T. B. 1986. Regional assignment of the erythropoietin gene to human chromosome region 7pter => q22. *Cytogenet. Cell Genet.* 42: 214-218.
- Watowich, S. S., Hilton, D. J., Lodish, H. F. 1994. Activation and inhibition of erythropoietin receptor function: role of receptor dimerization. *Mol. Cell Biol.* 14: 3535-3549.

- Więcek, A., Myśliwiec, M., Smoleński, O. 2001. Patogeneza niedokrwistości w przewlekłej niewydolności nerek. W: *Erytropoetyna od odkrycia do zastosowań klinicznych* pod red. Rutkowski, B. Wydawnictwo MAKmedia, Gdańsk.
- Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Yi, T., Tang, B., Miura, O., Ihle, J. N. 1993. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*. 74: 227-236.
- Wu, H., Lee, S. H., Gao, J., Liu, X., Iruela-Arispe, M. L. 1999. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development*. 126: 3597-3605.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., Lodish, H. F. 1995. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*. 83: 59-67.
- Yamaguchi, K., Akai, K., Kawanishi, G., Ueda, M., Masuda, S., Sasaki, R. 1991. Effects of site-directed removal of *N*-glycosylation sites in human erythropoietin on its production and biological properties. *J. Biol. Chem.* 266: 20434-20439.
- Yorioka, N., Hamaguchi, N., Takasugi, N., Shigemoto, K., Harada, S., Fujiwara, K., Ishida, A., Maeda, T., Kawai, A., Yamakido, M. 1993. Effect of recombinant human erythropoietin administration on immunological indices in patients undergoing chronic hemodialysis. *Jpn. J. Nephrol.* 35: 981-988.
- Youssoufian, H., Longmore, G., Neumann, D., Yoshimura, A., Lodish, H. F. 1993. Structure, function and activation of the erythropoietin receptor. *Blood*. 81: 2223-2236.
- Zhang, M.-Y., Sun, S.-C., Bell, L., Miller, B. A. 1998. NF- κ B transcription factors are involved in normal erythropoiesis. *Blood*. 91: 4136-4144.
- Ziegler, S. F., Ramsdell, F., Alderson, M. R. 1994. The activation antigen CD69. *Stem Cells*. 12: 456-465.