
AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU
WYDZIAŁ LEKARSKI

lek. Agnieszka Tarasewicz

**Zaburzenia niektórych immunologicznych mechanizmów
obronnych u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek**

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych

Promotor: Prof. dr hab. med. Bolesław Rutkowski

Grant MNiSzW 3 P05B 139 25

GDAŃSK 2006

*Składam serdeczne podziękowania
Panu Profesorowi Bolesławowi Rutkowskiemu
za opiekę, fachową pomoc i cierpliwość
okazane podczas powstawania pracy,
Panu Profesorowi Andrzejowi Myśliwskiemu
za umożliwienie wykonania oznaczeń.
Serdecznie dziękuję za gorliwe wsparcie,
jakie otrzymałam od moich Bliskich.*

SPIS TREŚCI

1	WSTĘP	5
1.1	Dane epidemiologiczne dotyczące zakażeń u pacjentów z PNN	5
1.2	Mechanizmy odporności przeciwbakteryjnej	6
1.2.1	Fagocyty	6
1.2.2	Fagocytoza i etapy procesu fagocytozy	7
1.2.2.1	Chemotaksja, migracja i aktywacja fagocytów	8
1.2.2.2	Rozpoznanie drobnoustroju	10
1.2.2.2.1	PAMP i receptory PRR	10
1.2.2.2.2	Układ dopełniacza i receptory dla dopełniacza	11
1.2.2.2.3	Fibronektyna i receptory dla fibronektyny	12
1.2.2.2.4	Immunoglobuliny klasy G i receptory FcγR	12
1.2.2.3	Pochłanianie	14
1.2.3	Mechanizmy zabijania wewnątrzkomórkowego	14
1.2.3.1	Mechanizmy tlenowe	14
1.2.3.2	Mechanizmy pozatlenowe	15
1.2.4	Zakończenie odpowiedzi nieswoistej	15
1.3	Wpływ zależnych od przewlekłej niewydolności nerek czynników na funkcje komórek fagocytarnych	16
1.3.1	Toksyny mocznicowe	16
1.3.2	Przewlekły stan zapalny	17
1.3.3	Niedożywienie	19
1.3.4	Zależność między niedożywieniem, zapaleniem i miażdżycą	20
1.3.5	Zaburzenia opsonizacji	21
1.3.6	Zaburzenia gospodarki wapniowo – fosforanowej, wtórna nadczynność przytarczyc	21
1.3.7	Niedokrwistość, zaburzenia gospodarki żelazowej, leczenie erytropoetyną	22
2	CEL PRACY	24
3	MATERIAŁ	25
3.1	Charakterystyka grupy badanej	25
3.2	Charakterystyka grupy kontrolnej	29
4	METODY	30
4.1	Odczynniki	30
4.2	Aparatura	32
4.3	Inne	32
4.4	Ocena aktywności fagocytarnej neutrofilów i monocytów	33
4.5	Ocena zdolności do syntezy reaktywnych związków tlenu (wybuchu tlenowego) neutrofilów i monocytów	35

4.6	Ocena ekspresji receptorów powierzchniowych na powierzchni neutrofilów i monocytów	37
4.7	Oznaczenie stężenia fibronektyny w osoczu	38
4.8	Pozostałe oznaczenia	39
4.9	Analiza statystyczna	40
5	WYNIKI	41
5.1	Ocena aktywności fagocytarnej neutrofilów i monocytów	41
5.2	Ocena zdolności do syntezy reaktywnych związków tlenu (wybuchu tlenowego) przez neutrofile i monocyty	42
5.3	Ocena ekspresji receptorów powierzchniowych zaangażowanych w proces fagocytozy na powierzchni neutrofilów i monocytów	43
5.4	Ocena stężenia opsonin w surowicy/osoczu krwi pacjentów z PNN w porównaniu do grupy kontrolnej	45
5.5	Ocena wzajemnych zależności pomiędzy wskaźnikami związanymi z procesem fagocytozy u pacjentów z PNN i w grupie kontrolnej	46
5.5.1	Zależności między wskaźnikami oceniającymi zdolność do fagocytozy opsonizowanych oraz nieopsonizowanych bakterii E. coli oraz syntezy RFT przez komórki żerne	46
5.5.2	Ocena związku ekspresji receptorów powierzchniowych z aktywnością fagocytarną oraz zdolnością do syntezy RFT przez neutrofile i monocyty	49
5.5.3	Ocena związku stężenia opsonin z aktywnością fagocytarną oraz zdolnością do syntezy RFT przez neutrofile i monocyty	51
5.6	Ocena związku zależnych od PNN zaburzeń metabolicznych, stosowanego leczenia oraz innych parametrów klinicznych i laboratoryjnych ze stwierdzanymi zaburzeniami układu immunologicznego	54
5.6.1	Stopień zaawansowania PNN	54
5.6.2	Stan zapalny	59
5.6.3	Stan odżywienia	66
5.6.4	Zaburzenia gospodarki wapniowo – fosforanowej, wtórna nadczynność przytarczyc	70
5.6.5	Niedokrwistość, zaburzenia gospodarki żelazowej i ich leczenie	74
5.6.6	Wiek	78
5.6.7	Choroby współistniejące i stosowane leczenie	79
5.6.7.1	Cukrzyca	79
5.6.7.2	Statyny	79
6	DYSKUSJA	80
7	WNIOSKI	91
8	STRESZCZENIE	92
9	PIŚMIENNICTWO	94

1 WSTĘP

Przewlekła niewydolność nerek (PNN) jest zespołem chorobowym o przewlekłym i postępującym przebiegu, który na skutek upośledzenia funkcji homeostatycznej, wydalniczej i wewnątrzwydzielniczej nerek prowadzi do nieprawidłowego funkcjonowania wszystkich narządów i układów, w tym układu immunologicznego. Należy wspomnieć, że niesprawność układu odpornościowego, wynika nie tylko z postępującej niewydolności nerek i związanych z nią zaburzeń metabolicznych, ale również prowadzonego, w schyłkowym jej stadium, leczenia nerkozastępczego. Konsekwencją upośledzenia immunologicznych mechanizmów obronnych w PNN jest zwiększona częstość powikłań infekcyjnych, osłabiona odpowiedź na szczepienia, łagodniejszy przebieg chorób autoimmunologicznych oraz lepsze przeżycie przeszczepionych narządów u tych chorych [1], [2].

1.1 Dane epidemiologiczne dotyczące zakażeń u pacjentów z PNN

Infekcje są drugą, pod względem częstości, po chorobach układu sercowo – naczyniowego, przyczyną zgonów (13,1 - 35,7 %) oraz częstą przyczyną hospitalizacji u chorych z PNN [3]. Większość stanowią zakażenia bakteryjne i często prowadzą do powikłań septycznych. Posocznica jest przyczyną 75 % zgonów z powodu infekcji, a 11 % chorych leczonych nerkozastępczo przechodzi co najmniej jeden epizod tego zespołu [4]. Śmiertelność z powodu posocznicy jest w tej grupie chorych 100 – 300 razy większa niż w populacji ogólnej [5].

Dostępne dane epidemiologiczne odnoszą się na ogół do pacjentów leczonych nerkozastępczo i tak: w Polsce 9,9 % zgonów w tej grupie chorych [6], w Hiszpanii 16 % [7], a w krajach Ameryki Łacińskiej od 7,1 – 27,6 % [8] było następstwem zakażenia. Wyniki prowadzonego w latach 1995 – 2000 w USA prospektywnego badania HEMO Study wykazały, że powikłania infekcyjne odpowiadały za 23,1 % zgonów [9], a 42,4 % pacjentów wymagało, co najmniej jednokrotnej hospitalizacji z powodu infekcji. Co więcej w 57,7 % przypadków przebieg hospitalizacji był niepomyślny tzn. zakończony zgonem, pobytem w oddziale intensywnej terapii, bądź też był dłuższy niż 7 dni [10].

Niewiele natomiast wiadomo o częstości powikłań infekcyjnych u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek leczonych zachowawczo. Badanie przeprowadzone

w populacji szwedzkich pacjentów z PNN w okresie przeddializacyjnym wykazało, że zakażenia były przyczyną 4,6 % zgonów [11].

Powyższe dane wykazują, że powikłania infekcyjne u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek są częste, charakteryzują się ciężkim przebiegiem oraz wysoką śmiertelnością. Pozwala to wysunąć przypuszczenie, że immunologiczne mechanizmy obronne u tych chorych są upośledzone.

1.2 Mechanizmy odporności przeciwbakteryjnej

Kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej na zakażenia bakteryjne, po przełamaniu barier anatomicznych i czynnościowych przez wnikające drobnoustroje, odgrywają mechanizmy odporności nieswoistej. Odporność ta nazywana również odpornością wrodzoną, jest filogenetycznie starsza i w odróżnieniu od odpowiedzi swoistej (nabytej) działa szybko i selektywnie, receptory rozpoznające drobnoustroje są niezmiennie w ciągu życia osobniczego i ulegają dziedziczeniu, nie pozostawia natomiast pamięci immunologicznej. Najważniejszym elementem odporności nieswoistej jest proces fagocytozy, w którym wyspecjalizowane komórki – fagocyty (komórki żerne) rozpoznają, pochłaniają i niszczą mikroorganizmy [12].

1.2.1 Fagocyty

Wśród komórek zdolnych do fagocytozy kluczową rolę w odporności przeciwbakteryjnej odgrywają neutrofile, monocyty i makrofagi.

Neutrofile (neutrocyty, granulocyty obojętnochłonne), okrągłe komórki o średnicy 12 – 15 μm i wielopłatowym jądrze, powstają w szpiku kostnym w ilości około 10^{11} na dobę. W krążeniu przebywają przez 6 - 20 godzin (pula krążąca i marginalna), po czym przechodzą do tkanek, gdzie po 1 - 2 dobach ulegają apoptozie i są fagocytowane przez makrofagi. Proces apoptozy regulowany jest przez szereg cytokin i endotoksyny. Komórki te posiadają w swojej cytoplazmie szereg ziarnistości (pierwszo-, drugo-, trzecio- i czwartorzędowe), gdzie magazynowane są białka działające bakteriobójczo, bakteriostatycznie, enzymy lizosomalne oraz białka np. receptorowe, które w szybki sposób mogą zostać dostarczone do błony komórkowej w odpowiedzi na bodźce powodujące degranulację. Podczas infekcji ilość komórek uwalnianych z rezerwy szpikowej wzrasta nawet 10 razy (leukocytoza), we krwi pojawiają się również formy niedojrzałe (granulocyty z jądrem pałeczkowatym). Na skutek

zahamowania apoptozy wydłużony zostaje czas przeżycia neutrofilów (IL-3, IL-15, endotoksyny) [13], [14], [15], [16].

Monocyty, komórki o średnicy 12 - 20 μm , oraz ich dojrzałe postacie, makrofagi, tworzą układ fagocytów jednojądrzastych. Monocyty po opuszczeniu szpiku pozostają w krążeniu przez 2 – 3 dni, a następnie zasiedlają tkanki i narządy, gdzie ulegają ostatecznemu zróżnicowaniu i dojrzewaniu pod względem fenotypowym i czynnościowym. Czas przeżycia makrofagów tkankowych jest dłuższy niż granulocytów obojętnochłonnych i wynosi 2-3 miesiące. Prócz zdolności do fagocytozy drobnoustrojów, martwych komórek i zniszczonych tkanek, komórki te, poprzez prezentację antygenów z udziałem cząsteczki MHC klasy II limfocytom Th i wydzielanie cytokin, uczestniczą w aktywacji i regulacji mechanizmów odporności swoistej [17], [12].

1.2.2 Fagocytoza i etapy procesu fagocytozy

Fagocytoza jest procesem, w którym pojedyncza komórka pochłania nierozpuszczalny materiał cząsteczkowy o średnicy większej niż 0,5 - 1 μm . Zjawisko to zostało po raz pierwszy opisane przez rosyjskiego badacza Ilję Miecznikowa, który w 1880 roku obserwując larwy rozgwiazd zwrócił uwagę na komórki pochłaniające obcy materiał. Swoje obserwacje rozszerzył na organizmy wyższe i jako pierwszy wysunął teorię, że leukocyty migrują do ogniska zapalnego, aby zniszczyć bakterie. Jednocześnie przeciwstawił się teoriom Virchowa uważającego, że funkcją krwinek białych jest roznoszenie drobnoustrojów.

Fagocytoza przebiega wieloetapowo. Rozpoczyna się od rozpoznania i związania drobnoustroju, powoduje to aktywację szlaków wewnątrzkomórkowych, rozpoczęcie wchłaniania cząsteczki i utworzenie fagosomu, z którego po połączeniu z układem lizosomalnym powstaje fagolizosom. Następnie dochodzi do wewnątrzkomórkowego zabicia pochłoniętych drobnoustrojów [13], [12].

1.2.2.1 Chemotaksja, migracja i aktywacja fagocytów

Zanim dojdzie do procesu fagocytozy, dzięki zjawisku chemotaksji, komórki żerne są przyciągane do ogniska zapalnego. Czynniki chemotaktyczne poprzez działanie na odpowiednie receptory w błonie komórkowej powodują przemieszczanie się komórki w kierunku wzrastającego stężenia tych substancji. W miejscu zakażenia wysokie ich stężenie powoduje zmniejszenie ekspresji swoistych receptorów na leukocytach i akumulację komórek. Lista czynników działających chemotaktycznie jest długa. Do najważniejszych należą: fMLP (N-formylometionylleucynofenyloalanina) pochodzenia bakteryjnego, fragmenty C5a i C3a dopełniacza, LTB₄, TGFβ, IL-8 i inne chemokiny. Chemotaktycznie działa również białko C-reaktywne (CRP) [12], [18], [17].

Oprócz działania „przyciągającego”, chemoatraktanty, współdziałając z innymi cytokinami, chemokinami oraz endotoksynami bakteryjnymi (głównie TNFα, IL-1, LPS) wspomagają migrację komórek zwiększając ekspresję molekuł adhezyjnych na komórkach śródbłonna naczyń postkapilarnych (selektyna E). Prowadzi to połączenia z selektynami na leukocytach (selektyna L), toczenia się leukocytów po powierzchni śródbłonna i ich aktywacji. Na skutek aktywacji zwiększa się ekspresja i powinowactwo integryn do swoistych ligandów na powierzchni śródbłonna, doprowadza to do ścisłej adhezji komórek.

Integryny są heterodimerami zbudowanymi z dwóch podjednostek: α (9 typów) i β (15 typów). Łączą się one z cząsteczkami immunoglobulinopodobnymi (ICAM, VCAM -1) na powierzchni komórek śródbłonna, które po selektynach i integrynach stanowią kolejną grupę molekuł adhezyjnych. Najważniejszą grupą integryn są integryny z rodziny β2. Cząsteczki biorące udział w adhezji i migracji fagocytów i ich najważniejsze ligandy przedstawiono w Tab. 1.

Tab. 1. Molekuły adhezyjne biorące udział w adhezji do komórek śródbłonna i migracji, ich najważniejsze ligandy i rozmieszczenie na komórkach [19], [16], [20]

Integryna	Inne nazwy	Ekspresja na komórkach	Ligandy	Ekspresja na komórkach	Czynniki regulujące ekspresję
integryna $\alpha_1\beta_2$	CD11a/CD18 LFA-1	limfocyty B, limfocyty T, monocyty, neutrofile	ICAM-1, -2,-3,-4	śródbłonek -ekspresja konstytutywna i indukowana	LPS, IL-1 β , TNF α , IFN γ
integryna $\alpha_M\beta_2$	CD11b/CD18 Mac-1 CR3	monocyty, neutrofile	ICAM-1	śródbłonek -ekspresja konstytutywna i indukowana	LPS, IL-1 β , TNF α , IFN γ
			C3bi czynnik X fibrynogen		
integryna $\alpha_X\beta_2$	CD11c/CD18 p150, 95 CR4	monocyty, neutrofile	ICAM-1	śródbłonek -ekspresja konstytutywna i indukowana	LPS, IL-1 β , TNF α , IFN γ
			C3bi fibrynogen		
integryna $\alpha_4\beta_1$	CD49d/CD29 VLA-4	limfocyty B, limfocyty T, monocyty, komórki NK, eozynofile, fibroblasty	VCAM-1	śródbłonek -ekspresja indukowana	LPS, IL-1 β , TNF α ,
			fibronektyna		
selektyna L	CD62L	monocyty, neutrofile limfocyty T	selektyna E	śródbłonek -ekspresja indukowana	TNF α ,

Aktywacja i adhezja komórek umożliwia ostatni etap migracji – diapedezę. Aktywowane komórki śródbłonna rozluźniają połączenia międzykomórkowe, błona komórkowa leukocytów ulega zwiększonemu upłynnieniu, dzięki czemu zmieniają one kształt, następnie przy udziale enzymów proteolitycznych trawią białka błony podstawnej i przechodzą do tkanek [19], [16].

Aktywacja fagocytów, oprócz ułatwienia procesu migracji, modyfikuje również inne funkcje tych komórek: fagocytozę, właściwości bakteriobójcze, cytotoksyczność, zawartość enzymów w lizosomach, wydzielanie cytokin, ekspresję receptorów. Do najaktywniejszych czynników pochodzenia bakteryjnego należą: LPS, MDP – dipeptyd muramyłowy, a do najsilniej działających cytokin: IFN γ , IL-2, -4, -8 i inne [12].

1.2.2.2 Rozpoznanie drobnoustroju

Rozpoznanie i związanie drobnoustroju przez komórkę żerną jest wstępem do rozpoczęcia procesu fagocytozy. Może ono zachodzić bezpośrednio na drodze mechanizmów nieswoistych, bądź też za pośrednictwem opsonin, cząsteczek, które opłaszczają bakterie i łącząc się z receptorami na powierzchni fagocytów czynią proces fagocytozy wielokrotnie bardziej efektywnym.

1.2.2.2.1 PAMP i receptory PRR

Neutrofile i makrofagi na drodze odpowiedzi nieswoistej rozpoznają jako obce cząsteczki na powierzchni drobnoustrojów tzw. PAMP (pathogen - associated molecular patterns) przy pomocy receptorów PRR (pattern recognition receptors).

PAMP są to cząsteczki kluczowe dla przeżycia bakterii lub grzybów. Należą do nich składniki ścian komórkowych bakterii: lipopolisacharydy (LPS), peptydoglikany, lipoproteiny, kwas teichojowy, lipoarabinomannan; białka ścian komórkowych grzybów: mannany, zymosan; DNA bakterii, fMLP.

Do receptorów PRR należy rodzina receptorów TLR (Toll- like receptors), CD14, receptory zmiatacze (SRA, MARCO), receptor dla mannozy, fMLP, receptor dla składników dopełniacza CR3 oraz receptory rozpuszczalne: CRP, SAP, LBP. Receptory PRR są w stanie rozpoznać obce cząsteczki szybko, ale nieswoiście. Tak więc, aby odpowiedź immunologiczna była adekwatna do stopnia zagrożenia, w celu pobudzenia innych funkcji komórek żernych wymagany jest udział dodatkowych bodźców, takich jak: cytokiny,

czynniki działające chemotaktycznie, bądź też wymagany jest udział innych receptorów. Na przykład CD14 na makrofagach łączy się z LPS związanym z w kompleksie z LBP i dopiero po połączeniu z TLR4 przekazany jest sygnał stymulujący wydzielanie IL-1, -6 i -8. Niektóre receptory mogą działać w różnych mechanizmach np. CRP umożliwia rozpoznanie drobnoustroju opsonizując bakterię i łącząc się z receptorami FcγR oraz aktywuje dopełniacz na drodze klasycznej, co w rezultacie powoduje opsonizację przy pomocy składowych dopełniacza [12], [13], [21].

1.2.2.2 Układ dopełniacza i receptory dla dopełniacza

Układ dopełniacza stanowi grupa ok. 30 białek, które mają działanie uzupełniające (dopełniające) funkcje układu odpornościowego, działając na pograniczu mechanizmów obrony nieswoistej i swoistej. Ulegają one aktywacji w sposób kaskadowy poprzez trzy, w zależności od rodzaju obcej substancji, drogi: drogę klasyczną (kompleks antygen – przeciwciało), alternatywną (spontanicznie na różnych powierzchniach np. ściany komórkowe ścian bakterii, grzybów, kompleksy immunologiczne) lub lektynową (białko/lektyna wiążąca mannozę – MBP/MBL). Podstawowym działaniem układu dopełniacza w obronie przeciwbakteryjnej jest doprowadzenie do powstania kompleksu atakującego błonę (MAC - składniki C5b-9) i lizy drobnoustroju. Składowe C3b, iC3b, C4b mają również działanie opsonizujące, C5a i C3a działają chemotaktycznie, C5a, C3a, C4a są anafilatoksynami, a C5a aktywuje komórki żerne [18], [22].

Istnieje wiele receptorów dla składników dopełniacza i zaangażowane są one w różne funkcje układu immunologicznego. CR1, CR3 i CR4 to receptory uczestniczące m. in. w wiązaniu drobnoustrojów do powierzchni komórek żernych. Występują zarówno na neutrofilach jak i monocytach oraz makrofagach.

Ligandami dla receptora CR1 (CD35) są C3b, C4b, C1q, MBP. Receptory CR3 (CD11b/CD18) i CR4 (CD11c/CD18), należące do grupy integryn, wiążą cząstki opłaszczone iC3b, oprócz tego CR3 mogą bezpośrednio rozpoznawać składniki ścian komórkowych bakterii i grzybów (LPS, β-glukan, zymosan), oraz wiązać się z fibrynogenem, czynnikiem X układu krzepnięcia, oraz cząsteczkami ICAM [13], [21], [23].

Z uwagi na to, że receptor CR3 należy do receptorów PRR, wymaga dodatkowej stymulacji. W odpowiedzi na bodźce aktywujące (LPS, TNFα, fibronektyna) receptory CR3 ulegają mobilizacji z ziaren drugo-, trzecio- i czwartorzędowych i ich ekspresja na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych wzrasta nawet dziesięciokrotnie.

Aktywacja jest również niezbędna dla rozpoczęcia procesu internalizacji związanego z CR3 drobnoustroju oraz indukcji wybuchu tlenowego [16], [21].

1.2.2.2.3 Fibronektyna i receptory dla fibronektyny

Fibronektyna to glikoproteina występująca w dwóch formach: osoczowej (plasma fibronectin – w osoczu i innych płynach ustrojowych) i komórkowej (cellular fibronectin - w macierzy pozakomórkowej oraz na powierzchni komórek). Posiada domeny łączące się z heparyną, kolagenem, fibryną, powierzchnią bakterii oraz szeregiem receptorów integrynowych. Uczestniczy w procesach adhezji, migracji, wzrostu i różnicowania komórek [24]. Wiążąc się z powierzchnią drobnoustrojów, a następnie z receptorami na powierzchni komórek żernych ułatwia proces fagocytozy, działa więc jak opsonina.

Receptorami na fagocytach, poprzez które rozpoznają one cząsteczki opłaszczone fibronektyną są $\alpha_5\beta_1$ (CD49e/CD29) i $\alpha_v\beta_3$ (CD51/CD61) [21]. Ponadto fibronektyna działa na monocyty i makrofagi niezależnie od działania opsonizującego, stymulując proces fagocytozy zachodzący przy udziale innych receptorów. Umożliwia fagocytozę cząsteczek opłaszczonych składnikami dopełniacza, wzmacnia fagocytozę cząsteczek opłaszczonych IgG oraz bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. [25], [26].

1.2.2.2.4 Immunoglobuliny klasy G i receptory Fc γ R

Fagocytoza zachodząca przy udziale przeciwciał (immunofagocytoza) wymaga już zaangażowania mechanizmów obrony swojej. Najbardziej efektywnymi opsoninami są immunoglobuliny klasy IgG, które częścią zmienną wiążą swoiste antygeny na drobnoustrojach, natomiast ich części stałe są rozpoznawane przez receptory Fc γ R na komórkach żernych. Istnieją trzy typy tych receptorów: Fc γ RI, Fc γ RII i Fc γ RIII oraz ich podtypy. Najważniejsze cechy receptorów dla IgG przedstawiono w Tab. 2.

Tab. 2. Receptory FcγR, ich ligandy, powinowactwo do poszczególnych klas przeciwciał IgG oraz występowanie na komórkach żernych

	Podtypy	Ligandy	Ekspresja na fagocytach
FcγRI (CD64)	FcγRI	monomery IgG (IgG ₁ >IgG ₃ >IgG ₄ >IgG ₂) cząsteczki opsonizowane przez CRP lub SAP	monocyty, makrofagi; neutrofile – po indukcji IFNγ, G-CSF
FcγRII (CD32)	FcγRIIA,B,C	kompleksy IgG lub IgG-antygen (IgG ₁ >IgG ₃ > IgG ₂ =IgG ₄) cząsteczki opsonizowane przez CRP lub SAP	monocyty, makrofagi, neutrofile
FcγRIII (CD16)	FcγRIIIA, B	kompleksy IgG lub IgG-antygen (IgG ₁ =IgG ₃ > IgG ₂ =IgG ₄) cząsteczki opsonizowane przez CRP lub SAP	monocyty, makrofagi, neutrofile

Receptory FcγRI w porównaniu do FcγRII i III wyróżniają się najwyższym powinowactwem do IgG i jako jedyne wiążą przeciwciała w formie monomerów. Na granulocytach obojętnochłonnych pojawiają się dopiero w wyniku aktywacji komórki, natomiast na krążących monocytach receptory te są wysyczone przez monomery IgG. Pomimo, że istnieją trzy geny dla Fcγ (FcγRIA, FcγRIB, FcγRIC) to ekspresji ulega tylko produkt genu FcγRIA.

Receptor FcγRII występuje w trzech odmianach. Na fagocytach występują głównie FcγRIIA i FcγRIIC, które mają działanie aktywujące proces fagocytozy. FcγRIIB, przekazujący sygnały hamujące aktywację komórek, ulega ekspresji w niewielkiej ilości i to tylko na monocytach i makrofagach.

Ostatni z receptorów występuje w dwóch odmianach. FcγRIIIA obecny jest na fagocytach jednojądrzastych, FcγRIIIB stwierdzany jest tylko na granulocytach obojętnochłonnych. Najsilniejszym aktywatorem ekspresji receptorów FcγR jest IFNγ.

Receptory Fc γ występują również na innych, poza fagocytami, komórkach: limfocytach T, limfocytach B, komórkach NK, eozynofilach, mastocytach i płytkach krwi. Uczestniczą w reakcjach ADCC (cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał), prezentacji antygenów, usuwaniu kompleksów immunologicznych, indukują wytwarzanie cytokin prozapalnych [13], [21], [12].

1.2.2.3 Pochłanianie

Proces internalizacji, połączonych z powierzchnią komórki żernej drobnoustrojów, wymaga aktywacji wielu ścieżek sygnałowych, które prowadzą między innymi do zmian polimeryzacji włókien aktynowych cytoszkieletu i ukształtowania błony komórkowej. Dzięki temu możliwa jest zmiana kształtu komórki żernej. Sposoby pochłaniania cząsteczek opsonizowanych IgG i cząsteczek opłaszczonych składnikami dopełniacza różnią się od siebie morfologicznie i czynnościowo. W pierwszym przypadku wypustki błony komórkowej wysuwają się i otaczają cząsteczkę, natomiast w drugim - fagocytowana cząsteczka wydaje się zapadać w głąb komórki żernej. Utworzony w ten sposób pęcherzyk nosi nazwę fagosomu [27]. Jednocześnie zostają uruchomione mechanizmy egzocytozy, podczas których zawartość ziaren komórki fagocytarnej zostaje uwolniona na zewnątrz oraz do fagosomu (degranulacja wewnętrzna).

1.2.3 Mechanizmy zabijania wewnątrzkomórkowego

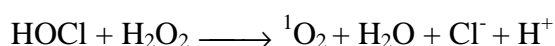
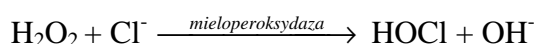
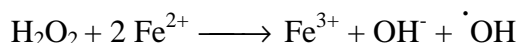
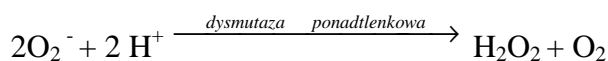
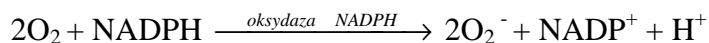
Zniszczenie drobnoustroju wewnątrz komórki fagocytarnej zachodzi na drodze mechanizmów tlenozależnych i tlenoniezależnych.

1.2.3.1 Mechanizmy tlenowe

Do najbardziej aktywnych związków bakteriobójczych należą reaktywne związki tlenowe. Powstają one w wyniku gwałtownie przebiegających przemian tlenowych określanych jako „wybuch tlenowy”(oxidative burst).

Pierwszym etapem tych przemian jest utworzenie aktywnego kompleksu oksydazy NADPH zależnej. W niepobudzonej komórce poszczególne składniki tego kompleksu pozostają rozdzielone w różnych kompartmentach: cytoplazmatycznym i błonowym (błona komórkowa, ziarna wydzielnicze i specyficzne). Ekspozycja na bodźce stymulujące (m.in. fagocytoza drobnoustroju) doprowadza do powstania aktywnego formy tego enzymu, który katalizuje powstanie anionu nadtlenowego (O $_2^-$) [28].

W kolejnych reakcjach, niektóre z nich przedstawiono poniżej, powstają: nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodniki hydroksylowe (OH^\cdot), tlen singletowy ($^1\text{O}_2$), kwas podchlorawy (HOCl) i chloraminy.



Aktywacja oksydazy NADPH, do której dochodzi po pochłonięciu drobnoustroju zależy od rodzaju receptorów biorących udział w procesie fagocytozy. Receptor $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ samodzielnie doprowadza do aktywacji oksydazy, natomiast aktywacja tego enzymu poprzez receptory $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ i CR3 wymaga pobudzenia obu tych receptorów jednocześnie [29].

1.2.3.2 Mechanizmy pozatlenowe

Jednocześnie zostają uruchomione mechanizmy zabijania niezależne od tlenu. Ziarna komórek żernych, a zwłaszcza granulocytów obojętnochłonnych, zawierają szereg enzymów i białek o działaniu bakteriobójczym: czynnik bakteriobójczy zwiększający przepuszczalność (BPI), katepsyna G, defensyny, lizozym, elastaza, kolagenaza, laktoferyna i inne [30].

1.2.4 Zakończenie odpowiedzi nieswoistej

Reakcja zapalna, która rozwija się w przebiegu zakażenia, w początkowej jego fazie służy pobudzeniu mechanizmów obrony nieswoistej i swoistej. Musi jednak w porę zostać zakończona, aby uniknąć ciężkiego uszkodzenia tkanek przez cytotoksyczną zawartość ziaren i reaktywne związki tlenowe uwalniane w przebiegu fagocytozy. Istotny udział w regulacji tych zjawisk mają makrofagi, które z jednej strony wydzielają czynniki o działaniu prozapalnym (m.in. IL-1 , IL-6 , $\text{TNF}\alpha$), z drugiej strony uwalniają cytokiny wpływające hamująco na układ immunologiczny (IL-4 , IL-10) [27]. Jednak zasadniczą rolę w zakończeniu odpowiedzi nieswoistej i towarzyszącej jej reakcji zapalnej odgrywa, indukowany w wyniku fagocytozy, proces apoptozy neutrofilów [31].

1.3 Wpływ zależnych od przewlekłej niewydolności nerek czynników na funkcje komórek fagocytarnych

Pacjenci z przewlekłą niewydolnością nerek charakteryzują się upośledzeniem mechanizmów odporności przeciwbakteryjnej, co m. in. wynika z nieprawidłowego działania, kluczowych w tym procesie, komórek fagocytarnych. Poszczególne funkcje komórek żernych, były przedmiotem wielu badań, jednak większość z nich dotyczyła pacjentów w zaawansowanym stadium choroby, leczonych nerkozastępczo, co może uniemożliwiać rozróżnienie wpływu czynników związanych z niewydolnością nerek od zaburzeń spowodowanych prowadzonym leczeniem. Ponadto wyniki tych badań są niejednoznaczne [32].

1.3.1 Toksyny mocznicowe

Toksyny mocznicowe są to substancje, o udowodnionym działaniu patogennym, ulegające akumulacji w ustroju w miarę progresji niewydolności nerek. Efekty toksemii mocznicowej nasilają się w miarę postępującego obniżenia filtracji kłębuszkowej i są tylko częściowo odwracalne podczas leczenia hemodializą i dializą otrzewnową [33].

W surowicy i ultrafiltracie osocza pacjentów hemodializowanych (HD) oraz płynie dializacyjnym chorych dializowanych otrzewnowo stwierdzono obecność szeregu substancji o charakterze toksyn mocznicowych, które wykazują działanie modulujące kluczowe w obronie przeciwbakteryjnej funkcje fagocytów [34].

Polipeptyd GIP I (granulocyte inhibitory protein I) o masie cząsteczkowej 28 kDa, wykazujący homologię z łańcuchami lekkimi immunoglobulin κ i λ , hamuje stymulowaną przez fMLP chemotaksję granulocytów, metabolizm tlenowy i zmniejsza efektywność procesów wewnątrzkomórkowego zabijania drobnoustrojów. Kolejnym białkiem, którego struktura pierwszorzędowa odpowiada budowie β_2 -mikroglobuliny, jest GIP II (granulocyte inhibitory protein II). Białko to ma działanie zmniejszające metabolizm tlenowy neutrofilów, wykazano również, że stymuluje monocyty do produkcji IL-1 β , IL-6 oraz TNF.

DIP I i DIP II (degranulation inhibiting protein) to białka wpływające na zdolność degranulacji neutrofilów. DIP I ma budowę zbliżoną do angiogeniny, z kolei struktura DIP II odpowiada budowie składnika D dopełniacza. Wykazano, że DIP I hamuje uwalnianie kolagenazy, żelatynazy i laktoferyny, natomiast DIP II wpływa hamująco na sekrecję laktoferyny [35].

W dializacie z jamy otrzewnowej stwierdzono obecność białka, budową zbliżonego do ubikwityny, zmniejszającego zdolność chemotaksji granulocytów obojętnochłonnych [36].

Leptyna, białko zaliczane do toksyn mocznicowych o średniej masie cząsteczkowej (16 kDa), oprócz funkcji regulującej stan odżywienia zaangażowane jest w procesy odporności i bierze udział w patogenezie stanu zapalnego. Zarówno niedożywienie z towarzyszącą hypoleptynią, jak i przewlekła niewydolność nerek ze stwierdzanym podwyższonym stężeniem leptyny wiążą się ze zwiększonym ryzykiem infekcji. Badania *in vitro* dotyczące granulocytów pobranych od zdrowych osób wykazały, że leptyna z jednej strony stymuluje migrację neutrofilów, z drugiej zaś - hamuje chemotaktyczne działanie innych substancji (fMLP, IL-8, C5a). Stwierdzono również, że surowica pacjentów z niewydolnością nerek wykazuje działanie hamujące migrację granulocytów obojętnochłonnych eksponowanych na fMLP, w stopniu korelującym z poziomem leptyny. Nie wykazano wpływu leptyny na aktywność fagocytarną, natomiast dane dotyczące produkcji reaktywnych związków tlenowych są rozbieżne [37], [38].

Udowodniono również depresyjny wpływ p - krezolu na funkcję komórek żernych. W obecności tej toksyny mocznicowej stwierdzano upośledzoną produkcję reaktywnych związków tlenowych przez granulocyty i monocyty oraz zmniejszenie aktywności pozakomórkowej mieloperoksydazy, nie wykazano natomiast wpływu na aktywność fagocytarną tych komórek [39].

Rolę cytokin prozapalnych i parathormonu (PTH) również uznawanych za toksyny mocznicowe przedstawiono w dalszej części wstępu.

1.3.2 Przewlekły stan zapalny

Stan zapalny towarzyszy przewlekłej niewydolności nerek zarówno w okresie przeddializacyjnym, jak i po rozpoczęciu leczenia nerkozastępczego. Podwyższone wykładniki stanu zapalnego stwierdzane są u 25 – 35 % pacjentów leczonych zachowawczo [40], [41] i u 40 – 55 % pacjentów hemodializowanych [42].

Markerami i mediatorami reakcji zapalnej w PNN są cytokiny prozapalne, z których niektóre uznawane są za toksyny mocznicowe (TNF α , IL-1 β , IL-6) oraz białko CRP [43]. Poziomy IL-6 i CRP narastają w miarę postępującej utraty funkcji nerek i korelują ujemnie z wielkością filtracji kłębuszkowej [41], nie stwierdzono natomiast znamienego obniżenia ich poziomów u pacjentów, którzy rozpoczęli leczenie powtarzanymi hemodializami [44]. Podwyższenie poziomów cytokin prozapalnych, stwierdzane u chorych z PNN, wynika nie tylko z upośledzonego wydalania tych substancji przez niewydolne nerki, ale również

ze zwiększonej ich produkcji. Stymulatorami odpowiedzi zapalnej u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek jest narastająca toksemia mocznicowa, stres oksydacyjny, utajone ogniska przewlekłego zakażenia, kontakt z bioniezgodnymi materiałami podczas zabiegu dializy, czy też zanieczyszczenia płynu dializacyjnego [45].

Kluczową rolę w patogenezie stanu zapalnego w mocznicy odgrywają znajdujące się w stanie przewlekłej aktywacji neutrofile, monocyty oraz makrofagi tkankowe. Monocyty są podstawowym źródłem cytokin prozapalnych [46]. Prozapalne monocyty krwi obwodowej charakteryzują się fenotypem CD14+/CD16+. Podwyższony odsetek tych komórek stwierdza się u chorych z ostrym i przewlekłym stanem zapalnym o etiologii infekcyjnej lub nieinfekcyjnej. Monocyty CD14+/CD16+ cechuje podwyższona aktywność fagocytarna, wzmożona zdolność do produkcji cytokin prozapalnych oraz zwiększona ekspresja HLA klasy II [47], [48]. Również u pacjentów z PNN obserwuje się wyższy niż u osób zdrowych odsetek tych komórek w populacji fagocytów jednojądrzastych [49], [50], [51].

Stymulacja granulocytów oraz w mniejszym stopniu monocytów w przebiegu przewlekłego stanu zapalnego prowadzi do wzrostu aktywności kompleksu oksydazy NADPH, jednocześnie dochodzi do uwolnienia mieloperoksydazy. Produkty tych enzymów (reaktywne związki tlenowe oraz kwas podchlorawy) wykazują nie tylko działanie bakteriobójcze, ale po uwolnieniu do tkanek przyczyniają się do zaburzenia równowagi między czynnikami anty- i prooksydacyjnymi i rozwoju stresu oksydacyjnego [52], [53]. Stężenie zaawansowanych produktów oksydacji białek (advanced oxidation protein products – AOPP), uznawanych za jeden z markerów stresu oksydacyjnego, narasta w miarę rozwoju PNN, osiągając najwyższe wartości u pacjentów hemodializowanych. [54]. Oprócz ujemnej korelacji z klirensiem kreatyniny poziom AOPP dodatnio koreluje z markerami aktywacji monocytów takimi jak neopteryna i TNF α . Ponadto w badaniach *in vitro* wykazano, że AOPP mają zdolność pobudzania „wybuchu tlenowego” w neutrofilach i monocytach pacjentów z mocznicą [55]. Reaktywne związki tlenowe modulują również proces zapalny poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych, co wzmacnia ekspresję m. in. cytokin prozapalnych, chemokin, receptorów dla cytokin oraz cząsteczek adhezyjnych [56]. Komórki fagocytarne są zatem ściśle zaangażowane w patogenezę zapalenia i stresu oksydacyjnego w mocznicy i stanowią ogniwo łączące oba stany.

1.3.3 Niedożywienie

Niedożywienie jest równie częstym, jak przewlekły stan zapalny, powikłaniem stwierdzanym u chorych z PNN. Objawy niedożywienia występują u 30 – 51 % pacjentów w okresie leczenia zachowawczego oraz u 39 – 65 % w okresie leczenia nerkozastępczego [42]. Do oceny stanu odżywienia stosowane są pomiary antropometryczne, badania biochemiczne oraz subiektywna ocena stanu odżywienia (subjective global nutritional assessment - SGNA) [42].

Patogeneza zaburzeń stanu odżywienia u pacjentów z PNN jest bardzo złożona i wieloczynnikowa [57]. Stenvinkel i wsp. wyróżniają dwa typy niedożywienia w tej grupie chorych.

Pierwszy typ jest to tzw. „czyste” niedożywienie związane ze zmniejszonym przyjmowaniem składników energetycznych i białka w diecie, wynikającym z braku apetytu narastającej niewydolności nerek, nieadekwatnej dializoterapii, stosowanych ograniczeń dietetycznych. Typ pierwszy charakteryzuje się obniżeniem katabolizmu białek, poziom albumin pozostaje w normie lub jest nieznacznie obniżony [58].

Typ drugi jest związany patogenetycznie z przewlekłym stanem zapalnym (niedożywienie „zapalne”). Wyróżnia się on znacznie niższymi poziomami albumin, podwyższonym katabolizmem białek oraz, co związane jest z patogenezą, podwyższeniem wykładników stanu zapalnego oraz stresu oksydacyjnego [58]. Mediatorami tego typu niedożywienia są cytokiny prozapalne, które stymulują katabolizm białek, zwiększają spoczynkową przemianę materii, redukują syntezę albumin, transferyny, zmniejszają apetyt oraz motorykę żołądka [59].

Pierwszy typ niedożywienia można odwrócić przez odpowiednie leczenie dietetyczne i adekwatną dializoterapię, typ drugi może zostać opanowany dopiero po usunięciu źródła stanu zapalnego [58].

Zaobserwowano, że u pacjentów leczonych zachowawczo, wraz ze spadkiem filtracji kłębuszkowej, obniża się pobór substratów białkowych w diecie, ponadto wykazuje się korelację pewnych wykładników stanu odżywienia m.in. poziomu albumin, transferyny, cholesterolu i BMI z GFR [60], co może przemawiać za tym, że stan odżywienia pogarsza się w miarę progresji niewydolności nerek.

Niedożywienie jest uznawane za jeden z czynników prowadzących do upośledzenia immunologicznych mechanizmów obronnych i zwiększających ryzyko infekcji w PNN [1], [4], [32]. Jest to również najczęstsza przyczyna niedoborów odporności na świecie.

Niedobory immunologiczne wynikające z niedożywienia predysponują zwłaszcza do zwiększonej zachorowalności na gruźlicę, zapalenia płuc, biegunki o etiologii wirusowej i bakteryjnej. Wiadomo, że niedożywienie wpływa na wiele elementów układu immunologicznego – m.in. czynność układu dopełniacza, wydzielanie immunoglobulin wydzielniczych, produkcję cytokin oraz funkcję komórek fagocytarnych [61], [62].

1.3.4 Zależność między niedożywieniem, zapaleniem i miażdżycą

Ścisły związek pomiędzy niedożywieniem, zapaleniem i rozwojem powikłań sercowo – naczyniowych obserwowany u chorych z PNN nazwano zespołem MIA (malnutrition – inflammation - atherosclerosis syndrome). Hypoalbuminemia, będąca powszechnie używanym markerem niedożywienia, ale również wykładnikiem stanu zapalnego, stanowi w grupie chorych hemodializowanych niezależny czynnik ryzyka zgonu z powodu chorób układu sercowo – naczyniowego [58]. Podwyższone poziomy cytokin prozapalnych, CRP i fibrynogenu wiążą się z rozwojem powikłań sercowo – naczyniowych oraz zwiększoną śmiertelnością u chorych z niewydolnością nerek [59], [63], [64].

Stan zapalny, nadprodukcja cytokin i stres oksydacyjny, procesy w których uczestniczą komórki fagocytarne, są ściśle zaangażowane w patogenezę miażdżycy. Reaktywne związki tlenowe - produkty oksydazy NADPH i mieloperoksydazy promują peroksydację lipidów, zużycie tlenu azotu, stymulują proliferację i migrację komórek mięśniówki gładkiej naczyń, doprowadzają do dysfunkcji komórek śródbłonna oraz wzmagają syntezę cytokin prozapalnych [52], [44].

CRP, wydzielane w odpowiedzi na działanie cytokin prozapalnych, wydaje się być nie tylko markerem stanu zapalnego, ale również może uczestniczyć w rozwoju i progresji procesu miażdżycowego. Zwiększa ono ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek śródbłonna (ICAM-1, VCAM –1), co ułatwia przyleganie leukocytów, aktywuje układ dopełniacza, stymuluje makrofagi do zwiększonej fagocytozy uszkodzonych komórek oraz oksydowanych cząsteczek LDL, a także produkcji cytokin prozapalnych [65]. Cytokiny prozapalne, hamując syntezę działających antyoksydacyjnie albuminy i transferyny przyczyniają się do rozwoju stresu oksydacyjnego [53].

Tak więc związki pomiędzy niedożywieniem, zapaleniem, stresem oksydacyjnym oraz rozwojem miażdżycy są bardzo złożone i wielokierunkowe, a pośrednim ogniwem wielu interakcji są komórki fagocytarne.

1.3.5 Zaburzenia opsonizacji

Jak wiadomo opłaszczenie drobnoustrojów przy pomocy cząsteczek immunoglobulin i składowych dopełniacza w znaczący sposób zwiększa efektywność procesu fagocytozy.

Już przed wielu laty ustalono, że pacjenci z PNN charakteryzują się obniżonymi stężeniami składowej C3 dopełniacza, prekursora cząsteczek o działaniu opsonizującym - C3b oraz iC3b [66], [67]. Nieprawidłowość ta dotyczy nie tylko chorych dializowanych, ale pojawia się już w okresie leczenia zachowawczego, częściowo może też wiązać się z problemem niedożywienia [68], [69].

Dane na temat poziomów immunoglobulin w surowicy pacjentów z PNN nie są jednoznaczne. Powszechnie uważa się, że poziomy IgG, IgM i IgA u tych chorych mieszczą się w zakresie stosowanych norm laboratoryjnych oraz nie odbiegają od poziomów stwierdzanych u osób zdrowych [1], [67]. Istnieją jednak doniesienia, w których wykazano zarówno obniżenie [70], jak i podwyższenie poziomów IgG u pacjentów hemodializowanych [71].

Niższe stężenia fibronektyny w surowicy pacjentów z PNN obserwuje się u chorych leczonych zachowawczo, hemodializowanych oraz dializowanych otrzewnowo [72], [73], [74]. Stężenia fibronektyny i składowej C3 dopełniacza korelują z aktywnością fagocytarną monocytów pacjentów hemodializowanych. Co więcej niższe poziomy fibronektyny wydają się wiązać ze zwiększonym ryzykiem zakażeń u tych chorych [70].

1.3.6 Zaburzenia gospodarki wapniowo – fosforanowej, wtórna nadczynność przytarczyc

Zaburzenia gospodarki wapniowo – fosforanowej w przebiegu przewlekłej niewydolności nerek charakteryzują się występowaniem hiperfosfatemii, hipokalcemii, niedoborem aktywnej formy witaminy D – kalcytriolu ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) oraz zwiększonym wytwarzaniem parathormonu w przytarczycach [75]. Zaburzenia te wiążą się nie tylko z patogenezą osteodystrofii nerkowej i zwiększonym ryzykiem chorób układu sercowo – naczyniowego, ale – jak wykazano w wielu badaniach dotyczących pacjentów leczonych nerkozastępczo - mają wpływ na funkcję układu immunologicznego.

Granulocyty obojętnochłonne pacjentów z PNN leczonych nerkozastępczo, z towarzyszącą hipokalcemią, hiperfosfatemią oraz wyższymi poziomami PTH cechują się podwyższonym poziomem wewnątrzkomórkowego wapnia ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) [76]. Dodatkowo

stwierdza się w tych komórkach mniejszą zawartość ATP, zmniejszony przyrost $[Ca^{2+}]_i$ po aktywacji receptora Fc γ RIII, oraz wynikającą z tych zaburzeń upośledzoną zdolność fagocytozy [77]. Ekspozycja granulocytów na podwyższone poziomy PTH upośledza również zdolność migracji, chemotaksji, z kolei produkcja reaktywnych związków tlenowych jest wzmożona [78], [79]. Wykazano, że efekty immunomodulacyjnego działania PTH we wtórnej nadczynności przytarczyc u pacjentów HD mogą zostać odwrócone przez leczenie blokerami kanałów wapniowych, normalizujących $[Ca^{2+}]_i$, nie wpływając jednocześnie na poziom hormonu [80], [81].

U pacjentów HD ze stwierdzanym niedoborem 1,25(OH) $_2$ D $_3$ terapia kalcytriolem stymuluje produkcję reaktywnych związków tlenowych przez monocyty i neutrofile [82], [83]. Immunomodulacyjny wpływ kalcytriolu na monocyty krwi obwodowej osób zdrowych wykazano również w badaniach *in vitro*. Wykazano, że zmniejsza on podstawową lub indukowaną przez cytokiny prozapalne (IFN γ , TNF α) ekspresję receptorów Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16) i CR3 (CD11b), z kolei dane na temat wpływu na aktywność fagocytarną tych komórek są sprzeczne [84], [85], [86].

1.3.7 Niedokrwistość, zaburzenia gospodarki żelazowej, leczenie erytropoetyną

Przed wprowadzeniem do leczenia niedokrwistości w przebiegu PNN w 1986 roku ludzkiej rekombinowanej erytropoetyny (EPO) podstawę terapii stanowiły przetoczenia koncentratu krwinek czerwonych. Wśród licznych powikłań takiego postępowania obserwowano również wtórną hemosyderozę wynikającą z nadmiernej kumulacji żelaza. Stan ten charakteryzujący się podwyższonym stężeniem ferrytyny wiąże się ze zwiększoną częstością powikłań infekcyjnych, w tym również septycznych [87], [88]. Obecność żelaza w środowisku wzmacnia wzrost bakterii, a u pacjentów hemodializowanych „przeładowanych” żelazem stwierdza się upośledzenie aktywności fagocytarnej neutrofilów oraz produkcji reaktywnych związków tlenowych [89]. Również nadmierne wysycenie żelazem laktoferyny i lizozymu zmniejsza bakteriobójcze działanie tych białek [90]. Leczenie EPO poprzez zużywania magazynów żelaza zmniejsza efekt „przeładowania” i poprawia wyjściowo upośledzoną funkcję fagocytarną neutrofilów [91].

Jednakże z drugiej strony żelazo niezbędne jest dla prawidłowej funkcji fagocytów. Skutkiem jego niedoboru jest upośledzenie procesu fagocytozy, produkcji reaktywnych związków tlenowych oraz aktywności mieloperoksydazy [90].

Pacjenci leczeni EPO wymagają zazwyczaj dożylniej suplementacji żelaza. Jednak jego podawanie stymuluje produkcję reaktywnych związków tlenu, przyczynia się do nasilenia stresu oksydacyjnego u pacjentów HD oraz wydaje się wiązać ze zwiększonym ryzykiem chorób sercowo – naczyniowych [92]. Upośledza również funkcję komórek fagocytarnych [93], [94].

Część chorych z PNN leczonych erytropoetyną wymaga wyższych niż przeciętne dawek leku lub też rozpoznaje się u nich oporność na leczenie EPO. Jedną z ważniejszych przyczyn zwiększonego zapotrzebowania na lek jest ostry lub przewlekły, jawny lub utajony stan zapalny [95], [96]. Pacjenci niedostatecznie odpowiadający na leczenie, w porównaniu do reszty chorych, charakteryzują się wyższymi markerami stanu zapalnego (CRP, fibrynogen, ferrytyna) oraz aktywacją komórek układu immunologicznego. Aktywowane monocyty i limfocyty Th1 są źródłem cytokin prozapalnych (TNF α , IFN γ , IL-1), które działają hamująco na erytropoezę, m. in. przyczyniając się do apoptozy komórek progenitorowych w szpiku [97], [98]. Leczenie EPO przyczynia się nie tylko do hamowania apoptozy, ale również moduluje czynność układu immunologicznego zmniejszając produkcję cytokin prozapalnych (TNF α , IL-6) [99].

Jak już wcześniej wspomniano poszczególne funkcje komórek żernych u pacjentów z PNN były przedmiotem wielu badań, jednak dostępne w literaturze dane są niejednoznaczne. Wyniki niektórych badań wykazują, że aktywność fagocytarna tych komórek u pacjentów z PNN jest obniżona w stosunku do osób zdrowych [77], [79], [80], [100], [101] [102]. Natomiast wielu badaczy nie stwierdza upośledzenia zdolności do fagocytozy w PNN [103], [104], [105], [106]. Niemniej jednak należy zauważyć, że piśmiennictwo na ten temat w większości odnosi się do pacjentów leczonych nerkozastępczo, bardzo różna jest też metodologia przeprowadzonych badań. Ponadto nie do końca ustalono jaki jest wpływ wymienionych powyżej, związanych z PNN, czynników na aktywność komórek fagocytarnych.

Biorąc pod uwagę powyższe wątpliwości uznano za zasadne podjęcie badań w celu oceny funkcji komórek fagocytarnych u pacjentów w różnym stadium zaawansowania przewlekłej niewydolności nerek leczonych zachowawczo oraz próby wyjaśnienia wpływu związanych z PNN zaburzeń metabolicznych na funkcje tych komórek.

2 CEL PRACY

Celem niniejszej pracy była ocena wybranych wskaźników służących do oceny zaburzeń układu immunologicznego u pacjentów w różnym stadium zaawansowania PNN, leczonych zachowawczo:

1. Ocena aktywności fagocytarnej neutrofilów i monocytów u pacjentów z PNN w porównaniu do grupy kontrolnej.
2. Ocena zdolności do syntezy reaktywnych związków tlenu (wybuchu tlenowego) neutrofilów i monocytów u pacjentów z PNN w porównaniu do grupy kontrolnej.
3. Ocena ekspresji receptorów powierzchniowych zaangażowanych w proces fagocytozy na powierzchni neutrofilów i monocytów u pacjentów z PNN w porównaniu do grupy kontrolnej.
4. Ocena stężenia opsonin w surowicy/osoczu krwi pacjentów z PNN w porównaniu do grupy kontrolnej.
5. Ocena wzajemnych zależności między wskaźnikami związanymi z procesem fagocytozy u pacjentów z PNN.
6. Próba oceny związku zależnych od PNN zaburzeń metabolicznych, stosowanego leczenia oraz innych parametrów klinicznych i laboratoryjnych ze stwierdzanymi zaburzeniami układu immunologicznego

3 MATERIAŁ

3.1 Charakterystyka grupy badanej

Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku.

Do udziału w badaniu zakwalifikowano 48 chorych (31 mężczyzn i 17 kobiet) w wieku od 24 do 81 lat (średni wiek $58,23 \pm 14,43$ lat), z przewlekłą niewydolnością nerek leczonych zachowawczo, znajdujących się pod opieką Poradni Chorób Nerek SPSK nr 1 ACK AMG lub hospitalizowanych w Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych AMG. Wszyscy pacjenci zapoznali się z informacją na temat celu prowadzonych badań i podpisali świadomą zgodę na udział w badaniu.

Do uczestnictwa nie kwalifikowano osób z jawnym klinicznie aktywnym procesem zapalnym, infekcyjnym lub immunologicznym, leczonych immunosupresyjnie lub stosujących antybiotykoterapię. Przyczyny przewlekłej niewydolności nerek w badanej grupie chorych przedstawiono w Tab. 3.

Tab. 3. Przyczyny PNN w badanej grupie chorych

Przyczyna PNN	Liczba pacjentów
Zwyrodnienie wielotorbielowate	10
Nefropatia cukrzycowa	10
Nefropatia cewkowo – śródmiąższowa	8
Przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek	7
Wady układu moczowego	2
Nefropatia niedokrwienna	2
Nefropatia nadciśnieniowa	2
Marskość nerki	2
Nieustalona etiologia	5

W Tab. 4. przedstawiono podstawowe wskaźniki kliniczne i laboratoryjne charakteryzujące badaną grupę chorych z PNN.

Tab. 4. Charakterystyka grupy chorych z PNN

Parametr	Średnia ± odchylenie standardowe	Wartość minimalna	Wartość maksymalna
Masa ciała [kg]	76,47 ± 13,2	44	106
Wzrost [m]	1,69 ± 0,09	1,5	1,89
BMI [kg/m²]	26,86 ± 4,24	15,22	35,46
GFR [ml/min]	27,84 ± 15,55	8,03	84,07
Hb [g/dl]	11,95 ± 1,89	8,88	17,96
Ht [%]	36,49 ± 5,89	25,86	55,22
RBC [T/l]	3,99 ± 0,66	2,97	6,16
WBC [G/l]	6,88 ± 1,8	3,81	11,94
Neutrocyty [G/l]	4,27 ± 1,39	1,88	8,45
Monocyty [G/l]	0,57 ± 0,21	0,20	1,38
BUN [mg/dl]	57,74 ± 26,29	15	115
Kreatynina [mg/dl]	3,62 ± 1,8	1,22	8,39
Wapń [mg/dl]	9,1 ± 0,71	7,00	10,6
Fosforany [mg/dl]	4,3 ± 1,16	2,5	7,1
PTH [pg/ml]	282,9 ± 283,48	31,1	1616
Białko całkowite [g/l]	73,2 ± 6,64	52	84
Albuminy [g/l]	46,6 ± 3,72	35	53
Cholesterol całkowity [mg/dl]	205,1 ± 53,7	117	364
HDL [mg/dl]	52,4 ± 11,92	29	83
LDL [mg/dl]	115,8 ± 39,54	57	216
Trójglicerydy [mg/dl]	183,3 ± 114,4	57	792
Żelazo [µg/dl]	70,4 ± 25,48	15	131
Transferyna [g/l]	2,1 ± 0,37	1,21	2,82
Ferrytyna [ng/ml]	208,8 ± 307,4	20,08	1889,34
CRP [mg/l]	5,23 ± 11,05	0,25	56,78

PNN rozpoznawano na podstawie podwyższonego stężenia kreatyniny lub obniżonego klirensu kreatyniny. Klirens kreatyniny (GFR) wyliczano z formuły Cockcroft – Gault:

$$\text{GFR u mężczyzn [ml/min]} = \frac{(140 - \text{wiek w latach}) \times \text{masa ciała w kg}}{\text{kreatynina w surowicy} \times 72}$$

$$\text{GFR u kobiet [ml/min]} = \frac{(140 - \text{wiek w latach}) \times \text{masa ciała w kg}}{\text{kreatynina w surowicy} \times 72} \times 0,85$$

W poniżej tabeli przedstawiono wykładniki funkcji wydalniczej nerek badanych pacjentów w zależności od stadium zaawansowania przewlekłej choroby nerek (wg K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease).

Tab. 5. GFR, stężenie kreatyniny i BUN (średnia ± odchylenie standardowe) u pacjentów w 2, 3, 4 i 5 stadium zaawansowania przewlekłej choroby nerek

Stadium przewlekłej choroby nerek	Liczba pacjentów	GFR [ml/min]	Kreatynina [mg/dl]	BUN [mg/dl]
<u>Stadium 2</u> Uszkodzenie nerek z niewielkim zmniejszeniem GFR (60-89 ml/min)	2	75,82 ± 11,67	1,35 ± 0,19	22 ± 2,83
<u>Stadium 3</u> Uszkodzenie nerek z umiarkowanym zmniejszeniem GFR (30-59 ml/min)	14	40,73 ± 7,7	2,24 ± 0,83	32,36 ± 9,79
<u>Stadium 4</u> Uszkodzenie nerek ze znacznym zmniejszeniem GFR (15-29 ml/min)	21	22,88 ± 3,66	3,58 ± 1,18	66,8 ± 21,05
<u>Stadium 5</u> Niewydolność nerek (<15 ml/min)	11	12,18 ± 2,05	5,88 ± 1,51	80,09 ± 18,48

Największą grupę chorych w populacji badanej stanowili pacjenci w czwartym stadium przewlekłej choroby nerek, najmniejszą – chorzy w stadium drugim. Do badania nie kwalifikowano pacjentów w stadium pierwszym tzn. z uszkodzeniem nerek, ale prawidłową lub zwiększoną filtracją kłębuszkową.

Niedokrwistość z poziomem hemoglobiny poniżej 11 g/dl stwierdzano u 15 chorych (31,25%). Ferrytynemia mniejsza niż 100 ng/ml występowała u 19 osób, natomiast wysycenie transferyny poniżej 20% - u 16 chorych. 8 osób leczono przy pomocy erytropoetyny, 10 pacjentów otrzymywało doustną suplementację żelaza.

Zaburzenia gospodarki wapniowo – fosforanowej dotyczyły wyłącznie chorych z GFR poniżej 30 ml/min. Hiperfosfatemia > 5,5 mg/dl występowała u 8 osób, iloczyn wapniowo – fosforanowy > 55 mg²/dl² – u 4, natomiast stężenie PTH >300 pg/ml stwierdzano u 15 osób. Połowa wszystkich pacjentów leczona była węglanem wapnia, 20 chorych otrzymywało Alfakalcydol.

Zaburzenia lipidowe obserwowano u $\frac{2}{3}$ chorych. U 22 osób stwierdzano hipercholesterolemię, u 27 – podwyższony poziom trójglicerydów. Jednakże leczenie hipolipemizujące przy pomocy statyn prowadzono tylko u 19 osób.

W grupie badanej znajdowało się 14 pacjentów z cukrzycą (28,7%), 3 chorych z rozpoznaniem cukrzycy typu 1 i 11 osób - z cukrzycą typu 2. Nefropatia cukrzycowa była przyczyną PNN u 10 osób (20,8%). 12 chorych leczonych było insuliną, 1 osoba otrzymywała doustne leki hipoglikemizujące, natomiast 1 pacjent był leczony dietą.

Stan odżywienia oceniany za pomocą BMI wykazywał obecność niedowagi (BMI < 21 kg/m²) u 4 chorych (w 5 stadium przewlekłej choroby nerek), nadwagę (BMI > 25 kg/m²) lub otyłość (BMI > 30 kg/m²) miało 33 chorych.

W badanej grupie nie obserwowano hipoalbuminemii. Tylko 2 pacjentów charakteryzowało się stężeniem albumin < 40 g/l. Częstszymi zaburzeniami białkowymi, stwierdzanymi prawie wyłącznie u pacjentów z filtracją kłębuszkową obniżoną poniżej 30 ml/min, były: hipotransferynemia (< 1,91g/l) obserwowana u 11 osób i obniżony poziom składowej C3 dopełniacza (< 0,9 g/l) – u 9 chorych. Co więcej zaburzenia te występowały również u chorych z nadwagą i otyłością.

Mimo, że u żadnego z chorych włączonych do badania nie stwierdzano klinicznych objawów infekcji, u 2 pacjentów w 5 stadium przewlekłej choroby nerek i u 1 w stadium 4 obserwowano podwyższony poziom CRP. Leukocytozę powyżej 11 G/l miało 2 chorych, natomiast ilość neutrocytów przekraczającą 8 G/l – 1 pacjent.

3.2 Charakterystyka grupy kontrolnej

Grupę kontrolną stanowiły 43 zdrowe osoby (27 kobiet i 16 mężczyzn) w wieku $49,77 \pm 13,28$ lat. Ochotników w większości rekrutowano wśród pracowników Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych AMG i ich rodzin.

4 METODY

Wszystkie oznaczenia zostały wykonane w krwi żyłnej, pobieranej z żyły odłokciowej, po uzyskaniu pisemnej zgody pacjenta. Około 15 ml krwi zbieranej było do odpowiednich, w zależności od badania, probówek.

4.1 Odczynniki

4.1.1 PHAGOTEST® (ORPEGEN Pharma, Niemcy)

4.1.2 BURSTTEST (PHAGOBURST®; ORPEGEN Pharma, Niemcy)

4.1.3 Human Fibronectin ELISA (Bender MedSystems, Austria)

4.1.4 Przeciwciała monoklonalne

CD11b PE, klon D12, mysie IgG_{2a}, κ, (Becton Dickinson, Pharmingen, USA)

CD14 APC, klon M5E2, mysie IgG_{2a} (Immunotech, Beckman Coulter, Francja)

CD16 APC-Cy7, klon 3G8, mysie IgG₁, κ, (Becton Dickinson, Pharmingen, USA)

CD32 PE, klon 3D3, mysie IgG₁, κ, (Becton Dickinson, Pharmingen, USA)

CD49d PE, klon 9F10, mysie IgG₁, κ, (Becton Dickinson, Pharmingen, USA)

CD64 FITC, klon 10.1, mysie IgG₁, κ, (Becton Dickinson, Pharmingen, USA)

Kontrola izotypowa FITC, klon MOPC-21, mysie IgG₁, κ, (BD Pharmingen, USA)

Kontrola izotypowa PE, klon MOPC-21, mysie IgG₁, κ, (BD Pharmingen, USA)

Kontrola izotypowa APC, klon G155-178, mysie IgG_{2a}, κ, (BD Pharmingen, USA)

Kontrola izotypowa APC-Cy7, klon MOPC-21, mysie IgG₁, κ, (BD Pharmingen, USA)

4.1.5 Bufory i roztwory

Bufor PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} - barwienia cytometryczne

NaCl 8,59 g

Na_2HPO_4 1,25 g

NaN_3 0,98 g

EDTA (dwusodowy) 3,7 g

Woda redestylowana 1000 ml

Ustalić pH 7,4, autoklawować, przechowywać w 4 ° C w ciemności

Roztwory lizujące erytrocyty oraz utrwalające komórki krwi do barwień cytometrycznych antygenów powierzchniowych:

Roztwór A – lizujący (600 μl / 50 μl krwi)

Kwas mrówkowy 0,6 ml

Woda destylowana do 500 ml

Roztwór B – stabilizujący błony komórkowe leukocytów (240 μl / 50 μl krwi)

Węglan sodu 1,5 g

Chlorek sodu 3,63 g

Siarczan sodu 7,83 g

Woda destylowana 250 ml

Roztwór C – utrwalający komórki (100 μl / 50 μl krwi)

Paraformaldehyd 1g

Woda destylowana 100ml

4.2 Aparatura

- 4.2.1 Urządzenie do lizy i utrwalania komórek Q-Prep, EPICS[®] Immunology Work Station (Coulter, USA)
- 4.2.2 Cytometry przepływowe: Epics[®] XL (Coulter, USA);
LSR II (Becton Dickinson, USA)
- 4.2.3 Komora Laminarna HERAsafe[®] HS18 (Heraeus, USA)
- 4.2.4 Łaźnia wodna (GFL, Niemcy)
- 4.2.5 Mieszadło typu vortex Vibrofix VF1 Electronic (Janke&Kundel IKA[®] - Labortechnik,
- 4.2.6 Probówki jednorazowe:
Vacuette[®] zawierające heparynę (Greiner Bio-One GmbH, Austria);
Vacuette[®] zawierające K₃EDTA (Greiner Bio-One GmbH, Austria);
probówki PS, 4ml, okrągłodenne (Medlab Products, Polska);
probówki Falcon, PS, 5ml, okrągłodenne (Becton Dickinson, USA)
- 4.2.7 Wirówka 3K15 (Sigma, UK)

4.3 Inne

- 4.3.1 Program WinMDI (**Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry**) 2.8 do analizy danych pochodzących z cytometru przepływowego Epics[®] XL (Joe Trotter, The Scripps Institute, USA);
- 4.3.2 Program FACSDiva 4.0 do zbierania i analizy danych pochodzących z cytometru przepływowego LSR II (Becton Dickinson, USA)

4.4 Ocena aktywności fagocytarnej neutrofilów i monocytów

Badanie funkcji fagocytarnej granulocytów obojętnochłonnych oraz monocytów przeprowadzono w heparynizowanej krwi pełnej przy pomocy zestawu PHAGOTEST[®] firmy ORPEGEN Pharma metodą cytometrii przepływowej. Zestaw ten zawiera opsonizowane oraz nieopsonizowane bakterie E. coli znakowane izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) oraz niezbędne odczynniki.

Oznaczenia przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta:

- 1) Heparynizowaną krew pełną od pacjenta rozdzielano do czterech próbek, po 100 µl do każdej i schładzano przez 10 min w temp. 0° C.
- 2) Do jednej pary próbek dodawano:
 - a. po 20 µl schłodzonego roztworu opsonizowanych bakterii E.coli znakowanych FITC (próbówki nr 1 i nr 2);
 - b. po 20 µl schłodzonego roztworu nieopsonizowanych bakterii E.coli znakowanych FITC (próbówki nr 3 i 4);
- 3) Probówki nr 1 i nr 3 inkubowano w łaźni wodnej (10 min, 37° C), pozostałe zaś przez 10 min w temp. 0° C (kontrola negatywna).
- 4) Do próbek umieszczonych w lodzie dodawano po 100 µl lodowatego roztworu zatrzymującego fagocytozę. Po wymieszaniu, próbki były dwukrotnie przemywane przy pomocy roztworu płuczącego (3ml) i odwirowywane (5 min, 250 x g, 4° C).
- 5) Następnie dodawano po 2 ml roztworu lizującego do każdej z próbek i po wymieszaniu inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej.
- 6) Po odwirowaniu komórek (5 min, 250 x g, 4° C) i odrzuceniu supernatantu, komórki przemywano (3ml roztworu płuczącego), ponownie wirowano (5 min, 250 x g, 4° C) następnie dodawano po 200 µl roztworu barwiącego fluorescencyjnie DNA i inkubowano przez 10 min. bez dostępu światła.

W ciągu 1 godziny odczytywano na cytometerze wyniki testu. Zbierano 1500 zdarzeń z bramki leukocytarnej. Przy długości światła pobudzającego 488 nm, (gazowy laser argonowo-jonowy), odczytywano fluorescencję barwnika związanego z DNA – bramka przyżyciowa, zawierająca diploidalne komórki eukariotyczne. Przy tej samej długości fali odczytywano fluorescencję FITC, związanego z pochłoniętymi przez komórki fagocytarne

(granulocyty i monocyty) bakteriami. Odczytane w ten sposób dane obejmowały procentową ilość komórek, które wykazały fagocytozę oraz średnią intensywność fluorescencji, korelującą z liczbą pochłoniętych bakterii przypadających na jedną komórkę żerną. Analiza próbek klinicznych poprzedzona została kalibracją aparatu za pomocą próbki kontrolnej, w taki sposób, aby niespecyficzenie fluoryzujące komórki stanowiły mniej niż 1% komórek pozytywnych. Dalsza obróbka danych wykonana była przy pomocy programu WinMDI.

Uzyskane wyniki przedstawiono jako:

N ops [%] – odsetek granulocytów fagocytydujących opsonizowane bakterie E. coli.

N ops [MFI] - średnia intensywność fluorescencji fagocytydujących granulocytów/
intensywność fagocytozy/ aktywność fagocytyarna

M ops [%] - odsetek monocytów pochłaniających opsonizowane bakterie E. coli.

M ops [MFI] - średnia intensywność fluorescencji wykazujących fagocytozę monocytów/
intensywność fagocytozy/ aktywność fagocytyarna

N nieops [%]	}	parametry dla oceny zdolności do pochłaniania nieopsonizowanych bakterii
N nieops [MFI]		
M nieops [%]		
M nieops [MFI]		

Ponadto po oznaczeniu bezwzględnej liczby granulocytów obojętnochłonnych (N [G/l]) oraz monocytów (M [G/l]) w morfologii krwi z podanych poniżej wzorów uzyskano bezwzględną liczbę fagocytydujących komórek.

N ops [G/l] - liczba neutrocytów fagocytydujących opsonizowane bakterie E. coli

$$N \text{ ops [G/l]} = \frac{N \text{ ops [%]} \times N \text{ [G/l]}}{100}$$

M ops [G/l] - liczba monocytów fagocytydujących opsonizowane bakterie E. coli

$$M \text{ ops [G/l]} = \frac{M \text{ ops [%]} \times M \text{ [G/l]}}{100}$$

Z takich samych wzorów uzyskano również dane dotyczące bezwzględnej liczby granulocytów i monocytów fagocytujących nieopsonizowane bakterie (N nieops [G/l] i M nieops [G/l]).

Badania wykonywano w Katedrze Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku, kierowanej przez prof. dr hab. med. Andrzeja Myśliwskiego.

4.5 Ocena zdolności do syntezy reaktywnych związków tlenu (wybuchu tlenowego) neutrofilów i monocytów

Badanie wybuchu tlenowego (ang. oxidative burst), czyli zdolności do produkcji reaktywnych związków tlenu przez granulocyty obojętnochłonne i monocyty wykonano przy użyciu zestawu PHAGOBURST[®] firmy ORPEGEN Pharma. Zestaw ten zawiera czynniki stymulujące: opsonizowane bakterie E. coli, PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate; octan tetradekanoiloforbolu, 12-mirystaniano-13-octanu forbolu), fMLP (N-formyl-Met-Leu-Phe; N-formylo-metionilo-leucylo-feniloalanina), substrat wykazujący fluorescencję pod wpływem RFT - dihydrorodamina (DHR) 123 oraz niezbędne odczynniki.

Oznaczenia wykonywano zgodnie z instrukcją producenta:

- 1) Pełną, pobraną na heparynę, krew rozdzielano do czterech probówek (5 ml) po 100 µl do każdej i inkubowano przez 10 min w temp 0° C.
- 2) Do probówek dodano:
 - a. probówka nr 1 – 20 µl roztworu opsonizowanych, schłodzonych bakterii E. coli;
 - b. probówka nr 2 – 20 µl roztworu do przemywania (kontrola negatywna);
 - c. probówka nr 3 – 20 µl roztworu fMLP (kontrola niska);
 - d. probówka nr 4 – 20 µl roztworu PMA (kontrola wysoka).
- 3) Po wymieszaniu zawartości próbek inkubowano je przez 10min w łaźni wodnej o temp. 37° C, po czym do każdej próbki dodawano 20 µl roztworu substratu DHR 123.
- 4) Po kolejnej inkubacji (10 min, 37° C) do każdej probówki dodawano po 2ml roztworu lizującego erytrocyty i inkubowano przez 20min w temperaturze pokojowej.
- 5) Probówki wirowano (5 min, 250 x g, 4° C) i odrzucano supernatant. Po przemyciu (3ml roztworu do przemywania), ponownie odwirowywano (5 min, 250 x g, 4° C) i odrzucano supernatant.

-
- 6) Do pozostałości po wirowaniu dodawano 200 μ l roztworu barwiącego fluorescencyjnie DNA, mieszano i inkubowano przez 10 min w temp. 0° C, chroniąc przed światłem.

Pomiar na cytometrze wykonywany był w ciągu 30 min od przygotowania próbki. Zbierano 15000 zdarzeń z bramki leukocytarnej. Przy długości fali światła absorbowanego 488nm (gazowy laser argonowo – jonowy), odczytywano emisję fluorescencji światła czerwonego (DNA; bramka przyżyciowa obejmująca diploidalne komórki ludzkie) oraz zielonego (fluorescencja rodaminy 123 - produktu reakcji DHR 123 z reaktywnymi związkami tlenowymi). Zebrane dane obejmowały procentową ilość komórek wytwarzających RFT oraz średnią intensywność fluorescencji tych komórek, korelującą z ilością przemienionego substratu przez pojedynczą komórkę. Analiza próbek klinicznych poprzedzona została kalibracją aparatu za pomocą próbki kontrolnej, w taki sposób, aby niespecyficznie fluoryzujące komórki stanowiły mniej niż 1% komórek pozytywnych. Dalsza obróbka danych wykonana była przy pomocy programu WinMDI.

Uzyskane wyniki przedstawiono jako:

N_{RFT} [%] – odsetek neutrocytów syntetyzujących reaktywne związki tlenowe po pochłonięciu bakterii E. coli

N_{RFT} [MFI] - średnia intensywność fluorescencji granulocytów / intensywność syntezy RFT / intensywność wybuchu tlenowego

M_{RFT} [%] – odsetek monocytów wytwarzających reaktywne związki tlenowe po pochłonięciu bakterii E. coli

M_{RFT} [MFI] - średnia intensywność fluorescencji monocytów / intensywność syntezy RFT / intensywność wybuchu tlenowego

Ponadto po oznaczeniu bezwzględnej liczby granulocytów obojętnochłonnych (N [G/l]) oraz monocytów (N [G/l]) w morfologii krwi z podanych poniżej wzorów uzyskano bezwzględną liczbę komórek produkujących RFT.

N_{RFT} [G/l] - liczba neutrocytów wytwarzających RFT po pochłonięciu bakterii E. coli

$$N_{RFT} [G/l] = \frac{N_{RFT} [\%] \times N [G/l]}{100}$$

M_{RFT} [G/l] - liczba monocytów produkujących RFT po pochłonięciu bakterii *E. coli*

$$M_{RFT} [G/l] = \frac{M_{RFT} [\%] \times M [G/l]}{100}$$

Badania wykonywano w Katedrze Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku, kierowanej przez prof. dr hab. med. Andrzeja Myśliwskiego.

4.6 Ocena ekspresji receptorów powierzchniowych na powierzchni neutrofilów i monocytów

Barwienia wykonano w heparynizowanej krwi pełnej, najpóźniej w godzinę od pobrania. Do próbek cytometrycznych przenoszono po 50 μ l krwi, a następnie dodawano 100 μ l PBS z 1 % FCS (fetal calf serum) zawierające rozcieńczenia odpowiednich przeciwciał. Następnie próbki inkubowano, delikatnie wytrząsając w temperaturze pokojowej przez 30min. Po inkubacji w krwi lizowano erytrocyty oraz utrwalano barwienia przy pomocy QPrep Epics Immunology Workstation z użyciem odpowiednich buforów (A,B,C). Tak przygotowaną krew analizowano w cytometrze przepływowym (LSR II, BD, USA). Ażeby wykluczyć niespecyficzne wiązanie przeciwciał do badania przygotowano też krew wybarwioną odpowiednimi kontrolami izotopowymi przeciwciał. Kompensacja widm fluorescencji, wykonana przed badaniem cytometrycznym, zapobiegała ewentualnemu nakładaniu się widm fluorescencji barwników zastosowanych podczas barwienia. Bramkowanie monocytów i granulocytów zostało przeprowadzone na podstawie obrazu FSS (ang. forward scatter; rozproszenie czołowe – ugięcie światła obrazujące wielkość komórki) i SS (ang. side scatter; rozproszenie boczne – ugięcie światła obrazujące ilość ziarnistości wewnątrz komórki). Dokładniejsze bramkowanie odpowiednich subpopulacji komórkowych wykonywano na podstawie fluorescencji odpowiednich barwników. Wyniki uzyskane podczas pomiarów cytometrycznych analizowano za pomocą programu FACSDiva 4.0.

Uzyskane wyniki przedstawiono jako odsetek komórek wykazujących ekspresję danej cząsteczki na powierzchni neutrocytów lub monocytów (np. N CD16+ [%]) oraz średnią intensywność fluorescencji (np. N CD16+ [MFI]), korelującą ze stopniem ekspresji danej cząsteczki na powierzchni fagocyta.

Badania wykonywano w Katedrze Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku, kierowanej przez prof. dr hab. med. Andrzeja Myśliwskiego.

4.7 Oznaczenie stężenia fibronektyny w osoczu

Stężenie fibronektyny w osoczu wykonywano metodą ELISA przy pomocy zestawu Human Fibronectin ELISA (Bender MedSystems, Austria). Zestaw ten zawiera mikro płytke ze studzienkami opłaszczonymi poliklonalnymi przeciwciałami króliczymi, skierowanymi przeciwko ludzkiej fibronektynie oraz niezbędne odczynniki. Oznaczenie wykonano zgodnie z instrukcją producenta.

- 1) Krew pobraną do probówki z EDTA wirowano przez 8 minut przy szybkości 1500 obrotów/minutę, uzyskane osocze krwi przechowywano w temperaturze - 80° C.
- 2) Osocze rozmrażano.
- 3) Osocze rozcieńczano w stosunku 1 : 10 000 przy pomocy Assay Buffer (PBS zawierający 1% oraz 10% bydlęcej albuminy osocza - BSA), dostępnego w teście.
- 4) Za pomocą metody seryjnych rozcieńczeń przygotowano standardy, zawierające 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63, 0,31 ng/ml fibronektyny.
- 5) Do każdego dołka przed naniesieniem rozcieńczonych próbek osocza dodano 50 µl Assay Buffer.
- 6) Następnie w odpowiednich dołkach płytki umieszczono po 50 µl rozcieńczonej próbki osocza.
- 7) Do każdego dołka dodawano 50 µl związków z biotyną króliczych poliklonalnych przeciwciał przeciwko ludzkiej fibronektynie, a następnie płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny i następnie trzykrotnie płukano, aby usunąć nadmiar przeciwciał.
- 8) Do każdego dołka dodawano 100 µl roztworu sprzężonej z peroksydazą streptawidyny (Streptavidin – HRP), wiążącej się z biotyną.
- 9) Po jednogodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej i 3 x płukaniu do każdego dołka dodawano 100 µl roztworu substratu reagującego z peroksydazą.
- 10) Płytkę inkubowano przez 10 – 20 minut w temperaturze pokojowej a następnie dodawano po 100 µl roztworu zatrzymującego reakcję enzymatyczną do każdego dołka (Stop Solution – jedno molowy kwas fosforowy).
- 11) Wyniki reakcji barwnej odczytywano w spektrofotometrze przy długości fali 450 nm.
- 12) Na podstawie odniesienia wartości absorpcji danych próbek do wartości absorpcji standardów wyznaczono stężenie fibronektyny w osoczu krwi (ng/ml).

Oznaczenia wykonywano w Katedrze Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku, kierowanej przez prof. dr hab. med. Andrzeja Myśliwskiego.

4.8 Pozostałe oznaczenia

Oznaczenia pozostałych substancji o charakterze opsonin oraz pozostałe badania laboratoryjne wykonywane były u wszystkich pacjentów z PNN, posługując się metodami rutynowo stosowanymi w laboratorium.

Oznaczono:

- morfologię krwi
- stężenie BUN [mg/dl] i kreatyniny [mg/dl]
- parametry gospodarki wapniowo – fosforanowej: wapń całkowity [mg/dl], fosforany [mg/dl] oraz PTH [pg/ml]
- stężenie białka całkowitego [g/l] oraz albuminy [g/l]
- lipidogram: cholesterol całkowity [mg/dl], HDL [mg/dl], LDL [mg/dl], trójglicerydy [mg/dl]
- parametry gospodarki żelazowej: żelazo [μg/dl], transferyna [g/l], ferrytyna [ng/ml]
- CRP [mg/l]
- C3 [g/l]
- C4 [g/l]
- IgG [g/l]

Wszystkie wyżej wymienione badania zostały wykonane w Laboratorium Centralnym SPSK nr 1 Akademickiego Centrum Klinicznego Akademii Medycznej w Gdańsku.

4.9 Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe. Hipotezę o zgodności między zbiorem wartości badanej próby a rozkładem normalnym weryfikowano przy pomocy testu Shapiro – Wilka. Wobec tego, że wartości badanych zmiennych nie miały rozkładu normalnego do dalszego opracowywania wyników zastosowano testy nieparametryczne.

Weryfikację statystyczną istotności różnic między dwiema grupami przeprowadzono przy pomocy testu U Manna-Whitneya (test dla dwóch prób niezależnych), natomiast w celu oceny różnic między wieloma grupami zastosowano test Kruskala – Wallisa (test dla wielu prób niezależnych). Istotność różnic dla zmiennych jakościowych oceniano przy pomocy testu χ^2 i jego poprawek. Zależności między ocenianymi zmiennymi badano przy pomocy nieparametrycznego współczynnika korelacji R Spearmana.

Założono, że przeprowadzone analizy wykazywały istotne statystycznie różnice dla $p < 0,05$. W celu zwiększenia mocy badanych zależności wprowadzono dodatkowe kryteria: wysoce istotne (dla $p < 0,01$) oraz bardzo wysoce istotne (dla $p < 0,001$).

Wszystkich obliczeń dokonano posługując się programem STATISTICA 7.1 firmy StatSoft Inc (Tulsa, USA).

5 WYNIKI

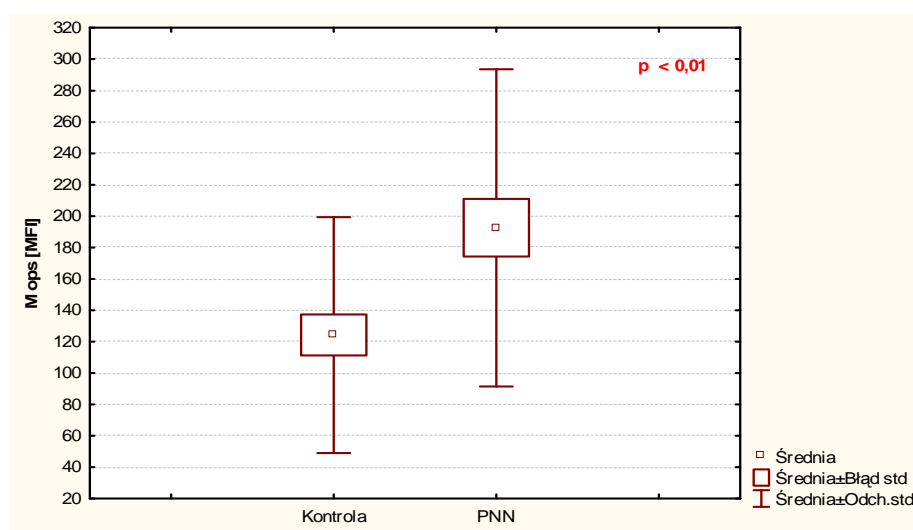
5.1 Ocena aktywności fagocytarnej neutrofilów i monocytów

Neutrofile pacjentów z PNN charakteryzowały się istotnie statystycznie wyższą w stosunku do grupy kontrolnej, zdolnością do fagocytozy opsonizowanych bakterii E.coli. Wyższy był zarówno odsetek jak i bezwzględna liczba fagocytyujących komórek oraz średni sygnał fluorescencji. Wyniki te przedstawiono w Tab.6.

Tab. 6. Zdolność neutrocytów do fagocytozy opsonizowanych bakterii E. coli u pacjentów z PNN i w grupie kontrolnej

	PNN	Kontrola	p
N ops [%]	86,87 ± 17,50	78,56 ± 18,74	p < 0,05
N ops [G/l]	3,69 ± 1,54	2,66 ± 1,20	p < 0,01
N ops [MFI]	424,36 ± 162,03	334,68 ± 112,12	p < 0,05

Odsetek monocytów (M ops [%]: 52,98 ± 20,95% vs 49,64 ± 19,39% odpowiednio) oraz bezwzględna ilość tych komórek (M ops [G/l]: 0,304 ± 0,19 G/l vs 0,255 ± 0,103 G/l) wykazujących fluorescencję po fagocytozie opsonizowanych bakterii E. coli u osób chorych i zdrowych nie różniły się. Jednak monocyty pacjentów z PNN charakteryzowały się istotnie wyższym MFI, czyli fagocytowały bardziej aktywnie (M ops [MFI]: 192,6 ± 101,05 vs 122,8 ± 75,92; p < 0,01; Ryc. 1).



Ryc. 1. Porównanie aktywności fagocytarnej monocytów (M ops [MFI]) w grupie badanej i kontrolnej

Po zastosowaniu nieopsonizowanej formy bakterii *E.coli* nie wykazano istotnych statystycznie różnic między grupami. Należy jednak zauważyć, że zarówno neutrocyty jak i monocyty charakteryzowały się podwyższoną w stosunku do grupy kontrolnej aktywnością fagocytarną (N_{nieops} [MFI] i M_{nieops} [MFI]), aczkolwiek były to wyniki na granicy istotności statystycznej (Tab. 7).

Tab. 7. Zdolność neutrocytów i monocytów do fagocytozy opsonizowanych bakterii *E. coli* u pacjentów z PNN i w grupie kontrolnej

	PNN	Kontrola	p
N_{nieops} [%]	81,11 ± 18,84	78,29 ± 16,95	ns
N_{nieops} [G/l]	3,50 ± 1,64	2,96 ± 1,19	ns
N_{nieops} [MFI]	680,48 ± 196,33	569,47 ± 180,44	ns (p = 0,077)
M_{nieops} [%]	52,98 ± 20,95	49,64 ± 19,39	ns
M_{nieops} [G/l]	0,304 ± 0,19	0,255 ± 0,103	ns
M_{nieops} [MFI]	182,52 ± 98,02	136,19 ± 89,78	ns (p = 0,08)

5.2 Ocena zdolności do syntezy reaktywnych związków tlenu (wybuchu tlenowego) przez neutrofile i monocyty

Około 90% neutrofilów oraz 75% monocytów w grupie badanej i kontrolnej wykazywało zdolność do produkcji reaktywnych form tlenu. Obie grupy nie różniły się także pod względem bezwzględnej liczby neutrocytów i monocytów syntetyzujących RFT oraz intensywności wybuchu tlenowego neutrocytów. Stwierdzono natomiast obniżoną intensywność syntezy RFT przez monocyty pacjentów z PNN (Tab.8).

Tab. 8. Zdolność do syntezy RFT przez komórki fagocytarne u pacjentów z PNN i w grupie kontrolnej

	PNN	Kontrola	p
N_{RFT} [%]	90,85 ± 14,74	89,88 ± 18,30	ns
N_{RFT} [G/l]	3,794 ± 1,38	3,222 ± 1,34	ns
N_{RFT} [MFI]	57,03 ± 27,23	59,99 ± 21,72	ns
M_{RFT} [%]	75,56 ± 17,15	74,84 ± 17,45	ns
M_{RFT} [G/l]	0,408 ± 0,18	0,386 ± 0,14	ns
M_{RFT} [MFI]	24,55 ± 6,24	28,17 ± 7,13	p < 0,01

5.3 Ocena ekspresji receptorów powierzchniowych zaangażowanych w proces fagocytozy na powierzchni neutrofilów i monocytów

Neutrofile osób z grupy badanej i grupy kontrolnej nie różniły pod względem ekspresji receptorów powierzchniowych związanych z funkcją fagocytarną komórek żernych. Wyniki te przedstawiono w Tab. 9.

Tab. 9. Porównanie ekspresji receptorów powierzchniowych zaangażowanych w proces fagocytozy na powierzchni neutrofilów w grupie badanej i kontrolnej

	PNN	Kontrola	P
N CD16+ [%]	91,17 ± 13,13	93,76 ± 4,13	ns
N CD16+ [MFI]	10609,76 ± 6081,77	11269,59 ± 5120,69	ns
N CD32+ [%]	7,43 ± 21,14	8,52 ± 22,62	ns
N CD32+ [MFI]	508,45 ± 306,9	507,48 ± 223,86	ns
N CD64+ [%]	4,77 ± 5,26	4,87 ± 3,51	ns
N CD64+ [MFI]	442,08 ± 282,77	416,37 ± 159,03	ns
N CD14+ [%]	9,58 ± 25,01	8,24 ± 24,28	ns
N CD14+ [MFI]	1362,21 ± 1222,5	1474,15 ± 1099,27	ns
N CD11b+ [%]	98,53 ± 1,79	98,27 ± 2,004	ns
N CD11b+ [MFI]	1818,10 ± 1487,8	1131,14 ± 443,93	ns (p = 0,079)
N CD49d+ [%]	5,10 ± 4,27	6,37 ± 11,95	ns
N CD49d+ [MFI]	460,95 ± 125,22	484,45 ± 126,96	ns

Ponad 90% granulocytów u pacjentów z PNN i u osób zdrowych wykazywało na swojej powierzchni obecność receptora F γ RIII (CD16) oraz receptora CR3 (CD11b). Średnia ekspresja pozostałych receptorów nie przekraczała 10% badanych komórek. Obie grupy badana i kontrolna nie różniły się również stopniem ekspresji receptorów [MFI] na powierzchni neutrocytów, z wyjątkiem wyższej ekspresji cząsteczki CD11b u pacjentów z PNN (różnica na granicy istotności statystycznej p = 0,079).

Średni procent monocytów wykazujących na swojej powierzchni obecność badanych receptorów nie różnił się istotnie w badanych grupach. Wyniki te przedstawiono w Tab. 10.

Tab. 10. Porównanie ekspresji receptorów powierzchniowych zaangażowanych w proces fagocytozy na powierzchni monocytów w grupie badanej i kontrolnej

	PNN	Kontrola	P
M CD16+ [%]	15,63 ± 13,33	12,34 ± 5,720	ns
M CD16+ [MFI]	3292,20 ± 2392,08	3263,89 ± 2635,22	ns
M CD32+ [%]	30,68 ± 42,23	51,06 ± 47,16	ns (p = 0,052)
M CD32+ [MFI]	433,66 ± 241,55	355,22 ± 185,93	ns
M CD64+ [%]	81,14 ± 11,702	80,37 ± 15,72	ns
M CD64+ [MFI]	785,49 ± 255,21	802,22 ± 244,19	ns
M CD14+ [%]	76,75 ± 22,32	80,43 ± 15,51	ns
M CD14+ [MFI]	1231,25 ± 1301,1	1416,52 ± 1195,14	p < 0,05
M CD11b+ [%]	95,35 ± 3,76	96,37 ± 2,79	ns
M CD11b+ [MFI]	1849,50 ± 967,84	1820,25 ± 882,29	ns
M CD49d+ [%]	85,16 ± 16,98	87,33 ± 17,22	ns
M CD49d+ [MFI]	636,33 ± 188,61	682,69 ± 186,26	ns

Większość receptorów była obecna na ponad 75% monocytów, ekspresję cząsteczki CD16 wykazywało kilkanaście % monocytów, natomiast CD32 - 30,68 ± 42,23 % monocytów pacjentów z PNN oraz 51,06 ± 47,16% monocytów osób zdrowych (różnica na granicy istotności statystycznej p = 0,052). Stopień ekspresji receptorów [MFI] na powierzchni monocytów nie różnił się istotnie pomiędzy badanymi grupami, z wyjątkiem obniżonej ekspresji cząsteczki CD14 na monocytach osób chorych.

5.4 Ocena stężenia opsonin w surowicy/osoczu krwi pacjentów z PNN w porównaniu do grupy kontrolnej

Grupa badana i grupa kontrolna nie różniły się pod względem stężenia składnika C3 dopełniacza, stężenia immunoglobuliny klasy G oraz fibronektyny. Stwierdzono natomiast istotnie wyższe stężenie C4 u pacjentów z PNN. Wyniki te przedstawiono w Tab. 11.

Tab. 11. Porównanie stężenia opsonin w surowicy/osoczu krwi pacjentów z PNN w stosunku do grupy kontrolnej

	PNN	Kontrola	p
C3 [g/l]	1,095 ± 0,226	1,06 ± 0,172	ns
C4 [g/l]	0,270 ± 0,062	0,204 ± 0,046	p < 0,001
IgG [g/l]	11,68 ± 2,57	11,79 ± 1,89	ns
Fibronektyna [g/l]	0,339 ± 0,051	0,322 ± 0,079	ns

5.5 Ocena wzajemnych zależności pomiędzy wskaźnikami związanymi z procesem fagocytozy u pacjentów z PNN i w grupie kontrolnej

5.5.1 Zależności między wskaźnikami oceniającymi zdolność do fagocytozy opsonizowanych oraz nieopsonizowanych bakterii *E. coli* oraz syntezy RFT przez komórki żerne

W grupie badanej i w grupie kontrolnej wskaźniki oceniające zdolność do fagocytozy opsonizowanych bakterii *E. coli* (odsetek i bezwzględna ilość neutrocytów oraz intensywność fagocytozy) korelowały dodatnio z odpowiednimi wskaźnikami świadczącymi o zdolności do pochłaniania nieopsonizowanych cząsteczek (Tab. 12).

Tab. 12. Zależności między zdolnością do fagocytozy opsonizowanych i nieopsonizowanych bakterii *E. coli* przez neutrocyty w grupie badanej i kontrolnej

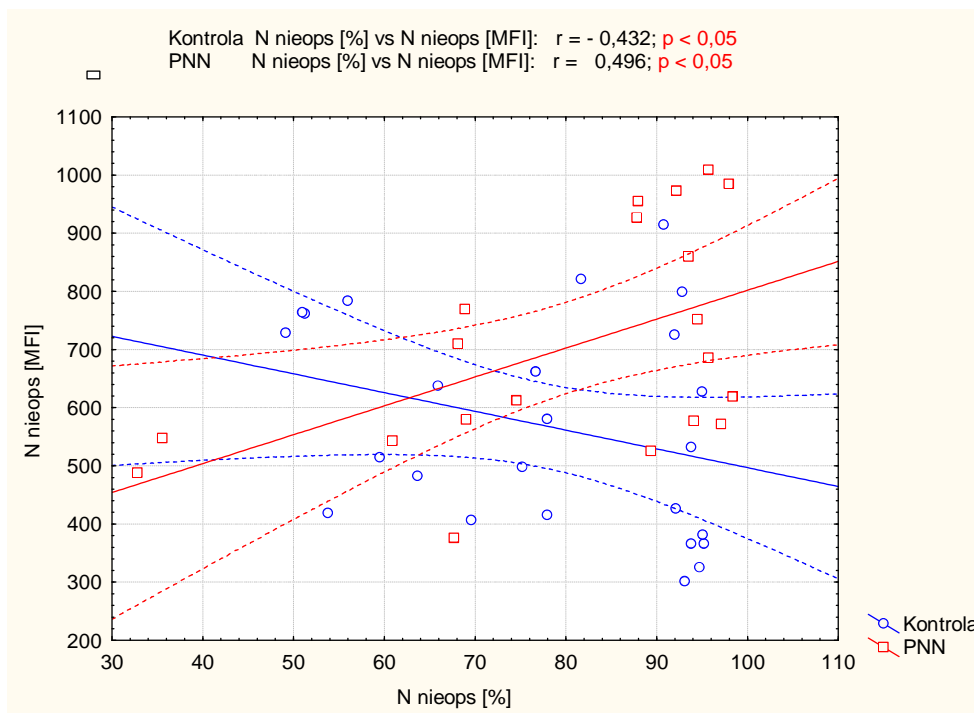
Korelacje		PNN		Kontrola	
		r	p	r	p
N ops [%] vs	N nieops [%]	0,882	p <0,001	0,795	p <0,001
N ops [G/l] vs	N nieops [G/l]	0,959	p <0,001	0,882	p <0,001
N ops [MFI] vs	N nieops [MFI]	0,885	p <0,001	0,785	p <0,001

W grupie pacjentów z PNN wykazano silne dodatnie korelacje pomiędzy poszczególnymi wskaźnikami oceniającymi zdolność neutrocytów do fagocytozy opsonizowanych oraz nieopsonizowanych bakterii *E. coli*. Na przykład odsetek neutrocytów fagocytujących opsonizowane bakterie korelował nie tylko z procentem neutrocytów fagocytujących nieopsonizowane *E. coli*, ale także z bezwzględną ilością komórek wykazujących zdolność fagocytozy opsonizowanych i nieopsonizowanych bakterii i intensywnością pochłaniania obu typów bakterii (Tab. 13).

Tab. 13. Wybrane zależności między wykładnikami aktywności fagocytarnej u pacjentów z PNN

Korelacje N ops [%] vs	r	p
N ops [G/l]	0,679	p < 0,001
N ops [MFI]	0,560	p < 0,01
N nieops [G/l]	0,706	p < 0,001
N nieops [MFI]	0,615	p < 0,01

Natomiast u osób z grupy kontrolnej odsetek neutrofilów fagocytyzujących opsonizowane i nieopsonizowane bakterie *E. coli* nie korelował z intensywnością fagocytozy, bądź też korelował ujemnie. Przykładową różnicę między grupą badaną i grupą kontrolną przedstawiono na Ryc. 2.



Ryc. 2. Korelacje między odsetkiem neutrocytów fagocytyzujących nieopsonizowane *E. coli* a intensywnością fagocytozy w grupie pacjentów z PNN oraz w grupie kontrolnej

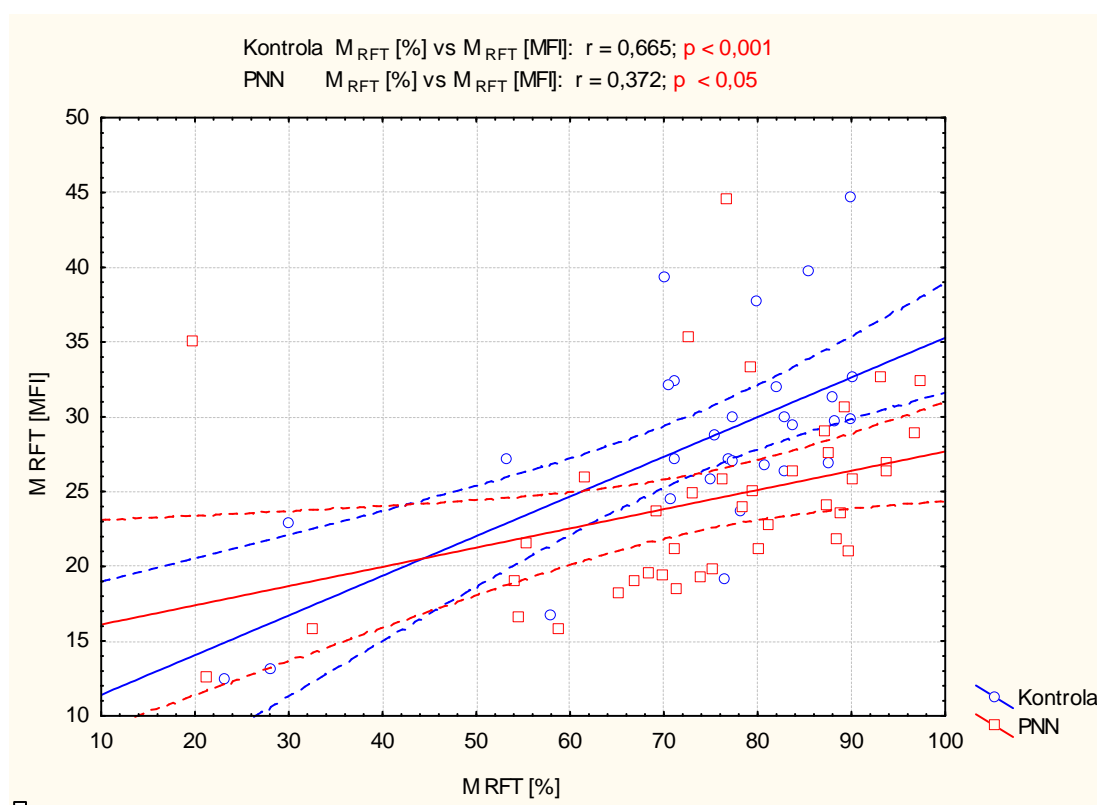
Zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej odsetek i bezwzględna ilość granulocytów obojętnochłonnych zdolnych do syntezy reaktywnych związków tlenowych korelowały dodatnio z poszczególnymi parametrami oceniającymi aktywność fagocytarną neutrocytów. Intensywność syntezy RFT przez neutrocyty osób zdrowych i chorych korelowała dodatnio z odsetkiem komórek syntetyzujących RFT (N_{RFT} [MFI] vs N_{RFT} [%]: $r = 0,74$; $p < 0,001$ – w obu grupach). W grupie chorych z PNN dodatkowo wykazano dodatnią korelację z intensywnością pochłaniania nieopsonizowanych bakterii *E. coli* (N_{RFT} [MFI] vs N_{nieops} [MFI]: $r = 0,489$; $p < 0,05$).

Tak jak w przypadku neutrocytów parametry oceniające zdolność do pochłaniania opsonizowanych bakterii *E. coli* przez monocyty osób zdrowych i pacjentów z PNN korelowały dodatnio z odpowiednimi parametrami oceniającymi zdolność do fagocytozy nieopsonizowanych bakterii przez te komórki. Zależności te przedstawiono w Tab. 14.

Tab. 14. Korelacje między zdolnością do fagocytozy opsonizowanych i nieopsonizowanych bakterii *E. coli* przez monocyty w grupie badanej i kontrolnej

Korelacje		PNN		Kontrola	
		r	p	r	p
M ops [%] vs	M nieops [%]	0,834	p < 0,001	0,629	p < 0,001
M ops [G/l] vs	M nieops [G/l]	0,879	p < 0,001	0,613	p < 0,001
M ops [MFI] vs	M nieops [MFI]	0,661	p < 0,01	0,712	p < 0,001

Odsetek monocytów zdolnych do syntezy RFT w grupie kontrolnej korelował dodatnio z odsetkiem monocytów fagocytujących opsonizowane bakterie *E. coli* ($M_{RFT} [\%]$ vs $M_{ops} [\%]$: $r = 0,412$; $p < 0,05$). Podobnej zależności nie wykazano w grupie pacjentów z PNN. Natomiast intensywność syntezy RFT przez monocyty osób zdrowych i chorych korelowała tylko z odsetkiem monocytów syntetyzujących RFT (Ryc. 3), nie stwierdzono natomiast związków z parametrami funkcji fagocytarnej monocytów.



Ryc. 3. Korelacje między odsetkiem monocytów zdolnych do syntezy RFT a intensywnością produkcji RFT w grupie badanej i kontrolnej

5.5.2 Ocena związku ekspresji receptorów powierzchniowych z aktywnością fagocytarną oraz zdolnością do syntezy RFT przez neutrofile i monocyty

Wykładniki funkcji fagocytarnej neutrocytów oraz ich zdolności do syntezy RFT w grupie pacjentów z PNN korelowały w większości ujemnie z ekspresją receptorów na powierzchni tych komórek. Wykazano tylko dodatnie korelacje między odsetkiem neutrocytów wykazujących ekspresję receptora CR3 (CD11b+) a procentem i bezwzględną ilością tych komórek pochłaniających nieopsonizowane bakterie E. coli.

Natomiast w grupie kontrolnej stwierdzano korelacje dodatnie, z wyjątkiem ujemnej zależności między odsetkiem granulocytów CD64+ a intensywnością fagocytozy nieopsonizowanych E. coli. Istotne statystycznie wyniki przedstawiono w Tab. 15.

Tab. 15. Zależność między ekspresją receptorów powierzchniowych na neutrofilach a aktywnością fagocytarną i zdolnością do syntezy RFT w grupie badanej i kontrolnej

Korelacje		PNN		Kontrola	
		r	p	r	p
N CD14+ [%] vs	N ops [%]	- 0,484	p < 0,05		
N CD14+ [%] vs	N _{RFT} [MFI]			0,571	p < 0,05
N CD14+ [MFI] vs	N _{RFT} [%]	- 0,429	p < 0,05		
N CD14+ [MFI] vs	N _{RFT} [MFI]	- 0,528	p < 0,01		
N CD32+ [%] vs	N ops [%]			0,691	p < 0,01
N CD32+ [%] vs	N nieops [%]			0,729	p < 0,01
N CD32+ [%] vs	N nieops [MFI]	- 0,491	p < 0,05		
N CD32+ [%] vs	N _{RFT} [%]	- 0,344	p < 0,05		
N CD32+ [%] vs	N _{RFT} [G/l]	- 0,343	p < 0,05		
N CD32+ [MFI] vs	N ops [MFI]	- 0,485	p < 0,05		
N CD32+ [MFI] vs	N nieops [MFI]	- 0,601	p < 0,05		
N CD32+ [MFI] vs	N _{RFT} [%]	- 0,421	p < 0,05		
N CD64+ [%] vs	N nieops [MFI]			- 0,692	p < 0,05
N CD64+ [MFI] vs	N nieops [%]	- 0,499	p < 0,05		
N CD11b+ [%] vs	N nieops [%]	0,581	p < 0,01		
N CD11b+ [%] vs	N nieops [G/l]	0,491	p < 0,05		
N CD49d+ [MFI] vs	N nieops [MFI]			0,571	p < 0,05

Również zdolność monocytów do fagocytozy obu typów bakterii oraz produkcji RFT korelowała ujemnie z ekspresją receptorów na powierzchni monocytów u pacjentów z PNN. Z kolei w grupie kontrolnej wykazano ujemne korelacje między ekspresją niektórych typów receptorów powierzchniowych na monocytach a zdolnością do syntezy reaktywnych związków tlenowych oraz dodatnie - między ekspresją niektórych receptorów a aktywnością fagocytarną monocytów, z wyjątkiem ujemnej zależności między procentem komórek CD64 pozytywnych a intensywnością fagocytozy opsonizowanych bakterii E. coli (Tab. 16).

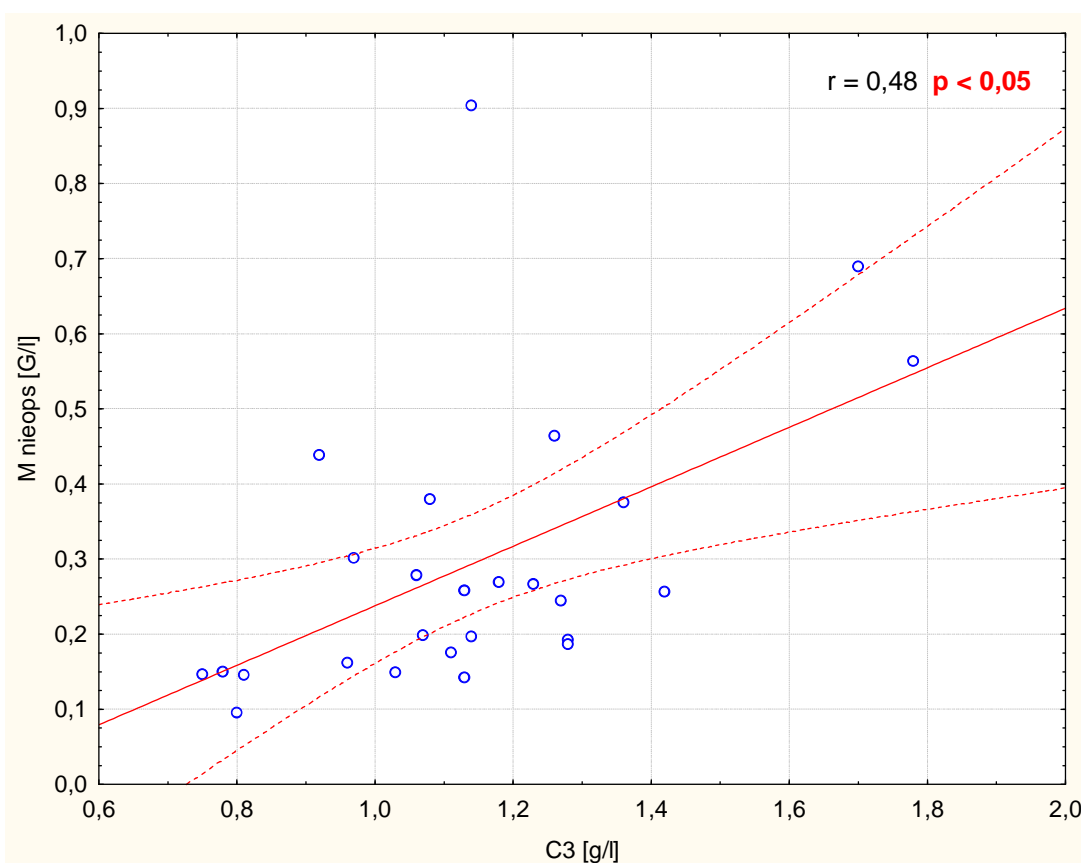
Tab. 16. Zależność między ekspresją receptorów powierzchniowych na monocytach a aktywnością fagocytarną i zdolnością do syntezy RFT w grupie badanej i kontrolnej

Korelacje		PNN		Kontrola	
		r	p	r	p
M CD14+ [MFI] vs	M ops [%]	- 0,444	p < 0,05		
M CD14+ [MFI] vs	M _{RFT} [%]	- 0,397	p < 0,05		
M CD16+ [MFI] vs	M ops [MFI]	- 0,462	p < 0,05		
M CD16+ [MFI] vs	M _{RFT} [MFI]			- 0,514	p < 0,05
M CD32+ [%] vs	M ops [MFI]			0,581	p < 0,05
M CD32+ [%] vs	M _{RFT} [G/l]			- 0,626	p < 0,01
M CD32+ [%] vs	M _{RFT} [MFI]	- 0,355	p < 0,05	- 0,502	p < 0,05
M CD64+ [%] vs	M ops [MFI]			- 0,474	p < 0,05
M CD11b+ [MFI] vs	M nieops [MFI]			0,698	p < 0,01
M CD11b+ [MFI] vs	M _{RFT} [MFI]	- 0,391	p < 0,05		
M CD49d+ [%] vs	M nieops [MFI]	- 0,454	p < 0,05		
M CD49d+ [%] vs	M _{RFT} [%]			- 0,459	p < 0,05
M CD49d+ [%] vs	M _{RFT} [MFI]			- 0,545	p < 0,05
M CD49d+ [MFI] vs	M ops [%]	- 0,384	p < 0,05	0,442	p < 0,05
M CD49d+ [MFI] vs	M ops [MFI]	- 0,375	p < 0,05		
M CD49d+ [MFI] vs	M nieops [MFI]			0,588	p < 0,05

5.5.3 Ocena związku stężenia opsonin z aktywnością fagocytarną oraz zdolnością do syntezy RFT przez neutrofile i monocyty

W grupie pacjentów z PNN wykazano korelacje między stężeniem składników dopełniacza a zdolnością monocytów do fagocytozy nieopsonizowanych bakterii *E. coli*, nie obserwowano natomiast żadnych związków między stężeniem IgG i stężeniem fibronektyny a aktywnością fagocytarną komórek żernych.

Stężenie składnika C3 i C4 dopełniacza w surowicy korelowało dodatnio ze zdolnością monocytów do fagocytozy nieopsonizowanych bakterii *E. coli* (C3 [g/l] vs M nieops [MFI]: $r = 0,51$; $p < 0,05$; C4 [g/l] vs M nieops [MFI]: $r = 0,51$; $p < 0,05$). Wykazano również związek między poziomem C3 a bezwzględną liczbą monocytów zdolnych do fagocytozy nieopsonizowanych bakterii. Zależność tę przedstawiono na Ryc. 4. W grupie osób zdrowych podobnych związków nie stwierdzano.



Ryc. 4. Zależność pomiędzy stężeniem C3 w surowicy a bezwzględną ilością monocytów fagocytujących nieopsonizowane bakterie *E.coli* (M nieops [G/l])

Podgrupa 9 pacjentów z PNN z obniżonym stężeniem składnika C3 dopełniacza (C3 < 0,9 g/l), w stosunku do podgrupy pacjentów z prawidłowym stężeniem C3, charakteryzowała się istotnie niższą zdolnością neutrocytów i monocytów do fagocytozy nieopsonizowanych bakterii *E. coli* oraz niższym stężeniem składnika C4 i IgG w surowicy (Tab. 17).

Tab. 17. Porównanie stężenia opsonin oraz zdolności do fagocytozy nieopsonizowanych bakterii *E. coli* przez neutrofile i monocyty w zależności od stężenia C3

	C3 < 0,9 g/l (N=9)	C3 ≥ 0,9 g/l (N=37)	p
C3 [g/l]	0,784 ± 0,051	1,191 ± 0,194	p < 0,001
C4 [g/l]	0,223 ± 0,042	0,285 ± 0,063	p < 0,01
IgG [g/l]	10,06 ± 1,95	12,15 ± 2,82	p < 0,05
N nieops [MFI]	497,42 ± 85,87	721,16 ± 191,51	p < 0,05
M nieops [%]	32,35 ± 8,99	52,36 ± 14,09	p < 0,05
M nieops [G/l]	0,134 ± 0,025	0,316 ± 0,189	p < 0,01
M nieops [MFI]	89,74 ± 45,60	203,13 ± 95,01	p < 0,05

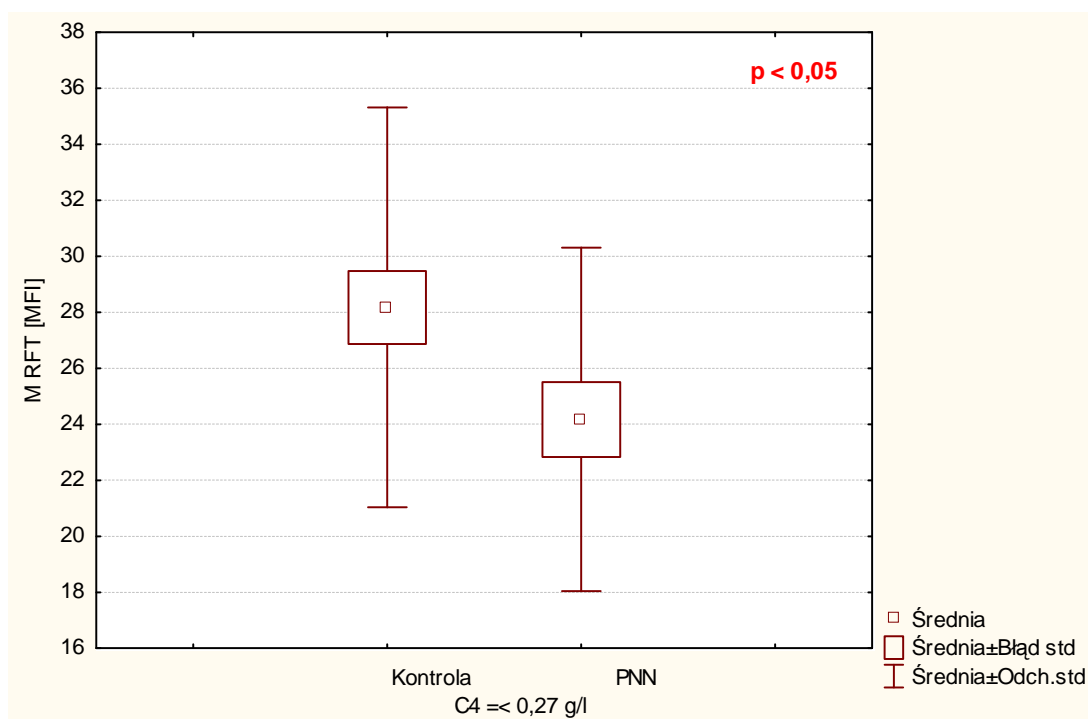
Co więcej u pacjentów z PNN i stężeniem C3 < 0,9 g/l obserwowano istotnie niższy w stosunku do grupy kontrolnej odsetek oraz bezwzględną ilość monocytów zdolnych do fagocytozy nieopsonizowanych bakterii *E. coli* (M nieops [%]: 32,35 ± 8,99 vs 49,64 ± 19,35; p < 0,01; M nieops [G/l]: 0,134 ± 0,025 vs 0,25 ± 0,103; p < 0,05).

Chorzy podzieleni na podgrupy pod względem stężenia C4 (poniżej i powyżej średniej w grupie badanej: 0,27 g/l) różnili się aktywnością fagocytarną komórek żernych oraz zdolnością do syntezy RFT (Tab. 18). Podgrupa ze stężeniem C4 ≤ 0,27 g/l charakteryzowała się istotnie niższą zdolnością do fagocytozy opsonizowanych bakterii *E. coli* przez neutrofile oraz nieopsonizowanych – przez monocyty, a także mniejszą ilością monocytów produkujących RFT.

Tab. 18. Porównanie stężenia opsonin, aktywności fagocytarnej oraz syntezy RFT w zależności od stężenia C4 u pacjentów z PNN

	C4 ≤ 0,27 [g/l] (N=25)	C4 > 0,27 [g/l] (N=22)	p
C3 [g/l]	1,018 ± 0,192	1,224 ± 0,246	p < 0,01
C4 [g/l]	0,228 ± 0,036	0,328 ± 0,044	p < 0,001
N ops [%]	82,64 ± 17,87	90,78 ± 16,51	p < 0,05
N ops [G/l]	3,191 ± 1,31	4,469 ± 1,83	p < 0,05
M nieops [MFI]	147,93 ± 93,19	224,02 ± 91,07	p < 0,05
M_{RFT} [G/l]	0,352 ± 0,12	0,465 ± 0,227	p < 0,05

Ponadto monocyty pacjentów, u których stwierdzano stężenie C4 ≤ 0,27 g/l wykazywały niższą w stosunku do grupy kontrolnej zdolność do syntezy RFT (M_{RFT} [MFI]: 24,13 ± 6,13 vs 28,17 ± 7,13; p < 0,05, Ryc. 5).



Ryc. 5. Porównanie syntezy RFT przez monocyty pacjentów z PNN ze stężeniem C4 ≤ 0,27 g/l oraz monocyty osób zdrowych

5.6 Ocena związku zależnych od PNN zaburzeń metabolicznych, stosowanego leczenia oraz innych parametrów klinicznych i laboratoryjnych ze stwierdzanymi zaburzeniami układu immunologicznego

5.6.1 Stopień zaawansowania PNN

W grupie wszystkich badanych pacjentów z PNN zdolność neutrocytów do pochłaniania nieopsonizowanych bakterii *E. coli* korelowała dodatnio ze stężeniem kreatyniny (Kreatynina [mg/dl] vs N nieops [G/l]: $r = 0,44$; $p < 0,05$) oraz ujemnie z filtracją kłębuszkową (GFR [ml/min] vs N nieops [G/l]: $r = - 0,402$; $p < 0,05$).

Takie same, ale silniejsze zależności wykazano w podgrupie pacjentów z GFR < 30 ml/min (Kreatynina [mg/dl] vs N nieops [G/l]: $r = 0,565$; $p < 0,05$ oraz GFR [ml/min] vs N nieops [G/l]: $r = - 0,579$; $p < 0,05$). Ponadto w podgrupie tej zaobserwowano ujemną korelację między stężeniem kreatyniny a zdolnością do fagocytozy nieopsonizowanych bakterii *E. coli* przez monocyty (Kreatynina [mg/dl] vs M nieops [G/l]: $r = - 0,505$; $p < 0,05$).

U chorych z GFR ≥ 30 ml/min takich związków nie stwierdzano, obserwowano natomiast zależność między stężeniem BUN a odsetkiem monocytów zdolnych do pochłaniania opsonizowanych bakterii *E. coli* przez (BUN [mg/dl] vs M ops [%]: $r = 0,576$; $p < 0,05$).

Również wskaźniki świadczące o zdolności do syntezy RFT przez neutrofile i monocyty wykazywały związek ze stopniem zaawansowania niewydolności nerek w całej badanej grupie pacjentów z PNN. Istotnie statystycznie korelacje przedstawiono w Tab. 19. Odsetek neutrofilów produkujących RFT oraz intensywność syntezy RFT przez neutrofile korelowały ujemnie z filtracją kłębuszkową a dodatnio z poziomem kreatyniny w surowicy pacjentów z PNN. Z kolei intensywność syntezy RFT przez monocyty korelowała ze wszystkimi wykładnikami funkcji nerek – poziomem BUN i kreatyniny w surowicy krwi, stadiem PChN (korelacje dodatnie) oraz GFR (korelacje ujemne).

Tab. 19. Zależność między stopniem zaawansowania niewydolności nerek a zdolnością neutrocytów i monocytów do produkcji RFT w grupie pacjentów z PNN

Korelacje		r	p
GFR [ml/min] vs	N _{RFT} [%]	- 0,307	p < 0,05
Kreatynina [mg/dl] vs	N _{RFT} [%]	0,356	p < 0,05
GFR [ml/min] vs	N _{RFT} [MFI]	- 0,357	p < 0,05
Kreatynina [mg/dl] vs	N _{RFT} [MFI]	0,305	p < 0,05
GFR [ml/min] vs	M _{RFT} [MFI]	- 0,387	p < 0,05
Stadium PChN vs	M _{RFT} [MFI]	0,368	p < 0,05
BUN [mg/dl] vs	M _{RFT} [MFI]	0,347	p < 0,05
Kreatynina [mg/dl] vs	M _{RFT} [MFI]	0,319	p < 0,05

Podobne, jednak silniejsze zależności zaobserwowano u pacjentów z filtracją kłębuszkową ≥ 30 ml/min (Tab. 20).

Tab. 20. Zależność między stopniem zaawansowania niewydolności nerek a zdolnością komórek żernych do produkcji RFT w grupie pacjentów z GFR ≥ 30 ml/min

Korelacje		r	p
GFR [ml/min] vs	M _{RFT} [%]	- 0,860	p < 0,001
GFR [ml/min] vs	M _{RFT} [MFI]	- 0,670	p < 0,05
BUN [mg/dl] vs	N _{RFT} [MFI]	0,656	p < 0,05
BUN [mg/dl] vs	M _{RFT} [%]	0,802	p < 0,01
BUN [mg/dl] vs	M _{RFT} [MFI]	0,592	p < 0,05
Kreatynina [mg/dl] vs	M _{RFT} [%]	0,749	p < 0,01

Natomiast w podgrupie chorych z GFR < 30 ml/min nie stwierdzano korelacji między wykładnikami zaawansowania niewydolności nerek a zdolnością komórek żernych do produkcji RFT.

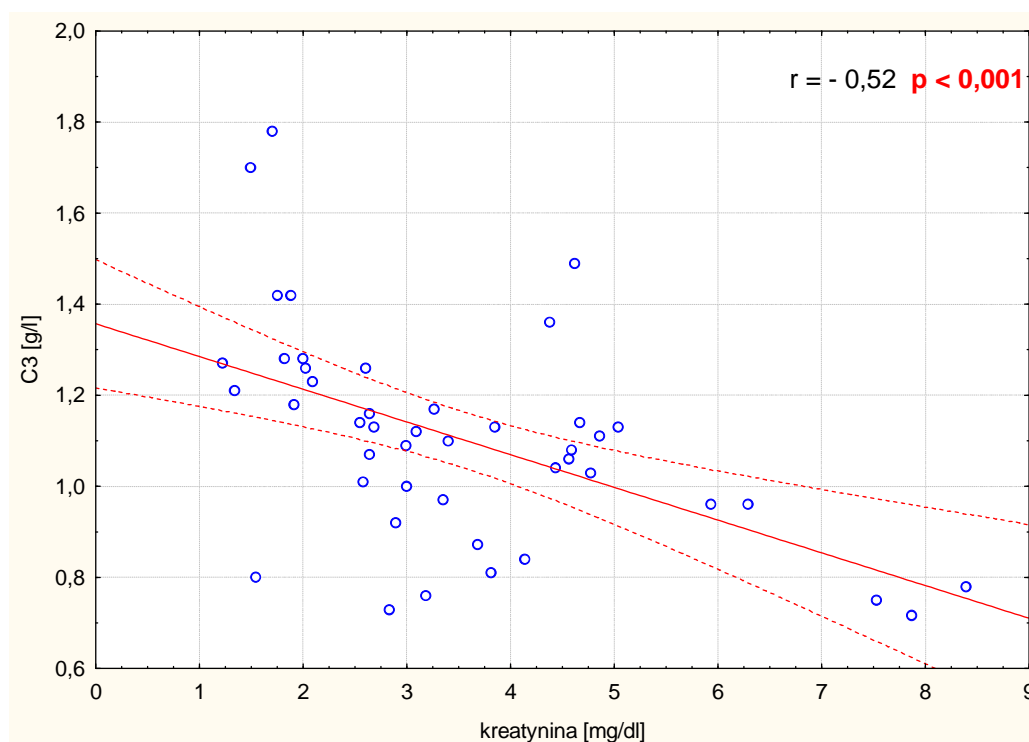
W całej badanej grupie chorych z PNN zaobserwowano szereg zależności między wykładnikami funkcji nerek a ekspresją receptorów zaangażowanych w proces fagocytozy na komórkach żernych (Tab. 21). Odsetek monocytów wykazujących na swojej powierzchni ekspresję receptora CD14, CD64 oraz procent granulocytów CD64 pozytywnych wzrastał,

natomiast ekspresja cząsteczki CD32 na komórkach żernych ulegała zmniejszeniu w miarę progresji PNN.

Tab. 21. Zależność między stopniem zaawansowania niewydolności nerek a ekspresją receptorów na fagocytach u pacjentów z PNN

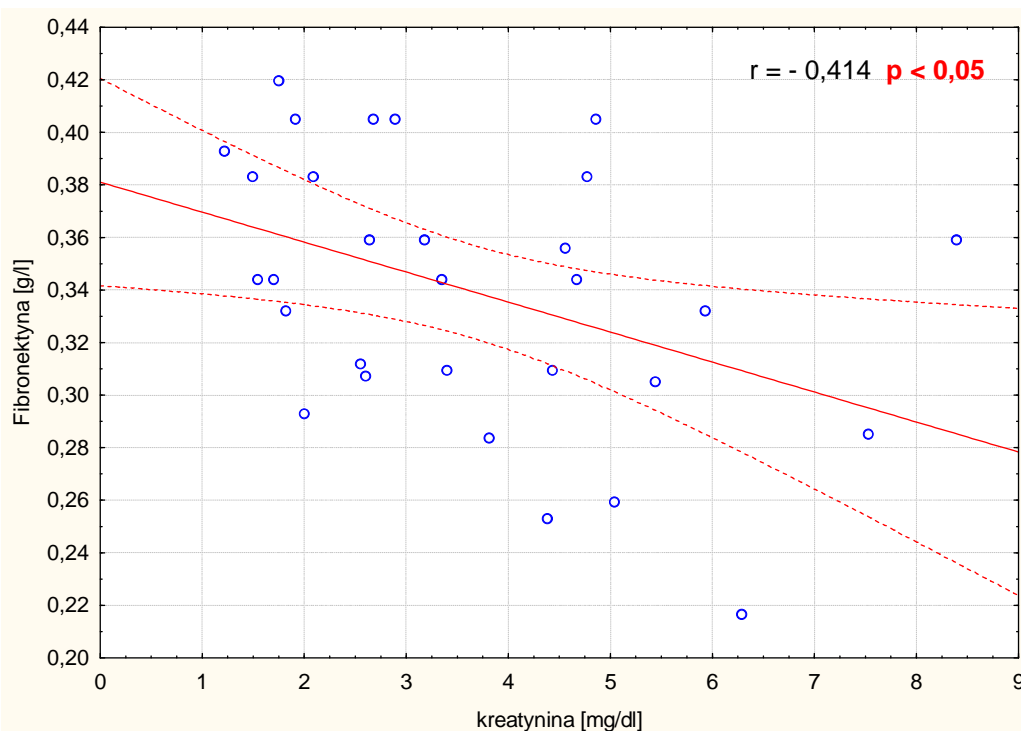
Korelacje		r	p
GFR [ml/min] vs	N CD32+ [MFI]	0,353	p < 0,05
GFR [ml/min] vs	M CD14+ [%]	- 0,392	p < 0,01
GFR [ml/min] vs	M CD64+ [%]	- 0,37	p < 0,05
Stadium PChN vs	N CD32+ [MFI]	- 0,331	p < 0,05
Stadium PChN vs	M CD14+ [%]	0,399	p < 0,01
Stadium PChN vs	M CD64+ [%]	0,377	p < 0,05
BUN [mg/dl] vs	M CD32+ [%]	- 0,336	p < 0,05
Kreatynina [mg/dl] vs	N CD64+ [%]	0,349	p < 0,05
Kreatynina [mg/dl] vs	M CD14+ [%]	0,321	p < 0,05
Kreatynina [mg/dl] vs	M CD64+ [%]	0,319	p < 0,05

W grupie pacjentów z PNN wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania niewydolności nerek stwierdzano niższe stężenia składnika C3 dopełniacza w surowicy.



Ryc. 6. Zależność między stężeniem kreatyniny i stężeniem C3 w surowicy pacjentów z PNN

Stężenie C3 korelowało dodatnio z filtracją kłębuszkową (GFR [ml/min] vs C3 [g/l]: $r = 0,457$; $p < 0,05$) i ujemnie ze stadiem PChN (Stadium PChN vs C3 [g/l]: $r = - 0,468$; $p < 0,05$), stężeniem BUN (BUN [mg/dl] vs C3 [g/l]: $r = - 0,429$; $p < 0,05$) oraz kreatyninemią (Ryc. 6). Również stężenie fibronektyny u pacjentów z PNN korelowało ujemnie ze stężeniem kreatyniny (Ryc. 7).



Ryc. 7. Zależność między stężeniem kreatyniny i fibronektyny u pacjentów z PNN

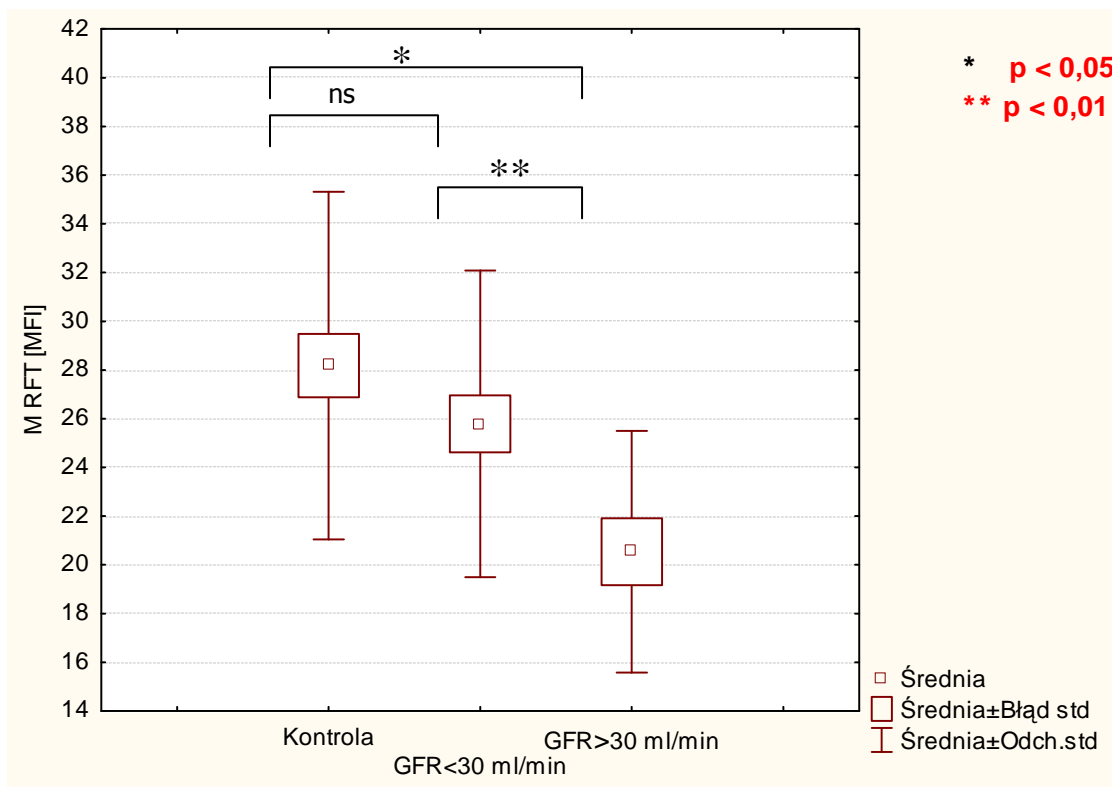
Podgrupy pacjentów z $GFR \geq 30$ ml/min i $GFR < 30$ ml/min różniły się istotnie pod względem niektórych wykładników funkcji komórek fagocytarnych, ekspresji receptorów oraz stężenia C3 w surowicy (Tab. 22).

Tab. 22. Porównanie wskaźników funkcji komórek fagocytarnych, ekspresji receptorów oraz stężenia C3 w surowicy u pacjentów z PNN w zależności od wielkości filtracji kłębuszkowej

	GFR ≥ 30 ml/min (N=16)	GFR < 30 ml/min (N=30)	p
C3 [g/l]	1,251 \pm 0,246	1,038 \pm 0,204	$p < 0,01$
N_{RFT} [%]	82,74 \pm 23,45	94,41 \pm 4,95	$p < 0,05$
N_{RFT} [MFI]	43,82 \pm 19,04	61,57 \pm 28,54	$p < 0,05$
M_{RFT} [MFI]	20,53 \pm 4,95	25,781 \pm 6,29	$p < 0,01$
M CD14+ [%]	65,86 \pm 29,19	81,46 \pm 17,11	$p < 0,01$
M CD14+ [MFI]	1402 \pm 1162,6	1160,59 \pm 1367, 43	$p < 0,05$
M CD64+ [%]	74,42 \pm 17,41	84,05 \pm 6,63	$p < 0,01$

Pacjentów z $GFR < 30$ ml/min w stosunku do drugiej podgrupy chorych cechowało niższe stężenie C3, wyższa zdolność do syntezy RFT przez komórki fagocytarne oraz większy odsetek monocytów CD14+ oraz CD64+. Pozostałe parametry nie różniły się istotnie.

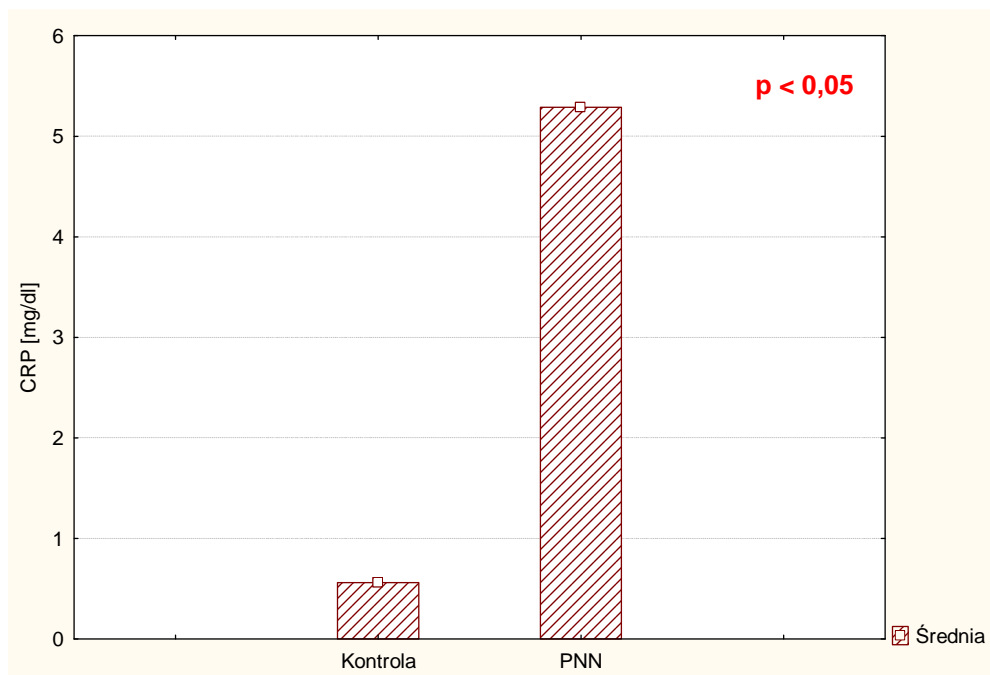
Zdolność monocytów do syntezy RFT u pacjentów z $GFR \geq 30$ ml/min była nie tylko istotnie niższa niż u pacjentów z $GFR < 30$ ml/min, ale również była obniżona w stosunku do grupy kontrolnej (Ryc. 8).



Ryc. 8. Porównanie zdolności monocytów do syntezy reaktywnych związków tlenowych w grupie kontrolnej oraz w podgrupach pacjentów z $GFR \geq 30$ i < 30 ml/min

5.6.2 Stan zapalny

Średnie stężenie CRP u pacjentów z PNN mieściło się w zakresie normy laboratoryjnej, jednak było ono istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej (odpowiednio: $5,23 \pm 11,05$ mg/l vs $0,56 \pm 0,33$ mg/l; $p < 0,05$; Ryc. 9).



Ryc. 9. Porównanie średniego stężenia CRP między grupą kontrolną i badaną

Po podzieleniu pacjentów na dwie podgrupy w zależności od stężenia CRP (powyżej i poniżej mediany w grupie badanej: 2,59 mg/l) stwierdzono, że chorzy ze stężeniem CRP $> 2,59$ mg/l charakteryzowali się wyższym odsetkiem monocytów CD32+, wyższą ekspresją cząsteczki CD49d na granulocytach, a także obniżoną zdolnością do syntezy RFT przez neutrocyty i niższym odsetkiem monocytów produkujących RFT (Tab. 23).

Tab. 23. Porównanie zdolności do syntezy RFT przez komórki fagocytarne oraz ekspresji receptorów powierzchniowych na komórkach żernych w zależności od stężenia CRP w surowicy u pacjentów z PNN

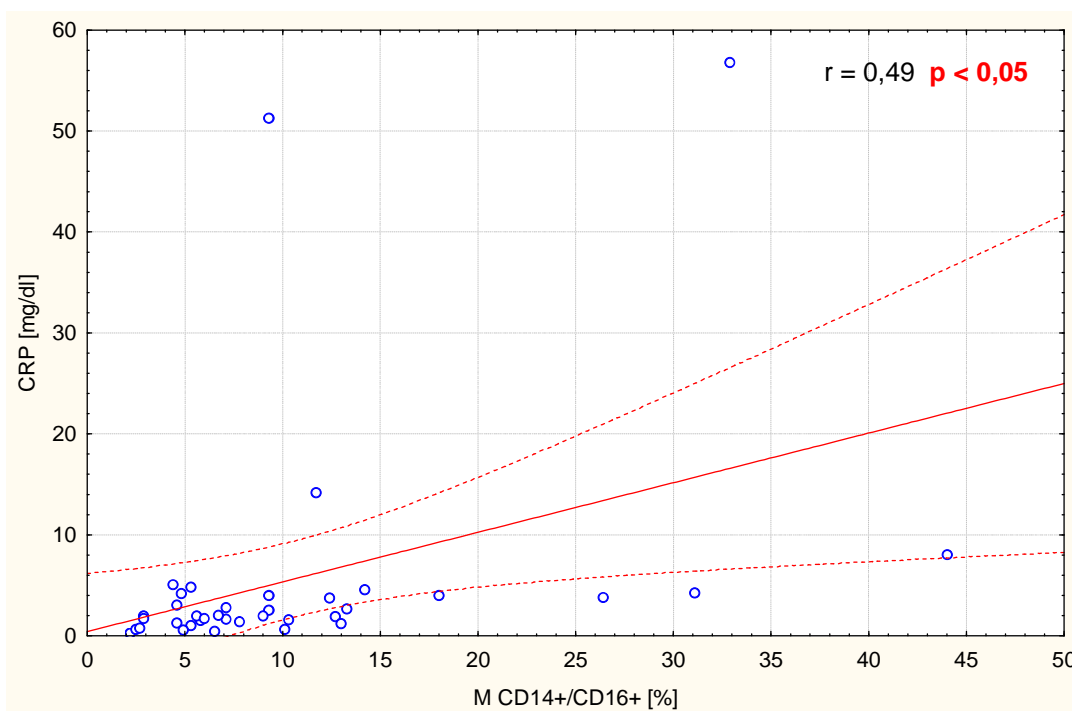
	CRP $> 2,59$ mg/l (N = 22)	CRP $< 2,59$ mg/l (N = 22)	p
CRP [mg/l]	$9,08 \pm 14,78$	$1,38 \pm 0,62$	$p < 0,001$
N _{RFT} [MFI]	$46,42 \pm 14,93$	$67,95 \pm 32,42$	$p < 0,05$
M _{RFT} [%]	$66,27 \pm 22,94$	$80,96 \pm 11,14$	$p < 0,05$
N CD49d+ [MFI]	$481,71 \pm 125,1$	$454,1 \pm 134,01$	$p < 0,05$
M CD32+ [%]	$40,03 \pm 45,51$	$25,92 \pm 40,91$	$p < 0,05$

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic między grupą kontrolną i podgrupą pacjentów ze stężeniem CRP > 2,59 mg/l w zakresie aktywności fagocytarnej komórek żernych, stwierdzono natomiast obniżoną w stosunku do grupy kontrolnej intensywność syntezy RFT przez monocyty (M_{RFT} [MFI]: $22,63 \pm 6,56$ vs $28,18 \pm 7,13$; $p < 0,001$). Neutrocyty i monocyty pacjentów z niższym stężeniem CRP charakteryzowały się wzmożoną w stosunku do grupy kontrolnej zdolnością do fagocytozy opsonizowanych bakterii *E. coli* (Tab. 24).

Tab. 24. Porównanie zdolności do fagocytozy przez komórki żerne pacjentów z CRP < 2,59 mg/l w porównaniu do grupy kontrolnej

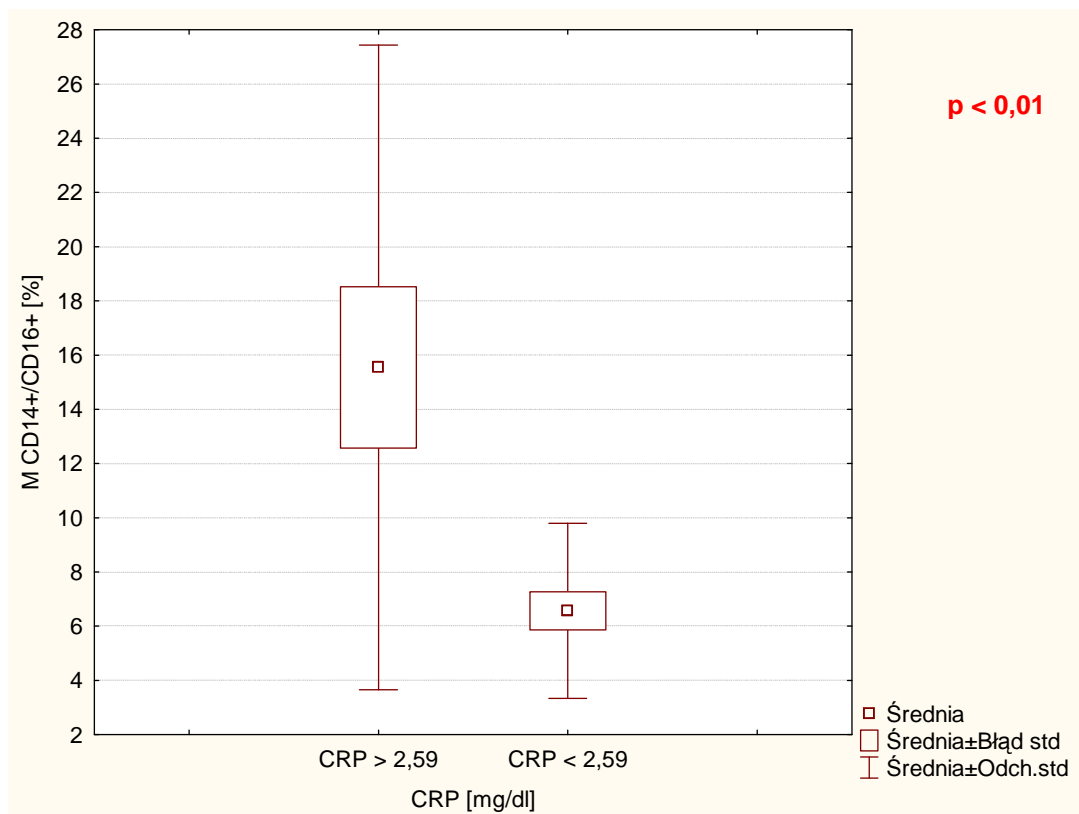
	CRP < 2,59 mg/l	Kontrola	P
N ops [%]	$81,86 \pm 21,49$	$78,56 \pm 18,74$	$p < 0,01$
N ops [G/l]	$3,07 \pm 1,21$	$2,66 \pm 1,20$	$p < 0,01$
N ops [MFI]	$417,06 \pm 181,38$	$334,68 \pm 112,12$	$p < 0,05$
M ops [MFI]	$156,83 \pm 91,78$	$122,8 \pm 75,92$	$p < 0,01$

Ponadto stwierdzono, że stężenie CRP w grupie osób chorych korelowało dodatnio z odsetkiem monocytów prozapalnych CD14+/CD16+ (Ryc. 10).



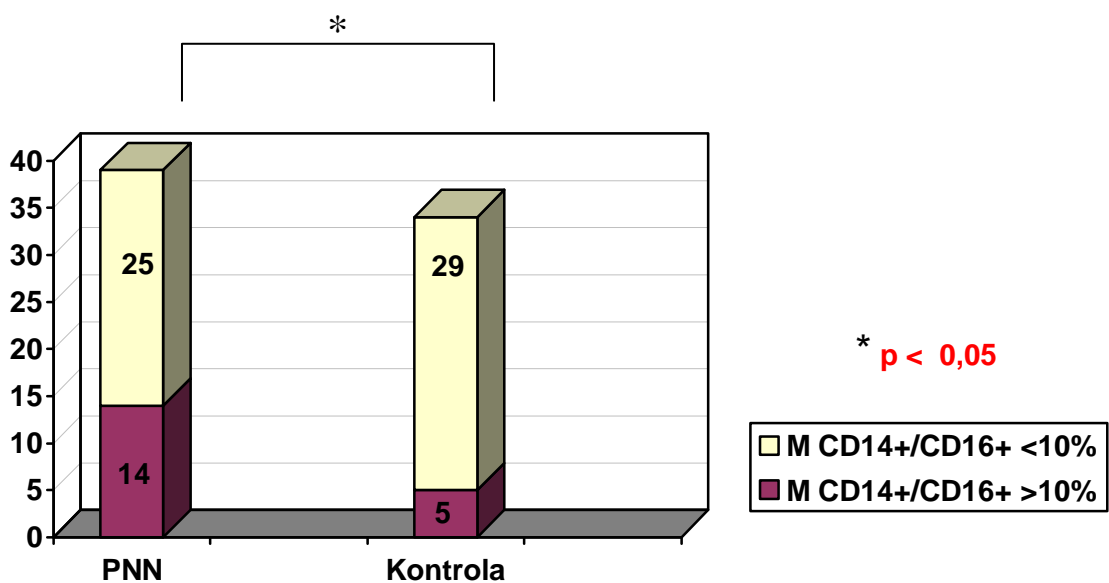
Ryc. 10. Zależność między stężeniem CRP a ilością monocytów prozapalnych (M CD14+/CD16+ [%]) u pacjentów z PNN

Pacjenci ze stężeniem CRP przekraczającym 2,59 mg/l charakteryzowali się istotnie wyższym, w stosunku do pozostałych chorych, odsetkiem monocytów CD14+/CD16+ ($15,28 \pm 11,57\%$ vs $6,57 \pm 3,22\%$; $p < 0,01$; Ryc.11).



Ryc. 11. Porównanie odsetka monocytów prozapalnych u pacjentów PNN w zależności od stężenia CRP

Średni procent monocytów CD14+/CD16+ nie różnił się istotnie między grupą badaną i kontrolną (odpowiednio: $10,49 \pm 8,86\%$ vs $8,46 \pm 6,13\%$). Natomiast 14 osób (35,9 %) w grupie badanej i tylko 5 osób (14,7 %) w grupie kontrolnej charakteryzowało się odsetkiem monocytów prozapalnych przekraczającym 10 % wszystkich monocytów, była to różnica istotna statystycznie (Ryc.12).



Ryc. 12. Porównanie liczby osób w grupie badanej i kontrolnej z odsetkiem monocytów CD14+/CD16+ stanowiących > 10 % i < 10 % monocytów krwi obwodowej

W grupie pacjentów z PNN wykazano szereg korelacji między odsetkiem prozapalnych monocytów a aktywnością komórek fagocytarnych i ekspresją receptorów zaangażowanych w proces fagocytozy. Stwierdzono istotne statystycznie ujemne korelacje między procentem monocytów CD14+/CD16+ a zdolnością do fagocytozy zarówno opsonizowanych oraz nieopsonizowanych bakterii E. coli przez neutrofile oraz nieopsonizowanych - przez monocyty, a także odsetkiem fagocytów produkujących RFT. Zależności te przedstawiono w Tab. 25.

Tab. 25. Zależność między odsetkiem M CD14+/CD16+ a aktywnością komórek fagocytarnych u pacjentów z PNN

Korelacje M CD14+/CD16+ [%] vs	r	p
N ops [MFI]	- 0,413	p < 0,05
N nieops [MFI]	- 0,543	p < 0,05
M nieops [MFI]	- 0,619	p < 0,01
N _{RFT} [%]	- 0,512	p < 0,01
M _{RFT} [%]	- 0,390	p < 0,05

Podobne, aczkolwiek bardziej liczne i silniejsze korelacje zaobserwowano również w podgrupie pacjentów z GFR < 30 ml/min (Tab. 26), natomiast u chorych z filtracją kłębuszkową > 30 ml/min oraz w grupie kontrolnej podobnych związków nie wykazano.

Tab. 26. Zależność między odsetkiem M CD14+/CD16+ a aktywnością komórek fagocytarnych u pacjentów z GFR < 30 ml/min

Korelacje M CD14+/CD16+ [%] vs	r	p
N nieops [MFI]	- 0,538	p < 0,05
M nieops [%]	- 0,539	p < 0,05
M nieops [MFI]	- 0,639	p < 0,01
N_{RFT} [%]	- 0,533	p < 0,01
M_{RFT} [%]	- 0,403	p < 0,05
M_{RFT} [MFI]	- 0,423	p < 0,05

Procent monocytów prozapalnych korelował nie tylko z ekspresją receptorów związanych z procesem fagocytozy na powierzchni monocytów, ale również wykazano zależności z ekspresją tych receptorów na granulocytach (Tab. 27).

Tab. 27. Zależność między odsetkiem M CD14+/CD16+ a ekspresją receptorów powierzchniowych na granulocytach i monocytach pacjentów z PNN

Korelacje M CD14+/CD16+ [%] vs	r	p
N CD14+ [%]	0,409	p < 0,05
N CD32+ [%]	0,534	p < 0,01
N CD64+ [%]	0,364	p < 0,05
N CD64+ [MFI]	0,491	p < 0,01
N CD49d+ [MFI]	0,363	p < 0,05
M CD14+ [MFI]	0,369	p < 0,05
M CD16+ [%]	0,508	p < 0,001
M CD32+ [%]	0,661	p < 0,001
M CD64+ [MFI]	0,523	p < 0,001
M CD49d+ [%]	0,446	p < 0,01
M CD49d+ [MFI]	0,360	p < 0,05
M CD11b+ [MFI]	0,419	p < 0,05

Stwierdzono dodatnie korelacje z odsetkiem granulocytów wykazujących ekspresję cząsteczek CD14, CD 32 i CD64 oraz stopniem ekspresji CD64 i CD49d na tych komórkach. Natomiast w populacji komórek jednojądrzastych wszystkie badane receptory korelowały dodatnio pod względem parametru [%] lub [MFI] z ilością monocytów CD14+/CD16+. W grupie kontrolnej procent monocytów CD14+/CD16+ korelował jedynie z ekspresją cząsteczki CD16 ([%] i [MFI]) na monocytach.

Ponadto podgrupa chorych z odsetkiem monocytów prozapalnych $\geq 10\%$, w stosunku do pacjentów z M CD14+/CD16+ $< 10\%$, cechowała się wyższym stężeniem CRP (odpowiednio: $11,95 \pm 19,03$ mg/l i $2,13 \pm 1,4$ mg/l; $p < 0,05$), oraz obniżoną aktywnością komórek fagocytarnych i podwyższoną ekspresją niektórych receptorów (Tab.28). Obniżona była zdolność do fagocytozy opsonizowanych bakterii E. coli przez neutrofile oraz nieopsonizowanych - przez monocyty (na granicy istotności statystycznej) oraz odsetek granulocytów produkujących reaktywne związki tlenowe. Obie populacje fagocytów wykazywały wyższą ekspresję cząsteczek CD32 i CD49d, a monocyty dodatkowo – CD16 oraz CD64

Tab. 28. Porównanie aktywności komórek fagocytarnych i ekspresji receptorów w podgrupach pacjentów z podwyższonym i prawidłowym odsetkiem monocytów prozapalnych CD14+/CD16+

	M CD14+/CD16+ $\geq 10\%$ (N = 14)	M CD14+/CD16+ $< 10\%$ (N = 25)	p
N ops [MFI]	319,03 \pm 124,89	455,59 \pm 171,62	ns (p = 0,0527)
M nieops [MFI]	134,83 \pm 46,69	199,39 \pm 100,01	ns (p = 0,0518)
N_{RFT} [%]	89,54 \pm 7,73	94,43 \pm 6,24	p < 0,05
N CD32+ [%]	15,85 \pm 33,87	1,12 \pm 1,81	p < 0,001
N CD49d+ [MFI]	521,0 \pm 142,79	424,33 \pm 104,61	p < 0,05
M CD16+ [%]	23,61 \pm 19,31	13,42 \pm 6,11	p < 0,01
M CD32+ [%]	50,46 \pm 46,86	15,86 \pm 33,24	p < 0,001
M CD64+ [MFI]	913,71 \pm 294,71	685,22 \pm 206,79	p < 0,05
M CD49d+ [MFI]	2287,89 \pm 1234,9	1586,95 \pm 681,81	p < 0,05

W porównaniu do grupy osób zdrowych podgrupa pacjentów z podwyższonym odsetkiem monocytów prozapalnych charakteryzowała się niższym odsetkiem monocytów fagocytyujących nieopsonizowane bakterie *E. coli* ($M_{\text{nieops}} [\%]$: $38,82 \pm 14,89$ vs $49,64 \pm 19,39$; $p < 0,05$) oraz obniżoną zdolnością syntezy reaktywnych związków tlenowych przez monocyty ($M_{\text{RFT}} [\text{MFI}]$: $22,81 \pm 5,72$ vs $27,15 \pm 5,89$; $p < 0,05$).

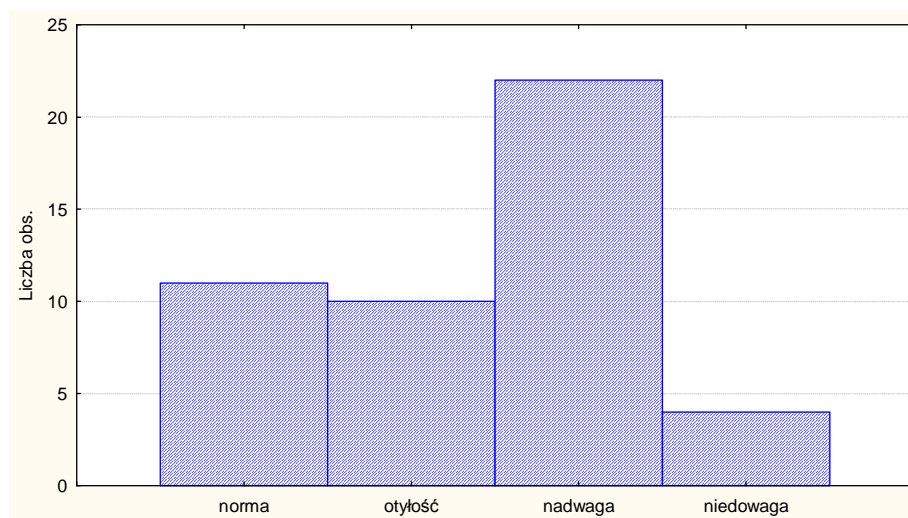
Z kolei podgrupa chorych z prawidłowym odsetkiem monocytów CD14+/CD16+ wykazywała podwyższoną w stosunku do osób zdrowych zdolność do fagocytozy opsonizowanych oraz nieopsonizowanych bakterii *E. coli* przez komórki żerne (Tab. 29).

Tab. 29. Aktywność fagocytarna komórek zernychu pacjentów z prawidłowym odsetkiem monocytów prozapalnych CD14+/CD16+ i u osób zdrowych

	M CD14+/CD16+ < 10%	Kontrola	p
N ops [%]	89,45 ± 16,93	78,56 ± 18,74	p < 0,05
N ops [G/l]	4,24 ± 1,8	2,66 ± 1,20	p < 0,01
N ops [MFI]	455,59 ± 171,62	334,68 ± 112,12	p < 0,01
M ops [MFI]	208,36 ± 113,78	122,8 ± 75,92	p < 0,001
N nieops [MFI]	749,05 ± 198,57	569,47 ± 180,44	p < 0,05
M nieops [MFI]	199,39 ± 100,01	136,19 ± 89,78	p < 0,01

5.6.3 Stan odżywienia

Średnia masa ciała pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek wynosiła $76,47 \pm 13,2$ kg, natomiast wskaźnik BMI $26,86 \pm 4,24$ kg/m². Wartości te nie różniły się istotnie od masy ciała i BMI osób zdrowych. Biorąc pod uwagę wskaźnik BMI prawidłową masę ciała miało 11 pacjentów z PNN (22,9%), pozostałych chorych charakteryzowała nadwaga, otyłość lub niedowaga (Ryc. 13). Zarówno masa ciała jak i BMI korelowały ujemnie ze stadiem PChN ($r = -0,3$; $p < 0,05$).



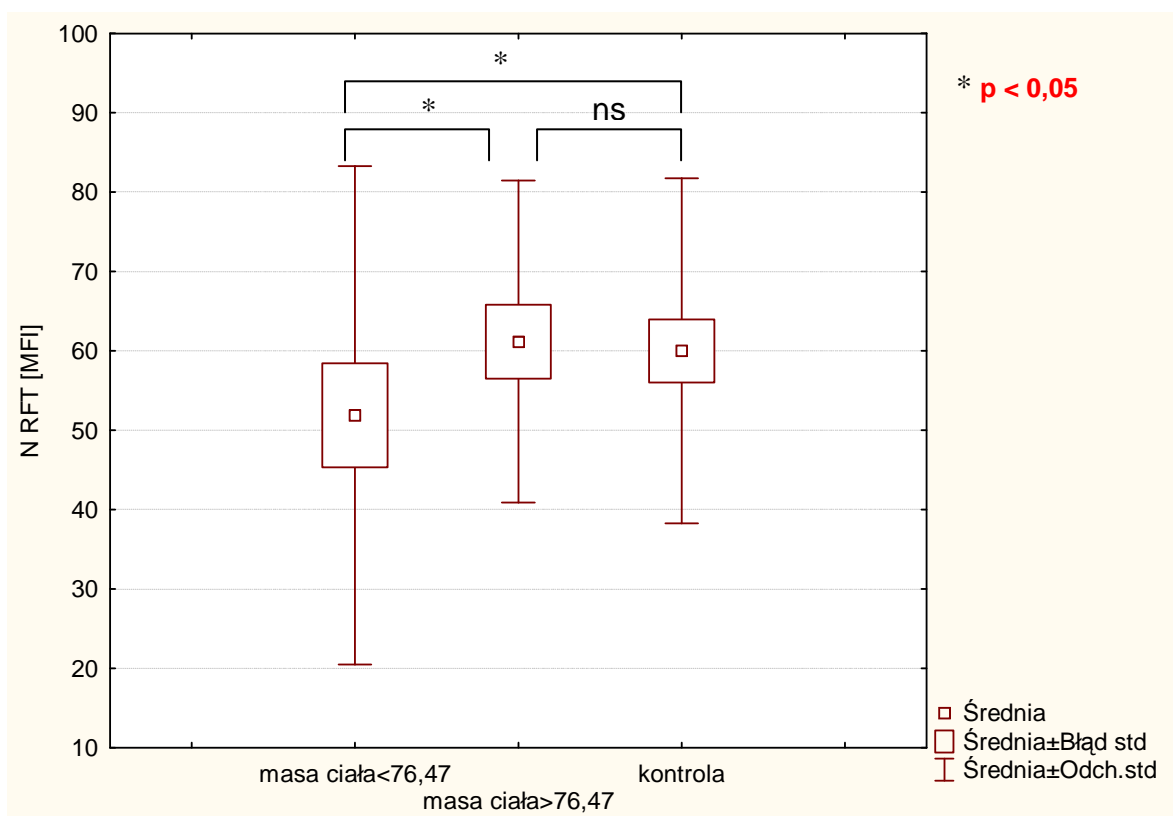
Ryc. 13. Stan odżywienia chorych z PNN na podstawie wskaźnika BMI

Pośród innych ocenianych u pacjentów z PNN parametrów świadczących o stanie odżywienia takich jak: stężenie białka całkowitego, albuminy i transferyny oraz frakcje lipidogramu, z wykładnikami zaawansowania PNN korelowało tylko stężenie transferyny (Transferyna [g/l] vs Stadium PChN: $r = -0,51$; $p < 0,001$) i cholesterolu HDL (Cholesterol HDL [mg/dl] vs Kreatynina [mg/dl]: $r = -0,296$; $p < 0,05$).

Wykazano szereg zależności między wykładnikami stanu odżywienia a aktywnością fagocytarną i ekspresją receptorów powierzchniowych na powierzchni komórek żernych, a także stężeniem substancji o charakterze opsonin u pacjentów z PNN.

Masa ciała korelowała dodatnio z odsetkiem monocytów fagocytujących nieopsonizowane bakterie *E. coli* (Masa ciała [kg] vs M nieops [%]: $r = 0,421$; $p < 0,05$) i w podgrupie pacjentów z masą ciała $< 76,47$ kg (średnia wartość w całej grupie) stwierdzano istotnie niższy odsetek tych monocytów w stosunku do grupy kontrolnej (M nieops [%]: $45,5 \pm 14,03$ vs $49,64 \pm 19,39$; $p < 0,05$). U chorych z masą ciała $> 76,49$ kg obserwowano więcej neutrocytów zdolnych do fagocytozy nieopsonizowanych

bakterii *E. coli* (N nieops [G/l]: $4,244 \pm 1,577$ vs $3,109 \pm 1,844$; $p < 0,05$) w stosunku do pozostałych chorych. Ponadto neutrocyty pacjentów z masą ciała $< 76,47$ kg charakteryzowały się niższą zdolnością do syntezy reaktywnych związków tlenowych w stosunku do chorych z masą ciała przekraczającą $76,47$ kg (N_{RFT} [MFI]: $51,89 \pm 31,39$ vs $61,15 \pm 20,29$; $p < 0,05$) oraz w stosunku do grupy kontrolnej (N_{RFT} [MFI]: $51,89 \pm 31,39$ vs $59,99 \pm 21,72$; $p < 0,05$; Ryc.14).



Ryc. 14. Porównanie zdolności do syntezy RFT przez neutrocyty pacjentów z PNN w zależności od masy ciała oraz w stosunku do grupy kontrolnej

Natomiast zarówno monocyty chorych z masą ciała $< 76,47$ kg (M_{RFT} [MFI]: $23,65 \pm 6,93$ vs $28,17 \pm 7,13$; $p < 0,01$) jak i $> 76,47$ kg (M_{RFT} [MFI]: $24,6 \pm 5,92$ vs $28,17 \pm 7,13$; $p < 0,05$) wykazywały obniżoną zdolność syntezy RFT w stosunku do grupy kontrolnej.

Stężenie białka całkowitego oraz cholesterolu LDL korelowało z intensywnością fagocytozy niopsonizowanych bakterii *E. coli* przez neutrocyty (Białko całk. [g/l] vs N nieops [MFI]: $r = 0,479$; $p < 0,05$; cholesterol LDL vs N nieops [MFI]: $r = 0,488$; $p < 0,05$). Również: stężenie białka całkowitego, albuminy, cholesterolu całkowitego

i trójglicerydów, korelowały dodatnio ze stężeniem substancji o charakterze opsonin, z wyjątkiem stężenia fibronektyny (Tab. 30).

Tab. 30. Zależności między wybranymi wykładnikami stanu odżywienia a stężeniem substancji o charakterze opsonin

Korelacje		r	p
Białko całk. [g/l] vs	C3 [g/l]	0,395	p < 0,01
Białko całk. [g/l] vs	C4 [g/l]	0,304	p < 0,05
Białko całk. [g/l] vs	IgG [g/l]	0,759	p < 0,001
Albumina [g/l] vs	C3 [g/l]	0,405	p < 0,01
Albumina [g/l] vs	IgG [g/l]	0,383	p < 0,05
Cholesterol całk. [mg/dl] vs	C3 [g/l]	0,333	p < 0,05
Cholesterol LDL [mg/dl] vs	C3 [g/l]	0,346	p < 0,05

Podgrupa pacjentów ze stężeniem albuminy powyżej 46,64 g/l (średnia wartość w grupie) charakteryzowała się istotnie wyższym stężeniem składnika dopełniacza C3 oraz IgG w stosunku do pozostałych chorych (Tab. 31).

Tab. 31. Porównanie stężenia C3 i IgG u pacjentów z PNN w zależności od stężenia albuminy

	Albumina > 46,64 g/l (N=25)	Albumina < 46,64 g/l (N=19)	P
C3 [g/l]	1,191 ± 0,244	1,013 ± 0,218	p < 0,05
IgG [g/l]	12,58 ± 2,81	10,72 ± 2,45	p < 0,05

U chorych z hipotransferynią (< 1,9 g/l) średnie stężenie IgG było wyższe niż u pozostałych chorych (odpowiednio: 13,19 ± 2,51 g/l vs 11,18 ± 2,69 g/l; p < 0,05). Ponadto pacjenci z obniżonym stężeniem transferyny charakteryzowali się istotnie wyższym poziomem CRP (10,2 ± 17,78 mg/l vs 3,95 ± 8,64 mg/l; p < 0,05).

U pacjentów charakteryzujących się niższym stężeniem albuminy < 46,64 g/l i u chorych ze stężeniem białka całkowitego < 73,2 g/l (średnia wartość w grupie) nie obserwowano podwyższonej aktywności fagocytarnej komórek żernych w stosunku do grupy kontrolnej. Natomiast u chorych ze stężeniem cholesterolu całkowitego nie przekraczającym 200 mg/dl stwierdzono mniejszą liczbę monocytów zdolnych do fagocytozy nieopsonizowanych bakterii w porównaniu do grupy kontrolnej (M nieops [G/l]: 0,214 ± 0,093 vs 0,255 ± 0,103; p < 0,01). Podobnie w podgrupie

pacjentów ze stężeniem trójglicerydów < 150 mg/dl obserwowano niższy odsetek oraz bezwzględną liczbę monocytów fagocytyzujących nieopsonizowane bakterie E. coli w stosunku do osób zdrowych (M nieops [%]: 45,75 ± 12,47 vs 49,64 ± 19,39; p < 0,05; M nieops [G/l]: 0,221 ± 0,092 vs 0,255 ± 0,103; p < 0,05).

Stężenie albuminy i poszczególnych frakcji lipidów korelowały w większości dodatnio z ekspresją receptorów zaangażowanych w proces fagocytozy na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych oraz w większości ujemnie z receptorami na powierzchni monocytów. Istotne statystycznie związki przedstawiono w Tab. 32.

Tab. 32. Zależności między wybranymi wykładnikami stanu odżywienia a ekspresją receptorów na powierzchni komórek fagocytarnych

Korelacje		r	p
Albumina [g/l] vs	M CD11b+ [%]	- 0,386	p < 0,05
Cholesterol całk. [mg/dl] vs	N CD11b+ [%]	0,429	p < 0,05
Cholesterol całk. [mg/dl] vs	M CD14+ [%]	- 0,453	p < 0,01
Cholesterol całk. [mg/dl] vs	M CD64+ [%]	- 0,545	p < 0,001
Cholesterol HDL [mg/dl] vs	N CD11b+ [%]	0,514	p < 0,01
Cholesterol LDL [mg/dl] vs	N CD49d+ [%]	0,411	p < 0,05
Cholesterol LDL [mg/dl] vs	N CD11b+ [%]	0,357	p < 0,05
Cholesterol LDL [mg/dl] vs	M CD14+ [%]	- 0,544	p < 0,001
Cholesterol LDL [mg/dl] vs	M CD64+ [%]	- 0,581	p < 0,001
Cholesterol LDL [mg/dl] vs	M CD49d+ [MFI]	0,357	p < 0,05
Trójglicerydy [mg/dl] vs	N CD64+ [%]	- 0,387	p < 0,05
Transferyna [g/l] [mg/dl] vs	N CD32+ [MFI]	0,505	p < 0,01
Transferyna [g/l] [mg/dl] vs	M CD14+ [MFI]	0,325	p < 0,05

5.6.4 Zaburzenia gospodarki wapniowo – fosforanowej, wtórna nadczynność przytarczyc

Jak już wcześniej zaznaczono zaburzenia gospodarki wapniowo – fosforanowej dotyczyły wyłącznie chorych w 4 i 5 stadium przewlekłej choroby nerek. Zarówno stężenie fosforanów jak i poziom PTH i iloczyn wapniowo – fosforanowy korelowały dodatnio z wykładnikami stopnia zaawansowania przewlekłej niewydolności nerek (stężenie BUN, kreatyniny, stadium PChN), natomiast dla stężenia wapnia wykazano korelacje ujemne. W Tab. 33. przedstawiono zależności między stężeniem kreatyniny a wskaźnikami zaburzeń gospodarki wapniowo – fosforanowej i PTH.

Tab. 33. Zależności między wskaźnikami zaburzeń gospodarki wapniowo – fosforanowej a stężeniem kreatyniny w surowicy pacjentów z PNN

Korelacje		r	p
Kreatynina [mg/dl] vs	Ca całk. [mg/dl]	- 0,599	p < 0,001
Kreatynina [mg/dl] vs	Fosforany [mg/dl]	0,579	p < 0,001
Kreatynina [mg/dl] vs	Ca x P [mg ² /dl ²]	0,438	p < 0,01
Kreatynina [mg/dl] vs	PTH [pg/ml]	0,635	p < 0,001

Stężenie wapnia całkowitego korelowało dodatnio z ilością monocytów zdolnych do fagocytozy opsonizowanych i nieopsonizowanych bakterii E. coli oraz ujemnie z ilością granulocytów fagocytujących nieopsonizowane bakterie E. coli. Ponadto N nieops [G/l] dodatnio korelowało ze stężeniem fosforanów. Z kolei PTH korelowało ujemnie z ilością monocytów pochłaniających nieopsonizowane E. coli (Tab. 34).

Tab. 34. Zależności między wskaźnikami gospodarki wapniowo – fosforanowej a ilością fagocytów pochłaniających opsonizowane oraz nieopsonizowane bakterie E. coli

Korelacje		r	p
Ca całk. [mg/dl] vs	N nieops [G/l]	- 0,394	p < 0,05
Ca całk. [mg/dl] vs	M ops [G/l]	0,334	p < 0,05
Ca całk. [mg/dl] vs	M nieops [G/l]	0,493	p < 0,01
Fosforany [mg/dl] vs	N nieops [G/l]	0,545	p < 0,01
PTH [pg/ml] vs	M nieops [G/l]	- 0,454	p < 0,05

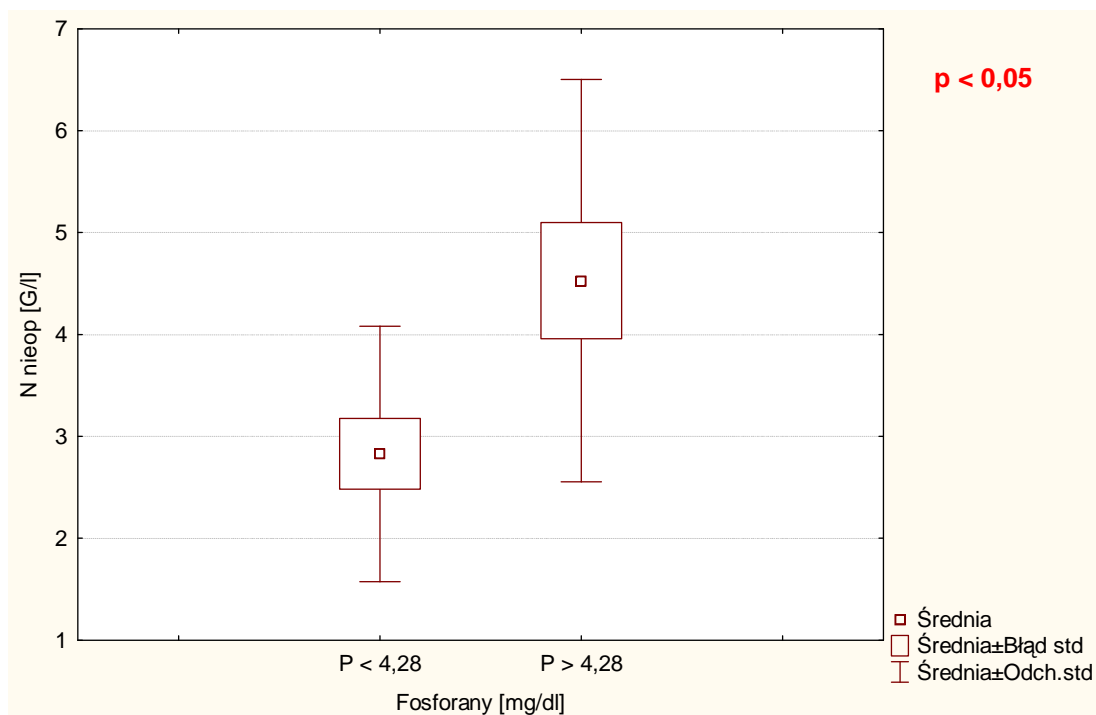
Po podzieleniu grupy badanej na chorych ze stężeniem wapnia całkowitego w surowicy powyżej i poniżej średniego stężenia w grupie (9,07 mg/dl) stwierdzono, że podgrupa chorych z niższym stężeniem wapnia charakteryzowała się mniejszą liczbą monocytów zdolnych do fagocytozy opsonizowanych i nieopsonizowanych bakterii E coli, natomiast większą intensywnością syntezy RFT przez komórki żerne (Tab.35). Ponadto chorzy ci mieli niższe stężenia CRP ($4,47 \pm 11,2$ mg/l vs $5,87 \pm 11,2$ mg/l; $p < 0,05$) oraz IgG ($10,74 \pm 2,49$ g/l vs $12,52 \pm 2,75$ g/l; $p < 0,05$) w surowicy.

Tab. 35. Liczba monocytów zdolnych do fagocytozy bakterii E. coli oraz intensywność syntezy RFT przez komórki żerne u pacjentów z PNN w zależności od stężenia wapnia w surowicy krwi

	Ca całk. > 9,07 mg/dl (N=25)	Ca całk. < 9,07 mg/dl (N=21)	p
M ops [G/l]	$0,352 \pm 0,155$	$0,256 \pm 0,219$	$p < 0,05$
M nieop [G/l]	$0,331 \pm 0,156$	$0,243 \pm 0,212$	$p < 0,05$
N_{RFT} [MFI]	$49,13 \pm 25,18$	$63,74 \pm 27,57$	$p < 0,05$
M_{RFT} [MFI]	$22,32 \pm 5,93$	$26,18 \pm 6,31$	$p < 0,05$

W porównaniu do grupy osób zdrowych chorzy z PNN i stężeniem wapnia < 9,07 mg/dl wykazywali obniżony odsetek i bezwzględną liczbę monocytów zdolnych do fagocytozy nieopsonizowanych bakterii (M nieops [%]: $44,32 \pm 17,07$ vs $49,64 \pm 19,39$; $p < 0,05$; M nieops [G/l]: $0,243 \pm 0,212$ vs $0,255 \pm 0,103$; $p < 0,05$).

Pacjenci ze stężeniem fosforanów przekraczającym 4,28 mg/dl cechowali się istotnie większą ilością neutrocytów zdolnych do fagocytozy nieopsonizowanych bakterii *E. coli* ($4,436 \pm 1,919$ G/l vs $2,828 \pm 1,253$ G/l; $p < 0,05$; Ryc. 15).



Ryc. 15. Porównanie ilości granulocytów zdolnych do fagocytozy nieopsonizowanych bakterii *E. coli* u pacjentów z PNN w zależności od stężenia fosforanów

U pacjentów z $PTH > 300$ pg/ml wykazano mniejszą ilość monocytów oraz większą ilość neutrocytów fagocytujących nieopsonizowane bakterie *E. coli* oraz podwyższony odsetek granulocytów CD64+ oraz monocytów CD11b+ (Tab.36).

Tab.36. Ilość fagocytów zdolnych do fagocytozy nieopsonizowanych bakterii *E. coli* oraz odsetek granulocytów CD64+ oraz monocytów CD11b+ u pacjentów z PNN w zależności od poziomu PTH

	PTH > 300 pg/ml (N=15)	PTH < 300 pg/ml (N=32)	p
N nieops [G/l]	$4,082 \pm 1,019$	$3,372 \pm 2,078$	$p < 0,05$
M nieops [G/l]	$0,256 \pm 0,262$	$0,305 \pm 0,155$	$p < 0,05$
N CD64+ [%]	$5,98 \pm 4,27$	$4,66 \pm 4,29$	$p < 0,05$
M CD11b+ [%]	$97,23 \pm 1,52$	$94,44 \pm 4,19$	$p < 0,05$

W porównaniu do grupy osób zdrowych pacjenci z poziomem PTH > 300 pg/ml charakteryzowali się podwyższonymi wykładnikami aktywności fagocytarnej neutrocytów (Tab. 37).

Tab. 37. Aktywność fagocytarna neutrocytów u pacjentów PNN z podwyższonym poziomem PTH oraz w grupie kontrolnej

	PTH > 300 pg/ml (N=15)	Kontrola	p
N ops [%]	95,19 ± 3,01	78,56 ± 18,74	p < 0,01
N ops [G/l]	4,204 ± 1,17	2,66 ± 1,20	p < 0,01
N ops [MFI]	501,84 ± 192,29	334,68 ± 112,12	p < 0,01
M ops [MFI]	238,15 ± 128,34	122,8 ± 75,92	p < 0,01
N nieop [%]	93,23 ± 3,46	78,29 ± 16,95	p < 0,05
N nieop [G/l]	4,082 ± 1,019	2,96 ± 1,19	p < 0,05
N nieop [MFI]	781,54 ± 199,29	569,47 ± 180,44	p < 0,05

Natomiast pacjenci z PTH < 300 pg/ml nie różnili się istotnie od grupy kontrolnej pod względem badanych wykładników funkcji fagocytarnej komórek żernych.

Nie stwierdzono istotnych różnic dotyczących badanych funkcji komórek żernych w podgrupach pacjentów leczonych przy pomocy preparatów węgla wapnia (N = 24) oraz alfakalcydolem (N = 20) w stosunku do chorych, u których takiego leczenia nie prowadzono.

5.6.5 Niedokrwistość, zaburzenia gospodarki żelazowej i ich leczenie

Średnie stężenie hemoglobiny w grupie badanej wynosiło $11,95 \pm 1,89$ g/dl, hematokryt $36,49 \pm 5,89$ % i były to istotnie niższe wartości ($p < 0,001$) niż w grupie osób zdrowych (Hb: $14,13 \pm 1,03$ g/dl; Ht: $42,5 \pm 3,14$ %). U 15 chorych stwierdzono stężenie Hb < 11 g/dl, u 6 pacjentów < 10 g/dl a u wartość Ht $< 30\%$ u 5 osób. U pacjentów z PNN średnie stężenie żelaza wynosiło $70,4 \pm 25,48$ μ g/dl, transferyny - $2,1 \pm 0,37$ g/l, a ferrytyny $208,8 \pm 307,4$ ng/ml. Hipotransferynemię ($< 1,91$ g/l) obserwowano u 11 osób a stężenie ferrytyny < 100 ng/ml u 19 chorych.

Stężenie hemoglobiny, transferyny oraz hematokryt korelowały dodatnio z filtracją kłębuszkową a ujemnie ze stężeniem BUN, kreatyniny, stadium PChN, a także PTH. Wybrane zależności przedstawiono w Tab. 38.

Tab. 38. Zależności między stężeniem hemoglobiny, transferyny, wartością hematokrytu a stadium PChN i poziomem PTH w grupie badanej

Korelacje		r	p
Stadium PChN vs	Hb [g/dl]	- 0,679	p < 0,001
Stadium PChN vs	Ht [%]	- 0,665	p < 0,001
Stadium PChN vs	Transferyna [g/l]	- 0,506	p < 0,001
PTH [pg/ml] vs	Hb [g/dl]	- 0,531	p < 0,001
PTH [pg/ml] vs	Ht [%]	- 0,513	p < 0,001
PTH [pg/ml] vs	Transferyna [g/l]	- 0,362	p < 0,05

W grupie chorych z przewlekłą niewydolnością nerek stężenie Hb i wartość Ht korelowały ujemnie z intensywnością RFT przez neutrocyty i monocyty (Tab. 39).

Tab. 39. Zależność między stężeniem Hb i wartością Ht a zdolnością do syntezy reaktywnych związków tlenowych przez fagocyty

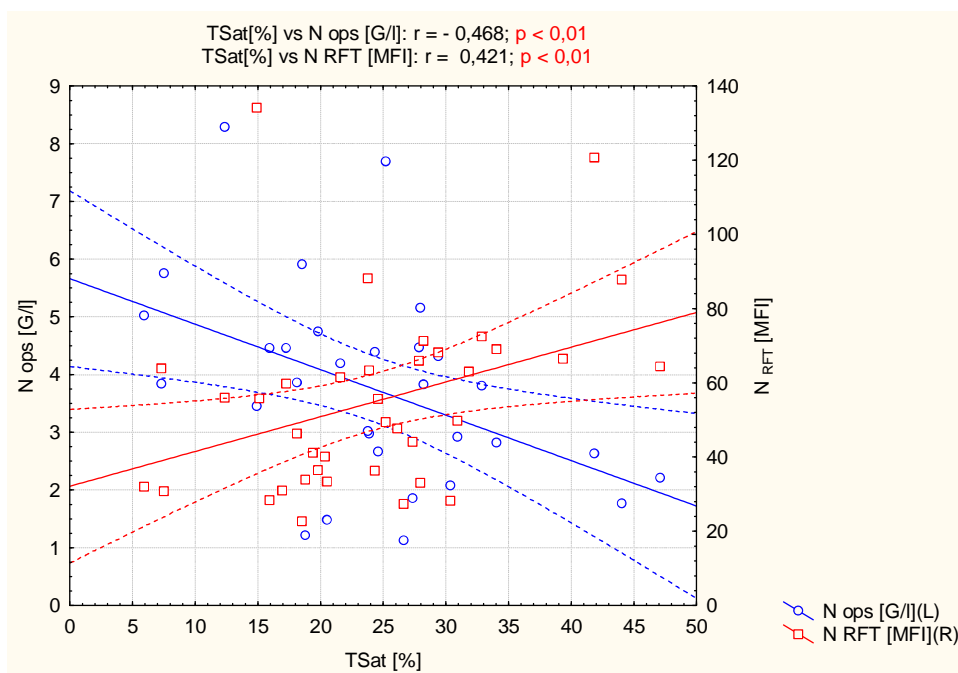
Korelacje		r	p
Hb vs	N _{RFT} [MFI]	- 0,329	p < 0,05
Hb vs	M _{RFT} [MFI]	- 0,394	p < 0,01
Ht vs	N _{RFT} [MFI]	- 0,324	p < 0,05
Ht vs	M _{RFT} [MFI]	- 0,359	p < 0,05

Ponadto w grupie badanej stwierdzono szereg zależności między parametrami gospodarki żelazowej a aktywnością fagocytarną komórek żernych (Tab. 40). Wraz ze wzrostem stężenia żelaza w populacji badanych chorych, odsetek i bezwzględna ilość granulocytów obojętnochłonnych zdolnych do pochłaniania opsonizowanych oraz nieopsonizowanych bakterii *E. coli*, a także intensywność fagocytozy przez monocyty – malały.

Tab. 40. Korelacje między stężeniem żelaza w surowicy pacjentów z PNN a aktywnością fagocytarną komórek żernych

Korelacje		r	p
Żelazo [µg/dl] vs	N ops [%]	- 0,394	p < 0,05
Żelazo [µg/dl] vs	N ops [G/l]	- 0,61	p < 0,001
Żelazo [µg/dl] vs	M ops [MFI]	- 0,406	p < 0,05
Żelazo [µg/dl] vs	N nieop [G/l]	- 0,445	p < 0,05

Również stopień wysycenia transferyny korelował ujemnie z ilością neutrofilów zdolnych do pochłaniania opsonizowanych bakterii *E. coli*, stwierdzono natomiast dodatnią korelację z intensywnością produkcji reaktywnych związków tlenowych. Obie zależności przedstawiono na Ryc. 16.



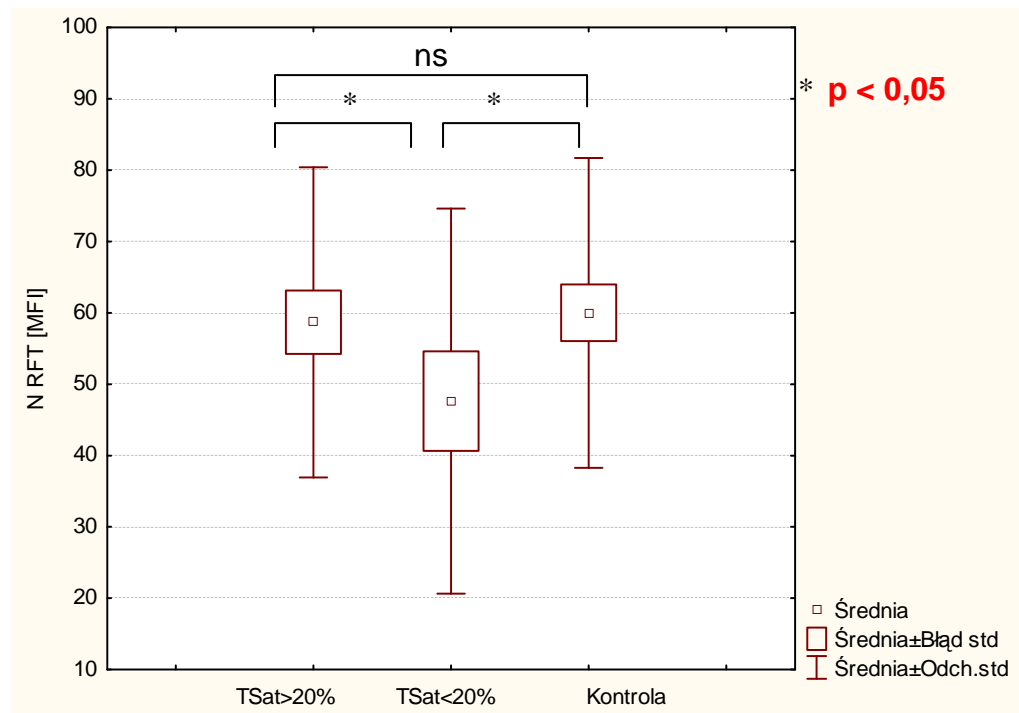
Ryc. 16. Zależności pomiędzy stopniem wysycenia transferyny a ilością neutrocytów fagocytujących opsonizowane *E. coli* oraz syntezą reaktywnych związków tlenowych u pacjentów z PNN

Zarówno pacjenci ze stężeniem żelaza poniżej średniej wartości w całej badanej grupie ($< 70,4 \mu\text{g/dl}$), chorzy ze stężeniem ferrytyny $< 100 \text{ ng/ml}$, jak i osoby, u których stopień wysycenia transferyny był niższy niż 20 % charakteryzowali się wyższym odsetkiem oraz bezwzględną ilością neutrocytów fagocytujących opsonizowane bakterie *E. coli*. Wyższa była również intensywność fagocytozy opsonizowanych bakterii przez obie populacje komórek żernych – neutrofile i monocyty (Tab. 41).

Tab. 41. Porównanie aktywności fagocytarnej neutrocytów i monocytów u pacjentów z PNN w zależności od stanu gospodarki żelazowej

	Żelazo $> 70,4 \mu\text{g/dl}$ (N=21)	Żelazo $< 70,4 \mu\text{g/dl}$ (N=24)	p
N ops [%]	81,22 \pm 19,04	91,15 \pm 15,66	p $<$ 0,05
N ops [G/l]	3,065 \pm 1,632	4,286 \pm 1,522	p $<$ 0,01
M ops [MFI]	135,82 \pm 68,94	225,8 \pm 105,87	p $<$ 0,05
	Ferrytyna $> 100 \text{ ng/ml}$ (N=28)	Ferrytyna $< 100 \text{ ng/ml}$ (N=19)	p
N ops [MFI]	375,54 \pm 127,04	519,49 \pm 163,1	p $<$ 0,05
	T Sat $> 20 \%$ (N=28)	T Sat $< 20 \%$ (N=16)	p
N ops [G/l]	3,273 \pm 1,526	4,551 \pm 1,703	p $<$ 0,05

Synteza reaktywnych związków tlenowych przez monocyty nie różniła się między podgrupami pacjentów różniących się parametrami gospodarki żelazowej i w każdej podgrupie była obniżona w stosunku do grupy kontrolnej. Wykazano natomiast niższą produkcję RFT przez granulocyty obojętnochłonne w podgrupie chorych z wysyceniem transferyny $< 20 \%$ w stosunku do chorych z wysyceniem transferyny $> 20 \%$ (N_{RFT} [MFI]: 47,64 \pm 26,99 vs 58,67 \pm 21,73; p $<$ 0,05) oraz w porównaniu do grupy kontrolnej (N_{RFT} [MFI]: 47,64 \pm 26,99 vs 59,99 \pm 21,72; p $<$ 0,05) Różnice między grupami przedstawiono na Ryc. 17.



Ryc. 17. Intensywność syntezy reaktywnych form tlenu przez neutrocyty pacjentów z PNN w zależności od stopnia wysycenia transferyny i w grupie kontrolnej

Ponadto u pacjentów ze stężeniem żelaza niższym niż 70,4 $\mu\text{g}/\text{dl}$ stwierdzono wyższy odsetek granulocytów CD32+ w stosunku do pozostałych chorych (N CD32+ [%]: $13,22 \pm 29,03$ % vs $1,61 \pm 2,09$ %; $p < 0,05$). Chorzy z ferrytyną > 100 ng/ml charakteryzowali się wyższym odsetkiem monocytów CD11b+ (M CD11b+ [%]: $96,51 \pm 2,09$ % vs $93,54 \pm 4,91$ %; $p < 0,05$). Natomiast przy wysyceniu transferyny < 20 % obserwowano wyższy procent granulocytów CD64+ (N CD64+ [%]: $7,6 \pm 8,07$ vs $3,57 \pm 2,42$; $p < 0,05$). W podgrupie chorych z obniżonym stężeniem transferyny ($< 1,91$ g/l) wykazano wyższą ekspresję receptora CD64 na powierzchni monocytów (M CD64+ [MFI]: $942,67 \pm 210,48$ vs $741,06 \pm 259,94$; $p < 0,01$). Jak już wcześniej wspomniano ta grupa chorych cechowała się również wyższym stężeniem IgG oraz CRP.

Pacjenci, u których prowadzono doustną suplementację preparatami żelaza (N = 10) oraz leczenia przy pomocy erytropoetyny (N = 8) nie różnili się istotnie pod względem badanych parametrów funkcji komórek fagocytarnych oraz ekspresji receptorów na powierzchni tych komórek, od pozostałych chorych.

5.6.6 Wiek

Grupa badana i grupa kontrolna różniły się istotnie pod względem wieku (odpowiednio: $58,23 \pm 14,43$ lata vs $49,77 \pm 13,28$ lata; $p < 0,05$).

W grupie pacjentów z PNN nie stwierdzono zależności między wiekiem a wykładnikami stopnia zaawansowania PNN, stanu zapalnego, parametrami gospodarki wapniowo – fosforanowej i żelazowej oraz funkcją komórek fagocytarnych i ekspresją receptorów powierzchniowych. Nie wykazano również istotnych statystycznie różnic pod względem ww. parametrów pomiędzy podgrupą starszych chorych, których wiek przekraczał średnią wartość w grupie a podgrupą pacjentów młodszych.

Przeprowadzona subanaliza podgrupy pacjentów z PNN (N = 36) oraz podgrupy osób z grupy kontrolnej (N = 36), które nie różniły się pod względem wieku (odpowiednio: $52,72 \pm 12,32$ lata vs $53,61 \pm 10,84$ lata), potwierdziła stwierdzane wcześniej różnice pomiędzy całą grupą badaną i grupą kontrolną. Podgrupa pacjentów z PNN charakteryzowała się wyższym stężeniem C4, podwyższoną zdolnością do fagocytozy opsonizowanych bakterii *E. coli* przez neutrofile i monocyty oraz obniżoną zdolnością do syntezy RFT przez monocyty w stosunku do grupy kontrolnej. Ponadto wykazano również istotną statystycznie różnicę w ekspresji receptora CD11b na powierzchni granulocytów na korzyść podgrupy pacjentów z PNN. Wyniki subanalizy przedstawiono w Tab. 42.

Tab. 42. Porównanie wybranych parametrów układu immunologicznego w podgrupie pacjentów z PNN oraz podgrupie osób zdrowych, nie różniących się pod względem wieku

	PNN (N=36)	Kontrola (N=36)	p
C4 [g/l]	$0,273 \pm 0,065$	$0,213 \pm 0,0467$	$p < 0,001$
N ops [G/l]	$3,754 \pm 1,769$	$2,789 \pm 1,108$	$p < 0,05$
N ops [MFI]	$444,59 \pm 166,98$	$344,83 \pm 114,4$	$p < 0,05$
M ops [MFI]	$199,29 \pm 109,88$	$128,26 \pm 78,71$	$p < 0,05$
M_{RFT} [MFI]	$24,17 \pm 6,95$	$28,63 \pm 6,77$	$p < 0,01$
N CD11b [MFI]	$2049,96 \pm 1592,71$	$1100,04 \pm 436,07$	$p < 0,05$

5.6.7 Choroby współistniejące i stosowane leczenie

5.6.7.1 Cukrzyca

Podgrupa 14 pacjentów z rozpoznaniem cukrzycy, podgrupa 10 chorych z nefropatią cukrzycową oraz podgrupa 12 pacjentów leczonych insuliną nie różniły się istotnie pod względem wszystkich badanych parametrów od pozostałych pacjentów z PNN.

5.6.7.2 Statyny

Podgrupa 19 pacjentów leczonych przy pomocy leków z grupy statyn nie różniła się istotnie pod względem badanych parametrów układu immunologicznego od pozostałych chorych nie otrzymujących takiego leczenia.

6 DYSKUSJA

Przewlekła niewydolność nerek związana jest z nieprawidłowym funkcjonowaniem wielu narządów i układów, w tym układu immunologicznego. Stwierdzane zaburzenia układu immunologicznego dotyczą zarówno mechanizmów odporności komórkowej jak i humoralnej, a konsekwencją tych nieprawidłowości jest między innymi zwiększona częstość powikłań infekcyjnych, w tym bakteryjnych u chorych z PNN.

Kluczową rolę w mechanizmach obrony przeciw wnikającym do organizmu drobnoustrojom stanowią fagocyty – neutrofile i monocyty, które rozpoznają, pochłaniają i niszczą mikroorganizmy. Poszczególne funkcje komórek żernych u pacjentów z PNN były przedmiotem wielu badań, jednakże dostępne w literaturze dane są niejednoznaczne, a nawet sprzeczne. Nie do końca również zdefiniowano czynniki związane z dysfunkcją fagocytów w PNN. Główną rolę przypisuje się takim czynnikom jak: nagromadzenie toksyn mocznicowych, przewlekły stan zapalny, niedożywienie, zaburzenia gospodarki żelazowej i wapniowo – fosforanowej, niedobory substancji o charakterze opsonin, zaburzenie ekspresji receptorów związanych z procesem fagocytozy oraz prowadzone leczenie nerkozastępcze.

Fagocytoza, definiowana jako zdolność do pochłaniania nierozpuszczalnego materiału cząsteczkowego przez komórki żerne, u chorych z niewydolnością nerek była przedmiotem badań już od lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku. W jednym z pierwszych doniesień na ten temat opisano obniżoną aktywność fagocytarną granulocytów wielojądrzastych u chorych z niewydolnością nerek w stosunku do grupy chorych z prawidłową funkcją nerek. Przy czym zaobserwowano również, że zdolność do fagocytozy nie była upośledzona, kiedy badane komórki zawieszono w surowicy krwi [107]. Największe zainteresowanie badaczy budziły komórki fagocytarne w latach 80 – tych i 90 – tych. Ukształtowany pogląd na temat upośledzenia aktywności fagocytarnej, prezentowany w literaturze o charakterze poglądowym [1], [108], opiera się na pracach z tamtego okresu dotyczących pacjentów leczonych nerkozastępczo przy pomocy hemodializy. Wyniki przeprowadzonych wówczas badań w większości wydawały się wykazywać, że aktywność fagocytarna neutrocytów u pacjentów z PNN jest obniżona w stosunku do osób zdrowych [77], [79], [80], [100], [101] [102]. Niemniej jednak wielu badaczy nie stwierdzało upośledzenia zdolności do fagocytozy przez granulocyty w PNN, zarówno u pacjentów leczonych zachowawczo jak i hemodializowanych [103], [104], [105], [106].

Natomiast w niniejszej pracy wykazano podwyższoną zdolność neutrocytów do pochłaniania opsonizowanych bakterii *E. coli* u pacjentów z PNN i są to wyniki odmienne od przedstawianych powyżej danych. Niemniej jednak jest to zgodne z wcześniejszymi badaniami przeprowadzonymi w naszej Klinice, gdzie obserwowano wzmożoną aktywność fagocytarną granulocytów również w grupie pacjentów hemodializowanych i to zarówno w stosunku do kontrolnej grupy osób zdrowych, jak i w odniesieniu do pacjentów z PNN leczonych zachowawczo [109], [110]. Ponadto dokładnie analizując literaturę i przyglądając się otrzywanym przez innych badaczy wynikom należy zauważyć, że niektórzy mogli obserwować podobne tendencje. Grupa autorów z ośrodka w Stanach Zjednoczonych w kilku pracach oceniała między innymi aktywność fagocytarną granulocytów u pacjentów z PNN leczonych zachowawczo - Ward i wsp. [111], McLeish i wsp. [104] oraz u pacjentów hemodializowanych – Jacobs i wsp. [112]. Opisują oni zdolność do fagocytozy przez neutrocyty jako niezmienną w porównaniu do grupy kontrolnej, jednakże w przedstawionych wynikach widać jednoznaczną tendencję do wyższej aktywności fagocytarnej granulocytów w grupie badanej. Różnice te nie osiągnęły ostatecznie istotności statystycznej najprawdopodobniej z powodu małej liczebności badanych grup, oraz jak się wydaje nie najbardziej właściwego doboru metod statystycznych. Z kolei praca Hirabayashi i wsp. [113] pokazuje istotnie wyższy indeks fagocyтары neutrocytów u pacjentów hemodializowanych po zabiegu hemodializy w stosunku do grupy kontrolnej.

W niniejszej pracy dokonano również oceny zdolności granulocytów do pochłaniania nieopsonizowanych bakterii *E. coli* i w tym przypadku nie wykazano istotnych statystycznie różnic między grupą pacjentów z PNN i grupą kontrolną, co jest zgodne z wcześniej prezentowanymi wynikami niektórych autorów.

Należy zatem rozważyć dlaczego badania dotyczące aktywności fagocytarnej granulocytów obojętnochłonnych dają tak rozbieżne wyniki. Wydaje się, że rozbieżności te mają swoje źródło przede wszystkim w różnej metodologii prowadzonych badań. Przeprowadzono je zarówno na izolowanych komórkach żernych jak i w krwi pełnej, używano zarówno opsonizowanych jak i nieopsonizowanych cząsteczek, a oprócz bakterii (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*), stosowano również komórki grzybów (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*) oraz inne cząstki tj. lateks i zymosan, oznaczenia wykonywano przy pomocy cytometru bądź też przy pomocy mikroskopu. Należy jednak nadmienić, że badacze opisujący niezmienną bądź też wzmożoną aktywność fagocytarną neutrocytów, w większości przeprowadzali oznaczenia, podobnie jak w niniejszej

pracy, w krwi pełnej przy pomocy cytometru przepływowego i po zastosowaniu naturalnych stymulatorów np. bakterii. Natomiast upośledzenie aktywności fagocytarnej opisywano zwykle w badaniach na izolowanych komórkach. Ponadto różne były grupy badanych chorych. Wiadomo, że u pacjentów hemodializowanych na funkcję komórek fagocytarnych do czynników związanych z mocznicą dodatkowo dołącza się wpływ leczenia nerkozastępczego. Znaczenie tu ma m.in. rodzaj używanych błon dializacyjnych, różniących się stopniem biozgodności [3]. Wszystko to czyni porównywanie uzyskanych wyników badań bardzo trudnym.

Dlatego też w przedstawionej pracy materiał badawczy stanowili pacjenci leczenia zachowawczo, w różnym stadium zaawansowania przewlekłej choroby nerek. Miało to na celu umożliwienie oceny wpływu przewlekłej niewydolności nerek i związanych z nią zaburzeń metabolicznych na funkcję fagocytów oraz wykluczenie zmian indukowanych leczeniem nerkozastępczym.

Tak więc analiza stwierdzanych u badanych chorych zaburzeń metabolicznych związanych z PNN pozwala znaleźć wśród nich czynniki o możliwym charakterze aktywującym i upośledzającym zdolność granulocytów do fagocytozy.

Opisywana w naszych badaniach aktywacja neutrocytów, przejawiająca się podwyższoną zdolnością do fagocytozy bakterii *E. coli*, wydaje się narastać wraz ze stopniem zaawansowania przewlekłej niewydolności nerek. Przemawiają za tym dodatnie korelacje między wykładnikami aktywności fagocytarnej granulocytów a wskaźnikami niewydolności nerek. Jednakże inni autorzy nie stwierdzali korelacji między fagocytozą a stężeniem kreatyniny [111] lub opisywali upośledzenie fagocytozy narastające w miarę progresji PNN [101]. Istnieją również prace badające wpływ niektórych toksyn mocznicowych na fagocytozę komórek żernych pobieranych od zdrowych ochotników. Vanholder i wsp. [39] nie stwierdzali różnic w aktywności fagocytarnej komórek w obecności żadnej z badanych toksyn mocznicowych, natomiast Klein i wsp. [103] opisali istotnie podwyższoną zdolność do pochłaniania bakterii przez pochodzące od zdrowych osób granulocyty, inkubowane w osoczu pacjentów z PNN leczonych zachowawczo. Można zatem tłumaczyć uzyskane przez nas wyniki obecnością toksyn mocznicowych o zdolności aktywującej neutrocyty.

Pojawiające się w miarę progresji PChN zaburzenia gospodarki wapniowo – fosforanowej również miały aktywujący wpływ na komórki granulocytarne. Pacjenci z wyższym stężeniem fosforanów oraz podwyższonym stężeniem PTH charakteryzowali się większą ilością neutrocytów fagocytujących nieopsonizowane *E. coli*. Ponadto porównując

podgrupy pacjentów różniące się poziomem PTH z grupą kontrolną, tylko pacjenci z PTH przekraczającym 300 pg/ml cechowali się podwyższonymi wykładnikami aktywności fagocytarnej granulocytów. Nie potwierdzono natomiast immunomodulacyjnego wpływu blokerów kanału wapniowego oraz preparatów witaminy D. Jednak dane w literaturze są odmienne. Grupa badaczy pod kierownictwem S. Massry wtórną nadczynność przytarczyc wiąże z upośledzeniem fagocytozy, indukowanym przez działanie PTH podwyższające stężenie wewnątrzkomórkowego wapnia $[Ca^{2+}]_i$ [77], [79]. Jednocześnie dowiedli oni, że leczenie preparatami z grupy antagonistów wapnia może odwracać ten efekt [80], [102]. Należy zaznaczyć, że charakterystyczne dla PNN zaburzenia gospodarki wapniowo – fosforanowej u naszych chorych narastały w miarę progresji choroby, a ponieważ nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej, nie można rozróżnić który z czynników w przypadku naszych pacjentów miał związek z aktywacją granulocytów.

Kolejnym czynnikiem, który wydaje się w aktywować fagocytozę granulocytów u badanych w niniejszej pracy chorych jest niedobór żelaza. Podwyższoną zdolność neutrocytów do fagocytozy opsonizowanych bakterii stwierdzano z w grupach z niższym niż średnie stężeniem żelaza ($< 70,4 \mu\text{g/ml}$), ze stężeniem ferrytyny $< 100 \text{ ng/ml}$ oraz z wysyceniem transferyny $< 20 \%$. Interpretacja tych wyników w świetle danych z literatury jest trudna. Ahluwalia i wsp. badający starsze kobiety ze stwierdzanym niedoborem żelaza i prawidłową funkcją nerek nie stwierdzili różnic w aktywności fagocytarnej granulocytów w stosunku do kobiet z wyrównaną gospodarką żelazową [114]. Jednak dokładna analiza przedstawionych wyników pozwala zauważyć podwyższoną, aczkolwiek niezamiennie, intensywność fagocytozy w podgrupie z niedoborem żelaza, co jest zbieżne z naszymi wynikami. Natomiast u pacjentów z PNN zarówno w stanach niedoboru, przeładowania jak i podczas leczenia dożylnymi preparatami żelaza opisywano upośledzenie fagocytozy granulocytów [89], [90], [93], [94]. Pomimo, że u naszych chorych nie stwierdzano podwyższonych poziomów żelaza i średnie jego stężenie mieściło się w zakresie norm laboratoryjnych, to wykazano jednak ujemne korelacje między stężeniem żelaza a wykładnikami zdolności granulocytów do fagocytozy opsonizowanych oraz nieopsonizowanych bakterii, co z jednej strony łączy się ze wzmożoną fagocytozą opisywaną u naszych chorych z niedoborem żelaza, z drugiej zaś strony przy istniejącym stanie „przeładowania” żelazem mogłoby wiązać się z upośledzeniem fagocytozy.

Wykładniki stanu zapalnego stwierdza się u 25 – 35 % pacjentów z PNN leczonych zachowawczo [40], [41]. Podwyższone w stosunku do grupy kontrolnej stężenie CRP oraz podwyższony odsetek monocytów prozapalnych obserwowany u 35,9 % chorych przemawia za istnieniem przewlekłego stanu zapalnego u badanych w naszej pracy pacjentów. Odsetek monocytów o fenotypie prozapalnym korelował ujemnie ze zdolnością neutrocytów do fagocytozy opsonizowanych oraz nieopsonizowanych bakterii *E. coli* i podgrupa pacjentów z podwyższonymi wskaźnikami stanu zapalnego charakteryzowała się niezmienną w stosunku do grupy osób zdrowych oraz obniżoną w stosunku do pozostałych chorych aktywnością fagocytarną neutrocytów. Tak więc przewlekły stan zapalny u pacjentów z PNN może prowadzić do upośledzenia aktywności fagocytarnej neutrocytów. W dostępnej literaturze nie ma prac łączących zaburzenia fagocytozy w PNN z wykładnikami stanu zapalnego.

Wśród badanych chorych nie stwierdzano różnic w stanie odżywienia ocenianego za pomocą masy ciała i wskaźnika BMI w stosunku od grupy kontrolnej. Niedowagę stwierdzano tylko u 8,3 % chorych, natomiast 68,9 % miało nadwagę bądź otyłość. W grupie chorych z niższą masą ciała obserwowano obniżoną w stosunku do pozostałych chorych ilość neutrocytów zdolnych do fagocytozy nieopsonizowanych bakterii *E. coli*. Również stężenie białka całkowitego i frakcji LDL cholesterolu korelowały dodatnio ze zdolnością granulocytów do syntezy nieopsonizowanych bakterii. Wydaje się zatem, że niedożywienie może mieć wpływ upośledzający zdolność fagocytozy nieopsonizowanych cząsteczek przez granulocyty.

Ze stężeniem białka całkowitego, albuminy i cholesterolu korelowały dodatnio stężenia substancji o charakterze opsonin, co może potwierdzać związek ewentualnych niedoborów opsonin z niedożywieniem pacjentów z PNN [68], [69]. Jednakże odmiennie niż w niektórych pracach nie wykazano obniżenia stężenia C3 i fibronektyny w stosunku do grupy kontrolnej, zaś podobnie jak u innych badaczy stężenie IgG było prawidłowe [66], [67], [72], [73], [74]. Ponadto w niniejszej pracy wykazano, że stężenia składowej C3 dopełniacza i fibronektyny korelowały ujemnie z wykładnikami zaawansowania PNN. Podobną zależność dla fibronektyny i kreatyniny wykazali Schena i wsp. jedynie u pacjentów po przeszczepieniu nerki. Nie znaleziono danych w literaturze na temat zależności między stężeniem opsonin a aktywnością fagocytarną granulocytów u pacjentów z PNN. U naszych chorych niższe stężenia C3 i C4 łączą się z obniżoną zdolnością fagocytozy zarówno opsonizowanych jak i nieopsonizowanych bakterii *E. coli*.

Znacząco mniej prac dotyczących pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek poświeconych jest zagadnieniom związanym z aktywnością fagocytarną monocytów.

W naszej pracy wykazaliśmy, że monocyty pacjentów z PNN leczonych zachowawczo pochłaniają opsonizowane bakterie *E. coli* znamiennej aktywniej niż monocyty osób zdrowych. Nie stwierdzono natomiast różnic w zdolności do pochłaniania nieopsonizowanych cząsteczek. Istniejące nieliczne doniesienia na temat aktywności fagocytarnej monocytów w PNN są odmienne. Pertosa i wsp. opisał upośledzenie fagocytozy przez monocyty u pacjentów hemodializowanych [70], natomiast Muniz-Junqueira i wsp. - u pacjentów z PNN leczonych zachowawczo, hemodializowanych i dializowanych otrzewnowo [115]. Należy jednak zauważyć, że autorzy ci badali izolowane monocyty, co może zaburzać funkcje tych komórek [3]. Z kolei nasze wcześniejsze badania monocytów w krwi pełnej, metodą cytometrii przepływowej u pacjentów hemodializowanych są zgodne z obecnie uzyskanymi wynikami [109], [110].

W odróżnieniu od granulocytów, zdolność monocytów do fagocytozy nieopsonizowanych bakterii korelowała ujemnie ze stężeniem kreatyniny, co może wynikać ze zmniejszającego się w miarę progresji PNN stężenia składnika dopełniacza C3. Co więcej pacjenci z obniżonym stężeniem C3 cechowali się obniżoną zdolnością monocytów do fagocytozy nieopsonizowanych cząsteczek nie tylko w stosunku do grupy pacjentów z prawidłowym stężeniem C3, ale również w stosunku do grupy kontrolnej. Wskaźnik ten był również niższy niż w grupie osób zdrowych u chorych ze stężeniem cholesterolu < 200 mg % oraz stężeniem trójglicerydów < 150 mg %, które to parametry korelowały dodatnio ze stężeniem C3. W literaturze nie znaleziono danych, które łączyłyby upośledzenie fagocytozy przez monocyty pacjentów z PNN z obniżeniem stężenia C3. Schena i Pertosa zwracają uwagę na rolę innej opsoniny – fibronektyny zwiększającej efektywność fagocytozy przez monocyty [70], [116]. Nasze badania nie wykazały jednak zależności między stężeniem fibronektyny i funkcją komórek żernych.

Jak już wcześniej wspomniano u badanych w niniejszej pracy pacjentów z PNN znamiennej częściej stwierdzano podwyższony odsetek monocytów o fenotypie CD14+/CD16+, co przemawia za obecnością przewlekłego stanu zapalnego u tych chorych [49], [50], [51]. Tak jak w przypadku granulocytów stwierdzano ujemne korelacje między odsetkiem prozapalnych monocytów a zdolnością monocytów do pochłaniania nieopsonizowanych cząsteczek. Tak więc monocyty pacjentów z podwyższonym odsetkiem monocytów CD14+/CD16+ charakteryzowały się upośledzeniem fagocytozy nie tylko

w stosunku do pozostałych chorych, ale także w porównaniu do grupy kontrolnej. Wydaje się więc, że w PNN z jednej strony mamy do czynienia z aktywacją jednej populacji monocytów, bowiem będące w mniejszości monocyty CD14+/CD16+ cechują się m.in. wzmożoną aktywnością fagocytarną w stosunku do monocytów CD14+ [117], a z drugiej strony - upośledzeniem fagocytozy przez pozostałe monocyty. W Tab. 44 przedstawiono czynniki o działaniu potencjalnie aktywującym i upośledzającym zdolność neutrocytów i monocytów do fagocytozy.

Tab. 44. Związane z przewlekłą niewydolnością nerek czynniki wpływające na aktywność fagocytarną komórek żernych

	Czynniki aktywujące	Czynniki upośledzające
Neutrofile	Progresja PNN ↓ stężenia wapnia ↑ stężenia fosforanów PTH ↓ stężenia żelaza ↓ stężenia ferrytyny ↓ wysycenia transferyny	Stan zapalny Niedożywienie Niedobór opsonin ↑ stężenia żelaza
Monocyty	↓ stężenia żelaza	Progresja PNN Stan zapalny Niedobór opsonin Niedożywienie ↓ stężenia wapnia PTH ↑ stężenia żelaza

Wzmożona aktywność fagocytarna neutrocytów i monocytów stwierdzana w przeprowadzonych przez nas badaniach wydaje się zaprzeczać zwiększonej zapadalności na infekcje bakteryjne, obserwowanej u pacjentów z niewydolnością nerek. Co ciekawe Skarman i wsp. badający granulocyty zakażone wirusem cytomegalii również opisali wzmożoną zdolność tych komórek do pochłaniania opsonizowanych cząsteczek drożdży, pomimo stwierdzanego klinicznie zwiększonego ryzyka infekcji bakteryjnych u chorych

z aktywnym zakażeniem CMV [118]. Tak więc aktywacja fagocytów nie wyklucza niedoborów odporności. Należy bowiem pamiętać, że niszczenie drobnoustrojów przez komórki żerne jest procesem wieloetapowym. Oprócz badanej przez nas zdolności pochłaniania cząsteczek wymaga on również efektywnej chemotaksji, opsonizacji, adhezji, oraz efektywnych mechanizmów wewnątrzkomórkowego zabijania. Istnieją liczne doniesienia w literaturze opisujące upośledzenie chemotaksji i wewnątrzkomórkowego zabijania drobnoustrojów u pacjentów z PNN [35], [36], [37], [105].

W odróżnieniu od podwyższonej zdolności fagocytów do pochłaniania opsonizowanych przez składniki dopełniacza i immunoglobuliny bakterii *E. coli*, nie stwierdzono istotnych różnic między grupą kontrolną i badaną w zakresie fagocytozy nieopsonizowanych cząsteczek. Wydaje się więc, że zachodząca podczas inkubacji opsonizacja przez obecne w krwi własne immunoglobuliny, składniki dopełniacza i fibronektynę nie była wystarczająco efektywna u badanych przez nas pacjentów z PNN. Co więcej jak już wcześniej wspomniano chorzy z niedoborem C3 cechowali się obniżoną zdolnością komórek żernych do fagocytozy nieopsonizowanych, a więc takich, jakim układ immunologiczny musi stawić czoło podczas infekcji, bakterii. Upośledzenie aktywności opsonizacyjnej osocza u pacjentów z PNN opisuje również Lucchi i wsp. i to zarówno u chorych leczonych zachowawczo jak i hemodializowanych [119]. Nie można także wykluczyć, że upośledzenie aktywności fagocytarnej komórek żernych obserwowane przez innych autorów wynika z niedoborów opsonin, czego jednak w tych pracach nie oceniano.

Efektywna adhezja między bakterią a fagocytom wymaga połączenia opsonizowanej cząsteczki z odpowiednimi receptorami na powierzchni komórki żernej. Niewiele wiadomo na temat ekspresji związanych z procesem fagocytozy receptorów dla immunoglobulin klasy G oraz dopełniacza u pacjentów z PNN. Niektóre badania oceniały ich ekspresję na makrofagach otrzewnowych u pacjentów dializowanych otrzewnowo [120], [121], a w innych zwracano uwagę na podwyższony odsetek monocytów prozapalnych CD14+/CD16+ we krwi – zagadnienie to rozważano powyżej. W badaniu dotyczącym dzieci z PNN leczonych zachowawczo, hemodializowanych i dializowanych otrzewnowo Bouts i wsp. stwierdzają obniżoną ekspresję CD32 (FcγII) oraz podwyższoną ekspresję cząsteczki CD11b na neutrocytach i monocytach niezależnie od metody leczenia nerkozastępczego [122]. Również Caimi i wsp. opisują podwyższoną ekspresję receptora CD11b na granulocytach pacjentów z PNN leczonych zachowawczo, tłumacząc ten fakt aktywacją

komórek przez cytokiny prozapalne. Stawiają także hipotezę ze podwyższona ekspresja cząsteczki CD11b, będącej również molekułą adhezyjną, sprzyja uszkodzeniu śródbłonna przez granulocyty [123]. Ponadto z wyjątkiem prac dotyczących aktywności fagocytarnej monocytów CD14+/CD16+ nie ma w literaturze danych na temat zależności między ekspresją receptorów dla immunoglobulin i dopełniacza a zdolnością komórek żernych do fagocytozy w przebiegu PNN. W niniejszej pracy nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między ekspresją badanych receptorów na granulocytach pacjentów z PNN w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednakże zaobserwowano wzmożoną ekspresję receptora CD11b [MFI] na neutrocytach osób z PNN, co potwierdza wcześniejsze obserwacje cytowanych powyżej autorów, aczkolwiek była to różnica na granicy istotności statystycznej. Jedyną dodatnią korelacją pomiędzy ekspresją receptorów a wykładnikami aktywności fagocytarnej była zależność między odsetkiem i bezwzględną ilością granulocytów fagocytydujących nieopsonizowane bakterie, a procentem granulocytów CD11b pozytywnych. Pozostałe korelacje były ujemne. Można zatem założyć, że wzmożona zdolność neutrocytów do fagocytozy opsonizowanych bakterii E.coli w badanej grupie chorych z PNN nie wynika ze zwiększonej ekspresji badanych receptorów dla immunoglobulin i dopełniacza.

Natomiast na monocytach pacjentów z PNN zaobserwowano istotnie niższą ekspresję cząsteczki CD14 oraz obniżony odsetek monocytów CD32 pozytywnych – wynik na granicy istotności statystycznej. Zmniejszoną ekspresję cząsteczki CD14, receptora z grupy PRR, łączącego się m. in. z lipopolisacharydami (LPS) oraz innymi składnikami błon komórkowych bakterii i grzybów, opisywano u pacjentów hemodializowanych. Wiązano to z przewlekłą symulacją receptorów podczas hemodializy prowadzącym do ich złuszczenia. Ekspresja CD14 zmniejsza się również podczas leczenia glikokortykoidami [51]. Wszelkie korelacje między ekspresją receptorów a wykładnikami aktywności fagocytarnej były ujemne, a więc tak jak w przypadku granulocytów podwyższona zdolność monocytów do pochłaniania opsonizowanych bakterii nie wynika ze zwiększonej ekspresji receptorów dla immunoglobulin klasy G i dopełniacza.

Warunkiem efektywności procesu fagocytozy jest zniszczenie pochłoniętego drobnoustroju przy udziale tlenowych i pozatlenowych mechanizmów wewnątrzkomórkowego zabijania.

W przedstawianej pracy oceniano zdolność syntezy reaktywnych związków tlenowych (reaktywnych form tlenu - RFT) przez neutrofile i monocyty w następstwie pochłonięcia bakterii E.coli, tzw. „wybuch tlenowy”. Dotychczasowe dane na ten temat u pacjentów z PNN

są, podobnie jak w przypadku fagocytozy, niejednoznaczne. Badacze opisują zarówno upośledzoną [113], [124], wzmożoną [103], [111], jak i niezmienną zdolność syntezy RFT [125], [126], [105]. W niniejszej pracy nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w zdolności granulocytów obojętnochłonnych do syntezy RFT między grupą badaną i grupą kontrolną. Różnice w zakresie uzyskiwanych wyników w cytowanym powyżej piśmiennictwie wynikają z różnej metodologii badań. Oceniano syntezę RFT zarówno przez komórki nie poddawane stymulacji, jak i po pobudzeniu procesów tlenowych przy pomocy różnorodnych cząsteczek (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, zymosan) oraz substancji chemicznych (PMA, fMLP). Badania przeprowadzono używając krwi pełnej lub izolowanych komórek, a oznaczenia wykonywano przy pomocy luminometrii lub cytometrii przepływowej. Wszystko to uniemożliwia porównywanie rezultatów tych badań. Niemniej jednak nasze wyniki są zgodne z wynikami autorów stosujących podobną lub tę samą, jak w prezentowanej pracy, metodologię.

Zatem wzmożonej aktywności fagocytarnej neutrocytów u badanych w niniejszej pracy pacjentów z PNN nie towarzyszy podwyższona zdolność do syntezy RFT. Można więc wysunąć przypuszczenie, że intensywnie fagocytyjące komórki nie produkują wystarczającej ilości RFT w celu zniszczenia pochłoniętych bakterii. Ponadto w niewydolności nerek dochodzi najpewniej do upośledzenia pozatlenowych mechanizmów wewnątrzkomórkowego zabijania. Anding i wsp. wykazują obniżoną zdolność do zabijania komórek drożdży przez granulocyty pacjentów hemodializowanych pomimo niezminionej w stosunku do kontroli aktywności fagocytarnej i syntezy RFT [105].

Natomiast w odróżnieniu od populacji granulocytów obojętnochłonnych wykazano, że intensywność syntezy RFT przez monocyty badanych pacjentów z PNN jest obniżona w stosunku do monocytów osób zdrowych. Według naszej wiedzy jest to pierwsze doniesienie dotyczące upośledzenia produkcji RFT przez monocyty chorych z PNN leczonych zachowawczo. W dostępnym piśmiennictwie jedynie Sardenberg i wsp. [124] opisują niższą syntezę związków tlenowych przez monocyty pacjentów hemodializowanych, natomiast wyniki odnoszące się do grupy pacjentów leczonych zachowawczo nie osiągnęły istotności statystycznej. Obserwowana u naszych chorych podwyższona aktywność fagocytarne monocytów oraz obniżona synteza RFT mogą warunkować przeżycie pochłoniętych mikroorganizmów i wyjaśniać zwiększoną zapadalność na infekcje u pacjentów z PNN. Na przykład Wszółka i wsp. opisują zwiększoną częstość przewlekłych zakażeń *Chlamydia pneumoniae* u chorych hemodializowanych, stwierdzając m. in. obecność materiału genetycznego bakterii w monocytach krwi obwodowej [127]. Uzyskane przez nas

wyniki mogą zatem tłumaczyć dysfunkcję monocytów uczestniczących w mechanizmach obronnych przeciw zakażeniu m. in. tym drobnoustrojem.

Podsumowując, wobec niejednoznacznych wyników dotychczasowych badań dotyczących komórek fagocytarnych u pacjentów z PNN celem niniejszej pracy była próba oceny funkcji komórek żernych u pacjentów w różnym stadium zaawansowania choroby, leczonych zachowawczo, w odniesieniu do zaburzeń metabolicznych związanych z PNN.

Rozbieżności w zakresie danych w literaturze odnoszących się do aktywności fagocytarnej komórek żernych w PNN wynikają nie tylko z różnej metodologii badań, ale w świetle uzyskanych przez nas wyników należy zwrócić uwagę na szereg czynników potencjalnie aktywujących, bądź hamujących zdolność tych komórek do fagocytozy. Również wśród badanych w niniejszej pracy pacjentów z PNN można zidentyfikować podgrupy chorych charakteryzujące się niezmienioną, podwyższoną, czy też upośledzoną aktywnością fagocytarną komórek żernych w stosunku do grupy kontrolnej.

Można zatem założyć, iż dysfunkcja komórek fagocytarnych u pacjentów z PNN jest wynikiem złożonych interakcji czynników o charakterze aktywującym bądź też hamującym. Odpowiednie podejście terapeutyczne: hamowanie progresji przewlekłej choroby nerek, zwalczanie ognisk stanu zapalnego, zapobieganie i leczenie niedożywienia oraz wyrównywanie zaburzeń gospodarki wapniowo – fosforanowej i żelazowej może zapobiegać zaburzeniom funkcji komórek fagocytarnych.

Pomimo, że w porównaniu do grupy osób zdrowych w całej grupie badanej nie stwierdzano upośledzenia aktywności fagocytarnej granulocytów, to można określić podgrupy pacjentów charakteryzujące się obniżeniem aktywności fagocytarnej komórek żernych, co łącznie z zaobserwowanym upośledzeniem tlenowych mechanizmów wewnątrzkomórkowego zabijania przez monocyty może tłumaczyć zwiększone ryzyko infekcji u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek.

7 WNIOSKI

1. Neutrofile i monocyty u pacjentów z PNN charakteryzują się podwyższoną zdolnością do fagocytozy opsonizowanych bakterii *E. coli* w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie stwierdza się natomiast różnic w zdolności do pochłaniania nieopsonizowanych cząstek bakteryjnych przez fagocyty osób zdrowych i chorych.
2. Monocyty pacjentów z PNN cechują się obniżoną zdolnością do syntezy reaktywnych związków tlenowych w stosunku do komórek pochodzących od osób zdrowych, natomiast produkcja tych związków przez granulocyty obojętnochłonne nie ulega zmianie u pacjentów z PNN.
3. U chorych z PNN znamienne częściej obserwuje się podwyższony odsetek monocytów prozapalnych CD14+/CD16+, a także obniżoną ekspresję cząsteczki CD14 na monocytach.
4. W surowicy/osoczu krwi pacjentów z PNN nie stwierdza się obniżenia stężenia substancji o charakterze opsonin z ludźmi zdrowymi.
5. W grupie pacjentów z PNN wzmożona aktywność fagocytarna neutrocytów i monocytów nie łączy się z podwyższoną ekspresją receptorów dla opsonin, natomiast niższe stężenia składników dopełniacza wiążą się z obniżeniem zdolności komórek żernych do fagocytozy.
6. U pacjentów z PNN istnieje szereg czynników o działaniu potencjalnie aktywującym (progresja PNN, wtórna nadczynność przytarczyc, niedobór żelaza) lub upośledzającym proces fagocytozy (przewlekły stan zapalny, niedożywienie), które należy brać pod uwagę przy interpretacji badań nad tym zagadnieniem.

8 STRESZCZENIE

U pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek (PNN) obserwuje się zwiększone ryzyko zakażeń bakteryjnych. Kluczową rolę w mechanizmach obrony przeciw wnikającym do organizmu drobnoustrojom stanowią fagocyty - neutrofile i monocyty, które rozpoznają, pochłaniają i niszczą mikroorganizmy. Poszczególne funkcje komórek żernych u pacjentów z PNN były przedmiotem wielu badań, jednakże dostępne w literaturze dane są niejednoznaczne, a nawet sprzeczne. Nie do końca również zdefiniowano czynniki związane z dysfunkcją fagocytów w PNN, a badania w większości dotyczą chorych leczonych nerkozastępczo przy pomocy hemodializy lub dializy otrzewnowej.

Dlatego też celem pracy była ocena funkcji komórek fagocytarnych u pacjentów w różnym stadium zaawansowania przewlekłej niewydolności nerek leczonych zachowawczo w odniesieniu do zaburzeń metabolicznych w przebiegu PNN. Badaniem objęto 48 chorych (31 mężczyzn i 17 kobiet, w średnim wieku $58,23 \pm 14,43$ lat), z przewlekłą niewydolnością nerek leczonych zachowawczo, znajdujących się pod opieką Poradni Chorób Nerek lub hospitalizowanych w Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych SPSK nr 1 ACK AMG. Grupę kontrolną stanowiły 43 zdrowe osoby (27 kobiet i 16 mężczyzn, w wieku $49,77 \pm 13,28$ lat).

Funkcja fagocytarna neutrofilów i monocytów oraz mechanizmy wewnątrzkomórkowego zabijania ("wybuch tlenowy") zostały oznaczone w krwi pełnej przy pomocy zestawów Phagotest i Bursttest. Ocenę ekspresji specyficznych dla fagocytozy receptorów dla immunoglobulin klasy G (FcγRI, II, III) oraz dopełniacza (CR3) na fagocytach przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej przy użyciu przeciwciał monoklonalnych (anty CD16, CD32, CD64, CD11b). Ponadto w surowicy/ osoczu oznaczono stężenia substancji o funkcji opsonin (stężenie C3, C4, IgG, fibronektyny) oraz oceniono szereg parametrów klinicznych i laboratoryjnych.

W wyniku przeprowadzonej analizy uzyskanych danych wykazano, że fagocyty pacjentów z PNN charakteryzują się podwyższoną zdolnością pochłaniania opsonizowanych bakterii *E. coli*, zaś zdolność do fagocytozy nieopsonizowanych cząsteczek jest niezmienną w stosunku do grupy kontrolnej. Zaobserwowano obniżoną syntezę reaktywnych związków tlenu w odpowiedzi na stymulację procesem fagocytozy

przez monocyty pacjentów z PNN. Ponadto w grupie badanej stwierdzono podwyższony odsetek monocytów prozapalnych CD14+/CD16+. Grupa badana i kontrolna nie różniły się pod względem stężenia substancji o charakterze opsonin. Wykazano, że w grupie pacjentów z PNN wzmożona aktywność fagocytarna neutrocytów i monocytów nie łączy się z podwyższoną ekspresją receptorów dla opsonin, natomiast niższe stężenia składników dopełniacza wiążą się z obniżeniem zdolności komórek żernych do fagocytozy. Ponadto stwierdzono, iż u pacjentów z PNN istnieje szereg czynników o działaniu potencjalnie aktywującym (progresja PNN, wtórna nadczynność przytarczyc, niedobór żelaza) lub upośledzającym proces fagocytozy (przewlekły stan zapalny, niedożywienie).

Podsumowując, aktywność fagocytarna w badanej grupie pacjentów z PNN nie jest upośledzona w stosunku do grupy kontrolnej, jednakże jak zaobserwowano jest ona wynikiem działania szeregu czynników o charakterze aktywującym i hamującym proces fagocytozy. Można wobec tego zidentyfikować podgrupy chorych charakteryzujące się obniżeniem aktywności fagocytarnej komórek żernych, co łącznie z zaobserwowanym upośledzeniem tlenowych mechanizmów wewnątrzkomórkowego zabijania przez monocyty może tłumaczyć zwiększone ryzyko infekcji u pacjentów z PNN leczonych zachowawczo.

9 PIŚMIENICTWO

1. Cohen G, Haag-Weber M, Horl WH. Immune dysfunction in uremia. *Kidney Int Suppl* 1997; 62: S79-S82.
2. Girndt M, Sester M, Sester U, Kaul H, Kohler H. Molecular aspects of T- and B-cell function in uremia. *Kidney Int Suppl* 2001; 78: S206-S211.
3. Himmelfarb J, Hakim RM. Biocompatibility and risk of infection in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9 Suppl 2: 138-144.
4. Powe NR, Jaar B, Furth SL, Hermann J, Briggs W. Septicemia in dialysis patients: incidence, risk factors, and prognosis. *Kidney Int* 1999; 55: 1081-1090.
5. Sarnak MJ, Jaber BL: Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the general population. *Kidney Int* 2000; 58: 1758-1764.
6. Puka J, Rutkowski B, i wsp. Raport o stanie leczenia nerkozastępczego w Polsce – 1999. AMG, Gdańsk 2000.
7. Amenabar JJ, Garcia-Lopez F, Robles NR, et al: 1997 spanish nephrology association (Sociedad Espanola de nefrologia) report on dialysis and transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 2841-2845.
8. Mazzuchi N, Schwedt E, Fernandez JM, et al. Latin American Registry of dialysis and renal transplantation: 1993 annual dialysis data report. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12(12): 2521-2527.
9. Allon M, Depner TA, Radeva M, et al. Impact of dialysis dose and membrane on infection-related hospitalization and death: results of the HEMO Study. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(7): 1863-1870.
10. Allon M, Radeva M, Bailey J, et al. The spectrum of infection-related morbidity in hospitalized haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(6):1180-1186.
11. Evans M, Fryzek JP, Elinder CG, Cohen SS, McLaughlin JK, Nyren O, Fored CM. The natural history of chronic renal failure: results from an unselected, population-based, inception cohort in Sweden. *Am J Kidney Dis* 2005; 46(5): 863-870.

-
12. Jakóbiński M, Gołąb J. Odporność nieswoista. W: Gołąb J, Jakóbiński M, Lasek W. (red.). Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa 2002; 131-156.
 13. Brown E, Gresham E. Phagocytosis. W: Paul WE, Ovid Technologies Inc. (red.). Fundamental immunology, 5th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2003; 1105 - 1126.
 14. Mollinedo F, Borregaard N, Boxer LA. Novel trends in neutrophil structure, function and development. Immunol Today 1999; 20(12): 535-537.
 15. Radkowski M, Olszewska D. Odporność przeciwwakacyjna. W: Gołąb J, Jakóbiński M, Lasek W. (red.). Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa 2002; 339.
 16. Smith CW. Neutrophils. W: Rich RR. (red.). Clinical immunology: principles and practice, 2nd edn. Mosby, London, New York 2003; 2.22.1-2.22.15.
 17. Smith PD, Smythies LE, Wahl SM. Macrophage Effector Function. W: Rich RR. (red.). Clinical immunology: principles and practice, 2nd edn. Mosby, London, New York 2003; 2.19.1-2.19.9.
 18. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Lancet 2001; 357(9270): 1777-1789.
 19. Gołąb J. Etapy przechodzenia leukocytów przez ścianę naczynia. W: Gołąb J, Jakóbiński M, Lasek W. (red.). Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa 2002; 104-113.
 20. Pflow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. J Biol Chem 2000; 275(29): 21785-21788.
 21. Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. Annu Rev Immunol 2002; 20: 825-852.
 22. Jakóbiński M. Układ dopełniacza. W: Gołąb J, Jakóbiński M, Lasek W. (red.). Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa 2002; 118-130.
 23. Ehlers MR. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. Microbes Infect 2000; 2(3): 289-294.

-
24. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 20): 3861-3863.
 25. Pommier CG, Inada S, Fries LF, Takahashi T, Frank MM, Brown EJ. Plasma fibronectin enhances phagocytosis of opsonized particles by human peripheral blood monocytes. *J Exp Med* 1983;157(6):1844-1854.
 26. Klufftinger JL, Kelly NM, Jost BH, Hancock RE. Fibronectin as an enhancer of nonopsonic phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by macrophages. *Infect Immun* 1989; 57(9): 2782-2785.
 27. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 593-623.
 28. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93(5): 1464-1476.
 29. Zhou MJ, Brown EJ. CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. *J Cell Biol* 1994; 125(6): 1407-1416.
 30. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003; 5(14): 1317-1327.
 31. Kobayashi SD, Voyich JM, DeLeo FR. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect* 2003; 5(14): 1337-1344.
 32. Vanholder R, Ringoir S. Infectious morbidity and defects of phagocytic function in end-stage renal disease: a review. *J Am Soc Nephrol* 1993; 3(9): 1541-1554.
 33. Czekalski S. Przewlekła niewydolność nerek (stadia progresji przewlekłej choroby nerek). W: Książek A, Rutkowski B. (red.). *Nefrologia*. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2004.
 34. Haag-Weber M, Cohen G, Horl WH. Clinical significance of granulocyte-inhibiting proteins. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 Suppl 1: 15-16.
 35. Haag-Weber M, Horl WH. Are granulocyte inhibitory proteins contributing to enhanced susceptibility to infections in uraemia? *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11 Suppl 2: 98-100.

-
36. Cohen G, Rudnicki M, Horl WH. Isolation of modified ubiquitin as a neutrophil chemotaxis inhibitor from uremic patients. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(3): 451-456.
 37. Ottonello L, Gnerre P, Bertolotto M, et al. Leptin as a uremic toxin interferes with neutrophil chemotaxis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(9): 2366-2372.
 38. Caldefie-Chezet F, Poulin A, Vasson MP. Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. *Free Radic Res* 2003; 37(8): 809-814.
 39. Vanholder R, De Smet R, Waterloos MA, Van Landschoot N, Vogeleere P, Hoste E, Ringoir S. Mechanisms of uremic inhibition of phagocyte reactive species production: characterization of the role of p-cresol. *Kidney Int* 1995; 47(2): 510-517.
 40. Ortega O, Rodriguez I, Gallar P, et al. Significance of high C-reactive protein levels in pre-dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(6): 1105-1109.
 41. Panichi V, Migliori M, De Pietro S, et al. C reactive protein in patients with chronic renal diseases. *Ren Fail* 2001; 23(3-4): 551-562.
 42. Pawlaczyk K, Oko A, Lindholm B, Czekalski S. Zespół niedożywienie – zapalenie – miażdżyca (zespół MIA) u chorych z niewydolnością nerek. *Pol Merkuriusz Lek* 2003; 15(88): 334-341.
 43. Kaysen GA, Eiserich JP. Characteristics and effects of inflammation in end-stage renal disease. *Semin Dial* 2003; 16(6): 438-446.
 44. Pupim LB, Himmelfarb J, McMonagle E, Shyr Y, Ikizler TA. Influence of initiation of maintenance hemodialysis on biomarkers of inflammation and oxidative stress. *Kidney Int* 2004; 65(6): 2371-2379.
 45. Kaysen GA. The microinflammatory state in uremia: causes and potential consequences. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(7): 1549-1557.
 46. Malaponte G, Bevelacqua V, Fatuzzo P, Rapisarda F, Emmanuele G, Travali S, Mazzarino MC. IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 release from monocytes in haemodialysis patients in relation to dialytic age. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(11): 1964-1970.

-
47. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002;168(7): 3536-3542.
 48. Scherberich JE. Proinflammatory blood monocytes: main effector and target cells in systemic and renal disease; background and therapeutic implications. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003; 41(10): 459-464.
 49. Scherberich JE, Estner H, Segerer W. Impact of different immunosuppressive regimens on antigen-presenting blood cells in kidney transplant patients. *Kidney Blood Press Res* 2004; 27(3): 177-180.
 50. Kawanaka N, Nagake Y, Yamamura M, Makino H. Expression of Fc gamma receptor III (CD16) on monocytes during hemodialysis in patients with chronic renal failure. *Nephron* 2002; 90(1): 64-71.
 51. Scherberich JE, Nockher WA. Blood monocyte phenotypes and soluble endotoxin receptor CD14 in systemic inflammatory diseases and patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(5): 574-578.
 52. Maruyama Y, Lindholm B, Stenvinkel P. Inflammation and oxidative stress in ESRD--the role of myeloperoxidase. *J Nephrol* 2004; 17 Suppl 8: S72-S76.
 53. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18(7): 1272-1280.
 54. Capeillere-Blandin C, Gausson V, Nguyen AT, Descamps-Latscha B, Druke T, Witko-Sarsat V. Respective role of uraemic toxins and myeloperoxidase in the uraemic state. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(6): 1555-1563.
 55. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161(5): 2524-2532.
 56. Morena M, Delbosc S, Dupuy AM, Canaud B, Cristol JP. Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodial Int* 2005; 9(1): 37-46.

-
57. Guarnieri G, Antonione R, Biolo G. Mechanisms of malnutrition in uremia. *J Ren Nutr* 2003; 13(2): 153-157.
 58. Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergström J. Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(7): 953-960.
 59. Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P. The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome - the heart of the matter. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 Suppl 11: 28-31.
 60. Kopple JD, Greene T, Chumlea WC, et al. Relationship between nutritional status and the glomerular filtration rate: results from the MDRD study. *Kidney Int* 2000; 57(4): 1688-1703.
 61. Chandra RK. Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(25): 14304-14307.
 62. Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56 Suppl 3: S73-S76.
 63. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, et al. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 2005; 67(4): 1216-1233.
 64. Kimmel PL, Phillips TM, Simmens SJ, et al. Immunologic function and survival in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1998; 54(1): 236-244.
 65. Rattazzi M, Puato M, Faggini E, Bertipaglia B, Grego F, Pauletto P. New markers of accelerated atherosclerosis in end-stage renal disease. *J Nephrol* 2003; 16(1):11-20.
 66. Myers BD, Klajman A. Levels of serum complement components in patients undergoing renal dialysis. *Isr J Med Sci* 1975; 11(4): 335-339.
 67. Rus HG, Cristea A, Gherman M, Niculescu F, Gavan M. Immunologic alterations associated with chronic hemodialysis. *Med Interne* 1983; 21(4): 289-295.

-
68. Jorgensen KA, Stoffersen E. The complement system in uremia. *Scand J Urol Nephrol* 1980; 14(3): 279-282.
 69. Sakamoto M, Fujisawa Y, Nishioka K. Physiologic role of the complement system in host defense, disease, and malnutrition. *Nutrition* 1998; 14(4): 391-398.
 70. Pertosa G, Mastrolitti G, Spath PJ, Fracasso AR, Manno C, Schena FP. Effect of fibronectin on C3b and Fc receptor-mediated phagocytosis by peripheral blood monocytes in uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant* 1989; 4(1): 15-20.
 71. Sezer S, Ozdemir N, Guz G, Turan M, Arslan S, Haberal M. Immunologic profile of end-stage renal failure patients. *Transplant Proc* 1999; 31(8): 3359-3360.
 72. Eriksen HO, Tranebjaerg L, Clemmensen I, Kjersem H, Skjoldby O. Plasma fibronectin concentration in patients with chronic renal failure and treated with haemodialysis. *Scand J Clin Lab Invest* 1983; 43(8): 723-726.
 73. Schena FP, Pertosa G, Germinario C. Plasma fibronectin levels in patients with chronic uremia. *Nephron* 1986; 44(4): 320-323.
 74. Goldstein CS, Garrick RE, Polin RA, Gerdes JS, Kolski GB, Neilson EG, Douglas SD. Fibronectin and complement secretion by monocytes and peritoneal macrophages in vitro from patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Leukoc Biol* 1986; 39(4): 457-464.
 75. Rutkowski B, Czekalski S. *Praktyczny poradnik rozpoznawania i leczenia zaburzeń Ca - P u pacjentów z niewydolnością nerek*. Gdańsk, Poznań, 2005.
 76. Karpati I, Seres I, Matyus J, Ben T, Paragh G, Varga Z, Kakuk G. Which parameters affect cytosolic free calcium in polymorphonuclear leukocytes of haemodialysis patients? *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(7): 1409-1415.
 77. Alexiewicz JM, Smogorzewski M, Fadda GZ, Massry SG. Impaired phagocytosis in dialysis patients: studies on mechanisms. *Am J Nephrol* 1991; 11(2): 102-111.
 78. Shurtz-Swirski R, Shkolnik T, Shasha SM. Parathyroid hormone and the cellular immune system. *Nephron* 1995; 70(1): 21-24.
 79. Massry S, Smogorzewski M. Dysfunction of polymorphonuclear leukocytes in uremia: role of parathyroid hormone. *Kidney Int Suppl* 2001; 78: S195-S196.

-
80. Alexiewicz JM, Smogorzewski M, Gill SK, Akmal M, Massry SG. Time course of the effect of nifedipine therapy and its discontinuation on $[Ca^{2+}]_i$ and phagocytosis of polymorphonuclear leukocytes from hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 1997; 17(1): 12-16.
 81. Ahmed A, Krol E, Smogorzewski M, Massry SG. Effect of amlodipine therapy on the monoclonal antibody 3G8-induced calcium signal in polymorphonuclear leukocytes of hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 1999; 19(4): 505-508.
 82. Hubel E, Kiefer T, Weber J, Mettang T, Kuhlmann U. In vivo effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on phagocyte function in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1991; 40(5): 927-933.
 83. Tokuda N, Kano M, Meiri H, Nomoto K, Naito S. Calcitriol therapy modulates the cellular immune responses in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2000; 20(2): 129-137.
 84. Boltz-Nitulescu G, Willheim M, Spittler A, Leutmezer F, Tempfer C, Winkler S. Modulation of IgA, IgE, and IgG Fc receptor expression on human mononuclear phagocytes by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ and cytokines. *J Leukoc Biol* 1995; 58(2): 256-262.
 85. Spittler A, Willheim M, Leutmezer F, et al. Effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ and cytokines on the expression of MHC antigens, complement receptors and other antigens on human blood monocytes and U937 cells: role in cell differentiation, activation and phagocytosis. *Immunology* 1997; 90(2): 286-293.
 86. Tokuda N, Levy RB. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 211(3): 244-250.
 87. Tielemans CL, Lenclud CM, Wens R, Collart FE, Dratwa M. Critical role of iron overload in the increased susceptibility of haemodialysis patients to bacterial infections. Beneficial effects of desferrioxamine. *Nephrol Dial Transplant* 1989; 4(10): 883-887.

-
88. Boelaert JR, Daneels RF, Schurgers ML, Matthys EG, Gordts BZ, Van Landuyt HW. Iron overload in haemodialysis patients increases the risk of bacteraemia: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant* 1990; 5(2): 130-134.
 89. Fishbane S. Review of issues relating to iron and infection. *Am J Kidney Dis* 1999; 34(4 Suppl 2): S47-S52.
 90. Sunder-Plassmann G, Patruta SI, Horl WH. Pathobiology of the role of iron in infection. *Am J Kidney Dis* 1999; 34(4 Suppl 2): S25-S29.
 91. Boelaert JR, Cantinieaux BF, Hariga CF, Fondu PG. Recombinant erythropoietin reverses polymorphonuclear granulocyte dysfunction in iron-overloaded dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1990; 5(7): 504-517.
 92. Bayes B, Pastor MC, Bonal J, Foraster A, Romero R. Oxidative stress, inflammation and cardiovascular mortality in haemodialysis--role of seniority and intravenous ferrotherapy: analysis at 4 years of follow-up. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(4): 984-990.
 93. Patruta SI, Edlinger R, Sunder-Plassmann G, Horl WH. Neutrophil impairment associated with iron therapy in hemodialysis patients with functional iron deficiency. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(4): 655-663.
 94. Deicher R, Ziai F, Cohen G, Mullner M, Horl WH. High-dose parenteral iron sucrose depresses neutrophil intracellular killing capacity. *Kidney Int* 2003; 64(2): 728-736.
 95. Macdougall IC, Cooper A. The inflammatory response and epoetin sensitivity. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 Suppl 1: 48-52.
 96. Dębska - Ślizień A. Stany zapalne a efekty leczenia erytropoetyną. W: Rutkowski B. (red.). *Optymalizacja terapii niedokrwistości erytropoetyną u pacjentów hemodializowanych. Przewodnik praktyczny. Poznań 2004; 57-69.*
 97. Macdougall IC, Cooper AC. Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 Suppl 11: 39-43.

-
98. Macdougall IC, Cooper AC. Hyporesponsiveness to erythropoietic therapy due to chronic inflammation. *Eur J Clin Invest* 2005; 35 Suppl 3: 32-35.
 99. Trzonkowski P, Mysliwska J, Debska-Slizien A, Bryl E, Rachon D, Mysliwski A, Rutkowski B. Long-term therapy with recombinant human erythropoietin decreases percentage of CD152(+) lymphocytes in primary glomerulonephritis haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(6): 1070-1080.
 100. Ksiazek A, Koziol M. Phagocytic function of neutrophils during dialysis in relation to some immunological findings. *Nephrol Dial Transplant* 1991; 6 Suppl 3: 31-34.
 101. Mahajan S, Kalra OP, Asit KT, Ahuja G, Kalra V. Phagocytic polymorphonuclear function in patients with progressive uremia and the effect of acute hemodialysis. *Ren Fail* 2005; 27(4): 357-360.
 102. Alexiewicz JM, Smogorzewski M, Klin M, Akmal M, Massry SG. Effect of treatment of hemodialysis patients with nifedipine on metabolism and function of polymorphonuclear leukocytes. *Am J Kidney Dis* 1995; 25(3): 440-444.
 103. Klein JB, McLeish KR, Ward RA. Transplantation, not dialysis, corrects azotemia-dependent priming of the neutrophil oxidative burst. *Am J Kidney Dis* 1999; 33(3): 483-491.
 104. McLeish KR, Klein JB, Lederer ED, Head KZ, Ward RA. Azotemia, TNF alpha, and LPS prime the human neutrophil oxidative burst by distinct mechanisms. *Kidney Int* 1996; 50(2): 407-416.
 105. Anding K, Gross P, Rost JM, Allgaier D, Jacobs E. The influence of uraemia and haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18(10): 2067-73.
 106. Iida T, Umezawa K, Tanaka K, Koga Y, Nakazawa H, Satoh T. Polymorphonuclear cells in chronic hemodialysis patients have intact phagocytotic and impaired bactericidal activities. *Nephron* 1997; 75(1): 41-47.
 107. Brogan TD. Phagocytosis by Polymorphonuclear Leukocytes from Patients with Renal Failure. *BMJ* 1967; 3:596-599
 108. Horl WH. Neutrophil function and infections in uremia. *Am J Kidney Dis* 1999; 33(2): xlv-xlvi.

-
109. Król E, Pietkiewicz A, Lewandowski K, Rutkowski B. Phagocytic Activity of Polymorphonuclear Neutrophils (PMNs) and Monocytes (M) in Patients on Chronic Haemodialysis Treatment *Ann Acad Med Ged* 2001; 31 Suppl 1: 271 -278.
 110. Tarasewicz A, Król E, Lewandowski K, Rutkowski B. The Phagocytic Activity of Polymorphonuclear Neutrophils (PMNs) and Monocytes in Patients with Chronic Renal Failure (CRF). *Ann Acad Med Gedan* 2003; 33 Suppl 1: 301-306.
 111. Ward RA, McLeish KR. Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol* 1995; 5(9):1697-1702.
 112. Jacobs AA, Jr., Ward RA, Wellhausen SR, McLeish KR. Polymorphonuclear leukocyte function during hemodialysis: relationship to complement activation. *Nephron* 1989; 52(2): 119-124.
 113. Hirabayashi Y, Kobayashi T, Nishikawa A, Okazaki H, Aoki T, Takaya J, Kobayashi Y. Oxidative metabolism and phagocytosis of polymorphonuclear leukocytes in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1988; 49(4): 305-312.
 114. Ahluwalia N, Sun J, Krause D, Mastro A, Handte G. Immune function is impaired in iron-deficient, homebound, older women. *Am J Clin Nutr* 2004; 79(3): 516-521.
 115. Muniz-Junqueira MI, Braga Lopes C, Magalhaes CA, Schleicher CC, Veiga JP. Acute and chronic influence of hemodialysis according to the membrane used on phagocytic function of neutrophils and monocytes and pro-inflammatory cytokines production in chronic renal failure patients. *Life Sci* 2005; 77(25): 3141-3155.
 116. Schena FP, Pertosa G. Fibronectin and the kidney. *Nephron* 1988; 48(3): 177-182.
 117. Ramirez R, Carracedo J, Berdud I, et al. Microinflammation in hemodialysis is related to a preactivated subset of monocytes. *Hemodial Int* 2006; 10 Suppl 1: S24-S27.
 118. Skarman PJ, Rahbar A, Xie X, Soderberg-Naucler C. Induction of polymorphonuclear leukocyte response by human cytomegalovirus. *Microbes Infect* 2006; 8(6): 1592-1601.

-
119. Lucchi L, Cappelli G, Acerbi MA, Spattini A, Lusvarghi E. Oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes and serum opsonic activity in chronic renal failure. *Nephron* 1989; 51(1): 44-50.
 120. Carcamo C, Fernandez-Castro M, Selgas R, Jimenez C, Molina S, Vara F. Long-term continuous ambulatory peritoneal dialysis reduces the expression of CD11b, CD14, CD16, and CD64 on peritoneal macrophages. *Perit Dial Int* 1996; 16(6): 582-589.
 121. Bouts AH, Davin JC, Krediet RT, Schroder CH, Monnens LA, Nauta J, van de Winkel JG, Out TA. IgG and complement receptor expression in children treated by peritoneal dialysis. *Pediatr Nephrol* 2005; 20(8): 1161-1167.
 122. Bouts AH, Krediet RT, Davin JC, Monnens LA, Nauta J, Schroder CH, van de Winkel JG, Out TA. IGG and complement receptor expression on peripheral white blood cells in uraemic children. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(9): 2296-2301.
 123. Caimi G, Montana M, Carollo C, Porretto F, Vaccaro F, Canino B, Lo Presti R. Polymorphonuclear leukocyte integrins in chronic renal failure. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005; 32(1): 43-49.
 124. Sardenberg C, Suassuna P, Watanabe R, et al. Balance between cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and reactive oxygen species production by monocytes in patients with chronic kidney disease. *Ren Fail* 2004; 26(6): 673-681.
 125. Sardenberg C, Suassuna P, Andreoli MC, et al. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(1): 160-165.
 126. Gastaldello K, Husson C, Wens R, Vanherweghem JL, Tielemans C. Role of complement and platelet-activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(10): 1638-1646.
 127. Wszola M, Kwiatkowski A, Nosek R, et al. Chlamydia pneumoniae infection and ischemic heart disease in hemodialysis patients. *Transplant Proc* 2006; 38(1): 31-34.