

ÜREMİLİ HASTALARDA OTORADYOGRAFİK TEKNİKLE HÜCRESEL İMMÜNİTE ve Hemodiyalizin Etkisiz

Dr. Kuddusi CENGİZ xx
Dr. Avery A SANDBERG xxx

ÖZET

44 Üremili hasta ve 24 sağlıklı kişinin fitohemaglutinin (PHA) ile uyarılmış periferik kan lenfositlerinde radyoaktif timidinin hücre çekirdeğine tutulması ile hücrel immünite değerlendirildi. Kontrol grubundan hazırlanan 76 saatlik hücre kültüründe radyoaktif timidin ile işaretlenen ortalama hücre sayısı 673.7 ± 53.6 , yüz saatlik hücre kültüründe, 701 ± 58.9 hücre Hasta grubunda radyoaktif timidin ile işaretlenen ortalama hücre sayısı 76 saatlik hücre kültüründe, 219.2 ± 69.6 yüz saatlik hücre kültüründe ise, 281.2 ± 76.5 hücre tesbit edildi.

Üremili hastalarda hücrel immünite bozulmuş ve hücrenin bölüm hızı kontrol grubuna oranla önemli ölçüde yavaşlamış bulundu (PG 0.001). Üremili hastalardaki hücrel immünitenin bozulmasına ve hücre geliş hızının yavaşlamasına hemodiyalizin etkisi gözlenmedi.

GİRİŞ

Üreminin immün sistemi inhibe ettiği insan ve deney hayvanlarında gösterilmiştir(1-4). İmmün sistemdeki bu bozukluklar hem in vitro (3,5-7). hemde in vivo çalışmalarla ortaya konulmuştur (8,9). Üremi immün sistem üzerine önemli derecede baskılayıcı etkiye sahiptir. Bu etkinin renal transplantasyondan sonra, graftin sürekliliği için yüksek doz İmmünoşüpresif tedavi olan hastalardan daha fazla olduğu bildirilmiştir. (2,10).

(x) Çalışma. Rusvell Park Memmorial Institute Cancer Cell Center and Kidney Transplant Program of the Buffola General Hospital Buffola N. Y da yapılmış ve XXIV th Congress of the EDTA-ERA. 1987 de takdim edilmiştir.

(xx) Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi İç hastalıkları Anabilim Dalı Öğr. Üyesi Doç. Dr. SAMSUN

(xxx) Rosvell Park Memmorial Institute Cancer Cell Center. Buffolo N.Y.

Otoradyografi, gerek sellüler gerekse subsellüler metabolik olayları aydınlatmada kullanılan iyi bir yöntemdir. (11,12) Vucutta T hücreleri ile ilgili olan hücre-sel immünite, in vitro ortamda lenfositlerin transformasyona uğratılmaları ile değerlendirilebilir. Kültür ortamına eklenen antijen ve mitojenle karşılaşan lenfositlerde hücre metabolizması artmakta ve yeni DNA sentez edilmektedir (13,14). Radyoaktif timidinin yeni sentezlenen DNA ya girmesi ölçülerek Lenfosit transformasyon oranı saptanmaktadır (13-15). Lenfositlerin in vitro transformasyonu, hücre-sel immün cevabın hem nitelik hem de nicelik yönünden iyi bir ölçüsüdür (13-16).

Çalışmamızda üremili hastalarda hücre-sel immünite ve buna literatürde oldukça tartışmalı olan hemodiyaliz etkisinin araştırılmasının yararlı olacağını düşündük.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmaya çeşitli nedenlere bağlı son önem böbrek hastalığı ve hemodiyaliz gereksinmesi olan "Roswell Park Memorial Institute Cancer Cell Center, Buffalo, New York ve Buffalo General Hospital" Hemodiyaliz Merkezine başvuran, 47 üremili hasta alındı. Hastalardan 3 tanesinde uygun metafaz bulunmadığından çalışma dışı bırakıldı.

Kontrol grubumuzu hiçbir hastalığı olmayan, en az son 3 ay içerisinde hiçbir ilaç kullanmayan (doğum kontrol ilaçları dahil), kimyasal toksinlerle ilişkisinin olmadığına inanılan, kan verebilecek kadar sağlıklı olan 24 kan vericisi oluşturmuştur. Kontrol grubunun yaşları 17-51 yaş arasında değişmekte idi. Bunların 12 si kadın 12 si de erkekti. Yaş ortalaması kadınlar için 29 erkekler için 34 idi.

Hasta grubumuz üremi tanısı almış hemodiyaliz gereksinmesi olan 44 hastayı içermektedir. Hastaların 25 i erkek, 19 u kadın olup, yaşları 19-72 yaş arasında değişiyordu. Ortalama yaş kadınlar için 49, erkekler içinde 48 yıl idi. Hasta seçiminde, hastaların steroidler dahil immün sistemi baskılayan hiçbir ilaç almamalarına özen gösterilerek, sitostatik ve immün depresan ilaç kullananlar çalışma dışı bırakıldı. Hastaların histopatolojik tanıları ve bazı özellikleri tablo 1 de özetlenmiştir.

Tüm hastalarımızda hastalık süresi 10-360 ay arasında değişmektedir. 12 hasta diyaliz başlamadan önce, geri kalan 32 hastaya da haftada iki kez diyaliz uygulanmaktaydı. Diyaliz uygulanan hastalar diyalizlerinin 1-16 ıncı aylarında ortalama 5 ± 43 üncü ayında çalışmaya alınmıştır. Her hastada diyaliz süresi hastanın ihtiyacına göre 6-8 saat devam ettirilmiştir.

Değerler ortalama, standart sapma ve grup değerlerinin alt ve üst sınırları olarak verilmiştir.

Tablo 1:

Histopatolojik tanıya göre gruplar	Diyaliz uygulanan vaka sayısı	Diyaliz uygulanmayan vaka sayısı	Toplam vaka sayısı	Yaş (yıl)	Hastalık süresi (ay)
1. Kronik G. Nefrit	13	3	16 (8K+8E)	43.5 (18—69)	46.5 18—130)
2. Diabetik Nefrosklerozis	8	3	11 (7K+4E)	48.5 (24—63)	116.2 (10—360)
3. Son dönem böbrek hastalığı	5	2	7 (2K+5E)	52.8 (31—69)	72.4 (25—120)
4. İnteritisyel Nefrit	2	2	4 (1K+3E)	54 (21—74)	219 (48)
5. Polikistik Böbrek	2	1	3 (2K+1E)	41 (26—60)	68 (30—138)
6. Diğer nedenlere bağlı nefrosklerosis	2	1	3 (3E)	48.6 (24—69)	71.3 (46—96)

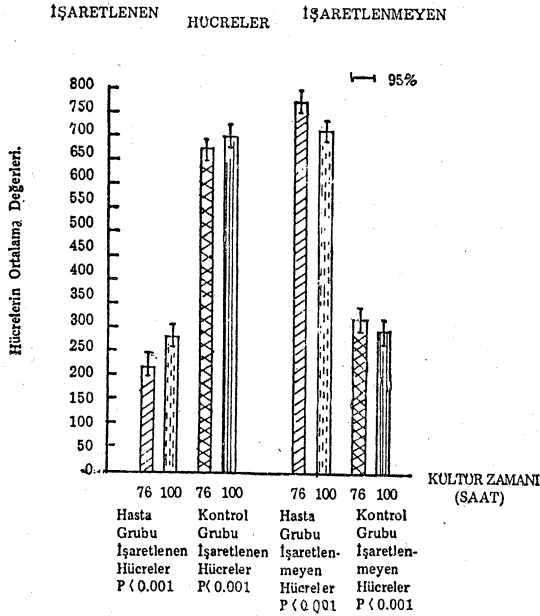
Otoradyografik çalışmada Taylor (17), Takagi ve Sandberg (12,18) metodları çok az değiştirilerek uygulandı. Kültür zamanı 72 ve 100 saat olarak tesbit edildi. Her bir doku kültür kutusuna 0.1 ml. fitohemaglutinin (PHA) ile uyarılmış, 1 ml. periferik kan konularak total volüm 10 ml olacak şekilde içerisinde 100 Ü/ml., penisilin, 100 mg/ml. streptomisin ve RPMI-1640 doku kültürü ile % 16.7 fetal dana serumu (GİBCO) içeren besi ortamı steril şartlarda konuldu. Kültür süresinin bitiminden 8 saat önce her doku kültür kutusuna spesifik aktivitesi 6.7 curi/milimol "tritiated thymidine" (H^3 -TdR) ilave edilerek elde edilen depo solusyondan her kültür kutusuna 1 mikroküri/ml. olacak şekilde 1 ml. ilave edildi. Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce kolşisin (0.2 mg/ml) ilave edildi. Standart teknikle (18) elde edilen lamalar "nuclear tract emülsion NTB-2" (Kodak) yarı yarıya distile su ile sulandırılmış emülsiyona batırıldıktan sonra developpe edilerek % 5 Giemsa boyası ile boyandı. Üzerinde 5 veya üstü granül bulunan lenfositler radyoaktif timidin ile işaretlenmiş, granül bulunmayanlarda işaretlenmemiş olarak değerlendirildi (18). Hesaplar "Roswell Park Memorial Institute" istatistik merkezinde bilgisayar ile yapıldı.

BULGULAR

Otoradyografik metodla, 44 üremili hasta ve 24 sağlıklı kişiyoaktif timidinin hücrelerin çekirdeklerinde tutulması ile PHA ya karşı hücre cevabı ölçülerek in vitro lenfosit transformasyonu değerlendirildi. Hücre çekirdeklerinde 5 grnül ve üstü tutulum, o hücrenin timidin ile işaretlenmiş sayılmasına yetmiştir. Timidin ile işaretlenen hücreler şekil 1 de görülmektedir.

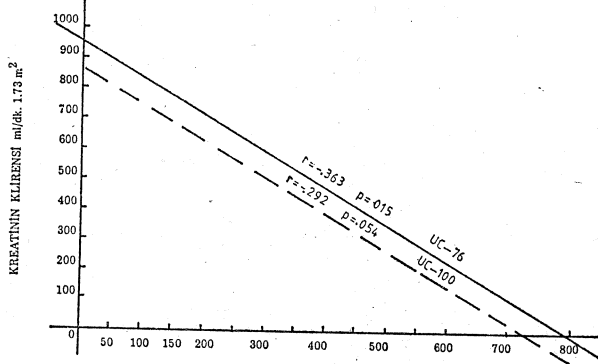
Kontrol ve hasta grubundaki her vaka için 76 ve 100 saatlik iki ayrı lenfosit kültüründen her vakada 1000 hücre sayılarak radyoaktif timidinin hücrelerin çekirdeklerinde tutulması değerlendirildi. Kontrol grubunda 76 saatlik hücre kültür sonucu radyoaktif timidin ile işaretlenen hücrelerin ortalama değeri 673.7 ± 56.3 ; yüz saatlik kültür sonucu 701 ± 58.9 bulundu. Hasta grubunda 76 saatlik kültürde radyoaktif timidin ile işaretlenen hücrelerin ortalama değeri 219.2 ± 69.6 iken yüz saatlik kültürde bu değer 281.2 ± 76.5 hücredir (Tablo 2). Hasta grubunda radyoaktif timidin ile işaretlenmiş hücre sayısı kontrol grubundakilerden anlamlı şekilde düşük; radyoaktif timidin ile işaretlenmemiş hücre sayısı anlamlı bir şekilde yüksekti. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.001$). Bundan başka hem hasta hem de kontrol grubunda, 100 saatlik kültür sonucu radyoaktif timidin ile işaretlenmiş hücre sayısı 76 saatlik kültür sonucu işaretlenen hücre sayısından fazla olduğu halde bu farklılık hasta grubunda kontrol grubundakinden daha belirgindi ($P < 0.01$), Grafik 1).

Grafik 1 : Üremili hastalar ve kontrol grubunda 76 ve 100 saatlik hücre kültüründe radyoaktif timidinle işaretlenen ve işaretlenmeyen hücreler

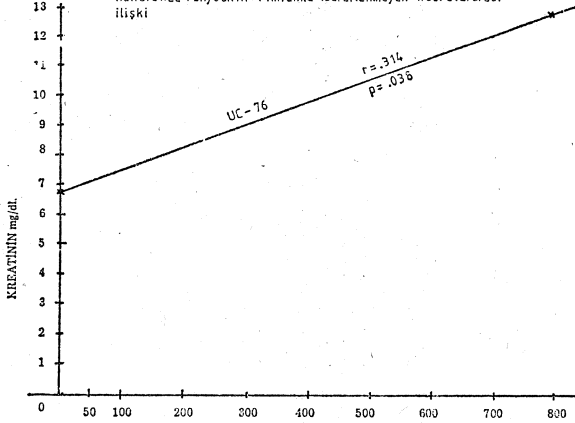


Otoradyografik çalışmada 76 saatlik hücre kültüründe radyoaktif timidin ile işaretlenmeyen hücreler ile hastaların kan kreatinin düzeyleri arasında pozitif, 100 saatlik hücre kültüründe radyoaktif timidinle işaretlenen metafaz ile de negatif bir ilişki vardır. Aynı şekilde 76 ve 100 saatlik hücre kültüründe radyoaktif timidinle işaretlenmeyen hücreler ile hastaların kreatinin klerens değerleri arasında negatif bir ilişki gözlenmekteydi (Grafik 2,3).

Grafik 2 : Üremili hastalarda kreatinin klerens değerleri ile 76 ve 100 saatlik hücre kültüründe radyoaktif timidinle işaretlenmeyen hücreler arasındaki ilişki.



Grafik 3: Üremili hastalarda kan kreatinin düzeyleri ile 76 saatlik hücre kültüründe radyoaktif timidinle işaretlenmeyen hücreler arasındaki ilişki



Hemodiyaliz üremili hastalarda PHA karşı hücre sel cevaba ve lenfosit transformasyonuna etkisini araştırmak amacı ile; 44 üremili hastanın 12'sinde hemodiyaliz uygulanmadan, 32'sinde de belirli süreden beri beş 2 kez hemodiyaliz uygulanmakta iken hücre sel immünite değerlendirildi. Hemodiyalizde ki 32 hastanın 76 saatlik kültür sonucunda radyoaktif timidin ile işaretlenmiş ortalama hücre sayısı 217.06 ± 73.09 , yüz saatlik kültür sonunda da radyoaktif timidin ile işaretlenen ortalama hücre sayısı 284.65 ± 76.61 idi. Mevcut işlem hemodiyaliz öncesi 12 hastada ise, 76 saatlik kültür sonucu radyoaktif timidin ile işaretlenmiş ortalama hücre sayısı 224.92 ± 62.34 , yüz saatlik kültür sonucu bu değer 272.66 ± 72.16 hücre idi. Hemodiyaliz öncesi hastalardaki değerler diyalizde bulunan hastalardaki değerler ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($P > 0.05$; Tablo 3.4).

Tablo 2: Üremili 44 Hasta ve 24 Sağlıklı Kişide ^3H -timidin ile işaretlenen ve işaretlenmeyen Hücre Sayısı Ortalamaları.

Gruplar	Sayısı	^3H -Timidin ile işaretlenen hücreler			^3H -Timidin ile işaretlenmemiş hücreler		
		76 saatlik kültür		100 saatlik kültür	76 saatlik kültür		100 saatlik kültür
		X	S.D.	X	X	S.D.	X
Kontrol	24	673.7 $\pm$ 56.3		701 $\pm$ 58.9	325.4 $\pm$ 57.9		299.1 $\pm$ 59.2
Hasta	44	219.2 $\pm$ 69.6		281.2 $\pm$ 76.5	780.7 $\pm$ 72.5		718.3 $\pm$ 76.9
t-değeri		20.27		17.86	-28.48		-25.02
P-değeri		P<0.001		p<0.001	p<0.001		p<0.001

Tablo 3: Hemodiyaliz 3H-timidin ile işaretlenen ve işaretlenmeyen hücelere etkisi (76) saatlik kültürde)

Hemodiyaliz Durumu	Vaka Sayısı	3H-timidin ile işaretlenen ve işaretlenmeyen hüceler (76) saatlik kültür)		işaretlenmeyen hüceler	
		İşaretlenen hüceler		İşaretlenmeyen hüceler	
		$\bar{X}$	S.D.	$\bar{X}$	S.D.
Diyaliz Uygulanmakta olan hastalar	32	217.06 ± 77.09		782.81 ± 76.78	
Diyaliz öncesi hastalar	12	224.92 ± 62.34		775.08 ± 62.33	
t-değeri		0.354		0.34	
P-değeri		P>0.05		P>0.05	

Tablo 4: Hemodiyaliz 3H-timidin ile işaretlenen ve işaretlenmeyen hücelere etkisi (100 saatlik kültürde)

Hemodiyaliz Durumu	Vaka Sayısı	3H-timidin ile işaretlenen ve işaretlenmeyen hüceler (100 saatlik kültürde)		işaretlenmeyen hüceler	
		İşaretlenen hüceler		İşaretlenmeyen hüceler	
		$\bar{X}$	S.D.	$\bar{X}$	S.D.
Diyaliz uygulanmakta olan hastalar	32	284.65 ± 76.61		713.52 ± 79.22	
Diyaliz öncesi hastalar	12	272.66 ± 72.16		716 ± 60.96	
t-değeri		0.47		0.101	
P-değeri		P>0.05		P>0.05	

TARTIŞMA

Üremili hastalarda immün sistemin önemli derecede baskılanmış olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (1-9). Üremide bildirilen immün baskılanmanın benzerine ileri dönem karsinoması olan kaşektik durumlarda ve hodgkin hastalarında da rastlanıldığı bildirilmiştir(19). Üremili hastalarda immün yetersizliğin derecesi, böbrek transplantasyonundan sonra immünosüpressif tedavi gören hastalardaki immün yetersizliğin derecesinden daha fazla olduğunun tesbit edilmiş olması, üreminin immün yetmezlikli hastalıklar listesine yazılmasının gerekliliğini savundurmıştır(2,10,19).

Çalışmamızda otoradyografik yöntemle hücre çekirdeğinin radyoaktif timidinle (3H-timidin) işaretlenme sıklığı sayılarak, üremili hastalar ve kontrol grubundaki sağlıklı kişiler için PHA ya karşı hücre cevabı ve invitro lenfosit transformasyonu değerlendirildi. Radyoaktif timidin ile işaretlenen hücre sayısı kontrol grubuna kıyasla oldukça düşüktü ve sonuç istatistiksel olarak çok önemli bulundu. (P<0.001). Hem hasta hem de kontrol grubuna ait 100 saatlik hücre kültüründe,

radioaktif timidin ile işaretlenen hücre sayısı, 76 saatlik hücre kültürü sonucu radioaktif timidin ile işaretlenen hücre sayısından fazla olmasına karşılık; bu farkın hasta grubunda daha belirgin olduğu gözlemlendi ($P < 0.01$). Lenfositlerin in vitro transformasyonunun derecesi hücre immün cevabın hem nitelik hem de nicelik yönünden iyi bir ölçüsü olduğu bildirilmiştir(1,3,13,15,18.). Bundan dolayı çalışmamızda açıkça görüldüğü gibi, üremili hastalarda immün sistem önemli ölçüde baskılanmıştır. Bundan başka 100 saatlik hücre kültüründe radioaktif timidin ile işaretlenen hücre sayısının, 76 saatlik hücre kültürü sonucunda işaretlenenlerden fazla olması, üremili hastalarda hücre gelişim hızının, kontrol grubuna oranla daha yavaş olduğunu göstermiştir. Çalışmamızın bu bölümünün benzerine literatürde rastlanmamıştır.

Literatürde üremili hastalardaki otoradyografik yöntemle daha önceden yapılan çalışmalar hemen tamamıyla lenfositlerin radioaktif timidin ile işaretlenmesi şeklinde olup, in vitro lenfosit transformasyonunu, dolayısı ile hücre immün sistemin ileri derecede baskılanmış olduğunu belirlemiştir. Çalışmamızdaki sonuçlar literatürdeki sonuçlarla uyumluluk göstermiştir (1,6,7).

Çalışmamızda, üremili hastaların tanı ve izlenimlerinde sıklıkla kullanılan laboratuvar sonuçları ile in vitro lenfosit transformasyon değerleri karşılaştırıldığında, lenfosit transformasyonu ile hastaların kan kreatinin düzeyleri ve kreatinin klerens değerleri arasında yakın bir ilişki bulundu ($P < 0.01$). Bu ilişkinin kreatinin klerens değerleri ile pozitif, kan kreatinin düzeyleri ile negatif olduğu gözlemlendi. Buna karşılık üremili hastalarda kan üre ve alkalen fosfataz değerleri arasında hiç bir ilişki gözlenmedi ($P > 0.05$). Bu da, üremili hastalarda kan kreatinin seviyesi ile in vitro lenfosit transformasyon derecesinin ilişkili olduğu ve böylece, in vitro lenfosit transformasyonuna protein katabolizmasının etkili olabileceğini düşündürmüştür(20). Kan kreatininini tek başına toksisitesi az olup (21), yüksek doz kreatinin intestinal bakterilerin kreatinase enzimi ile "Sarkocine" methy-lamine" ve methylhydantojin gibi lenfosit aktivasyonuna tok sik etkileri olan in vitro lenfosit transformasyonu ile yakın bir ilişki bulundu ($P < 0.01$). Bu da uyguladığımız otoradyografik tekniğin hastalığın takibinde kullanılabileceğini kanıtlar niteliktedir.

Hemodiyaliz üremili hastalarda hücre gelişim hızına ve hücre immün cevaba etkisinin olmadığını gözlenmiş olması, Literatürde çoğu araştırmacının bildirdiği gibi hemodiyalizle üremik toksinlerin tamamının organizma için etkisiz hale getirilemeyeceğini (22,23) doğruladığı gibi çalışma grubumuzda hemodiyalizde olan hastalara diyaliz uyulama süreleri 1-16 ay arasında değişmekteydi. Bu sürenin kısalığındanda olabildiği düşünülebilir.

Sonuç olarak, günümüzde bile henüz niteliklerini bilmediğimiz çeşitli toksik belki de karsinogenik maddelerin bu araştırma ile ortaya konan sitogenetik ve immünolojik bozukluklardan sorumlu olabileceği kanısına varıldı.

SUMMARY

Cell Mediated Immunity In Uremic Patients By Autoradiography and Hemodialysis

Phytohemagglutinin (PHA) stimulated peripheral blood lymphocytes from 44 uremic patients and 24 control subjects were studied cytogenetically. The cellular response to PHA was measured by incorporation of ^3H -thymidine into nuclei. In the control subjects, the mean number of Labelled cells was 673 ± 53.6 after culture period of 76 hrs. and 701 ± 58.9 after 100 hrs. A significantly lower number of labelled cells were observed in patients. The mean number of labelled cells was 219.2 ± 69.6 after 76 hrs. and 281.2 ± 76.5 after 100 hrs.

Measurements of cellular kinetics revealed a lower values when compared to control subjects ($P < 0.001$). And the effects of hemodialysis on the cellular response weren't seen in the uremic patients.

KAYNAKLAR

- 1- Newberry, W.M., and Sanford, J.P.: Defective cellular immunity in renal failure: Depression of reactivity of lymphocytes to phytohemagglutinin by renal failure serum. *J. Clin. Invest.*, 50: 1262, 1971.
- 2- Quadracci, L.J., Ringden, O., Krzymanski, M.: The effect of uremia and transplantation on lymphocyte subpopulation. *Kidney Int.*, 10: 179, 1976.
- 3- Silk, M.R.: The effect of uremic plasma on lymphocyte transformation. *Invest. Urol.*, 5: 195, 1967.
- 4- Dobbstein, H.: Immune system in uremia: *Nephron.*, 17: 409, 1976.
- 5- Daniels, J.C., Sakai, H., Remmers, A.R., Sarles, H.W., Fish, J.C., Cobb, E.K., Levin, W.C., and Ritzmann, S.E.: In vitro reactivity of human lymphocytes in chronic uremia: analysis and interpretation. *Clin. Exp. Immunol.*, 8: 213, 1971.
- 6- Kasakura, S., and Lowenstein, L.: The effect of uremic blood on mixed leukocyte reactions and on cultures of leukocytes with phytohemagglutination. *Transplantation.*, 5: 283, 1967.
- 7- Nelson, D.S., and Penrose, J.M.: Macromolecular inhibitor of lymphocyte transformation in serum from patients with chronic renal failure. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. (Pt. 2)*, 51: 259, 1973.
- 8- Dammin, G.J., Couch, N.P., and Murray, J.E.: Prolonged survival of skin homografts in uremic patients, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 64: 967, 1957.

- 9- Huber, H., Pastner, D., Dittrich, R., and Braunsteiner, H.: In reactivity of human lymphocytes in uremia-a comparison with the impairment of delayed hypersensitivity. *Clin. Exp. Immunol.*, 5: 75, 1969.
- 10- Wilson, W.E.C., Kirkpatrick, C.H., and Talmage, D.W.: Suppression of immunologic responsiveness in uremia. *Ann. Intern. Med.*, 62: 1, 1965.
- 11- Pelc, S.R.: Autoradiograph technique. *Nature (London)*, 160: 749, 1947.
- 12- Sandberg, A.A.: The chromosome in human cancer and Leukemia. New York: Elsevier, 99, 1980.
- 13- Elves, M.W., Israels, M.C.G. Collinge, M.: An assesment of the mixed leucocyte reaction in renal failure. *Lancet*, 1: 682, 1966.
- 14- Lalla, M., Virolainen, M.: Blood lymphoblast proliferation in vivo in cutaneous drug hypersensitivity reactions. *Int. Arch. Allergy*, 46: 289, 1974.
- 15- Harris, R.: The normal lymphocyte transfer (NLT) test and skin homografting in chronic uremia. In: *Histo-compatibility Testing*. Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 66: 95, 1966.
- 16- Coulson, A.S., and Chalmers, D.G.: Response of human blood lymphocytes to tuberculin PPD in tissue culture. *Immunology*, 12: 417, 1967.
- 17- Taylor, J.H., Woods, P.S., and Hughes, W.L.: The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labelled thymidine. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 43: 122, 1957.
- 18- Takagi, N., and Sandberg, A.A.: Chronology and pattern of human chromosome replication VII. Cellular and chromosomal DNA Cytogenetics., 7: 118, 1968.
- 19- Gatti, R.A., and Good, R.A.: Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A Literature review. *Cancer*, 28: 89, 1971.
- 20- Nakhla, L.S., Goggin, M.J.: Lymphocyte transformation in chronic renal failure. *Immunology*. 24: 229, 1973.
- 21- Jones, J.D., and Burnett, P.C., : Creatinine metabolism and toxicity. *Kidney Int*, 7: 294, 1975.
- 22- Holdsworth, R.S., Fitzgerald, C.S., and Atkins, R.C.: The Effect of maintenance dialysis on lymphocyte function. *Clin. Exp. Immunol.*, 33: 95, 1978.
- 23- Nelson, D.S., and Penrose, J.M.: Macromolecular inhibitor of Lymphocyte transformation in serum from patients with chronic renal failure. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. (pt.2)*, 51: 259, 1973.