

JOANNA TRÓMIŃSKA-STARCZYŃSKA

**WPLYW INTERFERONU-GAMMA (IFN- γ)
NA UWALNIANIE ROZPUSZCZALNEJ FORMY BIAŁKA
ADHEZYJNEGO ICAM-1 (sICAM-1) PRZEZ KOMÓRKI
LUDZKIEGO MEZOTELIUM OTRZEWNOWEGO IN VITRO**

ROZPRAWA DOKTORSKA

**z Katedry i Zakładu Patofizjologii
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
kierownik: Prof. dr hab. Andrzej Bręborowicz**

promotor: Prof. dr hab. Janusz Witowski

Poznań 2010

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów.....	3
Streszczenie.....	6
Wstęp.....	7
Cel pracy.....	18
Metodyka.....	19
Wyniki.....	27
Dyskusja.....	55
Wnioski.....	62
Piśmiennictwo.....	63

WYKAZ SKRÓTÓW (wg [1;2])

26S – proteasom 26S

AP-1 (activator protein-1) – białko aktywujące-1

AQP (aquaporin) – akwaporyna

bp (base pairs) – pary zasad

BSA (bovine serum albumin) – albumina surowicy bydlęcej

CC – chemokina klasy CC

CD (cluster of differentiation) – antygenowy kompleks różnicowania

CR-4 (CD11c/CD18) – integryna, ligand dla ICAM-1

CTGF (connective tissue growth factor) – czynnik wzrostu tkanki łącznej

CXC – chemokina klasy CXC

cDNA (complementary DNA) – DNA komplementarny do mRNA

DMSO (dimethylsulfoxide) – dimetylosulfotlenek

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – test immunoenzymatyczny

ERK (extracellular signal-regulated kinase) – kinaza białkowa rodziny MAPK
(aktywowana przez czynniki wzrostowe)

FACS (fluorescence activated cell sorting) – sortowanie komórek aktywowane fluorescencją

FCS (fetal calf serum) – płodowa surowica cielęca

FGF (fibroblast growth factor) – czynnik wzrostu fibroblastów

GAF (γ -interferon activated factor) – czynnik transkrypcyjny aktywowany przez IFN- γ

GAS (γ -interferon activated sequences) – sekwencje aktywowane przez IFN- γ

GLUT (glucose transporter) – system transportu glukozy

GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

GRO (growth-related oncogene) – onkogen związany ze wzrostem

HPMC (human peritoneal mesothelial cells) – komórki ludzkiego mezotelium otrzewnowego

I κ B – inhibitor czynnika transkrypcyjnego NF- κ B

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1

IFN- γ (interferon-gamma) – interferon- γ

IL (interleukin) – interleukina

IP-10 (interferon-inducible protein) – białko indukowane przez interferon

IRF (IFN-gene regulatory factor) – czynnik regulujący gen dla interferonu

ISGF (interferon-stimulated gene factor) – czynnik genów stymulowanych przez interferon

ISRE (interferon-stimulated response element) – region odpowiedzi stymulowanej przez interferon

JAK (Janus kinase) – kinaza Janusa

JNK (Jun N-terminal kinase) – kinaza białkowa rodziny MAPK (fosforylująca N-koniec białka Jun; inaczej SAPK)

kinaza Src (Sarcoma kinase, Src kinase) – niereceptorowa kinaza tyrozynowa Src

LFA (lymphocyte function associated, CD11a/CD18) – receptor związany z czynnością limfocytów, ligand dla ICAM-1

Mac-1 (CD11b/CD18) – integryna, ligand dla ICAM-1

MAP (mitogen activated protein) – białko aktywowane przez mitogeny

MCP-1 (macrophage chemoattractant protein-1) – białko chemotaktyczne dla makrofagów

M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów

MMP (matrix metalloproteinase) – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej

mRNA (messenger RNA) – informacyjny RNA

MTT (thiazolylblue formazan) – formazan błękitu tiazolowego; bromek [3(4,5-dimetylo-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu]

NF-κB (nuclear factor κB) – czynnik transkrypcyjny κB

NK (natural killer) – naturalna komórka cytotoksyczna

NKT (natural killer T cells) – limfocyty T mające markery typowe dla komórek NK

OsM (oncostatin M) – onkostatyna M

PA (plasminogen activator) – aktywator plazminogenu

PAI (plasminogen activator inhibitor) – inhibitor aktywatora plazminogenu

PBS (phosphate buffered saline) – izotoniczny roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami (pH 7,0)

PCR (polymerase chain reaction) – reakcja łańcuchowa polimerazy

PDGF (platelet-derived growth factor) – płytkopochodny czynnik wzrostowy

PKR (protein kinase RNA-dependent) – kinaza białkowa RNA-zależna

PMN (polymorphonuclear leukocyte) – granulocyty obojętnochłonne segmentowe

qPCR (quantitative PCR, real-time PCR) – reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym

RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) – czynnik regulowany przez aktywację, podlegający ekspresji i wydzielany przez prawidłowe limfocyty T

RT (reverse transcription) – odwrotna transkrypcja

SGLT (sodium-driven glucose transporter) – system skojarzonego transportu sodu i glukozy

sICAM-1 (soluble ICAM-1) – rozpuszczalna forma ICAM-1

SDS (sodium dodecylsulphate) – dodecylosiarczan sodu

SMIT (sodium myo-inositol transporter) – system transportowy dla sodu i mio-inozytolu

SOCS (suppressor of cytokine signaling) – supresor sygnałów przekazywanych przez cytokiny

STAT (signal transducer and activator of transcription) – czynnik transkrypcyjny STAT

TACE (TNF- α -converting enzyme; ADAM17) – enzym konwertujący TNF- α

TAPI – inhibitor enzymu konwertującego TNF- α

TGF- β (transforming growth factor-beta) – transformujący czynnik wzrostowy- β

TIMP (tissue inhibitor metalloproteinase) – tkankowy inhibitor metaloproteinazy

TNF- α (tumor necrosis factor) – czynnik martwicy nowotworów-alfa

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń

VEGF (vascular endothelial growth factor) – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego

STRESZCZENIE

Migracja i naciek krwinek białych są charakterystycznymi cechami reakcji zapalnej. Komórki mezotelialne regulują dootrzewnowy napływ leukocytów podczas zapalenia otrzewnej, przede wszystkim poprzez skoordynowane uwalnianie licznych cytokin i ekspresję cząsteczek adhezyjnych. Proces ten może być modulowany m.in. przez interferon- γ (IFN- γ). Stwierdzono, że IFN- γ stymuluje ekspresję cząsteczki adhezji międzykomórkowej-1 (ICAM-1) przez mezotelium, co ma istotne znaczenie dla adhezji i transmezotelialnej migracji granulocytów obojętnochłonnych. Wiadomo również, że ICAM-1 istnieje nie tylko w postaci związanej z błoną komórkową, ale także jako wolna forma rozpuszczalna – sICAM-1. Jej obecność wykryto w jamie otrzewnej podczas reakcji zapalnej. Nie jest natomiast jasne jej pochodzenie, mechanizm uwalniania i rola w otrzewnej. Ponieważ IFN- γ odgrywa kluczową rolę w regulacji napływu leukocytów do jamy otrzewnej i może modulować komórkową ekspresję ICAM-1, celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie wpływu IFN- γ na uwalnianie sICAM-1 przez mezotelium.

Badania przeprowadzono na komórkach ludzkiego mezotelium otrzewnowego (HPMC). Uwalnianie sICAM-1 zmierzono za pomocą testu immunoenzymatycznego. Komórkową ekspresję ICAM-1 oceniono za pomocą barwienia immunocytochemicznego, testu immunoenzymatycznego in situ i cytometrii przepływowej. Ekspresję mRNA dla ICAM-1 oceniono za pomocą techniki RT-PCR.

Stwierdzono, że w warunkach in vitro HPMC konstytutywnie uwalniają sICAM-1. Ekspozycja komórek na działanie IFN- γ zwiększa – w sposób zależny od dawki i czasu inkubacji – uwalnianie sICAM-1, a także ekspresję powierzchniową ICAM-1 i ekspresję mRNA dla ICAM-1. Wykazano, że TNF- α zwiększa w sposób synergiczny uwalnianie sICAM-1 przez komórki mezotelium otrzewnowego stymulowane IFN- γ , nie zmienia natomiast istotnie indukowanej przez IFN- γ ekspresji powierzchniowej ICAM-1 i ekspresji mRNA dla ICAM-1. Stwierdzono również, że uwalnianie sICAM-1 pod wpływem IFN- γ jest regulowane na poziomie translacji i poprzez szlak sygnałowy, w którym istotną rolę odgrywa proteasomowa degradacja białek i/lub czynnik transkrypcyjny NF- κ B. Nie wykazano natomiast, aby glukoza – zastosowana w stężeniach, jak w płynach do dializy otrzewnej – znacząco zmieniała uwalnianie sICAM-1, zarówno konstytucyjne, jak i stymulowane przez IFN- γ .

Wyniki tych badań wskazują, że komórki mezotelialne mogą być ważnym źródłem sICAM-1 w otrzewnej, a uwalnianie sICAM-1 podlega złożonej regulacji pod wpływem kluczowych cytokin odczynu zapalnego.

WSTĘP

Komórki ludzkiego mezotelium otrzewnowego

Błona otrzewnowa wyściela od wewnątrz ściany jamy brzusznej i jamy miednicy (otrzewna ścienna) oraz otacza znajdujące się w nich narządy (otrzewna trzewna). Jama otrzewnej zawarta jest między otrzewną ścienną i trzewną. Błona otrzewnowa pokryta jest przez komórki międzybłonka, czyli mezotelium. Mezotelium przypomina nabłonek surowiczy, jest jednak pochodzenia mezodermalnego. Komórki mezotelialne leżą na błonie podstawnej, pod którą znajduje się tkanka łączna z obfitą siecią naczyń włosowatych. Dokładniejsze poznanie funkcji komórek mezotelialnych w ostatnich latach zmieniło spojrzenie na ich znaczenie w jamie otrzewnej. Pierwotnie mezotelium traktowano jako bierną wyściółkę błony otrzewnowej, natomiast obecnie uważane jest ono za kluczową strukturę regulującą homeostazę w jamie otrzewnej [3].

Komórki mezotelialne pełnią przede wszystkim funkcję ochronną, stanowiąc barierę przed drobnoustrojami i zabezpieczając narządy wewnętrzne przed uszkodzeniami mechanicznymi [4;5]. Mezotelium znacząco zmniejsza tarcie między narządami zlokalizowanymi w jamie otrzewnej, dzięki produkcji bogatego w fosfolipidy surfaktantu, który obniża napięcie powierzchniowe [5-7]. Mezotelium wykazuje także wysoką aktywność fibrynolityczną [8], co zapobiega odkładaniu się złożeń włóknika na powierzchni otrzewnej i powstawaniu zrostów wewnątrzotrzewnowych [9]. Aktywność fibrynolityczna mezotelium jest regulowana poprzez produkcję aktywatorów plazminogenu (t-PA i u-PA) oraz ich inhibitorów (PAI-1 i PAI-2) [8].

Błona otrzewnowa stanowi selektywną barierę dla transportu płynów i cząsteczek między naczyniami włosowatymi, a jamą otrzewnej [10]. Błona otrzewnowa charakteryzuje się budową heteroporową, która umożliwia transport cząsteczek różnej wielkości [11]. Mezotelium nie stanowi prawdopodobnie istotnej bariery dla transportu przezotrzewnowego, ale może go znacząco modyfikować poprzez wpływ na strukturę otrzewnej [12]. Obecność w komórkach mezotelialnych złożonych systemów transportowych – np. Na^+/K^+ -ATPazy, transporterów dla glukozy (GLUT1, GLUT3, SGLT1), dla Na^+ i mio-inozytolu (SMIT), a także systemu transportowego A dla aminokwasów – umożliwia komórkom adaptację do zmian osmolarności w czasie dializy otrzewnowej [13-17]. Natomiast ekspresja akwaporyn (AQP) w komórkach mezotelium jest niepewna i zachodzi być może pod wpływem hiperosmolarności [18]. Wydaje się, że w błonie otrzewnowej akwaporyny występują przede wszystkim (lub wyłącznie) w

komórkach śródbłonna naczyń otrzewnowych [19;20], biorąc udział w przezotrzewnowym transporcie wody i powstawaniu zjawiska tzw. „odsiewania sodu” podczas dializy otrzewnowej.

Komórki mezotelialne produkują także eikozanoidy i liczne cytokiny (Tabela I), które modulują homeostazę w jamie otrzewnej. Mezotelium bierze również udział w prezentowaniu niektórych antygenów bakteryjnych [21] oraz aktywacji limfocytów T. Kluczową rolę w tych procesach odgrywa mezotelialna ekspresja cząsteczki adhezji międzykomórkowej-1 (ICAM-1) i wydzielanie IL-15, szczególnie pod wpływem IFN- γ [22].

Tabela I.
Niektóre cytokiny produkowane przez komórki mezotelium otrzewnowego

Cytokina	Piśmiennictwo
IL-1 α	Douvdevani 1994 [23]
IL-1 β	Lanfrancone 1992 [24] Douvdevani 1994 [23]
IL-6	Lanfrancone 1992 [24] Topley 1993 [25]
IL-8	Topley 1993 [25]
IL-15	Hausmann 2000 [22]
GRO- α	Visser 1998 [26]
MCP-1	Visser 1998 [26]
RANTES	Visser 1998 [26]
IP-10	Visser 1998 [26]
G-CSF, M-CSF, GM-CSF	Lanfrancone 1992 [24]
bFGF	Cronauer 1999 [27]
PDGF	Gerwin 1987 [28]
TGF- β	Offner 1996 [29]
VEGF	Inagi 1999 [30]
CTGF/CCN2	Liu 2007 [31]

Interferon-gamma (IFN- γ)

Interferony (IFN) stanowią rodzinę cytokin produkowanych przez komórki w odpowiedzi na patogeny. Zostały odkryte przez Isaacs i Lindenmanna, którzy badali przebieg reakcji wirusowej [32]. Komórki ludzkie wytwarzają przynajmniej siedem rodzajów interferonów: IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- γ [33]. Za główne źródła interferonów uważane są leukocyty (IFN- α), fibroblasty (IFN- β) i limfocyty T (IFN- γ), ale mogą one być także produkowane przez makrofagi, komórki dendrytyczne i keratynocyty

[34;35]. IFN- γ kodowany jest przez jeden gen zlokalizowany na chromosomie 12 i zawierający 3 introny. Białko IFN- γ zbudowane jest ze 146 aminokwasów i posiada dodatkowe grupy węglowodanowe. Głównym źródłem IFN- γ są limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ [36], komórki NK [37] i limfocyty NKT. Produkcja IFN- γ indukowana jest przez liczne cytokiny (m.in. IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21) [38-41], a także przez sam IFN- γ [39]. Receptor dla IFN- γ składa się z 2 podjednostek: IFN- γ R1 i IFN- γ R2 [42-44]. Połączenie się IFN- γ z receptorem wywołuje w pierwszej kolejności oligomeryzację receptora, następnie odpowiednie ustawienie się kinaz tyrozynowych Janus JAK1 i JAK2 i ich poprzeczną fosforylację (schemat 1) [45]. Kolejnym etapem jest rekrutacja czynnika transkrypcyjnego STAT1 α , jego fosforylacja i dimeryzacja do czynnika określanego jako GAF (γ -interferon activated factor) [45]. GAF ulega translokacji do jądra komórkowego i łączy się z sekwencjami GAS (γ -interferon activated sequences) w obrębie promotorów genowych. IFN- γ może stymulować transkrypcję również poprzez sekwencję promotorową ISRE (interferon-stimulated response element) [46]. IFN- γ aktywuje także drugorzędowe czynniki transkrypcyjne z rodziny IRF (interferon regulatory factors) oraz wykorzystuje takie czynniki transkrypcyjne, jak NF- κ B (nuclear factor κ B) i ISGF-3 (interferon-stimulated gene factor-3). Udział wielu czynników transkrypcyjnych w indukcji ekspresji genów przez IFN- γ wyjaśnia częściowo synergiczny efekt działania IFN- γ z innymi cytokinami (np. TNF- α i IL-1 β) [47;48]. Wybrane efekty działania IFN- γ pokazano w tabeli II.

Tabela II.
Wybrane efekty działania IFN- γ

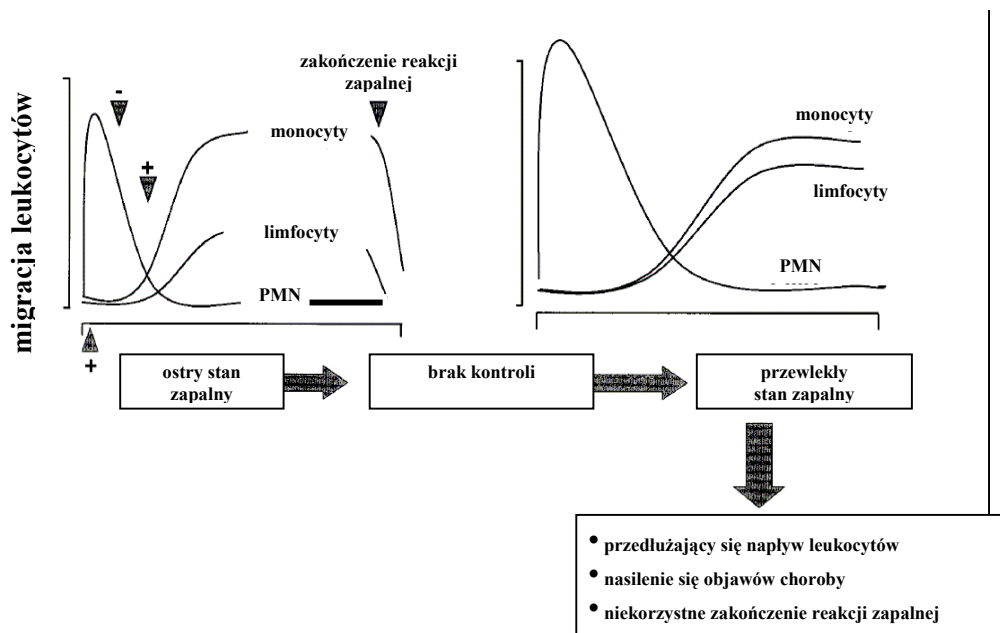
Efekt działania IFN-γ	Piśmiennictwo
Pobudzenie ekspresji cząsteczek MHC klasy I i II (HPMC, makrofagi)	[21;49;50]
Pobudzenie ekspresji cząsteczki CD80 na komórkach prezentujących antygeny	[49]
Pobudzenie ekspresji indukowalnej syntazy NO (iNOS) (makrofagi, fibroblasty, komórki nowotworowe)	[49;51;52]
Modulowanie ekspresji genu dla ICAM-1 (np. HPMC)	[22]
Aktywowanie limfocytów B do produkcji przeciwciał	[53;54]
Indukowanie syntezy IL-12 (monocyty i makrofagi)	[49]
Indukowanie różnicowania limfocytów Th w kierunku limfocytów Th1	[55]
Modulowanie syntezy i uwalniania chemokin klasy CXC (m.in. HPMC, fibroblasty)	[56-59]
Regulacja ekspresji receptorów dla chemokin klasy CXC (PMN)	[57;60]

fibroblastach obserwowano niekiedy efekt przeciwny [58]. Różnice te wynikają prawdopodobnie ze specyfiki komórek, wielkości zastosowanej dawki IFN- γ i jego połączenia z innymi cytokinami [26;58;59;67]. Znamienny jest natomiast pobudzający wpływ IFN- γ na uwalnianie chemokin ELR⁻ klasy CXC [56;57;64;66;68].

IFN- γ w reakcji zapalnej w jamie otrzewnej

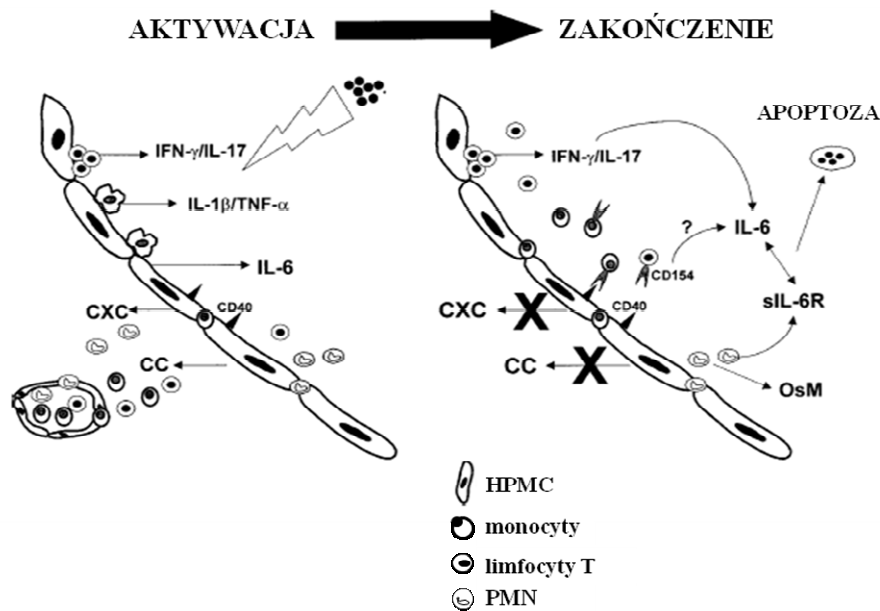
W trakcie ostrego stanu zapalnego dochodzi do napływu leukocytów do ogniska zapalnego, a następnie do ich usunięcia. Odpowiednia kontrola tego procesu zapewnia bezpieczne dla organizmu rozwiązanie reakcji zapalnej. Wiadomo, że w trakcie reakcji zapalnej zmienia się profil leukocytów napływających do ogniska zapalnego. We wczesnej fazie dominują PMN, których główną rolą jest fagocytoza czynników chorobotwórczych. Po wypełnieniu swojej roli PMN ulegają apoptozie, co zapobiega przedłużającemu się działaniu enzymów proteolitycznych i wolnych rodników uwalnianych przez PMN. Apoptotyczne PMN zostają sfagocytowane przez makrofagi, różnicujące się z monocytów, napływających do ogniska zapalnego w dalszej kolejności (schemat 2 i 3). Odpowiednia kinetyka napływu subpopulacji leukocytów decyduje o ostatecznym wyniku reakcji zapalnej. W przypadku przedłużającego się działania PMN może dojść do rozległego uszkodzenia tkanek, co występuje typowo podczas przewlekłej reakcji zapalnej (schemat 2).

O ile wiele wiadomo o roli chemokin uwalnianych przez komórki mezotelialne, o tyle mechanizm sterujący zmianą fenotypu leukocytów napływających do jamy otrzewnej jest mniej jasny. McLoughlin i wsp. sugerują, że proces ten podlega wielopoziomowej regulacji, polegającej na skoordynowanej produkcji i uwalnianiu chemokin, ekspresji odpowiednich dla nich receptorów oraz ekspresji cząsteczek adhezyjnych [69] (schemat 3). Efektem pojawienia się czynnika zapalnego w jamie otrzewnej jest lokalny wzrost uwalniania cytokin pro-zapalnych (IL-1 β i TNF- α) przez makrofagi osiadłe w jamie otrzewnej [59;69;70]. Cytokiny te stymulują okoliczne komórki (przede wszystkim komórki mezotelialne) do syntezy chemokin ELR⁺ klasy CXC, np. CXCL8/IL-8, które indukują migrację PMN [69]. W kolejnym etapie napływające limfocyty, przede wszystkim limfocyty T i NKT [22;36;71], wydzielają IFN- γ , który hamuje uwalnianie chemokin klasy ELR⁺ CXC, a nasila produkcję chemokin klasy ELR⁻ CXC i klasy CC. Powoduje to zahamowanie napływu PMN, a nasilenie migracji monocytów i limfocytów (schemat 2 i 3).



Schemat 2.

Kinetyka napływu różnych populacji leukocytów do ogniska zapalnego; wg [69].



Schemat 3.

Przebieg reakcji zapalnej w jamie otrzewnej; wg [69].

CXC – chemokiny klasy CXC, CC – chemokiny klasy CC, OsM – onkostatyna M, CD40 – białko receptorowe, CD154 – ligand dla CD40, sIL-6R – rozpuszczalny receptor dla IL-6.

Godne uwagi jest podkreślenie różnic w działaniu IFN- γ na migrację leukocytów w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Robson i wsp. pokazali, że IFN- γ , hamując ekspresję CXCL8/IL-8 w ludzkich komórkach mezotelialnych, hamuje transmigrację PMN przez komórki mezotelialne *in vitro* [59]. Natomiast badania *in vivo* na myszach pozbawionych genu dla IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) pokazały, że rola IFN- γ jest bardziej złożona [72]. Stwierdzono, że zapalenie otrzewnej u myszy IFN- $\gamma^{-/-}$ charakteryzuje się z jednej strony zmniejszoną i opóźnioną migracją PMN do jamy otrzewnowej, a z drugiej – opóźnionym ich usuwaniem z otrzewnej. Zauważono, że efekty te wynikają z upośledzenia otrzewnowej produkcji IL-1 β i IL-6. Podanie egzogennej IL-6 myszom IFN- $\gamma^{-/-}$ z zapaleniem otrzewnej normalizuje eliminację PMN poprzez zwiększenie tempa ich apoptozy.

ICAM-1

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, CD54) to białko reprezentujące grupę immunoglobulinopodobnych cząsteczek adhezyjnych. Do grupy tych adhezyn należą również ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4 (antygen grupowy krwi Landsteinerja-Weinera), ICAM-5 oraz VCAM-1. Wspólnym elementem budowy tych cząstek jest immunoglobulinopodobna jednostka homologiczna, zawierająca od 70 do 110 aminokwasów, oraz centralnie położony mostek dwusiarczkowy, tworzący pętlę z 50-70 aminokwasów. ICAM-1 to glikoproteina złożona z 505 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 76-114 kDa [73], w zależności od stopnia glikozylacji [61]. W cząsteczce ICAM-1 można wyróżnić część zewnątrzkomórkową, złożoną z 5 domen (D1-5), silnie hydrofobową część transbłonową oraz część cytoplazmatyczną, zbudowaną z 28 aminokwasów. Ligandami dla ICAM-1 są przede wszystkim leukocytarne integryny $\beta 2$ (tabela III) [61;74].

Tabela III.

Ligandy dla ICAM-1

LIGAND	SYNONIMY	WYSTĘPOWANIE
Integryna $\alpha L\beta 2$	LFA-1 CD11a/CD18	limfocyty B limfocyty T monocyty granulocyty
Integryna $\alpha M\beta 2$	Mac-1 CD11b/CD18	monocyty granulocyty
Integryna $\alpha X\beta 2$	CR-4 CD11c/CD18	monocyty granulocyty

Miejsca przyłączenia dwóch głównych ligandów dla ICAM-1 znajdują się w części zewnątrzkomórkowej, odpowiednio w domenie D1 dla LFA-1 oraz w domenie D3 dla Mac-1 [75-77]. Część cytoplazmatyczna ICAM-1 także odgrywa rolę w procesie migracji komórek, ponieważ - jak wykazano – jej zablokowanie lub wyłączenie jej ekspresji powoduje zahamowanie przezśródbłonkowej migracji leukocytów (zwłaszcza PMN), lecz nie ma wpływu na ich adhezję do śródbłonka [78-81]. Gen dla ICAM-1 zlokalizowany jest na 19 chromosomie i składa się z 7 egzonów i 6 intronów, przy czym każda z pięciu immunoglobulinopodobnych domen kodowana jest przez oddzielny egzon [62]. Dokładne poznanie struktury genu dla ICAM-1 oraz jego promotora pokazało, że regulacja jego ekspresji odbywa się przede wszystkim na poziomie transkrypcji [82-84]. W strukturze promotora genu dla ICAM-1 znajdują się miejsca przyłączenia czynników transkrypcyjnych NF- κ B, GAF oraz AP-1 [61;62;84;85]. Analiza mutacji obejmujących miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego NF- κ B pozwoliła pokazać jego rolę w aktywacji transkrypcji ICAM-1 pod wpływem estrów forbolu, cytokin (TNF- α , IL-1 β) oraz reaktywnych form tlenu [61;84;85]. Niewielka konstytutywna ekspresja ICAM-1 występuje w komórkach śródbłonka naczyń oraz niektórych limfocytach i makrofagach [86;87]. Natomiast cytokiny pro-zapalne lub silne utleniacze znacznie stymulują ekspresję ICAM-1 (tabela IV).

Tabela IV.

Czynniki indukujące ekspresję ICAM-1 w różnych typach komórek.

Czynnik stymulujący	Typ komórek	Piśmiennictwo
TNF- α	- komórki mezangium - komórki ludzkiego nabłonka oskrzelowego - komórki ludzkiego mezotelium otrzewnowego - śródbłonek naczyniowy	[88] [89;90] [91;92] [40;91]
IL-1 β	- komórki ludzkiego mezotelium otrzewnowego - śródbłonek naczyniowy - fibroblasty	[91;92] [91] [93]
IFN- γ	- fibroblasty - komórki ludzkiego mezotelium otrzewnowego - śródbłonek naczyniowy	[93] [91] [91]
Reaktywne formy tlenu (np. H ₂ O ₂)	- śródbłonek naczyniowy	[61]

W zależności od rodzaju czynnika stymulującego i typu komórek, w regulację ekspresji ICAM-1 zaangażowane są różne szlaki sygnalizacyjne. Dokładnie zbadano m.in. ścieżkę aktywną po zadziałaniu wolnych rodników na komórki śródbłonka. Roebuck i wsp. pokazali, że ekspozycja na nadtlenek wodoru indukuje ekspresję ICAM-1 poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego AP-1 [62]. Natomiast reaktywne formy tlenu wygenerowane po stymulacji przez TNF- α powodują zaangażowanie czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [61]. Innym szlakiem regulacyjnym, który może pośredniczyć w aktywacji genu dla ICAM-1, jest ścieżka kinaz MAP, m.in. p38 MAPK, JNK i ERK 1/2 [94]. Ich działanie, regulujące ekspresję genu ICAM-1 wykazano np. po zadziałaniu TNF- α , lipopolisacharydu, nikotyny i trombiny [94-96].

ICAM-1 bierze udział nie tylko w adherencji i migracji leukocytów, ale także w rozwoju embrionalnym i odpowiedzi immunologicznej. Wykazuje przy tym aktywność charakterystyczną dla przekaźników wewnątrzkomórkowych. Stwierdzono na przykład, że ligacja ICAM-1 na powierzchni komórek śródbłonka wywołuje wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu Ca²⁺, generuje reaktywne formy tlenu, aktywuje kinazy Src i p38, indukuje białko szoku termicznego HSP27, zmienia organizację cytoszkieletu i ekspresję genów [97-100]. Do genów regulowanych przez związanie ICAM-1 należą geny dla VCAM-1, CXL8/IL-8, CCL5/RANTES oraz samej ICAM-1 [101-104].

W ustroju mogą pojawiać się również wolne formy cząsteczek adhezyjnych. Formy te opisywane są jako rozpuszczalne (soluble, „s”) lub też krążące (circulating, „c”) i wykrywalne są we krwi oraz we wszystkich płynach ustrojowych. Mają one zdolność wiązania integryn z siłą zbliżoną do form transbłonowych [105]. Fizjologiczny poziom ekspresji ICAM-1 na powierzchni śródbłonka i stopień uwalniania sICAM-1 do krwi są stosunkowo niskie, natomiast wyraźnie wzrastają podczas procesu zapalnego, [106] lub nowotworzenia [107;108]. Dlatego cząsteczka ta bywa uważana za marker stanów zapalnych i czynnik prognozujący ich postęp i zaawansowanie [109-112].

ICAM-1 a reakcja zapalna w jamie otrzewnej

Podczas reakcji zapalnej dochodzi do migracji leukocytów do ogniska zapalnego. Aby dotrzeć do celu leukocyt musi przede wszystkim przekroczyć barierę, jaką stanowi śródbłonek. „Schwytnięcie” przepływających z krwią leukocytów odbywa się dzięki selektynom, zaś ich ścisłe przyłgnięcie do śródbłonka wymaga ekspresji ICAM-1. Uwolnienie enzymów proteolitycznych przez leukocyty oraz zmiany w cytoszkielecie komórek śródbłonka, umożliwiają migrację parakomórkową leukocytów przez połączenia

międzykomórkowe [113]. ICAM-1 przyczynia się także do migracji leukocytów szlakiem transkomórkowym. Carman i wsp. dowiedli, że połączenie się ICAM-1 z odpowiednim ligandem zmienia dystrybucję ICAM-1 na powierzchni śródbłonna [114], tak że część cytoplazmatyczna ICAM-1 wchodzi w interakcję ze składnikami cytoszkieletu i sprawia, że błona komórkowa przyjmuje kształt zbliżony do kubka, w którym „zanurzony” jest leukocyt [61]. Adhezja leukocytów do śródbłonna może ulec wzmocnieniu, dzięki zdolności ICAM-1 do oligomeryzacji [114]. Powstały homooligomer ICAM-1 ma większe powinowactwo do integryn na powierzchni leukocytów i wraz z nimi może ulegać translokacji na stronę bazalną komórki [114]. Taka translokacja ICAM-1 ułatwia przyjęcie kształtu kubka przez komórkę śródbłonna i dalszą migrację leukocytów PMN szlakiem transkomórkowym.

Wiadomo, że ICAM-1 jest obecna na powierzchni komórek mezotelialnych, a poziom jej ekspresji powierzchniowej zwiększa się po stymulacji takimi cytokinami, jak IL-1 β , TNF- α i IFN- γ [91;92]. Ponadto wykazano, że mezotelialna ekspresja ICAM-1 ułatwia adhezję PMN do mezotelium [92;115] i ich migrację przez mezotelium [70]. Stwierdzono, że procesy te ulegają znacznemu zahamowaniu pod wpływem przeciwciał blokujących ICAM-1 lub ligandy dla ICAM-1 (CD11/18) [70;92]. Ponadto Andreoli i wsp. pokazali, że zastosowanie przeciwciał anti-ICAM-1, zmniejszając adhezję aktywowanych PMN, w pewnym stopniu ogranicza uszkodzenia mezotelium wywołane przez PMN [115]. W badaniach *in vivo* stwierdzono, że podanie myszom przeciwciał anti-ICAM-1 lub delecja genu dla ICAM-1 powoduje znaczne zmniejszenie napływu PMN do jamy otrzewnej w czasie wczesnej fazy eksperymentalnego zapalenia otrzewnej [116-118].

Wpływ IFN- γ na ICAM-1

Jak opisano wcześniej, IFN- γ wpływa zarówno na akumulację PMN we wczesnej fazie zapalenia, jak i ich usuwanie z ogniska zapalnego w fazach późniejszych [69;72]. IFN- γ kontroluje także migrację innych klas leukocytów poprzez regulację produkcji odpowiednich chemokin [26;59;66]. Wiadomo też, że IFN- γ bezpośrednio wpływa na ekspresję ICAM-1 w różnych typach komórek (tabela IV). Regulacja ekspresji genu dla ICAM-1 przez IFN- γ możliwa jest przede wszystkim dzięki obecności miejsca aktywowanego przez IFN- γ (GAS) w obrębie promotora genu ICAM-1 [84], ale postuluje się również alternatywne drogi regulacji [45;84;86]. Nie jest jasny natomiast mechanizm, poprzez który IFN- γ wpływa na uwalnianie przez komórki rozpuszczalnej formy ICAM-1 (sICAM-1).

Wiadomo, że z jednej strony indukcja ICAM-1 na powierzchni komórek mezotelialnych promuje proces adhezji i transmezotelialnej migracji PMN [91;92;115], jednak z drugiej strony, obecność sICAM-1 hamuje migrację PMN poprzez warstwę mezotelium [70]. Ponieważ IFN- γ odgrywa kluczową rolę w regulowaniu napływu PMN do jamy otrzewnowej i może modulować ekspresję ICAM-1, celem niniejszej pracy było zbadanie zależności między ekspresją ICAM-1 na powierzchni komórek mezotelialnych i uwalnianiem przez nie rozpuszczalnej formy sICAM-1 pod wpływem IFN- γ .

CEL PRACY

Celem pracy było poznanie, jak interferon-gamma (IFN- γ) wpływa na uwalnianie rozpuszczalnej formy cząsteczki adhezji międzykomórkowej, sICAM-1, przez ludzkie komórki mezotelium otrzewnowego (HPMC).

W szczególności zamierzano zbadać:

1. jak zmienia się ekspresja ICAM-1 na powierzchni ludzkich komórek mezotelium otrzewnowego oraz uwalnianie rozpuszczalnej formy sICAM-1 pod wpływem IFN- γ ;
2. jaki mechanizm leży u podstaw wpływu IFN- γ na uwalnianie sICAM-1 przez HPMC;
3. w jaki sposób glukoza – w stężeniach stosowanych w dializoterapii otrzewnowej – moduluje wpływ IFN- γ na sekrecję sICAM-1 przez HPMC.

METODYKA

Materiały i metody

Jeśli nie podano inaczej, odczynniki chemiczne wykorzystane w niniejszej pracy pochodziły z firmy Sigma-Aldrich® (USA). Materiały do hodowli komórkowej pochodziły z firm Nunc (Dania) i Sarstedt (RFN).

Izolacja i hodowla ludzkich komórek mezotelium otrzewnowego

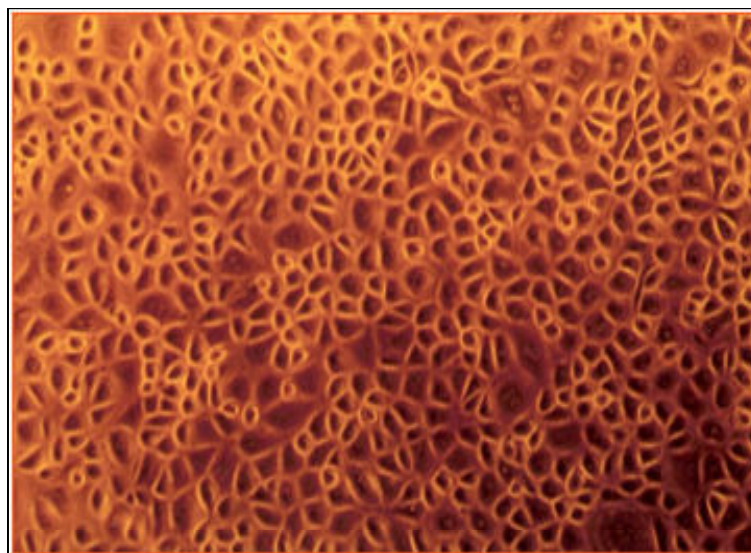
Komórki ludzkiego mezotelium otrzewnowego (*ang.* human peritoneal mesothelial cells, HPMC) izolowane były z fragmentów sieci większej (*omentum maius*), które ze wskazań lekarskich (np. uwalnianie zrostów, operacje przepuklin brzusznych, wszczepienie protez naczyniowych) usuwano w czasie zabiegów chirurgicznych. Tkanekę usuwano wyłącznie u pacjentów, u których nie stwierdzono w otrzewnej widocznych zmian patologicznych, takich jak odczyn zapalny lub rozsiew nowotworowy. Na wykorzystanie usuniętych fragmentów tkankowych do izolowania komórek uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej UMP (nr 35/06). Izolację i hodowlę komórek prowadzono zgodnie z metodą opracowaną w Zakładzie Patofizjologii UMP, która oparta jest o technikę zaproponowaną przez van Bronswijka i wsp [119;120]. Pobrany fragment tkanki umieszczano w roztworze trypsyny (0,05%) i EDTA (0,02%), rozpuszczonych w płynie Hanksa bez jonów wapnia i magnezu (HBSS). W roztworze tym inkubowano tkanekę przez 20 minut w temperaturze 37°C, delikatnie wstrząsając. Uzyskaną zawiesinę komórek dwukrotnie przepłukiwano w medium hodowlanym M199 buforowanym solami Earla i zawierającym 10% cielęcej surowicy płodowej (FCS) (Invitrogen, USA) oraz dodatek glutaminy (2 mM), penicyliny (100 U/ml), streptomycyny (100 µg/ml) i hydrokortyzonu (0,4 µg/ml). Zawiesinę komórek wirowano przez 10 minut przy szybkości 150 x g, następnie komórki zawieszano w medium hodowlanym i posiewano w butelkach hodowlanych o powierzchni 75 cm². Hodowane komórki inkubowano w temperaturze 37°C, w nawilżanym środowisku zawierającym 5% CO₂. W trakcie inkubacji, co 3 dni dokonywano wymiany całości medium hodowlanego.

Do eksperymentów wykorzystywano komórki ze wczesnych pasażów, tak aby zminimalizować liczbę starych komórek w hodowli [121]. Hodowle, które osiągnęły fazę zlewności, płukano 3-krotnie w medium zawierającym 0,1% FCS, a następnie inkubowano w tymże medium przez 24 godziny, w celu uzyskania tzw. hodowli spoczynkowej (*ang.*

growth arrested quiescent cells). Eksperymenty wykonywano w medium hodowlanym zawierającym 0,1% FCS.

Identyfikacja komórek ludzkiego mezotelium otrzewnowego

Identyfikację uzyskanych komórek mezotelialnych przeprowadzono według metodyki opracowanej w Zakładzie Patofizjologii UMP. W jej skład wchodziła ocena morfologiczna i cytochemiczna. HPMC w fazie zlewności wykazują charakterystyczny kształt kostki brukowej [122;123]. Dodatkowo wybarwiają się dodatnio na obecność cytokeratyny, która jest składnikiem cytoszkieletu komórkowego [123], oraz antygenu HBME-1, obecnego w cytoplazmie, zwłaszcza w obrębie mikrokosmków [124].



Ryc.1.

Komórki ludzkiego mezotelium otrzewnowego w hodowli in vitro (pow. x 100).

Cytokiny

Do badań wykorzystano rekombinowane formy ludzkich cytokin (R&D Systems, USA). Specyficzna aktywność IFN- γ wynosiła 10^7 U/mg (na podstawie porównania z aktywnością antywirusową standardu IFN- γ nr NIH-GG23-901-530 w teście wykorzystującym komórki HeLa zainfekowane wirusem zapalenia mózgu i serca, ECM) [125]. Swoistość efektu wywieranego przez IFN- γ oceniono w eksperymentach, w których komórki inkubowano z IFN- γ w obecności specyficznych przeciwciał neutralizujących IFN- γ (#AF-285-NA, R&D Systems) lub przeciwciał kontrolnych tej samej klasy.

Cytokiny i przeciwciała przechowywano w temperaturze -70°C i do każdego z eksperymentów używano świeżo rozmrożonych ich porcji.

Inhibitory

W tabeli V scharakteryzowano użyte inhibitory. Każdy z inhibitorów był rozpuszczony w DMSO i przechowywany zgodnie z zaleceniami producenta. W czasie eksperymentów do komórek grupy kontrolnej dodawano DMSO w stężeniach do 0,03% (co odpowiadało maksymalnej ilości DMSO podanej wraz z inhibitorami).

Tabela V.

Charakterystyka inhibitorów używanych w eksperymentach

Inhibitor	Mechanizm działania	Stosowane stężenia	Producent
Aktynomycyna D	hamowanie transkrypcji	0,03-3 $\mu\text{g/ml}$	Sigma-Aldrich® (USA)
Cykloheksymid	blokowanie translacji	0,3-30 $\mu\text{g/ml}$	Sigma-Aldrich® (USA)
SB 202190	blokowanie aktywności rodziny kinaz p38	0,1-10 $\mu\text{mol/l}$	Sigma-Aldrich® (USA)
MG-132	blokowanie proteasomu ubikwitynowego i – poprzez zahamowanie degradacji czynnika I κ B α – hamowanie pośrednio aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B	0,1-10 $\mu\text{mol/l}$	Biomol (USA)

Ocena żywotności komórek

Oceny żywotności komórek dokonano za pomocą testu MTT, który oparty jest na zdolności żywych komórek do konwersji soli tetrazolowej (bromku [3(4,5-dimetylo-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu], MTT) do nierozpuszczalnego formazanu. W celu przeprowadzenia testu komórki posiano na płytki 96-studzienkowe, a następnie przeprowadzono 30-minutową inkubację z użyciem różnych dawek inhibitorów. Po usunięciu medium i przepłukaniu komórek PBS, komórki inkubowano przez 24 godziny w standardowym medium hodowlanym. Następnie do medium dodano roztwór MTT (tak, aby jego ostateczne stężenie wynosiło 1,25 mg/ml) i inkubowano przez 4 godziny w temperaturze 37°C w ciemności. Następnie do każdej ze studzienek dodano po 100 μl buforu litycznego (20% SDS, 50% NN-dimetyloformamidu, pH 4,7) i po 24 godzinach inkubacji w ciemności w temperaturze pokojowej odczytano absorpcję przy długości fali 450 nm,

stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm. Pomiaru dokonywano w mikroczytniku Multiscan MCC/340 (Labsystem, Finlandia).

Pomiar stężenia białka

Do oznaczenia stężenia białka komórkowego wykorzystano metodę Bradforda [126]. Po usunięciu medium hodowlanego, komórki płukano w PBS i poddawano lizie za pomocą NaOH (0,1 mol/l). Do pomiaru stężenia białka w uzyskanych lizatach użyto odczynnika Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad Laboratories, RFN), natomiast jako standard wykorzystano albuminę bydlęcą (BSA). Czułość metody wynosiła 0,1 µg/ml. Stwierdzono, że 1 µg białka komórkowego odpowiada średnio (\pm SD) $2,1 \pm 1,0 \times 10^3$ komórek mezotelialnych [127]. Ilości cytokin uwalnianych przez HPMC wyrażono w przeliczeniu na 1 µg białka komórkowego.

Oznaczanie stężenia sICAM-1

Po zakończeniu eksperymentów pobierano próbki medium hodowlanego, które następnie przechowywano w temperaturze -20°C , aż do momentu wykonania pomiaru. Stężenie sICAM-1 w badanych supernatantach analizowano za pomocą metody immunoenzymatycznej (ELISA, ang. enzyme-linked immunosorbent assay), z wykorzystaniem zestawu DuoSet® ELISA Development System (R&D Systems, USA). Oznaczenia dokonywano w 96-studzienkowych płytkach typu MaxiSorp (Nunc, Dania). Płytką była pokrywana przeciwciałem „wychytującym” (mysie przeciwciało monoklonalne przeciwko ludzkiej sICAM-1), zawieszonym w PBS w stężeniu 4 µg/ml. Płytkę inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej, a następnie płukano trzykrotnie roztworem 0,05% Tween 20 w PBS (bufor płuczący) i blokowano przez podanie 10% roztworu Roti-Block (Carl Roth, RFN) na 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym wypłukaniu płytki buforem płuczącym do studzienek podawano wzorce, zawierające znane stężenia rekombinowanej ludzkiej sICAM-1 (w zakresie 15,6 -1000 pg/ml), lub badane próbki. Płytkę inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 4°C , a następnie płukano jak opisano powyżej. Po wypłukaniu, płytkę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej z biotynylowanym kozim przeciwciałem anti-sICAM-1, zawieszonym w stężeniu 100 ng/ml w PBS zawierającym 1% BSA. Po wypłukaniu płytkę inkubowano przez 20 minut z konjugatem streptawidyny i polimeru peroksydazy chrzanowej. Po kolejnym płukaniu, podawano do studzienek substrat zawierający 3,3',5,5'-tetrametylobenzydynę oraz H_2O_2 (Pharmingen, USA) i inkubowano w ciemności

w temperaturze pokojowej, aż do rozwinięcia się koloru. Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie do studzienek roztworu H_2SO_4 (2 N). Pomiaru gęstości optycznej dokonywano w mikroczytniku Multiscan przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm. Stężenia sICAM-1 liczone były na podstawie krzywej wzorcowej generowanej automatycznie przy użyciu programu komputerowego Genesis Lite (Labsystems, Finlandia).

Ocena ekspresji ICAM-1 za pomocą testu immunoenzymatycznego *in situ*

W celu oszacowania ekspresji ICAM-1 na powierzchni HPMC użyto testu immunoenzymatycznego *in situ*, opracowanego przez dr. K. Książka z Zakładu Patofizjologii UMP. Komórki posiewano na płytkach 96-studzienkowych i następnie poddawano eksperymentom. Po zakończonej ekspozycji usuwano medium hodowlane, a komórki przepłukiwano 3-krotnie PBS zawierającym 0,05% Tween 20 (bufor płuczący) i utrwalano przez 10 minut w temperaturze pokojowej w roztworze 3,7% formaldehydu i 0,1% glutaraldehydu w PBS. Następnie komórki płukano 3-krotnie buforem płuczającym i blokowano niespecyficzne miejsca wiązania poprzez inkubację w 10% roztworze Roti-Block przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie podawano biotynylowane monoklonalne przeciwciało anti-ICAM-1 (klon BBIG-I1; R&D Systems) w stężeniu 0,1 $\mu g/ml$ i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Studzienki płukano 4-krotnie buforem płuczającym, a następnie podawano konjugat streptawidyny i polimeru peroksydazy chrzanowej na 20 minut w temperaturze pokojowej. Po ponownym płukaniu podawano do studzienek substrat zawierający 3,3',5,5'-tetrametylobenzydynę oraz H_2O_2 (Pharmingen, USA) i inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej, aż do rozwinięcia się koloru. Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie do studzienek roztworu H_2SO_4 (2 N). Pomiaru gęstości optycznej dokonywano w mikroczytniku Multiscan przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm.

Ocena ekspresji ICAM-1 za pomocą barwienia immunocytochemicznego

Detekcji immunocytochemicznej ICAM-1 w HPMC dokonano w oparciu o metodę opisaną przez Shi i wsp. [128]. W tym celu komórki hodowano w komorach, których dno stanowiły mikroskopowe szkiełka podstawowe (Lab-Tek™ Chamber Slides; Nunc). Po zakończonej ekspozycji, komórki płukano 2 razy w PBS, a następnie utrwalano przez 15 minut w 3,7% roztworze formaldehydu w PBS. Aby zapobiec niespecyficznemu wiązaniu przeciwciał, komórki inkubowano w 2% roztworze BSA w PBS, a następnie podawano

monoklonalne przeciwciało anti-ICAM-1 (nr MAB2146, Chemicon, USA) w rozcieńczeniu 1:5000 i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po wypłukaniu w PBS zawierającym 0,05% Tween 20, komórki inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37°C z przeciwciałami wyznakowanymi peroksydazą chrzanową i skierowanymi przeciwko mysiej IgG (DAKO Envision System, Dako, Dania). Następnie podawano zbuforowany roztwór 3,3'-diaminobenzydyny (Dako) i inkubowano w wilgotnej komorze przez 5 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Po przepłukaniu preparatu wodą destylowaną wybarwione komórki oceniano w mikroskopie świetlnym. Kontrolę negatywną stanowiły komórki barwione z pominięciem etapu inkubacji z przeciwciałem anti-ICAM-1.

Ocena ekspresji powierzchniowej ICAM-1 za pomocą cytometrii przepływowej

Pomiaru dokonano według zmodyfikowanej metody Parka i wsp. [129]. Po zakończeniu eksperymentalnej ekspozycji, komórki zluszczano w roztworze trypsyny i liczono za pomocą komory Bürkera. Następnie z każdej badanej populacji HPMC przygotowywano 2 próbki liczące po 500000 komórek w 2 ml soli Hanksa. Komórki płukano w PBS z dodatkiem 2% FCS i 0,1% azydku sodu, a następnie dodawano do próbek odpowiednie przeciwciała, tj. anti-ICAM-1 lub kontrolne przeciwciało izotypowe (Immunotech, Francja) w proporcji 1 μ l/100000 komórek. Oba przeciwciała znakowane były izotiocyjanianem fluoresceiny. Komórki inkubowano z przeciwciałami przez 30 minut w temperaturze 4°C, po czym płukano je, zawieszano w 0,5 ml 1% paraformaldehydu i przechowywano w temperaturze 4°C do czasu analizy. Oceny komórek za pomocą cytometru przepływowego (FACS-Canto, Becton Dickinson, USA) dokonywano w ciągu 3 dni od utrwalenia badanej próbki. Uzyskane dane analizowano oraz przedstawiano graficznie przy pomocy programu PC-Lysis software (Becton Dickinson, USA).

Izolacja RNA

RNA izolowano z komórek według metody Chomczyńskiego i Sacchi [130], stosując RNA-Bee Isolation Solvent (Tel-Test Inc., USA) według instrukcji producenta. Uzyskany RNA oczyszczano przy użyciu zestawu RNeasy[®] Cleanup kit (Qiagen, RFN). Stężenie uzyskanego RNA oceniono na podstawie pomiaru gęstości optycznej przy długości fali 260 nm i 280 nm, używając do tego celu spektrofotometru Helios β (UNICAM, Wielka Brytania). Założono, iż $A_{260}=1$ dla stężenia RNA wynoszącego 40

µg/ml. Oceny stopnia czystości RNA dokonano na podstawie analizy stosunku A_{260}/A_{280} , uznając za akceptowalne wartości $>1,8$. Integralność otrzymanego RNA potwierdzono elektroforezą 0,5 µg RNA w 2% żelu agarozowym.

Odwrotna transkrypcja

Uzyskany RNA zdenaturowano przez 3-minutową inkubację w temperaturze 95°C, a po schłodzeniu poddano odwrotnej transkrypcji przy użyciu metody „losowo wybranych” starterów. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µl i składała się ona z mieszaniny nukleotydów w postaci heksametrów (pd[N]₆, 100 µM; Amersham Pharmacia Biotech, Wielka Brytania), 5 µl mieszaniny dezoksyrybonukleotydów (2,5 mM; Invitrogen), 2 µl ditiotretolu (0,1 M; Invitrogen), 1 µl inhibitora rybonukleaz (20 U, rRNasin®; Promega, USA), 1 µl odwrotnej transkryptazy (200 U, M-MLV™ Superscript; Invitrogen) i 1 µg RNA w H₂O. Reakcję prowadzono przez 10 minut w temperaturze 22°C, a następnie przez 40 minut w temperaturze 42°C. Ostatnim etapem była 5-minutowa inkubacja w temperaturze 95°C. Produkt reakcji, komplementarny DNA (cDNA), przechowywano w temperaturze -20°C.

Tabela VI.

Charakterystyka użytych starterów PCR (A- antysensowne, S- sensowne)

Gen	Liczba cykli PCR	Wielkość produktu PCR (pary zasad)	Piśmiennictwo
α-aktyna S: 5'-GGAGCAATGATCTTGATCTT-3' A: 5'-CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT-3'	32	204	[131]
ICAM-1 S: 5'-GTGACATGCAGCACCTCCTG-3' A: 5'-TCCATGGTGATCTCTCCTCA-3'	26	405	[132]

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) przeprowadzono w 50 µl mieszaniny reakcyjnej, na którą składały się 2 µl cDNA, 36,25 µl H₂O, 1,25 µl startera dla końca 5' (20 µM), 1,25 µl startera dla końca 3' (20 µM), 4 µl mieszaniny dezoksyrybonukleotydów, 5 µl 10-krotnie stężonego buforu PCR, 0,25 µl termostabilnej polimerazy DNA (2,5 U, AmpliTaq®; Perkin Elmer). Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler Gradient 5331 (Eppendorf, RFN).

Rozdział produktów PCR

Rozdziału produktów PCR dokonano w 3% żelu agarozowym (FMC Bioproducts, USA), w obecności bromku etydyny (1 µg/ml). Elektroforezę prowadzono pod napięciem 70 V przez 90 minut, następnie żel fotografowano w świetle ultrafioletowym i oceniano densytometrycznie, wykorzystując program Quantity One 4.0 (Bio-Rad, USA).

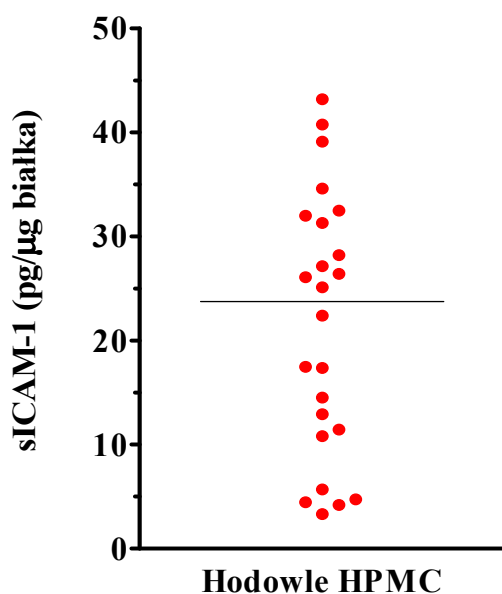
Analiza statystyczna

Wyniki analizowano za pomocą programu statystycznego GraphPad Prism™ 4.00 (GraphPad Software, USA). Zastosowano test t-Studenta (dla porównania 2 grup) oraz analizę wariancji ANOVA (dla porównania > 2 grup). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD). Jako istotne statystycznie przyjęto różnice, dla których wartość współczynnika p wynosiła <0,05.

WYNIKI

Konstytucyjne uwalnianie sICAM-1 przez HPMC

Po zbadaniu 24 hodowli HPMC, wyprowadzonych od różnych dawców, stwierdzono, że komórki te uwalniają sICAM-1 w sposób konstytucyjny (ryc. 2). Wykazano, że średnie (\pm SD) uwalnianie sICAM-1 w ciągu 24 godzin wynosi 22 ± 13 pg/ μ g białka komórkowego, przy współczynniku zmienności (CV) 58,3%. Mediana i zakres stwierdzonych wartości wynosiły odpowiednio 24 i 3-43 pg/ μ g białka komórkowego.



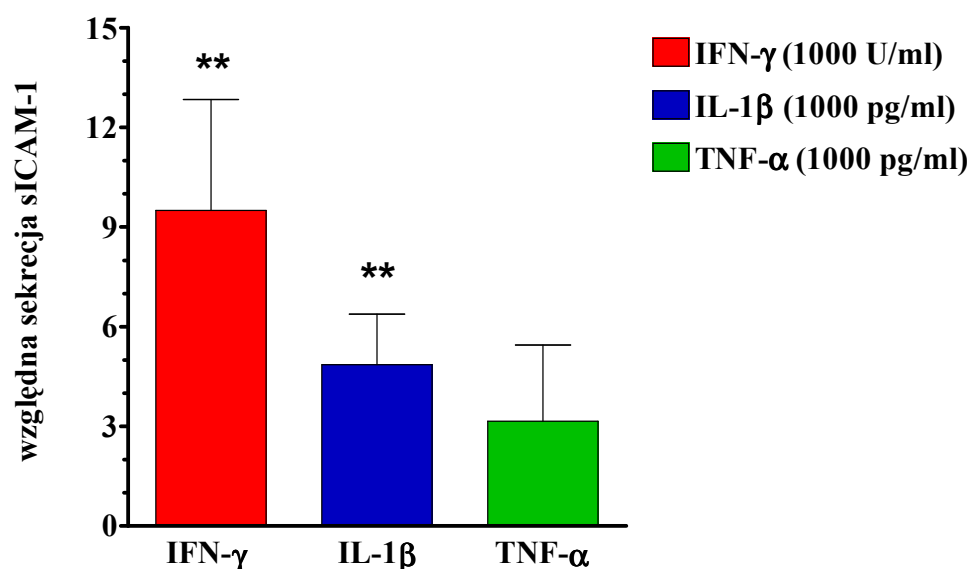
Ryc. 2.

Konstytucyjna sekrecja sICAM-1 przez HPMC.

Poszczególne punkty obrazują ilość uwolnionej sICAM-1 przez komórki mezotelialne wyizolowane od różnych dawców. HPMC były inkubowane przez 24 godziny w kontrolnym medium hodowlanym zawierającym 0,1% FCS. Stężenie uwolnionej sICAM-1 zostało znormalizowane w stosunku do ilości białka komórkowego. Pozioma linia oznacza medianę z 24 eksperymentów przeprowadzonych na hodowlach pochodzących od różnych dawców.

Uwalnianie sICAM-1 przez HPMC stymulowane cytokinami

W celu określenia, czy uwalnianie sICAM-1 zmienia się pod wpływem cytokin biorących udział w reakcji zapalnej, HPMC eksponowano na działanie wybranych cytokin (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) w dawkach, o których wiadomo z literatury, że stymulują uwalnianie innych mediatorów przez HPMC [70;72;91;92]. Zaobserwowano, iż najsilniejszy efekt, pobudzający uwalnianie sICAM-1, wywierał IFN- γ . W przypadku IL-1 β zaobserwowano również znamienne wzrost uwalniania sICAM-1, jednak znacząco mniejszy niż pod wpływem IFN- γ (Ryc. 3). Natomiast zarejestrowane zwiększenie uwalniania sICAM-1 pod wpływem TNF- α nie było statystycznie istotne w stosunku do grupy kontrolnej.



Ryc. 3.

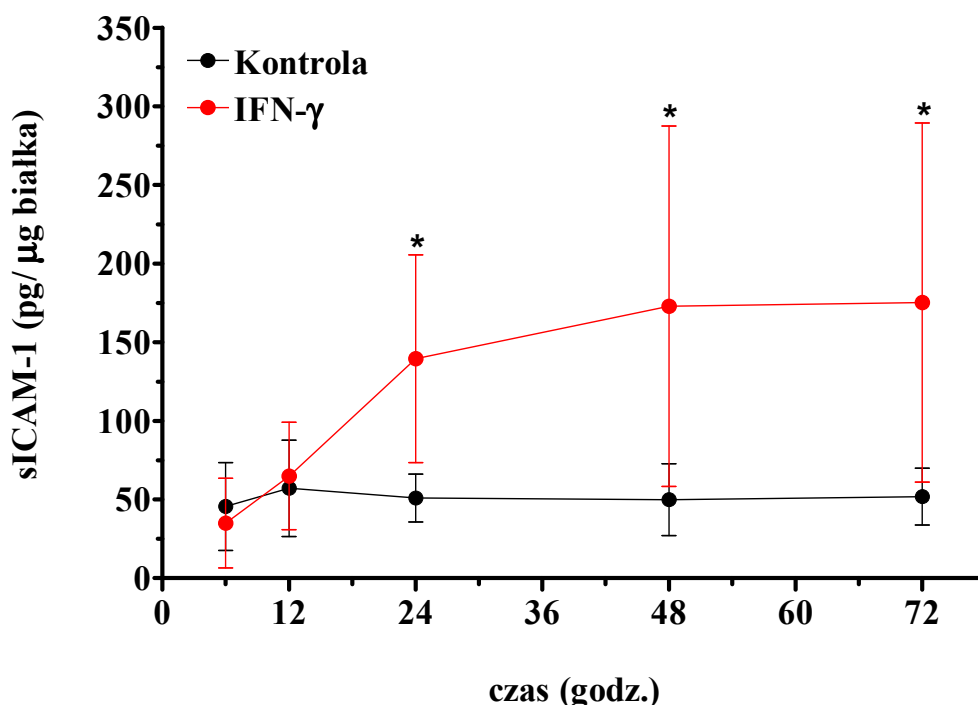
Sekrecja sICAM-1 przez HPMC stymulowane cytokinami.

Komórki mezotelialne inkubowano przez 24 godziny w obecności wybranych cytokin w stężeniach jak zaznaczono. Wykres przedstawia średnią (\pm SD) krotność zmiany w stosunku do niestymulowanej grupy kontrolnej (w której sekrecja sICAM-1 wynosiła 22 ± 13 pg/ μ g białka komórkowego). Wyniki pochodzą z 4-7 eksperymentów z komórkami izolowanymi od różnych dawców. Gwiazdki oznaczają statystycznie istotną różnicę w stosunku do komórek grupy kontrolnej (** $p < 0,01$).

Wpływ IFN- γ na uwalnianie sICAM-1 przez HPMC

Ponieważ powyższe dane sugerowały, że – spośród badanych cytokin – najsilniejszy efekt stymulujący uwalnianie sICAM-1 przez HPMC wywiera IFN- γ , w następnych eksperymentach postanowiono bliżej scharakteryzować działanie IFN- γ w tym zakresie.

Stwierdzono, że IFN- γ zwiększa sekrecję sICAM-1 przez HPMC w sposób zależny od czasu. Po zastosowaniu IFN- γ w dawce 1000 U/ml, istotny statystycznie wzrost uwalniania sICAM-1 ponad stężenia w grupie kontrolnej zaobserwowano po 24 godzinach. Wzrost ten osiągnął fazę plateau po 48 godzinach (ryc. 4).



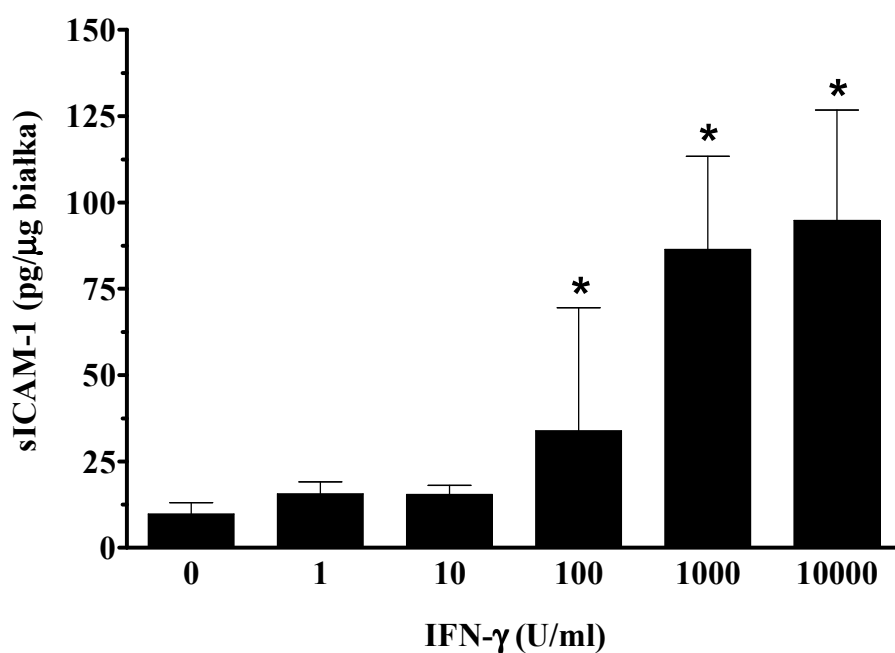
Ryc. 4.

Uwalnianie sICAM-1 przez HPMC w zależności od czasu ekspozycji na IFN- γ .

HPMC inkubowano w medium kontrolnym lub w obecności IFN- γ (1000 U/ml). Na wykresie przedstawiono dane z 6 eksperymentów. * oznacza statystycznie istotną różnicę w stosunku do kontroli w tym samym punkcie czasowym (* $p < 0,05$).

Wpływ IFN- γ na uwalnianie sICAM-1 przez HPMC w zależności od dawki

Stymulujący wpływ IFN- γ na uwalnianie sICAM-1 był również zależny od jego dawki (ryc. 5). Najniższą dawką IFN- γ , która znacząco zwiększała uwalnianie sICAM-1 było stężenie 100 U/ml. Najsilniejszy efekt zaobserwowano w stężeniu 10000 U/ml, przy którym uwalnianie sICAM-1 wzrosło 9,8-krotnie w porównaniu do niestymulowanej grupy kontrolnej.



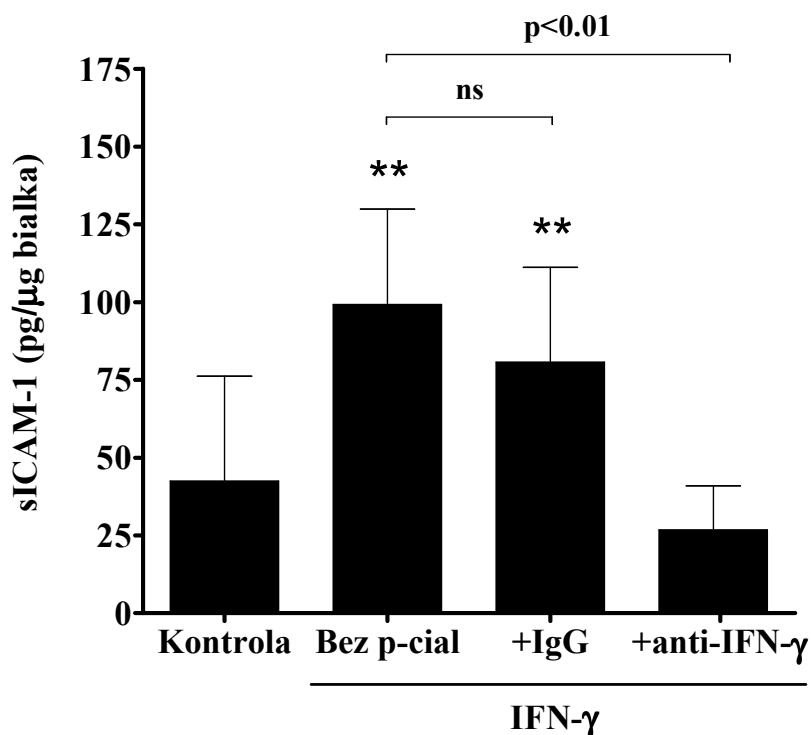
Ryc. 5.

Wpływ dawki IFN- γ na uwalnianie sICAM-1 przez HPMC.

Komórki poddano 24-godzinnej ekspozycji na wzrastające dawki IFN- γ . Na wykresie przedstawiono wartości średnie (\pm SD) z 6 eksperymentów z komórkami uzyskanymi od różnych dawców. * oznacza statystycznie istotną różnicę w stosunku do niestymulowanej kontroli (* p <0,05).

Swoistość wpływu IFN- γ na uwalnianie sICAM-1 przez HPMC

W celu potwierdzenia swoistości efektu wywieranego przez IFN- γ , oceniono jego działanie w obecności specyficznych przeciwciał anti-IFN- γ (ryc. 6). Stwierdzono, że w takich warunkach stymulujący wpływ IFN- γ na uwalnianie sICAM-1 został całkowicie zniesiony. Efektu takiego nie stwierdzono natomiast w obecności przeciwciał kontrolnych tej samej klasy.



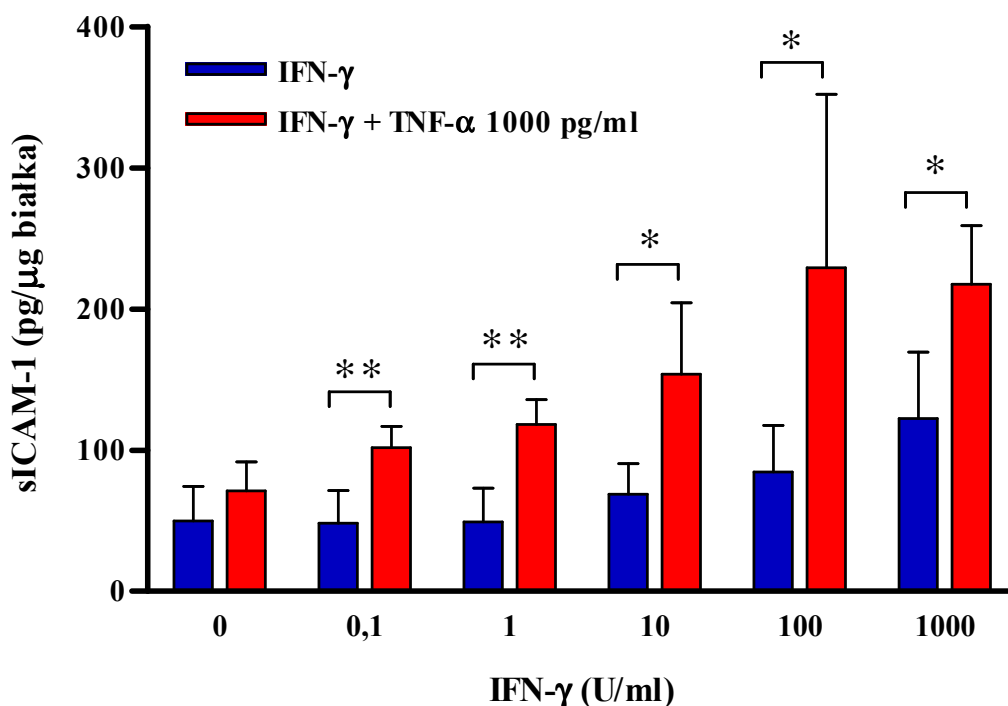
Ryc. 6.

Swoistość wpływu IFN- γ na uwalnianie sICAM-1 przez HPMC.

Komórki poddano 24-godzinnej ekspozycji na działanie IFN- γ (1000 U/ml) w obecności specyficznego przeciwciała neutralizującego IFN- γ (3 μ g/ml) lub w obecności przeciwciała kontrolnego w takim samym stężeniu. Przedstawiono wartości średnie (\pm SD) z 4 eksperymentów. ** oznacza statystycznie istotną różnicę ($p < 0,01$) w stosunku do niestymulowanej grupy kontrolnej.

Łączny wpływ IFN- γ i TNF- α na uwalnianie sICAM-1 przez HPMC

Do oceny, czy efekt IFN- γ może być modulowany przez inne cytokiny, wybrano TNF- α , który działając samodzielnie nie wykazywał istotnego wpływu stymulującego uwalnianie sICAM-1 (por. ryc. 3). Okazało się natomiast, że TNF- α istotnie potęguje stymulujące działanie IFN- γ . Efekt ten był widoczny w całym zakresie stężeń IFN- γ , w tym przy połączeniu z najniższymi stężeniami IFN- γ (0,1-1 U/ml), które same nie zwiększały uwalniania sICAM-1 (ryc. 7A).

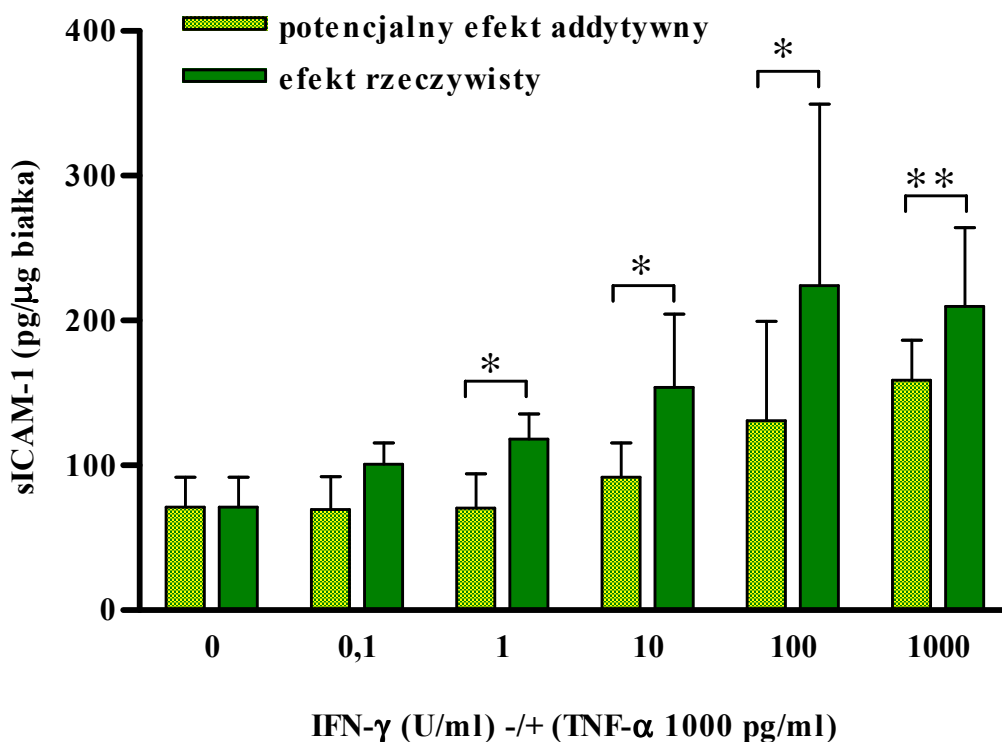


Ryc. 7A.

Porównanie wpływu IFN- γ działającego samodzielnie i w połączeniu z TNF- α na uwalnianie sICAM-1 przez HPMC.

Komórki mezotelialne inkubowano przez 24 godziny z IFN- γ lub IFN- γ + TNF- α w stężeniach jak zaznaczono. Wykres przedstawia dane z 4 eksperymentów z komórkami izolowanymi od różnych dawców. Gwiazdki oznaczają statystycznie istotną różnicę w stosunku do komórek poddanych działaniu samego IFN- γ w odpowiedniej dawce (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Stwierdzono również, iż łączne działanie cytokin na uwalnianie sICAM-1 przez HPMC jest silniejsze niż potencjalny efekt addytywny (liczony jako suma efektów każdej z cytokin osobno) (ryc. 7B). Efekt ten był widoczny dla IFN- γ w dawkach powyżej 0,1 U/ml.

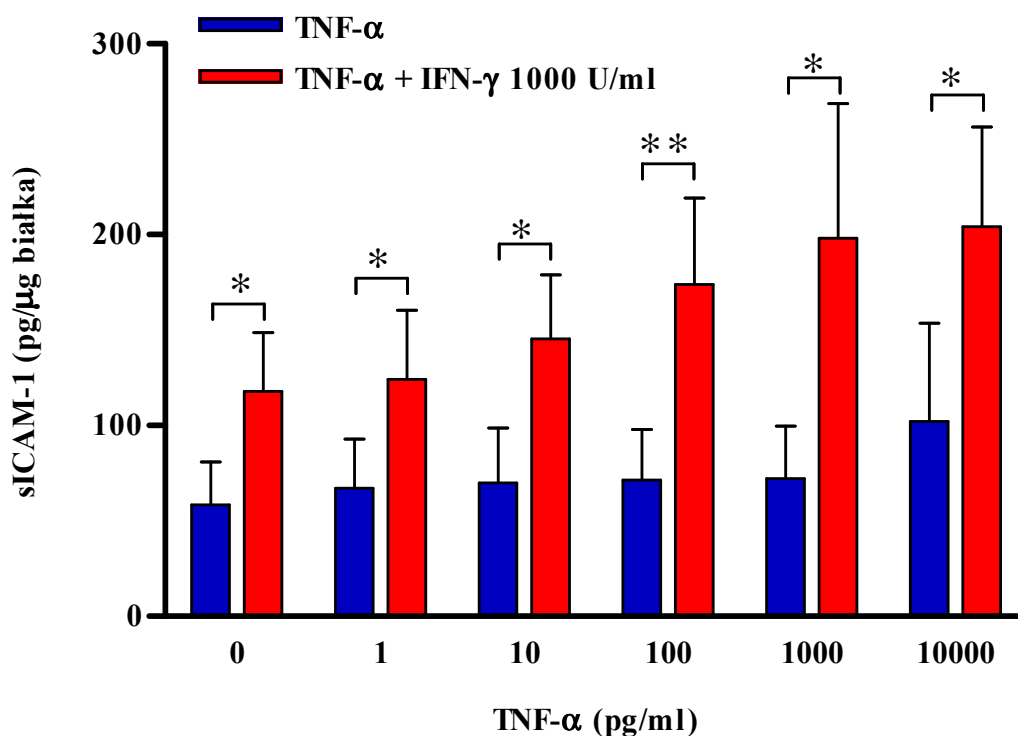


Ryc. 7B.

Synergiczny wpływ IFN- γ i TNF- α na uwalnianie sICAM-1.

Wykres porównuje rzeczywisty efekt działania IFN- γ i TNF- α z wyliczonym efektem addytywnym. Dane pochodzą z 4 eksperymentów z komórkami izolowanymi od różnych dawców. Gwiazdki oznaczają statystycznie istotną różnicę w stosunku do wyliczonego efektu addytywnego (* p<0,05, ** p<0,01).

W celu potwierdzenia synergizmu działania IFN- γ i TNF- α , przeprowadzono również eksperymenty, w których łączono różne dawki TNF- α ze stałą dawką IFN- γ . Stwierdzono, że sam TNF- α powoduje nieznaczny wzrost uwalniania sICAM-1 tylko w najwyższej zastosowanej dawce (10000 pg/ml) (ryc. 8A). Natomiast połączenie TNF- α z IFN- γ (1000 U/ml) wywołuje zwiększenie uwalniania sICAM-1 już począwszy do dawki 10 pg/ml. Najsilniejszy efekt stymulujący zaobserwowano w przypadku połączenia 1000 pg/ml TNF- α i 1000 U/ml IFN- γ , gdzie uwalnianie sICAM-1 było 2,7-krotnie wyższe w stosunku do samego TNF- α w tej samej dawce.

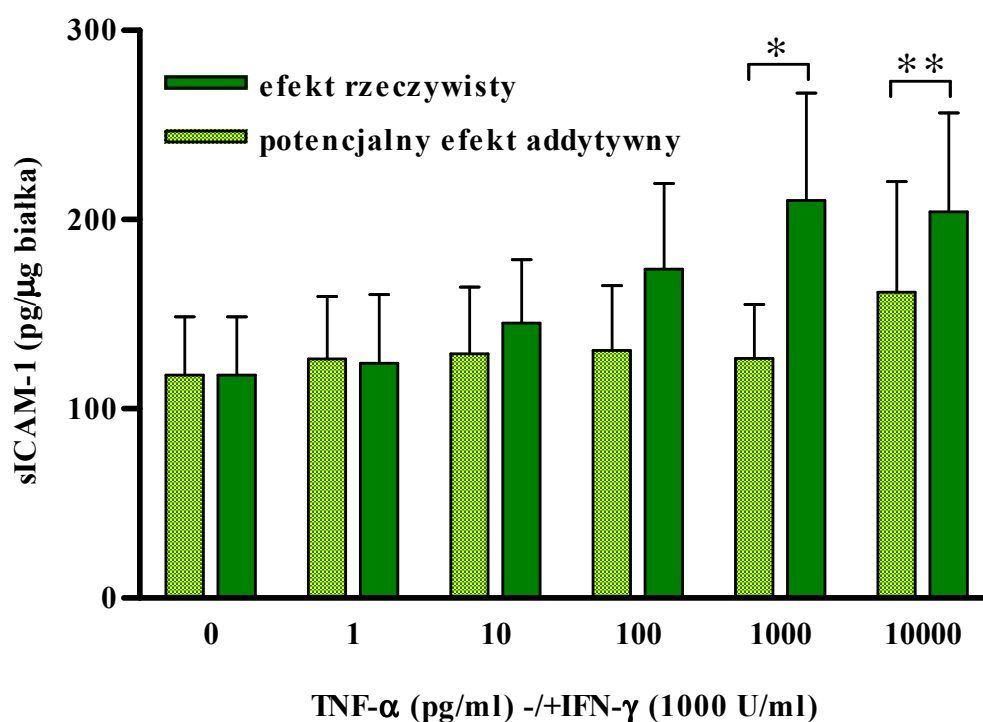


Ryc. 8A.

Porównanie wpływu TNF- α działającego samodzielnie i w połączeniu z IFN- γ na uwalnianie sICAM-1 przez HPMC.

Komórki mezotelialne inkubowano przez 24 godziny z TNF- α lub TNF- α + IFN- γ w stężeniach jak zaznaczono. Wykres przedstawia dane z 3 eksperymentów z komórkami izolowanymi od różnych dawców. Gwiazdki oznaczają statystycznie istotną różnicę w stosunku do komórek poddanych działaniu samego TNF- α w odpowiedniej dawce (* p<0,05; ** p<0,01).

Uzyskane dane pozwoliły obliczyć potencjalny efekt addytywny IFN- γ i TNF- α i zestawienie go z efektem rzeczywistym. Stwierdzono, że IFN- γ wywierał efekt synergiczny po połączeniu z TNF- α w dawkach > 100 pg/ml (ryc. 8B.)



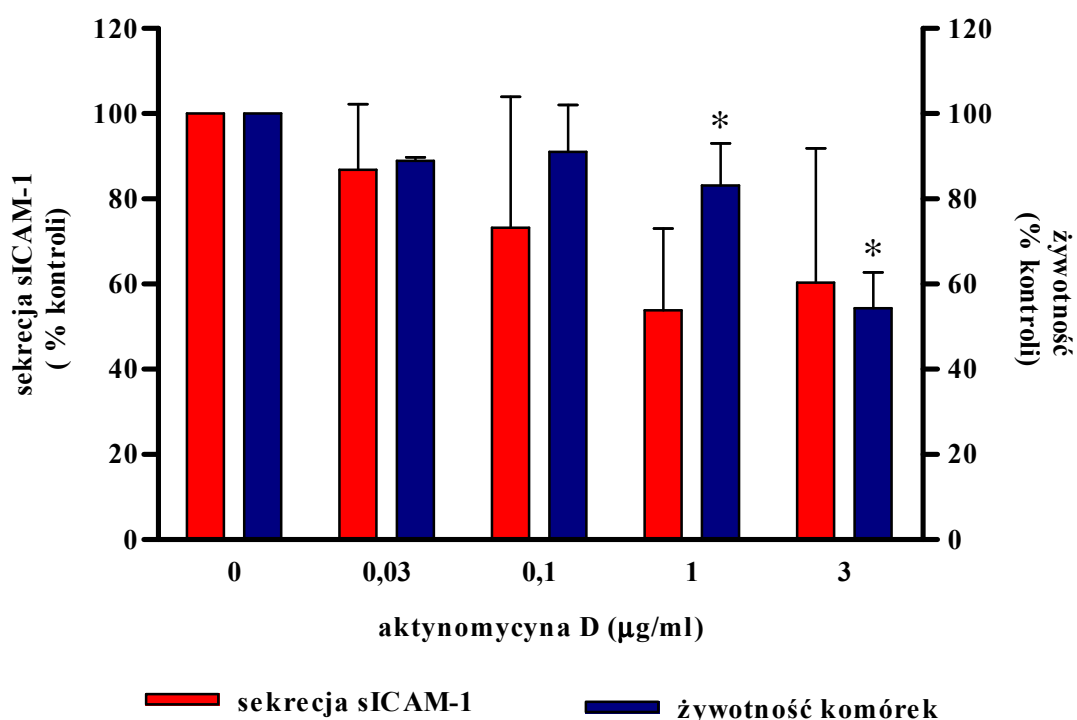
Ryc. 8B.

Synergiczny wpływ TNF- α i IFN- γ na uwalnianie sICAM-1.

Wykres porównuje rzeczywisty efekt działania IFN- γ i TNF- α z wyliczonym efektem addytywnym. Dane pochodzą z 3 eksperymentów z komórkami izolowanymi od różnych dawców. Gwiazdki oznaczają statystycznie istotną różnicę w stosunku do wyliczonego efektu addytywnego (* p<0,05; ** p<0,01).

Wpływ aktynomycyny D na uwalnianie sICAM-1 i żywotność HPMC

W kolejnej serii eksperymentów badano wpływ inhibitorów różnych szlaków sygnalizacyjnych na uwalnianie sICAM-1 przez HPMC. W tym celu komórki preinkubowano przez 30 minut z odpowiednim inhibitorem, a następnie stymulowano IFN- γ (1000 U/ml) przez 24 godziny. Jednocześnie kontrolowano żywotność komórek za pomocą testu MTT. Stwierdzono, że aktynomycyna D – inhibitor transkrypcji - upośledzała żywotność HPMC w dawkach $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ (ryc. 9). Natomiast w stężeniach nie zmniejszających żywotności komórek, nie wpływała istotnie na wielkość sekrecji sICAM-1.



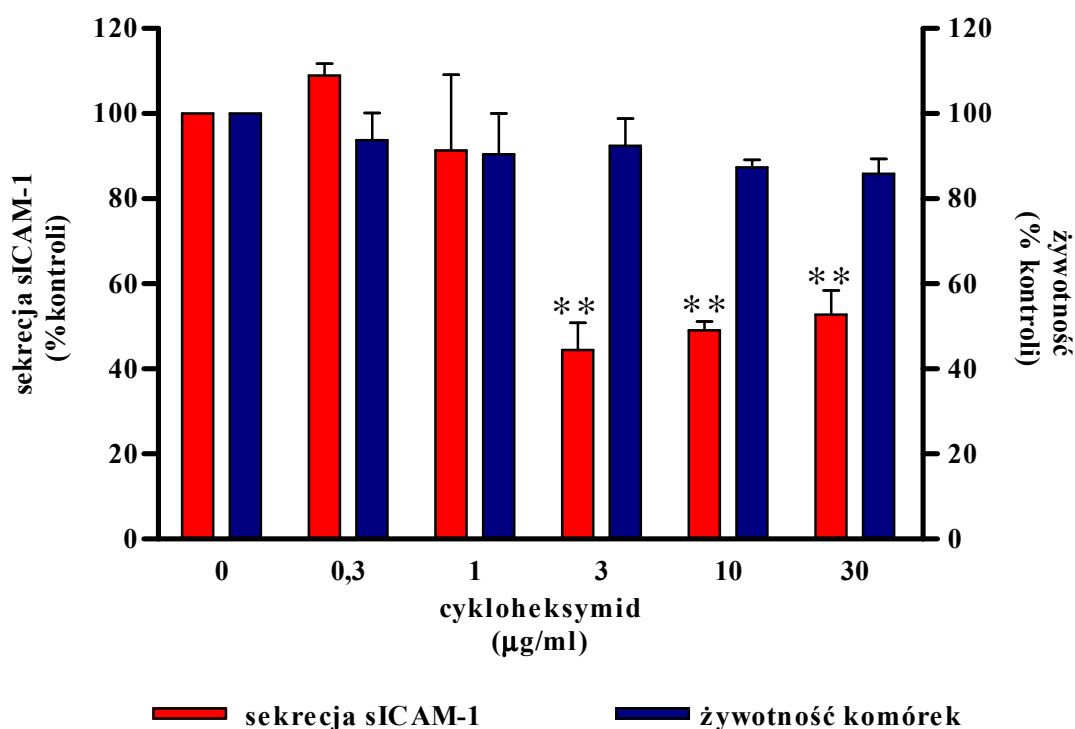
Ryc. 9.

Wpływ aktynomycyny D na żywotność i sekrecję sICAM-1 stymulowaną przez IFN- γ .

Wielkość sekrecji sICAM-1 i żywotność komórek wyrażono jako odsetek wartości kontrolnych uzyskanych w grupie nie poddanej działaniu aktynomycyny D. Dane pochodzą z 3 eksperymentów z komórkami izolowanymi od różnych dawców. Gwiazdki oznaczają statystycznie istotną różnicę w stosunku do grupy kontrolnej (* $p < 0,05$).

Wpływ cykloheksymidu na uwalnianie sICAM-1 i żywotność HPMC

W celu ustalenia, czy uwalnianie sICAM-1 stymulowane przez IFN- γ regulowane jest na etapie translacji, komórki pre-inkubowano przez 30 minut z inhibitorem translacji - cykloheksymidem, a następnie stymulowano IFN- γ przez 24 godziny. Żywotność komórek kontrolowano za pomocą testu MTT. Stwierdzono, że cykloheksymid w dawkach ≤ 30 $\mu\text{g/ml}$ nie upośledzał żywotności HPMC (ryc. 10). Wykazano natomiast, że w stężeniach ≥ 3 $\mu\text{g/ml}$ zmniejszał sekrecję sICAM-1 do około 50% wielkości w grupie kontrolnej.

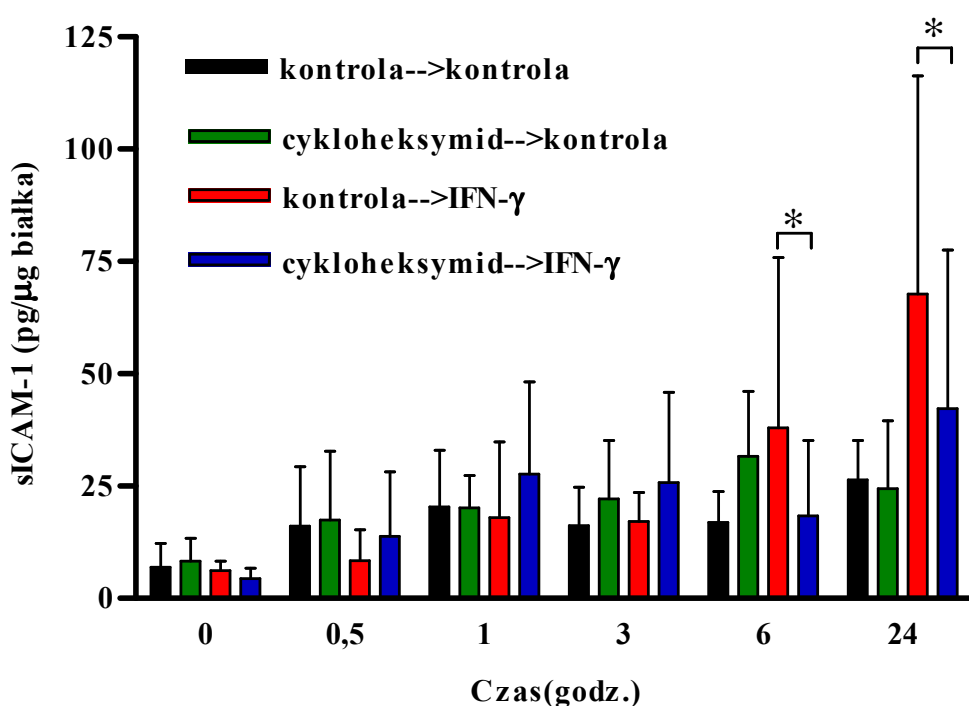


Ryc. 10.

Wpływ cykloheksymidu na żywotność i sekrecję sICAM-1 stymulowaną przez IFN- γ .

Wielkość sekrecji sICAM-1 i żywotność komórek wyrażono jako odsetek wartości kontrolnych uzyskanych w grupie nie poddanej działaniu cykloheksymidu. Dane pochodzą z 3 eksperymentów z komórkami izolowanymi od różnych dawców. Gwiazdki oznaczają statystycznie istotną różnicę w stosunku do grupy kontrolnej (** $p < 0,01$).

W celu określenia, jak szybko zaznacza się hamujący wpływ cykloheksymidu na uwalnianie sICAM-1 przeprowadzono eksperyment, w którym komórki poddano najpierw 30-minutowej pre-ekspozycji na cykloheksymid w dawce 10 µg/ml, a następnie stymulowano IFN-γ (1000 U/ml) i w odpowiednich punktach czasowych oznaczano ilość uwolnionej cząsteczki sICAM-1. Stwierdzono, że zahamowanie sekrecji sICAM-1 pod wpływem cykloheksymidu było widoczne od momentu, w którym zaczął zaznaczać się stymulujący wpływ IFN-γ, tj. po 6 godzinach inkubacji (ryc. 11). Jednocześnie nie stwierdzono, aby cykloheksymid wpływał na sekrecję sICAM-1 z komórek kontrolnych nie stymulowanych przez IFN-γ.



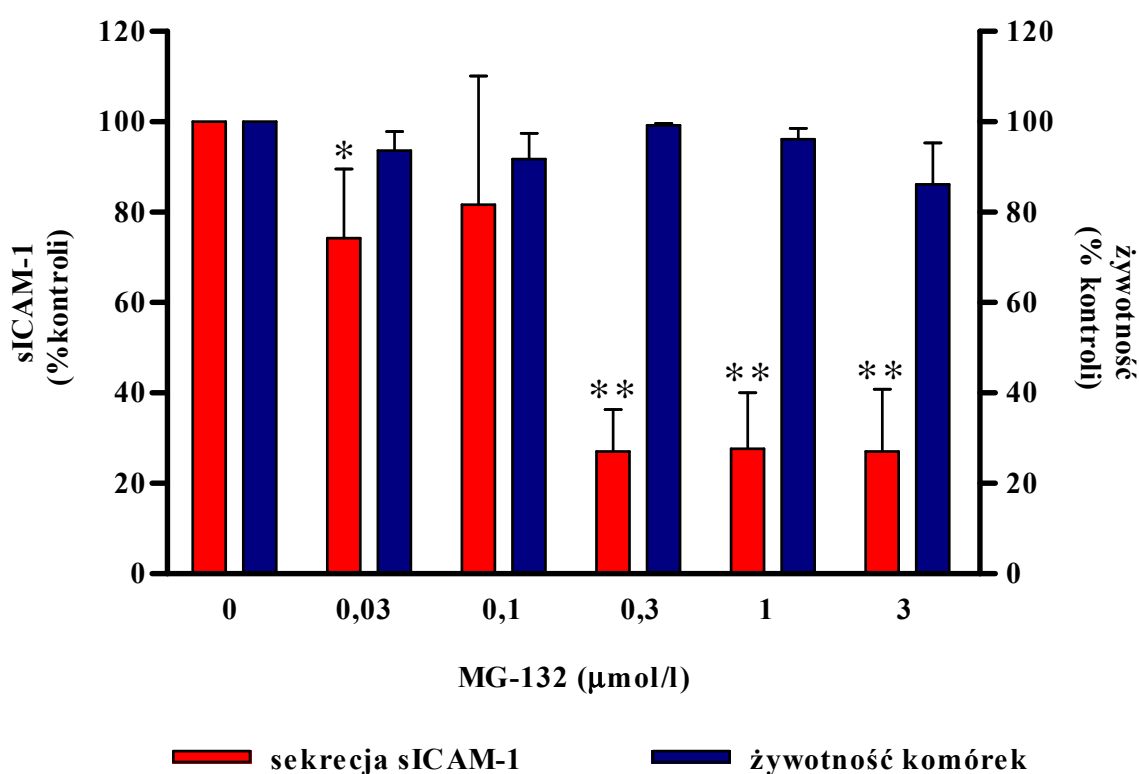
Ryc. 11.

Wpływ cykloheksymidu na kinetykę sekrecji sICAM-1 stymulowaną przez IFN-γ.

HPMC pre-inkubowano z cykloheksymidem lub medium kontrolnym przez 30 minut. Następnie media te usunięto i inkubowano HPMC przez 24 godziny z lub bez IFN-γ (1000 U/ml). Dane pochodzą z 3 eksperymentów z komórkami izolowanymi od różnych dawców. Gwiazdki oznaczają statystycznie istotną różnicę między grupami pre-inkubowanymi z lub bez cykloheksymidu (*p<0,05).

Wpływ MG-132 na uwalnianie sICAM-1 i żywotność HPMC

W komórkach pre-inkubowanych przez 30 minut z MG-132 - inhibitorem proteasomu i czynnika transkrypcyjnego NF- κ B - w dawkach $\leq 3 \mu\text{mol/l}$ nie zaobserwowano istotnego zmniejszenia żywotności w ciągu następnych 24 godzin inkubacji (ryc. 17). Stwierdzono jednak, zależny od dawki, spadek uwalniania sICAM-1 indukowanego przez IFN- γ (1000 U/ml). Najwyższa zastosowana dawka MG-132 (3 $\mu\text{mol/l}$) spowodowała zmniejszenie uwalniania sICAM-1 o blisko 65% w stosunku do grupy kontrolnej.



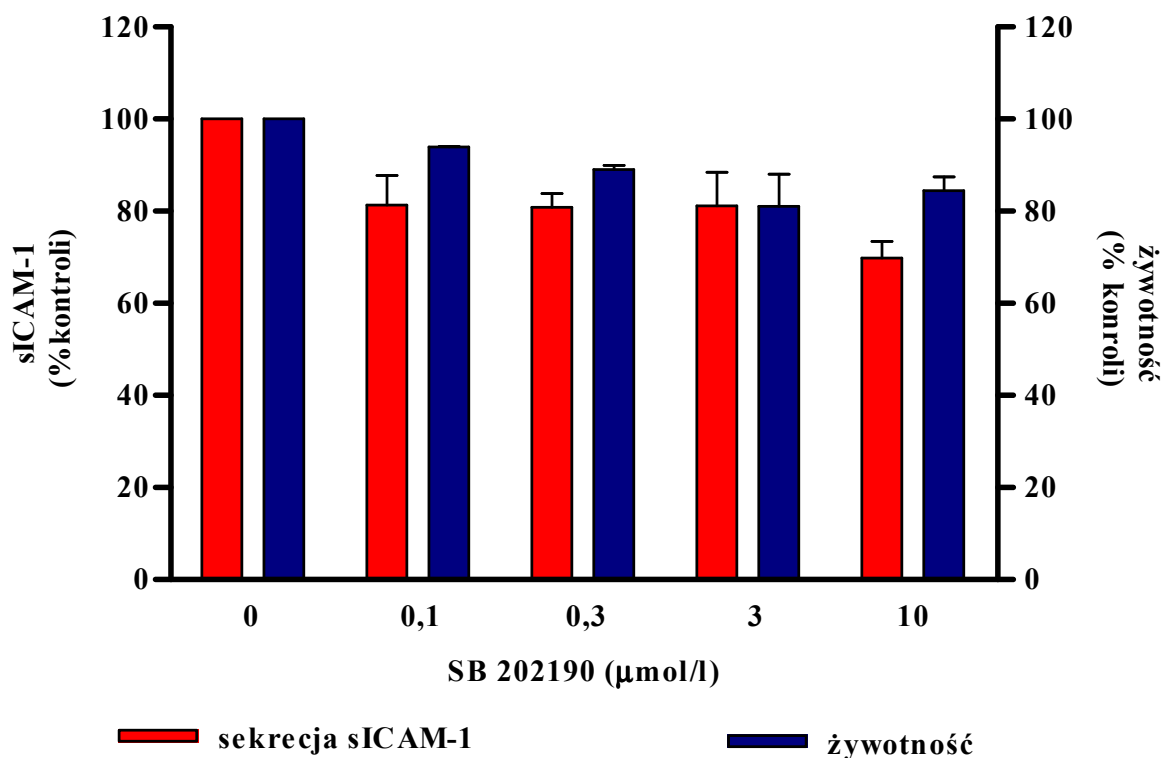
Ryc. 12.

Wpływ MG-132 na żywotność i sekrecję sICAM-1 stymulowaną przez IFN- γ .

Wielkość sekrecji sICAM-1 i żywotność komórek wyrażono jako odsetek wartości kontrolnych uzyskanych w grupie nie poddanej działaniu MG-132. Dane pochodzą z 3 eksperymentów z komórkami izolowanymi od różnych dawców. Gwiazdki oznaczają statystycznie istotną różnicę w stosunku do grupy kontrolnej (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Wpływ SB202190 na uwalnianie sICAM-1 i żywotność HPMC

Zaobserwowano, że pre-inkubacja z SB202190, inhibitorem kinazy p38, w dawkach do 10 $\mu\text{mol/l}$ nie upośledzała istotnie żywotności komórek, nie powodowała także istotnego statystycznie zmniejszenia sekrecji sICAM-1 wyindukowanej przez IFN- γ (ryc. 13).



Ryc. 13.

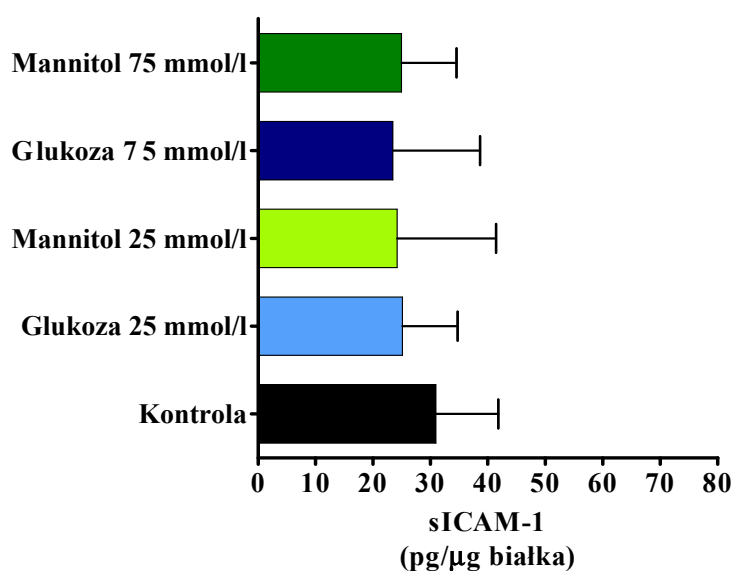
Wpływ SB202190 na żywotność i sekrecję sICAM-1 stymulowaną przez IFN- γ .

Wielkość sekrecji sICAM-1 i żywotność komórek wyrażono jako odsetek wartości kontrolnych uzyskanych w grupie nie poddanej działaniu SB202190. Dane pochodzą z 3 eksperymentów z komórkami izolowanymi od różnych dawców.

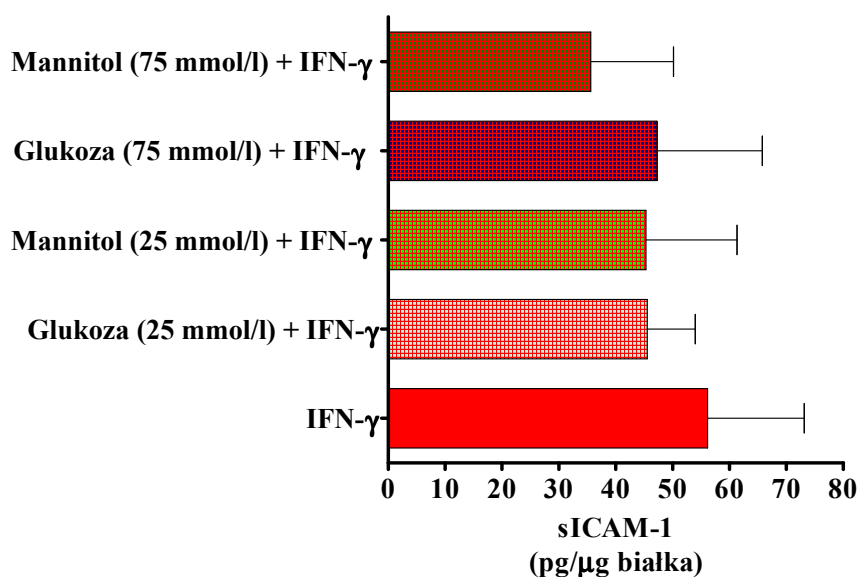
Wpływ glukozy na uwalnianie sICAM-1 przez HPMC

Inkubacja w obecności glukozy lub mannitolu w stężeniach do 75 mmol/l nie zmieniła istotnie wielkości konstytucyjnego uwalniania sICAM-1 przez HPMC (ryc. 14A). Podobnie nie stwierdzono, aby glukoza lub mannitol modyfikowały uwalnianie sICAM-1 stymulowane przez IFN- γ (ryc. 14B).

A.



B.



Ryc. 14.

Wpływ glukozy i mannitolu na uwalnianie sICAM-1 przez HPMC.

Komórki eksponowano przez 24 godziny na podwyższone stężenia glukozy lub ekwimolarne roztwory mannitolu bez (A) lub z (B) IFN- γ (1000 U/ml). Przedstawiono dane z 5 eksperymentów przeprowadzonych na komórkach pochodzących od różnych dawców.

W celu zbadania, czy wstępna pre-inkubacja z glukozą może mieć wpływ na zdolność HPMC do uwalniania sICAM-1, komórki ekspozycje na wysokie stężenie glukozy (75 mmol/l) lub medium kontrolne (zawierające glukozę w stężeniu 5 mmol/l) przez 12 godzin. Następnie usuwano supernatant i poddawano komórki właściwej (24-godzinnej) ekspozycji na działanie medium kontrolnego lub IFN- γ (1000 U/ml). Porównanie uwalniania sICAM-1 w poszczególnych grupach pokazało, że pre-inkubacja komórek w środowisku o wysokim stężeniu glukozy (75 mmol/l) nie zmieniła, w sposób istotny, uwalniania sICAM-1, zarówno konstytucyjnego, jak stymulowanego przez IFN- γ .

Tabela VII.

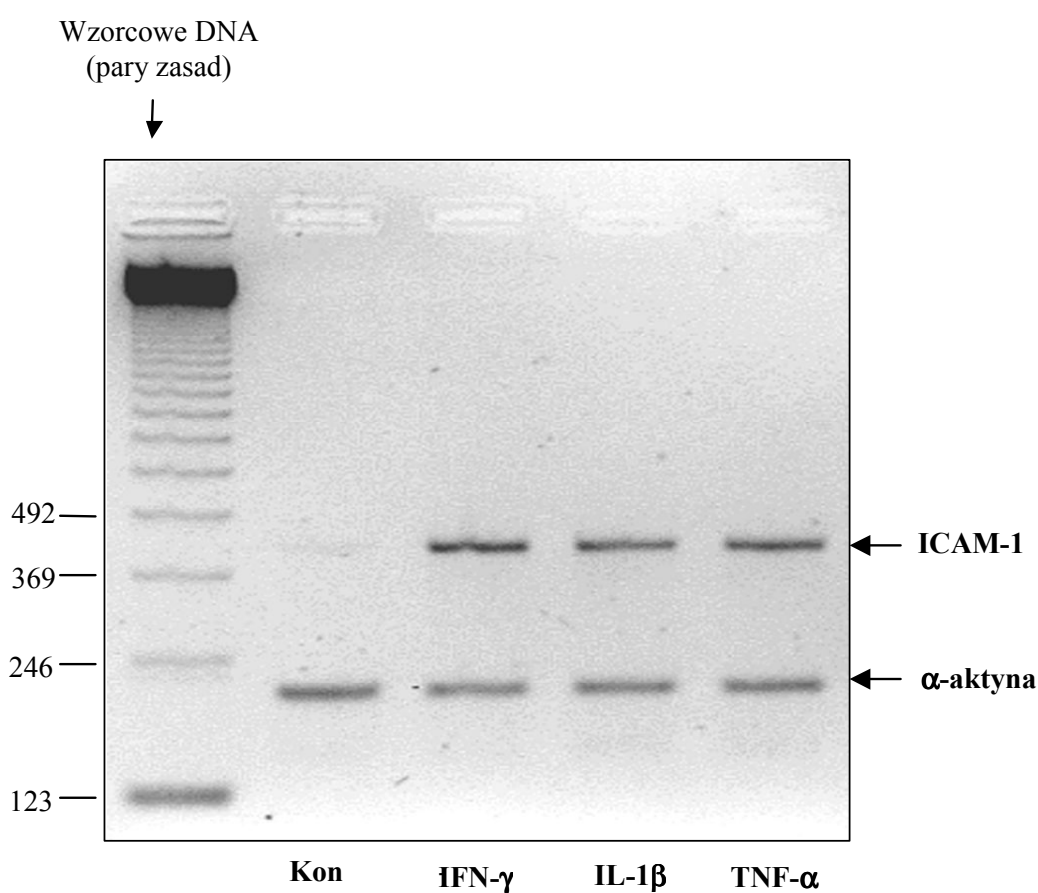
Wpływ pre-inkubacji z wysokimi stężeniami glukozy na uwalnianie sICAM-1.

Średnie uwalnianie sICAM-1 (\pm SD) przez komórki inkubowane najpierw przez 12 godzin w medium kontrolnym lub zawierającym 75 mmol/l glukozy, a następnie przez 24 godziny z lub bez IFN- γ (1000 U/ml). Dane pochodzą z 6 eksperymentów przeprowadzonych na komórkach wyizolowanych od różnych dawców.

Faza eksperymentu		sICAM-1 (pg/ μ g białka komórkowego)	
pre-inkubacja (12 godz.)	właściwa inkubacja (24 godz.)		
Medium kontrolne (5 mmol/l glukozy)	medium kontrolne	28 \pm 8	p= 0,1987 (ns)
Glukoza 75 mmol/l	medium kontrolne	24 \pm 8	
Medium kontrolne (5 mmol/l glukozy)	IFN- γ	59 \pm 37	p= 0,2066 (ns)
Glukoza 75 mmol/l	IFN- γ	48 \pm 10	

Ekspresja mRNA dla ICAM-1 w HPMC stymulowanych cytokinami

Wynikiem reakcji PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla mRNA dla ICAM-1 był pojedynczy prążek w żelu agarozowym, odpowiadający produktowi o wielkości 407 par zasad. Poziom ekspresji mRNA dla ICAM-1 oceniano po porównaniu z produktem amplifikacji mRNA dla α -aktyny o wielkości 204 par zasad. W komórkach niestymulowanych ekspresja mRNA dla ICAM-1 była ledwie wykrywalna. Natomiast w komórkach stymulowanych przez IFN- γ , IL-1 β lub TNF- α zaobserwowano wyraźny wzrost ekspresji mRNA dla ICAM-1 (ryc. 15).



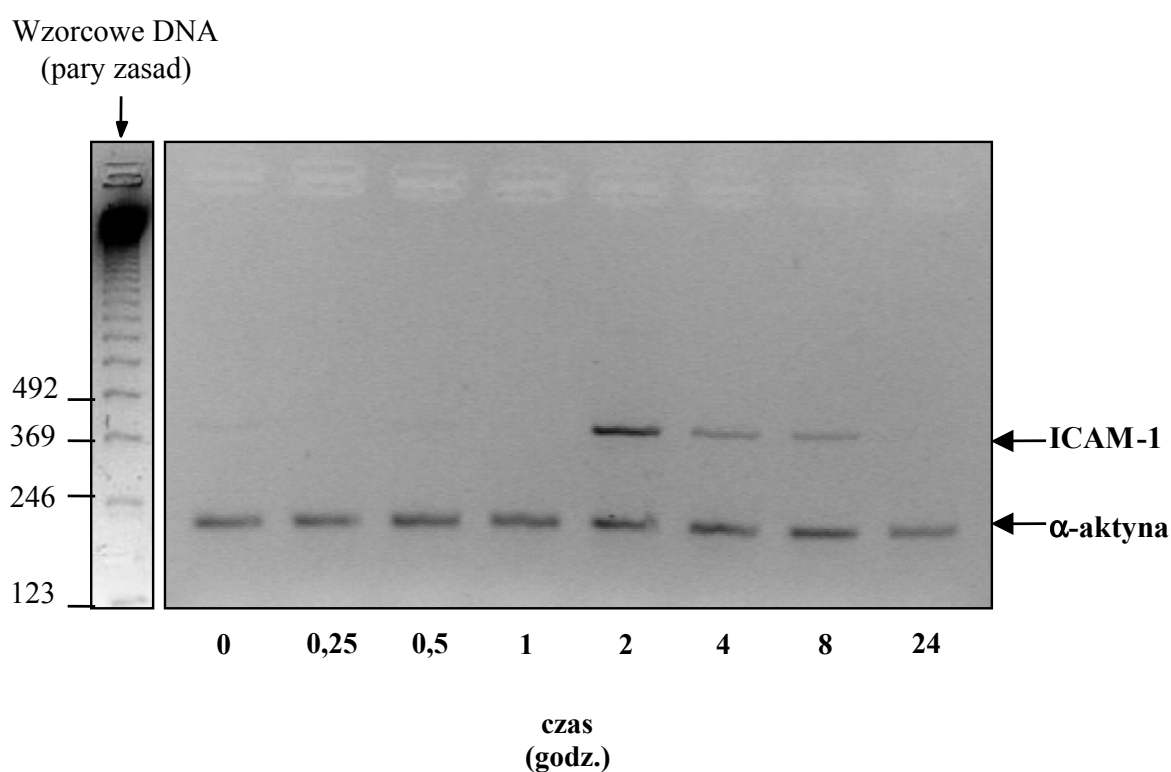
Ryc. 15.

Ekspresja mRNA dla ICAM-1 w HPMC stymulowanych cytokinami.

Komórki mezotelialne inkubowano przez 2 godziny w medium kontrolnym lub w obecności wybranych cytokin w następujących stężeniach: IFN- γ (1000 U/ml), IL-1 β (1000 pg/ml), TNF- α (1000 pg/ml). Po ekspozycji dokonano ekstrakcji RNA i oceny ekspresji mRNA dla ICAM-1 i α -aktyny za pomocą metody RT-PCR. Rycina przedstawia wyniki rozdziału elektroforetycznego uzyskanych produktów PCR

Wpływ IFN- γ na poziom mRNA dla ICAM-1 w HPMC

Analizując zmiany ekspresji mRNA dla ICAM-1 w czasie stwierdzono, że IFN- γ nasila przejściowo jego ekspresję w HPMC. Najbardziej wyraźne nasilenie ekspresji zaobserwowano 2 godziny po rozpoczęciu stymulacji, a w ciągu następnych 4-20 godzin jej stopniowe zmniejszenie (ryc. 16A).

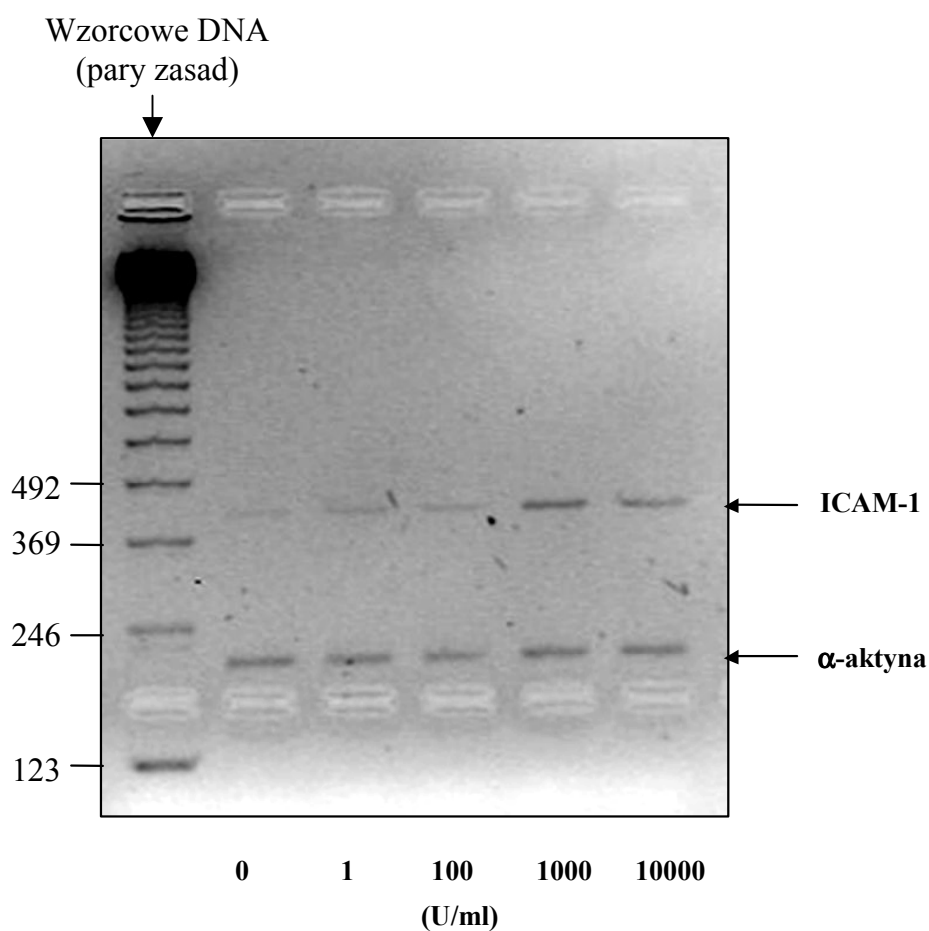


Ryc. 16A.

Wpływ IFN- γ na poziom mRNA dla ICAM-1 w HPMC w zależności od czasu ekspozycji.

Komórki mezotelialne inkubowano z IFN- γ (1000 U/ml) i w określonych odstępach czasu dokonywano ekstrakcji RNA. Oceny ekspresji mRNA dla ICAM-1 dokonano za pomocą metody RT-PCR. Rycina przedstawia reprezentatywne wyniki rozdziału elektroforetycznego uzyskane w jednym z dwóch wykonanych eksperymentów (z komórkami pochodzącymi od różnych dawców).

Oceniając ekspresję mRNA dla ICAM-1 po 2 godzinach, wykazano zależność efektu IFN- γ od jego dawki. Stosunkowo najsilniejszy wzrost ekspresji mRNA dla ICAM-1 stwierdzono po zastosowaniu dawki 1000 U/ml (ryc. 16B.)



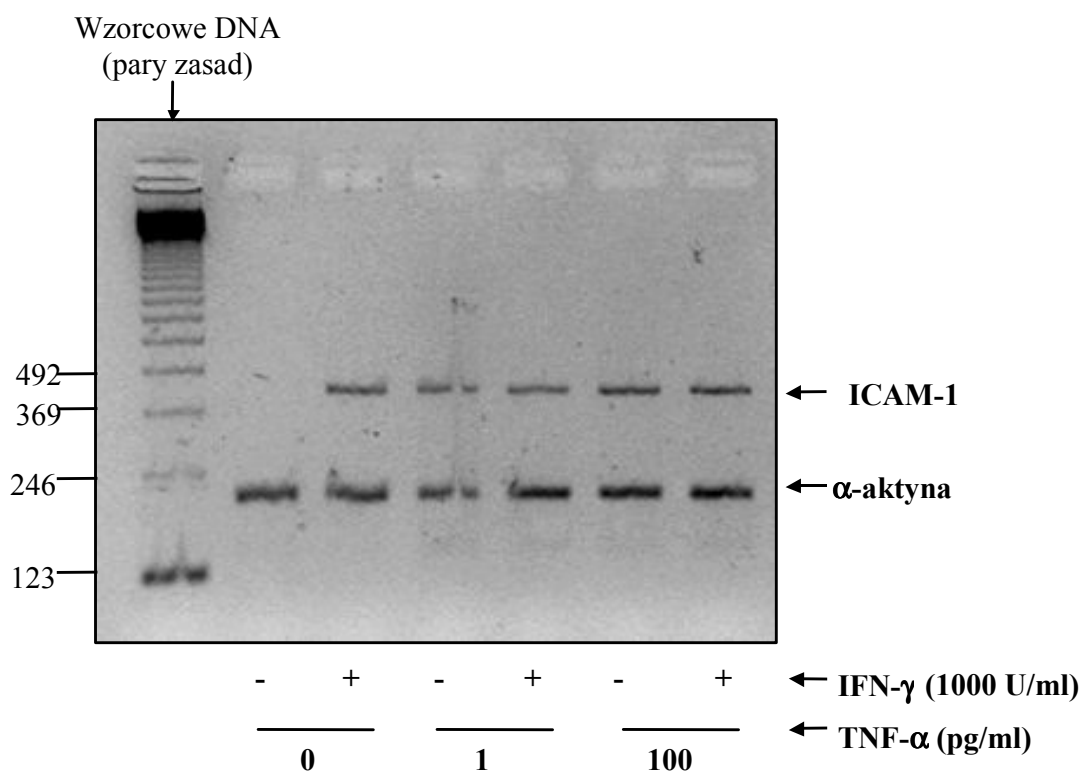
Ryc. 16B.

Wpływ IFN- γ na ekspresję mRNA dla ICAM-1 w HPMC w zależności od dawki.

Komórki mezotelialne inkubowano przez 2 godziny z IFN- γ w różnych dawkach, po czym wyizolowano RNA i poddano go analizie za pomocą metody RT-PCR. Rycina przedstawia reprezentatywne wyniki rozdziału elektroforetycznego uzyskane w jednym z dwóch wykonanych eksperymentów (z komórkami pochodzącymi od różnych dawców).

Wpływ IFN- γ oraz TNF- α na ekspresję mRNA dla ICAM-1

Podobnie jak zaobserwowano wcześniej (ryc. 15), ekspozycja HPMC na działanie IFN- γ zwiększała ekspresję mRNA dla ICAM-1 (ryc. 17). Nie stwierdzono natomiast, aby ekspresja mRNA dla ICAM-1 po stymulacji IFN- γ (1000 U/ml) zmieniała się znacząco po jego połączeniu z TNF- α w dawce 1 lub 100 pg/ml.



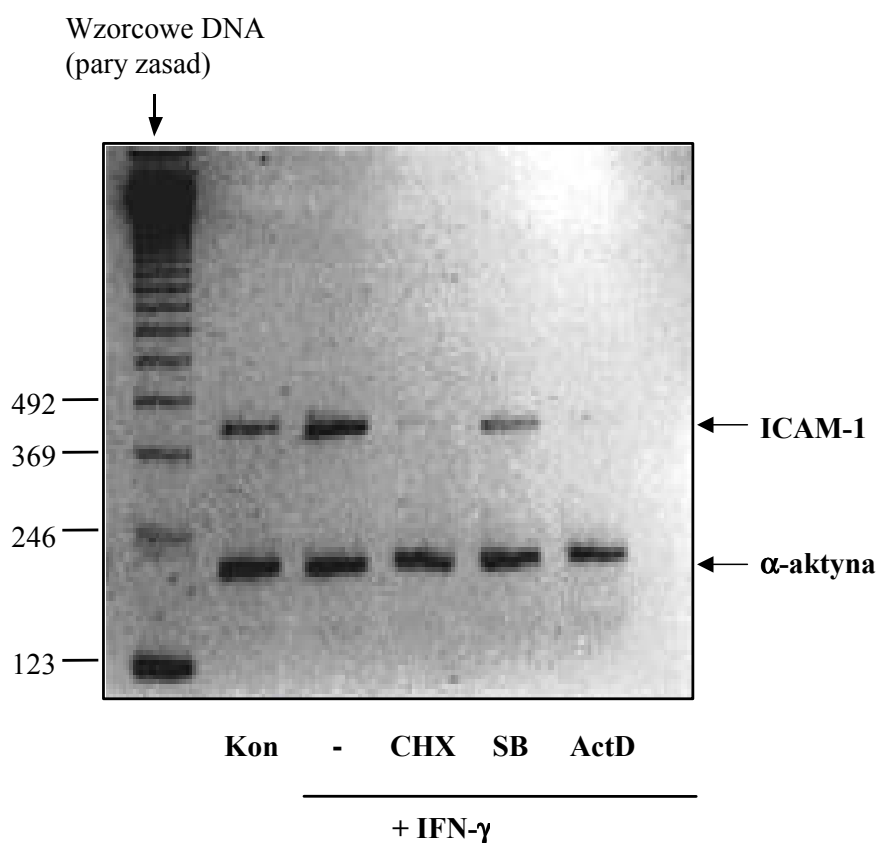
Ryc. 17.

Wpływ TNF- α na ekspresję ICAM-1 indukowaną przez IFN- γ .

HPMC eksponowano przez 2 godz. na IFN- γ i TNF- α w stężeniach jak zaznaczono. Analizy ekspresji mRNA dla ICAM-1 dokonano za pomocą RT-PCR. Rycina przedstawia wyniki rozdziału elektroforetycznego produktów PCR.

Wpływ aktynomycyny D, cykloheksymidu i SB202190 na ekspresję mRNA dla ICAM-1

W celu określenia, czy testowane inhibitory wpływały również na ekspresję mRNA dla ICAM-1, zastosowano 30-minutową pre-inkubację z odpowiednim inhibitorem, następnie stymulowano komórki IFN- γ (1000 U/ml) przez 2 godziny, po czym oznaczono ekspresję mRNA dla ICAM-1 za pomocą RT-PCR. Zaobserwowano, że wszystkie użyte przeze mnie inhibitory zmniejszyły ekspresję mRNA dla ICAM-1 (ryc. 18).



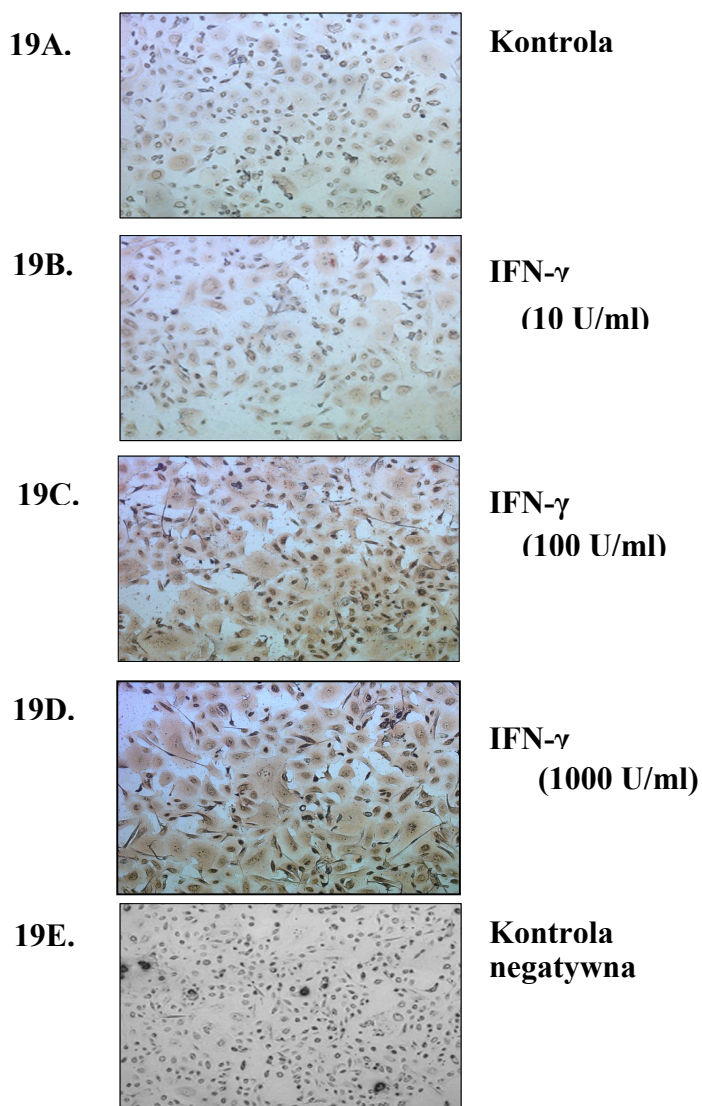
Ryc. 18.

Wpływ inhibitorów na ekspresję mRNA dla ICAM-1 stymulowaną przez IFN- γ .

Eksperyment polegał na zastosowaniu 30-minutowej pre-inkubacji z odpowiednim inhibitorem (cykloheksymid w dawce 10 μ g/ml, SB 202190 - 10 μ g/ml, aktynomycyna D - 1 μ g/ml), następnie stymulowano komórki IFN- γ (1000 U/ml) przez 2 godziny, po czym oznaczono ekspresję mRNA dla ICAM-1 za pomocą RT-PCR. Rycina przedstawia reprezentatywne wyniki rozdziału elektroforetycznego uzyskane w jednym z dwóch wykonanych eksperymentów (z komórkami pochodzącymi od różnych dawców).

Wpływ IFN- γ na ekspresję ICAM-1 w HPMC ocenianą metodą immunocytochemiczną

Badanie immunocytochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał anti-ICAM-1 ujawniło znaczące wybarwienie się ICAM-1 w niestymulowanych komórkach kontrolnych (ryc. 19A). Intensywność uzyskanego zabarwienia była jeszcze większa w komórkach eksponowanych przez 12 godzin na działanie IFN- γ w stężeniach 10-1000 U/ml (ryc. 19B-D). Nie wykazano natomiast reakcji barwnej, jeśli w procedurze barwienia pominięto przeciwciała anti-ICAM-1 („kontrola negatywna”, ryc. 19E).



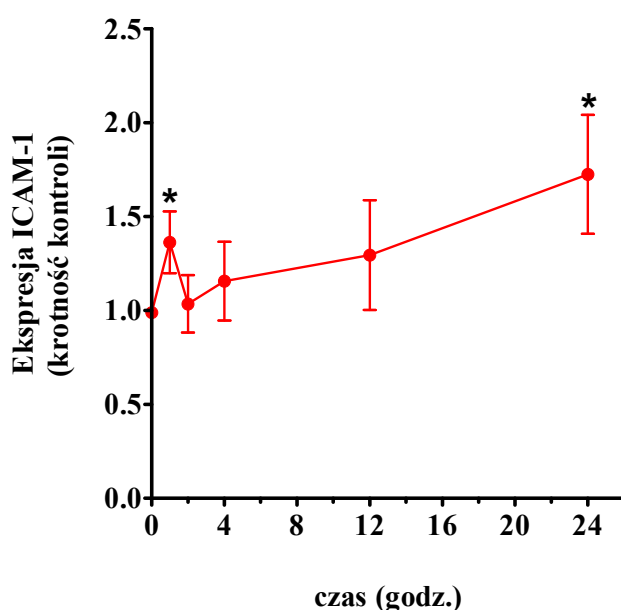
Ryc. 19.

Wpływ IFN- γ na ekspresję ICAM-1 ocenianą metodą immunocytochemiczną.

HPMC były eksponowane przez 12 godzin na działanie IFN- γ w dawkach jak zaznaczono, a następnie barwione z wykorzystaniem przeciwciała anti-ICAM-1 (A-D). W przypadku „kontroli negatywnej” w procedurze barwienia pominięto przeciwciała anti-ICAM-1 (E). Powiększenie 100 x.

Wpływ IFN- γ na ekspresję ICAM-1 w HPMC ocenianą metodą immunoenzymatyczną in situ

Oceniając zmiany ekspresji ICAM-1 w czasie za pomocą testu immunoenzymatycznego in situ stwierdzono, że ekspozycja HPMC na działanie IFN- γ (1000 U/ml) wywołuje dwufazowy wzrost ekspresji ICAM-1. Zaobserwowano, że ekspresja ICAM-1 wzrasta szybko w ciągu pierwszej godziny ekspozycji, w ciągu następnej godziny powraca do poziomu wyjściowego, po czym ponownie powolnie narasta osiągając kulminację po 24 godzinach (ryc. 20).



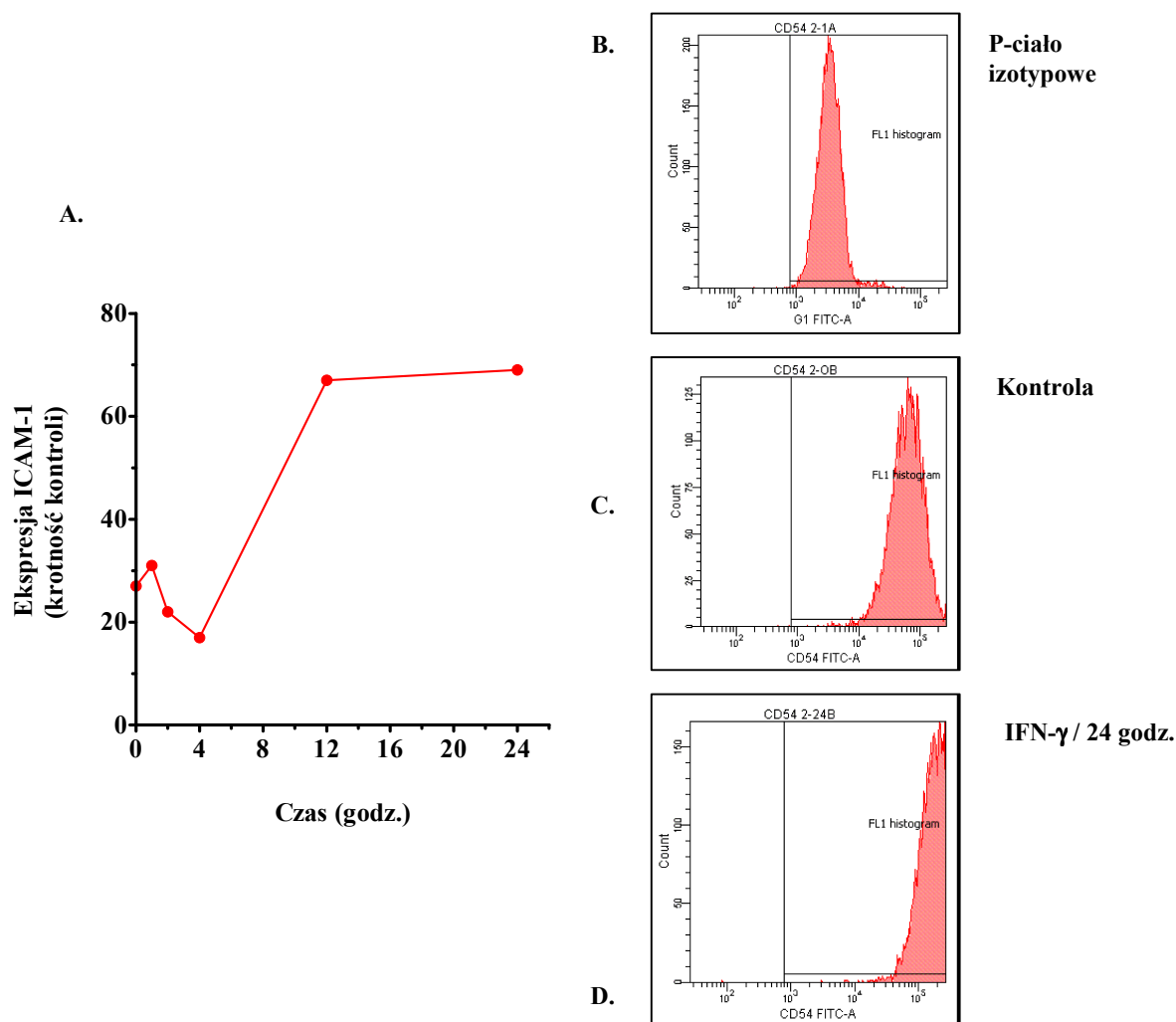
Ryc. 20.

Wpływ czasu ekspozycji na IFN- γ na ekspresję ICAM-1 w HPMC mierzoną za pomocą testu immunoenzymatycznego in situ.

HPMC były inkubowane w medium kontrolnym lub w obecności IFN- γ (1000 U/ml). Wyniki testu wyrażono jako stosunek (krotność) wartości gęstości optycznej dla komórek ekspozowanych na IFN- γ (1000 U/ml) i komórek kontrolnych. Dane pochodzą z 3 niezależnych eksperymentów z komórkami izolowanymi od różnych dawców. * oznacza statystycznie istotną różnicę w stosunku do kontroli w tym samym punkcie czasowym (* $p < 0,05$).

Wpływ IFN- γ na ekspresję ICAM-1 w HPMC ocenianą za pomocą cytometrii przepływowej

Badania z wykorzystaniem cytometrii przepływowej wykazały podobne zmiany kinetyki ekspresji ICAM-1 na powierzchni HPMC. Po niewielkim wzroście ekspresji w pierwszej godzinie ekspozycji, w ciągu kolejnych 3 godzin zaobserwowano jej obniżenie, a następnie ponowny i znaczny jej wzrost w ciągu 12-24 godzin (ryc. 21).

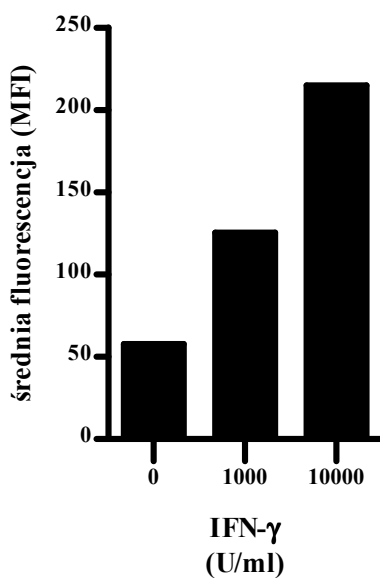


Ryc. 21.

Wpływ czasu ekspozycji na IFN- γ na ekspresję ICAM-1 w HPMC mierzona za pomocą cytometrii przepływowej.

Wyniki wyrażono jako krotność średniej intensywności fluorescencji (MFI) w komórkach inkubowanych z przeciwciałem anti-ICAM-1 w stosunku do komórek inkubowanych z kontrolnym przeciwciałem izotypowym (A). Przykładowe histogramy pokazują wartości uzyskane po inkubacji niestymulowanych komórek kontrolnych z przeciwciałem izotypowym (B) i przeciwciałem anti-ICAM-1 (C). Histogram D pokazuje wartości uzyskane w komórkach inkubowanych z IFN- γ (w dawce 1000 U/ml) przez 24 godziny i analizowanych za pomocą przeciwciał anti-ICAM-1.

Badając ekspresję ICAM-1 po 24-godzinnej inkubacji z IFN- γ , stwierdzono również, że stymulujący efekt IFN- γ był zależny od jego dawki (ryc. 22). Największe testowane stężenie IFN- γ (10000 U/ml) wywołało blisko 3-krotny wzrost ekspresji ICAM-1 w stosunku do grupy kontrolnej.



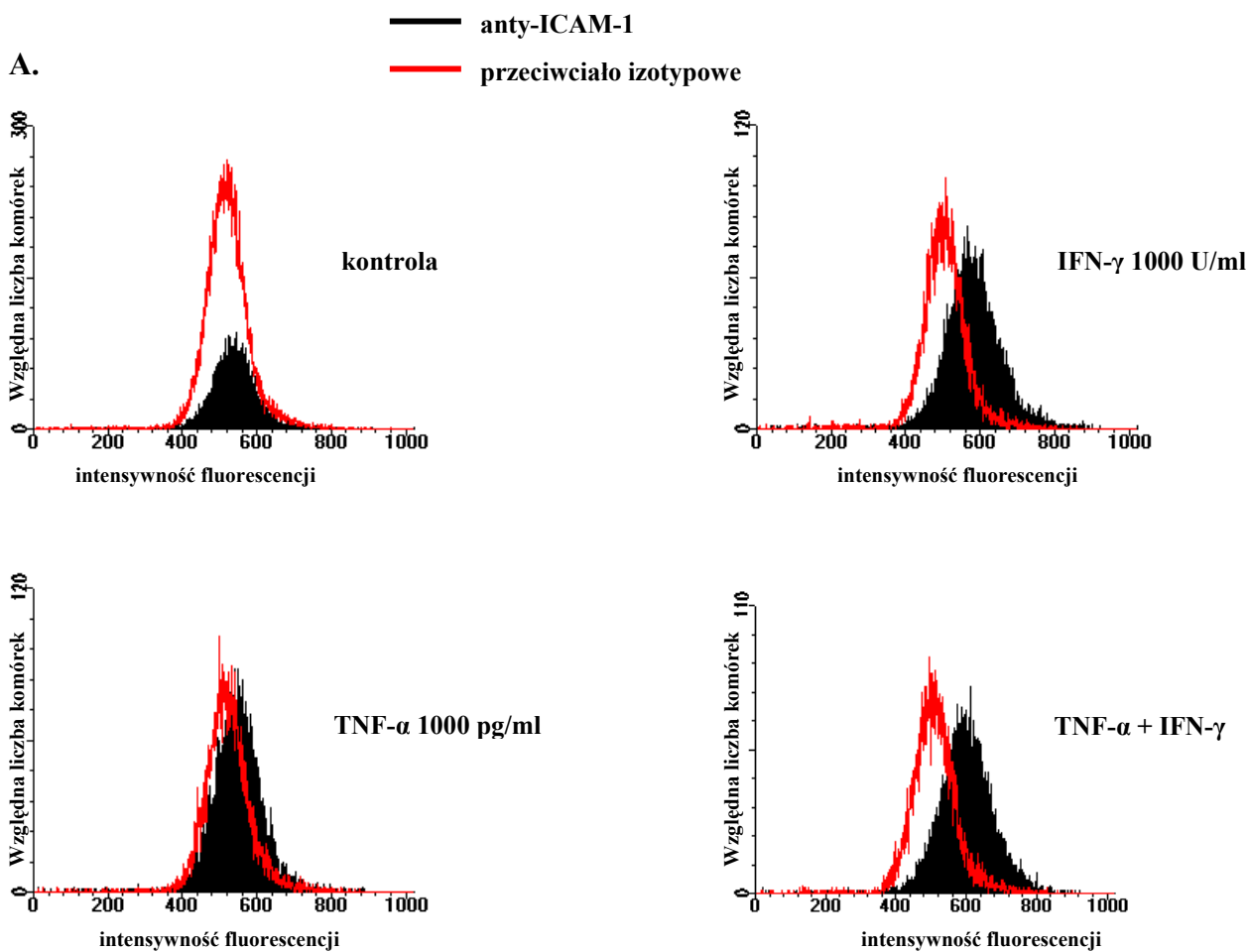
Ryc. 22.

Wpływ dawki IFN- γ na poziom ekspresji powierzchniowej ICAM-1 mierzony za pomocą cytometrii przepływowej.

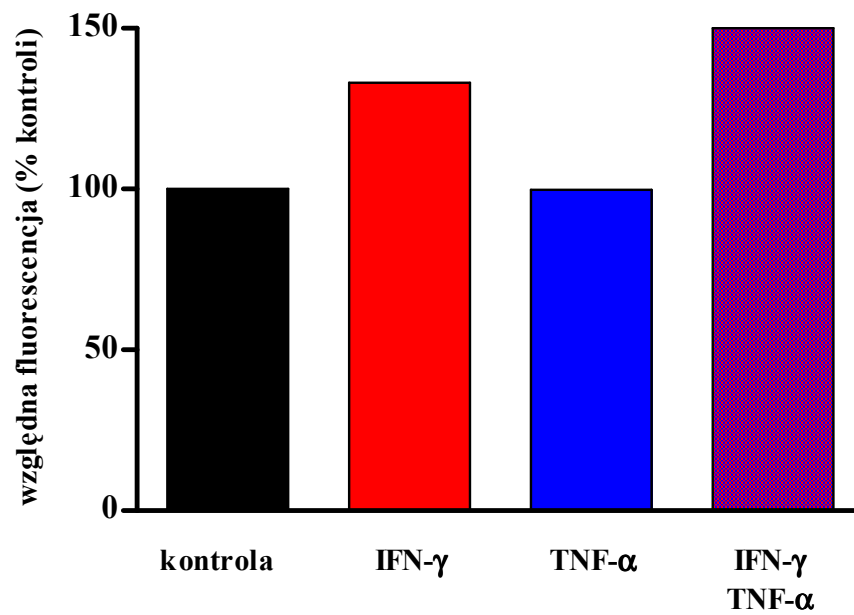
Komórki inkubowano z różnymi dawkami IFN- γ przez 12 godzin, a następnie analizowano za pomocą cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciała anty-ICAM-1.

Wpływ IFN- γ i TNF- α na ekspresję ICAM-1 w HPMC mierzoną za pomocą cytometrii przepływowej

Zastosowanie cytometrii przepływowej również pozwoliło stwierdzić, że TNF- α (1000 pg/ml) wywierał jedynie niewielki efekt na ekspresję ICAM-1 na HPMC. TNF- α nie zwiększał również istotnie ekspresji ICAM-1 stymulowanej przez IFN- γ .



B.



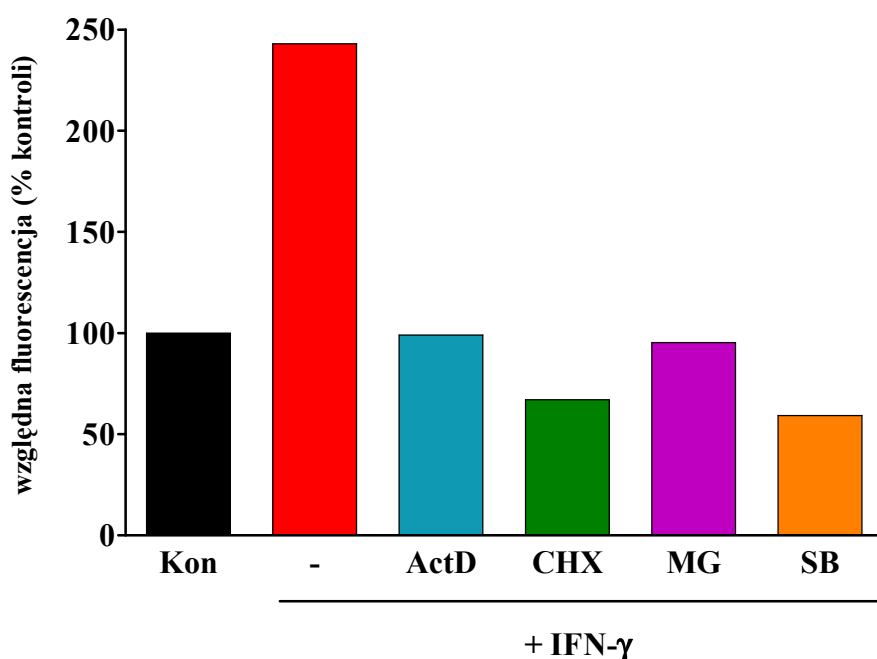
Ryc. 23.

Ekspresja powierzchniowa ICAM-1 w HPMC eksponowanych na IFN- γ i TNF- α analizowana za pomocą cytometrii przepływowej.

A: Histogramy obrazujące średnią fluorescencję (MFI) w komórkach kontrolnych i stymulowanych przez IFN- γ \pm TNF- α . B: Zmierzona fluorescencja została wyrażona jako odsetek wartości zarejestrowanych w niestymulowanych komórkach kontrolnych.

Wpływ inhibitorów na ekspresję ICAM-1 w HPMC ocenianą za pomocą cytometrii przepływowej

W celu określania, czy testowane inhibitory wpływały również na powierzchniową ekspresję ICAM-1, komórki poddawano 30-minutowej pre-inkubacji z odpowiednim inhibitorem, następnie stymulowano je przez 12 godzin IFN- γ (1000 U/ml), po czym oceniano powierzchniową ekspresję ICAM-1 przy użyciu cytometrii przepływowej. Stwierdzono, że wszystkie badane inhibitory, tj. aktynomycyna D (1 μ g/ml), cykloheksymid (10 μ g/ml), MG-132 (3 μ mol/ml) oraz SB 202190 (10 μ g/ml) niwelują stymulujący wpływ IFN- γ na powierzchniową ekspresję ICAM-1 (ryc.24).



Ryc. 24.

Wpływ inhibitorów na ekspresję powierzchniową ICAM-1 stymulowaną przez IFN- γ .

Wykres zestawia wyniki pomiarów ekspresji powierzchniowej ICAM-1 dokonane za pomocą cytometru przepływowego. Grupę kontrolną stanowiły komórki nie poddane pre-inkubacji z inhibitorami i niestymulowane przez IFN- γ .

DYSKUSJA

Badania reakcji zapalnej w jamie otrzewnej wykazały, że kluczową rolę w tym procesie odgrywają komórki mezotelialne [4;59;133;134]. Polega ona m.in. na uwalnianiu szeregu chemokin i ekspresji cząsteczek adhezyjnych. Spośród tych ostatnich, ICAM-1 została zidentyfikowana na powierzchni HPMC [22;91;92], a w jamie otrzewnej znaleziono jej rozpuszczalną formę, sICAM-1 [135]. Ponieważ znane były już doniesienia na temat roli śródbłonkowej ICAM-1 w adhezji i migracji leukocytów, powstało pytanie o regulację ekspresji, uwalniania i funkcję ICAM-1 i sICAM-1 pochodzenia mezotelialnego. Moje wstępne badania potwierdziły wcześniejsze doniesienia Jonjica i wsp. [91] oraz Liberka i wsp. [92], że HPMC wykazują konstytutywną ekspresję powierzchniową ICAM-1. Stwierdziłam także, że towarzyszy temu konstytutywne uwalnianie sICAM-1, którego stopień wykazuje zmienność zależną od dawcy komórek.

Ponieważ wcześniejsze prace wskazywały, że cytokiny IL-1 β , TNF- α i IFN- γ mają wpływ na ekspresję ICAM-1 przez HPMC [91;92], postanowiłam sprawdzić, jak cytokiny te wpływają na uwalnianie sICAM-1 przez HPMC. Wstępne badania wskazywały, że uwalnianie sICAM-1 przez HPMC jest największe po zastosowaniu IFN- γ , a w mniejszym stopniu także IL-1 β . Natomiast TNF- α nie wywierał znaczącego efektu. Eksperymenty z użyciem przeciwciał neutralizujących IFN- γ potwierdziły, że działanie IFN- γ stymulujące uwalnianie sICAM-1 jest specyficzne. Z kolei brak istotnego efektu TNF- α nie wynikał ze słabej aktywności biologicznej użytego preparatu, ponieważ kontrolne pomiary wykazały, że wywoływał on znaczącą stymulację uwalniania innych cytokin (np. IL-6 i MCP-1) przez HPMC (wyniki nieujęte w rozprawie). Wydaje się zatem, że znikomy wpływ TNF- α na uwalnianie sICAM-1 wynika ze specyfiki komórek. Leung i wsp. porównali uwalnianie sICAM-1 przez różne typy komórek stymulowane cytokinami [136]. Stwierdzili oni, że TNF- α silnie stymuluje uwalnianie sICAM-1 przez ludzkie komórki mięśni gładkich aorty, komórki śródbłonka z naczyń skórnych i płucne fibroblasty, słabo wpływa na komórki nabłonka oskrzelowego i nie wywiera znaczącego efektu na keratynocyty. Należy przy tym podkreślić, że autorzy testowali dawki TNF- α w zakresie nawet do 1 μ g/ml, a więc stukrotnie przekraczające najwyższe dawki zastosowane przeze mnie. Ciekawe jest również to, że w przypadku komórek mięśni gładkich aorty i komórek śródbłonka z naczyń skórnych, zarejestrowany efekt TNF- α był większy niż IFN- γ w podobnych dawkach. W kontekście zaobserwowanego u myszy wzrostu stężenia sICAM-1 w osoczu po systemowym podaniu TNF- α [137], można przypuszczać, że na efekt ten składa się różnego stopnia uwalnianie sICAM-1 przez różne typy komórek.

IFN- γ stymulował uwalnianie sICAM-1 przez HPMC w sposób zależny od czasu ekspozycji i użytej dawki. Stwierdzono, że największy wzrost uwalniania sICAM-1 ma miejsce w czasie pierwszych 24 godzin ekspozycji, zaś efektywną stymulację wywierają dawki ≥ 100 U/ml. Dlatego, w dalszych eksperymentach stosowano rutynowo stężenie 1000 U/ml i 24-godzinny okres ekspozycji. W tych warunkach obserwowano konsekwentnie wyraźny wzrost sekrecji sICAM-1, choć – podobnie, jak w przypadku uwalniania konstytutywnego – miał on różną wartość bezwzględną dla komórek pochodzących od różnych dawców.

Prace na innych typach komórek wskazywały na synergiczne działanie IFN- γ i TNF- α , zwiększające ekspresję ICAM-1 i uwalnianie sICAM-1 [84;85;90;136;138]. Moje eksperymenty pokazały, że również w przypadku HPMC, TNF- α synergicznie potęguje wpływ IFN- γ na uwalnianie sICAM-1. Co ciekawe, efekt ten był widoczny także przy takich stężeniach IFN- γ , które samodzielnie nie stymulowały uwalniania sICAM-1. Podobnie, dodatek IFN- γ powodował wzrost uwalniania sICAM-1 pod wpływem niskich dawek TNF- α , które nie wywierały efektu samodzielnie.

Nasilenie synergicznego działania kombinacji IFN- γ i TNF- α na uwalnianie sICAM-1 zależy od typu komórek. Opisywano taki efekt w komórkach mięśni gładkich naczyń, fibroblastach płucnych, keratynocytach, ale nie w komórkach śródbłonna naczyń [136]. Analizując powierzchniową ekspresję ICAM-1 w HPMC stymulowanych przez TNF- α i IFN- γ , Jonjic i wsp. stwierdzili efekt ilościowo addytywny, ale zauważyli, że wzrost ekspresji ICAM-1 w wyniku działania kombinacji IFN- γ i TNF- α jest szybszy niż w przypadku każdej z cytokin osobno [91]. Synergiczne działanie IFN- γ i TNF- α na HPMC nie ogranicza się do sICAM-1. Podobny efekt stwierdzono w przypadku IL-6 [72], MCP-1 i RANTES [59;91]. Należy jednak zaznaczyć, że interakcja IFN- γ i TNF- α może wywoływać w HPMC również efekty hamujące, np. w przypadku wydzielania IL-8 [59]. Wzajemne oddziaływanie wynika prawdopodobnie z krzyżowania się ścieżek sygnałowych z receptora dla IFN- γ i receptora TNF- α [139-141] oraz z faktu, że większość genów modulowanych przez IFN- γ i TNF- α posiada w strukturze swych promotorów miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych aktywowanych zarówno przez IFN- γ , jak i TNF- α [142].

W kolejnych eksperymentach stwierdziłam, że efekt IFN- γ , stymulujący wzrost ekspresji ICAM-1 w HPMC widoczny jest także w badaniu immunocytochemicznym, a ponadto zaobserwowałam wzrost powierzchniowej ekspresji ICAM-1 w badaniu z użyciem cytometrii przepływowej i testu immunoenzymatycznego in situ. W tych

ostatnich badaniach znamienny był dwufazowy efekt IFN- γ , obejmujący pierwszy, szybki wzrost ekspresji ICAM-1 po 1 godzinie stymulacji i drugi, widoczny po 12-14 godzinach. Taki charakter zmian może sugerować, że w pierwszej godzinie stymulacji dochodzi do wbudowania w błonę komórkową cząsteczek ICAM-1 obecnych wcześniej w komórce, natomiast dalszy wzrost ekspresji wymaga syntezy cząsteczek *de novo*.

Immunocytochemicznej detekcji ekspresji ICAM-1 w HPMC dokonywano już wcześniej. Andreoli i wsp. zobrazowali tą metodą obecność ICAM-1 w HPMC hodowanych *in vitro* [115], natomiast Suassuna i wsp. [143] oraz Yanez-Mo i wsp. [144] wykazali mezotelialną ekspresję ICAM-1 w preparatach biopsyjnych otrzewnej uzyskanych od chorych dializowanych otrzewnowo. Wyniki barwienia immunocytochemicznego uzyskane przeze mnie potwierdzają nie tylko obecność ICAM-1 w niestymulowanych komórkach mezotelium, ale pokazują także nasilenie ekspresji ICAM-1 pod wpływem IFN- γ .

W dalszych eksperymentach próbowałam określić mechanizm, poprzez który IFN- γ stymuluje uwalnianie sICAM-1. W celu zdefiniowania, czy efekt cytokin wiąże się ze zmianą ekspresji genu dla ICAM-1, zbadałam poziom mRNA dla ICAM-1 za pomocą metody RT-PCR. Stwierdziłam, że IFN- γ wywołuje przejściowy wzrost ekspresji mRNA dla ICAM-1, z maksimum obserwowanym 2 godziny po rozpoczęciu stymulacji. Dalsza analiza dokonana w tym punkcie czasowym pozwoliła mi stwierdzić, że efekt IFN- γ był zależny od jego dawki. Zauważyłam także, iż IL-1 β i TNF- α również wywoływały wzrost ekspresji mRNA dla ICAM-1. Potwierdza to wcześniejsze obserwacje Liberka i wsp. [92]. Opisana przez tych autorów kinetyka zmian ekspresji mRNA dla ICAM-1, z maksymalnymi poziomami zarejestrowanymi 1-6 godzin po rozpoczęciu stymulacji przez IL-1 β lub TNF- α , miała charakter podobny do tego, obserwowanego przeze mnie w przypadku IFN- γ .

Ponieważ badając uwalnianie sICAM-1 przez HPMC, odnotowałam synergiczny efekt IFN- γ i TNF- α , zbadałam również zmiany poziomu mRNA dla ICAM-1 pod wpływem obu cytokin. Nie stwierdziłam, aby dodatek TNF- α do IFN- γ znacznie zwiększał ekspresję mRNA dla ICAM-1. Może to oznaczać, że zmiany w ekspresji ICAM-1 mają charakter potranskrypcyjny i obejmują np. zmiany stabilności wyindukowanego mRNA. Z drugiej strony, brak wyraźnych zmian może być rezultatem niedoskonałej techniki, ponieważ klasyczna metoda RT-PCR umożliwia jedynie przybliżoną ocenę ilości badanego transkryptu i niewielkie różnice w ekspresji mogą pozostać nie wykryte, mimo

że mają znaczenie biologiczne. Dlatego też, moje obserwacje wymagałyby weryfikacji w tym zakresie przy pomocy ilościowej techniki real-time PCR (qPCR).

W celu stwierdzenia, czy wzrost poziomu mRNA dla ICAM-1 wiąże się ze wzrostem uwalniania sICAM-1 pod wpływem IFN- γ , wykonałam eksperymenty z użyciem inhibitora transkrypcji aktynowycyny D. Zaobserwowałam, że - przewidywalnie - aktynowycyna D zniwelowała stymulujący efekt IFN- γ na ekspresję mRNA dla ICAM-1 oraz zmniejszyła powierzchniową ekspresję ICAM-1. Jednak to samo stężenie aktynowycyny D nie powodowało istotnego i powtarzalnego obniżenia sekrecji sICAM-1, natomiast prowadziło do nieznacznego upośledzenia żywotności HPMC w czasie dłuższej inkubacji. Dane te wskazują, że uwalnianie sICAM-1 przez HPMC stymulowane IFN- γ nie jest zależne od zmian w ekspresji mRNA dla ICAM-1. Postulowano, że w niektórych typach komórek produkcja sICAM-1 może wynikać z alternatywnego łączenia RNA, prowadzącego do powstania osobnych transkryptów dla błonowej i rozpuszczalnej formy ICAM-1 [128;145;146]. Przeprowadzając reakcję PCR z użyciem starterów wg Shi i wsp. [128], nie wykryłam mRNA specyficznego dla sICAM-1 w HPMC - ani w warunkach spoczynkowych, ani po inkubacji z IFN- γ . Wynik ten, aczkolwiek prawdopodobny, wymaga technicznej weryfikacji, ponieważ w swym eksperymencie nie dysponowałam „kontrolą pozytywną”, tzn. RNA z komórek wykazujących ekspresję osobnych mRNA dla formy błonowej i rozpuszczalnej ICAM-1. W podobnych badaniach Budnik i wsp. wykazali, że w keratynocytach obecna jest tylko jedna forma mRNA dla ICAM-1 i jej poziom narasta po ekspozycji na IFN- γ [147]. Autorzy ci nie stwierdzili natomiast obecności osobnego mRNA dla sICAM-1, ani jego indukcji pod wpływem IFN- γ .

Kolejne eksperymenty przeprowadziłam z użyciem cykloheksymidu - inhibitora translacji białek. Stwierdziłam, że w HPMC inkubowanych z IFN- γ cykloheksymid redukuje zarówno uwalnianie sICAM-1, jak i zmniejsza powierzchniową ekspresję ICAM-1 i ekspresję mRNA dla ICAM-1. Zmniejszenie ekspresji mRNA dla ICAM-1 pod wpływem cykloheksymidu jest ciekawą obserwacją. Można przypuszczać, że cykloheksymid blokuje translację białek, umożliwiających efektywną transkrypcję mRNA dla ICAM-1 lub utrzymujących jego stabilność. Z kolei zmniejszenie uwalniania sICAM-1 może wynikać z zahamowania translacji białek, odcinających fragmenty zewnątrzkomórkowe błonowej ICAM-1. Podobne efekty opisały Whiteman i Spitieri w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego, stymulowanych przez IFN- γ [146]. Natomiast w mysich fibroblastach stwierdziły one, że cykloheksymid zwiększa pulę i stabilność mRNA dla ICAM-1. Co ciekawe, w badaniach *in vivo* u myszy stwierdzono, że

indukowany przez TNF- α wzrost stężenia sICAM-1 w osoczu można istotnie zmniejszyć poprzez dootrzewnowe podanie cykloheksymidu [137].

Badając wpływ innych inhibitorów, użyłam też związku MG-132, który jest inhibitorem proteasomowej degradacji białek i ma zdolność blokowania aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Wiadomo, że w obrębie promotora genu dla ICAM-1 istnieje miejsce wiązania NF- κ B [62;84;85;90;138]. Okazało się, że MG-132 blokuje powierzchniową ekspresję ICAM-1 i uwalnianie sICAM-1 przez HPMC stymulowane przez IFN- γ . Choć IFN- γ działa przede wszystkim poprzez czynnik transkrypcyjny STAT1, jednak może aktywować również NF- κ B [148]. Wykazano również, że IFN- γ może potęgować degradację I κ B α i w ten sposób zwiększać aktywność NF- κ B [142]. Stwierdzono, że w komórkach śródbłonna inhibitory proteasomu i aktywności NF- κ B hamują indukcję ICAM-1 przez TNF- α [149]. Z drugiej strony, wiadomo, że aktywność czynników STAT może być wygaszana przez białka klasy SOCS, które działają między innymi poprzez stymulowanie proteasomowej degradacji białek szlaku STAT [49]. Zatem w obecności MG-132 stymulacja czynnika STAT (i potencjalnie ICAM-1) przez IFN- γ powinna być zwiększona. Przypuszcza się jednak, że same białka SOCS są niszczone przez proteasom, a w takim wypadku jego zablokowanie przez MG-132 ograniczałoby działanie IFN- γ .

Ostatnim inhibitorem, który testowałam w swych eksperymentach był silny i selektywny inhibitor kinazy p38, SB 202190. Kinaza p38 fosforyluje m.in. czynnik GAF (czyli homodimer STAT1), co ma wzmacniać jego łączenie z motywem GAS w obrębie promotora genu dla ICAM-1 [49]. Stwierdziłam, że SB 202190 nie spowodował zmian w uwalnianiu sICAM-1 przez HPMC inkubowane z IFN- γ , ale zredukował ekspresję mRNA dla ICAM-1 i ekspresję powierzchniową ICAM-1 w tych komórkach. Wyniki te sugerują, że kinaza p38 jest zaangażowana w regulację ekspresji ICAM-1, ale nie sekrecji sICAM-1. Jednak Tsakadze i wsp. wykazali, że w śródbłonku naczyniowym inhibitory p38 hamują ściśnięcie sICAM-1 z powierzchni komórek [105].

W podsumowaniu tej części badań mogę stwierdzić, że IFN- γ stymuluje uwalnianie sICAM-1 przez mezotelium oraz zwiększa ekspresję powierzchniową ICAM-1 i poziom mRNA dla ICAM-1. Brak efektu aktywnymycyny D na uwalnianie sICAM-1 oraz brak specyficznego mRNA dla sICAM-1 mogą sugerować, że zwiększona sekrecja ICAM-1 wynika przede wszystkim z odcinania zewnątrzkomórkowej części błonowej ICAM-1, a wzrost ekspresji mRNA i białka błonowego ICAM-1 wywiera efekt pośredni poprzez zwiększenie dostępności ICAM-1. Proces odcinania części zewnątrzkomórkowej wydaje

się być procesem bardzo skomplikowanym i przebiegającym różnymi szlakami w różnych typach komórek i w odpowiedzi na różne bodźce. Wiadomo, że wiele cząsteczek istnieje zarówno w formie związanej z błoną komórkową, jak i powstaje przez odcięcie z powierzchni błony komórkowej, np. TNF- α [150;151], TNFR [151;152], IL-6R [150;153], L-selektyna [154], VCAM-1, fraktalkina (CX3CL1) [155;156]. Uwolnienie domeny zewnątrzkomórkowej tych cząsteczek jest ważnym mechanizmem, regulującym ich dostępność biologiczną. Stwierdzono, że w procesach tych biorą udział m.in. metaloproteinazy [154], enzym konwertujący TNF- α (TACE) [152], leukocytarna elastaza [157] i katepsyna G [158]. Moje wstępne i nieujęte w tej pracy badania z użyciem TAPI-2 – selektywnego inhibitora TACE – wykazały około 40-procentową redukcję uwalniania sICAM-1 przez HPMC inkubowane z IFN- γ . Badania te wymagają weryfikacji i skorelowania z ekspresją powierzchniową ICAM-1. Ponadto przy użyciu odpowiednich inhibitorów należałoby zdefiniować ścieżki sygnałowe, pośredniczące w odcinaniu sICAM-1 oraz zidentyfikować enzymy odcinające cząsteczkę sICAM-1. Do postulowanych w literaturze inhibitorów „zrzucania” części zewnątrzkomórkowych cząsteczek należą m.in. tkankowe inhibitory metaloproteinaz [159], fenantrolina [160], 3,4-dichloroizokumaryna [160], związki wanadu [161-164] i wortmannina [165]. Przeanalizowanie wpływu proponowanych inhibitorów mogłoby przybliżyć zrozumienie mechanizmu uwalniania sICAM-1 pod wpływem IFN- γ .

Jednym z założeń mojej pracy, było zbadanie, czy glukoza ma wpływ na uwalnianie sICAM-1 przez HPMC eksponowane na IFN- γ . Glukoza jest powszechnie stosowana w płynach do dializy otrzewnowej jako substancja osmotycznie czynna, która wymusza ultrafiltrację [166]. Przeprowadzone przeze mnie badania pokazały, że glukoza, w stężeniach stosowanych w dializie otrzewnowej, nie zmienia istotnie uwalniania sICAM-1, zarówno konstytutywnego, jak i wyindukowanego za pomocą IFN- γ . Podobne wyniki dało zastosowanie mannitolu, co wskazuje, że także hiperosmolarność nie zmienia zasadniczo uwalniania sICAM-1 przez mezotelium. Nie stwierdziłam również, aby pre-inkubacja z glukozą miała działanie uwrażliwiające HPMC („priming”) na następną stymulację. Można przypuszczać, że obecność płynu dializacyjnego, zawierającego glukozę nie zaburza uwalniania sICAM-1 przez HPMC w czasie reakcji zapalnej w jamie otrzewnej [135]. Może mieć to duże znaczenie, ze względu na potencjalną rolę sICAM-1 w ograniczaniu nadmiernego napływu PMN do otrzewnej [70;167].

Dokładna funkcja ICAM-1 w warunkach in vivo może być bardziej skomplikowana niż sugerowałyby zarówno moje, jak i wcześniejsze badania in vitro. Stwierdzono np. że

choć myszy pozbawione genu ICAM-1 charakteryzuje obwodowa leukocytoza i neutrofilia, częściej dochodzi u nich do bakteriemii po dootrzewnowym podaniu drobnoustrojów, chociaż nasilenie efektu zależne jest od rodzaju użytego szczepu bakterii [168]. Wskazywać to może na kompensację delekcji ICAM-1 przez inne adhezyny o podobnym działaniu. Również wykazana przeze mnie złożoność regulacji ekspresji ICAM-1 i uwalniania sICAM-1 wskazuje, że pełne poznanie roli ICAM-1 w otrzewnej wymaga jeszcze dalszych badań.

WNIOSKI

1. Komórki ludzkiego mezotelium otrzewnowego w warunkach hodowli *in vitro* wykazują konstytutywną ekspresję cząsteczki adhezji międzykomórkowej ICAM-1 oraz konstytutywnie uwalniają jej rozpuszczalną formę - sICAM-1.
2. Ekspozycja komórek mezotelium otrzewnowego na działanie IFN- γ zwiększa – w sposób zależny od dawki i czasu inkubacji – ekspresję powierzchniową ICAM-1, ekspresję mRNA dla ICAM-1 oraz uwalnianie sICAM-1.
3. TNF- α zwiększa w sposób synergiczny uwalnianie sICAM-1 przez komórki mezotelium otrzewnowego stymulowane IFN- γ , nie zmienia natomiast istotnie indukowanej przez IFN- γ ekspresji powierzchniowej ICAM-1 i ekspresji mRNA dla ICAM-1.
4. Uwalnianie sICAM-1 przez komórki mezotelium otrzewnowego pod wpływem IFN- γ jest regulowane na poziomie translacji i poprzez szlak sygnałowy, w którym istotną rolę odgrywa proteasomowa degradacja białek i/lub czynnik transkrypcyjny NF- κ B.
5. Ekspozycja komórek mezotelialnych na glukozę – w stężeniach odpowiadających tym stosowanym w dializie otrzewnowej – nie zmienia istotnie uwalniania sICAM-1, zarówno konstytucyjnego, jak i stymulowanego przez IFN- γ .

PIŚMIENNICTWO

1. Gołąb, J., Jakóbisiak, M., Lasek (red).W. Immunologia. PWN, Warszawa 2002.
2. Kłyszajko-Stefanowicz, L. Cytobiochemia. PWN, Warszawa 2002.
3. Mutsaers SE, Wilkosz S: Structure and function of mesothelial cells. *Cancer Treat Res* 2007;134:1-19.
4. Mutsaers SE: Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology* 2002;7:171-191.
5. Mutsaers SE: The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:9-16.
6. Beavis J, Harwood JL, Coles GA, Williams JD: Synthesis of phospholipids by human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 1994;14:348-355.
7. Hills BA, Burke JR, Thomas K: Surfactant barrier lining peritoneal mesothelium: lubricant and release agent. *Perit Dial Int* 1998;18:157-165.
8. van Hinsbergh VW, Kooistra T, Scheffer MA: Characterization and fibrinolytic properties of human omental tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells. *Blood* 1990;75:1490-1497.
9. Vipond MN, Whawell SA, Thompson JN, Dudley HA: Peritoneal fibrinolytic activity and intra-abdominal adhesions. *Lancet* 1990;335:1120-1122.
10. Henderson LW, Nolph KD: Altered permeability of the peritoneal membrane after using hypertonic peritoneal dialysis fluid. *J Clin Invest* 1969;48:992-1001.
11. Rippe B: Pathophysiological description of the ultrastructural changes of the peritoneal membrane during long-term continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Blood Purif* 1994;12:211-220.
12. Dobbie JW: Pathogenesis of peritoneal fibrosing syndromes (sclerosing peritonitis) in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 1992;12:14-27.
13. Breborowicz A, Witowski J, Knapowski J, Serkes KD, Martis L, Oreopoulos DG: In vitro study of the mechanism of potassium transport into human mesothelial cells. I: Effect of hyperosmolality. *Perit Dial Int* 1993;13:201-207.
14. Horio M: Effect of hypertonic stress on amino acid levels and system activitynin rat peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 1999;19:124-130.
15. Matsuoka Y, Yamauchi A, Nakanishi T, Sugiura T, Kitamura H, Horio M, Takamitsu Y, Ando A, Imai E, Hori M: Response to hypertonicity in mesothelial cells: role of Na⁺/myo-inositol co-transporter. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1217-1223.
16. Schroppe B, Fischereder M, Wiese P, Segerer S, Huber S, Kretzler M, Heiss P, Sitter T, Schlondorff D: Expression of glucose transporters in human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 1998;53:1278-1287.

17. Witowski J, Breborowicz A, Topley N, Martis L, Knapowski J, Oreopoulos DG: Insulin stimulates the activity of Na⁺/K⁺-ATPase in human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 1997;17:186-193.
18. Lai KN, Li FK, Lan HY, Tang S, Tsang AW, Chan DT, Leung JC: Expression of aquaporin-1 in human peritoneal mesothelial cells and its upregulation by glucose in vitro. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1036-1045.
19. Ni J, Verbavatz JM, Rippe A, Boisdé I, Moulin P, Rippe B, Verkman AS, Devuyst O: Aquaporin-1 plays an essential role in water permeability and ultrafiltration during peritoneal dialysis. *Kidney Int* 2006;69:1518-1525.
20. Stoenoiu MS, Ni J, Verkaeren C, Debaix H, Jonas JC, Lameire N, Verbavatz JM, Devuyst O: Corticosteroids induce expression of aquaporin-1 and increase transcellular water transport in rat peritoneum. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:555-565.
21. Valle MT, Degl'Innocenti ML, Bertelli R, Facchetti P, Perfumo F, Fenoglio D, Kunkl A, Gusmano R, Manca F: Antigen-presenting function of human peritoneum mesothelial cells. *Clin Exp Immunol* 1995;101:172-176.
22. Hausmann MJ, Rogachev B, Weiler M, Chaimovitz C, Douvdevani A: Accessory role of human peritoneal mesothelial cells in antigen presentation and T-cell growth. *Kidney Int* 2000;57:476-486.
23. Douvdevani A, Rapoport J, Konforty A, Argov S, Ovnat A, Chaimovitz C: Human peritoneal mesothelial cells synthesize IL-1 alpha and beta. *Kidney Int* 1994;46:993-1001.
24. Lanfrancone L, Boraschi D, Ghiara P, Falini B, Grignani F, Peri G, Mantovani A, Pelicci PG: Human peritoneal mesothelial cells produce many cytokines (granulocyte colony-stimulating factor [CSF], granulocyte-monocyte-CSF, macrophage-CSF, interleukin-1 [IL-1], and IL-6) and are activated and stimulated to grow by IL-1. *Blood* 1992;80:2835-2842.
25. Topley N, Jorres A, Luttmann W, Petersen MM, Lang MJ, Thierauch KH, Muller C, Coles GA, Davies M, Williams JD: Human peritoneal mesothelial cells synthesize interleukin-6: induction by IL-1 beta and TNF alpha. *Kidney Int* 1993;43:226-233.
26. Visser CE, Tekstra J, Brouwer-Steenbergen JJ, Tuk CW, Boorsma DM, Sampat-Sardjoepersad SC, Meijer S, Krediet RT, Beelen RH: Chemokines produced by mesothelial cells: huGRO-alpha, IP-10, MCP-1 and RANTES. *Clin Exp Immunol* 1998;112:270-275.
27. Cronauer MV, Stadlmann S, Klocker H, Abendstein B, Eder IE, Rogatsch H, Zeimet AG, Marth C, Offner FA: Basic fibroblast growth factor synthesis by human peritoneal mesothelial cells: induction by interleukin-1. *Am J Pathol* 1999;155:1977-1984.
28. Gerwin BI, Lechner JF, Reddel RR, Roberts AB, Robbins KC, Gabrielson EW, Harris CC: Comparison of production of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor by normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines. *Cancer Res* 1987;47:6180-6184.

29. Offner FA, Feichtinger H, Stadlmann S, Obrist P, Marth C, Klingler P, Grage B, Schmahl M, Knabbe C: Transforming growth factor-beta synthesis by human peritoneal mesothelial cells. Induction by interleukin-1. *Am J Pathol* 1996;148:1679-1688.
30. Inagi R, Miyata T, Yamamoto T, Suzuki D, Urakami K, Saito A, van Ypersele de SC, Kurokawa K: Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells: role in the functional and morphological alterations of peritoneal membranes in peritoneal dialysis. *FEBS Lett* 1999;463:260-264.
31. Liu FY, Xiao L, Peng YM, Duan SB, Liu H, Liu YH, Ling GH, Yuan F, Chen JX, Fu X, Zhu JL: Inhibition effect of small interfering RNA of connective tissue growth factor on the expression of vascular endothelial growth factor and connective tissue growth factor in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Chin Med J (Engl)* 2007;120:231-236.
32. Isaacs A, Lindenmann J: Virus interference. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957;147:258-267.
33. Pestka S: The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem* 2007;282:20047-20051.
34. Scarponi C, Nardelli B, LaFleur DW, Moore PA, Madonna S, De PO, Girolomoni G, Albanesi C: Analysis of IFN-kappa expression in pathologic skin conditions: downregulation in psoriasis and atopic dermatitis. *J Interferon Cytokine Res* 2006;26:133-140.
35. Schnipper LE, Levin M, Crumacker CS, Gilchrist BA: Virus replication and induction of interferon in human epidermal keratinocytes following infection with herpes simplex virus. *J Invest Dermatol* 1984;82:94-96.
36. Dasgupta MK, Larabie M, Halloran PF: Interferon-gamma levels in peritoneal dialysis effluents: relation to peritonitis. *Kidney Int* 1994;46:475-481.
37. Perussia B: Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr Opin Immunol* 1991;3:49-55.
38. Billiau A, Matthys P: Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:97-113.
39. Hardy KJ, Sawada T: Human gamma interferon strongly upregulates its own gene expression in peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170:1021-1026.
40. Lederer JA, Perez VL, DesRoches L, Kim SM, Abbas AK, Lichtman AH: Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation. *J Exp Med* 1996;184:397-406.
41. Trinchieri G: Interleukin-12 and interferon-gamma. Do they always go together? *Am J Pathol* 1995;147:1534-1538.

42. Dighe AS, Farrar MA, Schreiber RD: Inhibition of cellular responsiveness to interferon-gamma (IFN gamma) induced by overexpression of inactive forms of the IFN gamma receptor. *J Biol Chem* 1993;268:10645-10653.
43. Noordzij JG, Hartwig NG, Verreck FA, De Bruin-Versteeg S, De BT, Van Dissel JT, De GR, Ottenhoff TH, Van Dongen JJ: Two patients with complete defects in interferon gamma receptor-dependent signaling. *J Clin Immunol* 2007;27:490-496.
44. Pestka S: The interferon receptors. *Semin Oncol* 1997;24:S9.
45. Chang YJ, Holtzman MJ, Chen CC: Differential role of Janus family kinases (JAKs) in interferon-gamma-induced lung epithelial ICAM-1 expression: involving protein interactions between JAKs, phospholipase Cgamma, c-Src, and STAT1. *Mol Pharmacol* 2004;65:589-598.
46. Heim MH: Intracellular signalling and antiviral effects of interferons. *Dig Liver Dis* 2000;32:257-263.
47. Baldwin AS, Jr.: The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-683.
48. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K: Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:405-455.
49. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC: Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997;15:749-795.
50. Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, Reith W: Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* 1996;14:301-331.
51. Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, Bosland M, Gerecitano J, Shapiro D, Le J, Koh SI, Kimura T, Green SJ, .: Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 1994;263:1612-1615.
52. Toyoshima T, Kamijo R, Takizawa K, Sumitani K, Hatori M, Nagumo M: Nitric oxide up-regulates the expression of intercellular adhesion molecule-1 on cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:395-399.
53. Collins JT, Dunnick WA: Germline transcripts of the murine immunoglobulin gamma 2a gene: structure and induction by IFN-gamma. *Int Immunol* 1993;5:885-891.
54. Snapper CM, McIntyre TM, Mandler R, Pecanha LM, Finkelman FD, Lees A, Mond JJ: Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *J Exp Med* 1992;175:1367-1371.
55. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD: How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998;67:227-264.
56. Cole AM, Ganz T, Liese AM, Burdick MD, Liu L, Strieter RM: Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol* 2001;167:623-627.

57. Gasperini S, Marchi M, Calzetti F, Laudanna C, Vicentini L, Olsen H, Murphy M, Liao F, Farber J, Cassatella MA: Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol* 1999;162:4928-4937.
58. Oliveira IC, Mukaida N, Matsushima K, Vilcek J: Transcriptional inhibition of the interleukin-8 gene by interferon is mediated by the NF-kappa B site. *Mol Cell Biol* 1994;14:5300-5308.
59. Robson RL, McLoughlin RM, Witowski J, Loetscher P, Wilkinson TS, Jones SA, Topley N: Differential regulation of chemokine production in human peritoneal mesothelial cells: IFN-gamma controls neutrophil migration across the mesothelium in vitro and in vivo. *J Immunol* 2001;167:1028-1038.
60. Bonecchi R, Polentarutti N, Luini W, Borsatti A, Bernasconi S, Locati M, Power C, Proudfoot A, Wells TN, Mackay C, Mantovani A, Sozzani S: Up-regulation of CCR1 and CCR3 and induction of chemotaxis to CC chemokines by IFN-gamma in human neutrophils. *J Immunol* 1999;162:474-479.
61. Rahman A, Fazal F: Hug Tightly and Say Goodbye: Role of Endothelial ICAM-1 in Leukocyte Transmigration. *Antioxid Redox Signal* 2008.
62. Roebuck KA, Finnegan A: Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol* 1999;66:876-888.
63. Schroeder TH, Krueger WA, Dieterich HJ, Nohe B: Activity of the lipoyxygenase inhibitor 1-phenyl-3-pyrazolidinone (phenidone) and derivatives on the inhibition of adhesion molecule expression on human umbilical vascular endothelial cells. *Biologics* 2008;2:151-160.
64. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM: CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000;68:1-8.
65. Bizzarri C, Pagliei S, Brandolini L, Mascagni P, Caselli G, Transidico P, Sozzani S, Bertini R: Selective inhibition of interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis by ketoprofen isomers. *Biochem Pharmacol* 2001;61:1429-1437.
66. Bizzarri C, Beccari AR, Bertini R, Cavicchia MR, Giorgini S, Allegretti M: ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. *Pharmacol Ther* 2006;112:139-149.
67. Yasumoto K, Okamoto S, Mukaida N, Murakami S, Mai M, Matsushima K: Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene. *J Biol Chem* 1992;267:22506-22511.
68. Marx N, Mach F, Sauty A, Leung JH, Sarafi MN, Ransohoff RM, Libby P, Plutzky J, Luster AD: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. *J Immunol* 2000;164:6503-6508.

69. McLoughlin RM: Resolving peritoneal inflammation: flicking the right „switches". *Perit Dial Int* 2005;25:223-229.
70. Li FK, Davenport A, Robson RL, Loetscher P, Rothlein R, Williams JD, Topley N: Leukocyte migration across human peritoneal mesothelial cells is dependent on directed chemokine secretion and ICAM-1 expression. *Kidney Int* 1998;54:2170-2183.
71. Calame W, Hendrickx RJ, Namavar F, Beelen RH: Effect of interferon-gamma in dialysis fluid on peritoneal defence in rats. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:1212-1217.
72. McLoughlin RM, Witowski J, Robson RL, Wilkinson TS, Hurst SM, Williams AS, Williams JD, Rose-John S, Jones SA, Topley N: Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *J Clin Invest* 2003;112:598-607.
73. Larson RS, Corbi AL, Berman L, Springer T: Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *J Cell Biol* 1989;108:703-712.
74. Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC: Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 1989;83:2008-2017.
75. Diamond MS, Staunton DE, de Fougerolles AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Springer TA: ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* 1990;111:3129-3139.
76. Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA: Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 1991;65:961-971.
77. Diamond MS, Garcia-Aguilar J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA: The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol* 1993;120:1031-1043.
78. Greenwood J, Wang Y, Calder VL: Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *off. Immunology* 1995;86:408-415.
79. Greenwood J, Etienne-Manneville S, Adamson P, Couraud PO: Lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signalling at the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol* 2002;38:315-322.
80. Greenwood J, Amos CL, Walters CE, Couraud PO, Lyck R, Engelhardt B, Adamson P: Intracellular domain of brain endothelial intercellular adhesion molecule-1 is essential for T lymphocyte-mediated signaling and migration. *J Immunol* 2003;171:2099-2108.

81. Lyck R, Reiss Y, Gerwin N, Greenwood J, Adamson P, Engelhardt B: T-cell interaction with ICAM-1/ICAM-2 double-deficient brain endothelium in vitro: the cytoplasmic tail of endothelial ICAM-1 is necessary for transendothelial migration of T cells. *Blood* 2003;102:3675-3683.
82. Degitz K, Li LJ, Caughman SW: Cloning and characterization of the 5'-transcriptional regulatory region of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *J Biol Chem* 1991;266:14024-14030.
83. Degitz K: [ICAM-1 and immunological cell adhesion in the skin]. *Hautarzt* 1991;42:748-753.
84. Voraberger G, Schafer R, Stratowa C: Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J Immunol* 1991;147:2777-2786.
85. Ledebur HC, Parks TP: Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *J Biol Chem* 1995;270:933-943.
86. Hubbard AK, Rothlein R: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1379-1386.
87. Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA: A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 1986;137:1270-1274.
88. Pai A, Sundt P, Tees DF: In situ Microrheological Determination of Neutrophil Stiffening Following Adhesion in a Model Capillary. *Ann Biomed Eng* 2008;36:596-603.
89. Krunkosky TM, Fischer BM, Akley NJ, Adler KB: Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha)-induced ICAM-1 surface expression in airway epithelial cells in vitro: possible signal transduction mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1996;796:30-37.
90. Krunkosky TM, Fischer BM, Martin LD, Jones N, Akley NJ, Adler KB: Effects of TNF-alpha on expression of ICAM-1 in human airway epithelial cells in vitro. Signaling pathways controlling surface and gene expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:685-692.
91. Jonjic N, Peri G, Bernasconi S, Sciacca FL, Colotta F, Pelicci P, Lanfrancone L, Mantovani A: Expression of adhesion molecules and chemotactic cytokines in cultured human mesothelial cells. *J Exp Med* 1992;176:1165-1174.
92. Liberek T, Topley N, Luttmann W, Williams JD: Adherence of neutrophils to human peritoneal mesothelial cells: role of intercellular adhesion molecule-1. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:208-217.
93. Kawai M, Nishikomori R, Jung EY, Tai G, Yamanaka C, Mayumi M, Heike T: Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits intercellular adhesion molecule-1 biosynthesis induced by cytokines in human fibroblasts. *J Immunol* 1995;154:2333-2341.

94. Che W, Lerner-Marmarosh N, Huang Q, Osawa M, Ohta S, Yoshizumi M, Glassman M, Lee JD, Yan C, Berk BC, Abe J: Insulin-like growth factor-1 enhances inflammatory responses in endothelial cells: role of Gab1 and MEKK3 in TNF-alpha-induced c-Jun and NF-kappaB activation and adhesion molecule expression. *Circ Res* 2002;90:1222-1230.
95. Arnold R, Neumann M, Konig W: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists inhibit respiratory syncytial virus-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 in human lung epithelial cells. *Immunology* 2007;121:71-81.
96. Rahman A, Anwar KN, Uddin S, Xu N, Ye RD, Platanius LC, Malik AB: Protein kinase C-delta regulates thrombin-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 2001;21:5554-5565.
97. Chiang SC, Ali V, Huang AL, Chu KY, Tone LS: Molecular, cellular and functional characterizations of a novel ICAM-like molecule of the immunoglobulin superfamily from *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* 2001;112:263-275.
98. Pruitt HM, Langston W, Kevil CG, Patel RP: ICAM-1 cross-linking stimulates endothelial glutathione synthesis. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:159-164.
99. Tsakadze NL, Zhao Z, D'Souza SE: Interactions of intercellular adhesion molecule-1 with fibrinogen. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12:101-108.
100. Wang Q, Pfeiffer GR, Stevens T, Doerschuk CM: Lung microvascular and arterial endothelial cells differ in their responses to intercellular adhesion molecule-1 ligation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:872-877.
101. Clayton A, Evans RA, Pettit E, Hallett M, Williams JD, Steadman R: Cellular activation through the ligation of intercellular adhesion molecule-1. *J Cell Sci* 1998;111 (Pt 4):443-453.
102. Lawson C, Ainsworth M, Yacoub M, Rose M: Ligation of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor-kappaB-independent mechanism. *J Immunol* 1999;162:2990-2996.
103. Lawson C, Wolf S: ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep* 2009;61:22-32.
104. Sano H, Nakagawa N, Chiba R, Kurasawa K, Saito Y, Iwamoto I: Cross-linking of intercellular adhesion molecule-1 induces interleukin-8 and RANTES production through the activation of MAP kinases in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250:694-698.
105. Tsakadze NL, Sen U, Zhao Z, Sithu SD, English WR, D'Souza SE: Signals mediating cleavage of intercellular adhesion molecule-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C55-C63.
106. Van Der Saag PT, Caldenhoven E, van de SA: Molecular mechanisms of steroid action: a novel type of cross-talk between glucocorticoids and NF-kappa B transcription factors. *Eur Respir J Suppl* 1996;22:146s-153s.

107. Gho YS, Kleinman HK, Sosne G: Angiogenic activity of human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res* 1999;59:5128-5132.
108. Gho YS, Kim PN, Li HC, Elkin M, Kleinman HK: Stimulation of tumor growth by human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res* 2001;61:4253-4257.
109. Adams DH, Mainolfi E, Burra P, Neuberger JM, Ayres R, Elias E, Rothlein R: Detection of circulating intercellular adhesion molecule-1 in chronic liver diseases. *Hepatology* 1992;16:810-814.
110. Adams DH, Mainolfi E, Elias E, Neuberger JM, Rothlein R: Detection of circulating intercellular adhesion molecule-1 after liver transplantation--evidence of local release within the liver during graft rejection. *Transplantation* 1993;55:83-87.
111. Labarrere CA, Nelson DR, Miller SJ, Nieto JM, Conner JA, Pitts DE, Kirilin PC, Halbrook HG: Value of serum-soluble intercellular adhesion molecule-1 for the noninvasive risk assessment of transplant coronary artery disease, posttransplant ischemic events, and cardiac graft failure. *Circulation* 2000;102:1549-1555.
112. Ridker PM: Intercellular adhesion molecule (ICAM-1) and the risks of developing atherosclerotic disease. *Eur Heart J* 1998;19:1119-1121.
113. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW: ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood* 2005;106:584-592.
114. Carman CV, Springer TA: A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* 2004;167:377-388.
115. Andreoli SP, Mallett C, Williams K, McAteer JA, Rothlein R, Doerschuk CM: Mechanisms of polymorphonuclear leukocyte mediated peritoneal mesothelial cell injury. *Kidney Int* 1994;46:1100-1109.
116. Bullard DC, Qin L, Lorenzo I, Quinlan WM, Doyle NA, Bosse R, Vestweber D, Doerschuk CM, Beaudet AL: P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli. *J Clin Invest* 1995;95:1782-1788.
117. Mizgerd JP, Quinlan WM, LeBlanc BW, Kutkoski GJ, Bullard DC, Beaudet AL, Doerschuk CM: Combinatorial requirements for adhesion molecules in mediating neutrophil emigration during bacterial peritonitis in mice. *J Leukoc Biol* 1998;64:291-297.
118. Sligh JE, Jr., Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, Beaudet AL: Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8529-8533.
119. Breborowicz A, Rodela H, Pagiampzis J, Oreopoulos DG: Stimulation of mesothelial cells proliferation by endogenous growth factor(s). *Perit Dial Int* 1991;11:228-232.

120. van BH, Verbrugh HA, Bos HJ, Heezius EC, Oe PL, van der MJ, Verhoef J: Cytotoxic effects of commercial continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) fluids and of bacterial exoproducts on human mesothelial cells in vitro. *Perit Dial Int* 1989;9:197-202.
121. Ksiazek K, Piwocka K, Brzezinska A, Sikora E, Zabel M, Breborowicz A, Jorres A, Witowski J: Early loss of proliferative potential of human peritoneal mesothelial cells in culture: the role of p16INK4a-mediated premature senescence. *J Appl Physiol* 2006;100:988-995.
122. Hjelle JT, Golinska BT, Waters DC, Steidley KR, McCarroll DR, Dobbie JW: Isolation and propagation in vitro of peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 1989;9:341-347.
123. Stylianou E, Jenner LA, Davies M, Coles GA, Williams JD: Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 1990;37:1563-1570.
124. Fetsch PA, Simsir A, Abati A: Comparison of antibodies to HBME-1 and calretinin for the detection of mesothelial cells in effusion cytology. *Diagn Cytopathol* 2001;25:158-161.
125. Meager A: Biological assays for interferons. *J Immunol Methods* 2002;261:21-36.
126. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
127. Witowski J, Pawlaczyk K, Breborowicz A, Scheuren A, Kuzlan-Pawlaczyk M, Wisniewska J, Polubinska A, Friess H, Gahl GM, Frei U, Jorres A: IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. *J Immunol* 2000;165:5814-5821.
128. Shi Q, Benderdour M, Lavigne P, Ranger P, Fernandes JC: Evidence for two distinct pathways in TNFalpha-induced membrane and soluble forms of ICAM-1 in human osteoblast-like cells isolated from osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:300-308.
129. Park CW, Kim JH, Lee JH, Kim YS, Ahn HJ, Shin YS, Kim SY, Choi EJ, Chang YS, Bang BK: High glucose-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression through an osmotic effect in rat mesangial cells is PKC-NF-kappa B-dependent. *Diabetologia* 2000;43:1544-1553.
130. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
131. O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, Espinosa R, III, Le Beau MM, Earp HS, Liu ET: axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1991;11:5016-5031.

132. Cinatl J, Jr., Kotchetkov R, Weimer E, Blaheta RA, Scholz M, Vogel JU, Gumbel HO, Doerr HW: The antisense oligonucleotide ISIS 2922 prevents cytomegalovirus-induced upregulation of IL-8 and ICAM-1 in cultured human fibroblasts. *J Med Virol* 2000;60:313-323.
133. Topley N: The cytokine network controlling peritoneal inflammation. *Perit Dial Int* 1995;15:S35-S39.
134. Topley N, Mackenzie RK, Williams JD: Macrophages and mesothelial cells in bacterial peritonitis. *Immunobiology* 1996;195:563-573.
135. Martikainen T, Ekstrand A, Honkanen E, Teppo AM, Gronhagen-Riska C: Do interleukin-6, hyaluronan, soluble intercellular adhesion molecule-1 and cancer antigen 125 in dialysate predict changes in peritoneal function? A 1-year follow-up study. *Scand J Urol Nephrol* 2005;39:410-416.
136. Leung KH: Release of soluble ICAM-1 from human lung fibroblasts, aortic smooth muscle cells, dermal microvascular endothelial cells, bronchial epithelial cells, and keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260:734-739.
137. Komatsu S, Flores S, Gerritsen ME, Anderson DC, Granger DN: Differential up-regulation of circulating soluble and endothelial cell intercellular adhesion molecule-1 in mice. *Am J Pathol* 1997;151:205-214.
138. Aoudjit F, Brochu N, Belanger B, Stratowa C, Hiscott J, Audette M: Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene by tumor necrosis factor-alpha is mediated by the nuclear factor-kappaB heterodimers p65/p65 and p65/c-Rel in the absence of p50. *Cell Growth Differ* 1997;8:335-342.
139. Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE: Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* 1985;318:665-667.
140. Krakauer T, Oppenheim JJ: IL-1 and tumor necrosis factor-alpha each up-regulate both the expression of IFN-gamma receptors and enhance IFN-gamma-induced HLA-DR expression on human monocytes and a human monocytic cell line (THP-1). *J Immunol* 1993;150:1205-1211.
141. Tsujimoto M, Feinman R, Vilcek J: Differential effects of type I IFN and IFN-gamma on the binding of tumor necrosis factor to receptors in two human cell lines. *J Immunol* 1986;137:2272-2276.
142. Cheshire JL, Baldwin AS, Jr.: Synergistic activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon via enhanced I kappaB alpha degradation and de novo I kappaBbeta degradation. *Mol Cell Biol* 1997;17:6746-6754.
143. Suassuna JH, Das Neves FC, Hartley RB, Ogg CS, Cameron JS: Immunohistochemical studies of the peritoneal membrane and infiltrating cells in normal subjects and in patients on CAPD. *Kidney Int* 1994;46:443-454.

144. Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, Aguilera A, Sanchez-Tomero JA, Bajo MA, Alvarez V, Castro MA, del PG, Cirujeda A, Gamallo C, Sanchez-Madrid F, Lopez-Cabrera M: Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003;348:403-413.
145. Wakatsuki T, Kimura K, Kimura F, Shinomiya N, Ohtsubo M, Ishizawa M, Yamamoto M: A distinct mRNA encoding a soluble form of ICAM-1 molecule expressed in human tissues. *Cell Adhes Commun* 1995;3:283-292.
146. Whiteman SC, Spiteri MA: IFN-gamma regulation of ICAM-1 receptors in bronchial epithelial cells: soluble ICAM-1 release inhibits human rhinovirus infection. *J Inflamm (Lond)* 2008;5:8.
147. Budnik A, Grewe M, Gyufko K, Krutmann J: Analysis of the production of soluble ICAM-1 molecules by human cells. *Exp Hematol* 1996;24:352-359.
148. Ohmori Y, Schreiber RD, Hamilton TA: Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 1997;272:14899-14907.
149. Kalogeris TJ, Laroux FS, Cockrell A, Ichikawa H, Okayama N, Phifer TJ, Alexander JS, Grisham MB: Effect of selective proteasome inhibitors on TNF-induced activation of primary and transformed endothelial cells. *Am J Physiol* 1999;276:C856-C864.
150. Althoff K, Reddy P, Voltz N, Rose-John S, Mullberg J: Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur J Biochem* 2000;267:2624-2631.
151. Peiretti F, Bernot D, Lopez S, Bonardo B, prez-Beauclair P, Juhan-Vague I, Nalbone G: Modulation of PAI-1 and proMMP-9 syntheses by soluble TNFalpha and its receptors during differentiation of the human monocytic HL-60 cell line. *J Cell Physiol* 2003;196:346-353.
152. Reddy P, Slack JL, Davis R, Cerretti DP, Kozlosky CJ, Blanton RA, Shows D, Peschon JJ, Black RA: Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem* 2000;275:14608-14614.
153. Jones SA, Horiuchi S, Novick D, Yamamoto N, Fuller GM: Shedding of the soluble IL-6 receptor is triggered by Ca²⁺ mobilization, while basal release is predominantly the product of differential mRNA splicing in THP-1 cells. *Eur J Immunol* 1998;28:3514-3522.
154. Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA: An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 1998;282:1281-1284.
155. Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, Murphy G, Greaves DR, Dempsey PJ, Raines EW: Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 2001;276:37993-38001.

156. Tsou CL, Haskell CA, Charo IF: Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. *J Biol Chem* 2001;276:44622-44626.
157. Champagne B, Tremblay P, Cantin A, St PY: Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J Immunol* 1998;161:6398-6405.
158. Robledo O, Papaioannou A, Ochietti B, Beauchemin C, Legault D, Cantin A, King PD, Daniel C, Alakhov VY, Potworowski EF, St-Pierre Y: ICAM-1 isoforms: specific activity and sensitivity to cleavage by leukocyte elastase and cathepsin G. *Eur J Immunol* 2003;33:1351-1360.
159. Essick E, Sithu S, Dean W, D'Souza S: Pervanadate-induced shedding of the intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 ectodomain is mediated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Mol Cell Biochem* 2008;314:151-159.
160. Arribas J, Coodly L, Vollmer P, Kishimoto TK, Rose-John S, Massague J: Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J Biol Chem* 1996;271:11376-11382.
161. Baron M, Davignon JL: Inhibition of IFN-gamma-induced STAT1 tyrosine phosphorylation by human CMV is mediated by SHP2. *J Immunol* 2008;181:5530-5536.
162. Duff JL, Quinlan KL, Paxton LL, Naik SM, Caughman SW: Pervanadate mimics IFN-gamma-mediated induction of ICAM-1 expression via activation of STAT proteins. *J Invest Dermatol* 1997;108:295-301.
163. Melville MW, Tan SL, Wambach M, Song J, Morimoto RI, Katze MG: The cellular inhibitor of the PKR protein kinase, P58(IPK), is an influenza virus-activated co-chaperone that modulates heat shock protein 70 activity. *J Biol Chem* 1999;274:3797-3803.
164. Narayan V, Eckert M, Zylicz A, Zylicz M, Ball KL: Cooperative regulation of the interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by core components of the molecular chaperone machinery. *J Biol Chem* 2009;284:25889-25899.
165. Zhang F, Zhang T, Jiang T, Zhang R, Teng ZH, Li C, Gu ZP, Mei Q: Wortmannin potentiates roscovitine-induced growth inhibition in human solid tumor cells by repressing PI3K/Akt pathway. *Cancer Lett* 2009;286:232-239.
166. Martis L: Industry perspectives on biocompatibility of peritoneal dialysis solutions. *Perit Dial Int* 1995;15:S96-S99.
167. Sithu SD, English WR, Olson P, Krubasik D, Baker AH, Murphy G, D'Souza SE: Membrane-type 1-matrix metalloproteinase regulates intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)-mediated monocyte transmigration. *J Biol Chem* 2007;282:25010-25019.
168. Sarman G, Shappell SB, Mason EO, Jr., Smith CW, Kaplan SL: Susceptibility to local and systemic bacterial infections in intercellular adhesion molecule 1-deficient transgenic mice. *J Infect Dis* 1995;172:1001-1006.