

Apoptoza u dzieci i młodych dorosłych z przewlekłą chorobą nerek (PChN)

Apoptoza jest aktywną formą niszczenia komórek w żywym organizmie, inicjowaną przez liczne procesy stymulujące, które podlegają złożonemu systemowi regulacyjnemu. Proces ten odgrywa znaczącą rolę w zaburzeniach układu immunologicznego, również u pacjentów z PChN, zwłaszcza w jej schyłkowej fazie. Celem pracy była ocena stopnia nasilenia apoptozy w limfocytach krwi obwodowej u dzieci i młodych dorosłych z przewlekłą chorobą nerek (PChN) leczonych w Klinice Nefrologii Pediatricznej AM we Wrocławiu. **Materiał i Metody:** Badaniami objęto 70 dzieci i młodych dorosłych; 24 pacjentów w okresie predializacyjnym (Pre), 13 leczonych HD, 14 DO oraz 19 osób zdrowych, jako grupę kontrolną. Oceniano stopień nasilenia apoptozy (faza wczesna i późna) w limfocytach poddanych działaniu Annexyny V-FITC, badano stężenie białek błonowych Fas Ligand i Bcl-2 przy pomocy swoistych przeciwciał. Analizę przeprowadzono w cytometrze przepływowym. Wyniki: Największy odsetek limfocytów w fazie wczesnej i późnej apoptozy stwierdzono u dzieci w okresie predializacyjnym. Aktywność Fas Ligand była podobna we wszystkich badanych grupach, a wartości Bcl-2 istotnie wyższe w grupie HD i DO w porównaniu do pozostałych grup. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy Fas Ligand i Bcl-2 u pacjentów HD i leczonych zachowawczo, ujemna korelacja wystąpiła pomiędzy natężeniem późnej fazy apoptozy i Bcl-2 u chorych poddanych HD i w grupie kontrolnej. **Wnioski:** Największe natężenie apoptozy w limfocytach krwi obwodowej u dzieci występuje w okresie predializacyjnym. Istotne podwyższenie aktywności białka Bcl-2 u pacjentów dializowanych prawdopodobnie zapobiega nadmiernemu nasileniu apoptozy w tej grupie chorych.

(NEFROL. DIAL. POL. 2009, 13, 206-210)

Apoptosis in children and young adults with chronic kidney disease (CKD)

Apoptosis is a set of programmed active and selective mechanisms of cell death allowing the removal of cells in the living organisms. It is initiated by a number of stimuli, which are subject to complicated regulating system. It is proved that apoptosis plays a significant role in immunological disorders in uremic patients. The aim of the study: was to estimate the activity of apoptosis in peripheral blood lymphocytes of children and young adults with chronic kidney disease (CKD). **Material and methods:** 51 patients -13 undergoing haemodialysis (HD), 14 on peritoneal dialysis (PD) and 24 non-dialyzed (ND) CKD patients were enrolled into the study. The control group (Con) comprised 19 age-matched healthy subjects. Activity of lymphocyte apoptosis, Fas Ligand and Bcl-2 proteins expression were investigated. **Results:** The results show that cell apoptosis, in early as well as in the late phase, was increased in ND CKD patients. The activity of Fas Ligand protein was similar in all groups and activity of Bcl-2 protein was significantly higher in HD and PD patients as compared to predialysis and healthy subjects. Positive correlations between Fas Ligand and Bcl-2 in HD and ND children were identified. Negative correlations between late phase of apoptosis and Bcl-2 in HD and control group were found. **Conclusions:** The highest intensity of lymphocyte apoptosis occur in ND CKD children. The significantly enhanced activity of Bcl-2 protein in dialysis patients probably protects from apoptosis.

(NEPHROL. DIAL. POL. 2009, 13, 206-210)

Wstęp

Bardzo duże zainteresowanie wśród badaczy budzi problem zaburzeń układu odpornościowego u chorych z przewlekłą chorobą nerek. Wykazano, że w przebiegu mocznicy obserwuje się skłonność do lim-

fopenii, czym między innymi tłumaczy się zwiększoną podatność na infekcje, częstszą zapadalność na choroby nowotworowe oraz upośledzoną odpowiedź na działania antygenów wirusowych i bakteryjnych. Stwierdzono, że zmniejszona liczba limfo-

Irena MAKULSKA¹

Danuta ZWOLIŃSKA¹

Alicja CHYBICKA²

Dorota NOWOROLSKA²

¹Katedra i Klinika Nefrologii Pediatricznej Akademii Medycznej we Wrocławiu
ul. M. Skłodowskiej Curie 50/52
Kierownik Kliniki
Prof. dr hab.n. med. Danuta Zwolińska
Tel/fax: +48-71 770 30 33
e-mail: nefped@nefped.am.wroc.pl.

²Katedra i Klinika Onkologii i Hematologii Dziecięcej Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik Kliniki
Prof. dr hab.n. med. Alicja Chybicka

Słowa kluczowe:

- apoptoza
- limfocyty krwi obwodowej
- dzieci
- młodzi dorośli
- przewlekła choroba nerek
- hemodializa
- dializa otrzewnowa

Key words:

- apoptosis
- lymphocytes
- chronic kidney disease
- haemodialysis
- peritoneal dialysis
- children
- young adults

Adres do korespondencji:

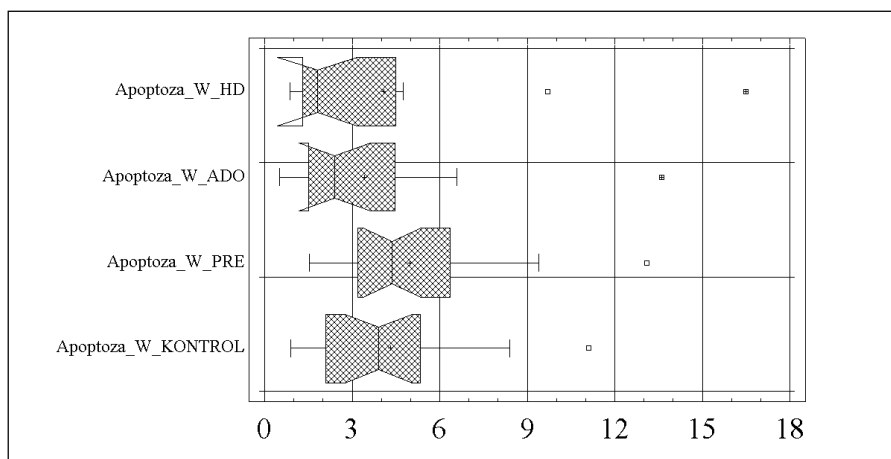
Prof. dr hab.n. med. Danuta Zwolińska
Katedra i Klinika Nefrologii Pediatricznej AM
ul. M. Skłodowskiej Curie 50/52
Wrocław
Tel/fax: +48-71 770 30 33
e-mail: nefped@nefped.am.wroc.pl

cytów dotyczy zarówno populacji komórek T jak i B [3,6]. Dowiedzono także, że nasilenie zaburzeń układu odpornościowego zależy od stopnia zaawansowania PChN oraz zastosowanej metody leczenia nerkozastępczego [1,7,18]. Jednym z głównych czynników, które wpływają niekorzystnie na liczbę i funkcję limfocytów jest zjawisko apoptozy. Apoptoza-zaprogramowana, aktywna i wysoce selektywna forma niszczenia komórek w żywym organizmie jest inicjowana przez liczne czynniki stymulujące. Należą do nich między innymi: uszkodzenie wewnątrzkomórkowego białka i DNA, niektóre czynniki wzrostu oraz cytokiny (IL-1, 2, 5, TNF-alfa, integryny, endotelina1) [10]. Dzięki apoptozie utrzymana jest równowaga pomiędzy liczbą proliferujących i umierających w organizmie komórek. Proces ten podlega złożonemu systemowi regulacji. Głównymi elementami tego systemu są białka błonowe takie jak: białko receptorowe Fas (APO-1, CD95) i jego ligand o nazwie Fas Ligand (CD178), które po połączeniu się inicjują zjawisko apoptozy poprzez aktywację wewnątrzkomórkowej kaskady enzymów proteolitycznych zwanych kaspazami [16]. Przeciwnie działanie, czyli hamowanie apoptozy, wykazuje białko błonowe Bcl-2, które znajduje się wewnątrz komórki. Dotychczasowe badania dotyczące apoptozy limfocytów u dorosłych chorych na PChN wykazały, że jest ona nasilona zarówno u pacjentów leczonych zachowawczo jak i dializowanych obiema metodami (hemodializą i dializą otrzewnową) [14]. Stwierdzono ponadto, że u chorych hemodializowanych wpływ na zjawisko apoptozy ma rodzaj użytej błony dializacyjnej. *Matsumoto* i *Galli* wykazali, że najbardziej nasilona apoptoza występuje przy użyciu dializatorów z błoną kuprofanową i hemofanową, a więc przy zastosowaniu błon o najmniejszej biogodności, zaś przy użyciu błon polisulfonowych czy AN69, odsetek komórek apoptotycznych maleje [3,7,12,14].

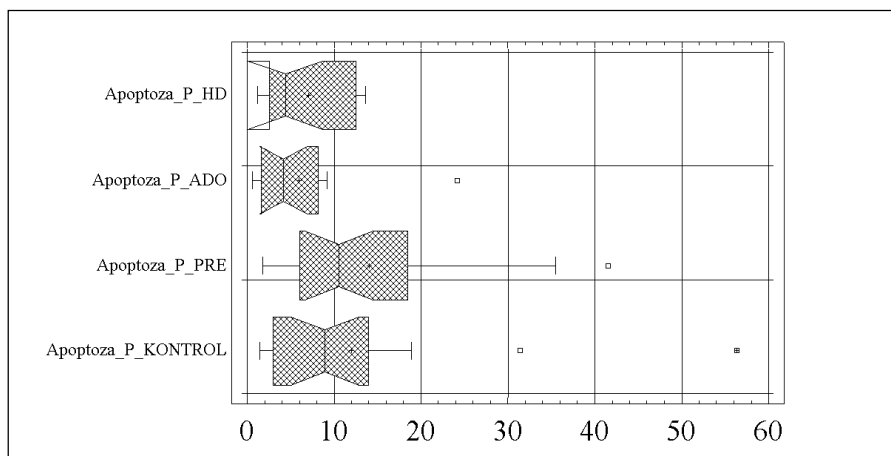
Brak doniesień dotyczących zjawiska apoptozy u dzieci z PChN skłonił nas do podjęcia badań, których celem było określenie stopnia apoptozy wczesnej i późnej limfocytów krwi obwodowej oraz ocena aktywności białek błonowych biorących bezpośredni udział w tym zjawisku u dzieci i młodych dorosłych chorych na PChN leczonych zachowawczo i nerkozastępczo powtarzanymi hemodializami (HD) i dializą otrzewnową (DO).

Materiał i metody

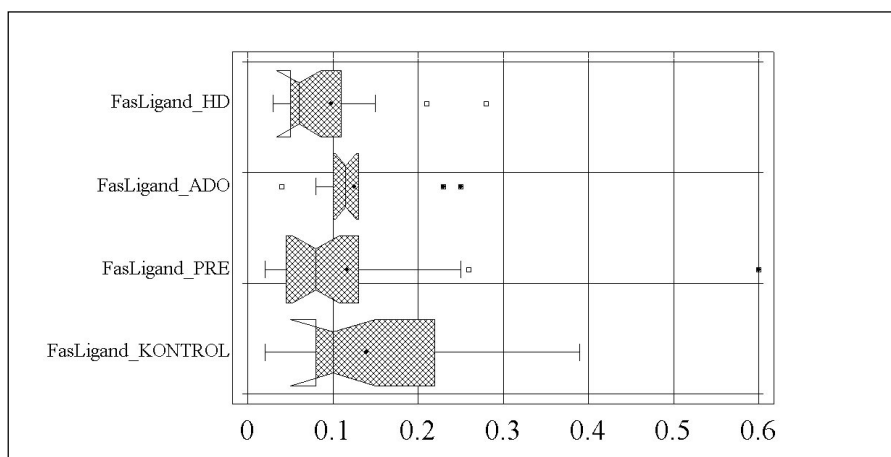
Badaniami objęto 51 pacjentów z PChN w wieku od 22 miesięcy do 25 lat (śr. wieku -10,5 lat), w tym 36 chłopców i 14 dziewczynek. Pacjentów podzielono na 4 grupy. Do grupy I – (PRE) zaliczono 24 chorych leczonych zachowawczo (11 chłopców, 13 dziewczynek, śr. wiek - 13 lat), średnia wartość klirensu kreatyniny wynosiła 35ml/min/1,73 m². Grupę II – (HD) stanowiło 13 pacjentów (7 chłopców, 6 dziewczynek, śr. wiek - 18,3 lat) w schyłkowej fazie PChN leczonych powtarzanymi hemodializami. Zabiegi wykonywano 3 x w tygodniu po 3-4,5 godziny z użyciem dializatorów polisulfonowych. W grupie III – (DO) znalazło się 14 dzieci (6 chłopców, 8 dziewczynek, śr. wiek - 10,3 lat) leczonych dializą otrzewnową z zastosowaniem ze-



Rycina 1
Porównanie odsetka limfocytów apoptotycznych (faza wczesna) pomiędzy badanymi grupami.
Comparison of the apoptotic lymphocytes percentage (the early phase) between examined groups.



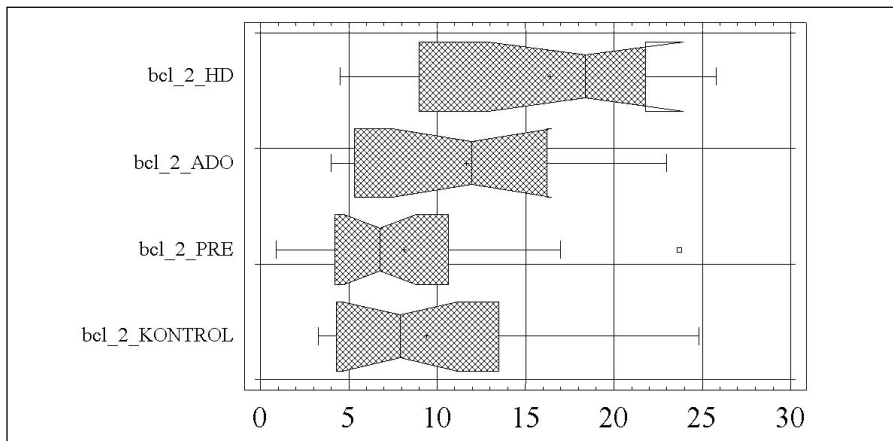
Rycina 2
Porównanie odsetka limfocytów apoptotycznych (faza późna) pomiędzy badanymi grupami.
Comparison of the apoptotic lymphocytes percentage (the late phase) between examined groups.



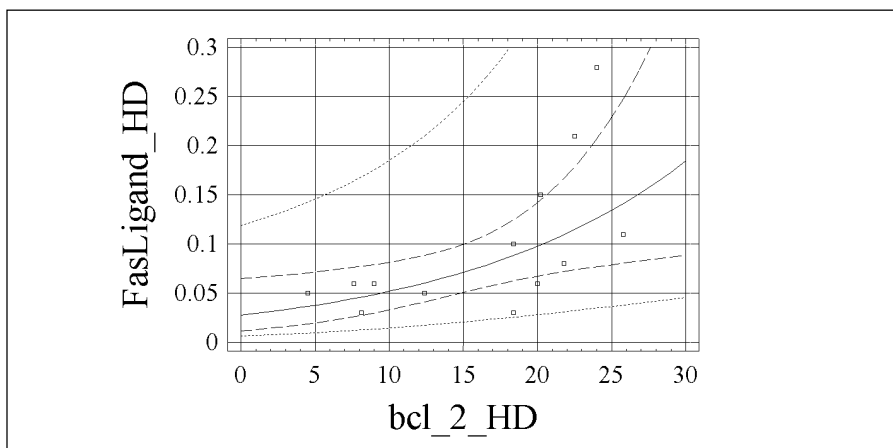
Rycina 3
Porównanie aktywności białka Fas Ligand pomiędzy badanymi grupami.
Comparison of the Fas Ligand activity between examined groups.

stawów do cyklera typu HomeChoice firmy Baxter. U pacjentów tych stosowano płyny o różnym stężeniu glukozy w zależności od wskazań klinicznych. U 4 dzieci stosowano płyn zawierający polimer glukozy- Extraneal do jednej długiej wymiany. Grupę kontrolną-IV, stanowiło 19 dzieci zdrowych (8 chłopców, 11 dziewczynek, śr. wiek - 12,5 lat). W badanej populacji u 28 pacjentów przyczyną PChN była wada układu moczowego, u 15 kłębuszkowe zapalenie nerek, u 5 przewlekłe odmiedniczkowe zapalenie nerek, 2 dzieci przebyło zespół hemolityczno-mocznicy, u 1 rozpoznano wrodzoną tubulopatię. W momencie wykonywania oznaczeń u żadnego z pacjentów nie stwierdzono objawów choroby infekcyjnej. Od każdego pacjenta powyżej 15 roku życia oraz od opiekunów uzyskano pisemną zgodę na wykonywanie badań oraz zgodę Komisji Bioetycznej AM we Wrocławiu.

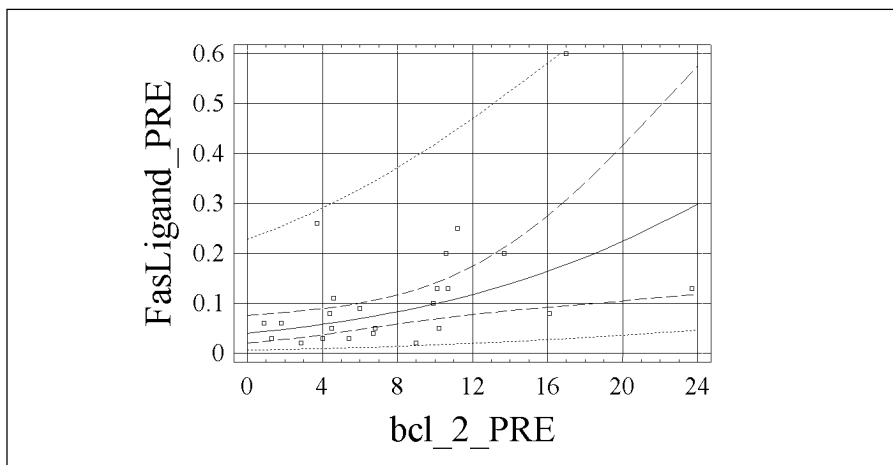
Krew pobierano rano na czczo przy okazji rutynowych badań.



Rycina 4
Porównanie aktywności białka Bcl-2 pomiędzy badanymi grupami ($p=0,002$).
Comparison of the Bcl-2 activity between examined groups ($p=0,002$).



Rycina 5
Korelacje pomiędzy Fas Ligand i Bcl-2 u pacjentów HD ($p=0,01$).
Relationship between Fas Ligand and Bcl-2 activity in HD patients ($p=0,01$).



Rycina 6
Korelacje pomiędzy Fas Ligand i Bcl-2 u pacjentów leczonych zachowawczo (PRE) ($p=0,008$).
Relationship between Fas Ligand and Bcl-2 activity in patients treated conservatively (PRE) ($p=0,008$).

U wszystkich badanych oznaczano m.in. surowicze stężenie mocznika i kreatyniny, stosując standardowe metody laboratoryjne. Apoptozę limfocytów krwi obwodowej, fazę wczesną i późną, badano przy użyciu Annexin V-FITC, aktywność białka Fas Ligand stosując przeciwciała monoklonalne anti-human Fas Ligand (CD178)-Phycoerythrin oraz białka Bcl-2 stosując Monoclonal Mouse Anti-Human BCL2 Oncoprotein.

Przygotowanie komórek jednojądrzastych - limfocytów

Limfocyty izolowane były z pełnej, heparynizowanej krwi przez odwirowanie w gradiencie Ficoll/Hypaque (Lymphoflot-Biotest). Osocze usuwano, komórki pod postacią „kożuszka” przemywano dwukrotnie roztworem PBS (phosphate-buffered saline) i zawieszano w buforze wiążącym [10mM hydroxyethylpiperazine ethanesulfonic amid (HE-

PES)/NaOH, pH 7,4; 140 mMNaCl; 2,5 mM $CaCl_2$] w stężeniu 1×10^6 komórek.

Badanie apoptozy wczesnej i późnej Annexyna-V FITC

Do wyizolowanych limfocytów w ilości 10^5 - 10^6 komórek (odsączonych) dodawano 10 μ l buforu wiążącego, 1 μ l Annexin V-FITC, 10 μ l jodku propidyny (PI) i 79 μ l wody destylowanej. Inkubowano przez 15 min. w temp. pokojowej. Zatrzymanie reakcji następowało po dodaniu 450 μ l zimnego buforu wiążącego. Następnie odczytywano wyniki na cytometrze przepływowym EPICS XL firmy Coulter w ciągu godziny. Wynik podawano jako odsetek komórek dodatnio barwiących się z Annexyną V-FITC (nie PI) i komórek barwiących się PI (nie Annexyną V-FITC). Dodatnia reakcja z Annexyną, która ma duże powinowactwo do fosfatydylseryny (PS), wskazywała na obecność komórek we wczesnej fazie apoptozy. Przemieszczenie PS z podstawnej do powierzchniowej części błony cytoplazmatycznej komórki jest wstępnym etapem rozpoczynającej się apoptozy. Dodatnia reakcja z jodem propidyny wskazywała na komórki w późnej fazie apoptozy. Komórki barwiące się Annexyną znajdowały się w prawym, dolnym polu wykresu, a komórki barwiące się PI występowały w jego prawym górnym polu.

Oznaczenie Fas Ligand

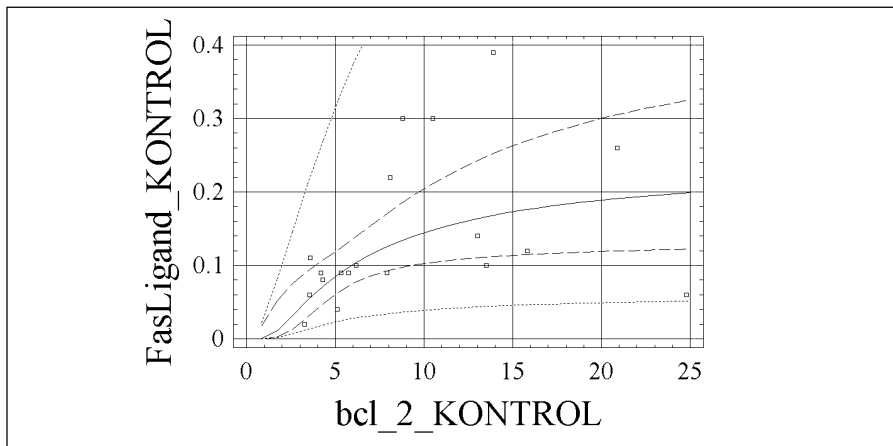
Krew pełną pobraną na EDTA płukano 3 razy PBS+0,5%BSA. Po wyizolowaniu limfocytów metoda podaną powyżej, do ich zawiesiny w ilości 5-7 $\times 10^3$ / μ l dodawano 10 μ l odczynnika CD45 FITC (f-my Beton Dickinson) oraz antyFas Ligand (f-my R&D System) 10 μ l. Całość inkubowano przez 45 min. w lodówce w temp. 2-8 stopni C, następnie dodawano odczynnik Opti LyseC (f-my Beckman Coulter) w ilości 250 μ l celem uzyskania lizy erytrocytów. Inkubacja trwała 12 min. W dalszej kolejności dodawano roztwór PBS i ponownie inkubowano przez 12 min. Po odwirowaniu (1000 obr/5min) zlewano nadsącz, zawieszano go w 250 μ l PBS. Liczono odsetek komórek, w których stwierdzano ekspresję białka błonowego Fas Ligand (CD 178) w oparciu o reakcję białka ze swoistym p-ciałem znakowanym phycoerytryną. Obecność świecenia i jego natężenie oceniano przy użyciu cytometru przepływowego EPICS XL f-my Coulter.

Oznaczenie Bcl-2

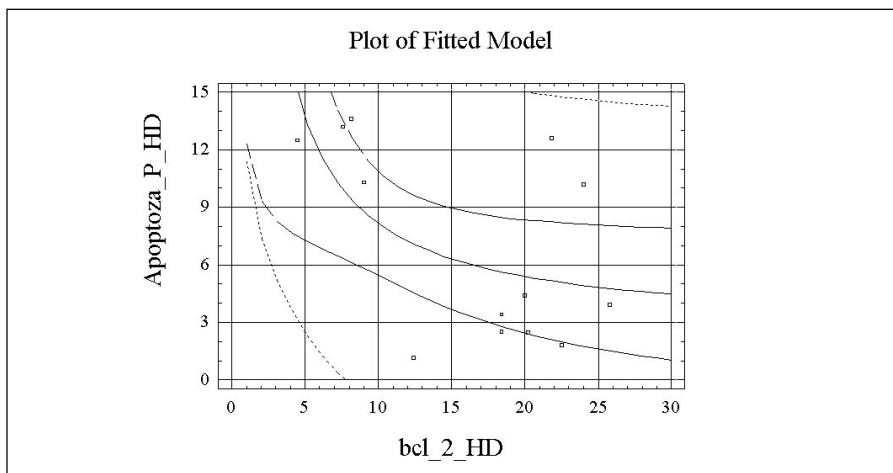
Do izolowanych (jak wyżej) limfocytów -50 μ l ($5-7 \times 10^3$ / μ l) dodawano 10 μ l HLA-ABC PE (f-my PharMingen A Beton Dickinson Comp) uzyskując próbkę badaną. Kontrolę stanowiło 50 μ l limfocytów z dodatkiem 10 μ l IgG1 PE. Próbkę inkubowano przez 30 min. Następnie dodawano po 100 μ l odczynnika A (Dako Intrastain kit) celem utrwalenia, inkubowano przez 15 min. W dalszej kolejności płukano i dodawano 500 μ l PBS, wirowano (1000 obr/min) przez 5 min. Zlewano nadsącz. Permeabilizowano dodając po 100 μ l odczynnika B (f-my Dako Intrastain kit). Dodawano 5 μ l odczynnika Bcl-2-FITC (f-my Dako Cytomation) do próbki badanej i 10 μ l IgG1 FITC do kontroli. Inkubowano przez 30 min., płukano i odczytywano w cytometrze w ciągu 15 min. Oceniano odsetek komórek barwiących się pod wpływem swoistego p-ciała anty-Bcl-2.

Analiza statystyczna

We wszystkich badanych grupach oznaczano wartości średnie, odchylenie standardowe i



Rycina 7
Korelacje pomiędzy Fas Ligand i Bcl-2 w grupie kontrolnej ($p=0,005$).
Positive correlation between Fas Ligand and Bcl-2 activity in control group ($p=0,005$).



Rycina 8
Korelacje pomiędzy odsetkiem apoptotycznych limfocytów (faza późna) i Bcl-2 u chorych HD ($p=0,03$).
Correlation between apoptotic lymphocytes percentage (late phase) and Bcl-2 in HD patients ($p=0,03$).

medianę. Porównywano te wartości między badanymi grupami. Poszukiwano istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami średnimi badanych grup z wykorzystaniem metody LSD (Least Significant Differences) przy założonym poziomie istotności 95% ($p=0,05$). Grupy badano parami. Stosując test Kruskal-Wallis analizowano hipotezę zerową, wskazującą że mediany w każdej z badanych cech są identyczne. Oceniono korelacje liniowe pomiędzy badanymi parametrami, a po ich stwierdzeniu dokonano analizy regresji z użyciem testu lack-of-fit ANOVA.

Wyniki

Wykazano, że największy odsetek limfocytów w fazie wczesnej apoptozy występował u pacjentów w okresie predializacyjnym w porównaniu z grupą chorych leczonych HD i DO oraz grupą kontrolną. Jednak różnice nie były istotne statystycznie (rycina 1). W fazie późnej apoptozy, największy odsetek limfocytów występował również u chorych w okresie predializacyjnym. Wykazano różnicę pomiędzy pacjentami z tej grupy i leczonymi dializą otrzewnową na granicy istotności statystycznej ($p=0,06$) (rycina 2).

Aktywność białka błonowego Fas Ligand we wszystkich badanych grupach była podobna. Nie wykazano między nimi różnic istotnych statystycznie (rycina 3).

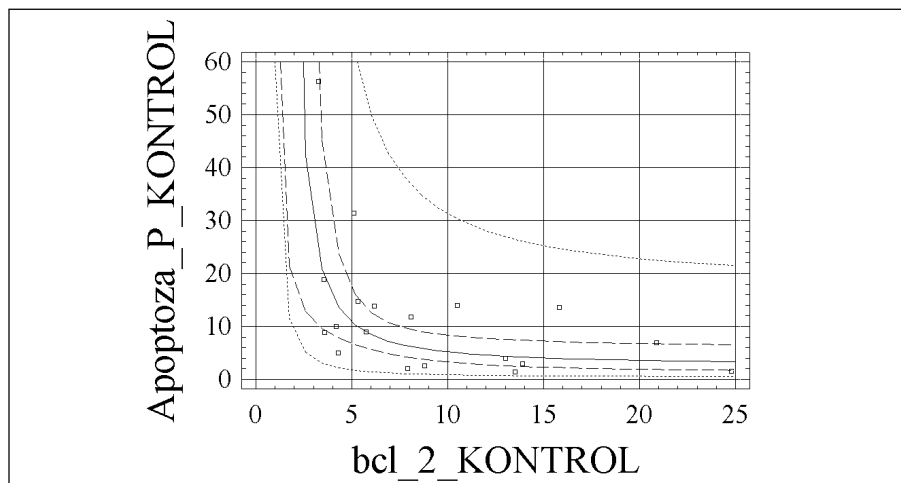
Aktywność białka Bcl-2 w badanych lim-

focytach była najwyższa w grupie pacjentów leczonych HD i DO. Wykazano znamienne statystycznie różnicę pomiędzy grupą chorych HD a grupą pacjentów leczonych zachowawczo i grupą kontrolną ($p=0,002$). Aktywność białka Bcl-2 u pacjentów leczonych DO nie różniła się istotnie od chorych w pozostałych grupach. (rycina 4). Analizując zależność badanych parametrów stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy Fas Ligand i Bcl-2 u pacjentów leczonych HD ($p=0,01$) (rycina 5), u chorych w okresie predializacyjnym ($p=0,008$) (rycina 6) i w grupie kontrolnej ($p=0,005$) (rycina 7). Ujemną korelację wykazano pomiędzy odsetkiem komórek apoptotycznych w fazie późnej a białkiem Bcl-2 w grupie leczonych HD ($p=0,03$) (rycina 8) oraz w grupie kontrolnej ($p=0,005$) (rycina 9) (tabela I).

Dyskusja

W PChN dochodzi do zaburzeń w układzie odpornościowym, co wyraża się między innymi zmniejszoną ilością komórek jednojądrzastych i wielojądrzastych krwi obwodowej. Jedną z przyczyn tego zjawiska może być nasilony proces apoptozy [3,13,11,20]. Wyniki badań własnych wykazały, że u dzieci i młodych dorosłych z PChN, leczonych zachowawczo, odsetek limfocytów apoptotycznych w fazie wczesnej i późnej tego procesu, był najwyższy w porównaniu z grupą

dzieci zdrowych i z grupą pacjentów dializowanych, choć różnica była na granicy istotności statystycznej. Najwyższe wartości obserwowano u dzieci z najbardziej upośledzoną funkcją nerek, co jest zgodne z doniesieniami Ankersmit i wsp., którzy u chorych dorosłych z PChN wykazali ujemną korelację pomiędzy natężeniem apoptozy komórek jednojądrzastych a klirensiem kreatyniny [9]. Wielu autorów dowiodło, że mocznica per se jest odpowiedzialna za zjawisko limfo- i neutropenii [8,11,20]. Prawdopodobnie za ten stan rzeczy odpowiedzialne są toksyny mocznicowe. Jako najbardziej szkodliwe wymienia się: parathormon, p-krezol, poliamidy, produkty aminoguanidyny, angiogeninę [5,9,13]. Do innych czynników odpowiedzialnych za zjawisko apoptozy należą: niedożywienie, przeładowanie organizmu żelazem, podwyższony poziom wapnia wewnątrzkomórkowego, podwyższone stężenie utlenionych cząstek LDL-cholesterolu czy niedobór cynku [15,19]. U pacjentów hemodializowanych wielu badaczy obserwowało istotne nasilenie apoptozy limfocytów, stwierdzając znaczące powiązanie tego zjawiska z rodzajem użytej błony dializacyjnej. Przy mniej biogodnych błonach (kuprofan, hemofan) odsetek limfocytów apoptotycznych był znacząco wyższy niż w przypadku użycia błony polisulfonowej czy AN69 [3,4,7,13]. U badanych przez nas pacjentów, odsetek limfocytów apoptotycznych, zarówno w fazie wczesnej jak i późnej, nie różnił się istotnie pomiędzy poszczególnymi grupami. Najprawdopodobniej wynika to z faktu, że u wszystkich pacjentów poddanych HD, zastosowano dializatory polisulfonowe, o dużej biogodności. Odsetek limfocytów apoptotycznych u dzieci leczonych metodą dializy otrzewnowej był podobny jak w grupie HD. Odmienne obserwacje poczynili Malo i wsp. [13] oraz Ankersmit i wsp. [2], lecz w obu przypadkach, grupy chorych DO porównywano do populacji pacjentów HD przy użyciu błon mniej biogodnych niż zastosowane w badaniach własnych. Dowiedziono, że kluczową rolę w inicjowaniu apoptozy w komórce odgrywa system białek błonowych Fas/Fas Ligand. Stwierdzono, że oprócz receptora Fas i jego ligandu, związanych z błoną komórkową, występują formy rozpuszczalne tych białek. Są to odpowiednio: sFas i sFas Ligand, które łącząc się ze sobą hamują swoją proapoptotyczną aktywność [16]. W stanie zdrowia zachowana jest między nimi równowaga. W mocznicy i u pacjentów leczonych HD Perianayagam i wsp. wykazali znacząco wyższe stężenie sFas w porównaniu z grupą kontrolną. Nie stwierdzono natomiast różnic w ilości osoczkowego sFas Ligand [17]. W badanej przez nas populacji najniższą aktywność Fas Ligand wykazano u pacjentów leczonych HD, choć różnica nie była istotna statystycznie. Przemawia to za włączeniem się mechanizmów blokujących proces apoptozy. Mając na celu możliwie pełną ocenę zjawiska apoptozy w limfocytach krwi obwodowej, oznaczano aktywność białka Bcl-2, uważanego za główny inhibitor apoptozy. U dorosłych pacjentów w okresie predializacyjnym Fernandez-Fresnedo i wsp. stwierdzili obniżoną aktywność białka Bcl-2 wiążąc to zjawisko ze spadkiem liczby limfocytów B we krwi



Rycina 9

Korelacje pomiędzy odsetkiem apoptotycznych limfocytów (faza późna) i Bcl-2 w grupie kontrolnej ($p=0,005$). Correlation between apoptotic lymphocytes percentage (late phase) and Bcl-2 in control group ($p=0,005$).

Tabela I

Analiza regresji. Korelacje pomiędzy badanymi parametrami (podano korelacje istotne statystycznie $p<0,05$). Regression analysis. Correlations between study parameters (only significant correlations was shown $p<0,05$)

Correlation	Bcl-2	p	R2	r
FasLigand	HD	0.01	43.2	0.65
	ND	0.008	27.7	0.52
	Con	0.005	37.5	-0.61
Apoptosis L	HD	0.03	35.6	0.59
	Con	0.005	37.7	0.61

p- poziom istotności; r- współczynnik korelacji; R2- R kwadrat (%)

obwodowej [6]. Podobne obserwacje poczynili *Buemi* i wsp. oraz *Koller* i wsp. u przewlekle hemodializowanych chorych [4,11]. W badaniach własnych stwierdzono najniższe stężenie Bcl-2 u pacjentów leczonych zachowawczo, u których apoptoza była najbardziej nasiloną. U pacjentów HD i DO stężenie Bcl-2 było istotnie wyższe, co można by tłumaczyć mniejszym nasileniem apoptozy w tych grupach. Podobne wyniki, w odniesieniu do komórek wielojądrzastych, uzyskali *Sardenberg* i wsp. [19]. Wykazanie, w badaniach własnych, dodatniej korelacji pomiędzy Fas Ligand i Bcl-2 i ujemnej pomiędzy odsetkiem komórek apoptotycznych a Bcl-2, wskazywać może na istotne współdziałanie ze sobą tych mediatorów apoptozy.

Z przedstawionych badań wynika, że proces apoptozy komórek jednojądrzastych u pacjentów z PChN jest bardzo złożony. Dla jego pełnego zrozumienia konieczna jest ich kontynuacja.

Wnioski

1. U dzieci i młodych dorosłych z PChN występuje nasiloną apoptoza limfocytów krwi obwodowej. Proces ten jest najbardziej wyrażony u pacjentów leczonych zachowawczo, co może mieć związek z retencją toksyn mocznicowych.

2. Istotne podwyższenie aktywności białka Bcl-2, w limfocytach pacjentów przewlekle dializowanych, prawdopodobnie zapobiega nasileniu apoptozy w tej grupie chorych

Piśmiennictwo

1. **Andrikos E., Buoncristiani E., D'Intini V. et al.**: Effect of daily hemodialysis on monocytes apoptosis. *Blood Purif.* 2005, 23, 79.
2. **Ankersmit H.J., Deicher R., Moser B. et al.**: Impaired T cell proliferation, increased soluble death-inducing receptors and activation - induced T cell death in patients undergoing haemodialysis. *Clin. Exp. Immunol.* 2001, 125, 142.
3. **Bhaskaran M., Ranjan R., Shah H. et al.**: Lymphopenia in dialysis patients: a preliminary study indicating a possible role of apoptosis. *Clin. Nephrol.* 2002,

57, 221.

4. **Buemi M., Allegra A., Corica F. et al.**: Reduced blood Bcl-2 protein concentration in patients on hemo-dialysis. *Blood Purif.* 1998, 16, 312.
5. **De Smet R., Vanholder R.**: Pathophysiologic effect of uremic retention solutes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999, 10, 1815.
6. **Fernandez-Fresnedo G., Angeles Ramos M., Gonzalez-Pardo M.C. et al.**: B lymphopenia in uraemia is related to an accelerated in vitro apoptosis and dysregulation of Bcl-2. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 502.
7. **Galli F., Ghibelli L., Buoncristiani U. et al.**: Mononuclear leukocyte apoptosis in haemodialysis patients: the role of cell thiols and vitamin E. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003, 18, 1592.
8. **Galli F., Canestrari F., Buoncristiani U.**: Biological effect of oxidant stress in haemodialysis: The possible roles of vitamin E. *Blood Purif.* 1999, 17, 79.
9. **Heidenreich S., Schmidt M., Bachmann J. et al.**: Apoptosis of monocytes cultured from long-term hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1996, 49, 792.
10. **Jaber B.L., Cendoroglo M., Balakrishnan V.S. et al.**: Apoptosis of leukocytes: Basic concepts and implications in uremia. *Kidney Int.* 2001, 59(Suppl. 78), 197.
11. **Koller H., Hochegger K., Zlabinger G.J. et al.**: Apoptosis of human polymorphonuclear neutrophils accelerated by dialysis membranes via the activation of the complement system. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2004, 19,12, 3104.
12. **Maccarone M., Manca-di-Villahermosa S., Meloni C. et al.**: Arachidonate Cascade, Apoptosis and Vitamin E in Peripheral Blood Mononuclear Cells From Hemodialysis Patients. *Am. J. Kidney Dis.* 2002, 40, 600.
13. **Martin-Malo A., Carracedo J., Ramirez R. et al.**: Effect of uremia and dialysis modality on mononuclear cell apoptosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000, 11, 936.
14. **Matsumoto Y., Shinzato T., Amano I. et al.**: Relationship between susceptibility to apoptosis and Fas expression in peripheral blood T cells from uremic patients: A possible mechanism for lymphopenia in chronic renal failure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, 215, 98.
15. **Meier P., Golshayan D., Blanc E. et al.**: Oxidized LDL modulates apoptosis of regulatory T cells in patients with ESRD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009, 20, 1368.
16. **O'Reilly L.A., Tai L., Lee L. et al.**: Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature* 2009, 461, 659.
17. **Perianayagam M.C., Murray S.L., Balakrishnan V.S. et al.**: Serum soluble Fas(CD95) and Fas Ligand profiles in chronic kidney failure. *J. Lab. Clin. Med.* 2000, 136, 320.
18. **Plum J., Reza Lordnejad R., Grabensee B.**: Effect of alternative peritoneal dialysis solutions on cell viability, apoptosis/necrosis and cytokine expression in human monocytes. *Kidney Int.* 1998, 54, 224.
19. **Sardenberg K., Suassuna P., Cruz Andreoli M.C. et al.**: Effect of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, 21, 160.
20. **Wu C.C., Liao T.N., Lu K.C. et al.**: Apoptotic markers on lymphocytes and monocytes are unchanged during single hemodialysis sessions using either regenerated cellulose or polysulfone membranes. *Clin. Nephrol.* 2005, 64, 198.