

Magdalena Karkos-Śmiech

**Określenie znaczenia ścieżki sygnałowej JaK/STAT
w modyfikowaniu reakcji immunologicznej
w przebiegu kłębuszkowych zapaleń nerek u dzieci**

Rozprawa doktorska

Promotor:

dr hab. n. med. Danuta Ostalska-Nowicka

Klinika Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego

w Poznaniu

Poznań 2012

Praca współfinansowana z projektu
Nefropedia.pl NR13 0033 10/2010

Spis treści

1. Wstęp.....	7
1.1. Zespół nerczycowy.....	7
1.1.1. Epidemiologia zespołu nerczycowego.....	7
1.1.2. Etiopatogeneza zespołu nerczycowego.....	8
1.1.3. Idiopatyczny zespół nerczycowy.....	9
1.1.3.1. Obraz kliniczny.....	9
1.1.3.2. Podział patomorfologiczny.....	10
1.1.4. Podłoże immunologiczne zespołu nerczycowego	11
1.1.4.1. Zaburzenia funkcjonowania limfocytów T.....	11
1.1.4.2. Zanurzenia funkcjonowania limfocytów B.....	12
1.1.5. Znaczenie glikokortykosteroidów w zespole nerczycowym – wybrane aspekty genomowe oraz pozagenomowe	13
1.2. Ścieżka transdukcji sygnału JaK/STAT.....	14
1.2.1. Rodzina kinaz Janus.....	16
1.2.2. Białka z grupy STAT.....	19
1.2.3. Regulacja transdukcji sygnału ścieżki JaK/STAT.....	19
1.2.4. Białka SOCS.....	19
1.2.5. Fizjologiczna funkcja białek SOCS.....	21
1.3. Znaczenie układu JaK/STAT w prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego oraz rozwoju chorób o podłożu immunologicznym.....	22
2. Cel.....	24
3. Pacjenci i metody.....	26
3.1. Pacjenci.....	26
3.1.1. Grupa badana.....	26
3.1.2. Grupa kontrolna.....	27
3.1.3. Protokół leczenia.....	27
3.2. Metody.....	28
3.2.1. Izolacja leukocytów z krwi obwodowej.....	28
3.2.2. Izolacja komórek jednojądrzastych.....	29
3.2.3. Izolacja całkowitego RNA.....	29
3.2.3.1. Izolacja RNA z wykorzystaniem TRIzolu.....	30

3.2.3.2. Izolacja RNA z zastosowaniem kolumnien EURx.....	31
3.2.4. Rozdział elektroforetyczny RNA w żelu agarozowym.....	32
3.2.5. Reakcja odwrotnej transkrypcji real time PCR.....	33
3.2.5.1. Synteza cDNA.....	33
3.2.5.2. Analiza jakości cDNA.....	34
3.2.5.3. Amplifikacja.....	35
3.2.6. Oznaczenie stężenia SOCS3, SOCS5, IL-6 i IL-20 w surowicy krwi.....	38
3.2.7. Reakcja immunocytochemiczne.....	38
3.2.8. Test przesiewowy ekspresji szlaku sygnalizacyjnego kinaz Janus.....	39
3.2.9. Analiza statystyczna.....	40
4. Wyniki.....	42
4.1. Obserwacja kliniczna.....	42
4.2. Ekspresja składowych ścieżki transdukcji sygnału JaK/STAT w populacji obwodowych monocytów i limfocytów.....	43
4.3. Ekspresja pozostałych genów uczestniczących w odpowiedzi immunologicznej i różnicowaniu komórkowym w obwodowych monocytach i limfocytach.....	45
4.4. Podwyższone stężenia SOCS3, SOCS5, IL-6, IL-20 w surowicy krwi u pacjentów z SRNS i SSNS przed wprowadzeniem steroidów.....	47
4.5. Podwyższone stężenia SOCS3, SOCS5, IL-6, IL-20 w surowicy krwi u pacjentów z SRNS po 6 tygodniach leczenia.....	48
4.6. Immunocytochemiczna ocena ekspresji SOCS3 i SOCS5.....	49
5. Omówienie wyników i dyskusja.....	51
6. Wnioski.....	59
7. Piśmiennictwo.....	60
8. Streszczenie.....	69
9. Summary.....	71
10. Lista załączników.....	73

Wykaz używanych skrótów

cDNA – (ang. *complementary DNA*) komplementarny DNA uzyskany z matrycy mRNA przy użyciu odwrotnych transkryptaz oraz polimerazy DNA

CIS – białko należące do grupy inhibitorów ścieżki transdukcji sygnału JaK/STAT

CRP – (ang. *c-reactive protein*) białko c-reaktywne

DMP – (ang. *diffuse mesangial proliferation*) rozlany rozplam mezangium

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

Epo – erytropoetyna

ESRD – (ang. *end stage renal disease*) końcowa niewydolność nerek

FSGS – (ang. *focal segmental glomerulosclerosis*) ogniskowe segmentowe stwardnienie kłębuszków nerkowych

GCS – glikokortykosteroidy

GFR – (ang. *glomerular filtration rate*) wskaźnik przesączania kłębkowego

GUS – sekwencja DNA wiążąca dimery STAT

INF- γ – interferon γ

Ig – immunoglobulina

IGF-1 - (ang. *Insulin-like Growth Factor*) insulinopodobny czynnik wzrostu -somatomedyna pośrednicząca

IL – interleukina

ISKDC – (ang. *International Study of Kidney Disease in Children*) międzynarodowa grupa badawcza zajmująca się określaniem standardów rozpoznawania oraz leczenia chorób nerek u dzieci

IZN – idiopatyczny zespół nerczycowy

JaK – kinaza Janus

JH – (ang. *Janus homology domain*) homologiczne domeny kinaz Janus

KIR – jedna z domen białka SOCS odpowiedzialna za inhibicję kinaz

MCD – (ang. *minimal change disease*) choroba zmian minimalnych

MCNS – (ang. *minimal change nephrotic syndrome*) zespół nerczycowy z obecnością zmian minimalnych

MISS – (ang. *membrane-initiated steroid signaling*) sposób oddziaływania steroidów na poziomie błony komórkowej

NF- κ B – (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) rodzaj kompleksu białkowego funkcjonującego jako czynnik transkrypcyjny

NISS – (ang. *nuclear-initiated steroid signaling*) sposób oddziaływania steroidów na poziomie jądra komórkowego

NK – (ang. *natural killer*) komórki należące do limfocytów odpowiedzialne za zjawisko naturalnej cytotoxyczności

ns – (ang. *not significant*) parametr, który nie jest istotny statystycznie

PBS – (ang. *phosphate buffered saline*) zbuforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej bez Ca i Mg

PF – (ang. *permeability factor*) czynnik zwiększający przepuszczalność błon komórkowych

PIAS – (ang. *protein inhibitor of activated STAT*) grupa białek hamujących aktywowane STAT

RNA – kwas rybonukleinowy

SCID – (ang. *severe combined immunodeficiency*) ciężki wrodzony zespół niedoboru odporności

SDNS – (ang. *steroid dependent nephrotic syndrome*) steroidozależny zespół nerczycowy

SH2 – centralna domena białek SOCS

SOCS – grupa białek hamujących ścieżkę transdukcji sygnału JaK/STAT

SRNS – (ang. *steroid resistant nephrotic syndrome*) steroidooporny zespół nerczycowy

SSNS – (ang. *steroid sensitive nephritic syndrome*) steroidowrażliwy zespół nerczycowy

TNF – (ang. *tumor necrosis factor*) czynnik martwicy nowotworów

TYK – kinaza tyrozynowa

ZN – zespół nerczycowy

1. Wstęp

1.1. Zespół nerczycowy

Zespół nerczycowy (łac. *syndroma nephroticum*, ang. *nephrotic syndrome*) jest najczęstszym obrazem klinicznym kłębuszkowych zapaleń nerek u dzieci i stanowi zespół objawów klinicznych i biochemicznych spowodowanych białkomoczem przekraczającym możliwości kompensacyjne ustroju [1].

Zespół nerczycowy (ZN) rozpoznaje się w sytuacji, gdy dobową utratę białka przekracza 50 mg/kg lub 40 mg/m²/godz. Hiperproteinurii towarzyszą obrzęki, hipoproteinemia z hypoalbuminemią, hiperlipidemia oraz zaburzenia krzepliwości krwi będące wynikiem przedostawania się do moczu antytrombiny III, a także białek C i S [2].

Utrata białka z moczem, zarówno selektywna (dotycząca wyłącznie frakcji albumin osocza) jak i nieselektywna (dotycząca albumin i globulin), po przekroczeniu granicznej wartości, prowadzi do zmniejszenia ciśnienia onkotycznego surowicy oraz wtórnych zaburzeń lipidowych w postaci hipercholesterolemii i hiperfibrinogenemii. Objawem zmniejszonego ciśnienia onkotycznego są również obrzęki i przesięki do jam ciała, będące efektem przemieszczania się płynu wewnątrznaczyniowego do przestrzeni zewnątrznaczyniowej i, w konsekwencji, doprowadzającego do hipowolemii.

1.1.1. Epidemiologia zespołu nerczycowego

Występowanie ZN szacuje się na 2 do 7 nowych zachorowań na 100 000 dzieci na rok. Znacznie częściej występuje u chłopców niż u dziewcząt (stosunek 2:1), szczególnie w wieku przedszkolnym. Przyczyny zespołu nerczycowego u dzieci są zdecydowanie inne niż u dorosłych [1].

W 90% przypadków u podłoża rozpoznania ZN u dzieci leżą pierwotne kłębuszkowe zapalenia nerek [3].

Do tej grupy zalicza się również wrodzone postacie zespołu nerczycowego: wrodzony zespół nerczycowy typu fińskiego, wrodzone rozlane szkliwienie mezangium, rodzinne ogniskowe segmentowe szkliwienie kłębków oraz zespół Alporta [4].

Zaledwie w 10% przypadków, ZN u dzieci rozwija się w następstwie innych jednostek chorobowych. Należą do nich udowodnione zakażenia bakteryjne lub wirusowe (sporadycznie pierwotniakowe), reakcje polekowe, choroba Schoenleina-Henocha, uszkodzenia kłębuszków w zatruciu metalami ciężkimi, toczeń rumieniowaty układowy, zespół Sjoegrena, reumatoidalne zapalenia stawów, zapalenie skórno-mięśniowe, cukrzyca czy też choroba Hodgkina [5].

1.1.2. Etiopatogeneza zespołu nerczycowego

Zespół nerczycowy stanowi wyzwanie zarówno pod względem poznania jego patogenezy jak i możliwości zastosowania efektywnej terapii. Mimo znacznej modyfikacji leczenia ZN, jaka dokonała się na przestrzeni ostatnich 10 lat, wciąż nie została wystarczająco dokładnie poznana jego patogeneza. Z tego też powodu znaczny odsetek zespołów nerczycowych o nieustalonej etiologii opisuje się mianem idiopatycznego zespołu nerczycowego (IZN). W literaturze przedstawiane są liczne hipotezy podejmujące próbę wyjaśnienia nadmiernej, patologicznej filtracji zachodzącej w kłębuszku nerkowym. Kliniczna odpowiedź na zastosowanie ogólnoustrojowej immunosupresji – wdrożenie glikokortykosteroidów, sugeruje bowiem kluczową rolę układu odpornościowego w rozwoju zmian leżących u podłoża ZN [5]. Z tego też powodu, za główną przyczynę białkomoczu w IZN uważa się zwiększoną przepuszczalność błony filtracyjnej kłębuszka nerkowego w następstwie działania różnorodnych czynników o charakterze immunologicznym [6]. Należy zauważyć, że każdy z elementów tworzących błonę filtracyjną kłębuszka nerkowego może zostać uszkodzony w przebiegu ww. procesu. Największą jednak uwagę zwraca się obecnie na mechanizmy prowadzące do uszkodzenia komórek listka trzewnego torebki Bowmana – podocytów, połączeń pomiędzy nimi (tzw. błonek filtracyjnych) oraz błony podstawnej. Uszkodzenia mogą dotyczyć zarówno pojedynczych jak i wszystkich elementów błony filtracyjnej [7]. Jednym z dyskutowanych mechanizmów jest utrata ujemnego ładunku błony filtracyjnej, która to, wg Sewilla i Shorta może mieć związek z krążącym polikationem wiążącym się z ujemnie naładowaną błoną [8]. Inny mechanizm, prowadzący do zwiększonej filtracji kłębuszka nerkowego, wiązałby się z istnieniem hipotetycznej cytokiny pochodzącej z limfocytów T (ang. *permeability factor*, PF), która uszkadzałaby błonę podstawną i/lub zmieniała jej ładunek elektryczny. Rola tej cytokiny została potwierdzona m.in. w przypadkach nawrotów ZN w nerce przeszczepionej u pacjentów z pierwotnie rozpoznany ogniskowym, segmentowym stwardnieniem kłębuszków nerkowych (ang. *focal segmental glomerulosclerosis*, FSGS) [9].

Badania prowadzone *in vivo* jak i w modelach doświadczalnych *in vitro* wykazały, że białkomocz może być przyczyną wydalania przez nerki różnorodnych pro-zapalnych oraz intensyfikujących włóknienie cytokin, co w dalszej perspektywie może prowadzić do nasilenia procesu zapalnego (aktywacja szeregu białokrwinkowego) oraz przebudowy mikro-architektury nerki [10]. Przewlekły białkomocz prowadzi zatem do ukonstytuowania stałej sekrecji cytokin, migracji leukocytów do przestrzeni moczowej kłębuszka lub przestrzeni śródmiąższowej, co staje się mechanizmem wyzwalamym postępującą dezintegrację kanalików nerkowych, zwłóknienie przestrzeni śródmiąższowej oraz nieodwracalne stwardnienie kłębuszków nerkowych [5].

1.1.3. Idiopatyczny zespół nercycowy

1.1.3.1. Obraz kliniczny

Najczęstszą przyczyną zespołu nercycowego u dzieci jest idiopatyczny zespół nercycowy, którego szczyt zachorowań przypada między drugim a piątym rokiem życia [1]. U większości pacjentów, IZN poprzedzony jest krótkotrwałym procesem zapalnym toczącym się w obrębie górnych/dolnych dróg oddechowych lub układu moczowego. Zastosowanie glikokortykosteroidów w terapii IZN przynosi istotną poprawę kliniczną oraz normalizację parametrów biochemicznych u ponad 90% chorych dzieci [11]. U 40% z nich remisję objawów ZN obserwuje się już przed upływem 2 tygodni leczenia, a u kolejnych 60% po dalszych sześciu tygodniach kontynuowania leczenia immunosupresyjnego. Tę grupę pacjentów, w której ustąpienie białkomoczu obserwuje się najpóźniej w okresie 8 tygodni od rozpoczęcia leczenia steroidami, określa się mianem wrażliwych na steroidy (ang. *steroid sensitive-nephrotic syndrome*, SSNS). Pozostały odsetek pacjentów z IZN (około 10%), który nie odpowiada na wdrożoną terapię glikokortykosteroidami określa się grupą chorych opornych na steroidy (ang. *steroid-resistant nephrotic syndrome*, SRNS) [11,12]. Przebieg zespołu nercycowego, w którym nie obserwuje się remisji klinicznej lub biochemicznej po podaniu glikokortykosteroidów albo poprawę widoczną wyłącznie podczas leczenia i ustępującą po jego zaprzestaniu (ang. *steroid-dependent nephrotic syndrome*, SDSS), jest najczęstszym wskazaniem do wykonania biopsji nerki oraz podjęcia próby modyfikacji leczenia immunosupresyjnego [13,14].

Po uzyskaniu pierwszej remisji choroby, u prawie 70% pacjentów z rozpoznaniem IZN obserwuje się występowanie nawrotów choroby. Niestety, mimo prób intensyfikacji leczenia immunosupresyjnego, u połowy z nich wykształca się zjawisko steroidozależności lub

steroidooporności. Wiąże się to z koniecznością stosowania innych niż glikokortykosteroidy leków immunosupresyjnych.

1.1.3.2. Podział patomorfologiczny

Obecnie wyróżnia się trzy odmiany morfologiczne IZN, których wspólną cechą są widoczne w mikroskopie elektronowym zmiany w obrębie komórek nabłonka listka trzewnego torebki Bowmana [7]. Dotyczą one w pierwszym rzędzie wypustek stopowatych podocytów, które mogą ulegać spłaszczeniu, fuzji, defragmentacji lub, w najbardziej zaawansowanych zmianach, zanikowi. W zależności od obrazu mikroskopowego bioptatu analizowanego w mikroskopii świetlnej oraz elektronowej, opisuje się następujące formy histologiczne IZN: zmiany minimalne (ang. *minimal change disease*, MCD), rozlany rozplem komórek mezangium (ang. *diffuse mesangial proliferation*, DMP) oraz, przytoczony już wyżej, FSGS [15].

Określenie „zmian minimalnych” (MCD) zostało wprowadzone do kanonów światowego piśmiennictwa w oparciu o fakt, że do czasu rutynowego zastosowania mikroskopii elektronowej w diagnostyce histologicznej, patolodzy nie byli w stanie stwierdzić jakichkolwiek zmian patologicznych w bioptatach nerki obserwowanych wyłącznie w mikroskopii w jasnym polu. Obecnie, najbardziej charakterystycznymi cechami obecnymi w MCD, które są stwierdzane w mikroskopii elektronowej, jest rozproszony zanik pojedynczych podocytów, połączony z wakuolizacją, stapianiem się wypustek i hipertrofią pozostałych komórek listka trzewnego torebki Bowmana [16].

Rozlany rozplem komórek mezangium (DMP) dotyczy, jak sama nazwa wskazuje, komórek zlokalizowanych między pętlami naczyniowymi kłębuszka nerkowego. Rozpoznanie to może być przede wszystkim postawione w oparciu o analizę materiału w mikroskopie elektronowym. Jako normę przyjmuje się obecność do 2 komórek mezangialnych w całej ww. przestrzeni [17].

Jeżeli w obrazie mikroskopowym stwierdza się w obszarach mezangium od 3 do 4 komórek mezangialnych to zmianę określa się jako nieznaczny rozplem. Obecność 5-7 komórek w tym obszarze upoważnia do rozpoznania miernego rozplemu, a 8 lub więcej komórek mezangialnych w przestrzeni mezangialnej to rozplem mezangialny. Rozplemowi mezangialnemu często towarzyszy proporcjonalny do zwiększonej liczby komórek mezangialnych przyrost macierzy mezangialnej.

Stwardnienie kłębuszka nerkowego spowodowane jest przyrostem objętości białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Segmentalne stwardnienie może być morfologicznym wykładnikiem procesów naprawczych, które były poprzedzone zmianami zapalnymi lub martwicą [18]. Szklwienie z kolei polega na obecności bezpostaciowego materiału, w którego składzie wyróżnić można glikoproteiny, a czasem również lipidy. Typową zmianą, w której stwierdza się zarówno stwardnienie, jak i szklwienie jest nefropatia cukrzycowa, lub też ogniskowe i/lub segmentowe stwardnienie kłębuszków nerkowych (FSGS).

Powszechnie uważa się, że ww. trzy formy histologiczne są w istocie wariantami lub okresami jednej i tej samej choroby. Ponadto zaobserwowano, że zmiany te mogą ulegać regresji w trakcie leczenia lub, wraz z zaostrzeniem przebiegu choroby definiowanego progresją białkomoczu, mogą postępować w kierunku nieodwracalnej sklerotyzacji kłębuszka nerkowego [19].

W badaniu immunofluorescencji pośredniej skrawków histologicznych biopsji nerki nie stwierdza się najczęściej tkankowych złogów immunoglobulin ani składowych dopełniacza. W niektórych tylko przypadkach DMP można stwierdzić obecność agregatów IgM, które, z racji swojej wielkości, lokalizują się w sąsiedztwie zmienionego chorobowo mezangium kłębuszka. W FSGS natomiast złogi immunoglobulin i składowe dopełniacza można zlokalizować w pętlach naczyniowych i komórkach nabłonkowych torebki Bowmana. FSGS nie jest jednakże charakterystyczną postacią histologiczną dla IZN, a raczej końcowym etapem procesów patologicznych toczących się w kłębuszku nerkowym [17].

1.1.4. Podłoże immunologiczne zespołu nerczycowego

1.1.4.1. Zaburzenia funkcjonowania limfocytów T

Obecnie powszechnie uznana jest hipoteza patogenetyczna zakładająca nadmierną aktywność nieprawidłowego klonu limfocytów T, produkujących czynniki uszkadzające błonę filtracyjną kłębuszka nerkowego i zwiększające jej przepuszczalność dla albumin. Nadal prowadzone są badania nad udziałem mechanizmów immunologicznych, takich jak defekt odpowiedzi komórkowej lub zaburzona funkcja limfocytów T oraz wpływu interleukin bądź ich receptorów na przepuszczalność bariery filtracyjnej dla białka [20,21,22]. Za bezpośrednim udziałem limfocytów T w patomechanizmie MCNS przemawiają wyniki prac badawczych, wykazujące wzrost aktywności cytokin produkowanych przez subpopulacje limfocytów Th1 i Th2 w okresach zaostrzenia choroby – głównie interleukiny 4 (IL-4) i interleukiny 13 (IL-13) [23,24]. W badaniach nad

dysfunkcją układu immunologicznego w patomechanizmie białkomoczu, autorzy podkreślają znaczenie zaburzeń równowagi w układzie wzajemnych relacji Th1/Th2 oraz potencjalnego związku pomiędzy zwiększeniem aktywności IL-4 i IL-13 (limfokin alergii) a zjawiskiem atopii w przebiegu klinicznym MCNS [25,26,27].

Jednym z dowodów na istnienie zaburzeń immunologicznych u podłoża MCNS jest kliniczna skuteczność leków immunosupresyjnych – nie tylko glikokortykosteroidów, ale także inhibitorów kalcyneuryny - takich jak cyklosporyna A czy takrolimus, których mechanizm działania polega na hamowaniu aktywacji limfocytów T z blokowaniem transkrypcji i ekspresji genów dla szeregu interleukin (IL-1,IL-3,IL-4), interferonu IFN- γ i innych cytokin np. TNF- α [28].

1.1.4.2. Zaburzenia funkcjonowania limfocytów B

W badaniach nad subpopulacjami limfocytów u pacjentów z nawrotowym zespołem nerczycowym typu „zmian minimalnych” udokumentowano nie tylko zmiany populacji limfocytów T, ale również zaburzenia aktywności limfocytów B, silnie pobudzanych do produkcji przeciwciał przez liczne cytokiny pochodzące od limfocytów Th2 (IL-4,IL-5, IL-13). Aktualne doniesienia naukowe ,wskazujące na aktywację limfocytów B w nawrocie białkomoczu i redukcję liczby limfocytów B i komórek CD19 w remisji choroby, mogą sugerować, że czynnikiem uszkadzającym barierę filtracyjną kłębuszka może być toksyczna immunoglobulina wydzielana przez nieprawidłowe limfocyty B, działająca bezpośrednio lub pośrednio poprzez wpływ na limfocyty T i/lub bezpośrednio na podocyty [9].

Współcześnie wielu autorów na podstawie badań i własnych doświadczeń klinicznych z zastosowaniem chimerycznego, ludzko-mysiego przeciwciała monoklonalnego (rituximab) w leczeniu idiopatycznego, steroidozależnego i steroidoopornego zespołu nerczycowego, wskazuje na kluczową rolę limfocytów B w patogenezie zmian minimalnych idiopatycznego kłębuszkowego zapalenia nerek [29,30,31]. Sukces terapeutyczny w uzyskaniu i podtrzymaniu remisji z zastosowaniem rituximabu, może sugerować i jednocześnie potwierdzać znamienne rolę limfocytów B w niezwykle złożonej, wieloczynnikowej patogenezie MCNS.

Na podstawie powyższych doniesień można wnioskować że, przynajmniej w pierwszym etapie rozwoju IZN odpowiadającemu histologicznemu rozpoznaniu MCD, przyczyna destrukcji elementów błony filtracyjnej ciałka nerkowego tkwi w rozchwianej funkcji układu immunologicznego. To najprawdopodobniej krążące leukocyty stają się pierwszym źródłem cytokin zapoczątkowujących depolaryzację, a w konsekwencji „rozszczelnienie”

błony filtracyjnej. Dopiero dalsza kaskada zdarzeń, obserwowana w niektórych formach DMP jak i w wszystkich przypadkach FSGS, doprowadza do rozwoju miejscowego procesu zapalnego w kłębuszku nerkowym. Z tego też powodu najbardziej pożądanym elementem poznawczym rozwoju wczesnych etapów IZN jest ustalenie pierwotnego statusu układu odpornościowego wpływającego na indukcję zmian histologicznych w nerce.

Wydaje się, że z punktu analizy zmian obserwowanych w narządach obwodowych, stan ten można najpełniej wyrazić, analizując ekspresję elementów ścieżki sygnałowej JAK/STAT w poszczególnych populacjach krążących krwinek białych.

1.1.5. Znaczenie glikokortykosteroidów w zespole nerczycowym – wybrane aspekty genomowe oraz pozagenomowe

Glikokortykosteroidy (GCS) hamują zarówno wczesną jak i późną odpowiedź immunologiczną. Pobudzają syntezę lipokortyny hamującej fosfolipazę A, enzym niezbędny w procesie produkcji substancji prozapalnych (eikozanoidów) z kwasu arachidonowego. Upośledzają w ten sposób produkcję m.in. leukotrienów, zmniejszają powstawanie i uwalnianie cytokin i czynników adhezji komórek. Działają głównie na limfocyty i komórki zapalne poprzez hamowanie ścieżki czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [32], ale także na różnorodne komórki docelowe (dendrytyczne, nabłonkowe, śródbłonkowe) poprzez zahamowanie transkrypcji cytokin prozapalnych [33] oraz poprzez hamowanie produkcji i proliferacji (w mechanizmie apoptozy) limfocytów T pomocniczych, cytotoksycznych i supresorowych.

Efekty kliniczne działania glikokortykosteroidów możliwe są dzięki mechanizmom molekularnym zachodzącym w jądrze, cytoplazmie i błonie komórkowej – zarówno genomowym, jak i niegenomowym.

Klasyczny, genomowy model działania GCS uwzględnia ich wpływ (bezpośredni lub pośredni) na transkrypcję i translację genów kodujących mediatory procesu zapalnego. Zachodzi to w procesach transaktywacji – pobudzenia transkrypcji genów dla m.in. lipokortyny-1, antagonisty receptora IL-1 i in. oraz transpresji – zahamowania transkrypcji genów cytokin (m.in. IL-1, IL-2, IL-6, IL-13, IL-18, TNF- α), chemokin, enzymów, receptorów oraz innych białek [34].

W ostatnich latach opisano także niegenomowy mechanizm działania GCS odpowiedzialny za najwcześniejsze efekty terapeutyczne, (od kilkunastu sekund do kilkunastu minut), w czasie wykluczającym produkcję białek *de novo*. Zjawiska te zachodzą poprzez wpływ na błonowe kanały elektrolitowe, potęgowanie działania noradrenaliny lub aktywację szlaków

sygnałowych kinaz. Nietranskrypcyjny przekaz sygnału może odbywać się bez udziału receptora (związany jest przede wszystkim z regulacją błonowych kanałów jonowych i zastosowaniem dużych dawek GCS) lub z udziałem receptora błonowego, rzadziej cytoplazmatycznego (GR) poprzez jego bezpośrednią interakcję z białkami docelowymi, takimi jak NF- κ B [32]. Niegenomowe mechanizmy działania GCS ujawniają się szczególnie przy wyższym ich dawkowaniu i wyższym stężeniu miejscowym ligandu w komórce.

Niegenomowe i genomowe mechanizmy działania wzajemnie oddziałują na siebie, mogą się wzajemnie wzmacniać, wywierając efekt addycyjny i synergistyczny. Działania niegenomowe GCS, wiążące się przede wszystkim z ich oddziaływaniem na poziomie błony komórkowej, są określane jako sygnalizacja inicjowana z błony (MISS, ang. *membrane-initiated steroid signalling*) dla odróżnienia sygnalizacji inicjowanej z jądra komórkowego (NISS, ang. *nuclear-initiated steroid signalling*) [34].

Ostatnio pojawiły się nowe dowody bezpośredniego działania GCS na podocyty [35,36]. Zlokalizowano w nich receptory glikokortykosteroidowe (GR), a działanie GCS wywołało efekt ochronny na podocyty (także mysie), wzmacniając proces ich zdrowienia poprzez stabilizację włókien aktyny [35] i zapobiegając apoptozie indukowanej puromycyną aminonukleozydową (PAN) [37].

1.2. Ścieżka transdukcji sygnału JAK/STAT

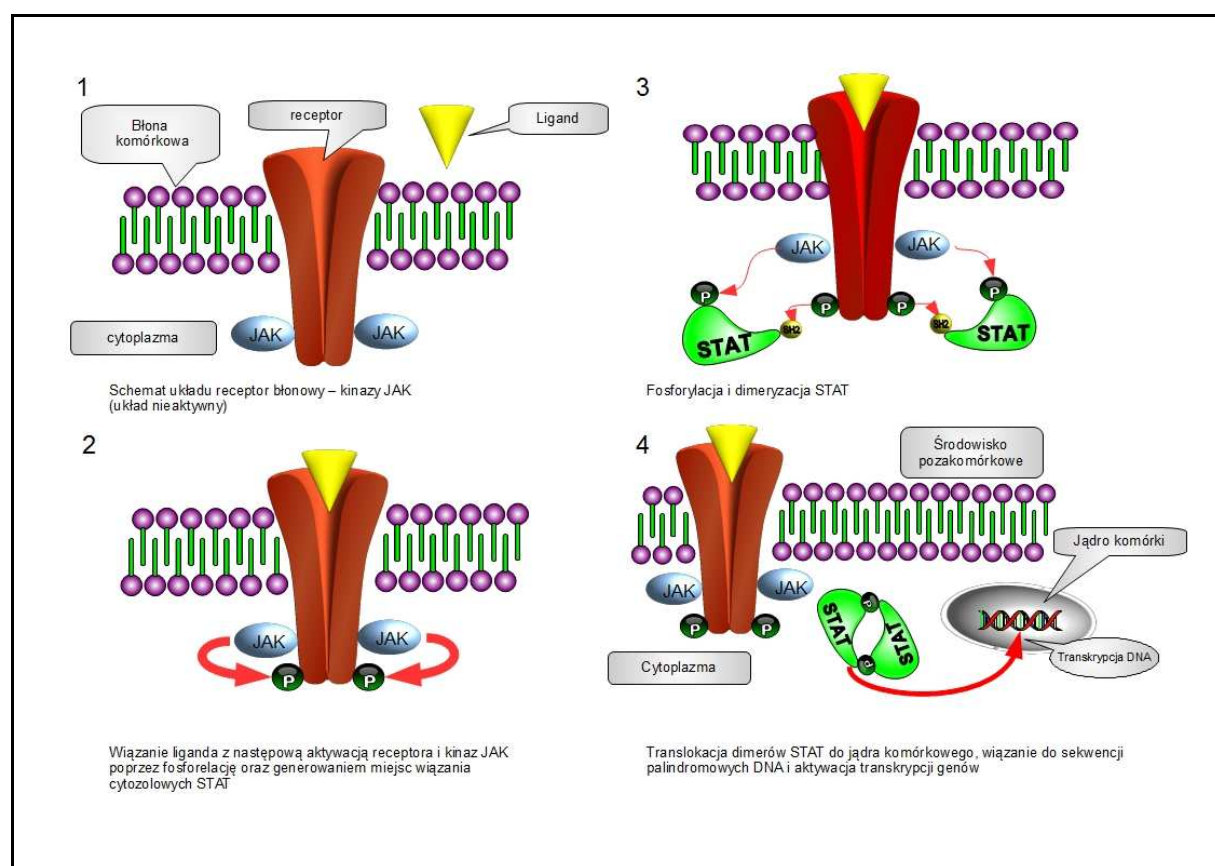
Każda komórka zwierzęca wyposażona jest w szereg błonowych oraz cytoplazmatycznych białek (odpowiednio białka receptorowe oraz przekaźnikowe) umożliwiających wygenerowanie odpowiedzi na różne sygnały pochodzące ze środowiska zewnętrznego lub sygnały wewnętrzne generowane w obrębie organizmu, prowadzące do zmian fizjologicznych, morfologicznych i rozwojowych w te same komórce, tkance, narządzie lub układzie. W ujęciu funkcjonalnym takie wypracowanie odpowiedzi komórkowej łączące się z aktywacją transkrypcji lub zainicjowaniem procesu apoptozy nosi nazwę transdukcji sygnału.

W zależności od pochodzenia lub dedykowanej funkcji pełnionej w organizmie, w komórce zwierzęcej może ulegać ekspresji od jednej do kilku różnych ścieżek transdukcji sygnału. Do jednej z nich, należy układ przekaźnikowy (ścieżka sygnałowa) JaK/STAT (ang. *Janus kinase – signal transducer and activator of transcription*). Ścieżka ta jest układem białek wewnątrzkomórkowych wykorzystywanych przez wiele cytokin i czynników wzrostu do

ekspresji genów, przez które dokonuje się proces aktywacji, proliferacji i różnicowania komórek. Receptory tych związków nie posiadają aktywności enzymatycznej i współdziałają z rodziną białek cytoplazmatycznych o właściwościach kinaz. Połączenie liganda z receptorem błonowym aktywuje związaną z nim kinazę tyrozynową, która ulega autofosforylacji, a następnie fosforyluje zwrotnie cytoplazmatyczne domeny receptora. Do aktywnych domen receptora przyłączają się białka STAT, które po procesie dimeryzacji zostają odłączone od receptora i przemieszczone do jądra komórkowego, gdzie, wiążąc się z DNA odpowiedniego miejsca genu promotorowego, aktywują proces transkrypcji genów [38,39,40,41,42]. Schematyczne funkcjonowanie układu przedstawiono na rycinie 1.

Szlak JaK/STAT jest podstawowym układem przekąźnikowym w populacji krążących monocytów oraz limfocytów, angażując niemal 40 cytokin oraz ich receptorów. Grupa cytokin, w celu wywoływania pożądanych działań fizjologicznych lub patologicznych w organizmie, używa komórkowego mechanizmu pośredniczenia, składającego się w tym przypadku z przetwornika sygnału (grupa białek JaK) oraz ścieżki transdukcji sygnału (STAT) [43]. Od momentu identyfikacji nowych czynników transkrypcyjnych aktywowanych przez interferony, co miało miejsce ponad 18 lat temu [44], szczegółowe badania pozwoliły na identyfikację podstawowych komponentów szlaku JaK/STAT. Należą do nich różnorodne ligandy zewnątrzkomórkowe, receptory transbłonowe, cztery kinazy Janus oraz siedem białek zaliczanych do transduktorów sygnału i aktywatorów transkrypcji (białka STAT) [45].

Rycina 1. Model aktywacji ścieżki JaK/STAT



Cząsteczki STAT obecne są w cytoplazmie w formie nieaktywnych monomerów. W chwili ich angażowania przez kompleks receptor/JaK, zostają kolejno włączane do aktywnych miejsc wiążących na fosforylowanych receptorach, gdzie same ulegają fosforylacji przez kinazy JaK. Następnie, już jako aktywne formy, uwalniane są do cytoplazmy, gdzie formują homo- i heterodimery, przemieszczające się do jądra komórkowego i wiążące się do palindromowych sekwencji DNA (ISRE, GUS). Tam też dochodzi do inicjacji transkrypcji odpowiednich genów [38,42]. Jak dotąd, nie zostało określone, które konfiguracje homo- oraz heterodimerów czynników STAT obecne są w komórce przed, podczas oraz w następstwie stymulacji cytokinami [46].

1.2.1. Kinazy Janus

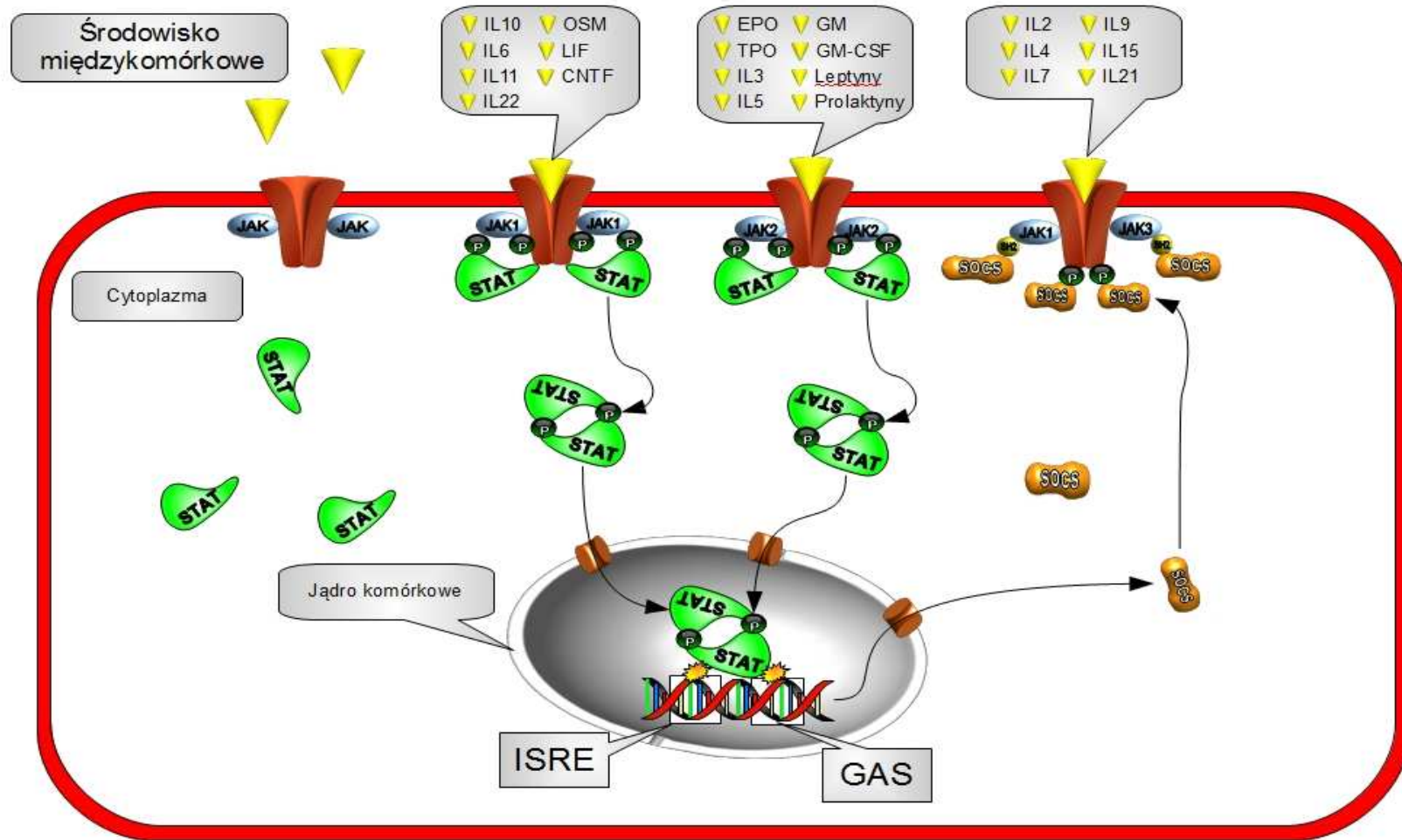
Do rodziny JaK należą cztery kinazy określane jako JaK1, JaK2, JaK3 i TYK2 (kinaza tyrozynowa 2). Ekspresja JaK1, JaK2 i TYK2 jest powszechna, podczas gdy obecność JaK3 ogranicza się jedynie do komórek pochodzenia limfo-hemopoetycznego [40]. Większość spośród 36 receptorów cytokin wykorzystuje zaledwie trzy kombinacje kinaz JaK:

homodimery JaK1-JaK1, JaK2-JaK2 oraz heterodimer JaK1-JaK3. Jak dotąd, nie zostało wyjaśnione podłoże selektywności tych wiązań w stosunku do kombinacji kinaz JaK [47].

Kinazy JaK są białkami wielkości od 120 do 140 kDa, zawierającymi siedem homologicznych domen określanych jako JH1 – JH7 (ang. *Janus homology domain*). JH1 jest domeną kinazową, kluczową dla aktywności enzymatycznej białek rodziny JaK. Jej fosforylacja prowadzi do zmiany konformacji białka, umożliwiającej związanie substratu. JH2 jest domeną pseudokinazową, która najprawdopodobniej hamuje aktywność JH1. Domeny JH3 – JH4 wykazują homologię z domenami SH2 (Src-homology-2). Z kolei N-końcowy fragment białek rodziny JaK zawiera domeny JH4 – JH7, zaangażowane w kontrolowanie interakcji między poszczególnymi kinazami JaK a receptorami cytokinowymi i (lub) innymi kinazami.

Na rycinie 2 przedstawiono informacje dotyczące oddziaływań poszczególnych dimerów JaK z receptorami odpowiednich cytokin.

Model sygnalizacji ścieżki JAK/STAT oraz jej kontroli z udziałem białek SOCS



Rycina 2. Model aktywacji i kontroli ścieżki sygnałowej JaK/STAT z uwzględnieniem rodzaju ligandów pozakomórkowych.

1.2.2. Białka STAT

Rodzina białek STAT odgrywa kluczową rolę w przekaźnictwie sygnału i jest przedmiotem intensywnych badań. Składa się z 7 elementów określanych jako STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b oraz STAT6. Czynniki te funkcjonują w komórce zarówno jako przetworniki sygnału wewnątrzkomórkowego jak i czynniki transkrypcyjne [43]. Białka STAT mogą być podzielone na dwie grupy funkcjonalne [38]. Jedna grupa składa się z czynników STAT2, STAT4 i STAT6, które odgrywają ważną rolę w rozwoju limfocytów T oraz transdukcji sygnału zależnego od IFN- γ . Druga grupa, złożona z białek STAT1, STAT3 i STAT5, jest zaangażowana w przekazywanie sygnału zależnego od hormonu wzrostu, prolaktyny i erytropoetyny. Są też ważnymi regulatorami apoptozy w cyklu komórkowym, a zaburzenia w ich funkcjonowaniu wydają się przyczyniać do rozwoju niektórych form proliferacji komórek nowotworowych [39].

1.2.3. Regulacja transdukcji sygnału ścieżki JaK/STAT

Regulacja szlaku JaK/STAT, podobnie jak innych kaskad sygnalizacyjnych, zachodzi na kilku poziomach. Do podstawowych mechanizmów regulacyjnych należy zaliczyć:

- hamujący wpływ transdukcji sygnału zależny od grupy białek SOCS (ang. *suppressors of cytokine signalling*)
- defosforylacja aktywowanych białek sygnalizacyjnych poprzez cytoplazmatyczne i jądrowe fosfatazy tyrozynowe
- ubikwitynacja defosforylowanych receptorów, prowadząca do ich internalizacji i degradacji w proteasomach [42,48,49,50]
- hamowanie przyłączania aktywowanych białek STAT do ich sekwencji wiążących na DNA poprzez działanie białek inhibujących aktywowane białka STAT (ang. *protein inhibitors of activated STAT, PIAS*) [48].

Dotychczasowe badania naukowe wykazały, że najistotniejszym elementem regulującym szlak JaK/STAT stanowi grupa białek SOCS.

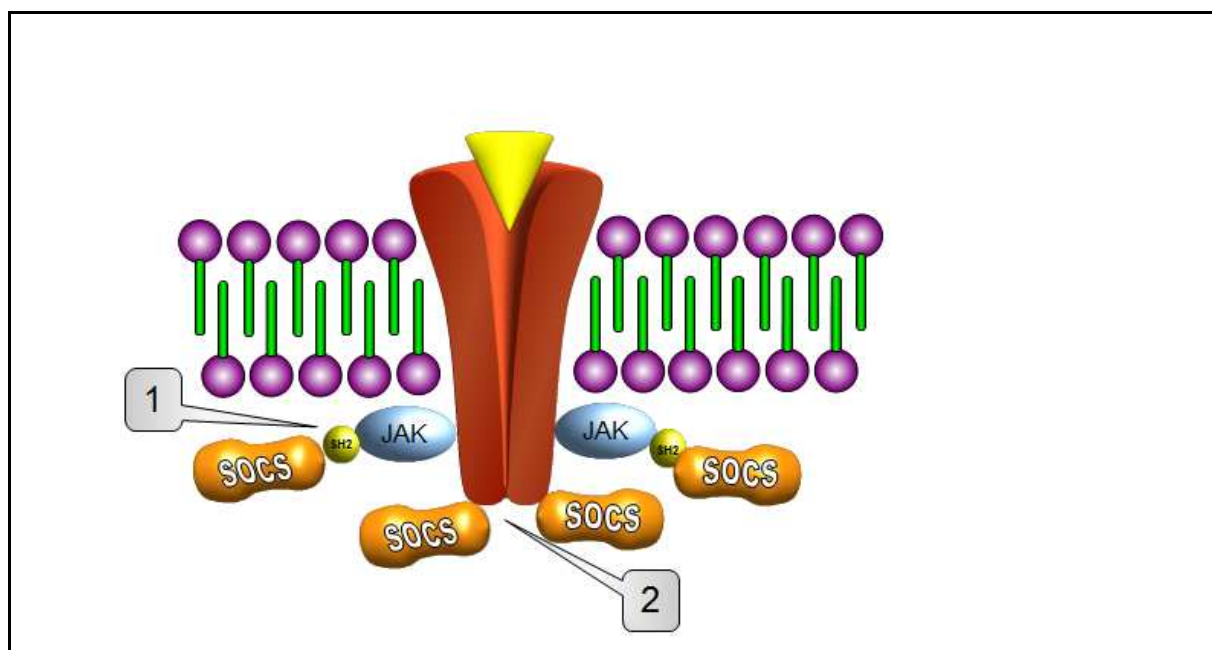
1.2.4. Białka SOCS

Rodzina białek SOCS to grupa białek regulujących wydajność i czas trwania kaskady sygnalizacyjnej cytokin zależnej od szlaku JaK/STAT [43]. Jak dotąd, udało się zidentyfikować osiem cząsteczek należących do tej rodziny. Należą do nich SOCS1 –

SOCS7 oraz białko CIS. Najlepiej zbadanymi elementami tego systemu są białka SOCS1 – 3 a także CIS [51].

Białka z rodziny SOCS wykazują homologię obejmującą centralnie położoną domenę SH2 (Src2 homology), domenę KIR (region inhibicji kinaz) oraz domenę na końcu karboksylowym zawierającą 40-aminokwasowy moduł określany mianem kasety SOCS [51]. Domena SH2 wiąże się do ufosforylowanych receptorów cytokin lub kinaz Janus, hamując sygnały przekazywane przez te cząsteczki. Kasetka SOCS natomiast wiąże kompleksy receptorowe, przeznaczając je do degradacji w proteasomach. Białka SOCS oddziałują zatem na komponenty kompleksu sygnalizacyjnego w dwojaki sposób. Po pierwsze, przez bezpośrednie wiązanie do aktywowanych receptorów cytokin ufosforylowanych w pozycji tyrozyny lub do kinazy JaK poprzez jej domenę SH2, co obrazuje umieszczona poniżej ilustracja (rys.3). Po drugie, związany z kasetą SOCS mechanizm kierujący je do degradacji w proteasomach.

Rycina 3. Model kontroli ścieżki JaK/STAT za pomocą ujemnego sprzężenia zwrotnego z udziałem białek SOCS



- 1) Hamowanie sygnałów przekazywanych przez JaK – wiązanie z kinazą za pomocą domeny SH2
- 2) Wiązanie bezpośrednie kompleksów receptorowych i przekazanie ich na szlak degradacji przez ubiquitynację – wiązanie z receptorem za pomocą kasety SOCS.

Białka SOCS1, SOCS2 i SOCS3 okazały się być wysoce selektywne pod względem regulowania transdukcji sygnału zależnego od cytokin. Proces ten ma charakter dynamiczny zależny od stanu komórki, gdyż czynniki STAT są nieustannie angażowane przez

aktywowane receptory w czasie przekazywania sygnałów, podczas gdy białka SOCS są stale wytwarzane w odpowiedzi na aktywację czynników STAT [52].

Dotychczas przeprowadzone badania umożliwiają zdefiniowanie poszczególnych funkcji białek SOCS, choć ich postulowane dodatkowe znaczenie, niezwiązane z blokowaniem sygnalizacji cytokin, nie zostało jeszcze dostatecznie poznane.

1.2.5. Fizjologiczna funkcja białek SOCS

Od czasu odkrycia białek SOCS, wiele uwagi poświęcono ich fizjo- oraz patologicznemu znaczeniu w ludzkim organizmie. Podczas gdy funkcje fizjologiczne SOCS1, SOCS2, SOCS3 oraz CIS zostały stosunkowo dobrze poznane, niezbyt wiele informacji można uzyskać na temat czynników SOC4–7 [43].

Badania prowadzone w modelu *in vitro* wykazały, że białko SOCS1 może hamować kilka różnych ścieżek transdukcji sygnału, aktywowanych przez IL-4, IL-6, IL-12 oraz INF- γ [53,54,55].

SOCS2 jest ważnym regulatorem proliferacji odgrywającym znaczącą rolę w mediacji sygnału aktywowanego przez hormonu wzrostu [41]. Badania doświadczalne wykazały, że białko to wiąże się z domeną SHP2 aktywowanego receptora dla hormonu wzrostu [56], co przyczynia się do zahamowania aktywacji STAT5b, która jest niezbędna do transkrypcji genu IGF1 [57,58]. Myszy z wyciszonym genem kodującym SOCS2 charakteryzują się klinicznymi wykładnikami gigantyzmu przejawiającego się powiększeniem organów wewnętrznych oraz wzrostu masy ciała o 30-40% w stosunku do myszy zdrowych [59].

Białka SOCS1 i SOCS3 dzielą ze sobą podobieństwa strukturalne, jednak mechanizmy ich działania są odmienne. SOCS3 hamuje kinazy JaK tylko w obecności cząsteczki gp130, spowalniając tym samym aktywność cytokin z rodziny interleukin (zwłaszcza IL-6 czyli czynnika hamującego rozwój białaczki, ang. *leukemia inhibitory factor*) oraz angiotensyny. SOCS3 funkcjonuje zatem jako negatywny regulator zapalenia.

Badania *in vivo* wykazały, że CIS hamuje transdukcję sygnału zależną od erytropoetyny (EPO), IL2, IL3, hormonu wzrostu i prolaktyny poprzez maskowanie miejsc wiązania receptorów STAT5 i, co się z tym wiąże, blokowaniem aktywacji STAT5 [60]. Dodatkowo, CIS spowalnia sygnalizację EPO poprzez ubikwitynację i kierowanie jej receptora do degradacji w proteasomach [61].

1.3. Znaczenie układu JaK/STAT w prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego oraz rozwoju chorób o podłożu auto-immunologicznym

Poznanie funkcjonowania komórek na poziomie molekularnym oraz trwające badania nad patomechanizmem chorób o podłożu auto-immunologicznym, w tym szeregu chorób nerek rozwijających się na podłożu zapalnym, pozwoliły na opracowanie oraz zastosowanie nowych substancji blokujących działanie określonych białek zewnątrzkomórkowych, mających znaczenie w patogenezie tych chorób. Do tych substancji należą przeciwciała skierowane przeciwko czynnikom pro-zapalnym, takim jak TNF- α , IL-1 i IL-6, przeciwciała przeciwko cząsteczce CD20 limfocytów B, których blokada wywołuje apoptozę komórki, czy też przeciwciała hamujące ko-stymulację cząsteczek CD80 i CD86 komórek prezentujących antygen z cząsteczką CD28 limfocytów T. Leki te stosowane są przede wszystkim w terapii artropatii zapalnych, choć podejmowane są próby wykorzystania tych cząsteczek w leczeniu ziarniniaka Wegenera i tocznia rumieniowatego układowego.

Kolejnymi cząsteczkami, tym razem wewnątrzkomórkowymi, które wzbudzają zainteresowanie badaczy i stają się potencjalnymi czynnikami terapeutycznymi, są białka wewnątrzkomórkowego układu przekąźnikowego JaK/STAT. Zaobserwowano m.in., że utrata funkcji poszczególnych kinaz tyrozynowych u myszy skutkuje powstaniem ciężkich uszkodzeń organizmu i często jest letalna. Delecja kinazy JaK1 powoduje poważne uszkodzenia neurologiczne i ciężki wrodzony zespół niedoboru odporności (ang. *severe combined immunodeficiency*, SCID). Utrata funkcji kinazy JaK2 skutkuje między innymi wystąpieniem nieprawidłowości erytropoezy oraz śmiertelnością w życiu płodowym, a utrata genu kinazy TyK2 powoduje zmniejszoną wrażliwość organizmu na infekcje wirusowe oraz oporność na wywołanie indukowanego zapalenia stawów. Natomiast delecja genu kinazy tyrozynowej JaK3 u ludzi nie jest letalna i skutkuje powstaniem ciężkiego wrodzonego zespołu niedoboru odporności (SCID), dziedziczonego autosomalnie dominująco. Myszy o fenotypie JaK3^{-/-} wykazują głębokie niedobory komórek progenitorowych grasicy i mniejszą zdolność odtwarzania rozwoju komórek T oraz poważnie zmniejszoną liczbę obwodowych limfocytów CD8⁺ i komórek NK [62].

Podobny fenotyp SCID jak w przypadku delecji genu JaK3 (T-B+NK⁻), tylko dziedziczony w sposób sprzężony z chromosomem X, powstaje, gdy dochodzi do delecji genu receptora γc . W obydwu przypadkach z powodu braku regulującej funkcji komórek T dochodzi do upośledzenia aktywacji komórek B i zaburzenia produkcji przeciwciał, co klinicznie objawia się hipogammaglobulinemią i zaburzonym wytwarzaniem przeciwciał w odpowiedzi na

immunizację. Okazuje się, że JaK3 pełni niezbędną rolę dla zależnego od receptora γ c rozwoju limfocytów B i T i dla zapobiegania γ c-zależnej apoptozie tymocytów.

Wyniki badań prowadzonych na modelach zwierzęcych wskazują, że kinaza JaK3 przynajmniej w części reguluje limfopoezę przez wybiórczą regulację ekspresji białek Bax i Bcl-2 [63]. Są one czynnikami regulującymi apoptozę. Białko Bax działa proapoptotycznie, natomiast białko Bcl-2 – antyapoptotycznie. Tymocyty oraz obwodowe limfocyty T pozbawione JaK3 wykazywały wysoką ekspresję Bax i zredukowane poziomy Bcl-2 w stosunku do osobników dzikich, co oznacza wysoką podatność tych komórek na apoptozę. U osobników pozbawionych JaK3 dochodziło do zaniku obwodowych limfocytów T i nieprawidłowego stosunku pomiędzy komórkami CD4+ i CD8+. Te dane wskazują, że kinaza JaK3 reguluje przetrwanie komórek przez regulację pro- i antyapoptotycznych białek Bax i Bcl-2.

Opierając się na obserwacjach dotyczących patogenezy SCID można mniemać, że blokada funkcji kinazy JaK3 może stanowić obiecujący element terapii chorób o podłożu autoimmunologicznym, w tym szeregu chorób nerek. Wydaje się, że zablokowanie aktywności JaK3 może skutkować zmniejszeniem odpowiedzi zapalnej i uzyskaniem wycofania objawów choroby. To byłoby możliwe przez zastosowanie sztucznie zsyntetyzowanych inhibitorów JaK3 bądź przez aktywację ekspresji lub aktywności naturalnych inhibitorów układu JaK/STAT. Do tej grupy czynników należą białka SOCS, PIAS i fosfatazy tyrozynowe.

2. Cel

Biorąc pod uwagę dane dotyczące podłoża immunologicznego w patogenezie wtórnego zespołu nerczycowego, można przypuszczać, że również i w grupie idiopatycznych zespołów nerczycowych wyjściowa przyczyna uszkodzenia ultrastruktury bariery filtracyjnej tkwi w nieprawidłowym funkcjonowaniu poszczególnych komórek układu odpornościowego. Ponieważ podstawowym narzędziem komórkowym w populacji krwinek białych wypracowującym odpowiedź na szereg różnych cytokin czy też czynników wzrostu jest ścieżka transdukcji sygnału JaK/STAT, można zakładać, że zaburzenia w funkcjonowaniu tego mechanizmu mogą mieć potencjalne znaczenie w dalszym rozwoju zespołu nerczycowego. Co więcej, zaburzenia te mogą mieć w efekcie dwójaki charakter – potęgujący rozwój choroby lub, przeciwnie, spełniający znaczenie ochronne.

Niezależnie od pierwotnej czy wtórnej przyczyny zespołu nerczycowego, podawanie glikokortykosteroidów stanowi obecnie złoty standard w terapii indukcyjnej. Dopiero brak skutecznej odpowiedzi na tak wdrożone leczenie, pozwala wydzielić grupę pacjentów o niepewnym rokowaniu, w stosunku do których należy rozszerzyć panel stosowanych badań diagnostycznych (również o przeprowadzenie biopsji nerki) umożliwiającą modyfikację lub zastąpienie terapii steroidowej.

Od wielu lat lekarzom specjalizującym się w nefrologii towarzyszy pytanie. Czy mogą istnieć inne, wcześniejsze przesłanki do modyfikacji tej terapii bez konieczności wykonywania biopsji nerki? Czy można określić profil genetyczny pacjentów, zarówno w zakresie analizy sekwencji DNA jak i transkryptomu, który już w pierwszych tygodniach leczenia umożliwiłby wyodrębnienie pacjentów wysokiego ryzyka? Taka optymalizacja procedur diagnostycznych jak i personalizacja leczenia mogłaby nie tylko zmniejszyć ryzyko powikłań jatrogennych (biopsja nerki, wielotygodniowa steroidoterapia), ale również zredukowałaby koszty leczenia.

W związku z powyższym celem niniejszej pracy było

1. oszacowanie wpływu glikokortykosteroidów na ekspresję wszystkich elementów ścieżki sygnalizacyjnej JaK/STAT w leukocytach pacjentów z rozpoznaniem zespołu

nerczycowego na podłożu zmian minimalnych, rozlanej mezangialnej proliferacji oraz ogniskowego stwardnienia kłębuszków nerkowych

2. próba określenia potencjalnego znaczenia zaburzeń funkcjonowania ścieżki JaK/STAT w idiopatycznego zespołu nerczycowego u dzieci
3. próba wyodrębnienia elementów szlaku JaK/STAT o potencjalnym znaczeniu prognostycznym w rozwoju zespołu nerczycowego u dzieci

3. Pacjenci i metody

3.1. Pacjenci

3.1.1. Grupa badana

Grupa badana składała się z 54 dzieci (29 chłopców i 25 dziewczynek) w wieku od 3 do 19 rż.(średnia wieku – $10,1 \pm 4,4$) hospitalizowanych z powodu idiopatycznego zespołu nerczycowego w latach 2008 – 2010 w Klinice Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Na podstawie odpowiedzi na leczenie steroidowe w okresie leczenia indukcyjnego wyodrębniono 34 pacjentów (18 chłopców i 16 dziewczynek) z wrażliwym na steroidy zespołem nerczycowym (SSNS) oraz 20 dzieci z wykładnikami oporności na leki steroidowe w ww. etapie leczenia (SRNS).

Do kryteriów wykluczających udział pacjenta w protokole badawczym zaliczano obecność przynajmniej jednego z niżej wymienionych czynników:

1. wiek < 3 lat oraz > 19 lat
2. współistnienie choroby autoimmunologicznej (np. nefropatii toczniowej, choroby Schoenleina – Henocha), rozpoznanie wtórnego zespołu nerczycowego
3. leczenie erytropoetyną w okresie do 6 miesięcy wstecz przed przystąpieniem pacjenta do badań
4. leczenie czynnikiem pobudzającym kolonie granulocytów i/lub monocytów w okresie do 3 miesięcy wstecz przed przystąpieniem pacjenta do badań
5. prowadzenie jakiegokolwiek terapii jedno- lub wielolekowej modulującej czynność układu immunologicznego w okresie ostatnich 6 miesięcy
6. końcowa niewydolność nerek (ang. *end stage renal disease*, ESRD)

Dwudziestu pacjentów z rozpoznaniem SRNS, w tym 11 chłopców i 9 dziewcząt poddano zabiegowi biopsji nerki zgodnie z rekomendowanymi w naszym kraju zaleceniami *International Study of Kidney Disease in Children (ISKDC)* [64]. W dalszej kolejności, zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia [65], na podstawie analizy

histologicznej (mikroskopia w jasnym polu, mikroskopia fluorescencyjna oraz mikroskopia elektronowa) ujawniono obecność zmian minimalnych (MCD) u 6 pacjentów, rozlaną proliferację mezangium (DMP) u 5 osób oraz ogniskowe segmentowe stwardnienie kłębuszków nerkowych (FSGS) u 9 dzieci.

SSNS oraz SRNS definiowano zgodnie z wytycznymi opisanymi we wstępie niniejszej rozprawy.

Protokół badań został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, (Uchwała nr. 939/09, Załącznik nr.1) a prawni opiekunowie wszystkich pacjentów zakwalifikowanych do badania, po uzyskaniu informacji na temat zakresu prowadzonych obserwacji i kompletowanej dokumentacji medycznej, wyrazili zgodę na uczestnictwo swoich podopiecznych w badaniach (Załącznik nr.2).

3.1.2. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło 10 dzieci (5 chłopców i 5 dziewczynek) w wieku od 3 do 19 rż. (średnia wieku – $12,4 \pm 4,7$), które włączano do protokołu badawczego po wypełnieniu stosownej ankiety dotyczącej wywiadu pacjenta oraz jego rodziny (Załącznik nr.4) i uzyskaniu zgody prawnych opiekunów (Załącznik nr.3). Wszystkie z ww. dzieci były hospitalizowane w Klinice Otolaryngologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu celem wykonania zabiegu rekonstrukcji przegrody nosowej, prezentowały prawidłowe wyniki: badania ogólnego moczu, czynności nerek, morfologii krwi (prawidłowa liczba leukocytów) oraz CRP. Ponadto, kryteria wyłączenia danego pacjenta z grupy kontrolnej były takie same jak w przypadku grupy badanej.

3.1.3. Protokół leczenia

Standardowy tryb postępowania, zgodnie z wytycznymi ISKDC w modyfikacji Kliniki Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej UM w Poznaniu, obejmował podawanie prednizolonu – 60 mg/m²/dobę w 2 dawkach podzielonych przez 6 tygodni przy pierwszym epizodzie ZN, a następnie 40 mg/m²/dobę w jednej dawce co drugi dzień przez kolejne 6 tygodni [66]. Łącznie po 12 tygodniach podawania steroidów, w przypadku utrzymywania się białkomoczu i hipoalbuminemii, stopniowo wycofywano podawanie tych leków i modyfikowano leczenie, wprowadzając inne leki immunosupresyjne (cyklosporyna, cyklofosfamid, mykofenolan mofetylu).

3.2. Metody

Krew w ilości 10 ml pobierano do probówek ze złożem EDTA od wszystkich pacjentów z grupy badanej (n=54) w trakcie rutynowego oznaczenia morfologii krwi oraz od dzieci z grupy kontrolnej (n=10) podczas wykonywania oznaczeń biochemicznych krwi w przededniu wykonania zabiegu operacyjnego rekonstrukcji przegrody nosowej. W grupie badanej krew pobierano dwukrotnie: po raz pierwszy w momencie rozpoznania choroby – przed rozpoczęciem leczenia immunosupresyjnego oraz po raz drugi – po sześciu tygodniach podawania GCS. Działanie takie miało na celu porównanie ewentualnych różnic ekspresji genów ścieżki sygnałowej JaK/STAT w trakcie leczenia immunosupresyjnego oraz określenie potencjalnego diagnostycznego wzoru ekspresji ww. genów w określaniu ryzyka wystąpienia SRNS.

Wyizolowane osocze przechowywano w temperaturze -80°C a następnie oznaczano w nim stężenie biologicznie aktywnych SOCS3, SOCS5, IL-6 i IL-20, stosując technikę ELISA. Dodatkowo, w surowicy krwi pacjentów określano stężenie albumin, lipidów, białka c-reaktywnego (CRP), glukozy, kreatyniny i mocznika z zastosowaniem rutynowych metod laboratoryjnych. Wskaźnik przesączania kłębkowego (ang. *glomerular filtration rate*, GFR) obliczano z kreatyniny stosując wzór Schwartz [67].

Wszystkie etapy analiz przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.2.1. Izolacja leukocytów z krwi obwodowej

Krew pełną w ilości 10 ml odwirowywano przez 30 minut w temperaturze 4°C , z prędkością 400 obrotów/min. Następnie dokonywano rozdziału osocza oraz elementów morfotycznych, które przenoszono do nowego, 50-ml falkonu i zawieszono w 39 ml fizjologicznego roztworu PBS. Na dnie falkonu, pod zawiesiną elementów morfotycznych, umieszczano 11 ml Ficollu, a następnie wirowano 30 min z prędkością 400 obrotów/min., po czym zdejmowano, z pominięciem wytrąconych erytrocytów, powstały supernatant i umieszczano w kolejnym 50 ml falkonie. Po ponownym, 10-minutowym wirowaniu supernatantu, zlewano płyn znad osadu (aż do osuszenia pojemnika), a następnie zawieszano osad w 2 ml TRIzol (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) lub, w zależności od obranej później

metody izolacji RNA, w 2 ml wody (*Nuclear water*). W Tabeli 1 zestawiono odczynniki wykorzystywane w izolacji leukocytów z krwi obwodowej

Tabela 1. Odczynniki wykorzystane do izolacji leukocytów

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
PBS-zbuforowany roztwór soli fizjologicznej bez Ca i Mg	Biomed	
<i>Ficoll-PaqueTM Plus</i>	GE Healthcare	17-1440-02
<i>Trizol-TRI Reagent</i>	(Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)	T9424-100ML

3.2.2. Izolacja komórek jednojądrzastych

Kolejnym etapem było wyizolowanie z uzyskanej mieszaniny monocytów, co wykonywano, stosując system pośredniego znakowania magnetycznego (MACS®, Miltenyi Biotec, Kraków, Polska). Pozostałe komórki nie będące monocytami, tj. limfocyty (limfocyty T, komórki NK, limfocyty B, komórki dendrytyczne), a także granulocyty oznaczano, stosując pośrednie znakowanie magnetyczne z użyciem mieszaniny biotynylowanych przeciwciał skierowanych przeciw CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123, oraz glikoforynie A (MACS®, Miltenyi Biotec). Ponieważ limfocyty stanowiły podstawową część znakowanej frakcji, uznano, że bez dalszego jej oczyszczania można ją uważać za frakcję limfocytów.

3.2.3. Izolacja całkowitego RNA

W pierwszym etapie badań wykonywano izolację RNA metodą z wykorzystaniem TRIZolu. Jest to metoda tradycyjna, starsza, pozwalająca uzyskać RNA w wysokim stężeniu, niestety słabszej jakości – zanieczyszczonego odczynnikami, zwłaszcza samym TRIZolem, co może mieć przełożenie na jakość uzyskiwanych wyników. Po analizie stopnia degradacji i jakości RNA, którą wykonano przez rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym, zdecydowano o wprowadzeniu nowej metody izolacji RNA za pomocą komercyjnego zestawu GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit, firmy EURx.

3.2.3.1. Izolacja RNA z wykorzystaniem TRIzolu

Probówkę z zawiesiną osadu i TRIzolu wirowano przez 10 min w temperaturze 4°C z prędkością 12.000 x g. Wyizolowany supernatant przenoszono do nowych probówek, gdzie, po dodaniu chloroformu w ilości 0,2 ml/1ml supernatantu, dokładnym wymieszaniu i pozostawieniu przez 10 min w temperaturze pokojowej, następował rozdział mieszaniny na trzy fazy: dolną (niepolarną, czerwoną) zawierającą białka i fenol, interfazę zawierającą DNA oraz górną (polarną, bezbarwną) zawierającą RNA. Po dokładnym odwirowaniu górnej fazy (15 min, 12.000 x g) następował etap kolejny – precypitacja. Do falkonu dodawano 0,5 ml izopropanolu, pozostawiano w temperaturze pokojowej na okres 5 – 10 min, następnie ponownie wirowano i usuwano powstały supernatant. Osad zawierający RNA przemywano 1 ml 75% etanolu w celu usunięcia pozostałości izopropanolu i soli. Po kolejnym wirowaniu i ostrożnym usunięciu supernatantu, suszono osad w temperaturze pokojowej, a następnie zawieszano w wodzie DEPT. Ilość wyizolowanego RNA mierzono spektrofotometrycznie z wykorzystaniem urządzenia NanoDrop ND-1000 firmy NanoDrop Technologies. Dodatkowo, jakość otrzymanego izolatu sprawdzano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym, co pozwalało na ocenę stopnia degradacji RNA. W Tabeli 2 przedstawiono odczynniki wykorzystane do izolacji RNA z wykorzystaniem TRIzolu.

Tabela 2. Odczynniki wykorzystane do izolacji RNA przy użyciu TRIzolu

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
TRIzol	(Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)	T9424-100 ML
Chloroform	Sigma	#096K0064
Alkohol izopropylowy	BioShop	CAS# 67-63-0
Etanol 96%	POCH SA	396480111
PBS	Biomed	
DEPC-eter dietylowy kwasu pirowęglowego	Fermentas	R0601
<i>Nuclease-Free Water</i> - woda wolna od nukleaz	Ambion	#AM9930

3.2.3.2. Izolacja RNA z zastosowaniem kolumn EURx

GeneMATRIX to syntetyczne membrany nowej generacji wiążące RNA i DNA, wykorzystujące selektywne właściwości wiązania kwasów nukleinowych przez kompozytowy SiO₂. GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit jest przeznaczony do szybkiej izolacji całkowitego komórkowego RNA. Oczyszczone RNA nie zawiera zanieczyszczeń m.in.: DNA, białka, lipidów, barwników, detergentów czy też soli. W trakcie izolacji RNA próbka zostaje poddana lizie w obecności buforów denaturujących, które inaktywują RNazy komórkowe. Następnie lizat jest wirowany w mini kolumnkach o specjalnej konstrukcji, które rozdrabniają komórkowe DNA, redukują lepkość lizatu i wstępnie oczyszczają preparat, usuwając fragmenty DNA. Dodanie specjalnego buforu oraz etanolu wytwarza warunki do selektywnego wiązania RNA do membrany GeneMATRIX. Podczas krótkiego wirowania następuje wiązanie RNA do membrany, natomiast niezwiązane zanieczyszczenia pozostają w wycieku z kolumny. Ich śladowe pozostałości na membranie są skutecznie usuwane w trakcie dwóch etapów płukania. Elucję oczyszczonego RNA wykonuje się wodą destylowaną, wolną od RNaz.

W nawiązaniu do powyższego, izolację RNA za pomocą kolumn EURx wykonywano w sposób następujący:

W próbówce 2 ml typu Eppendorf wirowano zawiesinę uzyskaną w pierwszym etapie przy prędkości 1000 x g przez 5 min, a następnie ostrożnie wybierano supernatant. Do osadu dodawano 400 µl buforu RL zawierającego β-merkaptotanol i mieszano przez worteksowanie. Lizat przenoszono do mini kolumny homogenizacyjnej umieszczonej w 2 ml próbówce odbierającej i wirowano przez 2 minuty z maksymalną prędkością. Następnie do przesączu dodawano 350 µl 70% etanolu i dokładnie mieszano przez pipetowanie. Całą mieszaninę przenoszono do minikolumny wiążącej umieszczonej w próbówce odbierającej, wirowano przez 1 min z prędkością 11.000 x g, a przesącz wylewano. Następnie do minikolumny dodawano 400 µl buforu płuczącego *Wash DNI* i ponownie wirowano. Przesącz wylewano, powtórnie umieszczano kolumnę w próbówce i wykonywano następne płukanie przez dodanie 650 µl buforu płuczącego *Wash RBW* z następnym wirowaniem przez 1 min przy prędkości 11.000 x g. Ponownie wylewano przesącz i powtarzano płukanie buforem *Wash RBW* w ilości 350 µl i wirowaniem przez 1 min z prędkością 11.000 x g. Następnie mini kolumnę umieszczano w nowej próbówce typu Eppendorf 1,5 ml i dodawano 40-60 µl wody wolnej od RNaz (*RNaze-free*) na środek membrany. Ponownie wirowano przez 1 min z prędkością 11.000 x g, po czym usuwano minikolumnę. Stężenie

otrzymanego RNA mierzono spektrofotometrycznie przy użyciu urządzenia Nano Drop ND-1000, po czym przechowywano w temperaturze 2-8°C lub zamrażano w -20°C. Odczynniki wchodzące w skład zestawu Gene MATRIX Universal RNA Purification Kit przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Odczynniki wykorzystane do izolacji RNA na kolumnkach EURx

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
B-merkaptoetanol (B-ME)	EURx	E3598
Bufor RL	EURx	E3598
70% etanol	EURx	E3598
<i>Wash DNI</i> bufor płuczący	EURx	E3598
<i>Wash RBW</i> bufor płuczący	EURx	E3598
Woda wolna od RNaz- <i>RNase-free</i>	EURx	E3598

3.2.4. Rozdział elektroforetyczny RNA w żelu agarozowym

Jakość otrzymanego RNA sprawdzano poprzez rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym.

Do 100 ml buforu TBE przygotowywanego w laboratorium dodano 1g agarozy i dopełniono do 500 ml wodą. Po ogrzaniu i schłodzeniu oraz dodaniu związku interkalującego (fluoryzującego w świetle UV – bromku etydyny) wylewano roztwór na saneczki z jednoczesnym wytworzeniem dołków dla próbek. Próbki do elektroforezy przygotowywano w probówkach typu Eppendorf, łącząc RNA, marker ciężaru cząsteczkowego Loading Dye 2xRNA oraz H₂O i inkubując przez 10 min w temperaturze 70°C. Po nałożeniu próbek oraz zalaniu żelu buforem przewodzącym, przeprowadzono elektroforezę w aparacie Power Pack Basic pod napięciem 80V. Następnie wykonywano wizualizację żelu pod lampą UV (Gel Doc- Imaging System). W Tabeli 4 zestawiono odczynniki wykorzystane do rozdziału RNA w żelu agarozowym, a w Tabeli 5 przedstawiono skład buforu TBE przygotowanego w laboratorium.

Tabela 4. Odczynniki wykorzystane do rozdzielania RNA w żelu agarozowym

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Agaroz	Abo Prona Basica LE	BGQT1
Bromek etydyny	Sigma	E2028
Odczynnik <i>Loading Dye 2xRNA</i>	Fermentas	#R0641
Woda wolna od nukleaz- <i>Water nuclease-free</i>	Fermentas	R0582

Tabela 5. Bufor TBE

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
<i>TRIS base</i>	Sigma	T1378
Kwas borny		
EDTA 0,5 molowy	Sigma	EDS

3.2.5. Reakcja odwrotnej transkrypcji real time PCR

W reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystywano właściwości polimeraz DNA zależnych od RNA do syntezy nici cDNA na RNA jako matrycy. Wykonywano ją dwuetapowo. Pierwszym etapem było przepisanie RNA na cDNA przy pomocy enzymu odwrotnej transkryptazy, którego produktem jest seria dwuniciowych odcinków cDNA – kopii RNA. Analizy jakości uzyskanego cDNA dokonywano z użyciem primerów *Forward* i *Reverse* dla β -aktyny. Następnie przeprowadzono reakcję PCR celem uzyskania odpowiedniej ilości materiału do analizy genowej szlaku JaK- STAT. Wszystkie reakcje przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu *First Strand cDNA Synthesis Kit* firmy Fermentas, a następnie komercyjnego, gotowego do użycia zestawu do PCR *Master Mix MaximaTMSYBR Green/Fluorescein qPCR* firmy Fermentas.

3.2.5.1. Synteza cDNA

Pierwszym etapem opisywanej metody było przyłączenie starterów *Random Hexamer Primer* w ilości 1 μ l do matrycy RNA (1 μ g – objętość potrzebną do przeprowadzenia reakcji obliczano na podstawie stężenia oznaczonego spektrofotometrycznie) w roztworze z DEPC. Reakcja ta zachodziła podczas 5-minutowej inkubacji w temperaturze 65°C. Następnie przeprowadzono właściwą reakcję odwrotnej transkrypcji, dodając do mieszaniny w probówce kolejno: *5x Reaction Buffer* – 4 μ l, Inhibitor RNaz *Ribo Lock* 20u/ μ l – 1 μ l, *Mix DTP 10 mM* – 2 μ l, odwrotną transkryptazę *M-MuLV* 20u/ μ l – 2 μ l. Po delikatnym

zmieszaniu i wirowaniu, próby inkubowano w temperaturze 25oC przez 5 min, a następnie w temperaturze 37oC przez dalsze 60 min. Reakcję zatrzymywano przez ogrzanie próbówki w temperaturze 70oC w czasie 5 min. Odczynniki zestawu *First Strand cDNA Synthesis Kit* wykorzystane do syntezy cDNA przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Odczynniki wykorzystane do syntezy cDNA

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
<i>Random Hexamer Primer 100</i> uM 0,2ug/ul	Fermentas	#1611
<i>DEPC –treated Water</i>	Fermentas	#1611
<i>5XReaction Buffer 250mM Tris –</i> <i>HCl(pH 8,3)</i>	Fermentas	#1611
<i>RiboLock RNase (20u/ul)</i>	Fermentas	#1611
<i>Mix dNTP 10mM</i>	Fermentas	#1611
Odwrotna transkryptaza M- MuLV 20u/ul	Fermentas	#1611

3.2.5.2. Analiza jakości cDNA

W celu weryfikacji jakości otrzymanego cDNA przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem primerów *Forward* i *Reverse* (F+R) dla β -aktyny. W tym celu dla każdego cDNA przygotowano mieszaninę 12,5 μ l *Master Mix Maxima*, 1 μ l *Primera F+R* oraz 10,5 μ l *Water Nuclease – free*. Następnie dodano do mieszaniny po 1 μ l wcześniej otrzymanego cDNA. Dla każdego pacjenta przygotowano po 4 próby – 2 próby syntezy i 2 próby kontroli negatywnej. Próby umieszczono w termocyclerze – *RealPlex Mastercycler epgradientS* firmy Eppendorf, gdzie przeprowadzono reakcję *real time PCR* (reakcja PCR w czasie rzeczywistym) wg następującego programu (Tabela 7).

Tabela 7. Program amplifikacji produktu genu β -aktyny.

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	94oC	3 min	1
Denaturacja	94oC	30s	35
<i>Annealing</i> (przyłączanie)	58oC	30s	35
Elongacja	72oC	45s	35

Wyniki otrzymano w postaci wykresów dla określonych primerów β -aktyny. W Tabeli 8

przedstawiono wykaz odczynników wykorzystanych do przeprowadzenia analizy jakości cDNA.

Tabela 8. Odczynniki wykorzystane do analizy jakości cDNA.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
<i>Master Mix MaximaTM SYBR(Green/ROXqPCR)</i>	Fermentas	K0171
<i>Primer Forward 0,3uM</i>	Fermentas	
<i>Primer Reverse 0,3uM</i>	Fermentas	
<i>Water nuclease-free</i> –woda wolna od nukleaz	Fermentas	R0582

3.2.5.3. Amplifikacja

Reakcję dla wszystkich prób przeprowadzono za pomocą zestawu *Master Mix MaximaTM SYBR Green/Fluorescein qPCR*. Jest to gotowy do użycia roztwór zoptymalizowanego buforu z polimerazą *MaximaTM Hot Start Taq DNA Polymerase*, *dNTPs*, barwnikiem *SYBR Green I* oraz pasywnym barwnikiem referencyjnym – fluoresceiną. Do mieszaniny dołączone jest dUTP dla dodatkowej kontroli przenoszenia kontaminacji przy użyciu Uracylu DNA glikozydazy (UDG). Barwnik SYBR Green I interkaluje w podwójną strukturę tworzonego DNA, dzięki czemu niepotrzebne jest użycie sond specyficznych do sekwencji. Skład mieszaniny eliminuje niespecyficzną amplifikację oraz powstawanie dimerów starterów.

Reakcję przygotowano podobnie jak do analizy jakości cDNA. Jako matryce dla polimerazy posłużyły preparaty cDNA z leukocytów krwi obwodowej. Mieszanina reakcyjna o objętości 25µl zawierała:

- 12,5 µl *Master Mix MaximaTMSYBR Green*
- 10,5 µl *Water Nuclease free*
- 1 µl primerów *Forward +Reverse*
- 1 µl cDNA

Zastosowano startery zaprojektowane dla poszczególnych genów białek szlaku JaK/STAT. W pierwszym etapie analiz skorzystano z komercyjnego zestawu PCR dla ludzkiego szlaku sygnalizacyjnego JaK/STAT (SA Biosciences, Qiagen, Wrocław, Poland). Gotowa płytki zawierała zliofilizowane primery dla 96 genów, w tym 84 genów szlaku sygnałowego JaK/STAT. Układ ten obejmował wszystkie znane elementy rodziny JaK i STAT, receptory

aktywujące, kofaktory jądra komórkowego, i koaktywatory związane z białkami STAT, geny indukowane przez STAT i negatywne kontrolery tego szlaku (pełna lista badanych genów jest też dostępna pod adresem: sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-039A.html, Tabela 9). U każdego uczestnika badań ekspresję każdego genu docelowego normalizowano wobec endogennej kontroli GAPDH+18S (ΔCT) i porównywano z odnośnikiem ($\Delta\Delta CT$), który stanowiło, jak już wspomniano wcześniej, RNA uzyskane z wyjściowych leukocytów krwi obwodowej pacjentów kontrolnych.

Tabela 9. Czynnościowe grupowanie genów zestawu PCR dla szlaku sygnalizacyjnego JaK/STAT człowieka (zgodnie z

http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-039A.html)

No.	Grupa	Analizowane geny
1.	JaKs	JaK1, JaK2, JaK3, TYK2
2.	Rodzina STAT	STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6
3.	Receptory wiążące i aktywujące białka JaK	CSF1R, CSF2RB, EGFR, EPOR, F2R, GHR, IFNAR1, IFNGR1, IL10RA, IL2RA, IL2RG, IL4R, IL6ST, INSR, MPL, PDGFRA, SH2B1
4.	Aktywność białka adaptorowego SH3/SH2	SH2B2 (APS), CRK, SIT1, SLA2, SRC, STAM
5.	Translokacja jądrowa białek STAT	F2, F2R, STAT1
6.	Fosforylacja tyrozyny białek STAT	F2, F2R, IL20, PPP2R1A, PRLR, STAT1
7.	Czynniki transkrypcyjne lub regulatory wchodzące w interakcję z białkami STAT	<p><u>Dodatnia regulacja transkrypcji:</u> HMGA1, SMAD3. <u>Negatywna regulacja transkrypcji:</u> SLA2, SMAD3, SPI1, STAT3. <u>Aktywność czynnika transkrypcji polimerazy RNA II:</u> JUNB, SP1, USF1. <u>Aktywność koaktywatora transkrypcji:</u> JUNB, YY1. <u>Aktywność korepresora transkrypcji:</u> JUNB, PIAS1, YY1. <u>Aktywność aktywatora transkrypcji:</u> SMAD1, SMAD5, SP1. <u>Inne czynniki transkrypcji i regulatory:</u> CEBPB, CRK, GATA3, IRF1, ISGF3G, JUN, MYC, NFKB1, NR3C1, PPP2R1A, SMAD2, SMAD4.</p>
8.	Geny indukowane białkami STAT	<p><u>Stat1:</u> CXCL9, IRF1, JUNB, NOS2A. <u>Stat3:</u> A2M, BCL2L1, CDKN1A, CRP, FAS (TNFRSF6), IRF1, MMP3, MYC, SOCS1. <u>Stat4:</u> FCGR1A, IFNG, IRF1, MYC. <u>Stat5:</u> CCND1, CDKN1A, IL2RA, IRF1, OSM. <u>Stat6:</u> FCER1A, GATA3, IL4, IL4R. <u>Stat1/Stat1/p48:</u> GBP1. <u>Stat1/Stat2/p48:</u> ISG15 (G1P2), OAS1.</p>
9.	Negatywne regulatory ścieżki JaK/STAT	PIAS1, PIAS2, PTPN1, PTPRC, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5
10.	Apoptoza	BCL2L1, CDKN1A, F2, F2R, FAS (TNFRSF6), IL2RA, NFKB1, PPP2R1A, PRLR, STAT1
11.	Różnicowanie komórek	IL20, IL4, NOS2A, PPP2R1A, SOCS2, SOCS5
12.	Wzrost i/lub przetrwanie komórek	<p><u>Cykl komórkowy:</u> CCND1, CDKN1A, EGFR, F2, F2R, IL2RA, IRF1, JaK2, MYC, PPP2R1A, STAT1. <u>Wzrost komórek:</u> A2M, EGFR, GHR, IFNG, IL4, INSR, OSM, PPP2R1A, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5. <u>Proliferacja komórek:</u> CSF1R, IL2RG, IL4, MPL, OSM, PDGFRA, SMAD3.</p>
13.	Odpowiedź immunologiczna	<p><u>Odpowiedź ostrej fazy:</u> CEBPB, CRP, F2, STAT3. <u>Przetwarzanie antygenu:</u> FCER1A, FCGR1A, PPP2R1A. <u>Humoralna odpowiedź immunologiczna:</u> SH2B2 (APS), CSF1R, CSF2RB, IL4, NFKB1, YY1. <u>Odpowiedź zapalna:</u> CEBPB, CRP, CXCL9, IL10RB, IL20, NFKB1, NOS2A, NR3C1. <u>Aktywacja limfocytów:</u> IL4, PRLR, SIT1, SLA2. <u>Regulatory:</u> CXCL9, FAS (TNFRSF6), ISG15 (G1P2), GBP1, IFNG, IL2RA, IL2RG, IL4, IL4R, IL6ST, IRF1, ISGF3G, OAS1, OSM, STAT5A, STUB1.</p>

3.2.6. Oznaczenie stężenia SOCS3, SOCS5, IL-6 i IL-20 w surowicy krwi

Odmrożone supernatanty ponownie oczyszczano ze strontów przez wirowanie (4000 rpm przez 2 min) a następnie oznaczano w nich zawartość biologicznie aktywnych SOCS3, SOCS5, IL-6 i IL-20. Kolejne szczeble procedur ELISA przeprowadzono zgodnie z zaleceniami wytwórcy. Oznaczenia przeciętnej zawartości SOCS3, SOCS5, IL-6 i IL-20 u każdego pacjenta w obu badaniach (przed i po leczeniu GCS) i w grupie kontrolnej opierano na podwójnym oznaczaniu cytokin na podstawie odczytu spektrofotometru przy długości fali 450 nm.

W badaniach zastosowano następujące zestawy kolorymetryczne ELISA: ¹SOCS-3 *human ELISA system*, ABIN366182 (*antibodies-online GmbH*, Aachen, Germany); ²SOCS-5 *human ELISA system*, ABIN 422766 (*antibodies-online GmbH*); ³*human high sensitivity IL-6 ELISA Kit*, ab46042 (Abcam, Cambridge, UK); ⁴*human IL-20 ELISA Kit*, ABIN415142 (*antibodies-online GmbH*). Dobór poszczególnych testów został podyktowany wynikami oznaczeń poziomu ekspresji genów, które w sposób istotny różniły się w okresie przed rozpoczęciem oraz w trakcie leczenia immunosupresyjnego (szczegółowe dane przedstawiono w rozdziale dokumentującym wyniki).

3.2.7. Reakcje immunocytochemiczne

W celu wykazania ekspresji SOCS3 i SOCS5 w rozmazach zawierających wyizolowane komórki jednojądrzaste znajdujące się we krwi obwodowej, przeprowadzono pośrednią procedurę immunocytochemiczną. Endogenną aktywność peroksydazy blokowano drogą 30 minutowej pre-inkubacji w 3% wodzie utlenionej. Badania immunofluorescencji opierano na wstępnej inkubacji z przeciwciałami swoistymi dla SOCS3 (w rozcieńczeniu 1:10; poliklonalne królicze przeciwciała przeciw antygenowi człowieka; ab16030, Abcam) i SOCS5 (w rozcieńczeniu 1:10; poliklonalne królicze przeciwciała przeciw antygenowi człowieka; ab3695, Abcam). Inkubacja z pierwszorzędowym przeciwciałem była prowadzona w temp. 4°C w ciągu nocy, po czym następowała inkubacja z przeciwciałem drugorzędowym (kozie anty-królicze, znakowane barwnikiem fluorescencyjnym *Alexa Flour 555*; A – 21429; rozcieńczenie 1:200; *Molecular Probes*, MobiTec, Goettingen, Niemcy) w temperaturze 37°C i czasie 30 min. Rezultaty reakcji obserwowano w świetle fluorescencyjnym pod mikroskopem Olympus BX60. Fotografie wykonywano korzystając z

kamery CCD sprzężonej z programem do analizy obrazów (*Soft Imaging System*, Olympus, Muenster, Niemcy). Analizę przeprowadzano w sposób ślepy, na kodowanych próbach.

W oparciu o wyniki barwienia hematologicznego, analizowane z użyciem morfometrycznego programu *MicroImage* (Olympus) oznaczano zawartość komórek immuno-dodatnich, porównując liczbę takich komórek z całkowitą liczbą komórek jądrzastych. Zawartość komórek dodatnich < 5% klasyfikowano jako wynik ujemny.

3.2.8. Test przesiewowy ekspresji szlaku sygnalizacyjnego kinaz Janus

Jak już wspomniano wcześniej, w pierwszym etapie badań dokonano swego rodzaju testu przesiewowego z wykorzystaniem płytek *SuperArray*. Ten rodzaj analizy zastosowano w przypadku 15 pacjentów z zespołem nerczycowym (7 pacjentów z rozpoznaniem SRNS oraz 8 z rozpoznaniem SSNS). Otrzymane wyniki nie pozwoliły jednak na jednoznaczną analizę, z uwagi na fakt, że geny ligandów (głównie cytokin) wykazywały zmiany ekspresji na tyle silne, iż maskowały wyniki dla kluczowych genów szlaku JaK/STAT. Za główną przyczynę takiego rozkładu uznano zaburzenia immunologiczne wywołane m.in. aktualnym etapem leczenia i czasem trwania choroby w dniu pobrania krwi do badań. Z tego względu do właściwych analiz wyselekcjonowano jedynie kluczowe „geny kandydujące” dla funkcjonowania szlaku sygnalizacyjnego kinaz Janus z pominięciem ligandów aktywujących szlak, których uwzględnienie utrudniało analizę ze względu na występowanie reakcji krzyżowych. Dodatkowo, rozbudowano także zakres informacji klinicznych zebranych na temat poszczególnych pacjentów, ze szczególnym uwzględnieniem historii leczenia oraz aktualnej terapii (w dniu pobrania krwi).

We właściwych, następczych analizach badano następujące geny: *JaK1*, *JaK2*, *JaK3*, *TYK2*, *STAT1*, *STAT2*, *STAT6*, *SOCS1*, *SOCS2*, *SOCS3*, *SOCS4*, *SOCS5*. Jako próbę odniesienia badano następujące geny referencyjne: *ACTB*, *hMRPL* oraz *HPRT*. W tym celu wykorzystano gotowe primery produkowane przez firmę *SA Biosciences*. Amplifikację produktów przeprowadzono w termocyklerze: *RealPlex Mastercycler egradientS* firmy *Eppendorf* według następującego programu (Tabela 10).

Tabela 10. Program amplifikacji produktów genów szlaku JaK/STAT.

Étap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	94oC	3 min	1
Denaturacja	94oC	30 s	35
Annealing (przyłączanie)	58oC	30 s	35
Elongacja	72oC	45 s	35

Po ostatnim cyklu następowało liniowe, stopniowe ogrzanie próbek do 95oC przez 20 min w celu znalezienia dokładnego punktu rozpadu nici DNA (kontrola jakości).

3.2.9. Analiza statystyczna

Po wykonaniu amplifikacji w technice real time PCR otrzymano surowe dane, które zostały wyeksportowane w postaci plików w formacie xls. Zebrane wyniki obejmowały informacje dotyczące wartości Ct dla wszystkich analizowanych genów zarówno w grupie pacjentów badanych, jak i w grupie kontrolnej (osoby zdrowe). Następnie utworzono dokument w programie Excel, w którym w odpowiednich kolumnach zebrano otrzymane wyniki. Dla każdej analizowanej osoby obliczono średnią wartość Ct dla trzech badanych genów referencyjnych. W kolejnym etapie dla każdej osoby obliczono wartość delta Ct osobno dla każdego genu szlaku JaK/STAT poprzez określenie różnicy między wartością Ct danego genu szlaku JaK/STAT, a średnią wartością Ct trzech genów referencyjnych u danej osoby. Następnie, tylko dla grupy kontrolnej, dla każdego genu szlaku JaK/STAT obliczono średnią wartość delta Ct oraz określono jej odchylenie standardowe. Ponadto, bazując na odchyleniu standardowym, dla każdego genu szlaku obliczono średnią wartość minimalną oraz maksymalną w grupie kontrolnej. Wartości te obrazowały zakres wartości Ct występujący w obrębie analizowanej grupy kontrolnej. W przypadku późniejszych analiz, dotyczących pacjentów, wartości te wyznaczały granice uznania zmian ekspresji genu za istotną. Po wykonaniu obliczeń dotyczących grupy kontrolnej, wykonano analizę zmiany ekspresji u pacjentów z zespołem nerczycowym. Dla każdego pacjenta, osobno dla każdego badanego genu, obliczono wartość delta Ct w sposób analogiczny do grupy kontrolnej. Następnie dla każdego genu obliczono wartość Δ delta Ct poprzez określenie różnicy między wartością delta Ct danego genu szlaku JaK/STAT u danego pacjenta, a średnią z wartością delta Ct tego genu obliczoną dla wszystkich osób z grupy kontrolnej. W celu obliczenia krotności zmiany ekspresji danego genu szlaku JaK/STAT u badanego pacjenta, obliczono następującą wartość: $2^{(-\Delta \Delta Ct)}$. Otrzymany wynik większy od 1 bezpośrednio informował

o krotności wzrostu ekspresji, natomiast spadek ekspresji i jego krotność wyrażona była w postaci ułamka dziesiętnego. Aby określić, czy otrzymana wartość krotności zmiany ekspresji u danego pacjenta była istotna w odniesieniu do grupy kontrolnej, wartość delta Ct dla każdego genu porównano z obliczonymi wcześniej wartościami minimalną oraz maksymalną. Istotny wynik zmian ekspresji dla danego pacjenta określono, gdy spełnione były następujące warunki:

1. wartość delta Ct badanego genu szlaku JaK/STAT u pacjenta nie zawierała się w zakresie średniej minimalnej i maksymalnej wartości delta Ct w grupie kontrolnej
2. obliczona krotność zmian ekspresji wykraczała poza wartość 4

Wszystkie zmienne ciągłe lub przedziałowe wyrażano jako średnie \pm SD. Dane porównywano, stosując dla wyników zgodnych z rozkładem normalnym - test *t* Studenta dla grup zależnych i niezależnych. Analizę różnej ekspresji genów wśród uczestników badań dla oceny wyników niezgodnych z krzywą Gaussa, przeprowadzano stosując test *U* Manna-Whitney'a dla grup niezależnych, natomiast dla grup zależnych – test Wilcoxon. Ogólną metodą dopasowania alfa we wszystkich mnogich porównaniach w obecnych badaniach było wprowadzenie poprawki Bonferoniego. $P < 0.05$ uznano za próg statystycznej istotności różnic lub korelacji [68].

4. Wyniki

4.1. Obserwacja kliniczna

W poniższej analizie i dyskusji termin 'grupa badana' odnosi się do wszystkich 54 dzieci analizowanych przed rozpoczęciem leczenia. W ciągu realizacji protokołu badań 34 pacjentów odpowiedziało na leczenie steroidami (pacjenci SSNS, podgrupa 1) a 20 dzieci nie wykazało pozytywnej odpowiedzi na ten rodzaj leczenia (pacjenci SRNS, podgrupa 2). Przed podjęciem leczenia wszyscy pacjenci tworzący podgrupy 1 i 2 nie różnili się od siebie pod względem podstawowych parametrów biochemicznych (stężenie kreatyniny, mocznika, lipidów i cholesterolu), mieli podobną liczbę leukocytów we krwi obwodowej oraz odsetek limfocytów. Analogicznie, wszyscy pacjenci zakwalifikowani do grupy badanej mieli podobne stężenie białka C-reaktywnego oraz wartość GFR. Również odsetek dzieci ze zdiagnozowaną przed rozpoczęciem leczenia erytrocyturią w obydwu podgrupach był porównywalny. Jedyną istotną statystycznie różnicą było stężenie albumin w surowicy krwi ($3,0 \pm 0,7$ mg/dl wobec $2,3 \pm 0,8$ mg/dl odpowiednio w podgrupie 1 i podgrupie 2.; $p < 0,05$) i poziom białkomoczu (44 ± 12 mg/kg/24h wobec 92 ± 33 mg/kg/24h; $p < 0,05$). Powyższe dane zebrano w Tabeli 11.

Po 6 tygodniach podawania steroidów wykazano obecność białkomoczu oraz hipoalbuminemii wyłącznie w podgrupie 2. Zgodnie z wytycznymi ISKDC oraz Światowej Organizacji Zdrowia w tej grupie pacjentów wykonano biopsję nerki oraz systematycznie wycofywano się z podawania steroidów na rzecz innych leków immunosupresyjnych (cyklosporyna, cyklofosfamid, mykofenolan mofetylu).

Na podstawie analizy histologicznej bioptatu nerki (mikroskopia w jasnym polu, mikroskopia fluorescencyjna oraz mikroskopia elektronowa) ujawniono obecność zmian minimalnych (MCD) u 6 pacjentów, rozlaną proliferację mezangium (DMP) u 5 osób oraz ogniskowe segmentowe stwardnienie kłębuszków nerkowych (FSGS) u 9 dzieci.

Tabela 11. Charakterystyka biochemiczna badanej populacji przed początkiem leczenia.

Cecha	Badana populacja	
	SSNS – podgrupa I	SRNS – podgrupa II
Białkomocz (mg/kg/24h)	44 ± 12	92 ± 33*
Erytrocyturia (% of patients)	23,5	20
GFR (ml/min/1,73m ²)	97 ± 7	89 ± 7
Albuminy w surowicy (g/dl)	3,0 ± 0,7	2,3 ± 0,8*
CRP (mg/dl)	< 0,5	< 0,5
Kreatynina (mg/dl)	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2
Mocznik (mg/dl)	25 ± 6	29 ± 8
Trójglicerydy (mg/dl)	158 ± 25	165 ± 21
Cholesterol (mg/dl)	182 ± 25	201 ± 24
Leukocytoza (G/l)	5,6 ± 1,2	5,7 ± 2,3
Limfocytoza (% leukocytów)	28 ± 12	32 ± 16

SSNS = steroidowrażliwy zespół nerczycowy; SRNS = steroidooporny zespół nerczycowy;

*= istotne statystycznie (p < 0,05)

4.2. Ekspresja składowych ścieżki sygnałowej JaK/STAT w populacji obwodowych monocytów oraz limfocytów

Ekspresja szlaku sygnalizacyjnego JaK/STAT w krążących agranulocytach (monocytach i limfocytach) u wszystkich pacjentów z grupy badanej była analizowana dwukrotnie: przed rozpoczęciem leczenia oraz po 6 tygodniach, gdy odpowiedź na leczenie sterydami pozwoliła na zróżnicowanie pacjentów SSNS (podgrupa 1) oraz SRNS (podgrupa 2). Wyniki pierwszej, wstępnej analizy porównano z ekspresją mRNA w grupie kontrolnej (Tabela 12), w której analiza ekspresji elementów ścieżki sygnałowej JaK/STAT była analizowana jednokrotnie. Działanie takie, oparte o standardy wykonywania badań przesiewowych, pozwoliło na wyodrębnienie 'genów kandydujących', w skład których zaliczono: JaK1, JaK2, JaK3, STAT1, STAT2, STAT6, TYK2, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4 i SOCS5. Co ciekawe, ekspresja mRNA dla ww. genów była około 10x większa w porównaniu do ekspresji tych samych genów oznaczonych w grupie kontrolnej i nie różniła się w obrębie izolowanych populacji monocytów i limfocytów. Ekspresja mRNA dla

pozostałych analizowanych genów (z wyjątkiem wymienionych w Tabeli 13) nie różniła się istotnie od ekspresji w grupie kontrolnej i stąd geny te wyeliminowano z dalszych badań.

Tabela 12. Uśrednione wartości zmiany ekspresji “genów-kandydujących” szlaku sygnalizacyjnego JaK/STAT w leukocytach obwodowych (monocytach i limfocytach) badanych dzieci (podgrupy I i II) oraz grupy kontrolnej w czasie rozpoznania i po 6 tygodniach steroidoterapii.

Gen	Uśrednione wartości zmiany ekspresji genów							
	Grupa badana w czasie rozpoznania w porównaniu z kontrolami		Podgrupa I po 6 tyg. leczenia w porównaniu ze stanem w czasie rozpoznania		Podgrupa II po 6 tyg. leczenia w porównaniu ze stanem w czasie rozpoznania		Podgrupa II po 6 tyg. leczenia w porównaniu z podgrupą I po 6 tyg. leczenia	
	Zmiana ekspresji	<i>P</i>	Zmiana ekspresji	<i>p</i>	Zmiana ekspresji	<i>p</i>	Zmiana ekspresji	<i>p</i>
<i>JaK1</i>	22,3 (↑)	0,0006	28,3 (↓)	0,0004	29,1 (↓)	0,0005	4,7 (↓)	ns
<i>JaK2</i>	12,8 (↑)	0,0052	12,8 (↓)	0,0048	17,4 (↓)	0,0086	3,8 (↓)	ns
<i>JaK3</i>	27,1 (↑)	0,002	13,8 (↓)	0,0042	16,3 (↓)	0,0038	8,6 (↓)	ns
<i>STAT1</i>	19,4 (↑)	0,0016	21,6 (↓)	0,0035	14,9 (↓)	0,0018	9,2 (↓)	ns
<i>STAT2</i>	48,1 (↑)	< 0,0001	34,1 (↓)	0,0001	32,3 (↓)	0,0001	7,4 (↓)	ns
<i>STAT6</i>	11,3 (↑)	0,0079	15,9 (↓)	0,0174	15,8 (↓)	0,0086	6,6 (↓)	ns
<i>TYK2</i>	17,5 (↑)	0,0413	21,6 (↓)	0,0064	16,3 (↓)	0,0058	3,7 (↓)	ns
<i>SOCS1</i>	24,8 (↑)	0,0413	14,7 (↓)	0,0064	12,1 (↓)	0,0214	8,2 (↓)	ns
<i>SOCS2</i>	26,1 (↑)	0,0027	32,9 (↓)	0,0018	16,2 (↓)	0,0024	7,4 (↓)	ns
<i>SOCS3</i>	32,7 (↑)	0,0021	29,1 (↓)	0,0005	2,4 (↑)	ns	22,5 (↑)	0,0005
<i>SOCS4</i>	18,3 (↑)	0,0005	28,8 (↓)	0,0006	29,3 (↓)	0,0004	3,9 (↓)	ns
<i>SOCS5</i>	19,6 (↑)	0,0085	22,7 (↓)	0,0086	3,5 (↑)	ns	13,6 (↑)	0,0086

Zmiana ekspresji = wielokrotność zmiany ekspresji

↑ = wzrost ekspresji genu; ↓ = spadek ekspresji genu;

ns = nie istotne statystycznie;

Wyniki drugiej analizy wyżej wspomnianych 'genów kandydujących' porównano statystycznie z wynikami analizy pierwszej – przed rozpoczęciem leczenia, w chwili rozpoznania, a także porównano je między pacjentami SSNS oraz SRNS (Tabela 12). U

dzieci z podgrupy 1, wstępnie podwyższona ekspresja wszystkich 'genów kandydujących' uległa zredukowaniu do zakresu kontrolnego. Podobnie u pacjentów z SRNS (podgrupa 2) podwyższone poziomy ekspresji mRNA dla niemal wszystkich 'genów-kandydujących' uległy obniżeniu z wyjątkiem ekspresji mRNA dla SOCS3 i SOCS5. Należy zauważyć, że ekspresja SOCS3 (ale nie ekspresja SOCS5) była podwyższona w krążących monocytach pacjentów podgrupy II w porównaniu z pacjentami podgrupy I ($p = 0,0005$). Przeciwnie, ekspresja SOCS5 (ale nie SOCS3) była podwyższona w limfocytach pacjentów z SRNS w porównaniu z pacjentami SSNS ($p = 0,0086$). Wyniki te wykazywały również silną dodatni korelację z nasileniem białkomoczu oraz obniżeniem stężenia albumin surowicy krwi pacjentów z zespołem nerczycowym.

Co nie mniej istotne, ekspresje SOCS3 i SOCS5 utrzymywały się na niezmiennie podwyższonym poziomie u wszystkich pacjentów z SRNS po 6-tygodniowym okresie podawania glikokortykosteroidów niezależnie od typu histologicznego glomerulopatii (MCD, DMP lub FSGS).

4.3. Ekspresja pozostałych genów uczestniczących w odpowiedzi immunologicznej i różnicowaniu komórkowym w obwodowych monocytach i limfocytach

Jak już przedstawiono w Tabeli 9, kompleksowa analiza całego układu JaK/STAT z zastosowaniem płytek SA Biosciences pozwalała przeanalizować różnice w ekspresji nie tylko poszczególnych elementów samej ścieżki sygnalizacyjnej, ale również ekspresję genów indukowanych przez grupę białek STAT oraz geny biorące udział w odpowiedzi immunologicznej.

Okazało się, że pacjenci SSNS, podobnie jak dzieci zakwalifikowane do grupy kontrolnej, nie wykazały podwyższonej ekspresji żadnych innych genów aniżeli tych, które zostały wymienione w Tabeli 12. Jednakże pacjenci SRNS, zarówno przed rozpoczęciem leczenia jak po 6 tygodniach podawania steroidów wykazywali istotnie wyższą ekspresję IL-20, IL-4R, IL-6ST oraz licznych czynników transkrypcyjnych: JUN, MPL, MYC, SP1 i SRC. Szczegółowe dane zsumowano w Tabeli 13.

Tabela 13. Korelacja uśrednionej zmiany ekspresji genów IL-20, IL-4R, IL-6ST, JUN, MPL, MYC, SP 1 i SRC w leukocytach obwodowych (monocytych i limfocytach) dzieci badanych (podgrupy I i II) i grupy kontrolnej w czasie rozpoznania i po 6 tygodniach steroidoterapii.

Gen	Zmiana ekspresji genu							
	Podgrupa I w czasie rozpoznania wobec kontroli		Podgrupa I po 6 tyg. leczenia wobec kontroli		Podgrupa II w czasie rozpoznania wobec kontroli		Podgrupa II po 6 tyg. leczenia wobec kontroli	
	Zmiana ekspresji	P	Zmiana ekspresji	p	Zmiana ekspresji	p	Zmiana ekspresji	p
<i>IL-20</i>	0,8 (↑)	Ns	0,4 (↑)	ns	167,8 (↑)	< 0,0001	172,1 (↑)	< 0,0001
<i>IL-4R</i>	2,1 (↑)	Ns	1,9 (↑)	ns	34,5 (↑)	< 0,0001	67,3 (↑)	< 0,0001
<i>IL-6ST</i>	1,1 (↑)	Ns	1,3 (↑)	ns	16,9 (↑)	< 0,0001	12,9 (↑)	< 0,0001
<i>JUN</i>	1,9 (↓)	Ns	1,1 (↓)	ns	109,2 (↑)	< 0,0001	121,5 (↑)	< 0,0001
<i>MPL</i>	1,6 (↓)	ns	0,9 (↓)	ns	99,8 (↑)	< 0,0001	78,3 (↑)	< 0,0001
<i>MYC</i>	0,3 (↑)	ns	0,5 (↑)	ns	110,7 (↑)	< 0,0001	119,3 (↑)	< 0,0001
<i>SP1</i>	0,8 (↓)	ns	0,6 (↓)	ns	39,2 (↑)	< 0,0001	38,2 (↑)	< 0,0001
<i>SRC</i>	0,9 (↑)	ns	1,3 (↑)	ns	32,7 (↑)	< 0,0001	29,7 (↑)	< 0,0001

Zmiana ekspresji = wielokrotność zmiany ekspresji

↑ = wzrost ekspresji genu; ↓ = spadek ekspresji genu;

ns = nie istotne statystycznie;

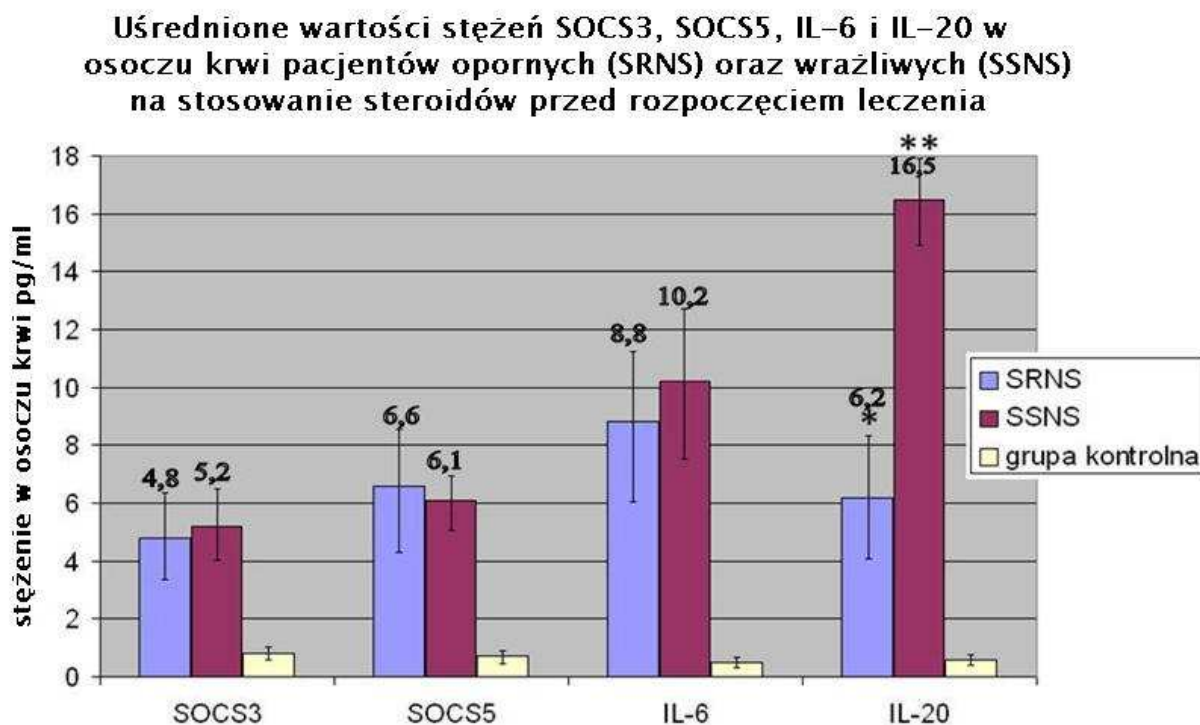
IL-20, podobnie jak wszystkie czynniki transkrypcyjne ulegały ekspresji wyłącznie w krążących monocytach. Z drugiej strony, IL-4R i IL-6ST wykazywały podwyższoną ekspresję tak w krążących monocytach jak limfocytach a poziom ich ekspresji nie różnił się między grupami. Co ciekawe, ekspresje IL-20, IL-4R, IL-6ST, JUN, MPL, MYC, SP1 i SRC nie różniły się istotnie między pacjentami z MCD, DMP i FSGS na początku leczenia jak i po 6 tygodniach podawania steroidów.

W związku z powyższym, w dalszym etapie badań postanowiono oznaczyć osoczowe wartości stężenia białek SOCS3, SOCS5, IL-6 oraz IL-20 u pacjentów SRNS oraz pacjentów SSNS przed rozpoczęciem terapii immunosupresyjnej oraz po 6 tygodniach leczenia z wykorzystaniem steroidów.

4.4. Podwyższone stężenia SOCS3, SOCS5, IL-6 i IL-20 w osoczu krwi pacjentów SRNS i SSNS przed wprowadzeniem steroidów.

Osoczkowe stężenia SOCS3, SOCS5, IL-6 i IL-20 oznaczone przed podawaniem steroidów były istotnie podwyższone zarówno u pacjentów SRNS jak i SSNS w porównaniu do dzieci należących do grupy kontrolnej. Przeciętne stężenie osoczkowe SOCS3 u tych pacjentów wyniosło $4,8 \pm 2,9$ pg/ml (pacjenci SRNS) i $5,2 \pm 2,5$ (pacjenci SSNS; $p < 0,001$ w porównaniu z grupą kontrolną). U pacjentów z rozpoznaniem SRNS przeciętne stężenie osoczkowe SOCS5 wyniosło $6,6 \pm 4,2$ pg/ml a u pacjentów z SSNS $6,1 \pm 1,8$ pg/ml ($p < 0,0001$ w porównaniu z kontrolami). IL-6 była również istotnie podwyższona u pacjentów z SRNS i pacjentów z SSNS i jej przeciętna zawartość wynosiła odpowiednio $8,8 \pm 5,3$ pg/ml i $10,2 \pm 5,2$ pg/ml ($p < 0,0001$ w porównaniu z kontrolami). Wreszcie średnie stężenie osoczkowe IL-20 wyniosło $6,2 \pm 4,3$ pg/ml u pacjentów z SRNS a $16,5 \pm 3,2$ pg/ml u dzieci z SSNS ($p < 0,005$ przy porównaniu SRNS do SSNS; $p < 0,0001$ przy porównaniu SSNS z kontrolami). Dane te zaprezentowano na Rycinie 4.

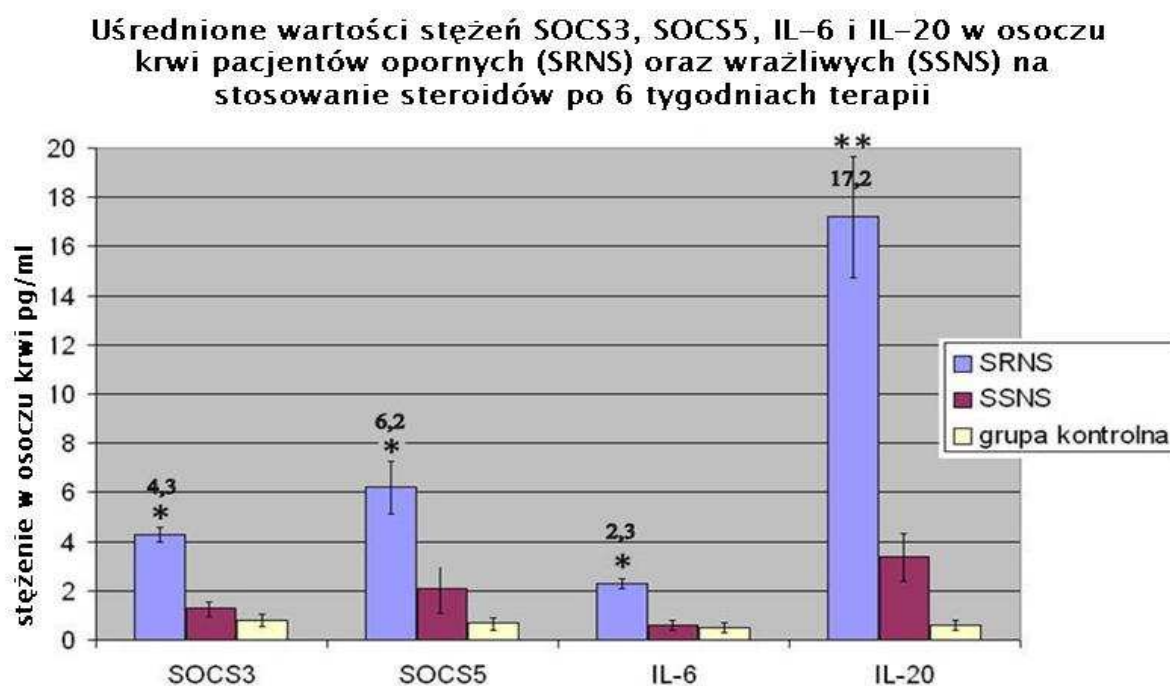
Rycina 4. Średnie stężenia osoczkowe SOCS3, SOCS5, IL-6 i IL-20 u pacjentów SRNS i SSNS przed rozpoczęciem steroidoterapii.



4.5. Podwyższone stężenia SOCS3, SOCS5, IL-6 i IL-20 w osoczu krwi pacjentów z SRNS po 6 tygodniach leczenia glikokortykosteroidami

Osozowe stężenia SOCS3, SOCS5, IL-6 i IL-20 oznaczane po 6 tygodniach leczenia immunosupresyjnego z zastosowaniem steroidów były istotnie podwyższone wyłącznie u pacjentów z rozpoznaniem SRNS. Te same stężenia u pacjentów SSNS badane w ww. okresie były porównywalne do wartości oznaczonych u dzieci zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. Średnie stężenie osoczowe SOCS3 u pacjentów z SRNS wyniosło $4,3 \pm 0,6$ pg/ml ($p < 0,05$ w porównaniu z pacjentami z SSNS po 6-tygodniowym leczeniu steroidami; $p < 0,0001$ w porównaniu z pacjentami kontrolnymi). Przeciętne stężenie osoczowe SOCS5 u pacjentów z SRNS wyniosło $6,2 \pm 2,1$ pg/ml ($p < 0,05$ w porównaniu do pacjentów z SSNS po 6-tygodniowym leczeniu immunosupresyjnym; $p < 0,0001$ w porównaniu do kontroli). Również poziom IL-6 był istotnie podwyższony u pacjentów z SRNS i wynosił średnio $2,3 \pm 0,4$ pg/ml ($p < 0,05$ tak w porównaniu do pacjentów z SSNS po 6-tygodniowym podawaniu leków steroidowych jak i w stosunku do kontroli). Wreszcie średnie stężenie osoczowe IL-20 wyniosło $17,2 \pm 5,0$ pg/ml ($p < 0,0001$ w porównaniu do pacjentów SSNS i pacjentów kontrolnych). Dane te zsumowano na Rycinie 5.

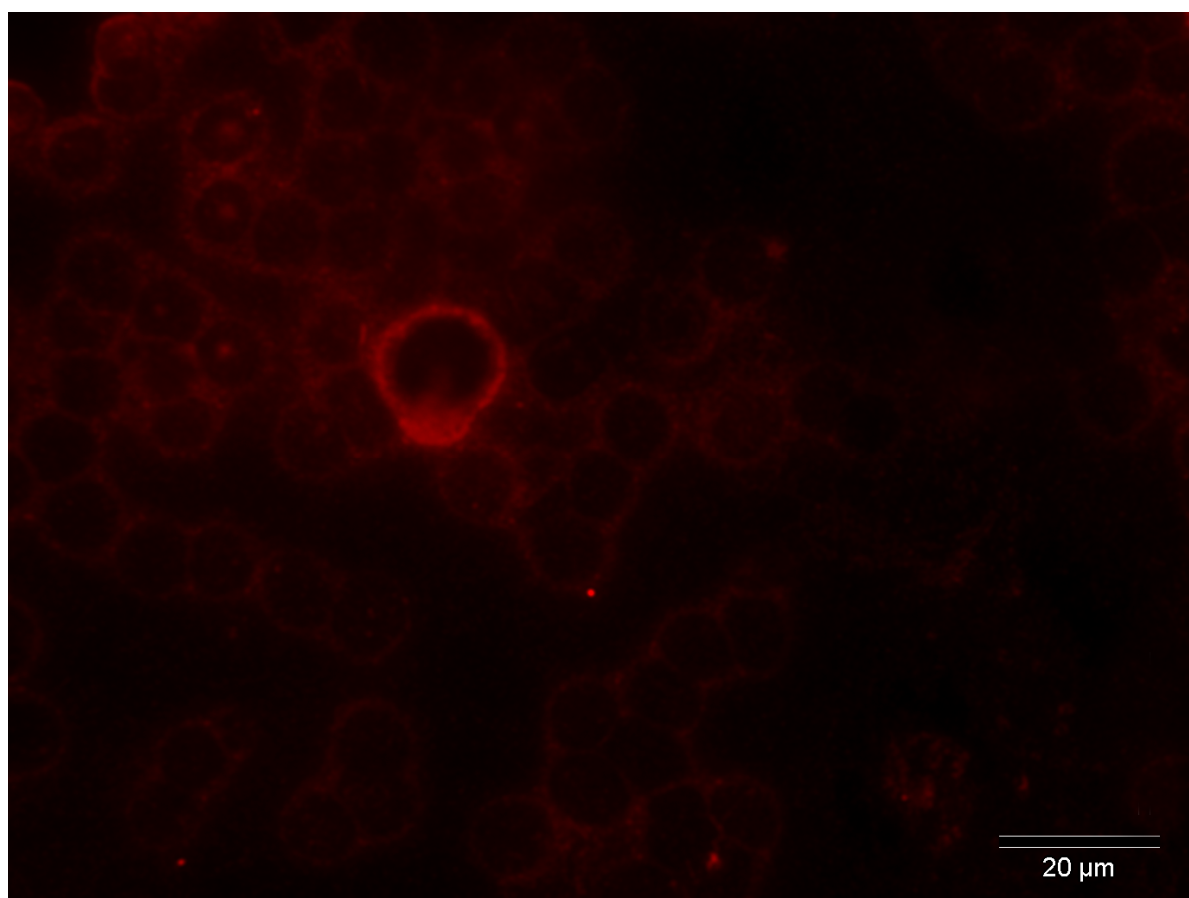
Rycina 5. Średnie stężenia osoczowe SOCS3, SOCS5, IL-6 i IL-20 u pacjentów SRNS i SSNS po 6 tygodniach steroidoterapii.



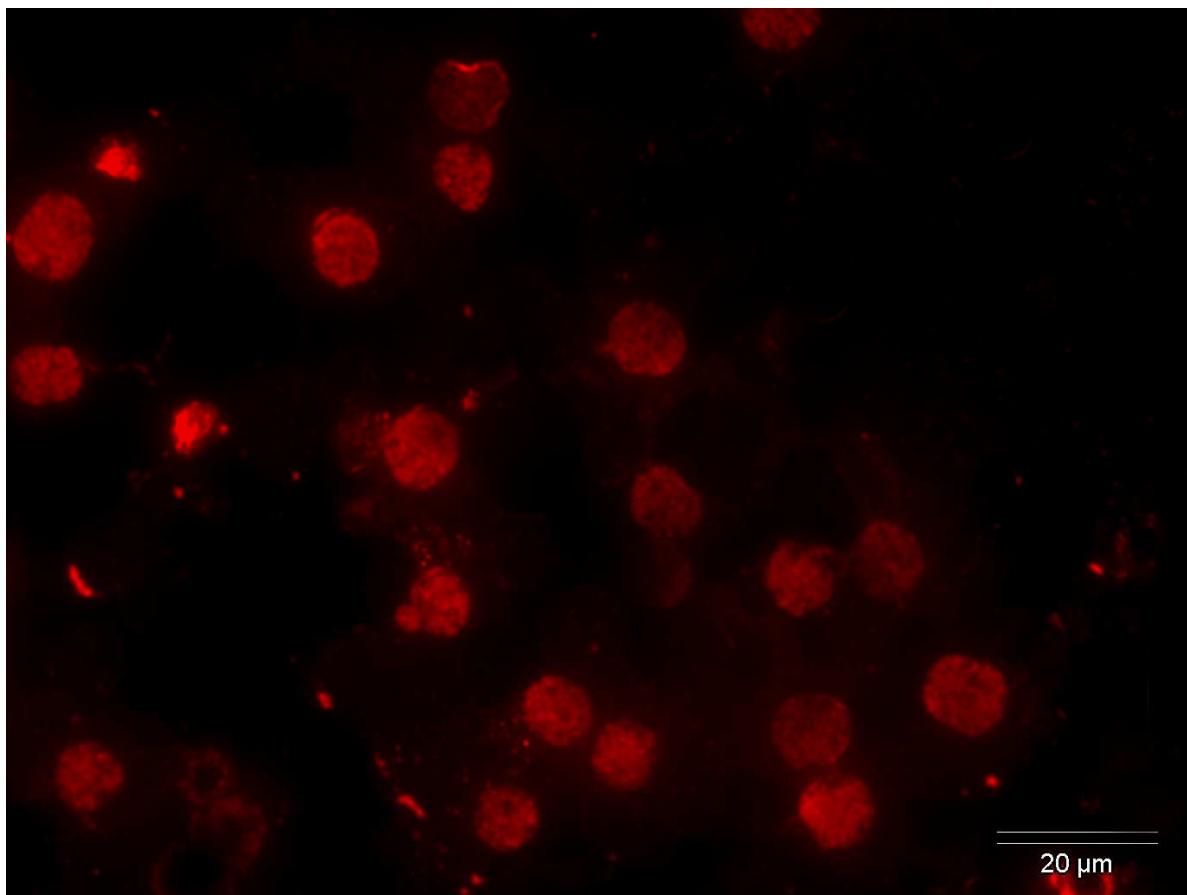
4.6. Immunocytochemiczna ocena ekspresji SOCS3 i SOCS5

W celu potwierdzenia różnej ekspresji SOCS3 i SOCS5 na poziomie białka w subpopulacjach leukocytów krwi obwodowej (monocytach i limfocytach), wykonano immunocytochemiczne oznaczenia obecności ww. czynników z zastosowaniem fluorescencji. Ekspresję SOCS3 i SOCS5 oceniano na rozmazach izolowanych komórek jednojądrzastych krwi, ale nie rozdzielanych na monocyty i limfocyty. Identyfikacji obu populacji komórek (monocytów i limfocytów) dokonywano na podstawie wielkości komórek: monocyty definiowano jako komórki o średnicy wahającej się od 15 do 20 μm . Pozostałe komórki o przeciętnej średnicy nie przekraczającej 12 μm uznawano za limfocyty. Ekspresję SOCS3 wykazywano wyłącznie w populacji monocytów (Rycina 6). Pośrednia immunofluorescencja wykazywała linijne wiązanie przeciwciał swoistych dla SOCS3 w cytoplazmie monocytów. Z drugiej strony, w populacji limfocytów wykazywano ekspresję SOCS5 (Rycina 7), w których cały obszar cytoplazmy wykazywał silny ziarnisty odczyn wiązania anti-SOCS5, pokrywając również teren jądra komórkowego.

Rycina 6. Immunohistochemiczna ocena obecności SOCS3 w populacji krążących monocytów u 13-letniego pacjenta z rozpoznaniem SRNS na podłożu FSGS.



Rycina 7. Immunohistochemiczna ocena obecności SOCS5 w populacji krążących limfocytów u 10-letniej pacjentki z rozpoznaniem SRNS na podłożu DMP.



5. Omówienie wyników i dyskusja

Jak przedstawiono wyżej, od czasu pierwszego opisu białek ścieżki sygnalizacyjnej JaK/STAT oraz białek należących do rodziny SOCS nastąpił ogromny postęp w rozumieniu ich znaczenia zarówno w homeostazie jak i patogenezie wielu chorób. Szlak JaK/STAT jest bowiem angażowany w liczne, zarówno fizjologiczne jak i patologiczne procesy, w skład których zalicza się choroby zapalne, nowotwory, choroby zwyrodnieniowe oraz dysfunkcje układu odpornościowego. Właśnie z tego powodu, w wielu chorobach będących w kręgu zainteresowania specjalisty chorób dzieci, takich jak opóźnienie wzrostu czy niedokrwistość związana z niewydolnością nerek, zapalenie kłębuszków nerkowych jak również odrzucanie narządów po ich przeszczepieniu, zaburzenia funkcjonowania ścieżki JaK/STAT oraz grupy czynników SOCS mogą mieć znaczenie diagnostyczne oraz rokownicze.

Problem tego co jest zasadniczym powodem zespołu nerczycowego u dzieci ciągle pozostaje otwarty. Czy jest on związany z zaburzeniami immunologicznymi i następczym uszkodzeniem bariery filtracyjnej czy też jest skutkiem mutacji genowych i modyfikacji białek kłębuszka nerkowego powodujących zwiększoną przepuszczalność tej struktury? Czy u wszystkich pacjentów z zespołem nerczycowym, u których podawanie steroidów wydaje się nie mieć efektu terapeutycznego, należy przede wszystkim sekwencjonować DNA albo poszukiwać udokumentowanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w celu optymalizacji kosztów leczenia i redukcji efektów ubocznych? Czy też należy brać pod uwagę etiologię zapalną, w której niewystarczające leczenie immunosupresyjne ma bezpośredni wpływ na sposób funkcjonowania bariery filtracyjnej.

Początkowo nazwa JaK1 i JaK2 była akronimem od *"just another kinase"*. Geny tych białek zostały bowiem zidentyfikowane podczas dużego przeglądu biblioteki ludzkiego DNA. Ostatecznie jednak przyjęło się rozwinięcie skrótu "Janus kinase". Nazwa ta nawiązuje do Janusa – rzymskiego boga o dwóch twarzach. Kinazy JaK posiadają bowiem dwie domeny białkowe, z których jedna jest domeną kinazową, a druga hamuje aktywność kinazową pierwszej. Co ciekawe, nazwa ta może być również wsparta przez podwójną i nierzadko wykluczającą się funkcją elementów układu JaK/STAT, co przytoczona również w bieżącej rozprawie.

Przed nieco bardziej szczegółowym omówieniem wyników zaprezentowanych w rozprawie, należy zwrócić uwagę na fakt, że konstrukcja zaplanowanych w niej badań opierała się na trzech etapach.

Pierwszy z nich polegał na przeprowadzeniu przesiewowego testu, w którym w sposób ilościowy określano ekspresję wszystkich genów białek zaliczanych do układu JaK/STAT jak i szeregu czynników skojarzonych z tym systemem przekazu sygnału komórkowego w agranulocytach krwi obwodowej (tabela 9). Wybór właśnie tej populacji obwodowych leukocytów (mono- i limfocytów) został podyktowany koniecznością uniknięcia błędów metodologicznych. Wiadomo bowiem, że w okresie intensywnej steroidoterapii dochodzi do zwiększonego wyrzutu niedojrzałych form granulocytów (przede wszystkim obojętnochłonnych) ze szpiku kostnego. Tym samym, gdyby porównywać uśrednioną ekspresję wybranych genów w całej populacji leukocytów (na podstawie wyizolowanego mRNA) mogłoby się okazać, że obecność zwiększonej bezwzględnej liczby granulocytów obojętnochłonnych w okresie między 6-8 tygodniem terapii lekami steroidowymi zniekształca różnice w poziomach ekspresji poszczególnych genów. Wyizolowanie monocytów i limfocytów z grupy wszystkich krwinek białych i poddanie dalszym analizom materiału pochodzącego z tych subpopulacji, z założenia, miało wpłynąć na obiektywizację wyników.

W efekcie przeanalizowano grupę 84 białek, z których wyselekcjonowano do etapu drugiego wyłącznie te czynniki, których poziom ekspresji był większy lub mniejszy co najmniej czterokrotnie od wyników, które wykazano w grupie kontrolnej. Warto również nadmienić, że w tabelach 12 i 13 przedstawiono uśrednione wartości poziomu mRNA obserwowane osobno w subpopulacji mono- jak i limfocytów. Ponieważ wartości te, poza wyjątkami opisanymi w rozdziałach 4.2 i 4.3 nie różniły się w sposób istotny między sobą, przyjęto przedstawienie wyników w jednej tabeli uwzględniającej średnią z pomiarów dokonywanych na wyizolowanym mRNA z limfo- i monocytów.

Drugi etap badań polegał na celowej analizie ekspresji zaledwie kilkunastu czynników (tabele 12 i 13), których ekspresję porównano nie tylko między pacjentami wrażliwymi i opornymi na steroidy, ale również na dwóch różnych etapach leczenia u pacjentów ze zdiagnozowaną steroidoopornością i steroidowrażliwością.

Pozwoliło to na przejście do trzeciego i zarazem ostatniego etapu badań, w którym szczegółowo (tym razem również na poziomie białka) określono poziom ekspresji wyłącznie czterech czynników. Dwóch bezpośrednio związanych z układem JaK/STAT (białka SOCS3 i SOCS5, których utrzymujący się podwyższony poziom ekspresji

zanotowano w grupie pacjentów SRNS, u których podawano przez 6 tygodni steroidy) oraz kolejnych dwóch związanych z funkcjonowaniem układu JaK/STAT (IL-6 oraz IL-20), co do których zaobserwowano najwyższy wzrost poziomu ekspresji (IL-20) oraz obecność zarówno w populacji krążących limfo- jak i monocytów (IL-6). Analiza ekspresji ww. SOCS3 i SOCS5 na poziomie białka miała miejsce zarówno w odniesieniu do stężenia tych czynników w surowicy krwi, jak i ich ekspresji w obrębie komórek. Z kolei ekspresję IL-6 oraz IL-20 na poziomie białka analizowano wyłącznie w oparciu o test ELISA.

Rozwijając drugi etap badań, należy zauważyć, że istotne różnice w ekspresji elementów szlaku sygnalizacyjnego JaK/STAT w agranulocytach pacjentów z rozpoznaniem idiopatycznego zespołu nerczycowego były obserwowane dla wartości ekspresji mRNA JaK1, JaK2, JaK3, STAT1, STAT2, STAT6, TYK2, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4 i SOCS5. Były one ponad 10-krotnie podwyższone u wszystkich badanych pacjentów. Rezultatu tego nie można jednak interpretować w sposób, który sugerowałby, że u wszystkich ww. pacjentów zespół ten rozwinął się wtórnie do zmian funkcjonalnych układu odpornościowego. W mojej opinii zmiany immunologiczne mogą być zarówno efektem jak i przyczyną modyfikacji białek bariery filtracyjnej. Analiza ekspresji białek układu JaK/STAT przed rozpoczęciem leczenia immunosupresyjnego nie pozwala zatem prognozować przyszłego przebiegu terapii. Jednakże, gdy określi się kolejny profil ekspresji ww. genów w najbardziej kluczowym momencie terapii immunosupresyjnej w przebiegu idiopatycznego zespołu nerczycowego (zwykle występuje on między 6-tym a 8-mym tygodniem leczenia), można już wykryć istotne różnice między dziećmi z rozpoznaniem SSNS oraz SRNS. W tym momencie procesu chorobowego ekspresje JaKs, STATs a także ekspresje TYK2, SOCS1, SOCS2 i SOCS4 ulegają redukcji do wartości grupy kontrolnej. Jedyne zmiany w ekspresji genów szlaku sygnalizacyjnego JaK/STAT ograniczają się do podwyższonych poziomów SOCS3 i SOCS5 wyłącznie u pacjentów z SRNS. Co ciekawe, zmienione ekspresje SOCS3 i SOCS5 u tych pacjentów można wykazać zarówno na poziomie mRNA jak na poziomie białka, co potwierdzają wyniki inkubacji immunohistochemicznych oraz ELISA. Najbardziej jednak zaskakującym elementem jest fakt, że podwyższona ekspresja białek SOCS3 i SOCS5 w krążących agranulocytach powinna raczej sugerować wyciszenie ścieżki JaK/STAT, a co się z tym wiąże również ograniczenie destrukcyjnego wpływu krążących leukocytów na funkcjonowanie bariery filtracyjnej.

Pytanie zatem, jakie postawiono, brzmiało: czy podwyższona ekspresja białek SOCS3 i SOCS5 zarówno na poziomie mRNA jak i białka nie jest przypadkiem wynikiem zwiększonej ekspresji innych, zależnych od ścieżki JaK/STAT białek regulatorowych, cytokin i /lub czynników transkrypcyjnych. W ten sposób podwyższone poziomy ww. białek SOCS można byłoby interpretować jako wynik nieefektywnego procesu hamowania nieznanymi dotąd mechanizmów odpornościowych pogłębiających spustoszenie w obrębie elementów filtracyjnych kłębuszka nerkowego.

Aby odpowiedzieć na to pytanie, zanalizowano ekspresje pozostałych czynników obecnych na komercyjnie dostępnej płycie SABiosciences. Płytkę tę, będącą formą macierzy RNA zinterpretowano zatem zarówno pod kątem ekspresji samej ścieżki JaK/STAT jak i w sposób pośredni powiązanych z nią białek regulatorowych, cytokin i czynników transkrypcyjnych. Wykazano, że pacjenci z rozpoznaniem SRNS, zarówno przed rozpoczęciem leczenia jak po 6 tygodniach podawania steroidów wykazywali istotnie wyższą ekspresję IL-20, IL-4R, IL-6ST oraz licznych czynników transkrypcyjnych takich jak: JUN, MPL, MYC, SP1 i SRC. Co więcej, na podstawie oznaczeń prowadzonych na wyizolowanych populacjach limfo- oraz monocytów udowodniono, że IL-20, podobnie jak wszystkie czynniki transkrypcyjne ulegały ekspresji wyłącznie w krążących monocytach. Z drugiej strony, IL-4R i IL-6ST wykazywały podwyższoną ekspresję zarówno w krążących monocytach jak limfocytach a poziom ich ekspresji nie różnił się między grupami. Co ciekawe, ekspresje IL-20, IL-4R, IL-6ST, JUN, MPL, MYC, SP1 i SRC nie różniły się istotnie między pacjentami z chorobą zmian minimalnych (MCD), rozlanym rozplemem mezangium (DMP) i ogniskowym segmentalnym szkliwieniem kłębuszków nerkowych (FSGS) na początku leczenia jak i po 6 tygodniach podawania steroidów.

W związku z powyższym, w dalszym etapie badań postanowiono oznaczyć osoczowe wartości stężenia nie tylko białek SOCS3, SOCS5, ale również IL-6 oraz IL-20 u pacjentów SRNS oraz pacjentów SSNS przed rozpoczęciem terapii immunosupresyjnej oraz po 6 tygodniach leczenia z wykorzystaniem steroidów.

Decyzję tę podjęto na podstawie danych literaturowych, z których wynika, że białko SOCS3 stanowi kluczowy regulator przeciwnych aktywności IL-6 i IL-20 (członka rodziny IL-10) [69]. IL-6 jest pro-zapalną cytokiną, która okazuje się pełnić istotną rolę w wielu chorobach zapalnych, łącznie z zespołem nerczycowym, podczas gdy IL-20, produkowana przez aktywowane monocyty, reguluje proliferację i różnicowanie innych monocytów oraz limfocytów [69]. Dodatkowo, IL-20 powoduje także proliferację oraz rozprzestrzenianie się wielopotencjalnych komórek progenitorowych hematopoezy [69].

Jak wykazano w obecnym doniesieniu, pacjenci z SRNS wykazywali istotnie wyższą ekspresję osoczną tak IL-6 jak IL-20 wyłącznie przed rozpoczęciem leczenia immunosupresyjnego. Po 6-tygodniowym leczeniu steroidami wyjściowe, wysokie stężenie IL-6 ulegało obniżeniu (choć nie powracało do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej), natomiast stężenie IL-20 podlegało dalszemu wzrostowi. Odpowiadało to nie tylko wyższym ekspresjom SOCS3 i SOCS5 w krążących komórkach jednojądrzastych, lecz także istotnej utracie białka w wyniku uszkodzenia bariery filtracyjnej. Nasze obserwacje zdają się dowodzić, że białkomoc z przeładowania może aktywować nie tylko kaskady zapalne i stres oksydacyjny lecz i, po części, szlak sygnalizacyjny JaK/STAT nie tylko w komórkach kanalików proksymalnych nerki [70] lecz także w wybranych leukocytach krwi obwodowej.

Co więcej, białko SOCS3 podlega silnej indukcji tak przez IL-6 jak przez IL-10 w obecności lipopolisacharydów (LPS), choć z drugiej strony zależne od IL-6 sygnałowanie ulega wybiórczemu hamowaniu dzięki wiązaniu SOCS3 z podjednostką IL-6ST gp130 (Tyr759). Stąd wydaje się, że modulacja szlaku gp130/JaK/STAT stanowi rozsądną strategię rozwoju nowych leków przeciwzapalnych [44], a oznaczanie stopnia ekspresji czynników SOCS3, IL-6 oraz IL-20 w chorobach zapalnych nerek stanowi ważny element w dyskusji nad poznawaniem i wykorzystywaniem nowych czynników prognostycznych w terapii idiopatycznego zespołu nerczycowego.

Niewiele wiadomo o funkcji SOCS5. Przy nadekspresji SOCS5 dochodzi, ponownie jak w przypadku SOCS3, do hamowania aktywności IL-6. Należy jednak zauważyć, że wpływ ten jest istotnie mniejszy niż w przypadku SOCS1 i SOCS3 [45]. Ludzkie białko SOCS5 ulega także ekspresji w wielu tkankach i narządach, wśród których należy wymienić serce, mózg, łożysko i mięśnie szkieletowe. Najsilniejszą jednak ekspresję SOCS5 stwierdzono w narządach limfoidalnych, takich jak śledziona, węzły chłonne, grasica oraz szpik kostny [38]. Może to wskazywać na fakt, że SOCS5 pełni istotną rolę w rozwoju morfologicznym oraz czynnościowym limfocytów. Ostatnie doniesienia zwracają również uwagę na fakt, że SOCS5 jest potencjalnym regulatorem sygnałowania IL-4 [39].

Przedstawione wyżej dane wskazują, że jakkolwiek nie podchodzić by do zagadnienia funkcjonowania ścieżki sygnałowej JaK/STAT, wyjaśnienie problemu w aspekcie idiopatycznego zespołu nerczycowego jest bardzo złożone. Z tego właśnie powodu w ramach niniejszej rozprawy ograniczono się do określenia ekspresji poszczególnych elementów tego układu jak i czynników z nim związanych wyłącznie w populacjach mono- i limfocytów. Wskazywały na to również liczne wcześniejsze doniesienia, w których

dokumentowano powiązania JaK/STAT właśnie z krążącymi agranulocytami. Z drugiej strony zdaję sobie sprawę z faktu, że jednostkowe określanie stężenia białek SOCS3 i SOCS5 oraz w IL-6 oraz IL-20 w surowicy krwi jest obarczone dużym błędem. Nigdy bowiem nie można w pełni zdefiniować aktualnego, osobniczo zmiennego stanu funkcjonalnego układu odpornościowego na podstawie wybiórczych analiz stężeń pojedynczych czynników. Wydaje się jednak, że jeżeli weźmie się pod uwagę kompleksową i jednoczasową analizę wszystkich czterech elementów (SOCS3, SOCS5, IL-6 oraz IL-20) to można byłoby, z pewnymi ograniczeniami, prognozować przebieg zespołu nerczycowego w aspekcie steroidooporności.

Problem istotności układu JaK/STAT w patofizjologii zespołu nerczycowego nie jest szeroko dyskutowany w osiągalnej literaturze przedmiotu. Poszczególne publikacje sugerują, że aktywacja przekąźnictwa JaK/STAT odgrywa rolę w progresji zaburzeń kłębuszkowych przebiegających z białkomoczem [71]. Badania te przeprowadzono jednak na modelu zwierzęcym i obejmowały one nieliczne geny, do których zaliczono JaK2, STAT1 i STAT3.

Wiadomo również, że oporność na hormon wzrostu oraz czynnik IGF-1 (ang. *insulin-like growth factor*) to dobrze znane konsekwencje zdrowotne związane z niewydolnością nerek. Stężenia hormonu wzrostu w surowicy krwi są zazwyczaj prawidłowe lub oscylują w górnych granicach normy, podczas gdy wzrost u dzieci z tym rodzajem niewydolności jest spowolniony [72,73]. Oporność na działanie hormonu wzrostu może rozwijać się jako efekt kilku mechanizmów – zmienionego poziomu receptorów hormonu wzrostu, uszkodzonego przesylu sygnału ścieżką JaK2-STAT lub opornością na IGF1 [74]. Nadal nieznanym jest jednak wyjaśnienie, dlaczego podczas niewydolności nerek sygnalizacja JaK/STAT zostaje uszkodzona. Prawdopodobny jest tylko wzrost ekspresji SOCS2 i SOCS3 wywołany przez zapalne cytokiny, działające poprzez innych członków rodziny kinaz janusowych [43]. Aktywacja ścieżki JaK/STAT w chorobach nerek była również uważana za ważny element w patogenezie i rozwoju chorób nerek, takich jak chociażby nefropatia cukrzycowa [75,76]. Aktywacja ścieżki JaK/STAT w nerce osoby z cukrzycą może nastąpić jako efekt angiotensyny II (A II), hiperglikemii lub białkomoczu. W organizmach żywych, blokada A II powstrzymuje wywołaną przez hiperglikemię aktywację białek JaK2-STAT w kłębuszkach nerkowych, co wskazuje na fakt, że aktywacja tej ścieżki przez hiperglikemię jest zależna od A II [76]. Wszystkie obserwacje zebrane razem prowadzą do wniosku, że ścieżka JaK/STAT może być elementem niezbędnym do rozwoju nefropatii cukrzycowej, choć rola białek SOCS nie została jeszcze w pełni zbadana [43].

Ostatnio zaproponowano kilka mechanizmów, drogą których aktywacja sygnałowania JaK/STAT mogłaby odgrywać rolę w progresji chorób kłębuszka nerkowego z białkomoczem. Opisywano je zarówno w modelach zwierzęcych [71] jak u ludzi [77]. Nakajima H. i wsp. sugerował, że białkomocz z przeciążenia może aktywować kaskady zapalne oraz stres oksydacyjny i, po części, aktywować szlak sygnalizacyjny JaK/STAT w nerkowych komórkach kanalików proksymalnych *in vitro* [77]. Z drugiej strony stwierdzono, że hipoalbuminemia powoduje nadekspresję rodziny SOCS w obwodowych leukocytach [5].

Pojawia się coraz więcej dowodów, że białko SOCS3 jest kluczowe w patogenezie i rozwoju chorób autoimmunologicznych. Na przykład myszy ze zmutowanym genem gp130, w którym miejsce wiążące SHP2/SOCS3 zostało zablokowane, zachorowały na zespół kilku chorób, podobny do reumatoidalnego zapalenia stawów [78]. Inne badania sugerują, że rozregulowanie SOCS3 jest częścią chorób zapalnych w przewodzie pokarmowym [79]. Niedawno pojawiły się też dowody na to, że SOCS1 może przeciwdziałać aktywności autoimmunizacyjnej w zapaleniu stawów [80].

Coraz więcej wyników badań naukowych potwierdza, że białka SOCS są zaangażowane w kontrolowanie równowagi komórek limfocytowych Th [43]. Dzięki tym odkryciom zwiększyło się zainteresowanie badaniami nad rolą białek SOCS w tolerancji immunologicznej i odrzuceniu przeszczepionych organów. Ze względu na ogromną rolę ścieżki JaK/STAT w homeostazie limfocytów, różnicowaniu komórek Th i aktywacji komórek pamięci limfocytów, coraz większe zainteresowanie wzbudza też odkrycie środków tłumiących i modulujących system odpornościowy, np. obiecujące są cząsteczki spowalniające działanie JaK3 [81,82]. JaK3 to bardzo pożądany cel terapeutyczny, ze względu na jego selektywność tkankową i oddziaływanie z pojedynczą podjednostką receptora cytokin [40,83]. Leki immunosupresyjne stosowane obecnie w transplantologii, takie jak cylosporyna A, steroidy i takrolimus, oddziałują na różnorakie tkanki i mechanizmy, będąc dość skutecznymi, ale obciążonymi wieloma szkodliwymi efektami ubocznymi. Dużą zaletą inhibitora JaK3 byłoby jego ograniczone działanie specyficznie i jedynie na tkankę limfoidalną [43].

Zgodnie z powyższym, wydaje się, że wstępne podawanie steroidów we wszystkich, bez wyjątku, typach zespołu nerczycowego pozostaje jak najbardziej wskazane. Nawet, jeżeli zespół nerczycowy rozwinął się w rezultacie pierwotnego uszkodzenia bariery filtracyjnej, spowodowanego chociażby mutacjami genowymi, to towarzysząca mu w każdym przypadku nadekspresja układu JaK/STAT może być wyhamowana przez wprowadzenie

leków steroidowych. Dopiero obserwowane zjawisko steroidooporności, być może wcześniej prognozowane utrzymującymi się podwyższonymi stężeniami IL-6 oraz IL-20 w osoczu krwi, byłoby wystarczającym elementem umożliwiającym modyfikację leczenia immunosupresyjnego i wprowadzenie innych, nie-steroidowych, leków przeciw zapalnym.

Z drugiej strony, podwyższone ekspresje mRNA dla *SOCS3* i *SOCS5* usprawiedliwiałyby podjęcie bardziej szczegółowych badań molekularnych łącznie z sekwencjonowaniem DNA.

6. Wnioski

1. Leki steroidowe stosowane w terapii zespołu nerczycowego u dzieci powodują zredukowanie do zakresu kontrolnego wyjściowo podwyższonych poziomów ekspresji mRNA czynników JaK1, JaK2, JaK3, STAT1, STAT2, STAT6, TYK2, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4 i SOCS5 w krążących leukocytach u wszystkich badanych pacjentów z SSNS. Dzieci z rozpozną steroidoopornością charakteryzują się utrzymującym się podwyższonym poziomem ekspresji białek SOCS3 i SOCS5, IL-20, IL-6ST, IL-4R oraz czynników transkrypcyjnych JUN, MPL, MYC, SP1 i SRC. Wpływ leków steroidowych na ekspresję czynników ścieżki transdukcji sygnału JaK/STAT jest niezależny od wariantu histologicznego kłębuszkowego zapalenia nerek (MCD, DMP, FSGS).
2. W oparciu o przeprowadzone badania nie udało się jednoznacznie określić znaczenia zaburzeń funkcjonowania ścieżki JaK/STAT w idiopatycznym zespole nerczycowym u dzieci. Wydaje się jednak , że białkomocz z przeładowania u dzieci niewrażliwych na leczenie steroidami może być związany ze wzrastającym stężeniem IL-20, co w efekcie może doprowadzać do nadekspresji białek SOCS3 i SOCS5 odpowiednio w monocytach i limfocytach krwi obwodowej.
3. Kompleksowa, a nie jednostkowa analiza ekspresji SOCS3 i SOCS5 oraz IL-6 i IL-20 na poziomie mRNA u pacjentów z rozpoznaniem zespołu nerczycowego w przebiegu kłębuszkowych zapaleń nerek może stanowić podstawy do prognozowania pojawienie się steroidooporności w przebiegu tego zespołu u dzieci.

7. Piśmiennictwo

1. Banaszak B.: Idiopatyczny zespół nerczycowy u dzieci – czy jesteśmy świadkami ewolucji obrazu klinicznego i histopatologicznego choroby? *Pediatrics. Polska.* 2011;517-522.
2. Eddy AA., Symons JM. :Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet.* 2003 Aug 23;362(9384):629-39.
3. Zhang S., Audard V., Fan Q., et al :Immunopathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Contrib Nephrol.*2011;169:94-106.
4. Mc Carthy HJ., Saleem MA. :Genetics in clinical practice: nephrotic and proteinuric syndromes. *Nephron Exp Nephrol.*2011;118:e1-8.
5. Camici M. :The nephrotic syndrome is a immunoinflammatory disorder. *Med.Hypotheses.*2007;68:900-905.
6. Schönberger E., Ehrich JH., Haller H., Schiffer M. :The podocyte as a direct target of immunosuppressive agents. *Nephrol Dial Transplant.*2011;26:18-24.
7. Mundel P., Shankland SJ. :Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol.*2002;13:3005-3015.
8. Sewell R., Short CD.: Minimal change nephropathy: how does the immune system affect the glomerulus? *Nephrol.Dial.Transplant.*1993;8:108-111.
9. Elie V., Fakhoury M., Deschênes G., Jacqz-Aigrain J.: Physiopathology of idiopathic nephrotic syndrome:lessons from glucocorticoids and epigenetic perspectives. *Pediatr Nephrol.*2011; DOI: 10.1007/s00467-011-1947-1

10. Gołąb J., Jakóbsiak M., Zagożdżon R., Obłąkowski P.: Cytokiny w Immunologia, red. Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W. PWN 2002;204-221
11. Ehrich JH., Brodehl J. :Long versus standard prednisone therapy for initial treatment of idiopathic nephrotic syndrome in children. Arbeitsgemeinschaft fur Padiatrische Nephrologie. Eur J Pediatr. 1993;152:357-361
12. Książek J., Wyszynska T. :Short versus long initial prednisone treatment in steroid – sensitive nephritic syndrome in children. Acta Pediatr. 1995;84:889-893
13. Gulati S., Sharma A., Sharma R., Gupta A., Gupta R. :Do current recommendations for kidney biopsy in nephritic syndrome need recommendations? Pediatr. Nephrol. 2002;17:404-408
14. Niaudet P. :Treatment of childhood steroid resistant idiopathic nephrosis with a combination of cyclosporine and prednisone. J. Ped. 1994;125:981-986
15. Moorani KN., Sherali AR. :Histopathological pattern in childhood glomerulonephritis. J Pak Med Assoc. 2010;60:1006-1009.
16. Audard V., Lang P., Sahali D. :Minimal change nephrotic syndrome : new insights into disease pathogenesis. Med Sci (Paris). 2008;24:853-858
17. Fogo A., Hawkins E., Berry P., et al :Glomerular hypertrophy in minimal change disease predicts subsequent progression to focal glomerular sclerosis. Kidney Int. 1990;38:115-123.
18. Fogo A., Glick AD., Horn SL., Horn RG. : Is focal segmental glomerulosclerosis really focal? Distribution of lesions in adults and children. Kidney Int. 1995;47:1690-1696.
19. Ostalska-Nowicka D. :Ocena wybranych czynników morfologicznych i immunohistochemicznych w prognozowaniu odpowiedzi na leczenie w idiopatycznych zespołach nerczycowych u dzieci, Rozprawa habilitacyjna. 2007:9-11

20. Akilesh S., Humer T.B., Wu H., et al.: Podocyte use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 2008;105:967.
21. Berg J.G., Weening J.J. :Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Clin.Sc.* 2004;107:125.
22. Grimbert P., Audard V., Remy P., et al. :Recent approaches to the pathogenesis of minimal-change nephrotic syndrome. *Nephrol.Dial.Transplant.*2003;18:245.
23. Frank C., Herrmann M., Fernandez S., et al. :Dominant T cells in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney Int.* 2005;57:510.
24. Zachwieja J., Bobkowski W., Zaniew M. i wsp.: Wewnątrzkomórkowa synteza cytokin jako wykładnik funkcji limfocytów i monocytów u dzieci z I rzutem zespołu nerczycowego. *Pol.Merk.Lek.* 2003;14:289.
25. Acharya B., Shirakawa T., Pungky A., et al.: Polymorphism of the interleukin-4, interleukin-13, and signal transducer and activator of transcription 6 genes in Indonesian children with minimal change nephrotic syndrome. *Am.J.Nephrol.*2005;25:30.
26. Salsano G., Esposito M., Graziano L., et al.:Atopy in childhood idiopathic nephrotic syndrome. *Ac.Paed.* 2007;4:561.
27. Stachowski J., Barth C., Michalkiewicz J., et al.:Th1/Th2 balance and CD45-positive T cells subsets in primary nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.*2000;14:779.
28. Niaudet P., Habib R. :Cyclosporine in the treatment of idiopathic nephrosis. *J Am Soc Nephrol.*1994;5:1049-1056.
29. Benz K., Dotsch J., Rascher W., Stachel D. :Change in the course of steroid-dependent nephrotic syndrome after rituximab therapy. *Ped.Nephrol.*2004;7:794.

30. Gilbert R., Hulse E., Rigden S., et al. :Rituximab therapy for steroid-dependent minimal change nephrotic syndrome. *Ped.Nephrol.* 2006;11:1698.

31. Nozu K., Iijima K., Fujisawa M., et al. :Rituximab treatment for posttransplant lymphoproliferative disorder induces complete remission of recurrent nephrotic syndrome. *Ped.Nephrol.* 2005;20:1660.

32. Barnes PJ. :Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol.*2010;120:76-85.

33. Adcock IM.: Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions. *Pulm Pharmacol Ther.*2000,13:115-126.

34. Grzanka A., Jarzab J. :Niegenomowy mechanizm działania glikokortykosteroidów. *Pneumonologia i Alergologia Polska.*2009;77:387-393.

35. Ransom RF., Lam NG., Hallett MA., Atkinson SJ., Smoyer WE.: Glucocorticoids protect and enhance recovery of cultured murine podocytes via actin filament stabilization. *Kidney Int.*2005;68:2473-2483.

36. Schönenberger E., Ehrich JH., Haller H., Schiffer M.: The podocyte as a direct target of immunosuppressive agents. *Nephrol Dial Transplant.*2011;26:18-24.

37. Wada T., Pippin JW., Marshal CB., Griffin SV., Shankland SJ.: Dexamethasone prevents podocyte apoptosis induced by puromycin aminonucleoside: role of p53 and Bcl-2-related family proteins. *J Am Soc Nephrol.*2005;16:2615-2625.

38. Calo V., Migliavacca M., Bazan V., et al : STAT proteins:from normal control of cellular events to tumorigenesis.*J Cell Physiol* 2003;197:157-168.

39. Bromberg J.: Stat proteins and oncogenesis.*J Clin Invest* 2002;109:1139-1142.

40. Witthuhn BA., Silvennoinen O., Miura O., et al : Involvement of the JAK-3 Janus kinase in signaling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature* 1994;370:153-157.
41. Greenhalgh CJ., Alexander WS. : Suppressors of cytokine signaling and regulation of growth hormone action. *Growth Horm IGF Res* 2004;14:200-206.
42. Levy DE., Darnell JE Jr.: Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:651-662.
43. Tan JC., Rabkin R. : Suppressors of cytokine signaling in health and disease. *Pediatr. Nephrol.* 2005 May;20:567-75.
44. Fu XY., Schindler C., Improtta T., et al : The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; USA 89:7840-7843.
45. Kisseleva T., Bhattacharya S., Braunstein J., et al : Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* .2002;285:1-24.
46. Zhong M., Henriksen MA., Takeuchi K., et al : Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT 1 for the activation-inactivation cycle. *Proc Natl Acad Sci* 2005; USA 102:3966-3971.
47. Murray P. : The JAK-STAT Signaling Pathway: input and output integration. *The Journal of Immunol* 2007;178:2623-2629.
48. Carter-Su C., Rui L., Stofega MR.: SH2-B and SIRP: JAK2 binding proteins that modulate the actions of growth hormone. *Recent Prog Horm Res* 2000;55:293-311.
49. Gent J., Van Den Eijnden M., Van Kerkhof P., Strous GJ. : Dimerization and signal transduction of the growth hormone receptor. *Mol Endocrinol* 2003;17:967-975.

50. Touw IP., De Koning JP., Ward AC., Hermans MH. :Signaling mechanisms of cytokine receptors and their perturbances in disease. *Mol Cell Endocrinol* 2000;160:1-9.

51. Yoshimura A., Nishinakamura H., Matsumura Y., Hanada T. :Review:Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins. *Arthritis Research & Therapy* 2005;7:100-110.

52. Alexander WS., Hilton DJ. :The role of suppressors of cytokine signaling(SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004;22:503-529.

53. Dalpke AH., Opper S., Zimmermann S., Heeg K.:Suppressors of cytokine signaling (SOCS-1 and SOCS-3)are induced by CpG-DNA and modulate cytoline responses in APCs. *J Immunol* 2001;166:7082-7089.

54. Kawazoe Y., Naka T., Fujimoto M., et al :Signal transducer and activator of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor 1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1)inhibits insulin signal transduction pathway through modulating insulin receptor substrate 1 (IRS-1) phosphorylation. *J Exp Med* 2001;193:263-269.

55. Stoiber B., Kovarik P., Cohnen S., et al :Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma. *J Immunol* 1999;163:2640-2647.

56. Greenhalgh CJ., Metcalf D., Thaus AL., et al :Biological evidence that SOCS-2 can act either as an enhancer or suppressor of growth hormone signaling. *J Biol Chem* 2002;277:40181-40184.

57. Favre H., Benhamou A., Finidori J., Kelly PA., Edery M. :Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction. *FEBS Lett* 1999;453:63-66.

58. Woelfle J., Billiard J., Rotwein P. :Acute control of insulin-like growth factor -I gene transcription by growth hormone through STAT 5b. *J Biol Chem* 2003;278:22696-22702.

59. Metcalf D., Greenhalgh CJ., Viney E., et al : Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signaling-2. *Nature* 2000;405:1069-1073.

60. Yoshimura AT., Ohkubo T., Kiguchi N., et al : A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *Embo J* 1995;14:2816-2926.

61. Verdier F., Chretien S., Muller O., et al : Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of the ubiquitinated CIS protein. *J Biol Chem* 1998;273:28185-28190.

62. Sexl V., Kovacic B., Piekorz R., et al : JaK1 deficiency leads to enhanced Abelson-induced B-cell tumor formation. *Blood*. 2003 Jun 15;101:4937-43.

63. Wen R., Wang D., McKay C., et al : JaK3 selectively regulates Bax and Bcl-2 expression to promote T-cell development. *Mol Cell Biol*. 2001 Jan; 21:678-89.

64. Melvin T, Bennett W: Management of nephrotic syndrome in childhood. *Drugs* 1991;42:30-51.

65. Hogg RJ., Portman RJ., Milliner D., et al : Evaluation and management of proteinuria and nephrotic syndrome in children: recommendations from a pediatric nephrology panel established at the National Kidney Foundation conference on proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, and elimination (PARADE). *Pediatrics*, 2000 Jun;105:1242-9.

66. Clark AG, Barratt TM: Steroid-responsive nephrotic syndrome; in: Barratt TM, Avner ED, Harmon WE (eds): *Pediatric nephrology*. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, 1998, 731-47.

67. Van Stralen KJ., Tizard EJ., Jager KJ., et al : Determinants of eGFR at start of renal replacement therapy in paediatric patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:3325-32.

68. Armitage P.: Statistical methods in medical investigations (in Polish). 1 ed. PZWL, Warszawa 1978, 97-103.
69. Hebenstreit D., Horejs-Hoeck J., Duschl A.: JaK/STAT –dependent gene regulation by cytokines. *Drug News Perspect.* 2005 May;18:243-9.
70. Zhang MZ., Zhang MY., Zhao S., et al : Effect of JaK/STAT pathway activation on high glucose-induced transdifferentiation in renal proximal tubular epithelial cells. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* ,2007 Jun;29:364-9.
71. Li R., Yang N., Zhang L., et al : Inhibition of Jak/STAT signaling ameliorates mice experimental nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 2007;27:580-9.
72. Tonshoff B., Blum WF., Mehls O. :Derangements of the somatotrophic hormone axis in chronic renal failure. *Kidney Int (Suppl)* 1997;58:106-113.
73. Kaskel F. :Chronic renal disease: a growing problem. *Kidney Int* 2003;64:1141-1151.
74. Rabkin R., Schaefer F. :New concepts: growth hormone, insulin-like growth factor- I and the kidney. *Growth Horm IGF Res* 2004;14:270-276.
75. Thirone AC., Scarlett JA., Gasparetti AL., et al :Modulation of growth hormone signal transduction in kidneys of streptozotocin- inducet diabetic animals:effect of a growth hormone receptor antagonist. *Diabetes* 2002;51:2270-2281.
76. Banes AK., Shaw S., Jenkins J., et al :Angiotensin II blockade prevents hyperglycemia-induced activation of JAK and STAT proteins in diabetic rat kidney glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F653-659.
77. Nakajima H., Takenaka M., Kaimori JY., et al : Activation of the signaltransducer and activator of transcription signaling pathway in renal proximal tubular cells by albumin. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:276-85.

78. Atsumi T., Ishihara K., Kamimura D., et al :A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis.J Exp Med 2002;196:979-990.

79.Suzuki A., Hanada T., Mitsuyama K., et al : CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT 3 activation and intestinal inflammation.J Exp Med 2001;193:471-481.

80.Egan PJ., Lawlor KE., Alexander WS., Wicks IP. :Suppressor of cytokine signaling-1 regulates acute inflammatory arthritis.J Clin Invest 2003;111:915-924.

81. Sudbeck EA., Liu XP., Narla RK., et al :Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis –inducing antileukemic agents.Clin Cancer Res 1999;5:1569-1582.

82.Saemann MD., Zeyda M., Diakos C., et al :Suppression of early T-cell-receptor-triggered cellular activation by the Janus kinase 3 inhibitor WHI-P-154.Transplantation 2003;75:1864-1872.

83.Johnston JA., Kawamura M., Kirken RA., et al :Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2.Nature 1994;370:151-153.

8. Streszczenie

Zespół nerczycowy (ZN) stanowi wyzwanie zarówno pod względem poznania jego patogenezы jak i możliwości zastosowania efektywnej terapii. Mimo znacznej modyfikacji jego leczenia, jaka dokonała się na przestrzeni ostatnich 10 lat, wciąż nie został wystarczająco dokładnie poznany mechanizm jego patogenezы. Z tego też powodu znaczny odsetek zespołów nerczycowych o nieustalonej etiologii opisuje się mianem idiopatycznego zespołu nerczycowego (IZN). Jednym z podstawowych leków stosowanych w terapii ZN są glikokortykosteroidy. Umożliwiają one osiągnięcie remisji choroby u blisko 80% dzieci, u których rozpoznano IZN. Pozostała grupa, opisywana jako oporna na steroidy, wymaga jednak modyfikacji terapii i poszukiwania innych skuteczniejszych metod leczenia.

Biorąc pod uwagę dane dotyczące podłoża immunologicznego w patogenezie wtórnego zespołu nerczycowego, można przypuszczać, że również i w grupie idiopatycznych zespołów nerczycowych wyjściowa przyczyna uszkodzenia ultrastruktury bariery filtracyjnej może tkwić w nieprawidłowym funkcjonowaniu poszczególnych komórek układu odpornościowego. Ponieważ podstawowym narzędziem komórkowym w populacji krwinek białych wypracowującym odpowiedź na szereg różnych cytokin czy też czynników wzrostu jest ścieżka transdukcji sygnału JaK/STAT, można zakładać, że zaburzenia w funkcjonowaniu tego mechanizmu mogą mieć potencjalne znaczenie w dalszym rozwoju zespołu nerczycowego. Co więcej, zaburzenia te mogą mieć w efekcie dwójaki charakter – potęgujący rozwój choroby lub, przeciwnie, spełniający znaczenie ochronne.

W związku z powyższym celem niniejszej pracy było

1. oszacowanie wpływu glikokortykosteroidów na ekspresję wszystkich elementów ścieżki sygnalizacyjnej JaK/STAT w leukocytach pacjentów z rozpoznaniem zespołu nerczycowego
2. próba określenia potencjalnego znaczenia zaburzeń funkcjonowania ścieżki JaK/STAT w idiopatycznym zespole nerczycowego u dzieci
3. próba wyodrębnienia elementów szlaku JaK/STAT o potencjalnym znaczeniu prognostycznym w rozwoju zespołu nerczycowego u dzieci

Grupa badana składała się z 54 dzieci w wieku od 3 do 19 rż., hospitalizowanych z powodu idiopatycznego zespołu nerczycowego w latach 2008 – 2010 w Klinice Kardiologii i

Nefrologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Na podstawie odpowiedzi na leczenie steroidowe w okresie leczenia indukcyjnego wyodrębniono 34 pacjentów z wrażliwym na steroidy zespołem nerczycowym (SSNS) oraz 20 dzieci z wykładnikami oporności na leki steroidowe w ww. etapie leczenia (SRNS).

Ekspresję czynników związanych z funkcjonowaniem ścieżki JaK/STAT badano na poziomie mRNA (technika real time PCR) oraz białka (metoda immunocytochemiczna oraz ELISA).

W oparciu o przeprowadzone badania wykazano, że

1. Leki steroidowe stosowane w terapii zespołu nerczycowego u dzieci powodują zredukowanie do zakresu kontrolnego wyjściowo podwyższonych poziomów ekspresji mRNA czynników JaK1, JaK2, JaK3, STAT1, STAT2, STAT6, TYK2, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4 i SOCS5 w krążących leukocytach u wszystkich badanych pacjentów z SSNS. Dzieci z rozpoznaną steroidoopornością charakteryzują się utrzymującym się podwyższonym poziomem ekspresji białek SOCS3 i SOCS5, IL-20, IL-6ST, IL-4R oraz czynników transkrypcyjnych JUN, MPL, MYC, SP1 i SRC. Wpływ leków steroidowych na ekspresję czynników ścieżki transdukcji sygnału JaK/STAT jest niezależny od wariantu histologicznego kłębuszkowego zapalenia nerek (MCD, DMP, FSGS).
2. W oparciu o przeprowadzone badania nie udało się jednoznacznie określić znaczenia zaburzeń funkcjonowania ścieżki jak/STAT w idiopatycznym zespole nerczycowym u dzieci. Wydaje się jednak, że białkomocz z przeładowania u dzieci niewrażliwych na leczenie steroidami może być związany ze wzrastającym stężeniem IL-20, co w efekcie może doprowadzać do nadekspresji białek SOCS3 i SOCS5 odpowiednio w monocytach i limfocytach krwi obwodowej.
3. Kompleksowa, a nie jednostkowa analiza ekspresji SOCS3 i SOCS5 oraz IL-6 i IL-20 na poziomie mRNA u pacjentów z rozpoznaniem zespołu nerczycowego w przebiegu kłębuszkowych zapaleń nerek może stanowić podstawy do prognozowania pojawienia się steroidooporności w przebiegu tego zespołu u dzieci.

9. Summary

Nephrotic syndrome (NS) is a challenge in terms of understanding its pathogenesis as well as in terms of the possibility of applying an effective therapy. In spite of a considerable modification of treatment which has taken place in the last 10 years, the mechanism of NS pathogenesis is still not well known enough. Due to this fact, a substantial percentage of nephritic syndrome cases is described as idiopathic nephrotic syndrome (INS). One of the basic medicines used in NS therapy are glucocorticoids. Thanks to them remission of the disease in almost 80% of children with INS can be obtained. The remaining group, described as steroid resistant, requires some modification of therapy and search for other, more effective methods of therapy.

Taking into consideration the data concerning the immunological origin in pathogenesis of secondary nephrotic syndrome, it may be expected that also in the group of INS patients, abnormal functioning of separate cells of the immune system is the initial reason of damage to the ultrastructure of the filtration barrier. As JaK/STAT signaling transduction pathway is the basic cell instrument among white blood cells generating the response to different cytokines as well as growth factors, it may be assumed that disorders in functioning of this mechanism may have a potential impact on further development of nephritic syndrome. Moreover, these disorders may be of double nature – enhancing the disease development or, just the opposite, acting as a protective factor.

On account of the above mentioned, the aim of the present thesis was to:

1. estimate glucocorticoids influence on expression of all the elements of JaK/STAT signaling pathway in leucocytes of patients with diagnosed nephrotic syndrome
2. attempt to determine the potential importance of functioning disorders of JaK/STAT in childhood idiopathic nephrotic syndrome
3. attempt to isolate elements of Jak/STAT pathway with potential prognostic importance in development of childhood idiopathic nephrotic syndrome

The study group consisted of 54 children aged 3 to 19 hospitalized because of idiopathic nephrotic syndrome in years 2008 – 2010 in Pediatric Cardiology and Nephrology Clinic of Karol Marcinkowski Medical University in Poznań. Two groups of patients were isolated on the basis of their response to steroid therapy during induction therapy – 34 patients with steroid sensitive nephrotic syndrome (SSNS) and 20 children with steroid resistant nephrotic syndrome (SRNS) at the above mentioned stage of treatment.

Expression of factors connected with functioning of JaK/STAT pathway was studied on mRNA level (PCR real time technique) as well as protein level (immunocytochemical and ELISA methods).

On the basis of the conducted research it was demonstrated that:

1. steroid medicines applied in therapy of nephrotic syndrome in children result in reduction to the control group range of the initially increased levels of mRNA expression of factors such as JaK1, JaK2, JaK3, STAT1, STAT2, STAT6, TYK2, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4 and *SOCS5* in circulating leucocytes of all the examined patients, except for the SSNS patients. The influence of steroid medicines on expression of factors of JaK/STAT signaling transduction pathway is unrelated to histological diagnosis (MCD, DMP, FSGS).
2. observations concerning changes in expression of SOCS3 and SOCS5 as well as IL-6 and IL-20 on mRNA and protein levels seem to prove that overload proteinuria in steroid resistant children may be connected with an increasing concentration of IL-20 which, in consequence, may lead to overexpression of SOCS3 and SOCS5 proteins in peripheral blood monocytes and lymphocytes respectively. However, the cause-effect relationship between the disorders of functioning of JaK/STAT pathway and development of children idiopathic nephrotic syndrome cannot be determined.
3. individual determination of expression of SOCS3 and SOCS5 as well as in IL-6 and IL-20 on the mRNA level in patients with nephrotic syndrome diagnosis has no substantial diagnostic value. Yet, it seems that a comprehensive and simultaneous analysis of all four factors mentioned above may, with some restrictions, indicate appearance of steroid resistance in the course of nephrotic syndrome in children.

10. Lista załączników

Załącznik 1. Zgoda Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu na prowadzenie badań naukowych.

Załącznik 2. Formularz świadomej zgody rodziców/opiekunów dziecka na udział w badaniach klinicznych (populacja badana).

Załącznik 3. Formularz świadomej zgody rodziców/opiekunów dziecka na udział w badaniach klinicznych (populacja kontrolna).

Załącznik 4. Ankieta dla osób zdrowych (populacja kontrolna).

Poznań, dnia.....

**Formularz Świadomej Zgody Rodziców/Opiekunów
Dziecka leczonego w Klinice Kardiologii i Nefrologii
Dziecięcej UM w Poznaniu z powodu pierwotnej
glomerulopatii (zespołu nerczycowego) na udział w
badaniach klinicznych.**

Po zapoznaniu się z treścią dokumentu informującego o rozpoznaniu choroby u
mojego dzieckaur.....
w....., wyrażam zgodę na jego udział w badaniach
klinicznych oraz przetwarzanie danych związanych z tym udziałem przez osoby
przeprowadzające ww. badanie kliniczne.

Zostałam/em poinformowana/y, iż w każdej chwili, ale nie później niż jeden dzień przed
planowaną biopsją nerki, mogę wycofać zgodę na udział mojego dziecka w badaniu
klinicznym.

Otrzymałam/em również jasne i pełne informacje dotyczące wykonywanych badań i zabiegu
oraz kopię podpisywanego formularza.

Podpis Rodzica/Opiekuna dziecka

Poznań, dnia.....

**Formularz Świadomej Zgody Rodziców/Opiekunów
Dziecka zdrowego na udział w badaniach
klinicznych w grupie kontrolnej.**

Po zapoznaniu się z treścią dokumentu informującego o rodzaju badań klinicznych, w których zaproponowano udział mojemu dziecku.....
ur.....w.....
w grupie kontrolnej, wyrażam zgodę na jego uczestnictwo oraz związane z nim przetwarzanie danych przez osoby przeprowadzające ww. badania kliniczne.
Otrzymałam/em jasne i pełne informacje dotyczące rodzaju badania klinicznego oraz kopię podpisywanego formularza.

Podpis Rodzica/Opiekuna dziecka

Idiopatyczny Zespół Nerczykowy – populacja kontrolna

Ankieta , Listopad 2009 (wg. Prof. Dr. F. Hildebrandt)

I. Informacje ogólne o pacjencie

Nazwisko Imię Data urodzenia

K M Wzrost cm .

Zespół nerczykowy :

- u pacjenta TAK NIE

- wśród rodziców / krewnych Matka Brat
pacjenta Ojciec Siostra Inni

Pochodzenie : polskie inne europejskie inne

II. Dodatkowe informacje

Wywiad okołoporodowy :

poród o czasie poród przedwczesny

- powikłania okresu TAK NIE
okołoporodowego

-rodzaj powikłań
okołoporodowych

Aktualne i / lub przebyte choroby pacjenta :

głuchota cukrzyca typ I

ślepotą cukrzyca typ II

małogłowię choroby autoimmunologiczne

opóźnienie rozwoju choroby układu krwiotwórczego
psychomotorycznego zaburzenia odporności

niski wzrost wady wrodzone serca

dysmorfia twarzy wady wrodzone układu moczowego

sześciopalczość nowotwory

dysplazja kręgowo – nasadowa alergie WZW Inne

Wywiad rodzinny :

Bliscy pacjenta cierpiący na wyżej wymienione choroby :

- stopień pokrewieństwa

- rodzaj schorzenia



KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 939/09

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad pomiarowania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 440); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrych Praktyk Klinicznych (Dz. U. 2005, Nr 37, poz. 308); Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 513 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsoru (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsoru (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych i udziałem wielesetnych (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1100); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niepożądanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 1 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przekładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczenia opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Przewodnego Przewodzenia Badania Klinicznego – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 05 listopada 2009 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawiła Pani:

dr hab. n. med. Danuta Ostalska-Nowicka

w sprawie prowadzenia badań w

**Klinice Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej UM w Poznaniu oraz w Katedrze
i Zakładzie Histologii i Embriologii UM w Poznaniu**

Główny badacz: lek. med. Magdalena Śmiech

Członkowie zespołu

badawczego:

dr hab. n. med. Michał Nowicki

prof. dr hab. n. med. Jacek Zachwieja

dr n. med. Witold Szaflarski

prof. dr hab. n. med. Elżbieta Kaczmarek

Temat badań: "Określenie znaczenia ścieżki sygnałowej JaK-STAT w modyfikowaniu reakcji immunologicznej w przebiegu kłębuszkowych zapaleń nerek u dzieci".

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

KOMISJA BIOETYCZNA
PRZY
UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU
ul. Fredry 10
61-701 Poznań
tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax (+48 61) 854 61 07

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

potwierdza się zgodność
z oryginałem

05.11.2012
[Signature]

SKŁAD OSOBOWY KOMISJI BIOETYCZNEJ

05.11.2009r.

z dnia

Lp	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Zygmunt Przybylski	medycyna sądowa	Katedra Medycyny Sądowej UM ul. Święcickiego 6, Poznań
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, Poznań
3.	prof. dr hab. Roman Szulc	anestezjologia i reanimacja, otolaryngologia	I Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii UM, ul. Długa 1/2, Poznań
4.	prof. dr hab. Janusz Szymań	anatomia patologiczna	Katedra Patomorfologii Klinicznej UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
5.	prof. dr hab. Wojciech Szulzewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UM ul. Szpitalna 27/33, Poznań
6.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
7.	prof. UM dr hab. med. Maciej Krawczyński	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UM ul. Grunwaldzka 55, Poznań
8.	dr hab. n. med. Robert Spaczyński	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UM, ul. Polna 33, 60-535 Poznań
9.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UM, ul. Łąkowa 1/2, Poznań
10.	prof. dr hab. Rąwek Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UM, ZOZ MSWiA ul. Dojazd 34, Poznań
11.	prof. dr hab. Janusz Paluszak	fizjologia kliniczna	Katedra i Zakład Fizjologii UM, ul. Święcickiego 6
12.	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wietowa 2/4, Poznań
13.	dr hab. Jerzy W. Ochmański	prawnik	Wydział Prawa UAM, ul. Św. Marcin 90, Poznań
14.	dr farm. Olimpia Klimaszewska	farmaceuta	Apteka „Kalifarm”
15.	Barbara Lipiak	pielęgniarka	ZOZ Granwald

arc+zarplun

LISTA OBECNOŚCI

KOMISJI BIOETYCZNEJ PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Posiedzenie Komisji dnia: 05 listopada 2009 r.

Przewodniczący: prof. zw. dr hab. ZYGMUNT PRZYBYLSKI

Zastępca
Przewodniczącego: prof. dr hab. JANUSZ WIŚNIEWSKI

Członkowie: prof. dr hab. ROMAN SZULC

prof. dr hab. JANUSZ SZYMAŚ

prof. dr hab. WOJCIECH SŁUZEWSKI

prof. dr hab. HENRYK WYSOCKI

prof. UM dr hab. med.
MACIEJ KRAWCZYŃSKI

dr hab. n. med. ROBERT SPACZYŃSKI

dr med. PIOTR TOMCZAK

prof. dr hab. PAWEŁ CHEĆIŃSKI

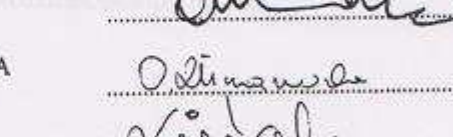
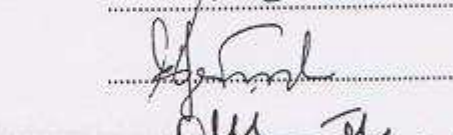
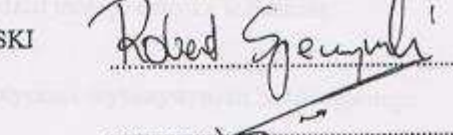
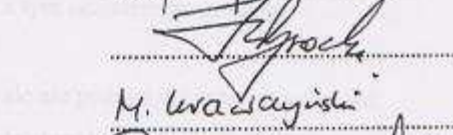
prof. dr hab. JANUSZ PALUSZAK

ks. prof. dr hab. JERZY TROSKA

dr hab. JERZY W. OCHMAŃSKI

dr farm. OLIMPIA KLIMASZEWSKA

BARBARA LIPIAK



KOMISJA BIOETYCZNA
UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
W POZNANIU
ul. Fredry 10
61-701 POZNAŃ
tel. (+48 61) 854 62 51, 854 80 80
fax (+48 61) 854 61 07
04.01.2010
z urzędem