

137
25
H3151



INSTYTUT CENTRUM MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

ZESPÓŁ CHIRURGII TRANSPLANTACYJNEJ

EWA SITNICKA

WPLYW OGÓLNOUSTROJOWEJ HIPERTERMII NA NATURALNIE
CYTOTOKSYCZNE KOMÓRKI WĄTROBY

PRACA DOKTORSKA

Promotor

Prof. dr hab. med. WALDEMAR L. OLSZEWSKI

Warszawa 1990

Serdecznie dziękuję

Panu Profesorowi dr hab. med. Waldemarowi L. Olszewskiemu
za opiekę naukową, wnikliwe rady i pomoc okazaną w czasie
przygotowywania pracy

Pani dr Barbarze Łukomskiej dziękuję za pomoc i konsultacje w
czasie przygotowywania pracy

Panu Tomaszowi Ryffa dziękuję za pomoc w przeprowadzeniu
części badań

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Zespołu Chirurgii
Transplantacyjnej ICMDiK PAN gorąco dziękuję za okazaną mi
życzliwość i koleżeńską atmosferę

Ewa Sitnicka

SPIS TREŚCI

	str
1.ZAŁOŻENIA I CEL	1
2.PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA	6
2.1.ZJAWISKO NATURALNEJ CYTOTOKSYCZNOŚCI	6
2.1.1.CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK NK	7
2.1.2.REGULACJA AKTYWNOŚCI KOMÓREK NK	9
2.1.3.FUNKCJE KOMÓREK NK	10
2.1.4.UDZIAŁ NK W NISZCZENIU NOWOTWORÓW IN VIVO	10
2.2.CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK NK IZOLOWANYCH Z ZATOK WĄTROBY	12
2.2.1.CHARAKTERYSTYKA FENOTYPOWA KOMÓREK ZATOK WĄTROBY	13
2.2.2.POCHODZENIE KOMÓREK ZATOK WĄTROBY	14
2.2.3.FUNKCJE KOMÓREK IZOLOWANYCH Z ZATOK WĄTROBY	15
2.3.MECHANIZM ZABIJANIA MIĘDZYKOMÓRKOWEGO	17
2.4.BEZPOŚREDNIE DZIAŁANIE WYSOKIEJ TEMPERATURY NA KOMÓRKI IN VITRO	20
2.5.WPŁYW HIPERTERMII NA KOMÓRKI NOWOTWOROWE	23
2.5.1.MIKROKRĄŻENIE W TKANCE NOWOTWOROWEJ PODCZAS HIPERTERMII	23
2.6.WPŁYW HIPERTERMII NA KOMÓRKI UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO	26
2.6.1.BADANIA IN VIVO	26
2.6.2.BADANIA IN VITRO	30
2.6.2.A PROLIFERACJA LIMFOCYTÓW W PODWYŻSZONEJ TEMPERATURZE	30
2.6.2.B FUNKCJE LIMFOCYTÓW W PODWYŻSZONEJ TEMPERATURZE	33
2.6.2.C PRODUKCJA CYTOKIN W PODWYŻSZONEJ TEMPERATURZE	34

2.7.ZJAWISKO SZOKU CIEPLNEGO	36
2.7.1.BIAŁKA SZOKU CIEPLNEGO	36
2.7.2.CZYNNIKI WYWOŁUJĄCE SYNTEZĘ BIAŁEK SZOKU CIEPLNEGO	37
2.7.3.GENY KODUJĄCE HSP	38
2.7.4.LOKALIZACJA HSP W KOMÓRCE	40
2.7.4.FUNKCJE HSP	41
3.MATERIAŁY I METODY	48
3.1.ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE	48
3.2.SCHEMAT DOŚWIADCZEŃ	48
3.2.1.HIPERTERMIA IN VIVO	48
3.2.2.HIPERTERMIA IN VITRO	51
3.3.IZOLACJA KOMÓREK Z KRWI I ŚLEDZIONY	54
3.4.PERFUZJA ZATOK WĄTROBY	54
3.5.OCENA ŻYWOTNOŚCI KOMÓREK	54
3.6.IZOLACJA KOMÓREK JEDNOJĄDROWYCH	55
3.7.PRZYGOTOWANIE PREPARATÓW KOMÓRKOWYCH	55
3.8.MORFOLOGICZNA CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK JEDNOJĄDROWYCH	56
3.9.IDENTYFIKACJA SUBPOPULACJI KOMÓREK PRZY UŻYCIU PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH	56
3.10.OCENA AKTYWNOŚCI KOMÓREK NATURALNIE CYTOTOKSYCZNYCH	58
3.10.1.TEST CYTOTOKSYCZNY Z RADIOAKTYWNIENIEM ZNAKOWANYMI KOMÓRKAMI K562	58
3.10.2.OCENA NATURALNEJ CYTOTOKSYCZNOŚCI NA POZIOMIE POJEDYNCZEJ KOMÓRKI (SINGLE CELL ASSAY)	59
3.10.3.REORIENTACJA APARATU GOLGIEGO	60
3.11.OZNACZANIE POZIOMU SYNTEZY RNA W KOMÓRKACH JEDNOJĄDROWYCH KRWI, ŚLEDZIONY I PERFUZATU WĄTROBY	62
3.12.OCENA ELIMINACJI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH LINII K562	62

IN VIVO

3.13.METODY STATYSTYCZNE	63
4.WYNIKI	65
4.1.WYNIKI BADAŃ PO HIPERTERMII IN VIVO	65
4.1.1.WPŁYW HIPERTERMII IN VIVO NA TEMPERATURĘ SZCZURA	65
4.1.2.WPŁYW HIPERTERMII NA LICZBĘ IZOLOWANYCH KOMÓREK	65
4.1.3.WPŁYW HIPERTERMII NA LICZEBNOŚĆ POSZCZEGÓLNYCH POPULACJI LEUKOCYTÓW	67
4.1.4.WPŁYW HIPERTERMII IN VIVO NA LICZEBNOŚĆ POSZCZEGÓLNYCH SUBPOPULACJI KOMÓREK JEDNOJĄDROWYCH	69
4.1.5.WPŁYW HIPERTERMII IN VIVO NA LICZBĘ LGL I AKTYWNOŚĆ KOMÓREK NK	72
4.1.6.WPŁYW 4-GODZINNEJ HIPERTERMII NA ELIMINACJĘ IN VIVO KOMÓREK K562	74
4.2.WYNIKI BADAŃ PO HIPERTERMII IN VITRO	75
4.2.1.WPŁYW HIPERTERMII IN VITRO NA LICZBĘ LGL I AKTYWNOŚĆ KOMÓREK NK W TEŚCIE CYTOTOKSYCZNYM	75
4.2.2.WPŁYW HIPERTERMII IN VITRO NA AKTYWNOŚĆ NK MIERZONĄ NA POZIOMIE POJEDYNCZEJ KOMÓRKI (SINGLE CELL ASSAY)	76
4.2.3.WPŁYW HIPERTERMII IN VITRO NA POŁOŻENIE APARATU GOLGIEGO W KOMÓRCZE EFEKTOROWEJ	77
4.2.4.WPŁYW HIPERTERMII IN VITRO NA POZIOM PRODUKCJI RNA	78
5.DYSKUSJA	80
6.PODSUMOWANIE I WNIOSKI	91
7.PIŚMIENNICTWO	93
8.SPIS SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	118
9.TABELE I WYKRESY	121

1. CEL I ZAŁOŻENIA

Sztucznie wywołana ogólnoustrojowa hipertermia prowadzi in vivo do hamowania procesu rozplemu komórkowego w nowotworach. W procesie tym odgrywają rolę zarówno neurohormonalne efekty hipertermii (wpływ na naczynia kapilarne), komórki odpornościowe (komórki cytotoksyczne), jak również topografia miejsca wzrostu nowotworu (np. wątroba). Praca powyższa przedstawia fragment badań nad wpływem hipertermii na cytotoksyczne funkcje limfocytów wątroby.

Komórki naturalnie cytotoksyczne pełnią funkcje immunomodulacyjne. Uczestniczą w regulacji hemopoezy (Reynolds i Ortaldo 1987) oraz odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego i humoralnego (Reynolds i Ortaldo 1987). Najnowsze badania wykazały, że komórki NK zwiększają odpowiedź limfocytów T na alloantygeny w reakcji MLR (Weissler i wsp. 1988). Komórki naturalnie cytotoksyczne regulują aktywność limfocytów B. Stwierdzono, że komórki LGL identyfikowane funkcjonalnie z komórkami NK i mające na swojej powierzchni marker Leu 7 hamują produkcję immunoglobulin i odpowiedź komórek B na PWM w badaniach in vitro (Pistoia i wsp. 1985).

Komórki NK biorą także udział w procesie odrzucania przeszczepów szpiku kostnego (Lotzova 1987) i przeszczepów narządowych (Reynolds i Ortaldo 1987). Wykazano, że komórki naturalnie cytotoksyczne produkują szereg cytokin, a wśród nich: IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IFN- α i IFN- γ , CSF (colony

stimulating factor) oraz TNF (tumor necrosis factor) (Lotzova i Ades 1989, Trinchieri i wsp.1989).

Komórki naturalnie cytotoksyczne uczestniczą w naturalnym mechanizmie odporności przeciwwirusowej (Bukowski i wsp.1983) oraz w zwalczaniu infekcji bakteryjnych, grzybiczych i pasożytniczych (Reynolds i Ortaldo 1987). Badania tej populacji komórek dowiodły, że odgrywają one rolę niespecyficznym mechanizmie hamowania i kontrolowania wzrostu nowotworów (Timonen i wsp.1981).

Hipertermia czyli całkowite lub lokalne ogrzanie ciała, stosowana jest coraz częściej w leczeniu niektórych typów nowotworów (Field 1987). Nieznany jest mechanizm przeciwnowotworowego działania wysokiej temperatury. Długotrwałe podwyższenie temperatury ciała prowadzi do zahamowania wzrostu pewnych nowotworów. Przypadki spontanicznego cofania się guzów obserwowano po długotrwałej gorączce. Dane literaturowe wskazują na hamujące działanie hipertermii in vivo i in vitro na proliferację komórek nowotworowych i powstawanie przerzutów (Strom 1983, Robins i wsp.1982, Shen i wsp.1987)). Przeciwnowotworowe działanie podwyższonej temperatury prawdopodobnie jest związane ze zwiększoną wrażliwością komórek nowotworowych na bezpośrednie działanie podwyższonej temperatury, która in vivo i in vitro hamuje proliferację niektórych typów nowotworów, z obniżeniem przepływu krwi przez guz nowotworowy oraz z aktywacją układu immunologicznego gospodarza.

Badania biologicznego efektu hipertermii w celu

uzasadnienia jej klinicznego stosowania wykazały immunoregulacyjne działanie wysokiej temperatury. Odnotowano wzrost poziomu interleukiny 1 (IL-1) (Neville i Sander 1988) i interferonu- γ (Downing i wsp.1987) oraz hormonów sterydowych (Lotz i Michaelson 1978) w surowicy zwierząt badanych po hipertermii. Konsekwencją tego jest zmiana aktywności komórek układu immunologicznego. Downing i Taylor (1987) wykazali, że komórki jednojądrowe izolowane od ludzi poddanych hipertermii mają obniżoną odpowiedź proliferacyjną na PHA, co jest prawdopodobnie związane z obserwowanym spadkiem liczby komórek CD4⁺.

Z badań nad immunoregulacyjnym wpływem hipertermii in vitro wynika, że jednorazowe, krótkotrwałe ogrzanie komórek hamuje odpowiedź na mitogen podczas hodowli w temperaturze 37°C (Hanson i wsp.1983, Duff i wsp.1982, Onsrud 1983). Boyer i wsp.(1986) stwierdzili, że podwyższona temperatura hamuje odpowiedź ludzkich limfocytów w teście mieszanej hodowli limfocytów (MLC). Temperatura 39°C wpływa korzystnie na indukowanie in vitro ludzkich komórek T cytotoksycznych w obecności napromieniowanych komórek nowotworowych linii JY i podnosi ich specyficzną aktywność cytotoksyczną skierowaną przeciwko komórkom tej linii (Dinarello i wsp.1987). W swoich dalszych badaniach Dinarello i wsp. (1987) odnotowali spadek produkcji cytokin po hipertermii in vitro : obniżeniu ulegała synteza IL-1, IL-2, TNF i GM-CSF.

Wiele danych (Roszkowski 1981, Shen i wsp.1987, Downing i wsp.1988) wskazuje na zróżnicowaną wrażliwość komórek układu

odpornościowego na działanie podwyższonej temperatury. Wyniki uzyskane z badań in vivo są często różne, w zależności od typu nowotworu, jego obecności lub braku oraz czasu ogrzewania. Do populacji komórek najbardziej wrażliwych na działanie wysokiej temperatury należą komórki NK.

Wątroba odgrywa istotną rolę w procesach odpornościowych. Jej anatomiczne położenie w układzie krążenia powoduje, że stanowi ona rodzaj filtru, przez który przepływają z krwią wrotną antygeny ze śledziony i przewodu pokarmowego. Der Elst i wsp. 1986 wykazali, iż wątroba hamuje rozplam nowotworów zabezpieczając przed powstawaniem przerzutów, jakkolwiek mechanizm niszczenia komórek nowotworowych przez komórki wątroby pozostaje nadal niewyjaśniony.

Lukomska i Olszewski (1981) opisali po raz pierwszy komórki rezydujące w zatokach wątroby, posiadające wysoką aktywność cytotoksyczną. Wśród komórek wypłukiwanych z zatok wątroby szczura metodą perfuzji 28% - stanowią duże limfocyty z ziarnistościami azurofilnymi (LGL) o wysokiej aktywności cytotoksycznej w stosunku do komórek linii nowotworowych (Lukomska i wsp. 1983). Wyniki badań (Lukomska i wsp. 1989) wskazują, że komórki te napływają do wątroby wraz z krwią wrotną i są tam czasowo zatrzymywane. Wyniki badań funkcjonalnych sugerują, iż są to komórki znajdujące się w stanie aktywacji (Lukomska i wsp. 1989).

Celem pracy było badanie wpływu ogólnoustrojowej

hipertermii na mononuklearne komórki wypłukiwane z zatok wątroby, a w szczególności :

a/ na ich charakterystykę fenotypową,

b/ aktywność wiązania i cytotoksyczność w stosunku do targetowych komórek nowotworowych.

2. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

2.1. ZJAWISKO NATURALNEJ CYTOTOKSYCZNOŚCI

Wśród immunologicznych mechanizmów przeciwnowotworowej obrony organizmu jedna z najważniejszych funkcji przypada naturalnej cytotoxycznosci komórkowej. Zjawisko naturalnej cytotoxycznosci komórkowej opisano w latach siedemdziesiątych w trakcie badań nad odpornością typu komórkowego. Wbrew oczekiwaniom badaczy spodziewających się u pacjentów z chorobą nowotworową wzmożonej swoistej reakcji limfocytów przeciwko własnym lub allogenicznym komórkom nowotworowym, okazało się, że limfocyty zdrowych osób wykazują często wysoka, niespecyficzną cytotoxycznosc (Mc Coy i wsp. 1973). Z kolei u zwierząt zaobserwowano brak udziału grasicy i limfocytów T w niektórych reakcjach immunologicznych odpowiedzialnych za hamowanie procesu nowotworowego (Rydyard i Povlsen 1976). Wkrótce stwierdzono, że opisane zjawisko nie jest artefaktem, lecz właściwością pewnej populacji limfocytów. Komórki te nie mają na swojej powierzchni markerów typowych dla limfocytów T ani B i określono je mianem komórek naturalnie cytotoxycznych (NK). Komórki należące do tej populacji w sposób nieswoisty, spontaniczny (niestymulowany) powodują lizę komórek nowotworowych in vitro. Opisano je we krwi obwodowej u ludzi (Timonen i wsp. 1981), u myszy (Kumagai i wsp. 1982) i u szczurów (Reynolds i wsp. 1981). Proces lizy komórek nowotworowych rozpoczyna się bardzo szybko, już w pierwszej godzinie

inkubacji z komórkami NK i nie jest ograniczony różnicami w głównym układzie zgodności tkankowej (MHC) między komórkami efektorowymi i docelowymi (Reynolds i Ortaldo 1987).

2.1.1. CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK NK

Komórki naturalnie cytotoksyczne określa się jako duże granularne limfocyty (large granular lymphocytes -LGL) ze względu na obecność w ich cytoplazmie granul azurochłonnych. Najnowsze badania wykazały, że właśnie te granule a ściśle ich zawartość, odgrywają istotną rolę w procesie lizy komórek docelowych. Granule te zawierają perforynę - białko homologiczne do składnika dopełniacza C₉ (Young i Cohn 1987), esterazy serynowe (Kamada i wsp.1989), NKCF -natural killer cell factor (Ortaldo i wsp.1987) i limfotoksynę (Lotzova i Ades 1989). Istnieje szereg danych sugerujących bliskie pokrewieństwo między komórkami NK a limfocytami T. Mechanizm zabijania komórek docelowych przez komórki NK i limfocyty T cytotoksyczne (CTL) jest identyczny. Różnica istnieje w procesie rozpoznawania komórki atakowanej. W rozpoznawaniu komórki docelowej przez limfocyty T uczestniczą antygeny zgodności tkankowej i receptor dla antygeny (TCR) znajdujący się na powierzchni limfocytów T. Dotychczas nie określono cząsteczki lub cząsteczek znajdujących się na komórkach NK, które biorą udział w rozpoznaniu komórki nowotworowej. Istnieje szereg przypuszczeń, że w procesie tym mogą uczestniczyć obecne na powierzchni komórek naturalnie cytotoksycznych molekuly : CD2, CD16 i CD11 (Lotzova i Ades 1989). Większość komórek NK

nie ma na swojej powierzchni cząsteczki CD3, obecnej na limfocytach T i receptora dla antygeny. Charakterystycznymi strukturami znajdującymi się na większości ludzkich komórek NK są cząsteczki CD16 i NKH-1 (Leu 19), natomiast u myszy są to NK1.1 lub NK1.2 (Lotzova i Ades 1989). Populacja komórek NK jest zróżnicowana. Wśród ludzkich komórek NK 95% stanowią komórki o fenotypie : $CD3^{-} Leu19^{+} CD16^{+}$, 5% to komórki $CD3^{-} Leu19^{+} CD16^{-}$ i $CD3^{-} Leu19^{-} CD16^{+}$ (Lanier i wsp.1986, Trincheri i Perussia 1984). Wyizolowano również populację komórek T o aktywności naturalnie cytotoksycznej. Mają one na swojej powierzchni antygeny :CD3 i Leu19, stanowią około 5% populacji limfocytów T i mają zdolność do spontanicznej lizy komórek linii K562. Pochodzenie komórek NK jest nadal niewyjaśnione. Badania dotyczące pokrewieństwa między komórkami NK i limfocytami T wykazały, że mają one niezależne linie rozwojowe i komórki NK nie stanowią populacji niedojrzałych komórek pre-T, co wielu autorów sugerowało (Lotzova i Ades). Reynolds i Ortaldo (1987) uważają, że naturalna cytotoksyczność to funkcja komórek, która nie jest związana z określoną populacją komórek. Po rozpoznaniu komórki nowotworowej komórka NK łączy się z nią w kompleks. Na powierzchni komórek naturalnie cytotoksycznych znajduje się szereg struktur uczestniczących w procesie ścisłego łączenia się komórek ze sobą. Są nimi : fibronektyna, laminina (Lotzova i Ades 1989), LFA-1 (Kuypres i Roos 1989), CR3 - (CD11b/CD18) (Kamos i wsp.1989, Timonen i wsp.1988). Na powierzchni komórek NK znajduje się duża ilość glikosfingolipidów (Kasai i wsp.1980).

2.1.2. REGULACJA AKTYWNOŚCI KOMÓREK NK

Aktywność komórek naturalnie cytotoksycznych jest regulowana przez szereg czynników. Do najefektywniejszych stymulatorów komórek NK należą interleukina 2 (IL-2) i interferony : α , β i γ (Lotzova i Ades 1989). Stwierdzono, że interleukina 2 nie tylko wzmacnia aktywność komórek NK ale także kieruje dojrzewaniem komórek NK z prekursorów. Ricardi i Migliorati (1989) badali wpływ IL-2 na dojrzewanie komórek NK. Komórki płodowej wątroby myszy hodowano w obecności IL-2. Po 7 dniach wyizolowano populację komórek o aktywności NK. Komórki efektorowe miały na swojej powierzchni dużą ilość glikosfingolipidów, były wrażliwe na działanie surowicy anty asialo-GM₁. Na powierzchni komórek były antygeny Thy1, Lyt5, NK-1.1, natomiast stwierdzono brak antygenu Lyt2, Lyt1, L3T4 i receptora dla antygenu (TCR). Ostatnio wyizolowano obecne na powierzchni ludzkich komórek LGL i komórek NK aktywowanych interleukiną 2 białko o masie 48 kD. Połączenie się tego białka z komórkami NK powoduje ich proliferację i aktywację. Natomiast zablokowanie białka przez swoistą surowicę hamuje aktywność NK. Białko o masie 48 kD jest prawdopodobnie białkiem regulującym aktywność komórek NK. Istnieje również szereg czynników hamujących aktywność komórek naturalnie cytotoksycznych. Aktywność NK ulega eliminacji zarówno in vivo jak i in vitro pod wpływem cyklofosfamidu (Ricardi i wsp.1981) i cyklosporyny A (Introne i wsp.1987). Także surowica anty-asialo GM₁ in vivo i in vitro hamuje naturalną cytotoksyczność (Barlozzari i wsp.1983). In vitro aktywność NK jest hamowana przez

prostaglandyny produkowane przez makrofagi i komórki Kupffera (Okamura i wsp.1987).

2.1.3. FUNKCJE KOMÓREK NK

Komórki naturalnie cytotoksyczne uczestniczą nie tylko w niespecyficznym mechanizmie zabijania komórek nowotworowych. Odgrywają również istotną rolę w naturalnym mechanizmie odporności przeciwwirusowej (Bukowski i wsp.1983) oraz w zwalczaniu infekcji bakteryjnych, grzybiczych i pasożytniczych (Reynolds i Ortaldo 1987). Ostatnio wykazano, że komórki NK pełnią również funkcje regulacyjne. Uczestniczą one w regulacji hemopoezy i w procesie różnicowania się komórek (Reynolds i Ortaldo 1987) oraz odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego i humoralnego (Reynolds i Ortaldo 1987). Biorą także udział w procesie odrzucania przeszczepów szpiku kostnego (Lotzova 1987) i przeszczepów narządowych (Reynolds i Ortaldo 1987). Wykazano również, że komórki naturalnie cytotoksyczne produkują szereg cytokin, a wśród nich : interleukinę 1, 2, 4 i 5, interferony : α i γ CSF (colony stimulating factor) i TNF (tumor necrosis factor) (Lotzova i Ades 1989).

2.1.4. UDZIAŁ NK W NISZCZENIU NOWOTWORÓW IN VIVO

Większość badań nad aktywnością komórek NK prowadzono in vitro. Niekwestionowana jest ich zdolność do spontanicznej lizy komórek nowotworowych in vitro. Natomiast niewiele wiadomo o udziale komórek NK w niszczeniu nowotworów in vivo. Publikowane obserwacje pochodzą z doświadczeń prowadzonych na zwierzętach,

u których aktywność NK była zablokowana przez podanie surowicy anty asialo-GM₁ lub cyklofosfamidu. Uzyskiwane wyniki świadczą pośrednio o przeciwnowotworowej roli komórek NK in vivo. Barlozzari i wsp.(1983) stwierdzili, że po podaniu szczurom surowicy anty asialo-GM₁ gwałtownie spada aktywność komórek NK mierzona w teście in vitro. Jednocześnie u tych zwierząt obserwowano rozwój spontanicznych nowotworów i szybki rozwój nowotworów przeszczepialnych. Gdy zwierzętom traktowanym surowicą anty asialo-GM₁ podawano komórki LGL pochodzące od zdrowych syngenicznych szczurów następował wzrost uprzednio zahamowanej aktywności NK. Wyniki wskazują na zaangażowanie komórek LGL w niszczenie komórek nowotworowych in vivo. Reynolds i wsp.(1981) zaobserwowali u myszy spadek aktywności komórek NK mierzonej w teście cytotoksycznym in vitro przeciwko komórkom YAC-1 i obniżenie zdolności do eliminacji in vivo komórek YAC-1 znakowanych radioaktywnym izotopem chromu ⁵¹Cr po podaniu cyklofosfamidu. Podanie myszom komórek śledzionowych pochodzących od zdrowych myszy syngenicznych przywraca upośledzoną aktywność komórek NK. Salup i Herberman (1988) badali udział komórek NK w hamowaniu wzrostu nowotworu Renca i powstawanie przerzutów in vivo u myszy. Obniżenie aktywności komórek NK przez podanie surowicy anty asialo-GM₁ powodowało wzrost liczby przerzutów w wątrobie i płucach oraz obniżenie zdolności do lizy komórek nowotworowych w teście in vitro. Natomiast po podaniu myszom z nowotworem preparatu MEV-2, który jest stymulatorem NK, obserwowano ograniczenie liczby przerzutów w porównaniu z kontrolą, która stanowiły myszy

nieleczone. Hanna (1985) uważa, że zarówno u gryzoni jak i u ludzi wzrost nowotworów i powstawanie przerzutów jest ujemnie skorelowane z liczbą i aktywnością komórek NK.

2.2. CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK NK IZOLOWANYCH Z ZATOK WĄTROBY

Wisse i wsp.(1976) opisali po raz pierwszy populację komórek wypłukanych z wątroby szczura o dużej zawartości granulazurochłonnych, które nazwali komórkami "pit" (pit cells). Początkowo autorzy przypuszczali, że komórki te pełnią funkcje wydzielnicze. Badania Kaneda i wsp.(1983) wykazały, że komórki "pit" izolowane z zatok wątroby szczura są komórkami o aktywności NK, wywołującymi in vitro lizę komórek YAC-1 i o morfologii typowej dla dużych granularnych limfocytów (LGL). Kaneda i Wake (1985) opisali następnie te komórki w innych narządach u szczura. Oprócz wątroby zawierają je : śledziona, płuca, szpik kostny, krew obwodowa i rdzeń grasicy. Brak ich w węzłach chłonnych i korze grasicy. Badania mikroskopowe wykazały, że komórki NK znajdujące się w zatokach wątroby wysuwają w różnych kierunkach pseudopodia i tworzą w ten sposób połączenia z komórkami śródbłonka i komórkami Kupffera. Badania w mikroskopie skaningowym wykazały, że zatoki wątrobowe, szczególnie zatoki periportalne są bardzo wąskie (Wisse i wsp.1983). Dlatego wszystkie komórki wpływające do wątroby wraz z krwią wrotną muszą wejść w ścisły kontakt z komórkami zatok wątroby. W zatokach wątroby poza komórkami LGL o aktywności naturalnie cytotoksycznej znajdują się komórki

Kupffera, komórki śródbłonka i komórki gromadzące tłuszcz zwane komórkami Ito. Komórki Ito zawierają krople tłuszczu bogate w witaminę A i uczestniczą w tworzeniu kolagenu podczas niektórych procesów patologicznych (Enzan i Hara 1986). Komórki Kupffera i komórki śródbłonka biorą udział w usuwaniu obcego materiału na drodze fagocytozy (Praaning-van Dalen i wsp.1982). Zoabserwowano również, że komórki Kupffera podobnie jak komórki "pit" bez wcześniejszej immunizacji zabijają komórki nowotworowe (Matler i wsp.1986). Cohen i wsp.(1985) uważają, że w populacji komórek izolowanych z zatok wątroby populacją charakteryzującą się największą aktywnością naturalnie cytotoksyczną są komórki LGL, zaś w znacznie mniejszym stopniu komórki Kupffera. Natomiast komórki Kupffera mogą w istotny sposób modulować aktywność komórek NK w zatokach wątroby. Okumara i wsp.(1987) wykazali, że komórki Kupffera mogą hamować aktywność komórek LGL przez produkcję prostaglandyn : E , E_2 , $F_{2\alpha}$. Komórki Kupffera produkują także czynnik, który pobudza hepatocyty do syntezy α_2 makroglobuliny, która jest białkiem ostrej fazy.

2.2.1. CHARAKTERYSTYKA FENOTYPOWA KOMÓREK ZATOK WĄTROBY

Ostatnio wiele badań prowadzonych na populacji komórek izolowanych z zatok wątroby dotyczy ich charakterystyki morfologicznej i fenotypowej. Bouwens i wsp.(1987) wykazali, że populacja komórek wypłukiwanych z zatok wątroby szczura zawiera komórki LGL, komórki agranularne i monocyty w stosunku 2:6:1. Wszystkie komórki LGL są OX8 i OX19 pozytywne, monocyty OX8 i OX19 negatywne, natomiast limfocyty agranularne są OX8 i/lub OX19 pozytywne. 56% komórek LGL izolowanych z zatok wątroby

jest wrażliwe na działanie surowicy anty asialo-GM₁. Lukomska i wsp.(1983) opisali populację komórek izolowanych z zatok wątroby szczura porównując uzyskane wyniki z danymi z krwi obwodowej. Populacja komórek perfuzatu wątroby zawiera 46% komórek z antygenem CD8, 40% komórek z antygenem CD4 i 50% komórek z antygenem CD5. We krwi obwodowej jest odpowiednio 27% komórek CD8, 65% CD4 i 64% CD5. Zatem populacja komórek izolowanych z zatok wątroby zawiera więcej komórek o fenotypie limfocytów T supresorowych/cytotoksycznych i znacznie mniej limfocytów T pomocniczych. Liczba komórek określanych jako duże granularne limfocyty (LGL) wynosi we krwi obwodowej 5%, natomiast w perfuzacie wątroby 29%. Aktywność naturalnie cytotoksyczna komórek perfuzatu wątroby w stosunku do komórek nowotworowych linii K562 i YAC-1 jest dwukrotnie wyższa niż komórek krwi obwodowej. Autorzy stwierdzili również lizę komórek linii P815 - linii NK niewrażliwej przez komórki zatok wątroby, natomiast liza tych komórek przez komórki krwi obwodowej wynosiła kilka procent. Zarówno komórki OX8 pozytywne, które stanowią 64% komórek NK wątroby jak i komórki OX8 negatywne stanowiące 38% posiadają identyczną aktywność naturalnie cytotoksyczną. Populacja komórek perfuzatu wątroby zawiera 76% komórek niewrażliwych na działanie surowicy anty asialo-GM₁ in vivo i 69% niewrażliwych na traktowanie tą surowicą in vitro.

2.2.2. POCHODZENIE KOMÓREK ZATOK WĄTROBY

Pochodzenie komórek znajdujących się w zatokach wątroby jest niewyjaśnione. Wisse i wsp.(1976 i 1983) uważają, że komórki

zatok wątroby nie są populacją osiadłą i prawdopodobnie pochodzą z krwi. Wpływając razem z krwią wrotną do zatok wątroby przylegają do komórek śródbłonka i tam czasowo pozostają. Freudenberg i wsp.(1986) przeprowadzając następujące wykazali, że mysie komórki zatok wątroby pochodzą ze szpiku kostnego. Komórki szpiku kostnego myszy mieszańców F_1 krzyżówki B10BR x B10D2 o fenotypie $H-2^{k+}$ podawano naświetlonym myszom szczepu rodzicielskiego $H-2^{k-}$ (B10D2) i badano w wątrobie obecność komórek $H-2^{k+}$. W miarę upływu czasu wzrastała w wątrobie liczba komórek o fenotypie komórek przeszczepionych. Świadczy to o pochodzeniu komórek zatok wątroby ze szpiku kostnego.

2.2.3 FUNKCJE KOMÓREK IZOLOWANYCH Z ZATOK WĄTROBY

Mechanizm niszczenia komórek nowotworowych przez komórki wątroby pozostaje nadal niewyjaśniony. Dotychczas udział w obronie przeciwko czynnikom infekcyjnym i nowotworom przypisywano komórkom Kupffera i komórkom śródbłonka. Opisana ostatnio populacja komórek "pit" charakteryzuje się wysoką aktywnością cytotoksyczną. Bouwens i wsp.(1987) wykazali in vitro aktywność cytotoksyczną komórek "pit" wątroby przeciwko komórkom nowotworowym linii YAC-1. Natomiast niewiele wiadomo na temat roli tych komórek w niszczeniu nowotworów in vivo. Van Der Elst i wsp.(1986) zaobserwowali, że u szczurów traktowanych cyklosporyną A, którym podano komórki nowotworowe linii DHD-K12 powstaje więcej przerzutów w wątrobie niż u zwierząt, którym nie podawano cyklosporyny. Ponieważ cyklosporyna hamuje aktywność komórek NK, autorzy uważają, że komórki NK wątroby

odgrywają istotną rolę w hamowaniu powstawania przerzutów. O udziale komórek wątroby w eliminacji nowotworów dowodzą także badania Weissa i wsp.(1983). Autorzy stwierdzili, że u myszy którym podawano komórki nowotworowe linii B16 do żyły wrotnej, komórki nowotworowe były zatrzymywane w wątrobie. Po 4 godzinach od podania komórek nowotworowych obserwowano ich eliminację. Po 24 godzinach od podania 25% komórek B16 pozostawało w wątrobie. Pozostałe 75% przechodziło dalej przez wątrobę do żyły czczej, serca i dalej do płuc. Ale w płucach znajdowano 0.35% podanej populacji. Autorzy uważają, że przejście komórek przez wątrobę powodowało eliminację komórek B16. Mechanizm niszczenia komórek nowotworowych przez komórki wątroby nie jest w pełni poznany. Komórki o aktywności naturalnie cytotoksycznej znajdujące się w zatokach wątroby prawdopodobnie pełnią istotną rolę w obronie przed infekcjami bakteryjnymi i wirusowymi tak jak komórki NK obecne w innych narządach oraz hamują wzrost komórek nowotworowych i powstawanie przerzutów. Komórki "pit" nie tylko uczestniczą w niszczeniu komórek nowotworowych. Obserwowano, że łączenie się komórek LGL z zatok wątroby z hepatocytami, czego następstwem jest niszczenie hepatocytów ma często miejsce w autoimmunologicznym zapaleniu wątroby (Kaneda i wsp.1984). Pohajdak i wsp.(1986) zaobserwowali, że w niektórych stanach zapalnych wątroby, podczas których następuje jej regeneracja, komórki NK migrują do przestrzeni między hepatocytami i wykazują aktywność cytotoksyczną. W ten sposób, prawdopodobnie, regulują wzrost hepatocytów. Również Itoh i wsp.(1988) wykazali

cytotoksyczną aktywność komórek LGL izolowanych z zatok wątroby myszy w stosunku do dzielących się hepatocytów. Sugeruje to regulacyjną funkcję komórek NK w warunkach fizjologicznego wzrostu i podczas regeneracji wątroby.

2.3. MECHANIZM ZABIJANIA MIĘDZYKOMÓRKOWEGO

Zabijanie komórek docelowych przez komórki efektorowe należące do układu immunologicznego stanowi naturalną linię obrony przeciwko namnażaniu się komórek nowotworowych, komórek zainfekowanych przez wirusy oraz przeciwko pasożytom i innym obcym komórkom. Zabijanie jednych komórek przez drugie nie jest wyłącznie właściwością komórek układu odpornościowego, zdolność tą posiadają również niektóre bakterie, pierwotniaki, grzyby i komórki roślinne. Jednakże zabijanie przez komórki układu immunologicznego różni się od innych form tym, że wymaga zawsze ścisłego kontaktu między komórką docelową (zabijaną) a efektorową (zabijającą). Wśród komórek układu odpornościowego istnieją dwie populacje komórkowe eliminujące komórki nowotworowe i komórki infekowane przez wirusy na drodze zabijania komórkowego. Są to limfocyty T cytotoksyczne (CTL) i komórki naturalnie cytotoksyczne (NK). Już w 1968 roku Rosenau wykazał w mikroskopie elektronowym, że podczas połączenia z limfocytami komórki docelowe przed pęknięciem puchną. Następnie prace Henney'a (1974) i Sanderson'a (1976) wykazały, że właśnie błona komórkowa komórek docelowych jest miejscem ataku podczas zabijania. Autorzy uważali, że komórki docelowe pobierają

cząsteczki, które są gwałtownie wydzielane przez atakujące limfocyty. Przepływ wody i soli przez błonę komórkową powoduje puchnięcie komórki i pęknięcie na drodze mechanizmu koloidalno-osmotycznego. Po raz pierwszy w 1980 roku zbadano w mikroskopie elektronowym pory utworzone w komórce docelowej przez limfocyty (Dourmashkin i wsp.). Te same badania powtórzyli Podack (1985) oraz Dennert i wsp. (1983) na populacji komórek NK. W dalszych badaniach wykazano, że komórki efektorowe zawierają w swej cytoplazmie wiele granul, które koncentrują się w rejonie kontaktu z komórką docelową (Bykovskaja i wsp. 1978). Granule te są aktywnie przesuwane w kierunku miejsca połączenia z komórką docelową (Kupfer i Dennert 1984), co świadczy o ich bezpośrednim udziale w tworzeniu porów w komórce atakowanej. W ciągu ostatnich 3 lat wyizolowano te granule z komórek T cytotoksycznych i komórek NK (Podack i wsp. 1985, Tschopp i Nabholz 1987 oraz Young i Cohn 1987). Metoda izolacji granul z komórek efektorowych opiera się na spowodowaniu pęknięcia komórki pod wpływem działania azotu i rozdzielenia poszczególnych organelli komórkowych przez wirowanie w gradiencie gęstości. Wyizolowane granule mają zdolność do tworzenia cylindrycznych otworów w błonie atakowanej komórki, identycznie jak te produkowane przez limfocyty. Proces ten wymaga obecności jonów wapnia. Wewnętrzna średnica porów wynosi od 5 do 20 nm. Wyizolowano białko odpowiedzialne za tworzenie tych porów (Masson i Tschopp 1985, Young i wsp. 1986). Nazwano je PFP (pore forming protein). Zamiennie stosuje się nazwę perforyna lub cytolyzyna. Białko to

ma masę cząsteczkową 70 kilodaltonów, ale w obecności wapnia natychmiast tworzy polimery o masie 1000 kilodaltonów. Utworzone polimery są odporne na dysocjację przez detergenty, ogrzewanie i czynniki redukujące wiązania dwusiarczkowe. Wyizolowana perforyna ma zdolność do niespecyficznego lizowania komórek nowotworowych różnych linii. Podczas kontaktu z komórką atakowaną, komórka efektorowa wydziela perforynę z granul. Biochemiczny mechanizm zapoczątkowujący tę degranulację komórek efektorowych nie jest wyjaśniony, prawdopodobnie biorą w nim udział estry forbolu i jonofory wapnia, a także aktywacji ulaga kinaza białkowa C (Russel i Coggeshall 1987, Takayama i Sitkovsky 1987). Obecność jonów wapnia jest konieczna zarówno do polimeryzacji perforyny jak i jej wiązania się z błoną komórki atakowanej. Ostatnie badania Persechini i wsp. (1989) wykazały, że podczas lizy komórek perforyna jest uwalniana z granul w wyniku zmiany pH. Zaobserwowano, że $\text{pH} > 7$ powoduje uwalnianie perforyny z granul i jej aktywację, natomiast gdy wartość pH jest mniejsza niż 7 perforyna pozostaje nieaktywna wewnątrz granul. Zabijanie przez limfocyty i komórki naturalnie cytotoksyczne przypomina lizę za pośrednictwem aktywacji kaskady dopełniacza. W skład układu dopełniacza wchodzi 15 różnych białek z czego 5 tworzy tak zwany kompleks ataku błony (membrane attack complex -MAC). Wynikiem działania MAC jest utworzenie wewnątrz błonowych porów w błonie komórkowej (Muller-Eberhard 1986). Lachmann (1983) sugeruje, że mechanizm działania dopełniacza i komórek T cytotoksycznych jest podobny. Najnowsze badania wykazały, że perforyna jest rzeczywiście

immunologicznie, strukturalnie i funkcjonalnie podobna do składników MAC : C_{5b-6}, C₇, C₈ i C₉ (Tschopp i wsp.1986). Perforyna jest najbliższej związana z C₉. Oba białka mają jednakową masę cząsteczkową i zdolność do polimeryzacji w wielocząsteczkowy kompleks. *Entamoeba histolytica* także produkuje perforynę (Young i Cohn 1987). Również wiele toksyn bakteryjnych ma zdolność do tworzenia porów w podwójnej warstwie lipidów. Istnieje, innyniezależny od perforyny mechanizm zabijania komórek docelowych przez limfocyty. Droga perforynowa jest absolutnie zależna od obecności wapnia. Podczas braku wapnia za lizę komórki docelowej odpowiedzialne jest inne białko nazwane leukaleksyną o masie 50 kilodaltonów (Liu i wsp.1987). Immunologicznie podobne jest ono do dwu innych cytokin :TNF (tumor necrosis factor) i limfotoksyny, ale różni się od nich niektórymi właściwościami fizykochemicznymi i funkcjonalnymi. Wyizolowana leukaleksyna powoduje lizę komórek docelowych znacznie wolniej niż perforyna, niszczy atakowaną komórkę przez fragmentację jej DNA.

2.4. BEZPOŚREDNIE DZIAŁANIE WYSOKIEJ TEMPERATURY NA KOMÓRKI IN VITRO

Dla komórek ssaków, dla których temperatura fizjologiczna jest temperatura 37°C, wzrost temperatury środowiska powyżej 42°C jest toksyczny (Strom 1983). Badania in viro wykazały, że komórki HeLa przeżywają inkubację w temperaturze 41-43°C, w temperaturze 43-48°C następuje inaktywacja białek, natomiast

temperatura 48-55°C powoduje degradację kwasów nukleinowych. Tak wyznaczone zakresy temperatur mają znaczenie w terapeutycznych zastosowaniach hipertermii. Podczas lokalnej hipertermii stosuje się nagrzewanie aż do wzrostu temperatury wewnętrznej ciała do 40-43°C a nawet 45°C, natomiast podczas hipertermii całego ciała, temperatura wewnętrzna zwykle wzrasta do 42°C. Komórki niektórych typów nowotworów są bardziej wrażliwe na bezpośrednie działanie podwyższonej temperatury niż komórki normalne. Do tych szczególnie wrażliwych należą komórki białaczkowe (Robins i wsp.1982), komórki mięsaka i czerniaka (Strom 1983). Metabolizm tych komórek jest w sposób nieodwracalny zahamowany w temperaturze 42°C. Najbardziej wrażliwe na działanie podwyższonej temperatury są komórki znajdujące się w fazie podziałów i w późnej fazie S, natomiast najmniej wrażliwe są te, które znajdują się we wczesnej fazie G₁. Dotyczy to zarówno komórek nowotworowych jak i normalnych. Zaobserwowano jednak, że te same komórki nowotworowe podgrzane do takiej samej temperatury są bardziej wrażliwe na jej działanie in vivo niż in vitro (Strom 1983). Podwyższona temperatura wywołuje istotne zmiany zarówno w morfologii jak i metabolizmie komórki. Morse i wsp (1988) zaobserwowali, że wzrost temperatury środowiska powoduje wzrost płynności błony komórkowej, co z kolei zmienia jej przepuszczalność i hamuje pobieranie aminokwasów ze środowiska. Li i Hahn (1980) analizując poszczególne składniki ogrzanej błony komórkowej stwierdzili obniżoną zawartość cholesterolu i fosfolipidów, denaturację niektórych białek strukturalnych i zahamowanie

aktywności enzymów błonowych. Uszkodzeniu pod wpływem wysokiej temperatury ulegają również mikrofilamenty aktynowe (Carper i wsp. 1989). Zmiany w strukturze błony komórkowej dotyczą także ekspresji receptorów powierzchniowych i ich funkcji. Calderwood i Hahn (1983) wykazali spadek liczby receptorów dla insuliny i obniżenie ich aktywności. Natomiast Magun i Fennie (1981) zaobserwowali to samo w przypadku receptora dla czynnika wzrostu komórek nabłonkowych EGF (epidermal growth factor). Onsrud (1983) stwierdził, że inkubacja ludzkich limfocytów przez 3 godziny w temperaturze 42°C powoduje spadek liczby receptorów powierzchniowych dla fragmentu Fc immunoglobulin. Wysoka temperatura zakłóca wszystkie ważne procesy metaboliczne komórki. Zahamowaniu ulega synteza DNA, co prowadzi do zaburzenia cyklu komórkowego i podziałów komórki (Gerner i Russel 1977). Zablockowaniu ulega również synteza RNA. Carper i wsp. (1989) zaobserwowali w podwyższonej temperaturze zahamowanie enzymu dekaroksyłazy ornityny, który kieruje biosyntezą poliamin. Poliaminy pełnią istotną funkcję w regulacji syntezy RNA, głównie tRNA a także proliferacji komórek (J.Kawiak i wsp. 1985). Landry i wsp. 1986 uważają, że zmiany w metabolizmie komórki indukowane przez podwyższoną temperaturę, powodujące jej inaktywację dotyczą głównie metabolizmu energetycznego komórki. Mondavi i wsp. (1969) zaobserwowali gwałtowny spadek oddychania w komórkach ogrzewanych. Zahamowaniu w podwyższonej temperaturze ulega również proces glikolizy (Haveman i wsp. 1981). Bezpośrednie działanie wysokiej temperatury może prowadzić do śmierci

komórki. Zależy to od wysokości temperatury, czasu ogrzewania i wrażliwości komórki. Gdy temperatura wzrasta do 43°C (a nawet do 45°C przy bardzo krótkich czasach ogrzewania) komórki są w stanie zaadaptować się do nowych warunków środowiska i przeżyć, dzięki specjalnie wytworzonym mechanizmom przystosowawczym. Zjawiska zachodzące w komórce pod wpływem wzrastającej temperatury nazwano szokiem cieplnym.

2.5 WPLYW HIPERTERMII NA KOMÓRKI NOWOTWOROWE

Zabijanie komórek nowotworowych w wysokiej temperaturze może następować : (1) natychmiast po jej podwyższeniu na skutek bezpośredniego toksycznego działania ciepła, (2) z opóźnieniem, na skutek działania temperatury, która powoduje obniżenie przepływu krwi przez guz nowotworowy i zmianę środowiska zewnątrzkomórkowego, (3) odległe w czasie zabijanie, spowodowane jest odpowiedzią immunologiczną na komórki nowotworowe po ogrzaniu. Bezpośrednie działanie hipertermii na komórki in vitro omówione jest w rozdziałach : 2.4 i 2.7. Zwiększona wrażliwość komórek nowotworowych na ogrzewanie związana jest z pewnymi ich cechami anatomicznymi i fizjologicznymi, różnymi od budowy komórek normalnych. Należą do nich przede wszystkim mikrokrazenie, czynniki środowiskowe takie jak pH, zawartość tlenu i substancji odżywczych oraz zmieniona budowa naczyń.

2.5.1. MIKROKRAŻENIE W TKANCE NOWOTWOROWEJ PODCZAS HIPERTERMII

Typowy model mikrokrazenia w normalnej tkance schematycznie

przedstawia się w sposób następujący. Krew przepływa kolejno przez duże tętnice do małych tętnic, tętniczek, naczyń włosowatych a dalej przez żyłki, małe żyły do dużych żył. Naczynia włosowate mają średnicę od 7 do 10 mikrometrów. Ich ściana zbudowana jest z następujących warstw : śródbłonna, błony podstawowej, pericytów i przydanki (Song 1983). We wczesnym stadium rozwoju nowotworu komórki rozwijają się i dzielą zużywając substancje odżywcze transportowane z krwią przez naczynia gospodarza. W miarę rozwoju guza naczynia gospodarza zostają włączone do jego masy, dając początek unaczynienia nowotworu. W procesie formowania się unaczynienia nowotworu bardzo istotną rolę odgrywają dwa czynniki humoralne :TAF (tumor angiogenesis factor) i EPF (endothelial proliferating factor), które są produkowane przez komórki nowotworowe. Miejscowa proliferacja komórek śródbłonna budujących naczynia gospodarza prowadzi do utworzenia sieci naczyń w tkance nowotworowej. Przepływ krwi przez naczynia włosowate w tkance nowotworowej jest powolny i przerywany. Inną cechą charakterystyczną mikrokrażenia wewnątrz guza jest duża ilość zatok i kanałów, w których nie ma całkowitego przepływu. Wraz ze wzrostem ciśnienia wewnątrz naczyń, które jest wynikiem rozrastania się guza, zatoki stale ulegają zamykaniu, co z kolei prowadzi do powstawania zakrzepów. Ciągły rozrost tkanki nowotworowej wewnątrz ograniczonej przestrzeni wywiera stale wzrastające ciśnienie na ściany naczyń, zwłaszcza w wewnętrznej części guza, powodując ich zapadanie się (Dickinson i Calderwood 1983). W porównaniu z normalnymi tkankami przepływ

krwi przez tkanki nowotworowe jest znacznie wolniejszy (Song 1983). Hipertermia (zarówno całkowita jak i lokalna) powoduje zahamowanie przepływu krwi przez guz nowotworowy, przeciwnie niż w tkankach normalnych, w których przepływ krwi jest wyższy w podwyższonej temperaturze (Song 1983, Dickson i Calderwood 1983, Waterman 1987). Zostało to wykorzystane w połączeniu z chemioterapią i radioterapią w leczeniu niektórych nowotworów (Field 1987). W porównaniu z plazmą i innymi płynami tkankowymi płyn przepływający przez tkanki nowotworowe zawiera mniej tlenu i glukozy natomiast więcej dwutlenku węgla i produktów glikolizy takich jak kwas mlekowy. W połączeniu ze słabym i przerywanym przepływem powoduje to zakwaszenie środowiska wewnątrz guza nowotworowego. I to właśnie jest przyczyną wysokiej wrażliwości komórek nowotworowych na ogrzewanie. W podwyższonej temperaturze pH wewnątrz tkanki nowotworowej ulega obniżeniu. Jest to spowodowane obniżeniem oddychania komórkowego, czego skutkiem jest kompensacyjny wzrost glikolizy, która z kolei prowadzi do wzrostu produkcji kwasu mlekowego. Obniżony przepływ powoduje gromadzenie się produktów przemiany materii. Konsekwencją niskiego pH są również zmiany w samym krążeniu. W warunkach kwaśnego środowiska erytrocyty ulegają deformacji, stają się bardziej sztywne, łatwiej przyczepiają się do ściany naczyń przez co ograniczają przepływ. Brak ciągłego przepływu jest również przyczyną niedotlenienia i niedożywienia samych komórek tworzących naczynia w tkance nowotworowej. Kang i wsp. (1980) uważają, że zabijanie komórek nowotworowych wewnątrz guza po ogrzewaniu

spowodowane jest brakiem środków odżywczych, wzrostem kwasowości środowiska, co pociąga za sobą uszkodzenie krążenia wewnątrz tkanki nowotworowej.

2.6. WPŁYW HIPERTERMII NA KOMÓRKI UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO

2.6.1. BADANIA IN VIVO

Wpływ hipertermii na komórki układu immunologicznego pozostaje nadal niewyjaśniony. Większość danych dotyczących przypuszczalnego zaangażowania komórek układu odpornościowego gospodarza w niszczeniu komórek nowotworowych po hipertermii pochodzi z badań in vitro. Brak informacji o procesach zachodzących in vivo po aktywacji komórek odpornościowych po ogrzaniu w miejscu wzrostu nowotworu. Uzyskane wyniki z doświadczeń in vivo są często różne, w zależności od typu nowotworu i czasu ogrzewania. Badania doświadczalne wykazały, że zwierzęta którym wszczepiano przegrzewane komórki nowotworowe, bądź zwierzęta, u których przegrzewano guz nowotworowy in vivo a następnie usuwano go, wyraźnie silniej odrzucają ponownie wszczepione komórki nowotworowe niż zwierzęta, u których przeprowadzano te zabiegi bez udziału hipertermii (Marmor i wsp.1977, Suit i wsp.1977). Moricca i wsp.(1977) stosowali perfuzję guza gorącymi płynami o temperaturze 42°C u chorych z mięsakami i czerniakami. Poza regresją guzów w przegrzewanym obszarze, obserwowali oni regresję przerzutów odległych od miejsc poddanych hipertermii. Wspomnieni badacze uważają, że dzięki hipertermii dochodzi do

immunizacji ustroju komórkami nowotworowymi i do nasilenia przeciwnowotworowych mechanizmów immunologicznych prowadzących do regresji przerzutów. Gee i wsp.(1976) stosowali intensywną hipertermię całego ciała (41.8°C) u chorych z nowotworami przewodu pokarmowego i układu moczowego. U chorych, u których nastąpiła regresja guzów, obserwowano wzrost liczby limfocytów T oraz zwiększenie ich reaktywności na mitogeny. Istnieją również wyniki badań wskazujące na znaczne ryzyko stosowania hipertermii całego ciała związane z możliwością przyspieszenia wznowy i wzrostu guza. Yerushalami (1976) zaobserwował wzrost liczby przerzutów nowotworowych u myszy z rakiem Levis'a po hipertermii całego ciała. Autor sugeruje, że zjawisko to może mieć związek z immunosupresją. Roszkowski (1981) stwierdził, że przegrzewanie myszy do temperatury 41.5°C przez 2 godziny przez 7 kolejnych dni powoduje wyraźne zahamowanie wzrostu przeszczepialnego mięsaka L1. Po 2 tygodniach od zakończenia terapii odnotowano ponowny wzrost guzów i wzrost liczby przerzutów. Shen i wsp.(1987) zaobserwowali, że hipertermia całego ciała nie ma wpływu na wielkość nowotworu LLC (Lewis lung carcinoma) u myszy, natomiast w istotny sposób ogranicza ilość powstających przerzutów. Jednocześnie aktywność komórek naturalnie cytotoksycznych (NK) była wyższa po hipertermii u zwierząt z nowotworem, w kontroli - u zwierząt zdrowych aktywność NK nie ulegała zmianie po ogrzaniu. Hipertermia lokalna w istotny sposób opóźniała wzrost nowotworu MeH i BP11 u szczura i powodowała obniżenie liczby powstających przerzutów (Schechter i wsp.1978). Nie odnotowano wzrostu aktywności

komórek NK in vivo, natomiast ta sama temperatura in vitro hamowała aktywność cytotoksyczną. Czy zatem hipertermia powoduje aktywację komórek układu immunologicznego? Downing i wsp. (1987) badali surowice pochodzące od zdrowych zwierząt poddanych hipertermii całego ciała przez 2 godziny, tak że temperatura ciała wzrastała o 2°C. Odnotowano wzrost poziomu interferonu alfa (IFN-α) w surowicy i wzrost produkcji interferonu gamma (IFN-γ) przez komórki jednojądrowe wyizolowane od zwierząt poddanych ogrzaniu pod wpływem PHA. Dalsze badania (Downing i Taylor (1987) wykazały obniżoną odpowiedź proliferacyjną na PHA limfocytów krwi obwodowej, izolowanych od ochotników poddanych hipertermii, tak że temperatura ciała wzrastała do 39°C. Jednocześnie odnotowano wzrost aktywności komórek NK. Podobnie jak w badaniach wcześniejszych autorzy zaobserwowali wzrost produkcji IFN-γ i interleukiny 2 (IL-2) przez komórki jednojądrowe izolowane od dawców po hipertermii. Natomiast nie odnotowano zmian w poziomie produkcji TNF (tumor necrosis factor) po stymulacji lipopolisacharydem (LPS) przez monocyty izolowane od osobników po hipertermii. W badaniach oceniających liczebność poszczególnych subpopulacji komórek układu odpornościowego Downing i wsp. (1988) wykazali, że wzrost temperatury ciała do 39°C powoduje wzrost liczby granulocytów, wzrost liczby komórek NK, spadek liczby komórek T pomocniczych, natomiast całkowita liczba komórek T nie ulegała zmianie. Neville i Sander (1988) stwierdzili wzrost poziomu interleukiny 1 (IL-1) w surowicy myszy poddanych hipertermii całego ciała 41-42°C. Roszkowski i

wsp.(1980) przeprowadzili ocenę stanu immunologicznego myszy poddanych hipertermii. Zwierzęta zagrzewano do 41.5°C przez 2 godziny dziennie przez 4 do 14 kolejnych dni. Tak stosowana hipertermia powodowała optymalny skutek terapeutyczny u zwierząt z przeszczepialnym mięsakiem (Roszkowski i wsp.1980). Badano odpowiedź typu komórkowego w teście opóźnionej nadwrażliwości skórnej na oksazolon i pierwotną odpowiedź humoralną na krwinki czerwone barana i lipopolisacharyd E.coli. Autorzy wykazali, że reakcja opóźnionej nadwrażliwości skórnej u zdrowych zwierząt poddanych wielokrotnemu nagrzewaniu jest wyraźnie upośledzona, podczas gdy osłabienie odpowiedzi humoralnej obserwowano znacznie później dopiero po 2 tygodniach stosowania hipertermii. Normalizacja następowała po 10-14 dniach od zakończenia nagrzewania. Analiza składu komórkowego narządów limfatycznych nie wykazała zmian w liczebności komórek B i T. Natomiast w węzłach chłonnych drenujących miejsca uczulone dochodziło do zahamowania proliferacji limfocytów T. Przeprowadzono również ocenę reakcji na oksazolon u zwierząt nieprzeznaczonych, którym po naświetleniu podawano limfocyty pochodzące od syngenicznych myszy poddanych 14-dniowej hipertermii (Roszkowski 1981). Zaobserwowano u tych zwierząt znacznie osłabioną reakcję, w porównaniu z grupą zwierząt którym podawano limfocyty pochodzące od nienagrzewanych dawców. Wyniki omówionych powyżej badań wskazują na zróżnicowaną wrażliwość komórek układu odpornościowego na działanie podwyższonej temperatury.

2.6.2. BADANIA IN VITRO

W celu wyjaśnienia wpływu hipertermii na mechanizmy odpornościowe przeprowadzono szereg badań in vitro na izolowanych populacjach komórek układu immunologicznego. Tak jak inne komórki, komórki układu odpornościowego poddane działaniu wysokiej temperatury produkują białka szoku cieplnego. Zjawisko to omówione jest w rozdziale 2.7.. Zagadnienia omówione w tym rozdziale dotyczyć będą wpływu hipertermii na funkcje poszczególnych populacji komórek układu immunologicznego. Onsrud (1983) w swoich badaniach nad wpływem podwyższonej temperatury in vitro na ludzkie leukocyty zaobserwował, że żywotność limfocytów spada wraz ze wzrostem temperatury i zależy od czasu ogrzewania. Temperaturę krytyczną jest temperatura 43°C . Po 5 godzinach inkubacji w temperaturze 39°C żywotność limfocytów spada do 80%, natomiast po 5 godzinach inkubacji w 42°C żywotność komórek wynosi tylko 15%.

2.6.2.A. PROLIFERACJA LIMFOCYTÓW W PODWYŻSZONEJ TEMPERATURZE

Dane dotyczące wpływu hipertermii in vitro na proliferację komórek układu immunologicznego są w dużym stopniu rozbieżne. Obserwowano zarówno wzrost jak i zahamowanie proliferacji limfocytów indukowanej mitogenami w wysokiej temperaturze. Jednak przedstawione poniżej obserwacje nasuwają następujące uogólnienie. Stymulacja limfocytów mitogenami w stale podwyższonej temperaturze (39°C) ma korzystny wpływ na proliferację komórek, natomiast jednorazowe krótkotrwałe ogrzanie komórek w temperaturze 42°C poprzedzające inkubację z mitogenami w 37°C hamuje proliferację limfocytów. Hanson i

wsp.(1983) zaobserwowali wzrost włączania znakowanej tymidyny przez mysie tymocyty inkubowane w temperaturze 39°C w obecności interleukiny 1 (IL-1), fitohemaglutynyny (PHA) lub obu tych czynników. Natomiast wzrost temperatury do 40°C powodował znaczne obniżenie proliferacji w porównaniu z kontrolą, która stanowiły komórki hodowane w temperaturze 37°C w obecności mitogenów. Autorzy badali także odpowiedź limfocytów T cytotoksycznych (CTL) na stymulację interleukiną 2. Włączanie znakowanej tymidyny badane w zakresie temperatur 31-38°C było na tym samym poziomie, natomiast ulegało znacznemu obniżeniu w temperaturze 40°C. Również Duff i wsp.(1982) zaobserwowali wzrost proliferacji mysich tymocytów w temperaturze 39°C pod wpływem interleukiny 1 lub interleukiny 2 oraz interleukiny 1 w obecności konkanawaliny A (ConA). Także proliferacja mysich śledzionowych komórek T była wyższa w temperaturze 39°C gdy komórki stymulowano interleukiną 1, interleukiną 2 (IL-2) lub interleukiną 1 w obecności ConA. Natomiast podwyższona temperatura nie powodowała zmian odpowiedzi limfocytów B na stymulację lipopolisacharydem (LPS). Ciavara i wsp.(1987) zaobserwowali spadek proliferacji mysich komórek B pod wpływem LPS-u, gdy komórki hodowano w temperaturze 39°C. Asham i Nahrmias (1977) wykazali wzrost włączania znakowanej tymidyny przez ludzkie limfocyty T pod wpływem PHA i ConA w temperaturze 39°C. Autorzy sugerują, że podwyższenie temperatury ma głównie wpływ na fazę proliferacyjną odpowiedzi na mitogen, co prawdopodobnie pociąga za sobą skrócenie cyklu komórkowego w podwyższonej temperaturze. Natomiast Izumi i

wsp.(1983) odnotowali spadek proliferacji mysich limfocytów ogrzanych w temperaturze 39 lub 42°C przez 1 godzinę przed stymulacją PHA w 72 godzinnej hodowli. Podobnie Onsrud (1983) zaobserwował, że 3 godzinna inkubacja in vitro w temperaturze 42°C hamuje włączanie znakowanej tymidyny przez ludzkie limfocyty T stymulowane PHA. Przedstawione wyniki sugerują różną wrażliwość na zmianę temperatury komórek należących do różnych populacji komórek układu odpornościowego i komórek będących na różnym etapie dojrzewania. Badania nad proliferacją limfocytów T w podwyższonej temperaturze wykazały, że wzrost temperatury do 42°C powoduje wzrost lub spadek proliferacji w różnych subpopulacjach komórek T w zależności od rodzaju sygnału aktywującego podziały komórkowe antygeny lub mitogenu. Ciavarra i wsp.(1987) stwierdzili, że mysie komórki T o fenotypie $lyt-1^{+}23^{-}$ odpowiadają lepiej na stymulację ConA w temperaturze 39°C, natomiast włączanie znakowanej tymidyny przez komórki $lyt-1^{-}23^{+}$ było w tych samych warunkach hodowli niższe. Natomiast proliferacja limfocytów $lyt-1^{-}23^{+}$ indukowana przez alloantygeny lub patogen (wirus Sendai) była niższa w temperaturze 39°C niż w kontroli. Autorzy uważają, że indukcja alloreaktywnych i wirusowo-specyficznych mysich limfocytów T cytotoksycznych jest procesem termowrażliwym, wrażliwość na wysoką temperaturę dotyczy albo prekursorów komórek CTL albo komórek pamięci immunologicznej. Podwyższona temperatura zmienia nie tylko odpowiedź na czynniki stymulujące proliferację komórek układu immunologicznego, ale wpływa także na funkcje poszczególnych populacji komórkowych.

2.6.2.B FUNKCJE LEUKOCYTÓW W PODWYŻSZONEJ TEMPERATURZE

Dinarelllo i wsp.(1987) zaobserwowali, że podwyższona temperatura (39°C) wpływa korzystnie na indukowanie in vitro ludzkich komórek T cytotoksycznych w obecności napromieniowanych komórek JY i podnosi ich aktywność cytotoksyczną skierowaną przeciwko linii JY. Boyer i wsp.(1986) badali odpowiedź ludzkich limfocytów w teście mieszanej hodowli limfocytów (MLC). Okazało się, że ogrzane limfocyty przez 1 godzinę w temperaturze 45°C tracą swoją zdolność do stymulowania reakcji MLC. Autorzy uważają, że prawdopodobnie jest to wynikiem upośledzenia wczesnych etapów rozpoznania antygeny. Ale defekt ten nie jest związany ze zmianą ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy II. Komórki T odpowiadające w MLC wymagają obecności dodatkowej struktury powierzchniowej. Jest nią cząsteczka nazwana LFA (lymphocyte function antigen). Prawdopodobnie właśnie ta cząsteczka ulega w podwyższonej temperaturze zmianom konformacyjnym lub eliminacji nie jest rozpoznawana przez limfocyty T odpowiadające. Jampel i wsp.(1983) badali produkcję in vitro przeciwciał przeciwko erytrocytom owcy przez mysie komórki śledzionowe w temperaturze 39.5°C . Zaobserwowano zwiększoną syntezę przeciwciał w porównaniu z kontrolą (w 37°C), która była związana ze wzrostem aktywności komórek T pomocniczych. Aktywność komórek T supresyjnych pozostawała bez zmian. Komórki naturalnie cytotoksyczne pełniące istotną rolę w niespecyficznym mechanizmie zabijania komórek nowotworowych stanowią populację komórek najbardziej wrażliwych na działanie wysokiej

temperatury. Po 1 godzinie inkubacji w temperaturze 42°C ludzkie komórki NK tracą 90% cytotoksycznej aktywności przeciwko komórkom nowotworowym linii K562 (Onsrud 1983). Temperatura hamuje aktywność komórek NK w sposób nieodwracalny, interferon- γ uważany za jeden ze stymulatorów komórek NK nie przywraca utraconej przez nie aktywności. Termowrażliwe są również prekursorzy komórek naturalnie cytotoksycznych. Autor jednocześnie zaobserwował w swoich badaniach, że limfocyty B i T poddane działaniu temperatury 42°C przez 1 godzinę odpowiadają w niezmienny sposób na stymulację przez mitogeny ConA i *Staphylococcus aureus* Covan I. Całkowity spadek naturalnej cytotoksyczności pod wpływem temperatury 42°C zaobserwowali również Kalland i Dahlquist (1983). Stwierdzili oni, że upośledzenie funkcji komórek NK nie było związane ze spadkiem żywotności komórek, tylko z obniżeniem zdolności do tworzenia kompleksów z komórkami nowotworowymi. Także Dinarello i wsp. (1987) wykazali spadek aktywności NK przeciwko komórkom nowotworowym K562, gdy komórki jednojądrowe inkubowano przed testem z komórkami nowotworowymi przez 18 godzin w temperaturze 39°C. Te same warunki hodowli w podwyższonej temperaturze podnosiły aktywność komórek T cytotoksycznych. Roberts i Steigbigen (1977) badali aktywność fagocytarną makrofagów w podwyższonej temperaturze w stosunku do różnych szczepów bakterii. Zaobserwowano wzrost tej aktywności w przypadku bakterii *Staphylococcus aureus*.

2.6.2.C. PRODUKCJA CYTOKIN W PODWYŻSZONEJ TEMPERATURZE

Komórki układu immunologicznego uczestniczące w reakcjach

obronnych organizmu komunikują się ze sobą przy pomocy białek o charakterze hormonów nazywanych cytokinami. Białka te mają zdolność do aktywowania bądź hamowania aktywności poszczególnych populacji komórek. Dinarello i wsp.(1987) badali wpływ podwyższonej temperatury na produkcję tych białek przez ludzkie komórki jednojądrowe. Stwierdzili oni, że limfocyty stymulowane przez PHA w temperaturze 39°C mają obniżoną zdolność do produkcji interleukiny 2, w temperaturze 39°C spada także synteza interleukiny 1 przez monocyty stymulowane LPS-em. Odnotowano również spadek produkcji BPA (erythroid burst-promoting activity) i GM-CSA (granulocyte-macrophage colony stimulating activity). Natomiast Hanson i wsp.(1983) zaobserwowali wzrost poziomu syntezy interleukiny 1 przez mysie makrofagi stymulowane lipopolisacharydem w temperaturze 38°C. W swoich najnowszych badaniach dotyczących wpływu temperatury na produkcję TNF (tumor necrosis factor) przez makrofagi stymulowane LPS-em Tomasovic i wsp.(1989) wykazali, że efekt działania temperatury zależy od tego kiedy ogrzewano komórki przed stymulacją produkcji czy po niej. Gdy makrofagi inkubowano przez 1-3 godzin w temperaturze 40.5-43°C a następnie stymulowano lipopolisacharydem poziom syntezy TNF ulegał obniżeniu. Natomiast gdy w ten sam sposób ogrzewano wcześniej stymulowane makrofagi produkcja TNF była wyższa niż w kontroli. Gromkowski i wsp.(1989) również badali wpływ podwyższonej temperatury na produkcję TNF in vitro. Doświadczenia przeprowadzano na liniach komórkowych produkujących TNF w hodowli komórkowej. Okazało się, że inkubowanie komórek przez 1

godzinę w temperaturze 40°C w znacznym stopniu obniża wydzielanie przez nie TNF. Sugeruje to, że różne procesy metaboliczne zachodzące w komórce podczas syntezy TNF są w różnym stopniu wrażliwe na podwyższenie temperatury środowiska.

2.7. ZJAWISKO SZOKU CIEPLNEGO

Zjawisko szoku cieplnego opisano po raz pierwszy u muszki owocowej *Drosophila melanogaster*. Inkubacja larw tego owada w podwyższonej temperaturze powodowała dramatyczne zmiany w strukturze chromosomów politenicznych widocznych w komórkach nabłonka gruczołów ślinowych (Ritossa, 1962). W wyniku szoku termicznego zniknęła większość istniejących wcześniej rejonów o rozluźnionej strukturze (tzw. pufy), natomiast pojawiło się 6 dodatkowych pufów. W miejscach tych zachodziła bardzo intensywna synteza RNA (Ritossa, 1964).

2.7.1. BIAŁKA SZOKU CIEPLNEGO

Przełomem w badaniach nad szokiem cieplnym stało odkrycie tzw. białek szoku cieplnego (hsp - ang heat shock proteins) (Tissieres i wsp. 1974). Okazało się, że w poddanych szokowi cieplnemu komórkach muszki owocowej syntetyzowane są duże ilości białek o masie cząsteczkowej 22.000 (hsp 22), 23.000 (hsp 23), 26.000 (hsp 26), 27.000 (hsp 27), 68.000 (hsp 68), 70.000 (hsp 70) i 83.000 (hsp 83). Białka te są produktami translacji mRNA pochodzącego z nowopowstałych pufów (Spradling

i wsp.1977, Henikoff i Meselson 1977). Białka szoku cieplnego znaleziono następnie w hodowanych in vitro komórkach kurczęcia (Kelley i Schlesinger 1978), u roślin (Barnett i wsp.1978) oraz w komórkach pałeczki okrężnicy E.coli (Lemeaux i wsp.1978), a następnie we wszystkich innych badanych pod tym kątem organizmach eukaryotycznych i prokaryotycznych (Schlesinger i wsp.1982, Neidhardt 1984, Craig 1985, Lindquist 1986). Mivechi (1989) zaobserwował produkcję białka szoku cieplnego o masie 70.000 przez komórki nowotworowe. Białka szoku cieplnego zwykle klasyfikuje się i nazywa zgodnie z ich masą cząsteczkową. Wyróżnia się wśród nich na podstawie ciężaru cząsteczkowego 3 podstawowe grupy : niskocząsteczkowe białka szoku cieplnego o masie 15-30.000 (hsp 15-30), białka o masie cząsteczkowej 83-90.000 (hsp 83-90) oraz białka o masie cząsteczkowej około 70.000 (hsp 70). Białka należące do poszczególnych klas wielkości są konserwatywne ewolucyjnie. Przeciwciała reagujące z białkami hsp 70 i hsp 89 kurczęcia rozpoznają białka o zbliżonym ciężarze cząsteczkowym w poddanych szokowi cieplnemu komórkach innych organizmów eukariotycznych (Kelley i Schlesinger 1982). Do białek szoku cieplnego należy również ubikwityna - 76 aminokwasowy bardzo stabilny ewolucyjnie polipeptyd występujący we wszystkich komórkach eukaryotycznych (Bond i Schlesinger 1985).

2.7.2. CZYNNIKI WYWOŁUJĄCE SYNTEZĘ BIAŁEK SZOKU CIEPLNEGO

Podwyższona temperatura nie jest jedynym czynnikiem wywołującym syntezę białek szoku cieplnego. Produkcja tych białek zachodzi także w komórkach poddanych m.in. działaniu inhibitorów

oddychania komórkowego, jonów metali ciężkich, związków utleniających takich jak : H_2O_2 czy wolne rodniki tlenowe, związków reagujących z grupami sulfhydrylowymi, analogów aminokwasów oraz etanolu (Craig 1985, Lanks 1986). Powyższe czynniki powodują prawdopodobnie uszkodzenie albo częściową denaturację istniejących wcześniej lub nowosyntetyzowanych białek komórkowych (Voellmy 1984). Także synteza dużych ilości nieprawidłowego białka prowadzi do aktywacji genów szoku cieplnego w komórkach pałeczki okrężnicy (Goff i Goldberg 1985). Również podczas infekcji przez wirusy DNA dochodzi do podwyższonej produkcji hsp 70 przez limfocyty (Polla 1988). Białko hsp 70 syntetyzowane jest również w komórce po transfekcji onkogenem E1A lub myc (Welch i wsp.1989). W komórkach wszystkich badanych dotychczas organizmów głównym syntetyzowanym w największej ilości białkiem szoku termicznego jest białko hsp 70 (Craig 1985, Linquist 1986), u szczura są to białka hsp 70 i hsp 71 (Fujio i wsp.1987). Drugim białkiem pod względem poziomu syntezy podczas szoku termicznego jest białko o masie 90.000 (hsp 90) (Welch i wsp.1989). Badania in vitro wykazały, że glukokortykoidy należą również do czynników indukujących syntezę białek szoku termicznego, głównie produkowanym białkiem jest hsp 90 (Kasambalides i Lanks 1983).

2.7.3. GENY KODUJĄCE HSP

Sekwencja nukleotydowa genów hsp 70 jest równie konserwatywna jak struktura pierwszorzędowa białek. W genomie organizmów eukariotycznych znajduje się kilka genów kodujących białka

szoku cieplnego o masie 70.000. Scharakteryzowano je u muszki owocowej (Southgate i wsp.1985), u człowieka (Wu i wsp.1985, Hunt i morimoto 1985, Voellmy i wsp.1985). Aktywacja ekspresji genów hsp 70 regulowana jest przez sekwencje wzmacniające HSE (heat shock element) na poziomie transkrypcji (Xiao i Lis 1988) oraz na etapach postranskrypcyjnych i ma ona cechy autoregulacji (DiDomenico i wsp. 1982). W czasie szoku cieplnego mRNA hsp 70 w odróżnieniu od większości mRNA komórkowego ulega wydajnej transkrypcji. Ponadto mRNA hsp 70 ulega bardzo szybkiej degradacji po zakończeniu szoku cieplnego (Banerji i wsp.1986, Theodorakis i Morimoto 1987). Również samo białko hsp 70 ulega w komórce szybkiemu rozpadowi. Zawiera ono typowe dla innych nietrwałych białek odcinki bogate w prolinę, serynę, treoninę, kwas glutaminowy (Rogers i wsp.1986, Carper i wsp.1987). Opisano także samoistną proteolizę białka hsp 70 (Mitchell i wsp.1985). U eukariotów wykryto kilka genów kodujących białka przypominające białka szoku cieplnego o masie cząsteczkowej 70.000. Dlatego w genomie tych organizmów można wyróżnić wielogenową rodzinę hsp 70 zawierającą :

(1) kilka genów hsp 70 - są one na ogół nieaktywne w warunkach fizjologicznych, ich ekspresja jest powodowana przez szok cieplny,

(2) kilka genów hsc 70 (heat shock cognate) - ich ekspresja zachodzi w warunkach fizjologicznych, a szok termiczny może spowodować jej spadek lub nieznaczny wzrost,

(3) pseudogeny hsc 70,

(4) gen grp 78 (glucose regulated protein)- jest on aktywny w

warunkach fizjologicznych, ale poziom jego ekspresji wzrasta pod wpływem czynników zaburzających glikozylację białek, (5) pseudogeny grp 78.

Gen grp 78 ulega wzmożonej ekspresji w następstwie braku glukozy w środowisku komórki oraz pod wpływem analogów glukozy, antybiotyków hamujących glikozylację białek oraz jonoforów (Lee 1987).

2.7.4. LOKALIZACJA BIAŁEK HSP W KOMÓRCIE

Mimo powszechnego występowania białek z rodziny hsp 70 ich funkcje były przez długi czas nieznane. Badanie ich lokalizacji w komórce oraz właściwości biochemicznych pozwoliły na stworzenie modelu wiążącego białka tej grupy z procesami transportu i przebudowy białek. Za pomocą przeciwciał reagujących z białkami z rodziny hsp 70 stwierdzono, że stanowią one jeden z głównych składników prawidłowych komórek i w warunkach fizjologicznych występują głównie w cytoplazmie (La Thangue 1984). W czasie cyklu komórkowego w warunkach fizjologicznych białko hsp 70 pojawia się w fazie G_1/S (Welch i wsp.1989). Białka hsc 70 muszki owocowej są związane z włóknkami cytoplazmatycznymi, które są w charakterystyczny sposób zagęszczone wokół jądra komórkowego (Palmer i wsp.1986). Lokalizacja białek szoku cieplnego ulega zmianie po wzroście temperatury środowiska. Gromadzą się one w jądrze komórkowym, prawdopodobnie łączą się z DNA powodując zahamowanie syntezy DNA i RNA. Aktywne pozostaje jedynie RNA kodujące białka szoku termicznego (W.J.Welch i wsp.1989). Białko hsp 70 muszki

owocowej występuje w czasie szoku głównie na terenie jądra komórkowego, po zakończeniu stresu rozprasza się w cytoplazmie (Velazquez i Lidquist 1984). Również białko hsc 70 w czasie szoku jest skupione w jądrze komórkowym (Beaulieu i Tanguay 1988). W mysich komórkach L białko hsp 70 występuje w temperaturze fizjologicznej głównie w jądrze, w czasie szoku gromadzi się swoiście w jąderku (Pelham 1984). Zaraz po syntezie większość hsp 70 lokalizuje się w jądrze komórkowym, a dokładnie w jego nukleoplazmie i gromadzi się w jąderku (Welch i wsp. 1989). Ta depozycja wiąże się z ograniczeniem funkcji jąderka i służy przede wszystkim zablokowaniu syntezy rRNA. Po zakończeniu stresu białko stopniowo zaczyna opuszczać jąderko, powoli zaczyna gromadzić się w cytoplazmie. Drugim białkiem pod względem poziomu syntezy podczas szoku termicznego jest białko o masie 90.000. Występuje ono w warunkach fizjologicznych w dużych ilościach w cytoplazmie niemal wszystkich komórek (Welch 1989).

2.7.5. FUNKCJE HSP

Charakterystyczną właściwością białek z rodziny hsp 70 jest zdolność do wiązania ATP (Beaulieu i Tanguay 1988). Działanie białek z rodziny hsp 70 zależy od hydrolizy ATP i nukleotyd ten nie może być zastąpiony przez stabilne analogi. Białko hsp 70 zgromadzone w czasie szoku cieplnego na terenie jądra komórkowego jest z niego szybko uwalnianie w obecności ATP (Lewis i Pelham 1985). Białko hsc 70 uczestniczy w dysocjacji klatryny z powierzchni pęcherzyków pinocytarnych (Ungewickell 1985), białko grp ma zdolność do wiązania się z łańcuchem

ciężkim immunoglobulin (Munro i Pelham 1986), oba te procesy zależne są od ATP. Białka hsp 70 i hsc 70 skutecznie wiążą kwasy tłuszczowe (Guidon i Hightower 1986). Mogą one również oddziaływać z rejonami hydrofobowymi na powierzchni innych białek (Minton i wsp.1982) np z rozpoznawanymi przez hsp 70 uszkodzonymi rybonukleoproteinami (Lewis i Pelham 1985). Białka hsp 70 wykorzystują prawdopodobnie energię hydrolizy ATP do wymuszania zmian konformacyjnych białek wchodzących w skład uszkodzonych struktur komórkowych i w ten sposób naprawiają je (Lewis i Pelham 1985). Oprócz pre-rybosomów substratem powyższej reakcji mogłyby być także rybonukleoproteiny zawierające mRNA (Kloetzel i Bautz 1983). Zwiększona konstytutywna zawartość białka hsp 70 znacznie przyspiesza odzyskiwanie przez jąderko prawidłowej morfologii po szoku cieplnym (Pelham 1984). Białko hsp 70 łączy się z denaturowanymi białkami lub zagregowanymi preribosomami w jąderku (Welch i wsp.1989). Prawdopodobnie uczestniczy ono w translokacji innych białek przez błonę komórkową, ich przesuwaniu się wewnątrz retikulum endoplazmatycznego oraz gromadzeniu się w mitochondriach. Zwiększona ilość białka hsp 70 produkowana podczas stresu termicznego ułatwia komórce normalne funkcjonowanie. W swoich badaniach *in vitro* nad funkcją białek szoku termicznego Mivechi i Ogivia (1989) wykazali ochronne działanie oczyszczonego białka hsp 70 na syntezę białek w podwyższonej temperaturze. Autorzy sugerują, że ochronne działanie białek szoku cieplnego dotyczy raczej procesu translacji niż transkrypcji. W komórkach

eukariotycznych uszkodzone białka są degradowane przez tzw. układ zależny od ubikwityny (Finley i Varshavsky 1985). Polipeptyd ten jest przyłączony do grupy ϵ -aminowej lizyny innych białek, które w tej postaci są rozpoznawane przez cytoplazmatyczne proteazy. Mysie komórki ts85, które zawierają termowrażliwy układ ubikwityny syntetyzują duże ilości białek szoku cieplnego (Finley i wsp.1984). Ponadto ekspresja genu ubikwityny gwałtownie wzrasta podczas stresu (Bond i Schlesinger 1985). Tak więc jedną z funkcji białek szoku termicznego jest również degradacja uszkodzonych białek powstałych podczas szoku. Białka z rodziny hsp kontrolują również potranslacyjną translokację białek do wnętrza siateczki śródplazmatycznej i mitochondrium. U drożdży uszkodzenie genów hsc spowodowało zablokowanie transportu białek przez błony (Deshaies i wsp.1988). Z kolei białko grp 78 kontroluje prawdopodobnie wydzielanie białek na zewnątrz komórki (Pelham 1988). Tworzy ono kompleksy z nieglikozylowanymi prekursorami białek wydzielniczych lub innymi nieprawidłowymi białkami i zapobiega ich niespecyficznej agregacji wewnątrz komórki (Kassenbrock i wsp.1988). Również białko hsp 90 oddziałuje z innymi białkami. Zaobserwowano, że łączy się ono z kinazami białkowymi tyrozyny w czasie między ich synteza a ich ostatecznym połączeniem się z błoną komórki (Pelham 1986). Hsp 90 wiąże się także z receptorami dla hormonów sterydowych, gdy nie są one połączone z hormonem (Balieu i Catelli 1989). W ten sposób blokowane jest miejsce wiązania, gdy nie ma hormonu. Prawdopodobnie ma to znaczenie dla stabilizacji cząsteczki

receptora i regulacji odpowiedzi na hormon. Białko hsp 90 uczestniczy także w transporcie hormonów sterydowych z cytoplazmy do jądra komórkowego. Ostatnie badania (Welch i wsp.1989) wykazały, że białko hsp 90 powoduje wzrost fosforylacji czynnika Eif-2 α (eucaryotic initiation factor 2), który reguluje rozpoczęcie procesu translacji. Podwyższona fosforylacja podczas szoku termicznego powoduje spadek syntezy białek. Istnieje wyraźna zależność między szokiem cieplnym, białkami szoku cieplnego i wolnymi rodnikami tlenowymi produkowanymi m.in. przez komórki fagocytujące. Zarówno szok jaki i wolne rodniki tlenowe indukują produkcję hsp 70 w fagocytach. Z kolei białka szoku cieplnego prawdopodobnie chronią te komórki przed utleniającym działaniem wolnych rodników tlenowych. Na ten dość skomplikowany układ nakłada się jeszcze działanie wysokiej temperatury, która z kolei hamuje uwalnianie wolnych rodników tlenowych przez komórki fagocytujące (Polla 1988). Coraz częściej dyskutowana jest rola hsp w zapaleniu. Podwyższona temperatura moduluje odpowiedź immunologiczną. Z kolei synteza białek szoku cieplnego jest podwyższona in vitro przez mediatory układu odpornościowego takie jak : interleukina 1 (IL-1), interleukina 2 (IL-2), czynniki mitogenne np. estry forbolu oraz przez wolne rodniki tlenowe. W badaniach klinicznych zaobserwowano spontaniczną produkcję hsp 70 przez chondrocyty u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (Polla 1988). Ostatnio wykazano, że wiele bakterii ma na swojej powierzchni antygeny homologiczne do białek szoku cieplnego. Antygeny o masie cząsteczkowej 65 kD

znaleziono u *Mycobacterium lepre* i *Mycobacterium tuberculosis*, białka te są bardzo podobne do białek szoku cieplnego produkowanych przez *E.coli*. Natomiast antygen o masie 71 kD wyizolowany z *M.tuberculosis* i 70 kD z *M.lepre* są homologiczne do białka hsp 70 (Polla 1988). Ponieważ białka szoku cieplnego są bardzo konserwatywne, to samo białko (ten sam antygen homologiczny do hsp) może być wprowadzone do organizmu gospodarza przez wiele różnych mikroorganizmów. Antygen o masie 65 kD obecny na powierzchni *Mycobacterium tuberculosis* jest białem szoku cieplnego, które ma podobną sekwencję i zdolność do reakcji krzyżowych z antygenami innych mikroorganizmów. Koga i wsp.(1989) znaleźli wewnątrz mysich makrofagów białko homologiczne do białka 65 kD występującego u *M.tuberculosis*. Makrofagi te poddane stresowi - infekowane wirusem cytomegalii (CMV) lub aktywowane interferonem- γ są atakowane i lizowane przez komórki T cytotoksyczne uczulone antygenem 65 kD. Autorzy uważają, że białka szoku cieplnego są przetwarzane przez komórki poddane stresowi i epitopy białek szoku cieplnego pochodzących z bakterii i gospodarza są prezentowane w kontekście antygenów zgodności tkankowej (MHC) klasy I. Czyli białka hsp 65 rozpoznawane przez uczulone limfocyty T cytotoksyczne służą jako cel w procesie obrony przed rozwojem choroby a jednocześnie mogą być przyczyną odpowiedzi autoagresyjnej. Za taką interpretacją wyników przemawia również fakt, że dwa geny kodujące białko hsp 70 zmapowano w obrębie głównego układu zgodności tkankowej (MHC). Sugeruje to udział białek należących do rodziny białek szoku cieplnego w procesie

prezentowania antygeny (Koga i wsp.1989). Najnowsze badania sugerują, że białka szoku cieplnego chronią komórkę nie tylko przed niesprzyjającymi zmianami środowiska takimi jak : temperatura, pH, poziom tlenu i glukozy i pozwalają się do nich zaadoptować. Jaattela i wsp.(1989) zaobserwowali, że inkubacja komórek nowotworowych linii WEHI-164 wrażliwych na cytolityczne działanie TNF- α i TNF- β w temperaturze 42°C chroni komórki przed lizą. Ochronne działanie temperatury jest związane z produkcją białek szoku cieplnego przez komórki nowotworowe, ponieważ zahamowanie syntezy białek pod wpływem aktynomycyny D przywraca wrażliwość na TNF. To samo zaobserwowali Gromkowski i wsp.(1989). Autorzy uważają, że białka szoku cieplnego regulują lub inicjują syntezę białka (lub białek), które blokują cytolityczne działanie TNF. Obserwacja, że komórki raz poddane działaniu podwyższonej temperatury ponowne jej podwyższenie przeżywają znacznie lepiej skłania do przypuszczenia, że białka szoku cieplnego uczestniczą w procesie nabywania termotolerancji przez komórki. Mechanizm powstawania w komórce stanu względnej niewrażliwości na działanie wysokiej temperatury pozostaje nadal niewyjaśniony. Henke (1986) zaproponował w sposób następujący udział białek szoku cieplnego w wywoływaniu stanu termotolerancji :

- hsp w sposób niespecyficzny stabilizują środowisko wewnątrzkomórkowe
- chronią przed zniszczeniem cieplnym
- uczestniczą w ponownym zapoczątkowaniu replikacji DNA (podczas szoku cieplnego proces ten ulega zahamowaniu)

- hsp mają właściwości proteolityczne , co chroni przed gromadzeniem się uszkodzonych białek
- hsp powodują stabilizację błony komórkowej.

Coraz więcej wiadomo o biochemii i genetyce białek szoku cieplnego, natomiast ich funkcja w komórce pozostaje nadal niewyjaśniona i są one obiektem intensywnych badań.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE

We wszystkich doświadczeniach używano szczury wsobne szczepu WAG (RT1^u) o ciężarze ciała 200 g, samce. Pobierano krew z żyły wrotnej, żyły czczej, śledzionę, oraz przeprowadzano perfuzję wątroby.

3.2. SCEMAT DOŚWIADCZEŃ

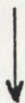
3.2.1. HIPERTERMIA IN VIVO

Ogólnoustrojową hipertermię wywoływano u zwierząt doświadczalnych przez umieszczenie ich w komorze hipertermicznej ogrzewanej płaszczem wodnym. W komorze istniał wymuszony przepływ powietrza, wilgotność względna była stała i wynosiła 60-70%. Para wodna wytwarzana przez zwierzęta podczas trwania hipertermii była pochłaniana przez umieszczoną w komorze substancję o działaniu higroskopijnym (CuSO_4), która przed każdym doświadczeniem suszono. Zwierzęta były umieszczane w klatkach Bollmana na 4 godziny w temperaturze powietrza 40°C (grupa I) lub na 8 godzin w temperaturze 37°C (grupa III). Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta trzymane w klatkach Bollmana odpowiednio przez 4 (grupa II) lub 8 godzin (grupa IV) w temperaturze pokojowej.

Mierzone ciśnienie tętnicze w tętnicy udowej u zwierząt kontrolnych wynosiło średnio 90/85 i nie wykazywało zmian podczas trwania doświadczenia. U zwierząt poddawanych hipertermii ciśnienie to ulegało obniżeniu do wartości 87/82 w 4 godzinie hipertermii i do wartości 80/75 w 8 godzinie. W 8 godzinie hipertermii zwierzęta traciły średnio $9.5 \pm 1.9\%$ ciężaru ciała w stosunku do wartości wyjściowej. Ciężar ciała w warunkach normotermii nie zmianał się.

Podczas trwania doświadczenia mierzono temperaturę ciała zwierząt. Bezpośrednio po zakończeniu doświadczenia pobierano od zwierząt krew, śledzionę i przeprowadzano perfuzję wątroby.

HIPERTERMIA IN VIVO

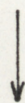


ZRÓDŁA KOMÓREK :

perfuzat wątroby
krew z żyły wrotnej
krew z żyły czczej
śledziona



METODY OCENY :



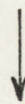
- 1.liczba komórek
- 2.żywołność komórek
- 3.charakterystyka morfologiczna



IZOLACJA NA GRADIENTCIE LYMPHOPREPU



METODY OCENY :



- 4.żywołność komórek
- 5.ocena aktywności naturalnie cytotoksycznej komórek jednojądrowych w stosunku do komórek K562
- 6.charakterystyka morfologiczna
- 7.identyfikacja subpopulacji komórek jednojądrowych przy użyciu przeciwciał monoklonalnych (W3/13, W3/25, OX8, OX19)
- 8.ocena eliminacji komórek nowotworowych linii K562 in vivo

Ryc.1 Schemat doświadczenia.

3.2.2.HIPERTERMIA IN VITRO

Komórki jednojądrowe izolowane z płynu uzyskiwanego po perfuzji wątroby, z krwi z żyły wrotnej, żyły czczej i śledziony inkubowano przez 3 godziny w łaźni wodnej o temperaturze : 39, 40 i 41°C (grupa doświadczalna). Komórki zawieszono w medium RPMI 1640 (GIBCO) z dodatkiem 10% inaktywowanej płodowej surowicy cielęcej (GIBCO) i gemitamycyny (SIGMA). Bezpośrednio po zakończeniu inkubacji badano aktywność komórek w testach. Grupę kontrolną stanowiły komórki jednojądrowe izolowane z perfuzatu wątroby, krwi z żyły wrotnej, żyły czczej i śledziony inkubowane przez 3 godziny w temperaturze 37°C (kontrola I). Dodatkową kontrolę stanowiły komórki z wszystkich badanych źródeł, które badano natychmiast po izolacji (kontrola II).

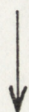
HIPERTERMIA IN VITRO

ŹRÓDŁA KOMÓREK :

perfuzat wątroby
krew z żyły wrotnej
krew z żyły czczej
śledziona



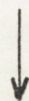
IZOLACJA NA GRADIENTCIE LYMPHOPREPU



inkubacja w temperaturze: 37, 39, 40 i 41°C przez 3 godziny



METODY OCENY :



1. żywotność komórek
2. ocena aktywności naturalnie cytotoksycznej komórek jednojądrowych w stosunku do komórek K562
3. oznaczanie aktywności cytotoksycznej na poziomie pojedynczej komórki jednojądrowej
4. ocena położenia aparatu Golgiego w komórce jednojądrowej
5. oznaczanie poziomu syntezy RNA w komórce jednojądrowej
6. charakterystyka morfologiczna

Ryc. 2 Schemat doświadczenia.

OMÓWIENIE SCHEMATÓW DOŚWIADCZEŃ

W I, II, III i IV grupie (hipertermia in vivo) zwierzęta poddawano działaniu podwyższonej temperatury. Bezpośrednio po zakończeniu hipertermii pobierano : krew z żyły czczej i żyły wrotnej, śledzionę oraz przeprowadzano perfuzję wątroby. Oceniano : liczebność (1), żywotność (2) i morfologię (3) komórek. Następnie izolowano komórki jednojądrowe na gradiencie Lymphoprepu, oceniano ich : żywotność (4), aktywność naturalnie cytotoksyczną w teście ze znakowanymi chromem radioaktywnym komórkami K562 (5) oraz sporządzano preparaty do oceny morfologicznej (6) i identyfikacji subpopulacji komórkowych przy pomocy przeciwciał monoklonalnych (7). Przeprowadzano ocenę eliminacji komórek nowotworowych linii K 562 in vivo (8). W hipertermii in vitro (grupa doświadczalna, kontrola I i kontrola II) po pobraniu krwi z żyły wrotnej i czczej, śledziony oraz perfuzji wątroby, komórki izolowano na gradiencie Lymphoprepu, a następnie inkubowano w łaźni wodnej przez 3 godziny w temperaturze: 37, 39, 40 i 41°C. Oceniano : 1/żywotność komórek, 2/ich aktywność NK w stosunku do komórek K562 oraz 3/aktywność cytotoksyczną na poziomie pojedynczej komórki w teście single cell assay i 4/położenie aparatu Golgiego. Badano 5/poziom syntezy RNA w 25-godzinnej hodowli. Jednocześnie sporządzano preparaty do 6/oceny morfologicznej komórek.

3.3. IZOLACJA KOMÓREK Z KRWI I ŚLEDZIONY

Szczury poddawano narkozie eterowej, podawano 0.2ml heparyny {Heparin Novo 1000IE/ml } do żyły grzbietowej prącia, otwierano powłoki brzuszne, pobierano krew z żyły wrotnej, z żyły czczej i śledzionę. W celu izolacji komórek śledzionę rozdrabniano, komórki wyczysywano przy pomocy igieł w medium RPMI 1640 {GIBCO Ltd Szkocja Wlk.Brytania} z dodatkiem 100µg/ml gentamycyny, uzyskaną w ten sposób zawiesinę przepuszczano przez gazę młynarską.

3.4.PERFUZJA ZATOK WĄTROBY

Perfuzję wątroby przeprowadzano w sposób następujący : jedną z kaniul wprowadzano do żyły wrotnej drugą do żyły głównej dolnej w odcinku nadprzeponowym . Wątrobę perfundowano 40ml płynu Eagle'a {Wytwórnia Surowic i Szczepionek, Polska} z dodatkiem 100µg/ml gentamycyny {SIGMA Chem.Co, St.Louis, USA} o temperaturze 4°C pod ciśnieniem 25-30mmHg. Wypływający z wątroby płyn zbierano z żyły głównej dolnej tuż za wątrobą.

3.5.OCENA ŻYWOTNOŚCI KOMÓREK

Żywotność komórek określano na podstawie testu z 0.2% błękitem trypanu.

3.6. IZOLACJA KOMÓREK JEDNOJĄDROWYCH

Krew rozcieńczano 3 krotnie medium RPMI 1640 i nakładano na gradient Lymphoprep { Nyegaard&Co.A/S, Norwegia } w proporcji : 4ml krwi na 3ml gradientu, po czym wirowano przez 30 minut przy 1600 obrotów/minutę w temperaturze pokojowej. Zawiesinę komórek śledzionowych i komórek wypłukiwanych z zatok wątroby nakładano na Lymphoprep bez rozcieńczania. Zbierano komórki interfazy, następnie trzykrotnie płukano i zawieszano we właściwej koncentracji w medium: RPMI z dodatkiem 10% inaktywowanej termicznie / 56°C 30 min./ płodowej surowicy cielęcej { GIBCO Ltd, Wlk.Brytania }.

3.7. PRZYGOTOWANIE PREPARATÓW KOMÓRKOWYCH

Sto mikrolitrów zawiesiny o gęstości 1.5×10^6 komórek/ml nakraplano do kamer cytowirówki { MEDIPAN, Polska } uzupełnionych mikroskopowymi szkiełkami podstawowymi i cytowirówkowymi bibułkami filtracyjnymi { SHANDON , Anglia }. Komórki odwirowywano przez 3 minuty przy 500 obrotów/minutę. Uzyskane w ten sposób preparaty komórkowe suszono w temperaturze pokojowej. Preparaty przeznaczone do oceny przy użyciu przeciwciał monoklonalnych zamrażano w -20°C, pozostałe utrwalano, barwiono metodą MGG i oceniano w mikroskopie świetlnym.

{Sera-Lab Ltd, Wlk.Bryt.} w rozcieńczeniu 1:100. Płukano przez 5 minut buforem : 0.05M Tris { Sigma Chem.Co.St.Louis,USA } / 0.145M NaCl o pH 7.6. Następnie preparaty inkubowano przez 30 minut z anty mysią Ig królika {Z 259, DAKOPATTS } rozcieńczoną 1:30. Płukano jak poprzednio w buforze Tris/NaCl, a następnie inkubowano przez 30 minut z anty AF Ig myszy skoniugowaną z AF { D651, DAKOPATTS } rozcieńczoną 1:30. Płukano buforem Tris i inkubowano przez 15 minut z substratem, który zawierał : bufor 0.1 M Tris o pH 8.2; fosforan AS-MX naftolu, wolny kwas, w N.N-dwumetylofosfamidzie { Sigma, Chem.Co., St.Louis, USA }, fast red TR Salt { Sigma, Chem.Co. } i 1 mM Levamisolu { Sigma Chem.Co.,USA }. W wyniku reakcji alkalicznej fosfatazy (AF) z substratem uzyskiwano barwny, czerwonoróżowy produkt. Reakcję endogennej fosfatazy hamowano levamisolem. Następnie preparaty płukano przez 5 minut w wodzie destylowanej. Jądra komórkowe podbarwiano hematoksyliną Mayera przez 1 minutę, następnie płukano pod bieżącą wodą i suszono. Po wysuszeniu preparaty zatapiano w glicerożelatynie. Procent komórek pozytywnych / o czerwonym zabarwieniu / ustalano licząc co najmniej 400 komórek w preparacie w mikroskopie świetlnym.

3.8. MORFOLOGICZNA CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK JEDNOJĄDROWYCH

Komórki utrwalone w 96% alkoholu metylowym barwiono metoda May-Grunwald-Giemsy /MGG/. Pod imersją oceniano morfologię komórek i obliczano skład procentowy leukocytów, ze szczególnym uwzględnieniem komórek z ziarnistościami azurochłonnymi o morfologii dużych granularnych limfocytów (LGL). Oceniano co najmniej 400 komórek pod mikroskopem świetlnym.

3.9. IDENTYFIKACJA SUBPOPULACJI KOMÓREK PRZY UŻYCIU PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH

metoda alkalicznej fosfatazy przeciwko alkalicznej fosfatazie / AFAAF /

W celu oceny liczebności poszczególnych subpopulacji limfocytów zastosowano następujące przeciwciała monoklonalne : anty CD3 (W3/13) identyfikujące dojrzałe i niedojrzałe funkcjonalnie komórki T, anty-CD4 (W3/25) identyfikujące komórki T pomocnicze/indukcyjne i niektóre populacje makrofagów, anty-CD8 (OX8) identyfikujące komórki T supresyjne/cytotoksyczne oraz anty-CD5 (OX19) identyfikujące tymocyty, dojrzałe limfocyty T i niektóre subpopulacje komórek B.

Zamrożone preparaty ogrzewano do temperatury pokojowej, dokładnie suszono i utrwalano 90 sekund w zimnym acetonie, następnie barwiono techniką fosfatazy AFAAF według metody opracowanej przez DAKOPATTS. Preparaty inkubowano przez 40 minut z przeciwciałami monoklonalnymi : OX8, OX19, W3/25, W3/13

3.10. OCENA AKTYWNOŚCI KOMÓREK NATURALNIE CYTOTOKSYCZNYCH /NK/

3.10.1. TEST CYTOTOKSYCZNY ZE ZNAKOWANYMI RADIOAKTYWNIEM KOMÓRKAMI NOWOTWOROWYMI LINII K562

Badania te przeprowadzono w celu oceny naturalnej cytotoksyczności komórek jednojądrowych czyli zdolności do spontanicznej (bez uprzedniego uczulenia) lizy komórek nowotworowych. Komórkami docelowymi w teście były NK-wrażliwe komórki linii K562 znakowane ^{51}Cr . Komórki efektorowe izolowano z krwi z żyły wrotnej, żyły czczej, śledziony i perfuzatu wątroby < Lukomska i wsp.1983 >. Znakowanie komórek chromem radioaktywnym: komórki 2 razy płukano medium / RPMI z dodatkiem penicyliny i streptomycyny i 10% inaktywowanej płodowej surowicy cielęcej / wirując przez 10 minut w temperaturze pokojowej przy szybkości 1000 obrotów/minutę, do osadu komórek / $1-2 \times 10^6$ komórek / dodawano 0.1ml ^{51}Cr / aktywność $1000\mu\text{Ci}$ / {Świerk, Polska}, inkubowano przez 60 minut w temperaturze 37°C , następnie 4 razy płukano medium wirując jak wyżej. Gęstość zawiesiny komórek docelowych w teście wynosiła 5×10^4 komórek/ml. Do stałej liczby komórek docelowych dodawano różną liczbę komórek efektorowych tak, by stosunek komórek efektorowych do docelowych wynosił : 20:1, 10:1, 5:1. Każdy układ powtarzano 3 razy, komórki inkubowano w płytkach do mikrohodowli { płytki okrągłodenne, Plastomed, Polska } przez 18 godzin w temperaturze 37°C , objętość zawiesiny w jednej studziencie wynosiła $200\mu\text{l}$. Następnie zbierano $100\mu\text{l}$ supernatantu z każdej próbki, radioaktywność mierzono w

liczniku gamma {Beckman}. Spontaniczne uwalnianie ^{51}Cr określano mierząc radioaktywność supernatantów z nad hodowli komórek K562 bez komórek efektorowych. Wyniki testu przedstawiano jako % cytotoksyczności obliczając ze wzoru:

$$\% \text{ cytotoksyczności} = \frac{A - S}{M - S} \times 100\%$$

gdzie : A - oznacza aktywność badanej próbki
S - uwalnianie spontaniczne
M - uwalnianie maksymalne oznaczające poziom wyznakowania komórek K562

3.10.2. TEST SINGLE CELL ASSAY

Badania te przeprowadzono w celu oceny naturalnej cytotoksyczności na poziomie pojedynczej komórki efektorowej <Bonavida i wsp.1983, Flexman i Shellam 1982, Grimm i wsp.1979>. Komórkami docelowymi w teście były komórki NK wrażliwe linii K562 i YAC-1 o gęstości 1×10^6 komórek/ml, zaś efektorowymi komórki jednojądrowe izolowane z krwi z żyły wrotnej, żyły czczej, śledziony i perfuzatu wątroby. Stosunek komórek efektorowych do docelowych wynosił 1:1. Sto mikrolitrów zawiesiny komórek docelowych i $100 \mu\text{l}$ komórek efektorowych inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C w probówkach Eppendorfa {Plastomed, Polska}. Następnie odwirowywano przez 5 minut w temperaturze pokojowej przy 500 obrotów/minutę,

zlewano supernatant, dodawano 50 μ l medium : 1xDulbecco's modification of Eagle's medium { Flow Laboratories, Wlk.Bryt. } z dodatkiem 10% inaktywowanej płodowej surowicy cielęcej, 25mM HEPES { Flow Laboratories } i 100 μ l gentamycyny. Zawiesinę komórek mieszano, dodawano 200 μ l 1% roztworu agarozy, w tym samym medium co komórki, ogrzanej do temperatury 38 $^{\circ}$ C, wlewano na szklaną płytkę Petriego o średnicy 5cm pokrytą 1% roztworem agarozy w medium. Po zastygnięciu agarozy płytki zalewano 2 ml RPMI 1640 z dodatkiem 10% inaktywowanej płodowej surowicy cielęcej i gentamycyny. Płytki inkubowano przez 4 godziny w temperaturze 37 $^{\circ}$ C. Po zakończeniu inkubacji oceniano żywotność komórek w teście z 0.2% błękitem trypanu, liczone % powstałych konjugatów komórka docelowa-komórka efektorowa i % konjugatów, w których komórka docelowa była martwa. Wyniki odnoszono do liczby komórek jednojądrowych, które nie utworzyły kompleksów.

3.10.3. REORIENTACJA APARATU GOLGIEGO

Celem badania była ocena aktywności komórki efektorowej cytolitycznej połączonej w kompleks z komórką nowotworową. Test przeprowadzano według metody opracowanej przez Carpena i wsp. (1982). Szkiełka nakrywkowe umieszczone na szalkach Petriego opłaszczano przez 45 minut w temperaturze pokojowej 200 μ l roztworu poli L-lizyny 2 μ g/ml { Sigma Chem.Co.St.Louis, USA }. Następnie delikatnie płukano PBS-em { Wytwórnia Surowic

i Szczepionek } przy użyciu mikropipety. Do 100 μ l zawiesiny komórek jednojądrowych izolowanych z żyły wrotnej, żyły czczej, śledziony i perfuzatu wątroby w RPMI o gęstości 1x10⁶ komórek/ml dodawano 100 μ l zawiesiny komórek linii YAC-1 o gęstości 1x10⁶ komórek/ml. Odwirowywano przez 5 minut przy szybkości 500 obrotów/minutę i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C. Następnie delikatnie mieszano i nakładano 100 μ l zawiesiny komórek na szkiełka nakrywkowe, każdą zawiesinę w 2 powtórzeniach. Inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37°C, dodawano na każde szkiełko po 1 ml medium RPMI z dodatkiem 10% inaktywowanej płodowej surowicy cielęcej i inkubowano przez 60 minut w temperaturze 37°C. Delikatnie płukano PBS-em i utrwalano przez 8 minut w 0.5% roztworze glutaraldehydu w temperaturze pokojowej. Następnie płukano PBS-em i inkubowano przez 4 minuty w 0.05% roztworze Triton X-100 w temperaturze pokojowej. Płukano PBS-em i inkubowano przez 30 minut ze 100 μ l WGA-FITC { Sigma Chem Co.USA } rozcieńczonej 1:400 w PBS-ie z dodatkiem 5% inaktywowanej płodowej surowicy cielęcej w ciemności w temperaturze 4°C. Następnie płukano PBS-em i szkiełka nakrywkowe po odwróceniu nakładano na szkiełka podstawowe, na które nałożono kroplę roztworu PBS-glicerol w stosunku 1:1. Preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym, liczone % kompleksów utworzonych przez komórki efektorowe z komórkami YAC-1, w których komórki efektorowe miały przesunięty aparat Golgiego w kierunku komórki docelowej.

3.11. OZNACZANIE POZIOMU SYNTEZY RNA

Wzrost poziomu syntezy RNA pod wpływem mitogenów ma miejsce już w 6 godzinie po stymulacji i jest jednym z pierwszych etapów aktywacji komórki. Oznaczanie poziomu syntezy RNA przeprowadzano w celu sprawdzenia czy komórki jednojądrowe ulagają aktywacji w podwyższonej temperaturze i jaka jest ich aktywność. Zdolność do syntezy RNA oznaczano w 25-godzinnej hodowli komórek z PHA (Averner i wsp.1972, Vassali i Silverstein 1977). Sto mikrolitrów zawiesiny komórek jednojądrowych o gęstości 3×10^6 komórek/ml w RPMI z dodatkiem 15% inaktywowanej płodowej surowicy cielęcej oraz 100 jednostek proztworu streptomycyny i penicyliny inkubowano w płaskodennej płytce hodowlanej (Titertek, Flow Lab., Wlk. Bryt.) ze 100 μ l 4% roztworu PHA (Wellcome, czystość odczynnika HA15, Wlk. Bryt.). Po 22 godzinach hodowli dodawano po 4 μ Ci 5,6³H urydyny (Amersham, Wlk. Bryt., aktywność specyficzna 35-50 Ci/mmol). Po 3 godzinach inkubacji z izotopem mierzono w liczniku β (Beckman) wbudowywanie urydyny, wyniki przedstawiano jako liczbę impulsów na minutę.

3.12. OCENA ELIMINACJI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH LINII K562

IN VIVO

W celu oceny eliminacji komórek nowotworowych in vivo podczas ogólnoustrojowej hipertermii podawano szczurom dożylnie komórki

nowotworowe znakowane radioaktywnym izotopem jodu ^{125}J . Znakowanie jodem przeprowadzano w sposób następujący : 30-40x10⁶ komórek linii K562 inkubowano w objętości 10 ml medium RPMI 1640 z dodatkiem 10% inaktywowanej surowicy cielęcej oraz 100 jednostek roztworu streptomycyny i penicyliny przez 18 godzin w obecności 20 μCi $^{125}\text{JdUdr}$ (aktywność specyficzna 5Ci/mg, Amersham Wlk.Brytania) oraz 10⁻⁶M 2'-deoxy 5-fluorourydyny (FdUrd) (Sigam, St.Louis, USA) (Ricardi i wsp.1980). Po zakończeniu znakowania komórki 4 razy płukano medium RPMI wirując w temperaturze pokojowej przy szybkości 1200 obrotów/minutę. Komórki zawieszano w soli fizjologicznej w koncentracji 1.5x10⁷ komórek/ml, mierzono aktywność w liczniku gamma (Beckmann) i wstrzykiwano szczurom do żyły grzbietowej prąca. Zwierzęta umieszczano w klatkach Bollmana i poddawano działaniu hipertermii w temperaturze powietrza 40^oC przez 4 godziny. Szczury kontrolne były przetrzymywane w klatkach Bollmana w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu ogrzewania szczury usypiano, skrwawiano, pobierano następujące tkanki : płuca, nerki, śledzionę, wątrobę, krezkowe węzły chłonne, kości udowe i kości podudzia i mierzono radioaktywność w liczniku gamma. Wyniki przedstawiano jako % aktywności podanej na 1 gram masy narządu.

3.13. ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW

Wyniki oceniano testem t-studenta metodą zmiennych

niepołączonych i metodą zmiennych połączonych oraz nieparametrycznym testem rang - testem Wilcoxon. Dane przed analizą statystyczną poddane były transformacjom : transformacji pierwiastkowej ($\sqrt{}$) gdy wyniki były przedstawione w postaci liczby impulsów na minutę i transformacji angular (arcsin) gdy wyniki były wyrażone w procentach. We wszystkich analizach przyjmowano $p \leq 0.05$.

4. WYNIKI

4.1. Wyniki badań po hipertermii in vivo

4.1.1. Wpływ hipertermii in vivo na temperaturę szczurów.

Mierzono temperaturę zwierząt poddawanych działaniu hipertermii in vivo przez 4 godziny w temperaturze powietrza 40°C i przez 8 godzin w temperaturze 37°C w komorze hipertermicznej. Wyniki tych pomiarów przedstawia Wykres 1. W chwili rozpoczęcia doświadczenia temperatura ciała zwierząt była jednakowa w obu seriach doświadczeń i wynosiła : 35.8±0.9°C (hipertermia 4-godzinna) i 35.8±0.6°C (hipertermia 8-godzinna), natomiast po zakończeniu ogrzewania wynosiła odpowiednio : 40.6±0.8°C i 40.8±0.8°C. Wzrost temperatury ciała zwierząt podczas 8-godzinnej hipertermii był łagodniejszy. Dopiero w 5 godzinie ogrzewania temperatura szczurów wzrastała do 39.2±0.3°C, podczas gdy w 4-godzinnej hipertermii wartość ta była osiągnięta już w 90 minucie doświadczenia (39.3±0.7°C). Powolniejszy wzrost temperatury w grupie 8-godzinnej hipertermii zastosowano celem utrzymania zwierząt przy życiu do końca okresu ogrzewania.

4.1.2. Wpływ hipertermii na liczbę izolowanych komórek.

Podczas ogólnoustrojowej hipertermii zaobserwowano wzrost liczby leukocytów w populacji komórek we krwi z żyły czczej oraz izolowanych ze śledziony. Wyniki przedstawione są

w Tabeli 1.

Po 4-godzinnej hipertermii całkowita liczba leukocytów uzyskiwanych po perfuzji wątroby w przeliczeniu na 1 g narządu nie ulegała zmianie i wynosiła $1.15 \pm 0.6 \times 10^6$ vs $1.97 \pm 0.5 \times 10^6$ w normotermii. Po 8-godzinnej hipertermii liczba leukocytów uzyskiwanych po perfuzji wątroby osiągała wartość $2.0 \pm 0.6 \times 10^6$ vs $2.2 \pm 0.6 \times 10^6$ w normotermii.

Liczba leukocytów w przeliczeniu na 1 cm^3 krwi we krwi z żyły wrotnej po 4-godzinnej hipertermii pozostawała bez zmian w stosunku do normotermii i wynosiła $3.0 \pm 0.5 \times 10^6$ vs $2.85 \pm 0.85 \times 10^6$ w normotermii, po 8-godzinnej hipertermii $5.6 \pm 1.0 \times 10^6$ vs $6.6 \pm 1.4 \times 10^6$ w normotermii.

Liczba leukocytów w 1 cm^3 we krwi z żyły czczej po 4-godzinnej hipertermii wzrastała i wynosiła $2.9 \pm 0.5 \times 10^6$ vs $1.15 \pm 0.25 \times 10^6$ w normotermii. Po 8-godzinnej hipertermii liczba leukocytów we krwi z żyły czczej nie ulegała zmianie i wynosiła w 1 cm^3 $3.4 \pm 0.8 \times 10^6$ vs $4.4 \pm 1.3 \times 10^6$ w normotermii.

Po 4-godzinnej hipertermii całkowita liczba leukocytów izolowanych ze śledziony w przeliczeniu na 1 g narządu osiągała wartość $1410 \pm 160 \times 10^6$ i była istotnie wyższa niż w normotermii $950 \pm 100 \times 10^6$. Po 8-godzinnej hipertermii liczba leukocytów izolowanych ze śledziony nie ulegała zmianie i wynosiła $1080 \pm 190 \times 10^6$ vs $1130 \pm 210 \times 10^6$ w normotermii.

4.1.3. Wpływ hipertermii na liczebność poszczególnych populacji leukocytów.

Oceniano morfologię leukocytów wypłukiwanych z zatok wątroby, izolowanych z krwi z żyły wrotnej i żyły czczej oraz ze śledziony po 4 i 8-godzinnej hipertermii oraz w normotermii. Wyniki przedstawione są w tabelach 2 i 3. Żywotność leukocytów oceniana w teście z 0.2% błękitem trypanu wynosiła zawsze powyżej 95%.

Zaobserwowano, że po 4-godzinnej hipertermii $80.0 \pm 0.7\%$ populacji leukocytów wypłukiwanych z zatok wątroby stanowiły komórki o morfologii limfocytów i ich liczba nie ulegała zmianie w porównaniu z normotermią, gdzie stanowiły $86.0 \pm 2.0\%$. Podczas 8-godzinnej hipertermii odsetek limfocytów wynosił $69.9 \pm 9.0\%$ komórek izolowanych z zatok wątroby vs $80.4 \pm 6.3\%$ w normotermii. Po hipertermii zaobserwowano w populacji komórek zatok wątroby wzrost liczby komórek o morfologii dużych granulanych limfocytów (LGL). Stwierdzono, że odsetek LGL po 4-godzinnej hipertermii wynosił $17.0 \pm 0.8\%$ vs $7.0 \pm 0.8\%$ w normotermii, natomiast po 8-godzinnej hipertermii $23.0 \pm 4.6\%$ vs $12.4 \pm 3.8\%$ w normotermii. W czasie 4-godzinnej hipertermii w populacji komórek zatok wątrobowych zaobserwowano $0.5 \pm 0.2\%$ granulocytów, nie odnotowano ich w normotermii, $2.5 \pm 0.9\%$ monocytów vs $6.0 \pm 2.0\%$ w normotermii oraz $0.5 \pm 0.1\%$ form blastycznych vs $1.0 \pm 0.1\%$. Po 8-godzinnej hipertermii odsetek poszczególnych populacji leukocytów wynosił odpowiednio : $0.7 \pm 0.5\%$ granulocytów vs $1.4 \pm 1.1\%$ w normotermii, $2.3 \pm 1.1\%$

monocytów vs $4.8 \pm 3.0\%$ oraz $0.2 \pm 0.1\%$ form blastycznych vs $0.8 \pm 0.2\%$ w normoterminii.

Po 4-godzinnej hipertermii w populacji leukocytów we krwi z żyły wrotnej zaobserwowano spadek liczby limfocytów : $49.9 \pm 2.1\%$ vs $66.0 \pm 3.5\%$ w normoterminii, wzrost LGL : $5.5 \pm 0.5\%$ vs $1.0 \pm 0.6\%$ oraz wzrost granulocytów : $39.9 \pm 5.0\%$ vs $28.5 \pm 8.5\%$. Odsetek monocytów po 4-godzinnej hipertermii stanowił $2.5 \pm 0.9\%$ vs $1.0 \pm 0.8\%$ w normoterminii, zaś liczba form blastycznych wynosiła 0.25 ± 0.1 vs 0 w normoterminii. Po 8-godzinnej hipertermii we krwi wrotnej odnotowano : spadek liczby limfocytów : $56.0 \pm 9.0\%$ vs $70.0 \pm 5.8\%$ w normoterminii, wzrost liczby LGL : $6.5 \pm 2.9\%$ vs $2.4 \pm 0.4\%$, wzrost granulocytów : $34.0 \pm 1.0\%$ vs $20 \pm 3.2\%$. Procent monocytów po 8-godzinnej hipertermii wynosił 3.7 ± 1.7 vs 6.2 ± 1.7 w normoterminii, zaś form blastycznych po 8-godzinnej hipertermii i w normoterminii nie zaobserwowano.

W populacji leukocytów we krwi z żyły częściej po 4-godzinnej hipertermii stwierdzono spadek liczby limfocytów : $47.5 \pm 7.8\%$ vs $62.5 \pm 2.5\%$ w normoterminii i wzrost liczby granulocytów : $40.0 \pm 9.0\%$ vs $28.0 \pm 3.0\%$ w normoterminii. Odsetek monocytów, LGL i blastów we krwi z żyły częściej nie ulegał zmianie po 4-godzinnej hipertermii i wynosił odpowiednio : $3.5 \pm 0.6\%$ vs $3.5 \pm 0.1\%$ w normoterminii, $4.5 \pm 0.5\%$ vs $5.0 \pm 1.0\%$ oraz $0.5 \pm 0.4\%$ vs 0 w normoterminii. Po 8-godzinnej hipertermii w populacji komórek z żyły częściej stwierdzono wzrost liczby granulocytów : $33.3 \pm 3.7\%$ vs $21.0 \pm 4.5\%$ w normoterminii, w pozostałych populacjach leukocytów nie odnotowano zmian. Odsetek limfocytów we krwi z żyły częściej po 8-godzinnej hipertermii wynosił $58.7 \pm 4.2\%$ vs

68.4±7.7% w normotermii, odsetek LGL 4.5±1.1% po hipertermii vs 4.6±1.6%. Monocyty stanowiły po 8-godzinnej hipertermii 3.5±1.1% vs 7.0±4.5% w normotermii, formy blastyczne 0.2±0.15% po hipertermii vs 0.2±0.1% w normotermii.

Zarówno 4-godzinna jak i 8-godzinna hipertermia nie wywoływała zmian w liczebności poszczególnych populacji leukocytów izolowanych ze śledziony. Po 4-godzinnej hipertermii stwierdzono 97.5±1.5% limfocytów vs 97.0±1.0% vs w normotermii, LGL 1.0±0.5% vs 1.5±0.3%, 2.0±0.6% monocytów vs 1.5±0.4% w normotermii. W populacji komórek izolowanych ze śledziony nie stwierdzono komórek o morfologii granulocytów ani form blastycznych zarówno w hipertermii jak i w normotermii. Po 8-godzinnej hipertermii limfocyty stanowiły 96.0±2.1% vs 94.0±2.2 w normotermii, odsetek komórek o morfologii LGL wynosił 3.2±1.4% po hipertermii vs 4.2±1.0%, natomiast liczba monocytów wynosiła 2.7±1.4% vs 2.6±0.8%. Nie zaobserwowano komórek o morfologii granulocytów i form blastycznych.

4.1.4. Wpływ hipertermii in vivo na liczebność poszczególnych subpopulacji komórek jednojądrowych

Stosując przeciwciała monoklonalne : W3/13, W3/25, OX8 i OX19 oznaczano liczebność poszczególnych populacji komórek jednojądrowych izolowanych od zwierząt poddanych działaniu hipertermii. Wyniki przedstawione są w Tabelach 6 i 7.

Zaobserwowano, że hipertermia powodowała niewielkie zmiany fenotypowe poszczególnych populacji leukocytów.

Czterogodzinna ogólnoustrojowa hipertermia nie powodowała zmian w całkowitej liczbie komórek CD3⁺ w populacji komórek izolowanych z zatok wątroby, krwi z żyły wrotnej, żyły czczej i śledziony. Procent komórek CD3⁺ pozytywnych wynosił po 4-godzinnej hipertermii odpowiednio : w populacji zatok wątroby 49.7±5.0% vs 55.8±8.8% w normotermii, we krwi z żyły wrotnej 55.3±6.6% vs 58.4±4.6%, we krwi z żyły czczej 58.0±12.7% vs 57.8±10.5% i w śledzionie 55.6±8.5% vs 60.0±4.8% w normotermii.

Po 4-godzinnej hipertermii liczba komórek CD4⁺ w populacji komórek izolowanych z zatok wątroby nie ulegała zmianie i wynosiła 23.9±5.5% vs 27.2±13.8% w normotermii. Natomiast odnotowano spadek liczby komórek CD4⁺ po 4-godzinnej hipertermii w populacji komórek izolowanych z krwi z żyły wrotnej do 23.5±8.0% vs 34.8±7.7% i z krwi z żyły czczej do 28.9±9.8% vs 39.9±6.9% w normotermii. W populacji komórek izolowanych ze śledziony liczba komórek CD4⁺ nie ulegała zmianie podczas 4-godzinnej hipertermii i wynosiła 29.8±2.6% vs 35.2±10.0% w normotermii. Konsekwencją spadku liczby komórek CD4⁺ pozytywnych jest zmiana stosunku liczby komórek pomocniczych do liczby komórek CD8⁺. Po 4-godzinnej hipertermii stosunek ten nie ulegał zmianie w populacji komórek zatok wątroby i wynosił 0.5±0.1 vs 0.68±0.26 w normotermii. Natomiast po hipertermii stosunek liczby komórek CD4⁺ do CD8⁺ we krwi z żyły wrotnej wynosił 0.78±0.2 vs 1.94±0.49 w normotermii, we krwi z żyły czczej 1.16±0.16 vs 1.97±0.44. Nie stwierdzono zmian po hipertermii w stosunku komórek CD4⁺ pozytywnych do CD8⁺ w populacji komórek izolowanych ze śledziony, wynosił on po

4-godzinnej hipertermii 1.3 ± 0.37 vs 1.52 ± 0.76 w normotermii.

Hipertermia nie powodowała zmian w liczbie komórek CD8 pozytywnych. Po 4-godzinnej hipertermii procent komórek CD8⁺ wynosił odpowiednio : w perfuzacie wątroby $43.5 \pm 4.2\%$ vs $40.0 \pm 4.7\%$ w normotermii, we krwi z żyły wrotnej $30.0 \pm 8.1\%$ vs $25.0 \pm 6.6\%$, we krwi z żyły czczej $26.8 \pm 7.7\%$ vs $21.4 \pm 4.4\%$ i w populacji komórek śledzionowych $22.7 \pm 4.7\%$ vs $24.4 \pm 4.2\%$.

Liczba komórek CD5⁺ nie ulegała zmianie podczas 4-godzinnej hipertermii. Procent komórek pozytywnych po hipertermii wynosił odpowiednio : w populacji komórek zatok wątroby $45.2 \pm 9.3\%$ vs $51.6 \pm 1.5\%$ w normotermii, we krwi z żyły wrotnej $47.6 \pm 6.8\%$ vs $52.6 \pm 4.5\%$, we krwi z żyły czczej $49.5 \pm 6.5\%$ vs $55.6 \pm 6.5\%$ i w śledzionie $52.6 \pm 5.8\%$ vs $55.2 \pm 2.4\%$ w normotermii.

Po 8-godzinnej hipertermii liczba komórek CD3⁺ wynosiła : w populacji komórek zatok wątroby $62.8 \pm 8.6\%$ vs $50.8 \pm 7.6\%$ w normotermii, we krwi z żyły wrotnej $64.0 \pm 7.3\%$ vs $69.5 \pm 5.2\%$, we krwi z żyły czczej $65.0 \pm 11.0\%$ vs $66.8 \pm 6.2\%$ i w śledzionie $51.4 \pm 10.8\%$ vs $46.5 \pm 9.5\%$ w normotermii. Liczba komórek CD4⁺ po 8-godzinnej hipertermii wynosiła odpowiednio : w populacji komórek izolowanych z zatok wątroby $24.8 \pm 6.0\%$ vs $27.6 \pm 8.8\%$, we krwi z żyły wrotnej $41.2 \pm 5.3\%$ vs $37.0 \pm 5.3\%$ w normotermii, we krwi z żyły czczej $38.9 \pm 10.0\%$ vs $42.2 \pm 8.8\%$ w normotermii i w populacji komórek izolowanych ze śledziony $29.6 \pm 6.6\%$ vs $22.0 \pm 3.4\%$ w normotermii.

Po 8-godzinnej hipertermii liczba komórek CD8 pozytywnych : w perfuzacie wątroby $42.7 \pm 7.9\%$ vs $37.4 \pm 9.9\%$ w normotermii, we krwi z żyły wrotnej $32.6 \pm 10.7\%$ vs $32.8 \pm 11.2\%$, we krwi z

żyły czczej $34.8 \pm 12.2\%$ vs 33.7 ± 8.0 i w populacji komórek śledzionowych $30.0 \pm 10.2\%$ vs $28.8 \pm 10.8\%$ w normotermii.

Liczba komórek CD5 pozytywnych nie ulegała zmianie podczas 8-godzinnej hipertermii i wynosiła : w populacji komórek zatok wątroby $45.0 \pm 9.7\%$ vs $46.2 \pm 5.0\%$ w normotermii, we krwi z żyły wrotnej $48.0 \pm 9.8\%$ vs $55.0 \pm 7.8\%$, we krwi z żyły czczej $51.2 \pm 6.9\%$ vs $50.0 \pm 8.7\%$ i w śledzionie $47.8 \pm 9.7\%$ vs $43.8 \pm 8.3\%$ w normotermii.

4.1.5. Wpływ hipertermii in vivo na liczbę LGL i na aktywność komórek NK.

Oceniano żywotność i morfologię komórek jednojądrowych izolowanych od zwierząt poddanych 4-godzinnej i 8-godzinnej hipertermii. Kontrolę stanowiły zwierzęta umieszczone odpowiednio przez 4 godziny i 8 godzin w temperaturze pokojowej. Żywotność komórek jednojądrowych mierzona w teście z 0.2% błękitem trypanu wynosiła zawsze powyżej 95%.

Procent komórek o morfologii dużych granulanych limfocytów (LGL) oceniano w preparatach barwionych metodą MGG. Komórki jednojądrowe wyizolowane od zwierząt poddawanych ogólnoustrojowej hipertermii przez 4 i 8 godzin oraz od zwierząt kontrolnych badano w teście cytotoksycznym, w którym komórkami docelowymi były komórki nowotworowe linii K562 znakowane radioaktywnym izotopem chromu ^{51}Cr . Wyniki testu przedstawione są w Tabelach 4 i 5 oraz na Wykresie 2a, 2b, 4a i 4b.

Zaobserwowano, iż 4-godzinna hipertermia powodowała istotny wzrost liczby dużych limfocytów z ziarnistościami (komórki LGL - large granular lymphocyte) w populacji komórek izolowanych z zatok wątroby : 37.3 ± 4.0 vs $23.9 \pm 5.7\%$ w normotermii i w populacji komórek izolowanych z żyły wrotnej : $21.0 \pm 0.4\%$ vs $10.2 \pm 0.7\%$ w normotermii (Tabela 4 i Wykres 3). Liczba LGL w populacji komórek izolowanych z żyły czczej i śledziony nie ulegała zmianie podczas hipertermii i wynosiła odpowiednio : $14.0 \pm 3.0\%$ vs $15.7 \pm 6.0\%$ i $6.0 \pm 2.3\%$ vs $7.6 \pm 2.0\%$.

Po 8-godzinnej hipertermii stwierdzono wzrost liczby LGL w populacji komórek izolowanych z zatok wątroby : $35.6 \pm 6.0\%$ vs $23.6 \pm 3.0\%$ w normotermii i w populacji komórek izolowanych z krwi z żyły wrotnej : $18.6 \pm 4.8\%$ vs $10.0 \pm 3.2\%$ (Tabela 5 i Wykres 5). Liczba LGL w populacji komórek izolowanych z krwi z żyły czczej i śledziony nie ulegała zmianie po hipertermii i wynosiła odpowiednio : $10.2 \pm 2.5\%$ vs $87.7 \pm 2.6\%$ i $5.8 \pm 2.4\%$ vs $5.5 \pm 1.0\%$.

Czterogodzinna hipertermia powodowała spadek aktywności cytotoksycznej komórek izolowanych z zatok wątroby : $44.8 \pm 4.1\%$ w porównaniu z normotermią $59.9 \pm 12.8\%$. Natomiast aktywność NK komórek izolowanych z krwi z żyły wrotnej była wyższa po hipertermii : $32.1 \pm 10.0\%$ vs $16.2 \pm 1.6\%$ w normotermii. Cytotoksyczność badana w populacji komórek izolowanych z krwi z żyły czczej i śledziony nie ulegała zmianie po hipertermii i wynosiła odpowiednio : $23.9 \pm 8.2\%$ vs $29.0 \pm 11.0\%$ i $28.2 \pm 13.6\%$ vs $24.9 \pm 8.1\%$ (Tabela 4 i Wykresy : 2a, 2b).

Podczas 8-godzinnej hipertermii również zaobserwowano spadek

aktywności cytotoksycznej w populacji komórek izolowanych z zatok wątroby : $35.5 \pm 8.7\%$ vs $51.5 \pm 8.3\%$ w normotermii (Tabela 5 i Wykresy : 4a, 4b). W pozostałych badanych źródłach komórek tj.: we krwi z żyły czczej, wrotnej i śledzionie aktywność NK pozostawała bez zmian, procent cytotoksyczności wynosił po hipertermii odpowiednio : $35.2 \pm 18.4\%$ vs $35.4 \pm 16.8\%$ w normotermii, $40.2 \pm 18.2\%$ vs $39.2 \pm 15.2\%$ oraz $16.2 \pm 13.7\%$ vs $22.3 \pm 10.5\%$.

4.1.6. Wpływ 4-godzinnej hipertermii na eliminację in vivo komórek K562.

W celu oceny eliminacji in vivo komórek nowotworowych podczas ogólnoustrojowej hipertermii zwierzętom podawano dożylnie znakowane radioaktywnym jodem komórki K562. Po 4 godzinach przetrzymywania zwierząt w warunkach hipertermii (grupa doświadczalna) i temperaturze pokojowej (grupa kontrolna) zwierzęta skrwawiano, pobierano tkanki i badano ich radioaktywność w liczniku gamma. Zaobserwowano, że radioaktywność odzyskana (w przeliczeniu na 1 gram masy) w tkankach pobranych od zwierząt poddanych hipertermii była wyższa niż w tkankach zwierząt grupy kontrolnej. Wyniki przedstawione są w Tabeli 8. Procent radioaktywności podanej w przeliczeniu na 1g masy narządu po hipertermii wynosił : w elementach morfotycznych krwi $0.53 \pm 0.17\%$ vs $0.31 \pm 0.13\%$ w normotermii, w osoczu $0.65 \pm 0.20\%$ vs $0.40 \pm 0.20\%$, w płucach $0.92 \pm 0.30\%$ vs $0.50 \pm 0.13\%$, w nerkach $0.55 \pm 0.20\%$ vs $0.28 \pm 0.10\%$, w

śledzienie $0.90 \pm 0.34\%$ vs $0.31 \pm 0.11\%$, w wątrobie $0.52 \pm 0.14\%$ vs $0.24 \pm 0.10\%$, w kręzkowych węzłach chłonnych $0.49 \pm 0.28\%$ vs $0.17 \pm 0.07\%$, w kościach udowych $0.33 \pm 0.16\%$ vs $0.13 \pm 0.05\%$ i w kościach podudzia $0.28 \pm 0.12\%$ vs $0.17 \pm 0.09\%$. Uzyskane wyniki wskazują, że tempo eliminacji komórek nowotworowych podanych dożylnie, podczas hipertermii było wolniejsze w porównaniu z normotermią.

4.2. Wyniki badań po hipertermii in vitro.

4.2.1. Wpływ hipertermii in vitro na liczbę komórek LGL i aktywność komórek NK w teście cytotoksycznym.

W badaniach dotyczących wpływu hipertermii in vitro na aktywność komórek naturalnie cytotoksycznych, komórki jednojądrowe wyizolowane na gradiencie Lymphoprepu z populacji komórek wypłukanych po perfuzji wątroby, z krwi z żyły wrotnej i żyły czczej oraz śledziony inkubowano przez 3 godziny w łaźni wodnej w temperaturze : 39, 40 i 41°C. Kontrolę stanowiły komórki jednojądrowe inkubowane przez 3 godziny w temperaturze 37°C.

Ocena preparatów barwionych metoda MGG wykazała, że podczas inkubacji w podwyższonej temperaturze liczba LGL nie ulega zmianie w żadnym z badanych źródeł komórek jednojądrowych (Tabela 9).

Inkubacja komórek jednojądrowych w temperaturze 41°C przez 3 godziny powoduje spadek aktywności NK w porównaniu z kontrolą, którą stanowiły komórki inkubowane przez 3 godziny w temperaturze 37°C (Tabela 9 i Wykres 6). Obniżenie cytotoksyczności względem komórek linii K562 miało miejsce we wszystkich badanych źródłach komórek efektorowych. Procent cytotoksyczności wynosił: w populacji komórek izolowanych z zatok wątroby 13.0±10.0% vs 43.0±14.3%, we krwi wrotnej 9.4±3.6% vs 19.0±8.2%, we krwi z żyły czczej 7.6±3.7% vs 19.0±3.7%, i w śledzionie 7.0±3.9% vs 11.8±6.3%.

4.2.2. Wpływ hipertermii in vitro na aktywność NK mierzona na poziomie pojedynczej komórki (single cell assay)

W celu wyjaśnienia spadku aktywności cytotoksycznej komórek jednojądrowych po hipertermii in vitro zastosowano "single cell assay", umożliwiający ocenę aktywności NK na poziomie pojedynczej komórki. Wyniki testu przedstawione są w Tabeli 10 i na Wykresach : 7 i 8. Zaobserwowano, że inkubacja komórek efektorowych w podwyższonej temperaturze prowadzi do obniżenia liczby kompleksów tworzonych przez te komórkami z komórkami nowotworowymi linii YAC-1 : w populacji komórek izolowanych z zatok wątroby 4.0±0.7% po hipertermii vs 15.2±2.2%, we krwi wrotnej 3.8±1.3% po hipertermii vs 8.8±1.3% w kontroli, we krwi z żyły czczej 3.7±0.47% po hipertermii vs 9.2±1.2% i w śledzionie 3.2±0.44% po hipertermii vs 6.0±1.1% w kontroli. Liczba martwych komórek YAC-1 w utworzonych kompleksach z

komórkami efektorowymi wynosiła : w populacji komórek izolowanych z zatok wątroby po hipertermii $26.2 \pm 7\%$ vs $39.8 \pm 3.6\%$ w kontroli, we krwi z żyły wrotnej po hipertermii $24.2 \pm 8.6\%$ vs $32.2 \pm 2.2\%$, we krwi z żyły czczej $27.8 \pm 5.9\%$ po hipertermii vs $31.6 \pm 3.6\%$ i w śledzionie $16.2 \pm 10.0\%$ po hipertermii vs $23.6 \pm 2.7\%$ w kontroli.

Zahamowaniu uległo również tworzenie kompleksów z komórkami K562. Procent tworzonych konjugatów wynosił : w populacji komórek izolowanych z zatok wątroby $3.0 \pm 0.94\%$ po hipertermii vs $8.25 \pm 0.8\%$, we krwi z żyły wrotnej $3.0 \pm 0.49\%$ po hipertermii vs $6.6 \pm 1.39\%$, krwi z żyły czczej po hipertermii $2.4 \pm 0.26\%$ vs $5.9 \pm 0.4\%$ w kontroli i w śledzionie $1.75 \pm 0.2\%$ po hipertermii vs $3.4 \pm 1.5\%$. Liczba martwych komórek docelowych w kompleksach nie zmieniała się w hipertermii bez względu na źródła komórek efektorowych i wynosiła : w populacji komórek izolowanych z zatok wątroby $30.1 \pm 8.0\%$ vs $35.0 \pm 4.48\%$ w kontroli, we krwi z żyły wrotnej po hipertermii $20.8 \pm 1.0\%$ vs $22.3 \pm 2.9\%$, we krwi z żyły czczej $23.3 \pm 5.3\%$ vs $25.0 \pm 6.0\%$ i w śledzionie $20.9 \pm 5.3\%$ po hipertermii vs $18.8 \pm 8.8\%$ w kontroli.

Sugeruje to, że hipertermia powoduje upośledzenie rozpoznawania komórek nowotworowych przez komórki NK.

4.2.3. Wpływ hipertermii in vitro na położenie aparatu Golgiego w komórce efektorowej

Miara aktywności komórek NK jest przesunięcie aparatu Golgiego, widoczne w komórce efektorowej, w kierunku komórki

docelowej w kompleksach powstających po połączeniu się komórki efektorowej z docelową. Procent kompleksów, które zawierały komórki efektorowe z przesuniętym aparatem Golgiego nie zmieniał się po inkubacji komórek efektorowych przez 3 godziny w temperaturze 41°C i wynosił: w populacji komórek izolowanych z zatok wątroby 64.4±4.16 vs 64.5±3.16, we krwi z żyły wrotnej 44.4±6.4 vs 46.7±7.22, we krwi z żyły czczej 42.0±4.0 vs 39.3±3.3 w kontroli i w śledzionie 18.9±1.56 vs 22.2±3.16. Wyniki przedstawione są w Tabeli 11 i na Wykresie 9. Świadczy to o tym, że hipertermia nie zmienia właściwości cytolitycznych komórek NK.

4.2.4. Wpływ hipertermii in vitro na poziom produkcji RNA

W celu oceny aktywności komórek po hipertermii in vitro i zbadania ich zdolności do odpowiedzi na stymulację mitogenami oceniano poziom syntezy RNA w hodowlach komórek jednojądrowych. Poziom produkcji RNA oznaczano metodą pomiaru włączania znakowanej urydyny (³HUrd) w 25-godzinnej hodowli komórek jednojądrowych izolowanych z krwi, śledziony i zatok wątroby. Wyniki przedstawiono jako liczbę impulsów na minutę (Tabela 12 i Wykresy : 10 i 11). Inkubacja komórek jednojądrowych izolowanych z zatok wątroby przez 3 godziny w temperaturze 41°C nie wywoływała zmian w poziomie włączania znakowanej urydyny zarówno przez komórki hodowane bez mitogenu (po hipertermii 1460±410 vs 1183±368 w kontroli) i jak i stymulowane PHA (1574±292 po hipertermii vs 1893±1015). Natomiast w populacji

komórek jednojądrowych izolowanych z krwi z żyły czczej i śledziony stwierdzono, że inkubacja komórek przez 3 godziny w temperaturze 41°C powodowała statystycznie istotny spadek zarówno spontanicznego jak i indukowanego przez mitogen (PHA) włączania urydyny. W populacji komórek izolowanych z krwi z żyły czczej i hodowanych bez mitogenu liczba impulsów wynosiła : 849±449 po hipertermii vs 1847±690 w kontroli a w przypadku komórek izolowanych z krwi i hodowanych w obecności PHA 1499±866 impulsów po hipertermii vs 3100±1300 w kontroli. W populacji komórek izolowanych ze śledziony wartości te wynosiły : 1122±726 po hipertermii vs 2696±588 w kontroli w hodowlach bez mitogenu i 2936±1435 po hipertermii vs 9204±2916 w kontroli w hodowlach z PHA.

5. DYSKUSJA

Na podstawie uzyskanych wyników okazało się, że ogólnoustrojowa hipertermia powoduje spadek aktywności komórek naturalnie cytotoksycznych izolowanych z zatok wątroby. Wykazane w badaniach *in vitro* obniżenie naturalnej cytotoksyczności po hipertermii potwierdziła obserwacja, że dożylnie podane komórki nowotworowe podczas hipertermii są eliminowane w tempie wolniejszym niż w normotermii. Wskazuje to na obniżenie *in vivo* aktywności komórek NK podczas ogólnoustrojowej hipertermii. Ricardi i wsp. (1981) wykazali, że zahamowanie aktywności komórek NK wywołane działaniem cyklofosfamidu lub surowicy anty asialo-GM₁ powoduje wzrost przeszczepialnych nowotworów i zwiększoną liczbę powstających przerzutów. Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje o udziale komórek NK w eliminacji komórek nowotworowych *in vivo*. Obniżenie aktywności komórek NK podczas hipertermii nie było związane ze spadkiem żywotności komórek ani ze zmniejszeniem ich liczby. Przeciwnie, obserwowano wzrost liczby dużych granulanych limfocytów (LGL). Jedną z koncepcji wzrostu liczby LGL mogłaby być ich aktywacja w wątrobie. Zwiększoną liczbę dużych granulanych limfocytów odnotowano również w populacji komórek jednojądrowych we krwi wrotnej, można by więc przypuszczać, że hipertermia powodowała napływanie komórek LGL wraz z krwią wrotną do zatok wątroby. LGL są wrażliwe na działanie czynników chemotaktycznych (Pohajdak i

wsp.1986). Można przypuszczać, że podczas hipertermii produkowane są przez wątrobę czynniki działające chemotaktycznie na komórki LGL i stymulujące ich migrację. Wiltrout i wsp.(1984) uważają, że migracja dużych granularnych limfocytów wywoływana jest przez czynniki środowiskowe, patogeny lub stymulatory biologiczne. Autorzy wykazali gwałtowne napływanie dużych granularnych limfocytów do wątroby i płuc po stymulacji *Corynebacterium parvum* lub eterem dwuwinylowym (MEV-2), który jest modulatorem odpowiedzi biologicznej. Podwyższony poziom interleukiny 1 odnotowany podczas hipertermii przez Nevilla i Saudera (1988) może również stymulować hepatocyty do syntezy różnych czynników regulujących migrację LGL i aktywność komórek NK.

Wzrost liczby dużych granularnych limfocytów mógł być również wywołany przez ich lokalną proliferację pod wpływem interferonu- γ . Downing i wsp.(1987) zaobserwowali wzrost poziomu interferonu- γ w surowicy ochotników poddanych hipertermii całego ciała i podwyższony poziom syntezy IFN- γ in vitro przez stymulowane komórki pobrane od tych dawców.

W naszych doświadczeniach mechanizm ten byłby mało prawdopodobny, ponieważ czas stosowania hipertermii wynosił 4 i 8 godzin, podczas gdy cykl proliferacyjny jest dłuższy. W cyklu komórkowym czas trwania fazy G_2 wynosi 2-6 godzin, fazy S 6-8 godzin, mitozy około 1 godziny (Asham 1984).

Wreszcie najbardziej prawdopodobną koncepcją wyjaśniającą wzrost liczby LGL jest zahamowanie wydzielania substancji z ziarnistości, stąd utrzymanie ziarnistości i większe

rozpoznawanie LGL, a także mniejsza aktywność cytotoksyczna w stosunku do komórek docelowych.

W celu wyjaśnienia mechanizmu odpowiedzialnego za obniżenie aktywności komórek NK badano ich aktywność na poziomie pojedynczej komórki. Pierwszym etapem zabijania komórki docelowej (nowotworowej) przez komórkę efektorową (NK) jest rozpoznanie celu ataku i połączenie się obu komórek w kompleks (Cerottini i Brunner 1974). W moich badaniach zaobserwowałam obniżenie liczby kompleksów tworzonych przez ogrzane komórki jednojądrowe z komórkami nowotworowymi linii K562 i YAC-1, natomiast liczba martwych komórek nowotworowych w kompleksach nie ulegała zmianie. Wskazuje to na upośledzenie rozpoznawania komórek docelowych przez komórki efektorowe poddane *in vitro* hipertermii. Takie same wyniki uzyskali Kalland i Dahlquist (1983) badając *in vitro* ludzkie komórki NK. Autorzy wykazali, że inkubacja wzbogaconej frakcji komórek LGL przez 1 godzinę w temperaturze 42°C powoduje obniżenie liczby kompleksów tworzonych z komórkami K562.

Ocena poszczególnych populacji limfocytów izolowanych z zatok wątroby przy pomocy przeciwciał monoklonalnych wykazała tylko niewielkie zmiany w fenotypie komórek podczas hipertermii *in vivo*. Wskazuje to, że podczas hipertermii nie dochodzi do napływania innych fenotypowo komórek, ale raczej do zmian funkcjonalnych komórek w układzie wrotnym a w szczególności w zatokach wątroby.

Inkubacja komórek w podwyższonej temperaturze powoduje zmiany w błonie komórkowej, najistotniejszą z nich jest wzrost

płynności. Wydaje się, że wzrost płynności błony komórkowej obserwowany podczas hipertermii (Morse i wsp.1988) jest czynnikiem, który bardzo ogranicza łączenie się komórek ze sobą. Rozemood i Bonavida (1985) zaobserwowali spadek liczby kompleksów tworzonych przez ludzkie komórki jednojądrowe z komórkami nowotworowymi linii K562, gdy płynność błony komórek efektorowych była zwiększona. W swoich dalszych badaniach autorzy wykazali, że wzrost płynności błony komórkowej nie zmienia zdolności ludzkich komórek NK do produkcji i wydzielania NKCF (Rozemood i wsp.1987). Potwierdza to przypuszczenie, że spadek aktywności komórek NK w podwyższonej temperaturze jest związany z upośledzeniem rozpoznawania komórek nowotworowych i łączenia się nimi w kompleksy, a nie z obniżeniem ich aktywności cytolitycznej. Ponadto podwyższona temperatura zmienia ekspresję niektórych receptorów powierzchniowych (Govermann i wsp.1984, Magun i Fennie 1981). Jakkolwiek nie opisano do tej pory struktury (receptora) na powierzchni komórek NK, która jest odpowiedzialna za rozpoznawanie atakowanej komórki (Roder i wsp.1979, Lotzova i Ades 1989), można przypuszczać, że wysoka temperatura, również zmienia jej ekspresję.

Kolejnym etapem w zabijaniu komórki nowotworowej, po utworzeniu konjugatu jest przesunięcie aparatu Golgiego w komórce efektorowej w kierunku komórki docelowej. Wskazuje to na aktywację komórki NK i jest związane z wydzielaniem białek niszczących komórkę docelową (Kupfer i Dennert 1984). W doświadczeniach własnych zaobserwowano, że inkubacja komórek NK

w wysokiej temperaturze hamuje tworzenie kompleksów z komórkami linii YAC-1, natomiast nie zmienia się liczba komórek efektorowych z aparatem Golgiego przesuniętym w stronę komórki docelowej. Zatem zahamowanie aktywności komórek NK następuje na etapie wiązania się komórki efektorowej z docelową.

Można przypuszczać, że istnieje szereg innych czynników powodujących zaobserwowane obniżenie aktywności komórek NK podczas hipertermii.

Hipertermia, podczas której dochodzi do wzrostu wewnętrznej temperatury ciała, może być czynnikiem wywołującym uszkodzenia wątroby. Nishimura i wsp. (1989) wykazali, że podczas lokalnej hipertermii układ naczyniowy wątroby ulega uszkodzeniu. Okazało się, że uszkodzenie żyły środkowej w 50% następowało po ogrzaniu wątroby przez 30 minut w temperaturze 41.5-42.5°C, żyły wrotnej w temperaturze 42.5-53.5°C, zaś arterioli wątrobowych w temperaturze 44-45°C. Świadczy to o zróżnicowanej wrażliwości unaczynienia wątroby na temperaturę. Obserwowane uszkodzenia następowały w ciągu 24 godzin po zakończeniu ogrzewania. Podczas przeprowadzanych przeze mnie doświadczeń, w hipertermii w 40°C temperatura wewnątrz wątroby wzrastała do 41°C. Mogło to wywoływać lokalne zmiany w wątrobie, co z kolei mogło stymulować hepatocyty do produkcji czynników działających chemotaktycznie na komórki LGL lub hamująco na ich aktywność cytotoksyczną.

Szybki wzrost temperatury ciała u zwierząt poddawanych hipertermii wywołuje u nich stres termiczny. Towarzyszy temu wzrost poziomu kortykosteronu w surowicy. Odnotowano to u

szczurów (Lotz i Michaelson 1978) i u indyków (El-Halawani i wsp.1973). Z literatury wiadomo, że glukokortykoidy, których poziom wzrasta podczas stresu, hamują aktywność cytotoksyczną komórek NK zarówno *in vivo* (Onsrud i Thorsby 1981) jak i *in vitro* (Matera i wsp.1988). Mechanizm, na drodze którego dochodzi do spadku cytotoksyczności nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony. Nair i Schwartz (1984) uważają, że jest to bezpośrednie działanie hormonu na komórkę. Autorzy zaobserwowali znaczne obniżenie liczby komórek tworzących kompleksy z komórkami docelowymi pod wpływem glukokortykoidów. Kortykosterydy hamują również generację komórek LAK (lymphokine activated killer) powodują spadek ich aktywności *in vitro* (Mc Vicar i wsp.1989).

Obserwowany przez mnie spadek aktywności komórek NK podczas hipertermii może być również związany ze wzrostem poziomu prostaglandyny E_2 . Baracos i wsp.(1983) zaobserwowali podwyższony poziom produkcji PGE_2 w temperaturze $39^{\circ}C$. Wiadomo, że prostaglandyny *in vitro* hamują aktywność cytotoksyczną komórek NK (Okamura i wsp.1987).

W badaniach *in vivo* podczas ogólnoustrojowej hipertermii aktywność cytotoksyczna komórek izolowanych z zatok wątroby ulegała obniżeniu, natomiast nie zaobserwowano zmian w aktywności komórek izolowanych z krwi obwodowej i śledziony. W populacji komórek izolowanych z krwi z żyły wrotnej podczas 4-godzinnej hipertermii obserwowano wzrost aktywności komórek NK, 8-godzinna hipertermia nie powodowała zmian w aktywności cytotoksycznej populacji komórek jednojądrowych krwi wrotnej.

W przeprowadzonych badaniach *in vitro* odnotowano spadek cytotoksyczności komórek NK w temperaturze 41°C w populacji komórek izolowanych z zatok wątroby, śledziony oraz krwi obwodowej i krwi wrotnej.

Przedstawione obserwacje można interpretować działaniem lokalnych czynników środowiskowych. Populacja komórek NK zasiedlających zatoki wątrobowe prawdopodobnie ulega dodatkowej supresji pod wpływem lokalnie uwalnianych czynników. Z literatury wiadomo, że hepatocyty, komórki Kupffera i komórki NK znajdujące się w wątrobie oddziałują na siebie, regulując wzajemnie swoją aktywność. Komórki Kupffera produkują m.in. prostaglandyny hamujące aktywność komórek NK (Okamura i wsp.1987). Brak zmian aktywności komórek NK we krwi może być wynikiem działania podwyższonego poziomu IFN- γ w surowicy, co obserwowano u ochotników poddanych hipertermii (Downing i wsp.1987) i IL-1, co odnotowano u myszy po hipertermii *in vivo* (Neville i Sander 1988). Czynniki te mogą działać ochronnie a nawet stymulująco na komórki NK znajdujące się we krwi, co mogłoby wyjaśniać zaobserwowany podczas 4-godzinnej hipertermii wzrost naturalnej cytotoksyczności we krwi wrotnej. Shen i wsp. (1987) zaobserwowali, że hipertermia *in vivo* u myszy nie zmienia aktywności NK w śledzionie bezpośrednio po zakończeniu ogrzewania. Natomiast 1 i 2 dni po hipertermii w temperaturze 42°C gwałtownie spada liczba powstających kompleksów między komórką efektorową i docelową. Zatem można przypuszczać, iż wpływ hipertermii na aktywność komórek NK jest długotrwały, zależny od wysokości temperatury i czynników środowiska

wewnętrznego.

Połączenie się ze sobą komórki efektorowej z docelową stymuluje komórkę efektorową do syntezy i wydzielania białek powodujących cytolizę komórki docelowej. Do białek tych należą : perforyna (Young i wsp. 1986), leukaleksyna (Liu i wsp. 1987) i NKCF (Ortaldo i wsp. 1987). O udziale tych białek w procesie cytolizy świadczą wyniki doświadczeń, w których blokowano syntezę białek przy pomocy inhibitorów takich jak np. cyklohexamid (Leung i Ip 1985). Okazało się, że po zahamowaniu syntezy białek, obniżeniu ulega zarówno aktywność cytolityczna komórek NK jak i ich zdolność do tworzenia kompleksów z komórkami docelowymi. Zatem synteza de novo białek w komórce efektorowej jest czynnikiem niezbędnym do rozpoznania i do lizy komórek docelowych.

Upośledzenie tworzenia kompleksów z komórkami nowotworowymi przez komórki NK podczas hipertermii mogło więc być również związane z zahamowaniem syntezy białek (struktur/receptorów), koniecznych do łączenia się komórek ze sobą.

Kolejnym etapem prowadzonych badań było sprawdzenie jak hipertermia *in vitro* wpływa na syntezę RNA. Podczas aktywacji limfocytów *in vitro* przez mitogen synteza RNA mierzona włączaniem znakowanej urydyny wzrasta już w 6 godzinie po podaniu PHA, osiągając maksimum około 24 godziny. W 48 godzinie ilość RNA w komórce ulega podwojeniu, następnie produkcja spada by znów podwoić się w 96 godzinie hodowli (Ashman 1984). Wzrost syntezy RNA jest jednym z pierwszych etapów aktywacji limfocytów indukowanej *in vitro* przez mitogen.

Okazało się, że podwyższona temperatura hamuje włączanie znakowanej urydyny w 25-godzinnej hodowli komórek jednojądrowych, zarówno stymulowanych jak i niestymulowanych mitogenem, izolowanych z krwi obwodowej i śledziony. Zmian tych nie udało się zaobserwować w populacji komórek izolowanych z zatok wątroby, co nie znaczy, iż ten sam mechanizm jest odpowiedzialny za odnotowane zmiany. Komórki jednojądrowe nie odpowiadały na stymulację PHA. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (Sadowska-Szablisy i wsp.1989), że komórki izolowane z zatok wątroby nie odpowiadały na mitogen. Wykazano, że komórki izolowane z zatok wątroby znajdują się w stanie aktywacji (Lukomska i wsp.1989) i tym należy tłumaczyć fakt, że nie odpowiadają na czynniki stymulujące *in vitro*.

Obserwowane podczas hipertermii zahamowanie syntezy RNA w populacji limfocytów śledziony i krwi świadczy o obniżeniu wrażliwości komórki na czynniki powodujące jej stymulację.

Spadek syntezy RNA przez komórki w podwyższonej temperaturze odnotowali Gerner i Russell (1977). Przyczynę tego wyjaśnili Carper i wsp.(1989), stwierdzając, że hipertermia blokuje enzym : dekarboksylazę ornityny. Enzym ten kieruje w komórce biosyntezą poliamin, które z kolei regulują syntezę RNA i proliferację komórki. Istnieją również dane wskazujące na skrócenie cyklu komórkowego komórek jednojądrowych w podwyższonej temperaturze (Gerner i Russel 1977).

Inną przyczyną zahamowania produkcji RNA pod wpływem hipertermii jest działanie białek szoku cieplnego. Produkowane są one przez niemal wszystkie komórki Procaryota i Eucaryota w

krótkim czasie po podwyższeniu się temperatury środowiska i ich zadaniem jest ochrona komórki przed toksycznym działaniem wysokiej temperatury (Lindquist 1986). Białka szoku cieplnego łącząc się z rybosomami i rybonukleoproteinami blokują syntezę RNA, wybiórczo syntetyzowane jest jedynie RNA kodujące białka szoku cieplnego (Kloetzel i Bautz 1983).

Opisywane doświadczenia własne prowadzone były w 25-godzinnej hodowli komórek po uprzednim 3-godzinnym ich ogrzewaniu, zatem prawdopodobnie obserwowano już końcowy efekt odpowiedzi komórki na stres termiczny.

Welch i Suhan (1986) badali syntezę białek szoku cieplnego podczas ogrzewania komórek i w czasie odzyskiwania prawidłowych fizjologicznych funkcji komórek po zakończeniu stresu cieplnego. Syntezę szoku cieplnego obserwowano po inkubacji przez 1-3 godziny w temperaturze 42.5°C. Już w 1 godzinie rozpoczyna się synteza białek szoku cieplnego. Maksimum tej syntezy przypada między 7 a 8 godziną po zakończeniu ogrzewania i utrzymuje się jeszcze na podwyższonym poziomie w 24 godzinie po zakończeniu stresu cieplnego. 24 godziny po zakończeniu hipertermii u połowy ogrzewanych komórek białka szoku cieplnego znajdowały się jeszcze w jądrze i jąderku. Podczas szoku cieplnego białka te przesuwają się z cytoplazmy do jądra komórkowego, zaś po zakończeniu stresu następuje ich stopniowe przesuwanie się z powrotem do cytoplazmy.

Uzyskane wyniki zachęcają do prowadzenia dalszych badań nad

wpływem hipertermii na komórki cytotoksyczne. Zwłaszcza interesującym wydaje się sprawdzenie jak długo utrzymuje się efekt podwyższonej temperatury podczas uogólnionej hipertermii i jaki udział w tym procesie mają białka szoku cieplnego.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Wykazano, iż ogólnoustrojowa hipertermia stosowana przez 4 do 8 godzin powodowała obniżenie badanej *in vitro* aktywności cytotoksycznej populacji komórek jednojądrowych izolowanych z zatok wątroby, przy jednoczesnym zwiększeniu liczby limfocytów z ziarnistościami azurofilnymi, uznawanych za komórki cytotoksyczne. Dożylnie podane komórki docelowe (komórki nowotworowe K562) były eliminowane w hipertermii w tempie wolniejszym niż w normotermii, co potwierdzało obserwowane *in vitro* obniżenie poziomu cytotoksyczności.

In vitro inkubacja komórek, otrzymanych z zatok wątroby normotermicznego szczura, w temperaturze 41°C przez 3 godziny potwierdziła zjawisko obniżenia cytotoksyczności i pozwoliła wykazać dodatkowo, iż komórki te posiadały obniżoną zdolność wiązania się z komórkami docelowymi.

Ocena poszczególnych subpopulacji komórek jednojądrowych z zatok hipertermicznej wątroby przy użyciu przeciwciał monoklonalnych wykazała brak większych zmian w ich fenotypie. Wskazywałoby to, iż w hipertermii obniżenie poziomu cytotoksyczności nie było spowodowane odpływem lub napływem do zatok wątroby innych populacji, a raczej zmianami funkcjonalnymi obecnych tam czasowo komórek naturalnie cytotoksycznych. Ograniczenie tworzenia kompleksów z komórkami docelowymi wyjaśniałoby obniżoną cytotoksyczność. Mechanizm tego pierwszego nie jest jasny, ale wykazane upośledzenie

wbudowywania urydyny do RNA mogłoby świadczyć o reakcji obronnej komórki na stres cieplny.

Pozornie paradoksalna obserwacja obniżenia aktywności cytotoksycznej przy równoczesnym wzroście liczby LGL, komórek uznanych odpowiedzialnymi za naturalną cytotoksyczność, mogłaby być tłumaczona brakiem zużycia zawartości z ziarnistości LGL (m.in. NKCF - natural killer cell factor) w procesie cytotoksycznym. Wiadomo, iż ziarnistości komórek naturalnie cytotoksycznych zawierają związki biorące udział w uszkodzaniu błony komórki docelowej. Na podstawie przeprowadzonych badań możnaby powiedzieć, iż optymalną temperaturą dla funkcji komórek cytotoksycznych u szczura jest temperatura w zakresie 37-39°C.

7. PIŚMIENICTWO

1. Ashman R.F. : "Lymphocyte activation". w "Fundamental Immunology", Rozdział 6, ed W.E.Paul ,Raven Press 1984, Nowy York.
2. Ashman R.B. i Nahmias A.J. : "Effects of incubation temperature on mitogen responses of lymphocytes from adult peripheral blood and from cord blood". Clin.Exp.Immunol 1978,33,319.
3. Averner M.J., Brock M.L., Jost J.P. : "Stimulation of ribonucleic acid synthesis in horse lymphocytes by exogenous cyclic adenosine 3'5'-monophosphate". J.Biol. Chem. 1972,247,413.
4. Banerji S.S., Berg L., Morimoto R.I. : "Transcriptional and post transcriptional regulation of avian HSP 70 gene expression". J.Biol.Chem.1986,261,15740.
5. Baracos V., Rodemann H.P., Dinarello C.A., Goldberg A.L. : "Stimulation of muscle protein degradation and prostaglandin E₂ release by leucocytic pyrogen (interleukin 1)". N.England J.Med.1983,308,553.
6. Barlozzari T., Reynolds C.W., Herberman R.B. : " In vivo role of natural killer cells : involvement of large granular lymphocytes in the clearance of tumor cells in anti-asialo GM₁-treated rats". J.Immunol.1983,131,1024.
7. Barnett T., Altschuler M., McDaniel C.N., Mascarentes J.P. : "Heat - shock induced proteins in plant cells". Dev.Genet.1978, 1,331.

8. Baulieu E-E., Catelli M-G.: "Steroid hormone receptors and heat shock protein Mr 90.000 (HSP 90) : a functional interaction?" str.203-219 w "Stress induced Proteins" ed Pardue M.L., Feramisco J.R., Lindquist , 1984 Alan R.Liss Inc. New York.
9. Beaulieu J.F. i Tanguay R.M. : "Members of the Drosophila HSP 70 family share ATP-binding properties". Eur.J.Biochem.1988,172,341.
- 10.Bole D.G., Hendershot L.M., Kearney J.F. : "Post-transcriptional association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in non secreting and secreting hybridomas". J.Cell.Biol. 1986,102,1558.
- 11.Bonavida B., Bradley T.P., Grimm E.A.: "The single cell assay in cell mediated cytotoxicity". Immunology Today 1983,4,196.
- 12.Bond U.i Schlesinger M.I. : "Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts".Mol.Biol.Cell. 1985,5,949.
- 13.Boyer C.M., Kostyu D.D., Brissette C.S., Amos D.B. : "Functional defects of heat-inactivated lymphocytes in mixed-lymphocyte culture". Cell.Immunol.1986,101,440.
- 14.Bukowski J.F., Woda B.A., Habu S., Okamura K., Welsh R.M. : "Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo".J.Immunol.131,1531.
- 15.Buwens L. i Wisse E. : " Immuno - electron microscopic characterization of large granular lymphocytes (natural

- killer cells) from rat liver". Eur.J.Immunol.1987,17, 1423.
16. Bouwens L., Remels L., Baekeland M., van Bossuyt H. Wisse E.: " Large granular lymphocytes or "pit cells" from rat liver : isolation, ultrastructural characterization and natural killer activity". Eur.J.Immunol.1987,37.
17. Bykovskaya S.N., Rytenko A.N., Rauschenbach M.O., Bykovsky A.F.: "Ultrastructural alteration of cytolytic T lymphocytes following their interaction with target cells. I. Hypertrophy and change of orientation of the Golgi apparatus". Cell.Immunol.1978,40,16.
18. Calderwood S.K. i Hahn G.M. : "Thermal sensitivity and resistance of insulin - receptor binding. Biochim.Biophys. Acta 1983,756,1.
19. Carpen O., Virtanen I., Saksela E. : "Ultrastructure of human natural killer cells : nature of the cytolytic contacts in relation to cellular secretion". J.Immunol.1982,128,2691.
20. Carper S.W., Duffy I.I., Gerner E.W. : "Heat shock proteins thermotolerance and other cellular processes". Cancer Res.1987,47,5249.
21. Carper S.W., Harari D.M., Fuller I.M.D., Gerner E.W. "Biochemical and cellular responses to hyperthermia in cancer therapy". str 247-256 w "Stress-induced proteins" ed Pardue M.L., Feramisco J.R., Lindquist S. 1984 Alan R.Liss Inc. New York.
22. Cerottini J.C. i Brunner K.T. : "Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity". Adv.Immunol.1974,

- 18,67.
23. Chung C.H. i Goldberg A.L.: "The product of the lon (cap R) gene in E.coli in the ATP dependent proteases : Protease La". Proc Natl.Acad.Sci.USA 1981,78,4931.
24. Ciavarra R.P., Silvester S., Brody T. : "Analysis of T-cell subset proliferation at afebrile and febrile temperatures: differential response of Lyt-1⁺23⁻ lymphocytes to hyperthermia following mitogen and antigen stimulation and its functional consequence on developnent of cytotoxic lymphocytes". Cell.Immunol.1987,293.
25. Cohen S.A., Salazar D., van Mernchhausen W., Werner-Wasik M., Nolan J.P. : "Natural anti tumor defence system of the murine liver". J.Leucocyte Biol.1985,37,559.
26. Craig E.A.: "The heat shock response". CRC Crit Rev.Biochem. 1985,18,5390.
27. Deshaies R.J., Koch B.D., Werner-Washburne M., Craig E.A., Schekman R. : "A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor peptides". Nature 1988,332,800.
28. Deunert G. i Podack E.R : "Cytolysis by H-2 specific T-killer cells : assembly of tubular complexes during the lytic reaction". J.Exp.Med.1983,157,1483.
29. Dickson J.A., Calderwood S.K. : "Thermosensitivity of neoplastic tissues in vivo". w "Hyperthermia in cancer therapy". ed Strom F.K. 1893 Boston G.K.Hall Medical Publishers.
30. DiDomenico B.J., Bugaisky G.E., Lindquist S. : "The heat

- shock response in self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels". *Cell* 1982,31,593.
31. Digemans K.P. : "Behaviour of intravenously injected malignant lymphoma cells. A morphologic study". *J.Natl.Canc.Inst.*1973,51,1883.
32. Dinarello Ch.A., Dempsey R.A., Allegretta M., Lo-Preste G., Dainiak N., Parkinson D.R., Mier J.W. : "Inhibitory effects of elevated temperature on human cytokine production and natural killer activity". *Canc.Res.*1986,46,6236.
33. Dourmashkin R.R., Deteix P., Simone C.B., Henkart P. : "Electron microscopic demonstration of lesions on target cell membranes associated with antibody-dependent cellular cytotoxicity". *Clin.Exp.Immunol.*1980,43,554.
34. Downing J.F., Martinez-Valdez M., Elizondo R.S., Walker E.B., Taylor M.W. : "Hyperthermia in humans enhances interferon- γ synthesis and alters the peripheral lymphocyte population". *J.Interferon.Res.*1988,8,143.
35. Downing J.F. i M.W.Taylor : "The effect of in vivo hyperthermia on selected lymphokines in man". *Lymphokine Res.*1987,6,103.
36. Downing J.F., Taylor M.W., Wei K.M., Elizondo R.S. : "In vivo hyperthermia enhances plasma antiviral activity and stimulates peripheral lymphocytes to increased synthesis of IFN- γ ". *J.Interferon Res.*1987,7,185.
37. Duff G.W. i Durum S.C. : "Fever and Immunoregulation : Hyperthermia, Interleukins 1 and 2, and T-cell Proliferation". *Yale J.Biol.Med.*1982,55,437.

- 38.El-Halawani M.E., Waibel P.E., Appel J.R., Good A.L. :
"Effects of temperature stress on catecholamines and
corticosterone of male turkeys". *Am.J.Physiol.*1973,224,
384.
- 39.Enzom H. i Hare H. : "Ito cells (Fat-storing cells) and
collagen formation in carbon tetrachloride induced liver
fibrosis". w Kiru A., Knook D.L., Wisse E. (ed) "Cells of
the hepatic sinusoids".The Kupffer cells fundation tom 1.
Proceedings of the 3rd Int. Kupffer cell symposium,
Strasbourg 1986,233.
- 40.Field S.B. : "Hyperthermia in the treatmant of cancer".
*Phys.Med.Biol.*1987,32,789.
- 41.Finley D., Ciechanover A., Varshavsky A. : "Thermolability"
of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell
cycle mutant ts 85". *Cell* 1984,37,43.
- 42.Finley D., Varshavsky A : "The ubiquitin system : functions
and mechanisms ". *Trends Biochem.Sci.*1985,10,343.
- 43.Flexman J.P. i Shellam G.R. : "Target - effector interactions
in the rat natural killer cell system.I.The measurement of
cytotoxicity at the single cell level".
*Eur.J.Immunol.*1982,12,457.
- 44.Freudenberg N., Freudenberg M.A., Hoess C.D., Schrecher H.,
Galanos C : "Investigations into the origin of mouse liver
sinusoidal cells". *Virchows Archiv.A (Pathol.Anat.)*.1986,
410,1.
- 45.Fujio N., Hatayama T., Kinoshuta H., Yukioka M. : "Induction
of four heat shock proteins and their mRNAs in rat after

- whole body hyperthermia". J.Biochem.1987,101,181.
- 46.Gee A.P., Pettigrew R.T., Williams A.E., Smith A.N. :
"Preliminary studies on immunocompetence of patients
undergoing whole body hyperthermia therapy for advanced
malignancy". Br.J.Canc 1976,34,313.
- 47.Gerner E. i Russel D. : "The relationship between polyamine
accumulation and DNA replication in synchronized Chinese
hamster ovary cells after heat shock". Cancer
Res.1977,37,482.
- 48.Giovanella C. : "Thermosensitivity of neoplastic cells". w
"Hyperthermia in cancer therapy" ed Strom F.K. 1983 Boston
G.H.Hall Medical Publishers.
- 49.Goff S.A.i Goldberg A.L. : "Production of abnormal proteins
in E.coli stimulates transcription of lon and other heat
shock genes". Cell 1985,41,587.
- 50.Goverman D.S., Borden E.C., Meritt J.A., Robins H.I.,
Steevens R., Bryan G.T. : "Augmented antiproliferative
effects of IFN at elevated temperatures against human
bladder carcinoma cell lines". Cancer Res.1984,44,5516.
- 51.Grimm E.A., Thomas J.A., Bonavida B.: "Mechanism of
cell-mediated cytotoxicity at single cell level.II.Evidence
for first order-kinetics of T cell-mediated cytotoxicity and
for heterogeneity of lytic rate". J.Immunol. 1979,123,
2870.
- 52.Gromkowski S.H., Yagi J., Janeway Ch.A.Jr. : "Elevated
temperature regulates tumor necrosis factor-mediated
immune-killing". Eur.J.Immunol.1989,19,1709.

53. Guidon P.T. i Hightower L.E. : "Purification and initial characterization of the 71 kilodalton rat heat shock protein and its cognate as fatty acid binding protein". *Biochemistry* 1986,25,3231.
54. Hanna N.: "The role of natural killer cells in control of tumor growth and metastasis". *Biochim. and biophys. Acta* 1985,780,213.
55. Hanson D.F., Murphy P.A., Silicano R., Shin H.S. : "The effect of temperature on the activation of thymocytes by interleukins I and II". *J. Immunol.* 1983,130,216.
56. Haveman J. i Hahn G.M. : "The role of energy in hyperthermia - induced mammalian cell inactivation : a study of the effects of glucose starvation and an uncoupler of oxidative phosphorylation". *J. Cell. Physiol.* 1981,107,237.
57. Henke K.J. : "Thermotolerance in cultured mammalian cells". p.15-71, w "Thermotolerance and thermophility : observation and mechanisms. Mechanisms of thermotolerance". K.J. Henke red. Boca Raton FC. CRC. press 1986.
58. Henney C.S. : "Estimation of the size of a T-cell induced lytic lesion". *Nature (London)* 1974,249,456.
59. Hunt C. i Morimoto R.J. : "Conserved features of eukaryotic hsp 70 genes revealed by comparison within the nucleotide sequence of human hsp70". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985,82, 6455.
60. Introna M., Allaren P., Spreafico F., Monterani A : "Inhibition of human natural killer activity by cyclosporin A". *Transplantation* 1987,31,113.
61. Itoh H., Abo T., Sugawa S., Kanno A., Kumagai K. :

- : "Age-related variation in the proportion and activity of murine liver natural killer cells and their cytotoxicity against regenerating hepatocytes. *J. Immunol.* 1988, 141, 351.
62. Izumi A., Koga S., Maeta M. : "Effects of in vitro hyperthermia on murine and human lymphocytes". *Cancer* 1983, 51, 2061.
63. Jaattela M., Saksela K., Saksela E. : "Heat shock protects WEHI-164 target cells from the cytolysis by tumor necrosis factor α and β ". *Eur. J. Immunol.* 1989, 19, 1413.
64. Jampel B.D., Duff G.W., Gershon R.K., Atkins E., Durum S.K. : "Fever and immunoregulation. III. Hyperthermia augments the primary in vitro humoral immune response". *J. Exp. Med.* 1983, 157, 1229.
65. Kalland T. i Dahlquist I : "Effects in vitro hyperthermia on human natural killer cells". *Canc. Res.* 1983, 43, 1842.
66. Kamada M.K., Michon J., Ritz J., Holidack J., Serafin W.E., Austen K.F., MacDermott R.P., Stevens R.L. : "Identification of carboxypeptidase and tryptic esterase activities that are complexed to proteoglycans in the secretory granules of human cloned natural killer cells". *J. Immunol.* 1989, 142, 609.
67. Kaneda K., Dan C., Wake K. : "Pit cells as natural killer cells". *Biomedical Res.* 1983, 4, 567.
68. Kaneda K i Wake K. : "Pit cells in extrahepatic organs of the rat". *Anatomical Records.* 1985, 211, 192.
69. Kaneda K., Kurioka N., Seki S., Wake K., Yamamoto S. : "Pit cell-hepatocyte contact in autoimmune hepatitis". *Hepatology*

- 1984,4,955.
- 70.Kang M-S, Song C.W., Levitt S.H. : "Role of vascular function in response of tumors in vivo to hyperthermia". *Cancer Res.*1980,40,1130.
- 71.Kasai M., Iwamori M., Nagai Y., Okamura K., Tada T. : "A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells". *Eur.J.Immunol.*1980,10,175.
- 72.Kasambalides E.J. i Lanks K.W. : "Dexamethasone can modulate glucose-regulated and heat shock protein synthesis". *J.Cell.Phys.*1983,114,93.
- 73.Kassenbrock C.K., Garcia P.B., Walter P., Kelley R.B. : "Heavy - chain binding protein recognizes aberrant polipeptides translocated in vivo". *Nature* 1988,330,90.
- 74.Kawiak J., Mirecka J., Olszewska M., Warchoń J. : "Podstawy cytofizjologii" - praca zbiorowa, PWN 1985, Warszawa.
- 75.Kelley P.M. i Schlesinger M.J. : "Antibodies to two major heat shock proteins cross-react with similar proteins in widely divergent species". *Med.Cell.Biol.*1982,2,267.
- 76.Kelley P.M. i Schlesinger M.J. : "The effect of amino-acid analogues on gene expression in chicken embryo fibroblast". *Cell* 1978,15,1277.
- 77.Klementz R., Hultmark D., Gerhing W.I. : "Selective translocation of heat shock mRNA in *Drosophila melanogaster* depends on sequence information in the leader". *EMBO J.*1985,4,2053.
- 78.Kloetzel P.M. i Bautz E.K.F. : "Heat-shock proteins are associated with mRNA in *Drosophila melanogaster* tissue

culture cells". EMBO J.1983,2,705.

- 79.Koga T., Wand-Wurttrnberger A., DeBrun J., Munk M.E., Schoel B., Kaufman S.H.E. : "T cell against a bacterial heat shock protein response stressed macrophages". Science, 1989,24, 1112.
- 80.Kumagai K., Itoh K.,Suzuki R., Hinuma S., Saitoh F. : "Studies of murine large granular lymphocytes. I. Identification as efector cells in NK and K cytotoxicities". J.Immunol.1982,129,338.
- 81.Kupfer A. i Dennert G. : "Reorientation of the mocrotubule organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binging to lysable target cells". J.Immunol.1984,133,2762.
- 82.Kuypers i D.Ross : "Leucocyte membrane adhesion proteins . LFA-1, iCR3 and p150,95 : a review of functional and regulatory aspests". Res.Immunol.1989,140,461.
- 83.Lachman P.J. : "Are complement lysis and lymphocytotoxicity analogous?" Nature (London) 1983, 305,473.
- 84.Landry J., Samson S., Chretien P. : "Hyperthermia-induced cell death, thermotolerance, and heat shock proteins in normal, respiration-deficient and glycolysis-deficient Chinease Hamster". Cancer Res.1986,46,324.
- 85.Lanier L.L., Le A.M., Civin C.I., Likeri M.R., Phillips J.G. : "The relationship of CD16 (Leu 11) and Leu 19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes". J.Immunol.1986,136,4480.
- 86.Lanks K.W. : "Modulators of the eucaryotic heat shock

- response". *Exptl.Cell.Res.*1986,165,1.
- 87.La Thangue N.B. : "A major heat-shock protein defined by a monoclonal antibody". *EMBO J.* 1984,3,1871.
- 88.Lee A.S. : "Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells". *Trends. Biochem.Sci.*1987,12,20.
- 89.Leung K.H. i Ip M.M. : " Regulation of rat natural killing. I. Inhibition of cytolysis and activation by protein synthesis inhibitors". *Int.J.Immunopharmac.*1985,7,857.
- 90.Leureaux P.G., Herendeen S.L., Bloch P., Neidhardt F. : "Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E.coli* following temperature shifts". *Cell* 1978,13,427.
- 91.Lewis M.I. i Pelham H.R.B. : "Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70 kd heat shock protein". *EMBO J.*1985,4,3137.
- 92.Li G.C. i Hahn G.M. : "Adaptation to different growth temperatures modifies some mammalian cell survival responses". *Exp.Cell.Res.*1980,128,475.
- 93.Lim L., Hall C., Leung T., Whetley S. : "68 kDe microtubule-associated protein with synaptosomal plasma membranes and with the *Drosophila* 70 kDe heat-shock protein". *Biochem.J.* 1984,224,1151.
- 94.Lindquist S.: "The heat shock response". *Annu .Rev. Biochem.* 1986,55,1151.
- 95.Liu C-C., Steffen M., King F., Young J.D-E. : "Identification, isolation and characterization of a novel cytotoxin in murine cytolytic lymphocytes". *Cell*

- 1987,51,393.
- 96.Lotz W.G. i Michaelson S.M. : "Temperature and corticosterone relationships in microwave-exposed rats". J.Appl.Physiol.: Respirat.Environ.Exercise.Physiol.1978,44,438.
- 97.Lotzova E.: "Nk cell role in regulation of the growth and functions of hemopoietic and lymphoid cells". w Lotzova E i Herberman R.B.(red) : "Immunobiology of natural killer cells" tom II,89-105, CRC Press Boca Raton 1987.
- 98.Lotzova E. i Ades E.W. : "Natural killer cells : definition, heterogeneity, lytic mechanism, functions and chemical application". Nat.Immun.Cell.Growth.Regul.1989,8,1.
- 99.Lukomska B., Olszewski W.L., Ryffa T., Ziolkowska A., Sadowska D.: "Liver sinusoidal blood containing natural killer-like cells". Scand.J.Immunol.1989,29,239.
- 100.Lukomska B., Ryffa T., Olszewski W.L., Engeset A.: "Natural killer lymphocytes in rat liver sinusoidal blood". Lymphology 1983,16,202.
- 101.Lukomska B. i Olszewski W.L. : "Immunologic characteristics of cells in the portal system : high natural cytotoxicity". Eur.Surg.Res.1981,13,52.
- 102.Magun B.E. i Feunie C.W. : "Effects of hyperthermia on binding, internalization and degradation of epidermal growth factor". Radiat.Res.1981,86,133.
- 103.Malacarne P., Nielsen I., Gualanadi M., Guerra G., Ambroso G., Marzola M. : " Effect of hydrocortisone on human peripheral blood populations ". EOS J.Immunol. Immunopharmacol.1988,8,257.

104. Malter M., Friedrich E., Suss R. : "Liver as a tumor cell killing organ : Kupffer cells and natural killers". *Canc. Res.* 1986, 46, 3055.
105. Marmor J.B., Nager C., Hahn G.M. : "Tumor regression and immune recognition after ultrasound heating". *Radiat. Res.* 1977, 70, 633.
106. Masson D. i Tschopp J. : "Isolation of a lytic pore-forming protein (perforin) from cytolytic T lymphocytes". *J. Biol. Chem.* 1985, 260, 9069.
107. Matera L., Cardoso E., Vegila F., Cesano A., Bellone G., Vuolo A., Molinatti G-M. : "Effect of cortisol on the native and in vitro induced non-MHC restricted cytotoxicity of large granular lymphocytes". *J. Clin. Lab. Immunol.* 1988, 27, 77.
108. Mc Coy J.L., Herberman R.B., Rosenberg E.B., Donkey F.C., Levine P.H., Alford C. : "⁵¹Chromium release assay for cell-mediated cytotoxicity of human leukemia and lymphoid tissue-culture cells". *Natl. Canc. Inst. Monogr.* 1973, 37, 59.
109. Mc Vicar D.W., Merchant R.E., Merchant L.H., Young H.F. : "Corticosteroids inhibit the generation of lymphokine-activated killer activity in vitro". *Canc. Immunol. Immunother.* 1989, 29, 211.
110. Minton K.W., Karmin P., Hahn G.M, Minton A.P. : "Nonspecific stabilization of stress-susceptible proteins by stress-resistant proteins : a model for the biological role of hsp". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, 79, 7107.
- 111 Mitchell H.K., Petersen N.S., Bezin C.H. : "Self-degradation

- of heat shock proteins". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985,82,4969.
- 112.Mivechi N.F. : "Heat-sensitivity, thermotolerance and profile of heat shock synthesis of human myelogenous leukemias".Cancer Res.1989,49,1954.
- 113.Mivechi N.F. i Ogilvie P.D. : "Effects of heat-shock proteins (Mr 70.000) on protein and DNA synthesis at elevated temperatures in vitro ". Cancer Res.1989,49, 1492.
- 114.Mondovi B., Strom R., Rotilio G., Agro A., Cavaliere R., Rossi-Fanelli A.:"The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cell. I.Studies on cellular respiration". Eur.J.Cancer 1969,5,129.
- 115.Moricca G., Cavaliere R., Bigotti A., Colistio F. : "Hyperthermic treatment of tumors. Experimental and clinical observations". Recent Results in Cancer Res. red. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1977,NY 59,112.
- 116.Morse T.D., Souliman S., Chapman I.V. : "Hyperthermia-induced fluidity changes in normal and transformed fibroblasts". Zagadnienia biofizyki współczesnej 1988,13,5.
- 117.Muller-Eberhard H.J. : "The membrane attack complex of complement". Annu.Rev.Immunol.1986,4,503.
- 118.Munro S. i Pelham H.R.B. : "An hsp 70 like protein in the ER : identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein". Cell 1986,46,291.

119. Nair M.P.N. i Schwartz S.A. : "Immunomodulatory effects of corticosteroids on natural killer and antibody dependent cellular cytotoxic activities of human lymphocytes". J.Immunol.1984,132,968.
120. Neidhard F.C., van Bogelen R.A., Vanghn V. : "The genetics and regulation of the heat shock proteins". Annu.Rev.Genet.1984,18,295.
121. Neville A.J., Sander D.N. : "Whole body hyperthermia (41-42°C) induces Interleukin-1 in vivo". Lymphokine Res. 1988,7,201.
122. Nishimura Y., Jo S., Akuta K., Masunaga S., Fushiki M., Hiraoka M., Takahashi M., Abe M. : "Histological analysis of the effect of hyperthermia on normal rabbit hepatic vasculature". Cancer Res.1989,49,4295.
123. Okamura Y., Ishibashi H., Shirahama M., Kurokawa S., Kudo J., Okubo H., Niho Y : " Kupffer cells modulate NK cell activity in vitro by producing prostaglandins". Cell.Immunol.1987,107,89.
124. Onsrud M. : "Effects of hyperthermia on human natural killer cells". Acta.path.microbiol.immunol.scand.Sect.C.1983,91,1.
125. Onsrud M i Thorsby E. : "Influence of in vivo hydrocortisone on some human blood lymphocyte subpopulations. I. Effect on natural killer cell activity". Scand.J.Immunol.1981,13,573.
126. Ortaldo J.R., Winkler-Pichett R., Morgan A.Ch., Woodhouse C., Kantor R., Reynolds C.W. : "Analysis of rat natural killer cytotoxic factor (NKCF) produced by rat NK cell lines and the production of a murine monoclonal antibody

- that neutralizes NKCF". J. Immunol. 1987, 139, 3159.
127. Pelham H.R.B. : "Speculations on the functions of the Major Heat Shock and Glucose-regulated Proteins". Cell 1986, 46, 959.
128. Pelham H.R.B. : "Coming in from the cold". Nature 1988, 332, 776.
129. Pelham H.R.B. : "Hsp 70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock". EMBO J. 1984, 3, 3095.
130. Persechini P.M., Liu C-C, Jiang S., Young J.D-E : "The lymphocyte pore-forming protein perforin is associated with granules by a pH-dependent mechanism". Immunol. Letters 1989, 22, 23.
131. Pistoia V., Cozzolino F., Ferrarini M. : "More about NK cells and regulation of B cell activity". Immunology Today 1985, 6, 287.
132. Podack E.R. : "Molecular mechanism of lymphocyte mediated tumor lysis". Immunology Today 1987, 6, 21.
133. Podack E.R., Young J.D-E, Cohn Z.A. : "Isolation, biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 82, 8629.
134. Pohajdak B., Gomez J., Orr E.W., Khail N., Talgoy M., Greenberg A.H. : "Chemotaxis of large granular lymphocytes". J. Immunol. 1986, 136, 278.
135. Polla B.S. : "A role for heat shock proteins in inflammation". Immunology Today 1988, 9, 134.

136. Praaning - van Dalen D.P., De Leeuw M.A., Brouwer A., De
Ruiter C.F., Knook D.L. : "Ultrastructural and biochemical
characterization of endocytic mechanisms in rat liver
Kupffer and endothelial cells". w Knook DL i Wisse E. (ed)
"Sinusoidal liver cells". Elsevier Biomedical Press,
Amsterdam 1982, 271.
137. Ramos O.F., Patarroyo M., Yefenof E., Klein E. :
"Requirement of leucocytic cell adhesion molecules
(CD11a-c/CD18) in the enhanced NK lysis of iC_{3b} -opsonized
targets". J. Immunol. 1989, 141, 4100.
138. Reynolds C.W. i Ortaldo J.R. : "Natural killer activity: the
definition of a function rather than a cell type". Immunol.
Today 1987, 8, 172.
139. Reynolds C.W., Timonen T., Herberman R.B. : "Natural killer
(NK) cell activity in the rat. Isolation and
characterization of the effector cells". J. Immunol. 1981, 127,
282.
140. Ricardi C., Balozzari T., Santori A., Herberman R.B.,
Cesarini C : "Transfer to cyclophosphamide-treated mice of
natural killer cells and in vivo natural reactivity against
tumors". J. Immunol. 1981, 126, 1284.
141. Ricardi C., Santoni A., Barlozzari T., Puccetti P.,
Herberman R.B. : "In vivo natural reactivity of mice against
tumor cells". Int. J. Cancer 1980, 25, 475.
142. Ricardi C., Migliorati : "Generation of NK cells from fetal
liver". J. Immunol. Res. 1989, 1, 27.
143. Ritossa F. : "A new puffing pattern induced by temperature

- shock and DNP in *Drosophila*". *Experientia* 1962,18,571.
144. Ritossa F.: "Behaviour of RNA and DNA synthesis at the puff level in salivary gland chromosomes in *Drosophila*". *Exptl. Cell. Res.* 1964,36,515.
145. Roberts N.J. Jr i Steigbigel R.T. : "Hyperthermia and human leucocyte functions : effects on response to mitogen and antigen and bactericidal capacity of monocytes and neutrophils". *Infect. Immun.* 1977,18,673.
146. Robins J.H., Stevens R.A., Smitt C.L., Peterson C., Maritn P.A. : "A hyperthermia study of differential sensitivity and thermotolerance in AKR murine leukemia and normal bone marrow cells". *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1988,14,979.
147. Roder J.C., Rosen A., Fenyó E.M., Troyi F.A. : "Target - effector interaction in the NK system, the isolation of target structures". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979,76,1405.
148. Rogers S., Wells R., Rechsteiner M. : "Amino acid sequence common to rapidly degraded protein : The PEST hypethesis". *Science* 1986,234,364.
149. Rolstad B., Herberman R.B., Reynolds C.W. : "Natural killer cell activity in the rat. V. The circulation patterns and tissue localization of peripheral blood large granular lymphocytes (LGL)". *J. Immunol.* 1986,136,2800.
150. Roozmond R.C., Merissen M., Urli D.C., Bonavida B. : "Effect of altered membrane structure on NK cell-mediated cytotoxicity. III. Decreased succceptibility of natural killer cytotoxic factor (NKCF) and suppression of NKCF

- 150 release by membrane rigidification". J.Immunol.1987,139,
1739.
- 151.Rosenau W.: " Target cell destruction ". Fed.Proc.Acad.Sci.
150 USA 1968,27,34.
- 152.Roszkowski W. : "Ocena działania hipertermii na układ
immunologiczny ze szczególnym uwzględnieniem odporności
151 przeciwnowotworowej". Post.Hig.Med.Dośw. 1981,35,451.
- 153.Roszkowski W., Wrembel J.K., Roszkowski K., Janiak M.,
Szmigielski S. : " Effects of whole - body microwave
hyperthermia on delayed cutaneous hypersensitivity in
152 tumorbearing mice". J.Canc.Res.Clin.Oncol.1980,97,23.
- 154.Russel J.H. i Coggeshall K.M. : "The role of protein kinase
C in the cytotoxic T-cell lytic response".
153 Ann.Inst.Pasteur/Immunol.1987,138,320.
- 155.Rygaard J. i Povlsen C.O. : " The nude mice vs the
hypothesis of immunological surveillance". Transpl.Rev.
1976,28,43.
- 156.Sadowska-Szablisy D., Lukomska B., Olszewski W.L. :
154 "Suppressive effect of cellular and humoral liver-derived
factors".7 International Congress of Immunology 1989,
155 Berlin Zachodni (poster).
- 157.Salup P.R. i Herberman R.B.: "Role of natural killer cells
in control of metastases and for therapy of murine cancer".
156 EOS. J.Immunol.Immunopharmacol.1988,8,151.
- 158.Sanderson C.J. : "The mechanism of T cell mediated
cytotoxicity. I. The release of different cell components".
Proc.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.1976,192,221.

159. Schechter M., Stowe S.M., Moroson H. : "Effects of hyperthermia on primary and metastatic tumor growth and host immune responses in rat". *Cancer Res.* 1978, 38, 498.
160. Schlesinger M.J., Ashburner M., Tissieres A. (red) : "Heat shock : from Bacteri to man". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., 1982.
161. Shen R.N., Hornback N.B., Shidma H., Shupe R.E., Brahmi Z. : "Whole-body hyperthermia decreases lung metastases in lung tumor-bearing mice, possibly via a mechanism involving natural killer cells". *J. Clin. Immunol.* 1987, 7, 246.
162. Song C.W. : "Blood flow in tumors and normal tissues in hyperthermia". w " Hyperthermia in cancer therapy " ed Strom F.K. 1983 Boston G.K.Hall Medical Publishers.
163. Southgate R., Mirault M-E., Ayme A., Tissieres A. : "Organization, sequences and induction of heat shock genes" str 3-30 w "Changes in Eucaryotic Gene Expression in Response to Environmental stress" Attkinson B.G. i Waldman D.B. red 1984 Academic Press New York.
164. Spradling A., Pardue M.L., Perman S. : "Messenger RNA in heat-shocked Drosophila cells". *J. Mol. Biol.* 1977, 109, 559.
165. Takayama H i Sitkovsky M.V. : "Antigen receptor regulated exocytosis in cytotoxic T lymphocytes". *J. Exp. Med.* 1987, 166, 725.
166. Theodorakis N.G., Morimoto R.J. : "Posttranslational regulation of hsp 70 expression in human cells : effects of heat shock, inhibition of protein synthesis and adenovirus infection on translation and mRNA stability".

- Mol.Cell.Biol.1987,7,4357.
- 167.Timonen T., Ortaldo J.R., Herberman R.B.:"Characterization of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells". J.Exp.Med.1981,153,569.
- 168.Timonen T., Patarroyo M., Gahmberg C.G. : "CD11a-c/CD18 and CP84 (LB-2) adhesion molecules on human large granular lymphocytes and their participation in natural killing". J.Immunol.1988,141,1041.
- 169.Tissieres A., Mitchell H.K., Tracy U.M. : "Protein synthesis in a salivary glands in *Drosophila melanogaster* : relation to chromosome puffs". J.Mol.Biol.1974,84,389.
- 170.Tomasovic S.P., Barta M., Klostergaard J. : "Temporal dependence of hyperthermic augmentation of macrophage-TNF production and tumor cell-TNF sensitization". Int.J. Hyperthermia 1989,5,625.
- 171.Trincheri G. i Perussia B. : "Biology of Disease. Human natural killer cells : biologic and pathogenic aspects". Lab.Invest.1984,50,489.
- 172.Trinchieri G., Murphy M., Cuturi M.C., Anegon I., Perussia B. : "Control of hematopoietic progenitor cells by natural killer cells". w "Functions of the natural immune system". p.247-266, ed C.W.Reynolds i R.W.Wiltrout, Plenum Publ. Corp.1989.
- 173.Tschopp J., Masson D., Stanley K.K.: "Structural/functional similarity between proteins involved in complement and cytotoxic T lymphocyte-mediated cytotoxicity".Nature (London) 1986,322,831.

174. Tschopp J. i Nabholz M. : "The role of cytoplasmic granule components in cytotoxic lymphocyte-mediated cytotoxicity". Ann. Inst. Pasteur/Immunol. 1987, 138, 290.
175. Ungewickell E. : "The 70 kd mammalian heat shock proteins are structurally and functionally related to the uncoating protein that releases clathrin triskelions from coated vesicles". EMBO J. 1985, 4, 3385.
176. Vassalli J.D. i Silverstein S.C. : "Colcemid and related alkaloids inhibit lectin mediated stimulation of RNA synthesis in human peripheral blood lymphocytes". Exp. Cell. Res. 1978, 106, 95.
177. Velazquez J.M. i Lindquist S. : "Hsp 70 : nuclear concentration during environmental stress and endoplasmic stage during recovery". Cell 1984, 36, 655.
178. Voellmy R. : "The heat shock genes : a family of highly conserved genes with a superbly complex expression patterns". BioEssays 1984, 1, 213.
179. Voellmy R., Ahmed A., Schiller P., Bromley P., Runger D. : "Isolation and functional analysis of a human 70.000-dalton heat shock protein gene segment". Proc. Natl. Acad. Sci USA 1985, 82, 4949.
180. Waterman F.M., Nehriger R.E., Moylan III D.J., Leeper D.B. : "Response of human tumor blood flow to local hyperthermia". Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys. 1987, 13, 75.
181. Weiss L., Ward P.M., Holmes J.C. : "Liver to lung traffic of cancer cells". Int. J. Canc. 1983, 32, 79.
182. Weissler J.C., Yarbrough W.C. Jr., Toews G.B., Nicord L.P. :

- "Human natural killer cells enhance a mixed leucocyte reaction". J.Leucocyte Biol.1988,43,291.
- 183.Welch W.J. I Suhan J.P. : " Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress". J.Cell.Biol.1986,103,2035.
- 184.Welch W.J., Mizzen L.A., Arrigo A.P. : "Structure and function of mammalian stress proteins". str 187-202 w "Stress-induced proteins" Pardue M.L., Feramisco J.R., Lindquist S. ed 1989 Alan R.Liss Inc. New York.
- 185.Wiltrout R.H., Matheson B.J., Tahnadge J.E., Reynolds C.W., Zhang S-R., Herberman R.B., Ortaldo J.R. : "Augmentation of organ associated natural killer by biological response modifiers". J.Exp.Med.1984,160,1431.
- 186.Wisse E., van't Noordende J.M., van der Meulen J., Daems W.Th. : "The pit cells : description of a new type of cell occuring in rat liver sinusoidal and peripheral blood".Cell.Tissue Res.1976,173,423.
- 187.Wisse E., De Zanger R., Jacobs R : "Scanning EM obserwations on rat liver sinusoids relevant to microcirculation and transport process". J.Clin.Electron Microcopy 1983,16,427.
- 188.Wu B., Hurt C., Morimoto R. : "Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein Hsp 70". Mol.Cell.Biol.1985,5,330.
- 189.Yerusalami A. : "Influence on metastatic spread of whole body or local tumor hyprthermia". Eur.J.Cancer 1976,12, 455.
- 190.Young J.D-E. i Cohn Z.A. : "Cellular and humoral mechanisms

of cytotoxicity : structural and functional analogies".

Adv.Immunol.1987,41,269.

191.Young J.D-E., Hengartner H., Podack E.R., Cohn Z.A.:

:"Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity ".Cell 1986,44,849.

192.Xiao H. i Lis J.T.:"Germline transformation used to define

key features of heat-shock response elements". Science 1988,239,1139.

Con A

⁵¹Cr

CTL

DNA

EGF

EPF

F₁

FeR

W-2

8. SPIS SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

AFAAF	- alkaliczna fosfataza skierowana przeciwko alkalicznej fosfatazie
ATP	- adenosine triphosphate - adenozyno trójfosforan
C ₅₋₉	- białka wchodzące w skład dopełniacza
CD	- cluster of differentiation - grupa antygenów związanych z różnicowaniem się/dojrzywaniem komórki
Con A	- concanavalin A - konkanawalina A
⁵¹ Cr	- radioaktywny izotop chromu 51
CTL	- cytotoxic T lymphocyte - limfocyt T cytotoksyczny
DNA	- deoxyribonucleic acid - kwas dezoksyrybonukleinowy
EGF	- epidermal growth factor - czynnik wzrostu komórek nabłonkowych
EPF	- endothelial proliferating factor - czynnik wywołujący proliferację komórek śródbłonna
F ₁	- pierwsze pokolenie mieszańców
FcR	- receptor dla fragmentu Fc immunoglobuliny
H-2	- główny kompleks genów kodujących silne antygeny zgodności tkankowej u myszy

HNK-1	- antygen obecny na komórkach NK i K
HSP	- heat shock proteins - białko szoku cieplnego
IFN- α , β , γ	- interferon typu α , β , γ
IL-1-6	- interleukina 1-6
K562	- ludzkie komórki białaczki erytroblastycznej (NK wrażliwe)
L3T4	- antygen obecny na powierzchni komórek T pomocniczych
LGL	- large granular lymphocytes - duże granularne limfocyty o aktywności naturalnie cytotoksycznej
LFA-1	- leucocyte function associated antigen- antygen obecny na powierzchni leukocytów
Leu 19	- antygen obecny na powierzchni komórek NK i limfocytów T cytotoksycznych
LPS	- lipopolisacharyd
Lyt 1-5	- antygeny obecne na powierzchni limfocytów T
MGG	- barwienie metodą May-Grunwalda Giemsy
MHC	- major histocompatibility complex - główny kompleks genów kodujących silne antygeny zgodności tkankowej
MLC	- mixed lymphocyte culture - mieszana hodowla limfocytów
NK	- komórki o aktywności naturalnie

cytotoksycznej

NK 1.1 ,NK 1.2	- antygeny obecna na powierzchni komórek NK
PGE	- prostaglandyny
PHA	- phytohaemagglutinin - fitohemaglutynina
RNA	- ribonucleic acid - kwas rybonukleinowy
TAF	- tissue angiogenic factor - tkankowy czynnik angiogenezy
TCR	- T cell antigen receptor - receptor dla antygeny na powierzchni limfocytów T
TNF	- tumor necrosis factor - czynnik martwicy guza nowotworowego
YAC-1	- mysie komórki chłoniaka (NK wrażliwe)

9. TABELE I WYKRESY

rodzaj

komórki

całkowita

liczba

leukocytów

wymiarowa

z wątroby

$\times 10^6/g$

liczba

leukocytów

w krwi

tytuł wrot

$\times 10^6/cm^3$

liczba

leukocytów

w krwi

tytuł czere

$\times 10^6/cm^3$

całkowita

liczba

leukocytów

ze śledziony

$\times 10^6/g$

rodzaj

norma

Tabela 1. Wpływ 4-godzinnej i 8-godzinnej hipertermii in vivo na liczebność leukocytów.

źródło komórek	liczba leukocytów				
	N po 4 godz.	H po 4 godz.	N po 8 godz.	H po 8 godz.	norma
całkowita liczba leukocytów wypłukiwanych z wątroby $\times 10^6/g$	1.97±0.5	1.15±0.6	2.2±0.6	2.0±0.6	2.5±1.5
liczba leukocytów we krwi z żyły wrotnej $\times 10^6/cm^3$	2.85±0.85	3.0±0.81	6.6±1.4	5.6±1.0	6.5±1.0
liczba leukocytów we krwi z żyły czczej $\times 10^6/cm^3$	1.15±0.25 *	2.9±0.57	4.4±1.3	3.4±0.8	4.5±1.5
całkowita liczba leukocytów ze śledziony $\times 10^6/g$	950±100 *	1410±160	1130±210	1080±190	2000±350

n=6 * - oznacza statystycznie istotne różnice przy $p \leq 0.05$

N - normotermia H - hipertermia

Tabela 2. Wpływ 4 godzinnej hipertermii in vivo na odsetek leukocytów.

źródło komórek	%L	%LGL	%G	%M	%B
perfuzat wątroby					
N	86.0±2.1	7.0±0.8	0	6.0±2.0	1.0±0.1
		*			
H	80.0±0.7	17.0±1.0	0.5±0.2	2.0±0.3	0.5±0.1
krew z żyły wrotnej					
N	66.0±3.5	1.0±0.6	28.5±8.5	1.0±0.8	0
	*	*	*		
H	49.5±2.1	5.5±0.5	39.9±5.0	2.5±0.9	0.25±0.1
krew z żyły czczej					
N	62.5±2.5	3.5±1.0	28.0±3.0	5.0±1.0	0
	*		*		
H	47.5±7.8	3.5±0.6	40.0±9.0	4.5±0.5	0.5±0.4
śledziona					
N	97.0±1.0	1.5±0.3	0	1.5±0.4	0
H	97.5±1.5	1.0±0.5	0	2.0±0.6	0

* - oznacza statystycznie istotne różnice n=3 p≤0.05

N - normotermia

M - monocyty

L - limfocyty

H - hipertermia

B - blasty

G - granulocyty

Tabela 3. Wpływ 8 godzinnej hipertermii in vivo na odsetek leukocytów.

źródło komórek	%L	%LGL	%G	%M	%B
perfuzat wątroby					
N	80.4±6.3	12.4±3.8	1.4±1.1	4.8±3.0	0.8±0.2
		*			
H	69.0±6.2	23.0±4.6	0.7±0.5	2.3±1.1	0.2±0.1
krew z żyły wrotnej					
N	70.0±5.8	2.4±0.4	20.0±3.2	6.2±1.7	0
		*	*		
H	56.0±9.0	6.5±2.9	34.0±1.0	3.7±1.7	0
krew z żyły czczej					
N	68.4±7.7	4.6±1.6	21.0±4.5	7.0±4.5	0.2±0.1
			*		
H	58.7±4.2	4.5±1.1	33.3±3.7	3.5±1.1	0.2±0.15
śledziona					
N	94.0±2.2	4.2±1.0	0	2.6±0.8	0
H	96.0±2.1	3.2±1.4	0	2.7±1.4	0

* - statystycznie istotne różnice n=6 p≤0.05

N - normotermia M- monocyty L - limfocyty
H - hipertermia B - blasty G - granulocyty

Tabela 4. Wpływ 4-godzinnej hipertermii in vivo na liczbę LGL i aktywność NK.

źródło komórek	% LGL	%ctx E:T=20:1	%ctx E:T=10:1	%ctx E:T=5:1
perfuzat wątroby				
N	23.9±5.7 *	59.9±12.8 *	51.0±9.1 *	42.1±12.6
H	37.3±4.0	44.8±4.1	38.8±5.1	33.4±10.8
krew z żyły wrotnej				
N	10.2±0.7 *	16.2±1.6 *	13.0±4.9	11.2±6.5
H	21.0±0.4	32.1±10.0	19.0±8.6	15.5±8.8
krew z żyły czczej				
N	15.7±6.0	29.0±11.0	19.7±5.6	17.4±5.0
H	14.0±3.0	23.9±8.2	21.1±7.9	15.6±8.5
śledziona				
N	7.6±2.0	24.9±8.1	21.0±8.9	16.1±8.1
H	6.0±2.3	28.2±13.6	21.5±10.1	17.9±12.5

* - oznacza statystycznie istotne różnice $p \leq 0.05$ $n=5$

N - normotermia

H - hipertermia

Tabela 5. Wpływ 8-godzinnej hipertermii in vivo na liczbę LGL i aktywność NK.

źródło komórek	% LGL	%ctx E:T=20:1	%ctx E:T=10:1	%ctx E:T=5:1
perfuzat wątroby				
N	23.6±3.0	51.5±8.3	42.1±9.6	33.4±9.0
	*	*	*	*
H	35.6±6.0	35.5±8.7	28.4±5.3	23.0±4.2
krew z żyły wrotnej				
N	10.0±3.2	39.2±15.2	34.7±14.2	27.9±10.3
	*			
H	18.6±4.8	40.2±18.2	32.5±15.1	29.6±15.6
krew z żyły czczej				
N	8.7±2.6	35.4±16.8	31.4±17.9	23.6±4.3
H	10.2±2.5	35.2±18.4	32.9±16.4	28.5±16.4
śledziona				
N	5.5±1.0	22.3±10.5	14.7±6.8	11.5±8.8
H	5.8±2.4	16.2±13.7	12.8±12.1	8.9±10.0

* - oznacza istotne statystycznie różnice $p \leq 0.05$ $n=5$

N - normotermia H - hipertermia

Tabela 6. Wpływ 4-godzinnej hipertermii in vivo na liczebność poszczególnych subpopulacji komórek jednojądrowych.

źródło komórek	%CD3 ⁺	%CD4 ⁺	%CD8 ⁺	%CD5 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
perfuzat wątroby					
N	55.8±8.8	27.2±13.8	40.4±4.7	51.6±1.5	0.68±0.26
H	49.7±5.0	23.9±5.5	43.5±4.2	45.2±9.3	0.50±0.10
krew z żyły wrotnej					
N	58.4±6.0	34.8±7.7	25.0±6.6	52.6±4.5	1.94±0.49
H	55.3±6.6	25.3±8.0	30.0±8.1	47.6±6.8	0.78±0.20
krew z żyły czczej					
N	57.8±10.5	39.9±6.9	21.1±4.4	55.6±6.0	1.97±0.44
H	58.0±12.7	28.9±9.8	26.8±7.7	49.5±6.5	1.16±0.16
śledziona					
N	60.0±4.8	35.2±10.0	24.4±4.2	55.2±2.4	1.52±0.76
H	55.6±8.5	29.8±2.6	22.7±4.7	52.6±5.8	1.30±0.37

* - oznacza statystycznie istotne różnice przy $p \leq 0.05$ $n=5$

N - normotermia H - hipertermia

Tabela 7. Wpływ 8-godzinnej hipertermii in vivo na liczebność poszczególnych subpopulacji komórek jednojądrowych.

źródło komórek	%CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD5 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
perfuzat wątroby					
N	50.8±7.6	27.6±8.8	37.4±9.9	46.2±5.0	0.77±0.24
H	62.8±8.6	24.8±6.0	42.7±7.9	45.0±9.7	0.61±0.17
krew z żyły wrotnej					
N	69.5±5.2	37.0±5.3	32.8±11.2	55.0±7.8	1.28±0.38
H	64.0±7.3	41.2±5.3	32.6±10.7	48.0±9.8	1.34±0.50
krew z żyły czczej					
N	66.8±6.2	42.2±8.8	33.7±8.0	50.0±8.7	1.12±0.32
H	65.0±11.0	38.9±10.0	34.8±12.2	51.2±6.9	1.18±0.47
śledziona					
N	46.5±9.5	22.0±3.4	28.8±10.8	43.8±8.3	0.89±0.18
H	51.4±10.8	29.6±6.6	30.0±10.2	47.8±9.7	1.14±0.51

n=5

N - normotermia

H - hipertermia

Tabela 8. Wpływ 4-godzinnej hipertermii in vivo na eliminację in vivo komórek K562 znakowanych radioaktywnym izotopem jodu ^{125}J .

badany narząd	% podanej radioaktywności/1g masy narządu	
	NORMOTERMIA	HIPERTERMIA
krwinki	0.31±0.13	* 0.53±0.17
osocze	0.40±0.20	* 0.65±0.20
płuca	0.50±0.13	* 0.92±0.30
nerki	0.28±0.10	* 0.55±0.20
śledziona	0.31±0.11	* 0.90±0.34
wątroba	0.24±0.10	* 0.52±0.14
krezkowe węzły		
chłonne	0.17±0.07	* 0.49±0.28
kości udowe	0.13±0.05	* 0.33±0.16
kości podudzia	0.17±0.09	0.28±0.12

n=5 * - oznacza statystycznie istotne różnice $p \leq 0.05$

Tabela 9. Wpływ hipertermii in vitro na aktywność komórek NK.

źródło komórek	temperatura in vitro	% LGL	%ctx E:T=20:1	%ctx E:T=10:1	%ctx E:T=5:1
perfuzat wątroby	K	ND	41.3±3.8	34.7±5.2	26.0±7.3
	37°C	24.0±2.3	43.0±14.3	31.5±11.8	18.1±9.6
	39°C	24.0±2.2	37.0±18.3	32.2±18.1	20.0±13.4
	40°C	23.8±4.2	35.0±13.4	26.0±11.0	16.7±12.5
	41°C	22.0±1.8	13.0±10.0*	10.3±5.8*	8.2±7.8*
krew z żyły wrotnej	K	ND	19.0±2.5	20.3±6.6	14.0±1.0
	37°C	12.8±2.2	19.0±8.2	12.9±6.0	8.6±5.5
	39°C	13.2±2.8	16.0±4.0	12.6±4.5	5.9±3.3
	40°C	12.7±2.4	14.0±1.9	9.8±2.7	7.4±3.2
	41°C	12.3±2.6	9.4±3.6*	7.2±1.9*	5.6±2.6*
krew z żyły czczej	K	ND	24.0±3.8	17.3±3.0	15.0±2.4
	37°C	11.3±2.5	19.0±3.7	14.5±4.4	10.4±4.6
	39°C	10.5±2.1	18.0±2.6	12.5±5.7	9.4±4.9
	40°C	10.0±1.8	17.0±6.7	12.0±6.3	8.9±6.0
	41°C	10.0±1.5	7.6±3.7*	6.4±4.1*	4.5±2.5*
śledziony	K	ND	17.1±4.1	14.3±1.7	10.0±3.9
	37°C	4.5±1.2	11.8±6.3	9.2±5.9	6.7±4.0
	39°C	5.5±1.3	11.0±4.8	8.1±5.2	5.8±4.1
	40°C	5.2±1.2	10.0±4.9	7.2±4.8	4.5±3.8
	41°C	4.5±0.8	7.0±3.9*	5.6±3.1*	3.2±2.5*

* - oznacza statystycznie istotne różnice przy $p \leq 0.05$ $n=6$

K - komórki badane w teście natychmiast po izolacji

Tabela 10. Wpływ hipertermii in vitro na aktywność NK na poziomie pojedynczej komórki.

źródło komórek efektorowych /E/	% kompleksów z komórkami docelowymi /T/ K562	% martwych komórek docelowych w kompleksach E-T	% kompleksów z komórkami docelowymi /T/ YAC-1	% martwych komórek docelowych w kompleksach E-T
perfuzat wątroby				
N	8.25±0.8	35.0±4.48	15.2±2.2	39.8±3.6
	*		*	
H	3.0±0.94	30.1±8.0	4.0±0.7	26.2±7.4
krew z żyły wrotnej				
N	6.6±1.39	22.3±2.9	8.8±1.3	32.2±2.2
	*		*	
H	3.0±0.49	20.8±1.0	3.8±1.0	24.2±8.6
krew z żyły czczej				
N	5.9±0.4	25.0±6.0	9.2±1.2	31.6±3.6
	*		*	
H	2.4±0.26	23.3±5.3	3.7±0.47	27.8±5.9
śledziona				
N	3.4±1.5	18.8±8.0	6.0±1.1	23.6±2.7
			*	
H	1.75±0.25	20.9±5.3	3.2±0.44	16.2±10.0

* - oznacza statystycznie istotne różnice $p \leq 0.05$ $n=3$

N - normotermia H - hipertermia

Tabela 11. Wpływ hipertermii in vitro na reorientację aparatu Golgiego w komórce efektorowej.

źródło komórek efektorowych /E/	temperatura	%kompleksów komórek efektorowych z komórkami YAC-1 (E-T)	%kompleksów E-T w których widoczne jest przesunięcie aparatu Golgiego w komórce efektorowej
perfuzat wątroby	37°C	27.0±2.16	64.5±3.16
		*	
krew z żyły wrotnej	41°C	8.7±3.4	64.4±4.16
krew z żyły wrotnej	37°C	20.0±2.83	46.7±7.22
		*	
krew z żyły czczej	41°C	7.3±0.94	44.4±6.45
śledziona	37°C	18.4±1.02	39.3±3.3
		*	
śledziona	41°C	6.8±1.70	42.0±4.0
śledziona	37°C	6.7±1.14	22.2±3.16
		*	
	41°C	2.3±0.44	18.9±1.56

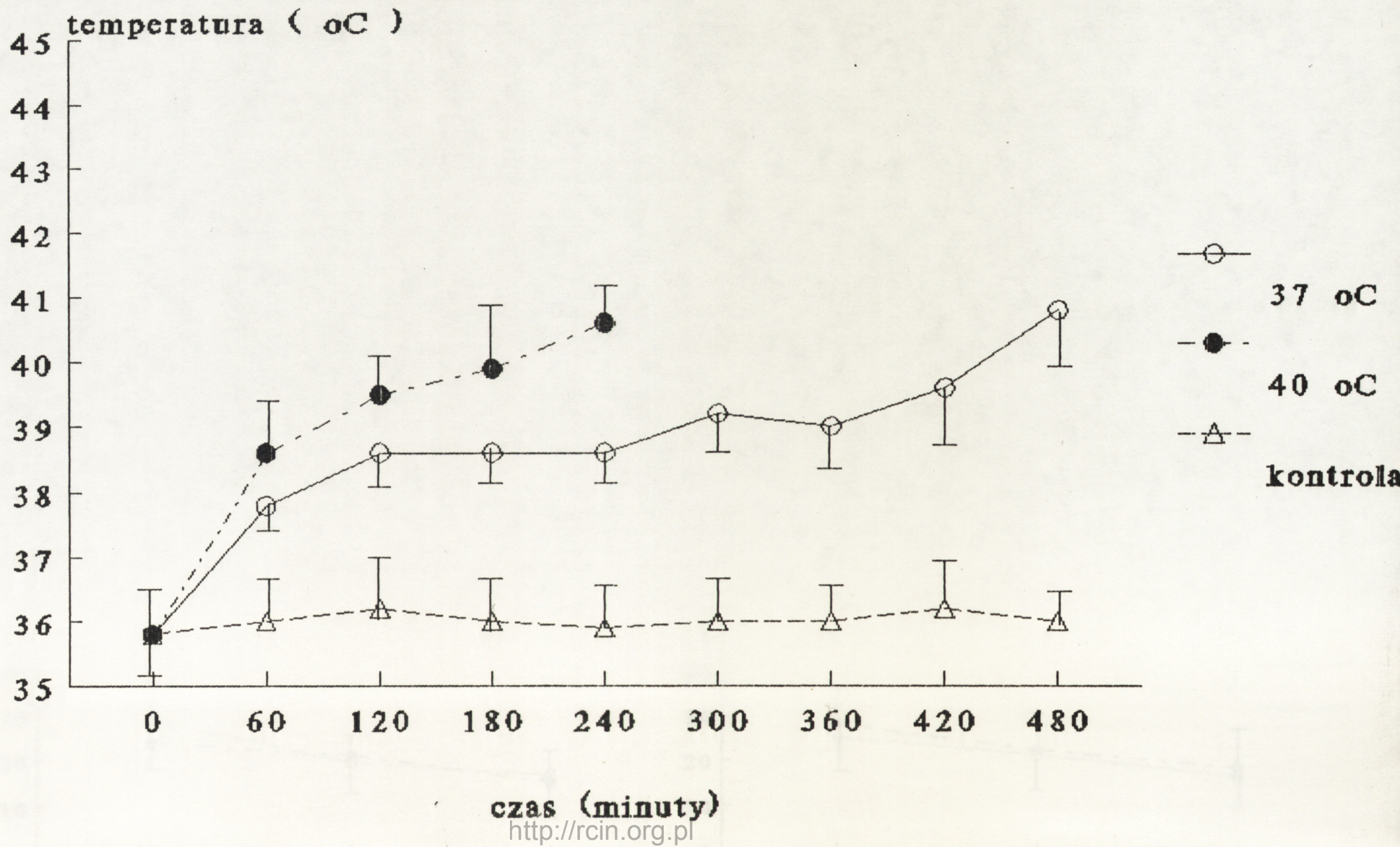
* - oznacza istotne statystycznie różnice $p \leq 0.05$ $n=3$

Tabela 12. Wpływ hipertermii in vitro na włączanie znakowanej urydyny w 25-godzinnej hodowli komórek jednojądrowych.

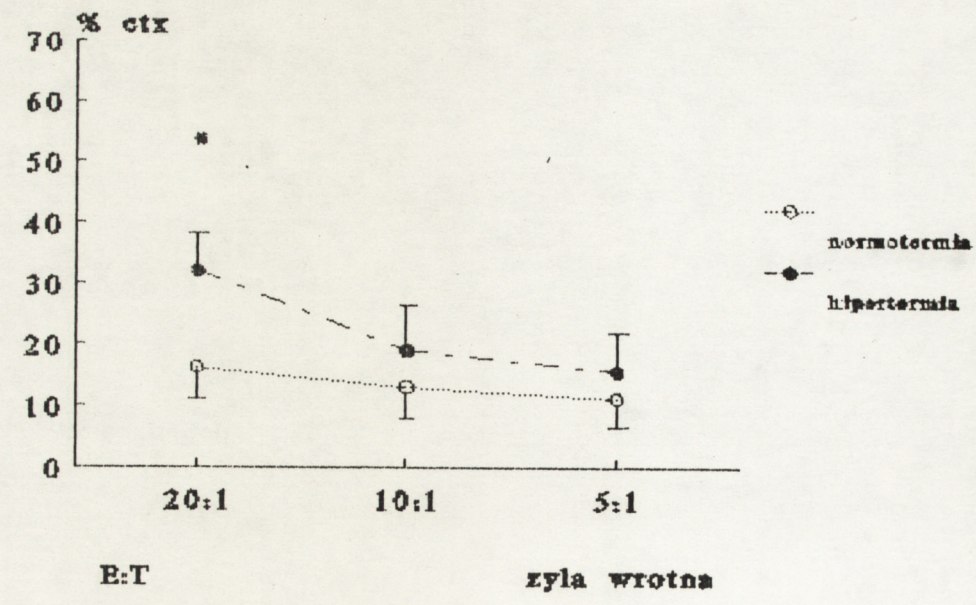
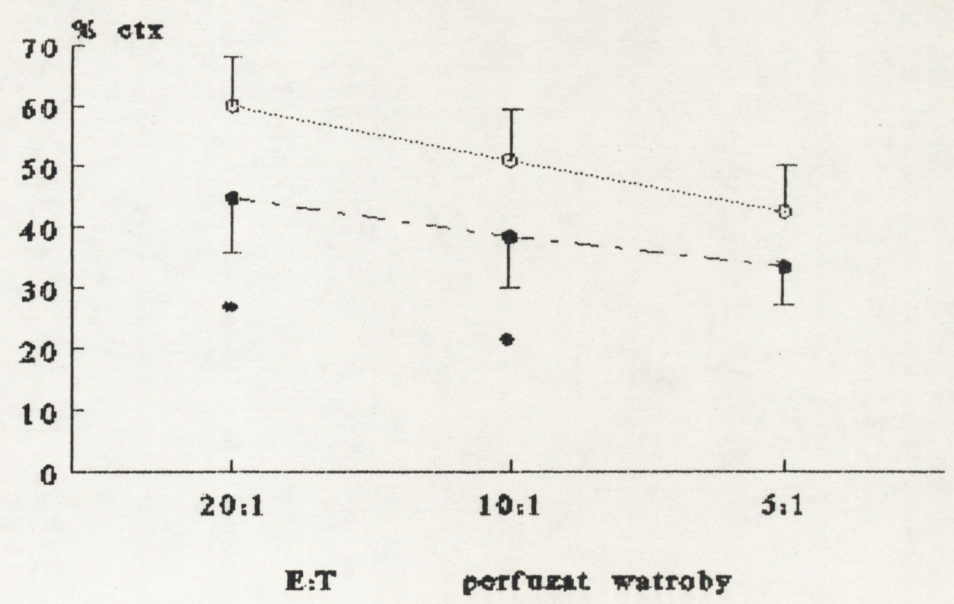
źródło komórek	temperatura	kontrola (cpm)	PHA (cpm)
perfuzat wątroby	37°C	1183±368	1893±1015
	41°C	1460±410	1574±292
krew z żyły wrotnej	37°C	1847±690	3100±1300
	41°C	849±449	1499±866
śledziona	37°C	2696±588	9204±2916
	41°C	1122±726	2936±1435

*- oznacza statystycznie istotne różnice $p \leq 0.05$ $n=3-5$

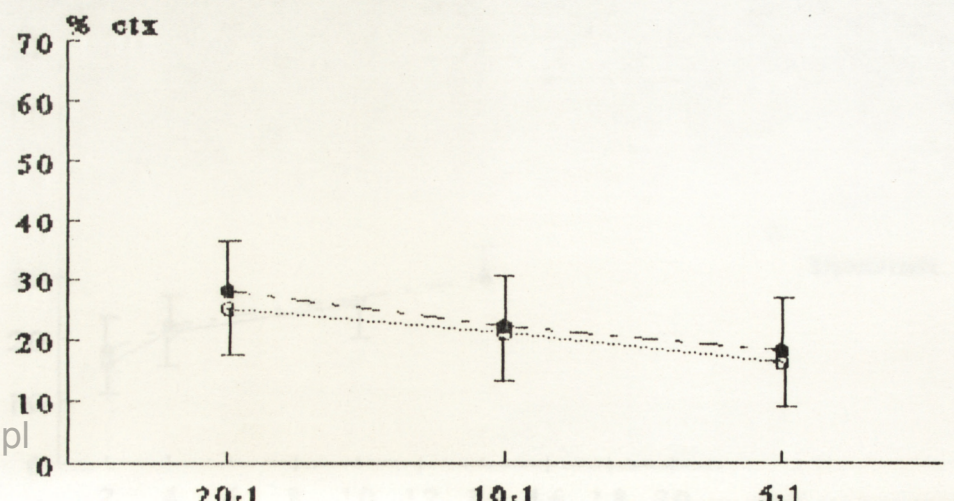
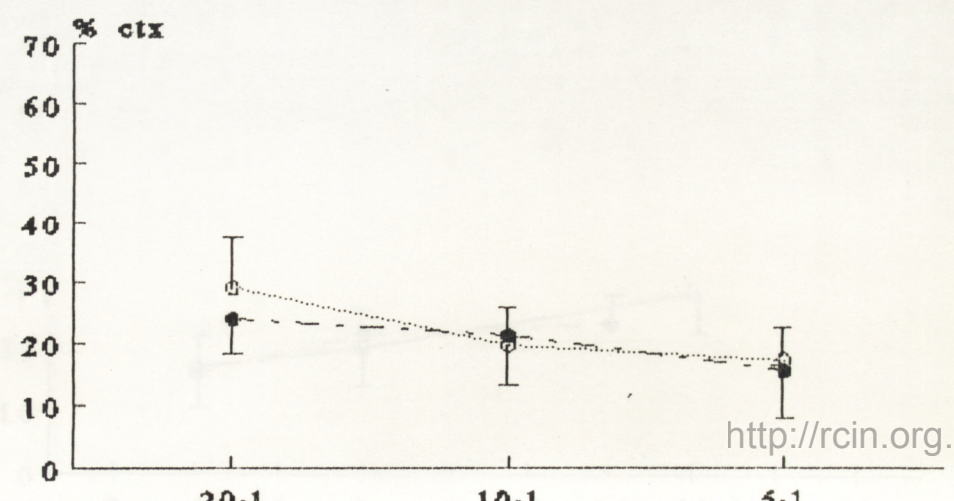
Wykres 1. WPLYW HIPERTERMII NA TEMPERATURE SZCZURA

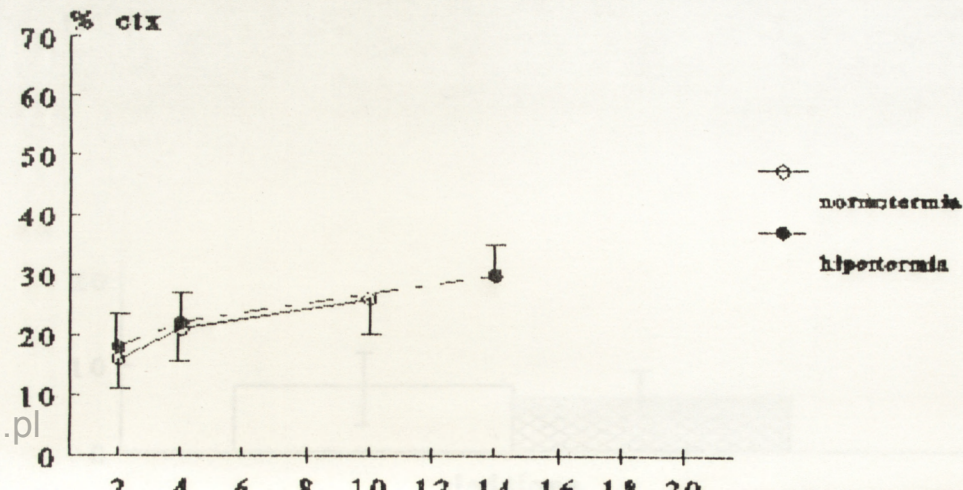
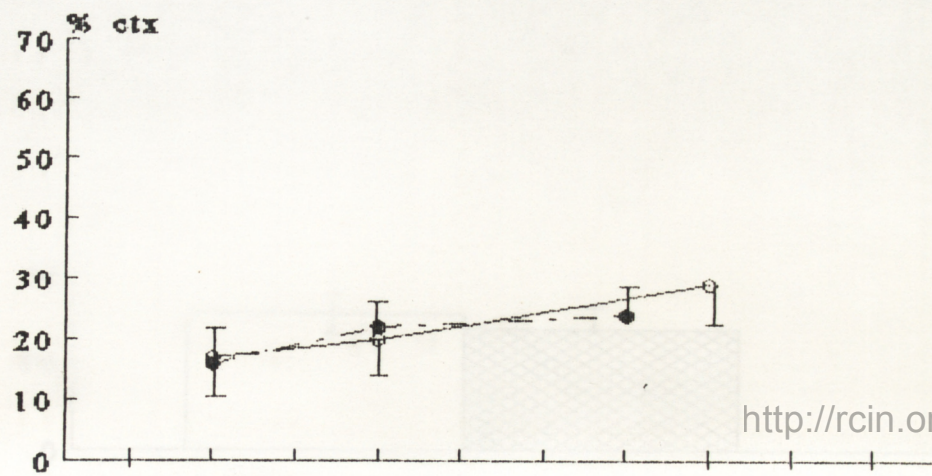
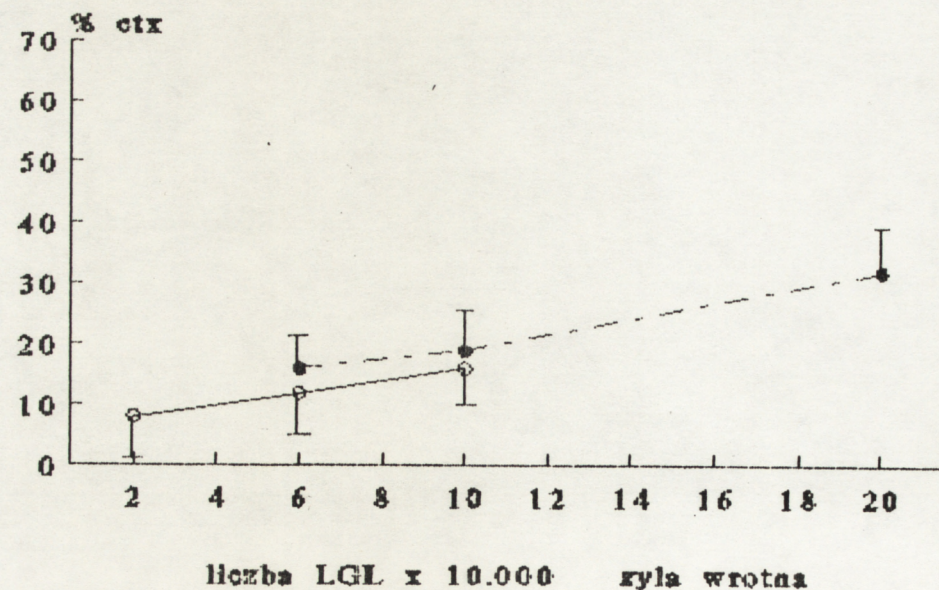
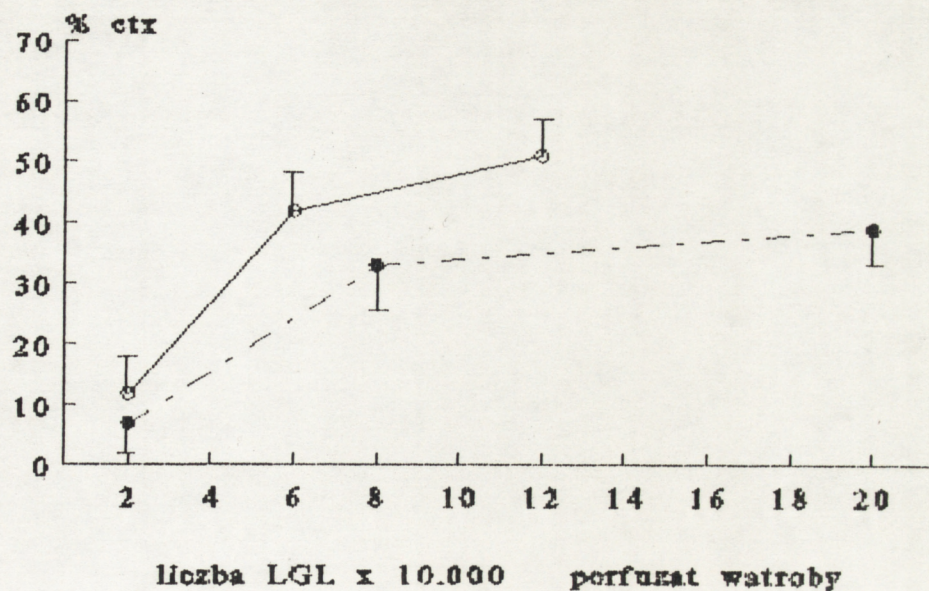


Wykres 2a. WPLYW 4-GODZINNEJ HIPERTERMII IN VIVO NA AKTYWNOŚĆ NK.

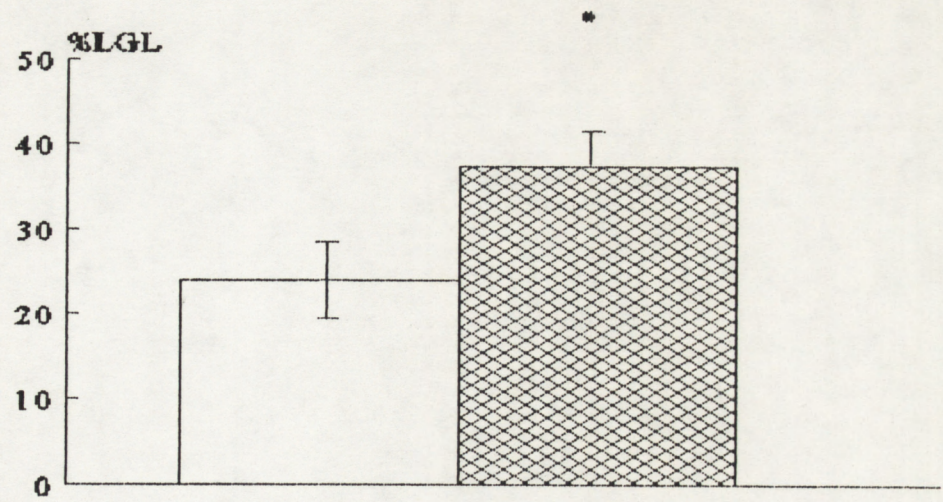


* statystycznie istotne

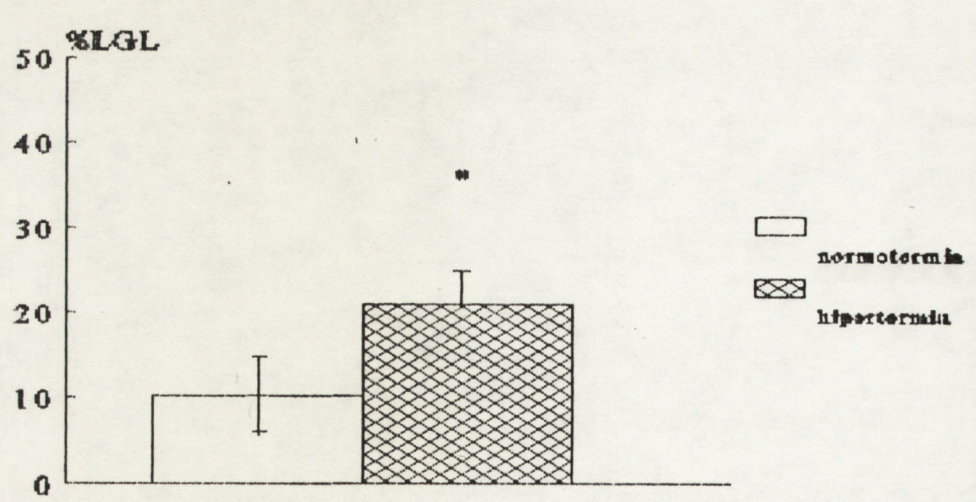




Wykres 3. WPLYW 4-GODZINNEJ HIPERTERMII IN VIVO NA LICZBE LGL.

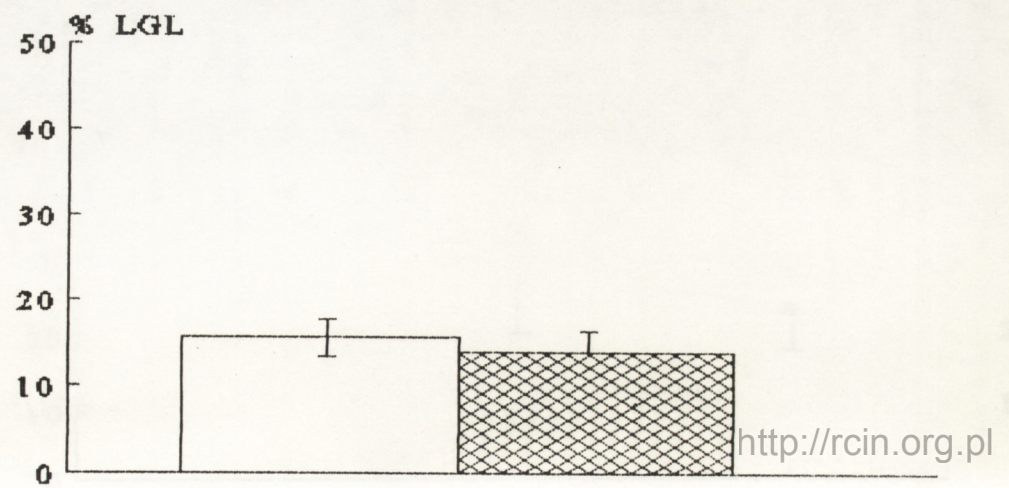


perfuzat watroby

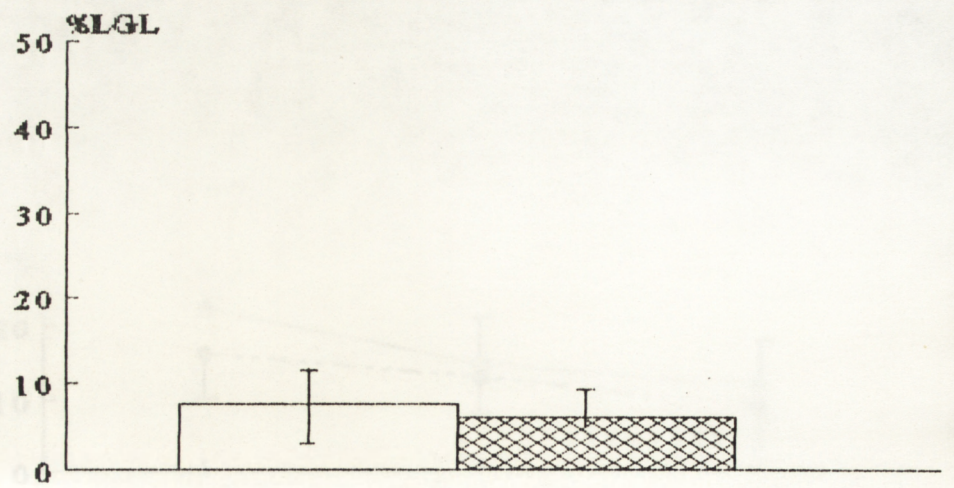


normotermia
hipertermia

zyla wrotna

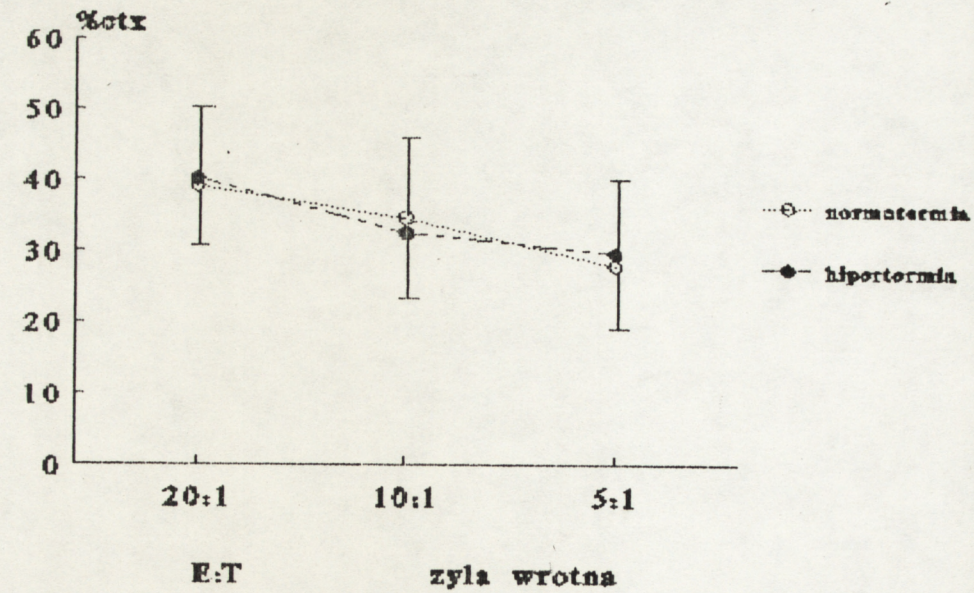
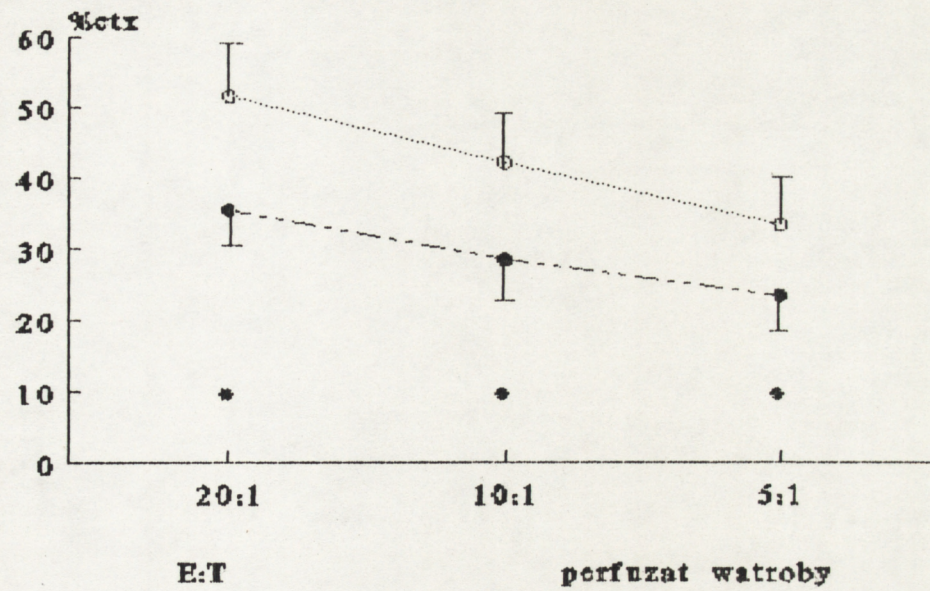


<http://rcin.org.pl>

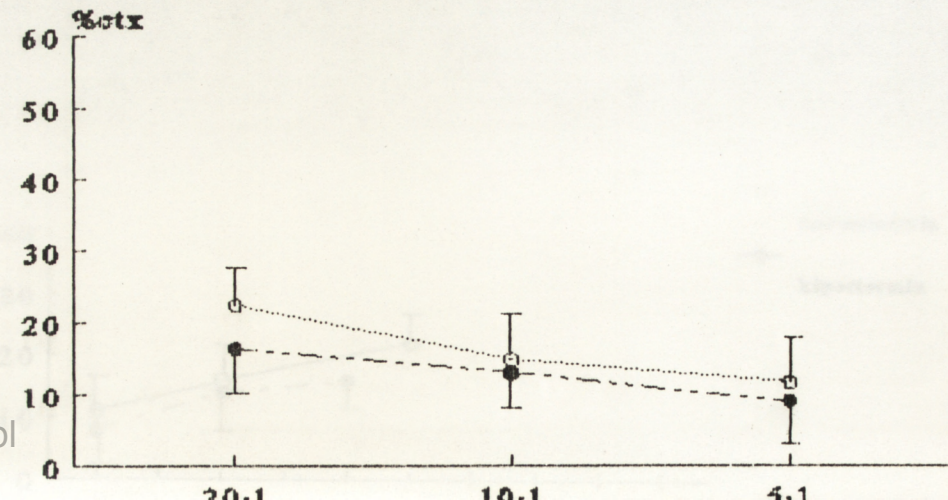
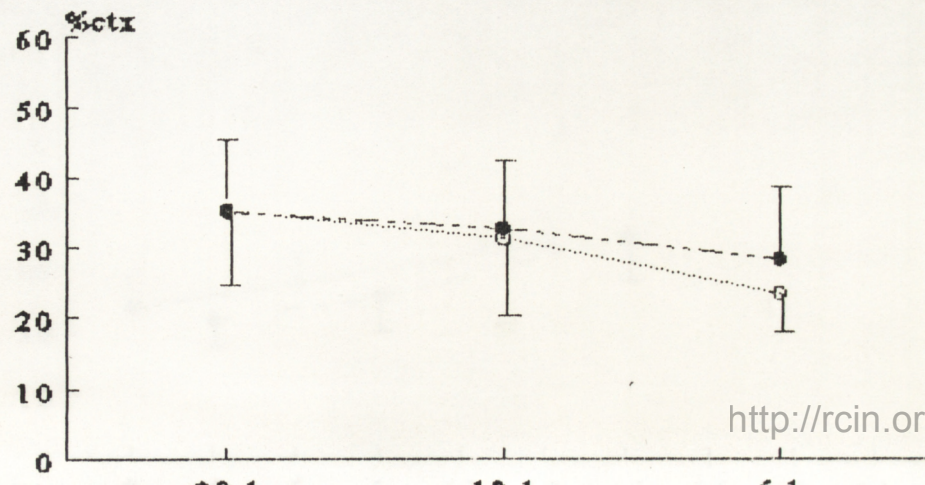


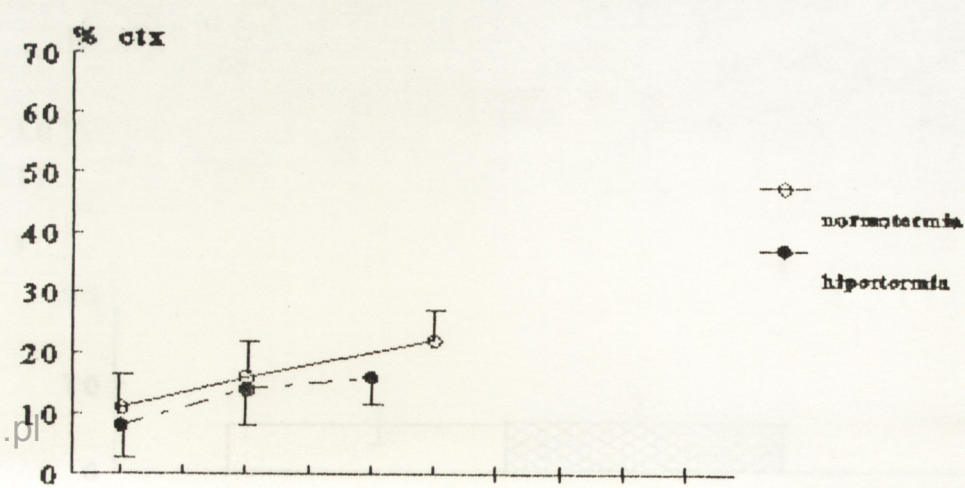
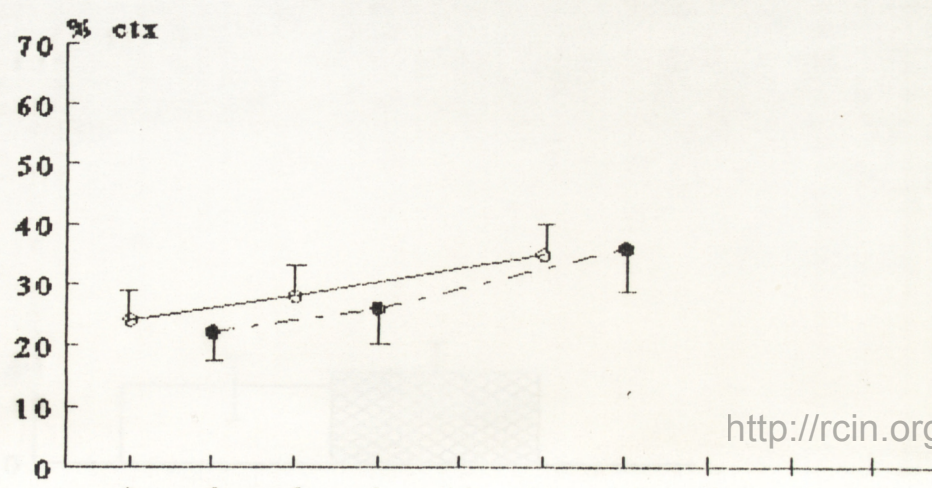
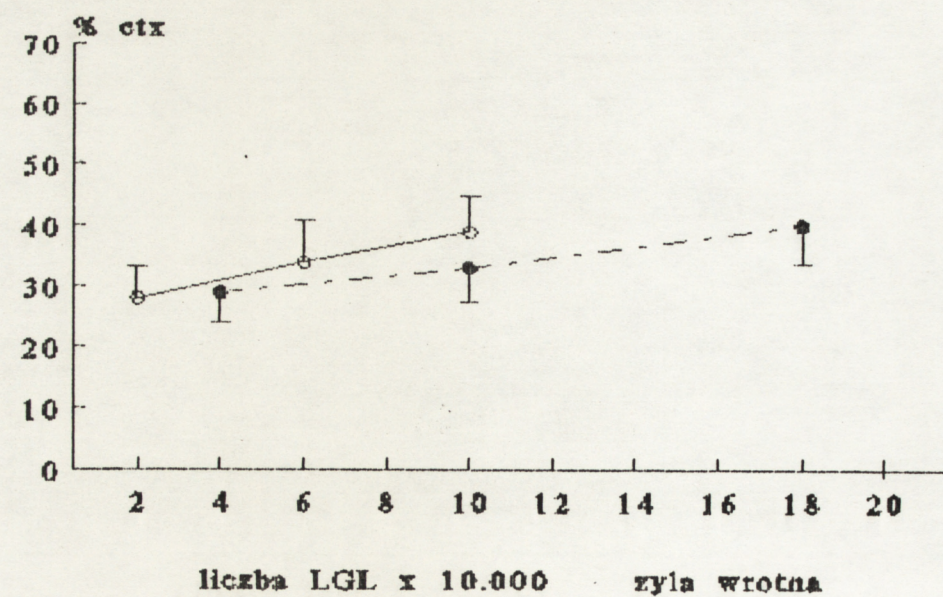
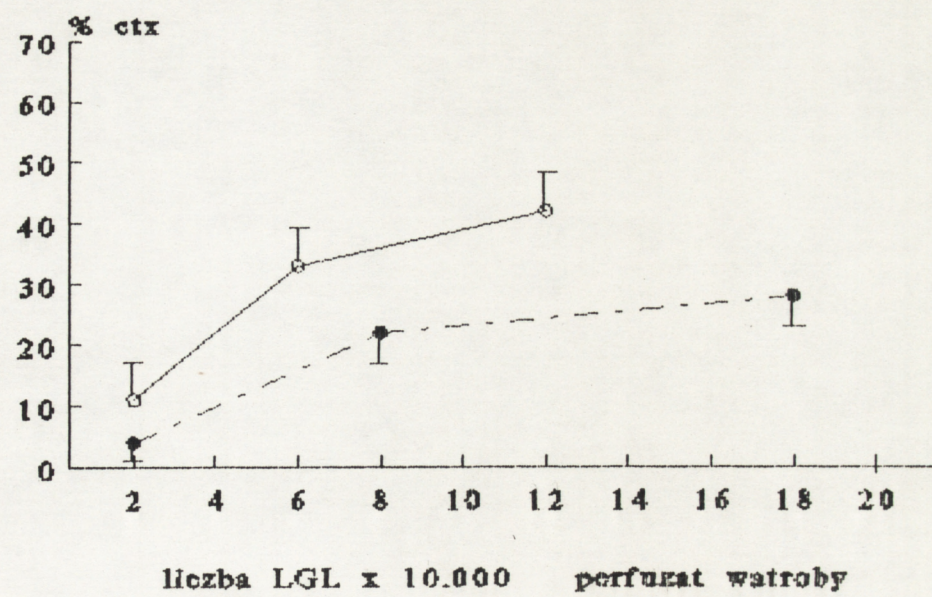
alodziona

Wykres 4a. WPLYW 8-GODZINNEJ HIPERTERMII *IN VIVO* NA AKTYWNOŚĆ NK.

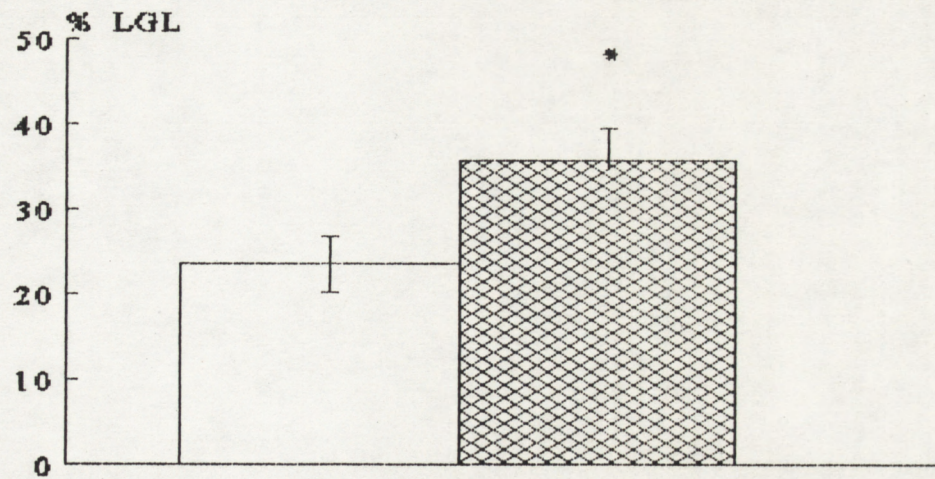


* statystycznie istotne

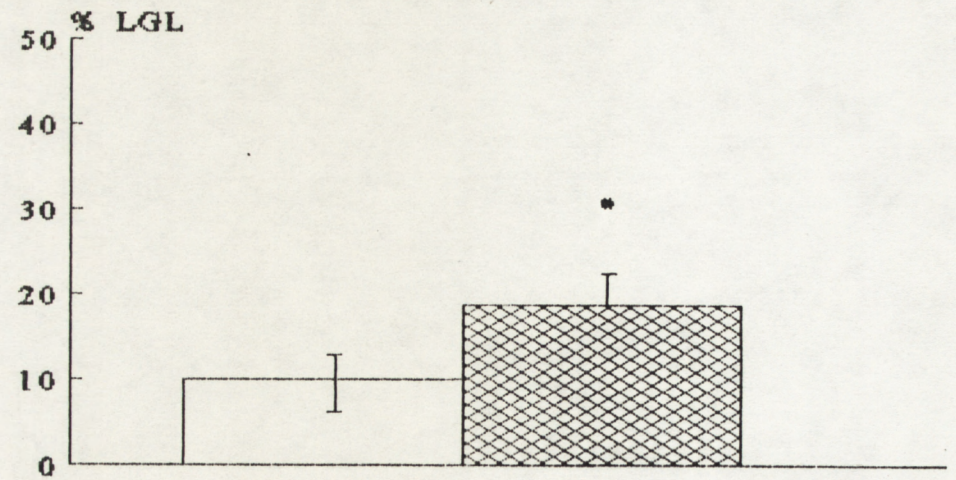




Wykres 5. WPLYW 8-GODZINNEJ HIPERTERMII IN VIVO NA LICZBE LGL.

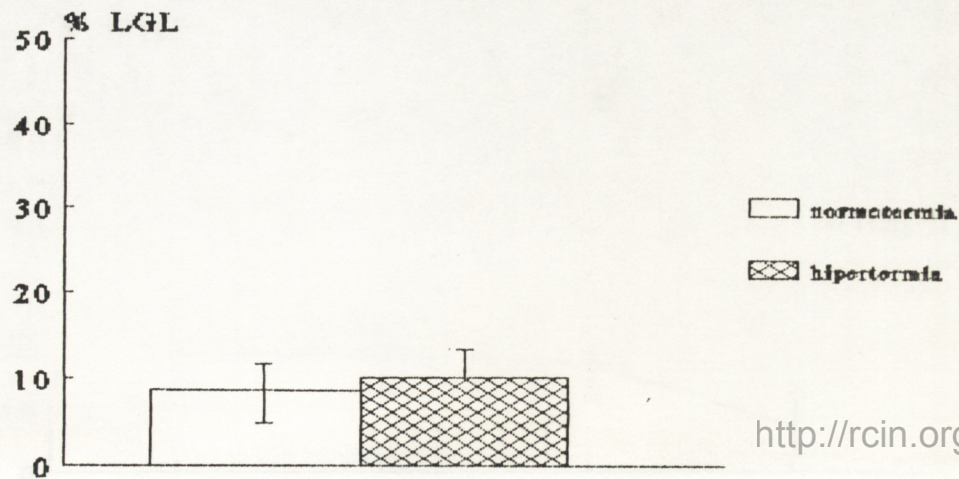


perfuzat watroby

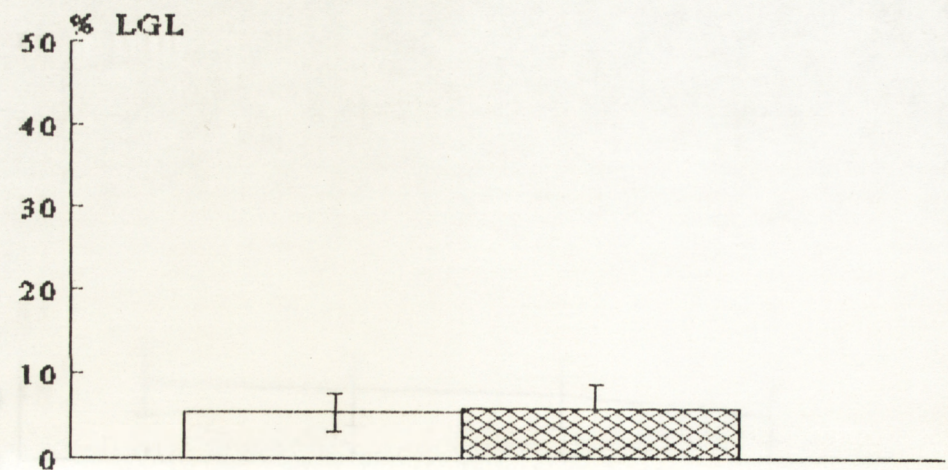


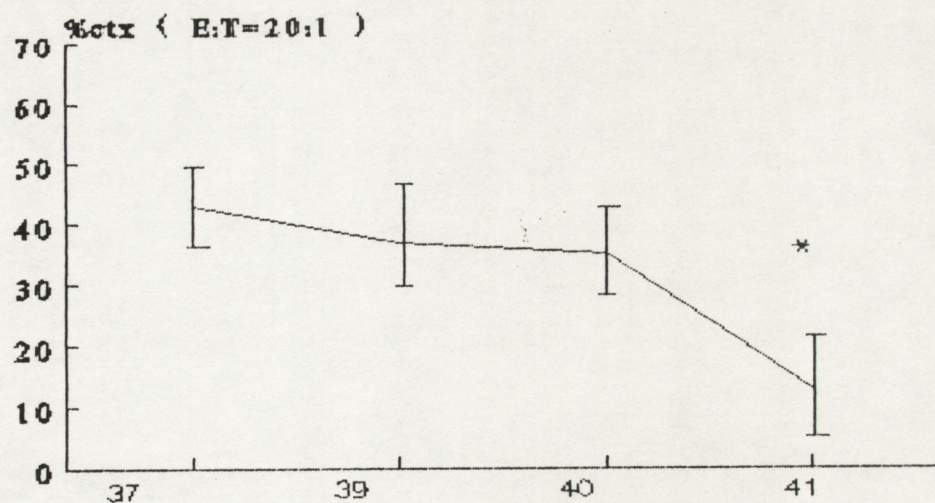
zyla wrotna

* statystycznie istotne

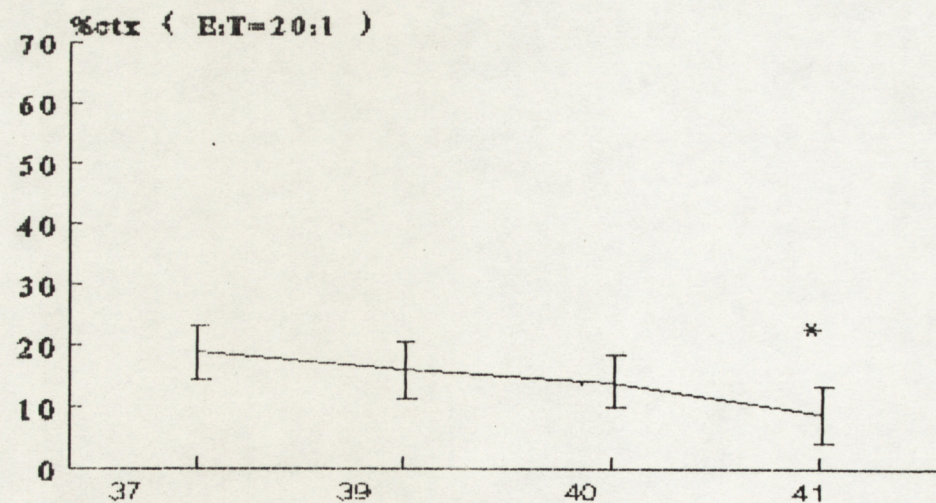


<http://rcin.org.pl>



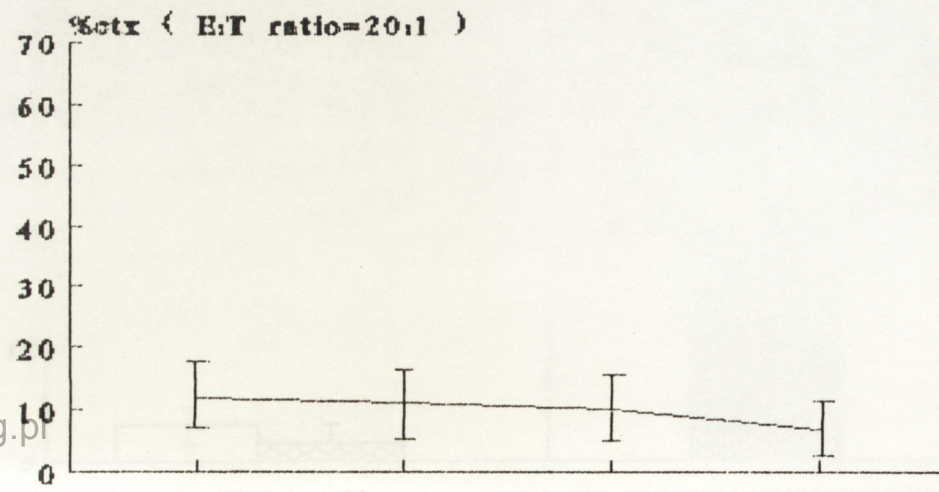
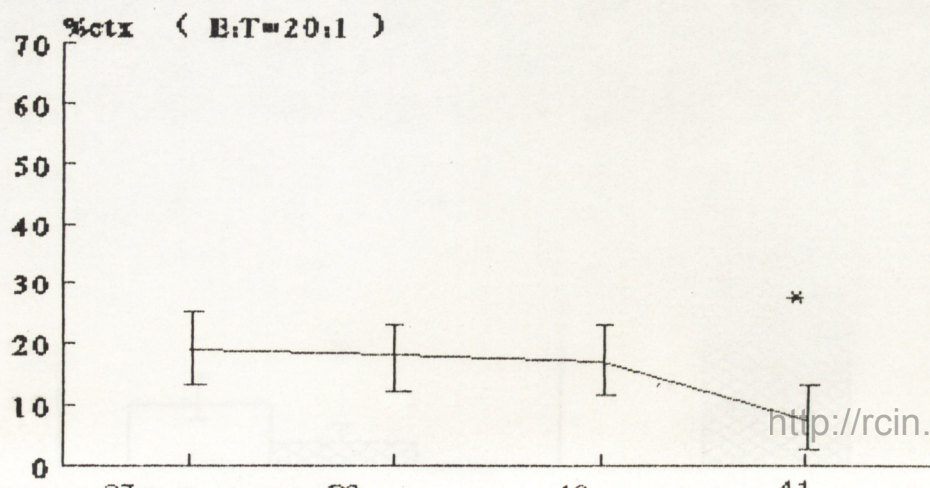


temperatura (° C) perfuzat wtroby



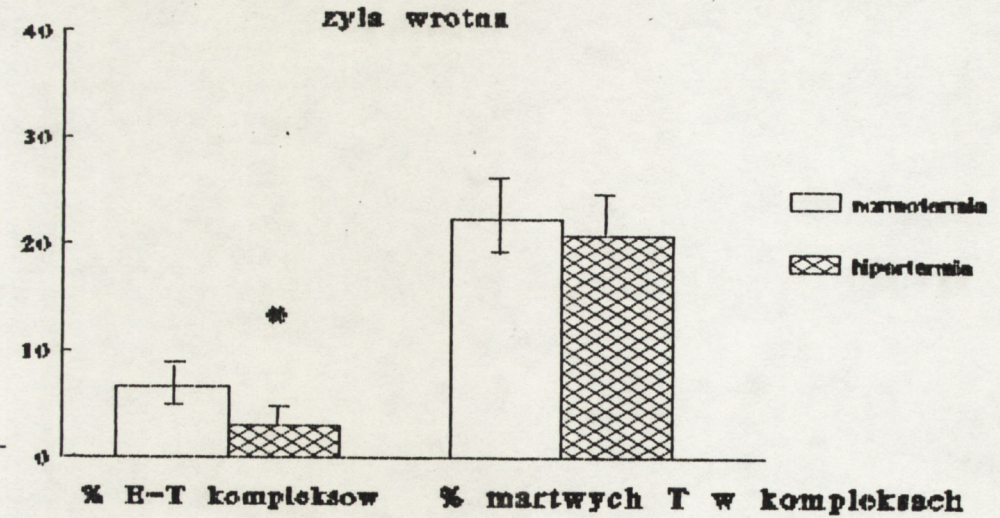
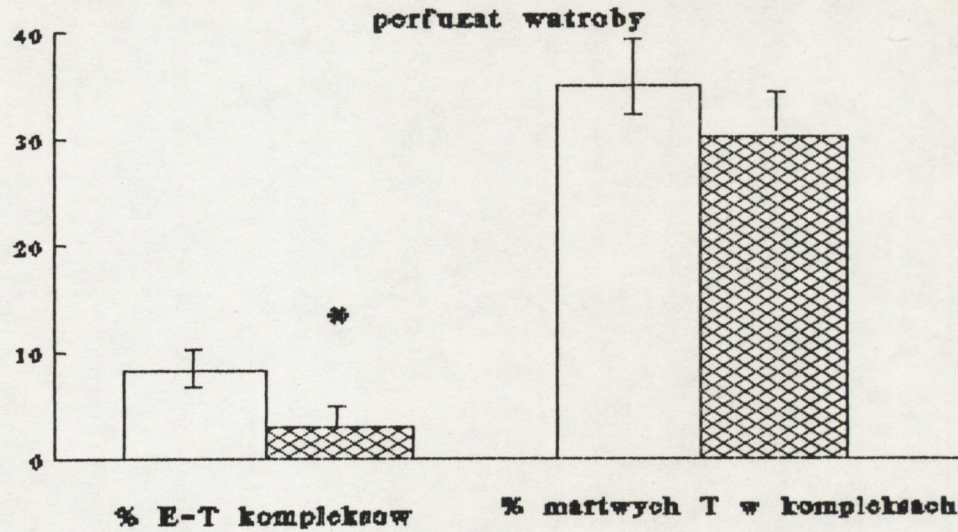
temperatura (° C) zyla wrotna

* statystycznie istotne

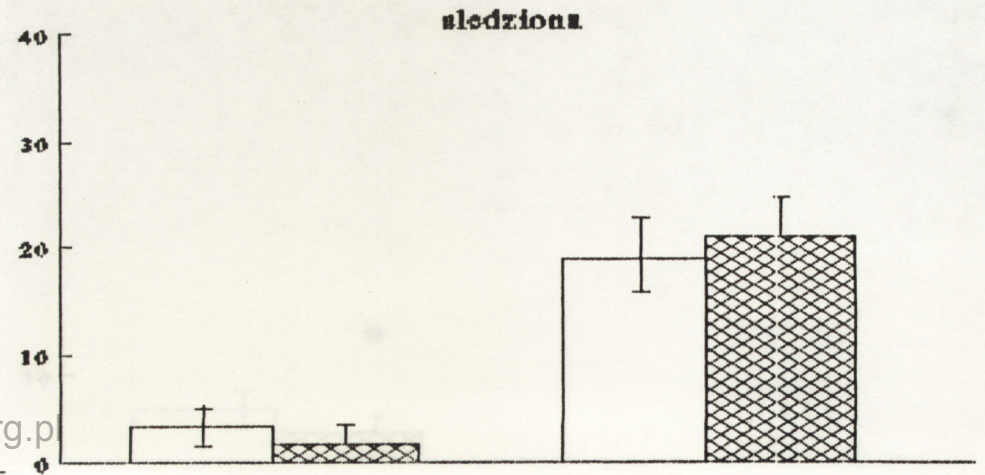
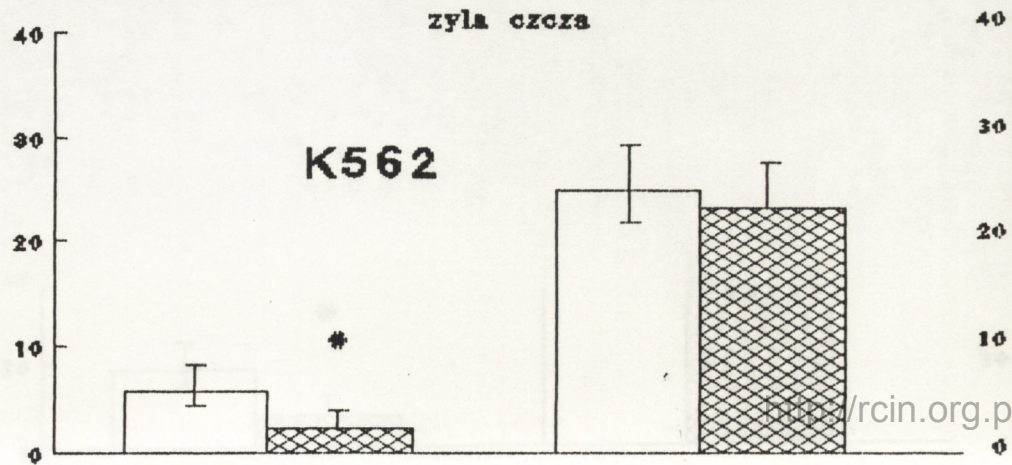


Wykres 7. WPLYW HIPERTERMII IN VITRO
MIERZONA NA POZIOMIE

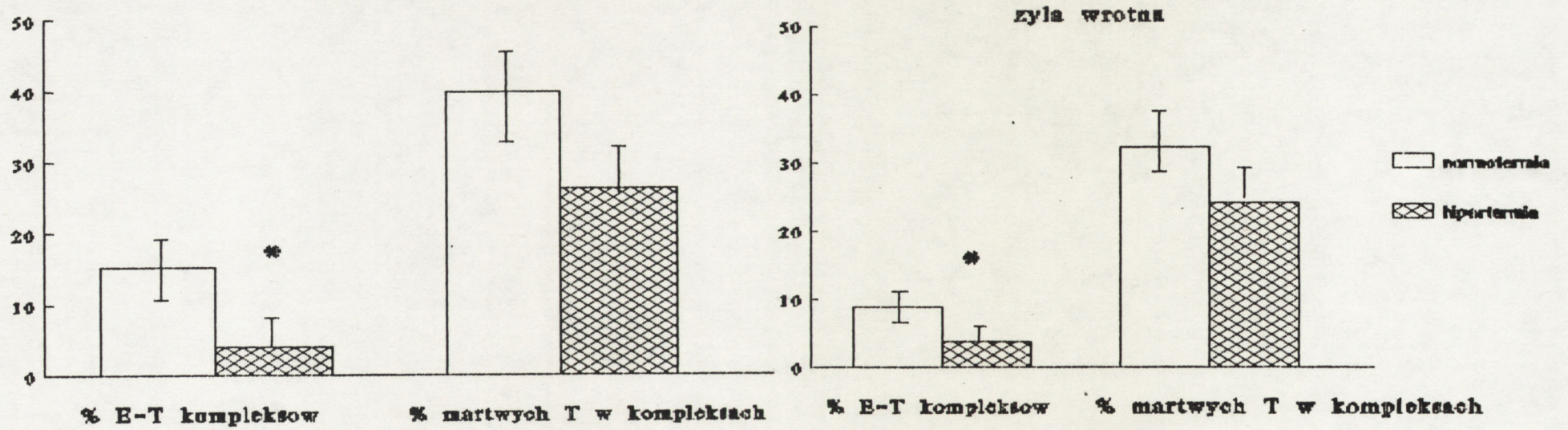
NA AKTYWNOŚĆ NK
POJEDYNCZEJ KOMORKI



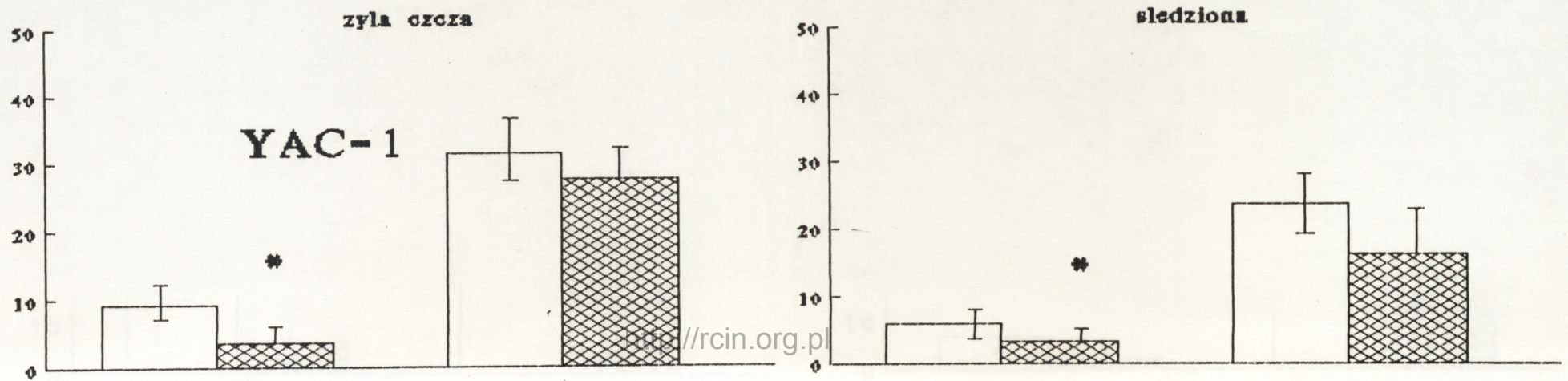
* statystycznie istotne



Wykres 8. WPLYW HIPERTERMII IN VITRO
NA AKTYWNOŚĆ NK
MIERZONA NA POZIOMIE
POJEDYNCZEJ KOMORKI

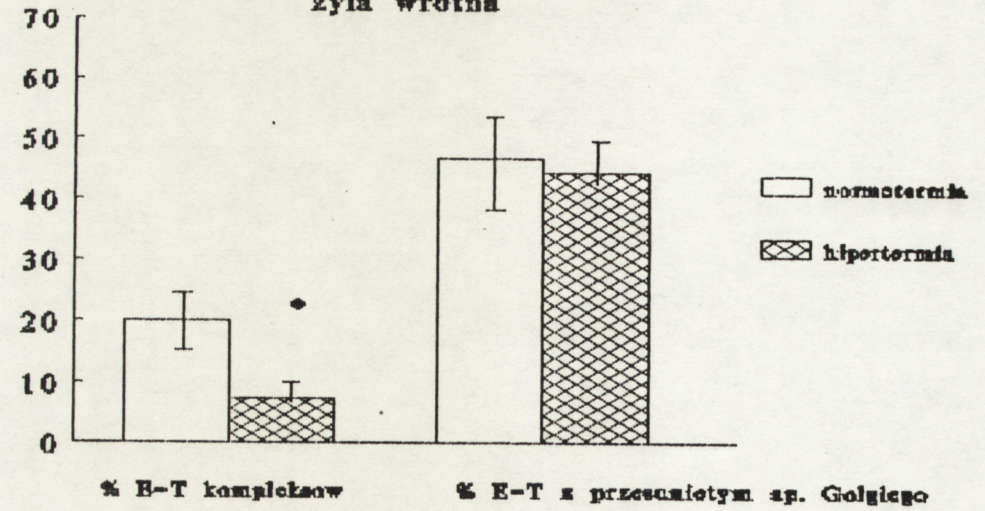
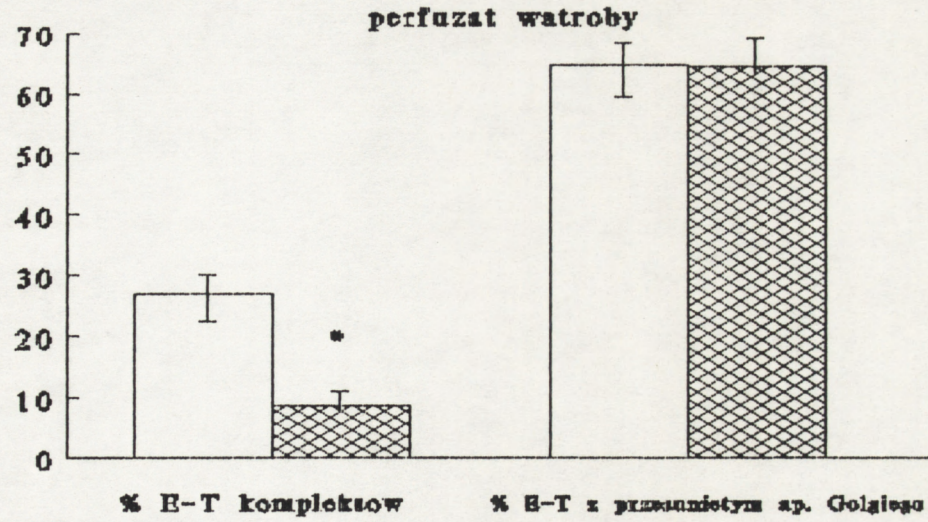


* statystycznie istotne

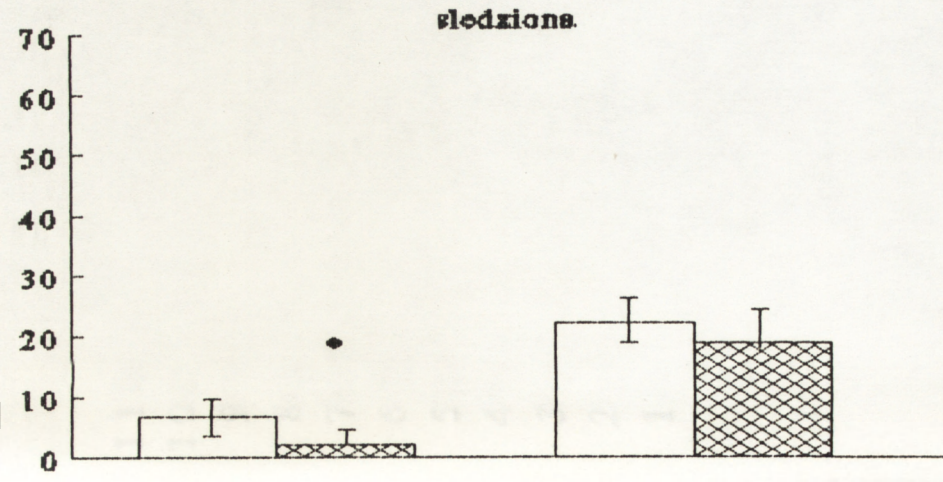
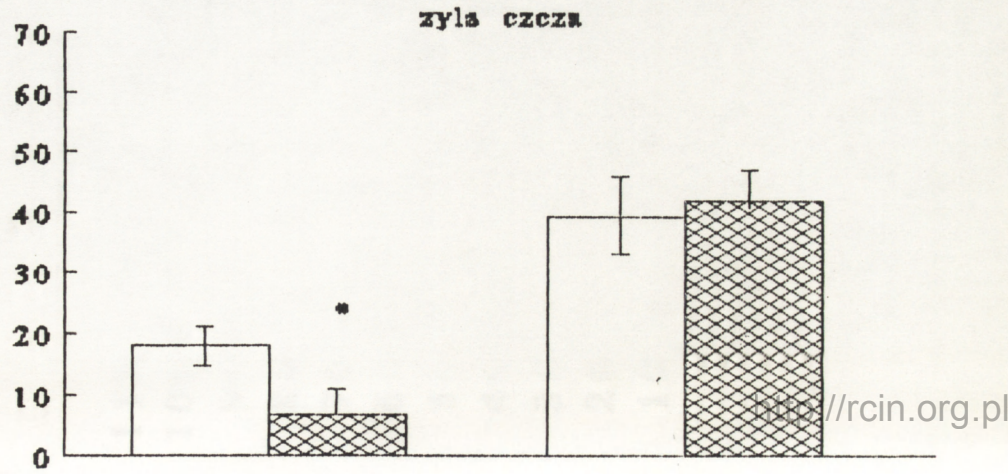


Wykres 9. WPŁYW HIPERTERMII
APARATU GOLGIEGO

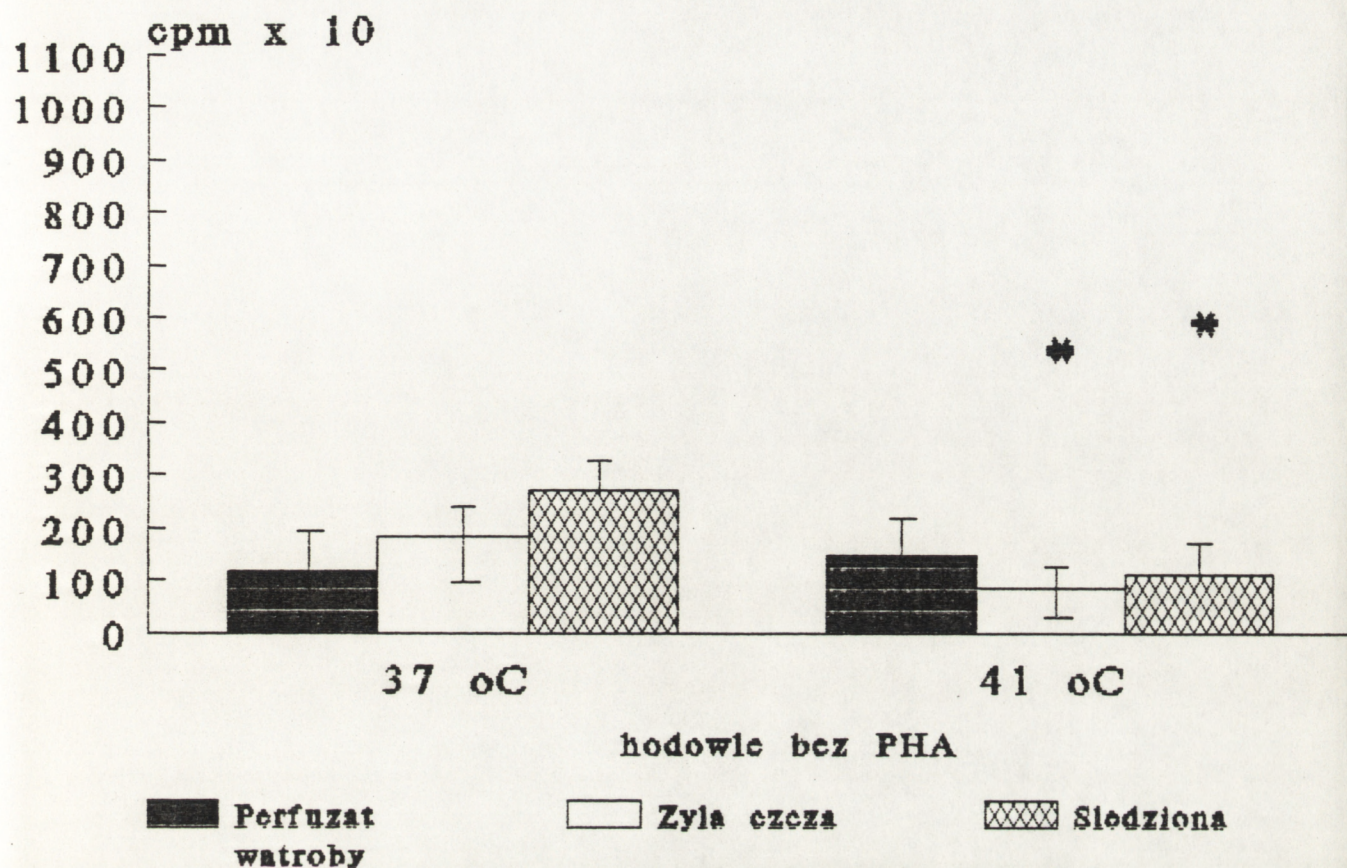
IN VITRO NA POŁOŻENIE
W KOMÓRCIE BIEKTORWEJ



* statystycznie istotne



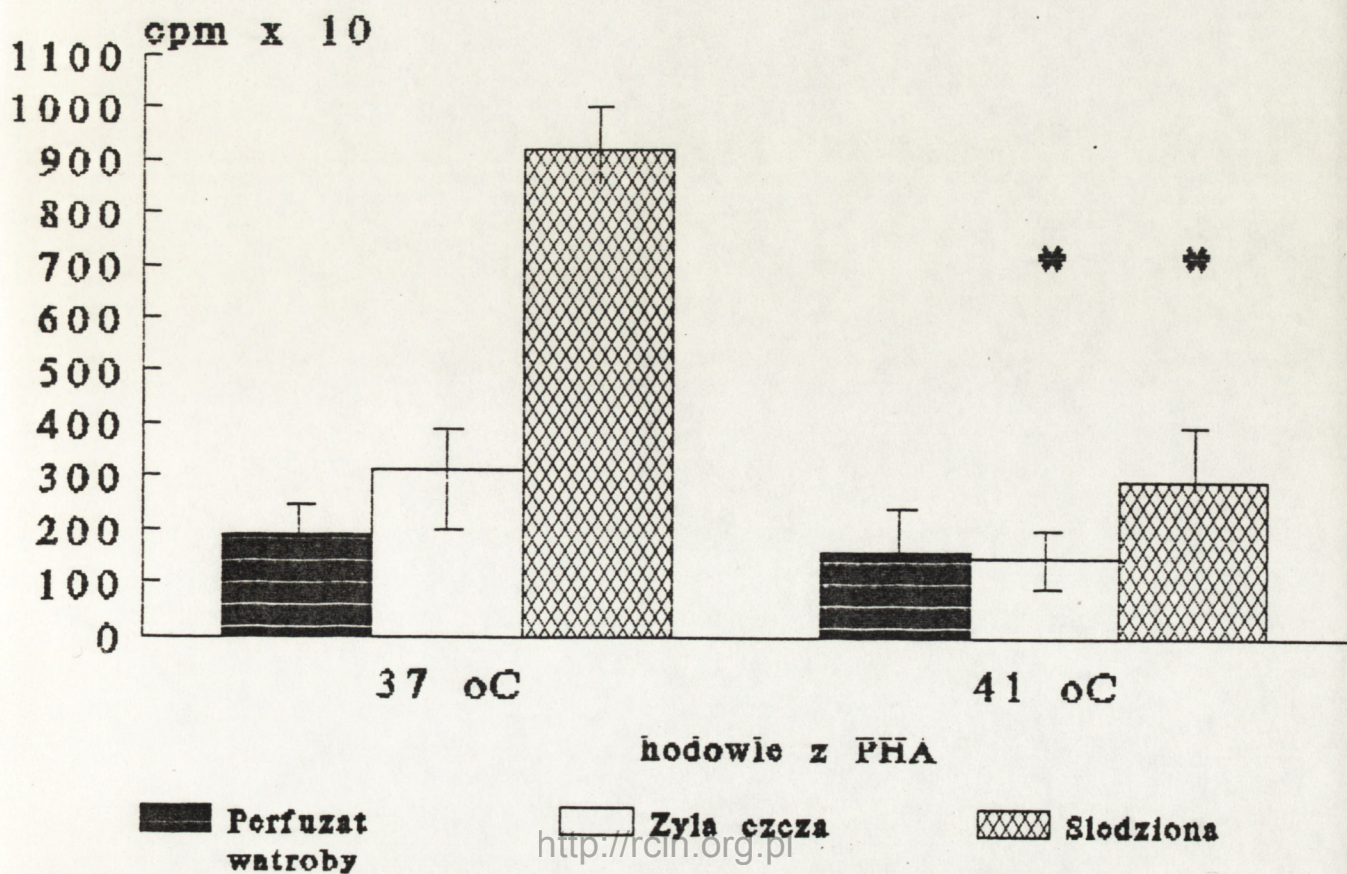
Wykres 10. WPLYW HIPERTERMII IN VITRO
NA WLACZANIE ZNAKOWANEJ URYDYNY



hodowle bez PHA

* statystycznie istotne

Wykres 11. WPLYW HIPERTERMII IN VITRO
NA WLACZANIE ZNAKOWANEJ URYDYNY



hodowle z PHA

* statystycznie istotne