



25  
38

CENTRUM MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
ZESPÓŁ CHIRURGII TRANSPLANTACYJNEJ

*BARBARA ŁUKOMSKA*

**PRZECHOWYWANIE MAKROFAGÓW OTRZEWNOWYCH  
W TEMPERATURZE  $-196^{\circ}\text{C}$**

PRACA DOKTORSKA

Promotor

*Doc. dr hab. med. Waldemar L. Olszewski*

Warszawa 1978

Serdecznie dziękuję Panu Promotorowi Doc. dr hab. med.  
Waldemarowi Olszewskiemu za opiekę naukową i wnikliwą  
dyskusję merytoryczną zagadnień, dotyczących niniejszej  
pracy.

Do jej powstania przyczynili się także

Pan Inżynier Bonifacy Pawtel

z Zakładu Niskich Temperatur Centralnego Ośrodka Techniki  
Medycznej

oraz Koledzy i Współpracownicy z Zespołu Chirurgii  
Transplantacyjnej CMDiK PAN, Zakładu Niskich Temperatur  
Centralnego Ośrodka Techniki Medycznej oraz Zakładu Histologii  
i Embriologii Instytutu Biostruktury AM w Warszawie.

Wszystkim składam podziękowania

B. Łukomska

# S P I S   T R E Ś C I

	Strona
1. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY .....	1
2. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA .....	4
3. MATERIAŁ I METODY .....	24
4. WYNIKI .....	37
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW .....	40
6. WNIOSKI .....	46
7. PIŚMIENNICTWO .....	47
8. SKRÓTY UŻYWANE W PRACY .....	63
9. TABELI I RYCINY	

## 1. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Makrofagi są komórkami, biorącymi udział w różnych etapach procesów odpornościowych. Określono szereg ich czynności, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Podstawowe ich funkcje in vivo to: fagocytoza substancji cząsteczkowych i rozpuszczalnych /17,18/, kompleksów antygen - przeciwciało /61/, wychwytywanie i przetwarzanie antygeny /98,110/, degradacja antygeny do postaci nieimmunogennych /29/, wytwarzanie i wydzielanie substancji, regulujących procesy odpornościowe, w tym komponent dopełniacza C4, C2, C3 /70/, interferonu, lizozymu oraz enzymów, zdolnych do oddziaływania na białka zewnątrzkomórkowe /112, 126, 127/, czynność bakterioobójczą i bakteriostatyczną /4, 86, 95/. W warunkach in vitro, makrofagi fagocytują substancje cząsteczkowe /39,41/, kompleksy immunologiczne /1,118/, wychwytyują i rozkładają substancje antygenowe /84/, wykazują niespecyficzną cytotoksyczność w stosunku do różnych komórek docelowych, w tym nowotworowych /46,47,55/, niszczą drobnoustroje /4/, po "uzbrojeniu" specyficznymi przeciwciałami, wykazują wysoką cytotoksyczność, ściśle ukierunkowaną /31,87/, wpływają aktywizująco na limfocyty /116,130/.

Zarówno badania nad czynnością makrofagów *in vivo* i *in vitro*, jak i próby podawania ich w celach leczniczych, wymagają uzyskania dużych, ściśle określonych populacji, nie zmieniających swych właściwości w czasie prowadzonej serii badań. Muszą to być komórki o znanej, w niektórych sytuacjach nawet zaprogramowanej aktywności i specyficzności /79/.

Dla dysponowania odpowiednimi standardowymi frakcjami makrofagów, z dużą liczbą komórek, najodpowiedniejszą metodą

wydaże się jest przechowywanie ich w niskich temperaturach. Korzyści, wynikające z posiadania właściwej metody przechowywania byłyby oczywiste. I tak powtarzalny poziom cytotoksyczności przechowywanych makrofagów, spełniających rolę komórek efektorowych, pozwoliłby na określenie czy zmiany w uwalnianiu pierwiastków radioaktywnych, którymi znakowano komórki docelowe, dotyczą zmian w aktywności komórek efektorowych, czy różnic w zdolności niszczenia lub antygenowości komórek docelowych /51/. Użycie stałej puli, przechowywanych makrofagów, spowodowałoby eliminację różnic pomiędzy komórkami, pobieranymi w poszczególnych okresach czasu, dla zbadania tych samych parametrów /49/.

Jeśli istnieją niezgodności wyników pomiędzy makrofagami, uzyskiwanymi w różnych odstępach czasu, przy jednoczesnym braku różnic między makrofagami zamrożonymi, stanowiącymi standardową pulę, możnaby wnioskować, iż różnice, pomiędzy poszczególnymi ocenami makrofagów, dotyczyły błędów technicznych, a nie były związane ze zjawiskami biologicznymi.

Tak więc, krioprezerwacja komórek, ocenianych w trakcie długotrwałych testów, pozwoliłaby eliminować zmienność, związaną z problemami technicznymi przy pobieraniu komórek, dawałaby więc powtarzalność wyników.

Zamrożone makrofagi mogłyby być także użyte do zmian układów komórkowych, poprzez selektywne wzbogacanie określonych populacji komórek, oraz poprzez zmiany struktury powierzchniowej, co wiązałoby się ze zmianami zdolności wiązania substancji i komórek, a być może także zmianami antygenowości /26/.

Wśród technik immunologicznych brak jest skutecznej i powtarzalnej metody długotrwałego przechowywania makrofagów.

Wynika to zapewne z faktu, iż techniki krioprezerwacji komórek jądrzastych są jeszcze w stadium doświadczalnym, a także ze specyficznych trudności, jakie stwarzają same makrofagi tj. ich duża masa komórkowa, różne stadia aktywności, a więc zmiany chemiczne w komórce, powodujące modyfikację optymalnych szybkości chłodzenia i ogrzewania po przechowywaniu, a także łatwe przyleganie do obcych powierzchni.

Biorąc pod uwagę możliwość standaryzacji określonej puli komórek fagocytarnych, w Zakładzie Chirurgii Transplantacyjnej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, powstała myśl aby opracować metodę długotrwałego przechowywania makrofagów.

Celem mojej pracy była:

1. Adaptacja metod, stosowanych w krioprezerwacji komórek zwierzęcych w temp.  $-196^{\circ}\text{C}$  do przechowywania makrofagów otrzewnowych myszy.
2. Sprawdzenie jaki wpływ ma zastosowany proces zamrażania i rozmrażania makrofagów na ich funkcje biologiczne.
3. Zbadanie jakie znaczenie ma długość okresu przechowywania w temp.  $-196^{\circ}\text{C}$  na biologiczne funkcje makrofagów.

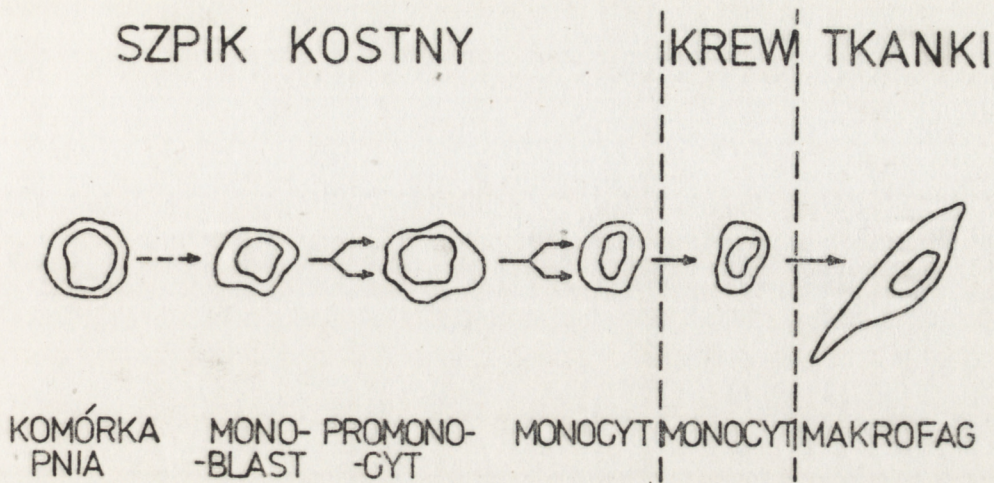
Praca została wykonana przy współpracy z Zakładem Niskich Temperatur Centralnego Ośrodka Techniki Medycznej.

## 2. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

Makrofagi odgrywają rolę regulacyjną w odpowiedzi immunologicznej /111,117/. Biorą udział w chemicznym i przestrzennym przygotowaniu antygeny, który w swojej natywnej formie jest słabo immunogeny dla limfocytów /98/, współdziałanie komórek T i B /28/, generację komórek cytotoksycznych /115/. Obecność makrofagów znacznie podnosi zdolność komórek immunologicznie kompetentnych do odpowiedzi na antygeny niezgodności tkankowej /82/, antygeny i mitogeny. W obecności limfocytów i antygeny makrofagi wykazują zdolności bakteriobójcze /4,86/, są cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych /19/. Makrofagi biorą udział w zjawiskach, związanych z zapaleniem /17,18,29/, opóźnioną nadwrażliwością /132/, autoagresją /69,82/. Wytwarzają szereg substancji, aktywnych biologicznie tj. lizozym, składniki dopełniacza /17/, pyrogen /7/, enzymy proteolityczne: kolagenazę i elastazę /112,126,127/, aktywator plazminogenu /114/.

### P o c h o d z e n i e m a k r o f a g ó w i i c h

k i n e t y k a. Istnieje szereg hipotez, dotyczących pochodzenia makrofagów. Najbardziej prawdopodobną wydaje się teoria powstawania fagocytów jednojądrzastych z komórki pnia poprzez monoblast, promonocyt i monocyt, który opuszcza szpik kostny i z krwią obwodową przedostaje się do tkanek. Tu dojrzewa on ostatecznie i nabywa właściwości, charakterystycznych dla środowiska danej tkanki, stając się makrofagiem.



Rycina 1. Schemat powstawania fagocytów jednojądrzastych /wg Van Furth'a /30//

W ogniskach zapalnych pojawia się duża ilość monocytów, migrujących z krwi poprzez przestrzeń między śródbłonkiem kapilarów żylnych. Dopływ monocytów jest stały i trwa przez cały okres zapalenia. Monocyty przekształcają się w makrofagi, zwiększa się ich aktywność fagocytarna.

Van Furth /29/ przedstawił schemat, dotyczący wytwarzania monocytów w szpiku kostnym, ich przechodzenie przez łożysko naczyniowe krwi i migrację do jamy otrzewnowej, w stanie fizjologicznym i w czasie ostrego procesu zapalnego.

	Szpik kostny		Krew obwodowa		Jama otrzewna
	Ilość wytworzonych monocytów	Dopływ monocytów	Odływ monocytów	Ilość makrofagów	
Stan fizj.	$20,9 \times 10^5$	$13,6 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$	$0,6 \times 10^5$	
Zapalenie	$34,5 \times 10^5$	$27,5 \times 10^5$	$13,5 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5$	



Wielu autorów uważa, że fagocyty jednojądrzaste mogą odnawiać populację komórek we własnym zakresie /30,75,103,108/ i że głównym źródłem makrofagów jest proliferacja na drodze mitozy. Trudno określić jaki udział w populacji makrofagów stanowią komórki, powstałe drogą podziałów. Wiadomo natomiast, że zarówno migracja monocytów jak i proliferacja makrofagów nie są procesami spontanicznymi. W czasie zapalenia pojawia się swoisty czynnik, który ma zdolność uwalniania monocytów ze szpiku kostnego /30/. Podobnie, istnieje czynnik, inicjujący mitozę makrofagów otrzewnowych /108/.

#### H e t e r o g e n n o ś ć   f u n k c j o n a l n a   m a k r o - f a g ó w

Makrofagi, występujące w różnych tkankach, wykazują różnice biochemiczne, morfologiczne i funkcjonalne. Różnice te dotyczą indywidualnych cech, jakich nabywają komórki pod wpływem mikrośrodowiska określonej tkanki. Np. makrofagi płuc zawierają więcej enzymów lizosomalnych niż makrofagi otrzewnowe, a mimo tego ich aktywność bakteriobójcza jest niższa w porównaniu z fagocytami otrzewnej /81/. Trzykrotnie mniejsze powinowactwo błony cytoplazmatycznej makrofagów płuc do opłaszczonych erytrocytów barana niż w przypadku fagocytów otrzewnowych, tłumaczy się różnicami antygenowymi pomiędzy specyficznymi antygenami powierzchniowymi tych dwóch grup makrofagów /93/. Brak odpowiedzi fagocytów płucnych na czynnik, hamujący migrację, wynika z braku ekspresji receptora dla MIF-u, przy pozytywnej odpowiedzi makrofagów otrzewnowych /109/.

Różnorodność makrofagów dotyczy także ich funkcji immunologicznych. Jedne komórki odgrywają rolę w indukcji odpowiedzi immunologicznej /98/, inne spełniają rolę "uprzątaczy", degradując antygen do produktów nieimmunogennych /29,109/. Np. makrofagi wątrobowe nie biorą udziału w indukcji immunologicznej /9/. Mimo iż fagocytoza antygeny w komórkach Kupffera jest dwunastokrotnie większa niż w makrofagach śledzionowych, makrofagi wątroby nie są w stanie, funkcjonalnie, zastąpić fagocytów śledzionowych po splenektomii, gdyż zdolne są tylko do sekwestracji antygeny, a nie do prezentacji go limfocytom /109/.

Makrofagi mogą wykazywać także heterogenność funkcjonalną w obrębie tego samego narządu, w zależności od miejsca lokalizacji i powiązania z innymi komórkami. Np. antygen, w węzłach chłonnych szczura, jest początkowo związany z makrofagami części rdzennej węzła i pozostaje tam przez pewien okres czasu, a następnie pojawia się w grudkach kory, związany z makrofagami dendrytycznymi /119/. Podobne obserwacje poczyniono w śledzionie /44/, gdzie antygen jest początkowo związany z makrofagami miazgi czerwonej, a później pojawia się w makrofagach dendrytycznych grudek chłonnych śledziony. Makrofagi dendrytyczne różnią się od innych zdolnością stymulacji limfocytów, ich wypustki mają ścisły kontakt z limfocytami B.

#### C h a r a k t e r y s t y k a m a k r o f a g ó w o -

t r z e w n o w y c h . Makrofagi jamy otrzewnowej różnią się między sobą nie tylko pochodzeniem /30/. Z badań Daems'a /16/ wynika, że pomiędzy fagocytami osiadłymi a makrofagami,

powstałymi w wyniku różnicowania się monocytów, w procesie zapalnym, istnieją różnice metaboliczne i cytochemiczne, dotyczące rozmieszczenia enzymów /128/. Heterogenność populacji makrofagów otrzewnowych została udowodniona poprzez rozdział komórek wysięku otrzewnowego /PEC/ królika na gradiencie albuminy bydlęcej /117/ czy fikołu /118/. Wyróżnia się trzy, funkcjonalnie różne typy komórek. W pierwszej interfazie gradientu pozostają komórki z widoczną zawartością oleju mineralnego w cytoplaźmie, pochodzącego z wcześniejszej stymulacji. Są to komórki, klasycznie zdefiniowane jako "uprząta-cze", szybko wchłaniające i rozkładające antygen do produktów nieimmunogennych. Drugą grupę stanowią makrofagi o słabiej wyrażonych właściwościach endocytozy i fagocytozy, odpowiadające na antygen syntezą RNA informacyjnego, który stymuluje normalne limfocyty do wytwarzania przeciwciał Ig M. Trzeci typ makrofagów to komórki, z wyraźnie zaznaczoną siateczką endoplazmatyczną w rozrzedzonej cytoplaźmie, odpowiedzialne za generację immunogennego RNA, kompleksu RNA z antygenem i stymulujące limfocyty do produkcji specyficznych przeciwciał klasy IgG. Komórki, należące do poszczególnych podklas wykazują zróżnicowanie aktywności receptora Fc /93/. Największą zdolność tworzenia rozetek EA posiadają makrofagi, zdolne do wytwarzania kompleksów antygenowych /119/. Antygen, wychwytywany przez tę subpopulację komórek jest zgromadzony w oddzielnej części komórki, charakteryzującej się dużą gęstością, z dala od lizosomów. Natomiast w makrofagach, o dużej zdolności fagocytarnej, antygen jest zlokalizowany w sąsiedztwie lizosomów i szybko degradowany, tracąc zdolność immunogenną. Do dziś niewiadomo czy różnice funkcjonalne są wynikiem nie-

jednakowego poziomu dojrzewania komórek czy różnic w pochodzeniu makrofagów.

Udział makrofagów w kontroli odpowiedzi immunologicznej. Makrofagi mogą modyfikować działanie limfocytów, w różnych stadiach odpowiedzi immunologicznej. Odgrywają rolę w rozpoznaniu antygenów przez limfocyty T, proliferacji i odpowiedzi na mitogeny, w odpowiedzi na alloantygeny /mieszana hodowla limfocytów/, wytwarzaniu limfokin i generacji komórek pomocniczych /1,110, 111,130/.

Wpływ makrofagów wymaga bezpośredniego kontaktu komórki z limfocytom T lub może być wynikiem działania czynników, uwalnianych przez makrofagi. Charakter tych czynników jest w dalszym ciągu niewyjaśniony. Opisywano je jako produkty degradacji makrofagów, makrocząsteczki wrażliwe na trypsynę, cząsteczki sfagocytowanego antygeny, RNA wytwarzany przez makrofagi i uwalniany z antygenem w postaci superantygeny.

Antygen jest wychwytywany przez makrofagi na drodze aktywnego procesu metabolicznego, poprzez mikropinocytozę. Związywanie antygeny z powierzchnią fagocyta jest uwarunkowane istnieniem antygenów Ia na błonie komórkowej makrofaga /102/. Przeciwciała, przeciw tym antygenom, hamują rozpoznanie przez limfocyty T antygeny, transportowanego przez makrofagi.

Do właściwej prezentacji limfocytom rozpuszczalnego antygeny, konieczna jest zgodność tkankowa pomiędzy makrofagiem i limfocytom /24,97/. Antygeny cząsteczkowe nie wymagają obecności genów zgodności tkankowej i dlatego odpowiedź limfocytów

T na PHA jest taka sama w obecności makrofagów ksenogenicznych jak i allogenicznych.

Interakcja między limfocytom, a makrofagiem może dotyczyć dwóch oddzielnych zjawisk. W pierwszej fazie następuje wybiórcze przyleganie antygenowo swoistych komórek T do makrofagów, transportujących ten antygen. Druga faza - aktywacji, jest niespecyficzna i polega na stabilizacji fizycznego współdziałania między limfocytom, a makrofagiem.

Podczas wytwarzania odporności swoistej, zadaniem makrofagów jest regulacja działania limfocytów T i B oraz antygenom. Kompleksowość prezentacji antygenom i odpowiedzi komórek immunologicznie kompetentnych jest bardzo ważna, bowiem w przypadku braku makrofagów antygen może prowadzić do generacji supresorowych komórek T /3/.

Wpływ makrofagów na proliferację i różnicowanie limfocytów. Makrofagi mają zdolność sekrecji limfostymulatorów. Są to:

1. Czynniki mitogenne dla limfocytów, który stymuluje proliferację tymocytów i wzmacnia ich odpowiedź na lektyny np. PHA.
2. Czynniki, aktywujący komórki B, który różnicuje limfocyty B na komórki, wytwarzające przeciwciała.
3. Czynniki, inicjujący powstawanie komórek pomocniczych /102/.
4. Czynniki, stymulujący powstawanie kolonii granulocytów czy monocytów z komórek pnia szpiku kostnego.
5. Czynniki, różnicujący tymocyty, który wpływa na funkcjonalne dojrzewanie limfocytów T in vitro.

Makrofagi mogą współdziałać z różnymi klasami komórek limfoidalnych, największy wpływ mają jednak na limfocyty T. Ilość wydzielonych czynników jest modulowana przez dojrzałe komórki T szczególnie w przypadku czynnika mitogennego /3/.

Udział makrofagów w odpowiedzi immunologicznej, związanej z przeciwciałami. Współdziałanie makrofagów z limfocytami B jest mniej poznane, jakkolwiek wiadomo iż jednojądrzaste fagocyty odgrywają ważną rolę w powstawaniu i regulacji odpowiedzi, związanej z przeciwciałami. Ich obecność jest konieczna w rozwoju odpowiedzi PFC - plaque forming cells na antygeny T - zależne /grasiczo zależne/ i T - niezależne /grasiczo niezależne/ /72/. Dotyczy to wszystkich klas immunoglobulin.

Istnieją genetyczne uwarunkowania interakcji makrofagów, transportujących antygen i komórek limfoidalnych śledziona, w rozwoju odpowiedzi humoralnej na antygeny grasiczo - zależne /84/. Komórki limfoidalne powodują powstanie wtórnej odpowiedzi humoralnej, kiedy są stymulowane antygenem, przetwarzanym w makrofagach syngenicznych w stosunku do tych, które używano, stymulując komórki śledziona in vivo. Genetyczna kontrola współdziałania makrofag - limfocyt w odpowiedzi wtórnej pochodzi z subregionu Ia kompleksu H2. W odpowiedzi pierwotnej, genetyczna kontrola nie odgrywa żadnej roli /84/.

Makrofagi a odporność w procesach nowotworowych. Makrofagi mają zdolność regulacji wzrostu innych komórek, poprzez mechanizmy

efektorowe. Wielkość działania tych mechanizmów zależy od rodzaju i poziomu aktywacji makrofagów /58/. Nieaktywowane makrofagi nie wykazują efektu cytotoksycznego w stosunku do komórek nowotworowych, zarówno w układzie syngenicznym jak i allogenicznym. Mogą one nabywać własności cytotoksycznych podczas współdziałania z uczulonymi limfocytami lub ich produktami tj. czynnikiem uzbrajającym makrofagi - SMAF /13,25, 42,60/, swoistymi przeciwciałami /21,36/ itp. Nazywamy je wtedy makrofagami uzbrojonymi. Hamowanie wzrostu nowotworu przez makrofagi może mieć charakter niespecyficzny. Obserwuje się je wówczas gdy makrofagi są aktywowane przez wirusy, bakterie, adjuwanty endotoksyny /53/. Aktywowane makrofagi mogą niespecyficznie niszczyć komórki docelowe w układzie syngenicznym, allogenicznym i ksenogenicznym /46/. Makrofagi uczulone, od zwierząt immunizowanych, wykazują zdolność niszczenia komórek nowotworowych, lecz ich poziom cytotoksyczności w układzie allogenicznym różni się od zdolności cytotoksycznej makrofagów uzbrojonych. Uczulone fagocyty jednojądrzaste powodują lizę komórek nowotworowych natomiast makrofagi uzbrojone hamują jedynie wzrost nowotworu. Po inkubacji z komórkami docelowymi, makrofagi uzbrojone mogą stać się cytolytyczne i noszą wówczas nazwę makrofagów aktywnych - uzbrojonych.

W procesie aktywacji ważną rolę odgrywają receptory powierzchniowe makrofagów, wśród nich receptory dla fragmentu Fc immunoglobulin G /80/, komponenty C3 dopełniacza, specyficzne receptory dla limfocytów T /83/ i niespecyficzne receptory, poprzez które następuje wiązanie takich cząstek jak lateks, lektyny itp.

Mechanizm efektorowy fagocytów jednojądrzastych nie jest dokładnie poznany. Z jednej strony wiadomo iż makrofagi, aktywowane na drodze specyficznej bądź niespecyficznej mogą niszczyć komórki docelowe i proces ten jest niezależny od genów zgodności tkankowej i może także zachodzić między gatunkami.

W zjawisku cytotoksyczności, gdzie następuje ścisły kontakt między komórką efektorową, a docelową ważne wydaje się oddziaływanie niektórych cech komórki nowotworowej /85/. Wg Hibbs'a /47/ interakcja aktywowanych makrofagów i komórek docelowych pociąga za sobą destabilizację błonową u obu komórek, co doprowadza do miejscowego i przejściowego zlania się błon, a następnie przetransportowania zawartości wtórnych lizosomów stymulowanych makrofagów do komórek docelowych, co prowadzi do ich zniszczenia /11/.

Opisano szereg czynników, uwalnianych przez makrofagi, zdolnych do wywołania efektu cytotoksycznego /2,15,66,77,78,115/, ale ich dokładne znaczenie jest trudne do określenia. Stymulacja makrofagów jest związana ze zwiększoną sekrecją komponenty dopełniacza C3 i proteaz. Aktywacja dopełniacza powoduje rozszczepienie komponenty C3 na C3a, wykazującą cytotoksyczność i C3b, zdolną do indukowania sekrecji hydrolaz przez makrofagi.

Proteazy są odpowiedzialne za zmiany błony cytoplazmatycznej komórek docelowych, zaś czynnik glikoproteidowy, uwalniany przez makrofagi, powoduje martwicę nowotworów.

Mechanizm efektorowy fagocytów jednojądrzastych *in vivo* jest procesem kompleksowym, zależnym od czynników humoral-



nych i komórkowych /31,50,87,120/. W organizmie makrofagi często podlegają niespecyficznnej stymulacji bakteriami i ich produktami, pasożytami, preparatami terapeutycznymi wykazując immunologicznie swoistą reakcję.

Jednojądrzaste komórki fagocytarne, które *in vitro* nie wykazują zdolności cytotoksycznych /makrofagi niestymulowane/ lub ich poziom cytotoksyczności jest niski /makrofagi uzbrojone bądź stymulowane tioglikolanem sodu/ nie niszczą komórek nowotworowych *in vivo*.

Makrofagi wysoce cytotoksyczne *in vitro*, zachowują tę właściwość *in vivo*. Należą do nich syngeniczne i allogeniczne uczulone makrofagi, fagocyty aktywne - uzbrojone, specyficznie aktywowane makrofagi i normalne komórki fagocytarne, stymulowane zabitymi prątkami gruźlicy /BCG/.

Wszczepienie aktywowanych makrofagów zwierzęciu, z rozwiniętym procesem nowotworowym, powoduje gromadzenie się fagocytów dookoła komórek docelowych i zahamowanie ich wzrostu. Aktywowane makrofagi mogą być ważnymi komórkami efektorowymi, w zabezpieczeniu przed rozwojem procesu nowotworowego lub odgrywać dużą rolę w pozytywnych wynikach immunoterapii przy nowotworach, po hyperimmunizacji czynnikami niespecyficznymi /55,105/.

#### Supresorowe działanie makrofagów

Oprócz mechanizmów, warunkujących zdolność komórek immunologicznie kompetentnych do odpowiedzi na antygeny, makrofagi mają zdolność supresji odpowiedzi immunologicznej /54,73,74,124/. Supresja jest procesem energoniezależnym gdyż rolę supresora mogą pełnić zabite makrofagi, fragmenty błon fagocy-

tów i lizaty komórkowe /88/.

Ptak i Gershon /88/ podają dwie możliwości supresyjnego działania makrofagów na odpowiedź immunologiczną:

1. Mogą działać jako sygnał dla komórek limfocytarnych.

Limfocyty, umieszczone w hodowli razem z makrofagami, dążą do agregacji dookoła fagocytów, po czym, po kilku godzinach, odłączają się od ich powierzchni /96/.

2. Powierzchnie makrofagów mogą adsorbować czynniki uwalniane przez limfocyty, niezbędne do współdziałania komórek i w ten sposób powodują zmniejszenie interakcji komórek, biorących udział w odpowiedzi immunologicznej. Czynniki te, uwalniane przez komórki T mają duże powinowactwo do powierzchni makrofagów /48/.

Wg Rao i wsp. /92/ makrofagi wykazują działanie supresyjne w obecności przeciwciał. W supresji związanej z przeciwciałami, dotyczącej przeszczepów syngenicznych nowotworów u myszy, biorą udział makrofagi, które nie wykazują funkcji fagocytarnych /104/.

Wg Kung'a i wsp. /46/ istotną rolę w immunosupresji in vivo ma arginaza, uwalniana przez makrofagi.

Mechanizm supresji makrofagów pozostaje w dalszym ciągu niewyjaśniony.

M i g r a c j a   m a k r o f a g ó w . Migracja makrofagów jest procesem aktywnym, energozależnym /71,122,123/. Głównym źródłem energii lokomotorycznej jest prawdopodobnie glikoliza beztlenowa /12/. Inhibitory glikolizy hamują migrację makrofagów.

Bezpośrednio za ruch komórki, odpowiedzialne są pęczki włókienek cytoplazmatycznych. Twory te, zbudowane z łańcuchów polipeptydowych, powstają w wyniku polimeryzacji cytoplazmy podstawowej, w związku ze stanem czynnościowym komórki np. ruchem /131/. Pojawiają się głównie w tej części makrofaga, która pozostaje w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią, gdzie następuje przesuwanie się komórki. Włókienka cytoplazmatyczne składają się w głównej mierze z aktynu, odpowiedzialnego za skurcz pęczków włókien. Kurczenie się włókienek cytoplazmatycznych jest kontrolowane i koordynowane przez rureczki /mikrotubuli/ i włókienka /mikrofilamenty/ sfery promienistej /astrosfery/, odchodzące promieniście od centrum komórkowego w kierunku błony cytoplazmatycznej /129/. Fizjologicznie, rureczki i włókienka astrosfery działają supresyjnie na pęczki włókienek cytoplazmatycznych, utrzymując skurcz na minimalnym poziomie, co manifestuje się powolnym ruchem komórki, określanym mianem migracji spontanicznej.

R e c e p t o r y   p o w i e r z c h n i o w e   m a k r o -  
f a g ó w   i   i c h   f u n k c j a   w   p r o c e s i e  
f a g o c y t o z y . Błona komórkowa makrofagów przypomina, swoją budową płynną mozaikę /106/. Składa się z podwójnej warstwy fosfolipidów, w którą zanurzone są cząsteczki białkowe. Białka te mogą wiązać się z poszczególnymi warstwami lipidów lub pozostawać w stanie wolnym, tworząc połączenie między cytoplazmą, a środowiskiem zewnątrzkomórkowym /76/.

Na powierzchni błony komórkowej makrofagów, wykazano obecność szeregu receptorów, różnego typu /10,34,90,99,101,119,125/. Najlepiej poznana grupa receptorów to receptory Fc,

które wiążą  $\gamma$  globuliny. Ich budowa chemiczna nie jest znana, wiadomo jednak iż receptory Fc są wrażliwe na działanie fosfolipoz, zaś pod wpływem enzymów proteolitycznych pozostają niezmienione /45,94,113/.

Drugą grupę receptorów powierzchniowych stanowią receptory dla komponenty C3b dopełniacza. Z badań Griffina i wsp. /39, 40,41/ oraz Bianco /5/, Mantovanniego /61/ i Hollanda /48/ wynika, że receptory Fc i C3b znajdują się na oddzielnych cząsteczkach, a więc funkcjonalnie są niezależne od siebie jeśli chodzi o fazę przylegania i pochłaniania materiału cząsteczkowego. Receptory Fc są odpowiedzialne za adherencję i fagocytozę cząstek, pokrytych IgG natomiast receptory C3b ułatwiają przyleganie cząstek, pokrytych C3, ale nie biorą udziału w pochłanianiu tych cząstek.

Najważniejszym czynnikiem, rządzącym losem cząsteczki, jest obecność opsonin na jej powierzchni. Efekt opsonizacyjny komponenty C3b dopełniacza polega na zmniejszeniu ładunku, jaki wykazuje powierzchnia cząsteczki /23/ i w efekcie następuje łatwiejsze połączenie z komórką fagocytarną w polu elektrostatycznym.

Jakkolwiek immunoglobuliny i dopełniacz zmieniają ładunek i topograficzne rozmieszczenie poszczególnych komponent na powierzchni cząsteczki, jest rzeczą oczywistą, że faza przylegania i interioryzacja jest specyficznym i skoordynowanym działaniem pomiędzy przeciwciałami IgG i dopełniaczem, a ich odpowiednikami - receptorami dla fragmentu Fc przeciwciała i komponenty C3b na błonie komórkowej makrofagów /35/.

Gallin i wsp. /32/ zauważyli, że aktywowane makrofagi wykazują hyperpolaryzację błonową, co związane jest ze spad-

kiem oporności błony cytoplazmatycznej. Dalsze badania wykazały iż zmiany potencjału błonowego następują pod wpływem frakcji C5 dopełniacza, która działając na komórki fagocytarne, wywołuje depolaryzację, z jednoczesną zmianą przepuszczalności błony komórkowej, poprzedzoną większą i dłużej trwającą hyperpolaryzacją. Jednoczesne badania mikroskopowe dowodzą, iż zmiany potencjału dają w efekcie rozprzestrzenianie się i pofałdowanie błony cytoplazmatycznej a także tworzenie pseudopodiów. Zjawiska elektryczne na błonie makrofagalnej mogą być odpowiedzialne za zapoczątkowanie i kontrolę funkcji fizjologicznych komórki np. fagocytoza.

W przypadku fagocytozy materiału cząsteczkowego, proces ten może być podzielony na dwie fazy /91/:

- I - przyleganie cząsteczki do powierzchni komórki
- II - wchłanianie cząsteczki

Pierwsza faza jest energoniezależna, druga natomiast jest wysoce temperaturozależna i wymaga aktywnego metabolizmu komórkowego.

Współdziałanie eptonin z odpowiednimi receptorami, na błonie cytoplazmatycznej makrofaga, wywołuje sygnał, który, przenoszony do cytoplazmy reguluje proces fagocytozy. Odpowiedź błony cytoplazmatycznej makrofaga jest ograniczona tylko do tej części błony, która przylega bezpośrednio do cząsteczki, inicjującej sygnał. Griffin i wsp. /39/ wysunęli koncepcję sygnału zapalającego /trigger/, który rozpoczyna interioryzację cząsteczki. Wielkość i rodzaj odpowiedzi błony cytoplazmatycznej makrofaga na stymulanty fagocytarne zależy od ilości, rozmiaru i kształtu cząstek przylegających.

Tak więc zdolność makrofagów do odpowiedzi komórkowej jest modyfikowana przez cząstkę, ulegającą fagocytozie, a nie zapoczątkowana przez specyficzne stymulatory. Zgodnie z tym, kolejne współdziałanie receptorów błonowych z opsoninami, przyczepionymi do cząstki może dawać przesunięcie błony dookoła cząstki /mechanizm zipper, określający przeciwciała, pośredniczące w obwodowym rozprzestrzenianiu się błony cytoplazmatycznej makrofaga dookoła cząstki/.

Istnieją więc dwa prawdopodobne mechanizmy pochłaniania cząsteczek. Jeśli cząstki, pokryte są właściwymi opsoninami /IgG, C3b/ to fagocytoza następuje poprzez mechanizm "trigger", inicjowany przez przyleganie cząstek do receptorów błony cytoplazmatycznej makrofaga, a następna faza odbywa się lawinowo nawet po usunięciu opsonin z nieprzyczepionych powierzchni cząstek lub kiedy receptory, które nie zostały wciągnięte w początkowe stadium przylegania są zablokowane.

Jeśli natomiast interioryzacja przyczepionych cząstek wymaga stopniowej integracji przeciwciał i właściwych receptorów makrofaga wtedy, w momencie usunięcia przeciwciał z nieprzylegającej, bezpośrednio do komórki powierzchni cząsteczki lub zablokowania receptorów - nie występuje II faza fagocytozy czyli interioryzacja cząsteczki. Jednakże hipoteza "zipper", tłumacząca selektywny i specyficzny proces fagocytozy nie jest wyjaśniona dokładnie.

Współdziałanie receptorów i przeciwciał inicjuje agregację kurczliwych białek /aktynu i miozynu/ w cytoplazmie makrofagów, co prowadzi do wysuwania pseudopodiów w polu, przylegającej cząsteczki /8,65/. Receptory na błonie cytoplazmatycznej, wysuwających się pseudopodii, przyczepiają się do

dodatkowych przeciwciał na powierzchni cząsteczki, w rezultacie wywołuje to dodatkowe sygnały, następującą agregację białek kurczliwych cytoplazmy i dalsze wysuwanie pseudopodii. Proces powtarza się wiele razy, dopóki błony cytoplazmatyczne, wysuwających się niby nóżek spotkają się i połączą ze sobą, tworząc wodniczkę fagocytarną.

Druga faza fagocytozy wymaga energii metabolicznej. Energia ta jest konieczna do przesunięcia błony cytoplazmatycznej makrofaga dookoła cząsteczki i połączenia błon, tworzących się pseudopodiów /95/. Źródłem energii jest utlenianie glukozy do pirogronianu i mleczanu /52/.

Następnym etapem fagocytozy, po utworzeniu fagosomu jest uwolnienie enzymów lizosomalnych do wodniczki fagocytarnej. Współdziałanie komponenty C3b dopełniacza z receptorem dla frakcji C3 na błonie cytoplazmatycznej makrofaga, prowadzi do uwolnienia lizosomalnych hydrolaz /100/, które mogą rozszczepiać C3 na C3a i C3b, i w ten sposób utworzona komponenta C3b dopełniacza indukuje dalsze uwolnienie enzymów lizosomalnych.

Regulacja metaboliczna w momencie fagocytozy cząstek, uwarunkowana receptorami Fc i C3 różni się od fagocytozy cząstek, niezależnej od opsonin /67,68/. Interioryzacja tych cząstek jest uwarunkowana niezidentyfikowanymi komponentami błony komórkowej, które wydają się być funkcjonalnie, strukturalnie i metabolicznie niezależne od receptorów Fc i C3 /22/. Poprzez te niespecyficzne receptory, zostają związane niepatogenne szczepy bakterii, cząsteczki węgla, lateksu, zymosanu, lektyny roślinne, czynnik hamujący migrację itp.

Mechanizm uszkodzenia i zabezpieczenia komórek podczas procesu zamrażania. Zamrażanie jest przemianą fazową, która w czystym rozpuszczalniku powoduje zmianę stanu skupienia.

Obecność komórek w roztworze, podlegającym zamrażaniu powoduje iż zachodzące zjawiska fizyczne są bardziej złożone. Ze względu na istniejące błony komórkowe, skład roztworu wewnątrzkomórkowego różni się od płynu zewnątrzkomórkowego. Proces powolnego ochładzania, proces zamrażania, zaczyna się w środowisku, otaczającym komórki zaś wewnątrz komórki pozostaje niezamrożone nawet przy znacznie obniżonych temperaturach, pomimo obecności lodu zewnątrzkomórkowego /63/. Proces krystalizacji składa się z powstawania zarodków krystalizacji, których ilość na zewnątrz komórki jest znaczna. Płyn wewnątrzkomórkowy, składający się z substancji zarówno o dużej jak i małej masie cząsteczkowej powoduje iż czasy powstawania zarodków krystalizacji obniżają się do niższych temperatur w obrębie komórki. W związku z tym, roztwór w obrębie komórki, oziębionej do temperatury jednakowej ze środowiskiem zewnętrznym ulega przechłodzeniu, a ciśnienie pary wody wewnątrzkomórkowej jest wyższe od ciśnienia lodu zewnątrzkomórkowego. Różnica ta powoduje dyfuzję wody z komórki, która odkłada się na zewnątrz, powodując wzrost kryształów lodu /57/. Najbardziej istotnymi przyczynami, uszkadzającymi komórki podczas zamrażania są: zmiany stężenia rozpuszczalnika wewnątrzkomórkowego i formowanie się lodu wewnątrz komórki /121/. Podczas zamrażania następuje wzrost stężenia soli w środowisku



zewnątrzkomórkowym, co powoduje przepuszczalność błony komórkowej dla kationów sodu. Cząsteczki soli, a w konsekwencji i wody zaczynają przenikać do komórki, następuje pęcznienie i pękanie komórek. Inną główną przyczyną uszkodzeń, powstających podczas zamrażania jest formowanie się lodu wewnątrzkomórkowego. Jeżeli proces chłodzenia przebiega tak szybko, iż z powodu braku czasu, kurczenie się komórki nie może nastąpić przed zamrożeniem wewnątrzkomórkowym, wówczas w komórce powstają kryształy lodu. Proces krystalizacji nie zawsze jest letalny dla komórki i zależy od sposobu rozmrażania /26/. Powolne rozmrażanie komórek, szybko chłodzonych, powoduje iż małe kryształy lodu, powstałe w trakcie zamrażania, rosną i skupiają się, powodując rozerwanie komórki.

Szybkie rozmrażanie zwiększa szanse przeżycia w porównaniu do rozmrażania powolnego, brak jest czasu dla wzrostu kryształów wewnątrzkomórkowych przed osiągnięciem punktu topnienia.

Ograniczenie uszkodzeń, powstałych w wyniku zamrażania uzyskuje się poprzez stosowanie środków osłaniających. Mogą to być substancje, które przenikają do komórki przed zamrożeniem /gliceryna, DMSO, acetamid/ lub nie przenikają do komórek /sacharoza/. Przy powolnym zamrażaniu, uszkodzenia komórki są następstwem przenikania, normalnie nieprzepuszczalnej soli. Jeśli część tej soli, zostanie zastąpiona przez inną substancję, przenikającą do komórki, ale nie szkodliwą to w całym układzie zajdzie szereg istotnych zmian. Ilość soli, przepuszczalnej do komórki ulegnie zmniejszeniu, ponieważ siła napędowa, warunkująca przenikanie zostanie ograniczona. Obecność substancji osłaniającej wewnątrz komórki będzie obniżać ciśnienie pary wody wewnątrzkomórkowej do poziomu ciśnienia pa-

ry wodnej w środowisku zewnętrznym, a więc prędkość i wielkość kurczenia się komórki w reakcji na zamrażanie zewnętrzne będzie mniejsze.

Płyny osłaniające nie powodują uszkodzenia osmotycznego pod wpływem pęcznienia w czasie rozmrażania gdyż łatwo przemieszczają się do komórki i z komórki. Istotne znaczenie ma również usuwanie czynnika osłaniającego z komórek. Aby uniknąć szoku hipertonicznego, spowodowanego nagłymi zmianami osmolarności, usunięcie DMSO czy glicerolu musi być powolne, poprzez rozcieńczanie zawiesiny komórek medium o temperaturze pokojowej /49/.

### 3. MATERIAL I METODY

Doświadczenia wykonano na myszach Swiss, 6-8 tygodniowych wazących ok. 20 g.

#### A. Schemat doświadczenia

Makrofagi otrzewnowe z dodatkiem środka kriochronnego /DMSO - dwumetylosulfotlenek/ umieszczano w silikonowanych ampulkach i schładzano w urządzeniu do programowanego zamrażania materiału biologicznego w sposób owiewowy, do temperatury  $-196^{\circ}\text{C}$ . Następnie przenoszono ampulki do zbiorników z ciekłym azotem. Komórki rozmrażano po upływie 24 godz., 3 dni, 1 tygodnia, 2 tygodni, 1 miesiąca, 2 miesięcy i 3 miesięcy przechowywania.

Po rozmrożeniu oceniano następujące parametry:

1. Wielkość odzysku komórek
2. Żywotność
3. Poziom fagocytozy
4. Zdolność spontanicznej migracji
5. Efektywność receptorów Fc
6. Efektywność receptorów C3
7. Cytotoksyczność nieswoistą

Wszystkie doświadczenia wykonano w trzech powtórzeniach, w obecności kontroli, którą stanowiły makrofagi niemrożone, pobierane od zwierząt w dniu oceny poszczególnych prób makrofagów zamrożonych.

Wyniki przedstawiono w procentach, w stosunku do wartości kontrolnych, przyjętych jako 100%.

## B. Stosowane metody

a. Przygotowanie makrofagów do przechowywania. Celem otrzymania dużej ilości komórek, stymulowano myszy olejem parafinowym, podawanym do otrzewnowo w ilości 2 ml. Po 96 godz. zwierzęta skrwawiano, przez podcięcie naczyń szyjnych. Wysiłek otrzewnowy zbierano, przepłukując jamę otrzewnową 0,9% roztworem NaCl z dodatkiem 5 j. heparyny/ml. Zawiesinę komórek odwirowywano, przepłukiwano 0,9% roztworem NaCl, osad zawieszano w zdekomplementowanej surowicy cielęcej doprowadzając koncentrację do  $4 \times 10^6$  komórek /ml.

b. Mieszanina zamrażająca. Mieszanina zamrażająca składała się z: 3 części płynu Eagle'a MEM, 3 części 20% glukozy i 4 części dwumetylosulfotlenku /DMSO/. Do 3 części zawiesiny komórkowej dodawano 1 część mieszaniny zamrażającej i umieszczano w silikonowych ampułkach, w ilości po 1 ml /33/. Ampułki zamykano, zatapiając w płomieniu palnika. Próbkę schładzano do temp.  $4^{\circ}\text{C}$  /277 K/ wstawiając je do lodówki.

c. Proces zamrażania. W początkowym okresie zastosowano kilka metod schładzania. Celem było wybranie takiego schematu zamrażania, który pozwoliłby na uzyskanie maksymalnej ilości żywych komórek.

Poszczególne schematy zamrażania makrofagów:

- I. Chłodzenie z prędkością 0,5 deg/min do temp.  $-25^{\circ}\text{C}$  /248K/ a następnie z prędkością 70 deg/min do temp.  $-173^{\circ}\text{C}$  /100K/
- II. Chłodzenie z prędkością 1 deg/min do temp.  $-30^{\circ}\text{C}$  /243 K/ a następnie z prędkością 16 deg/min do temp.  $-173^{\circ}\text{C}$  /100K/

- III. Chłodzenie z prędkością 1 deg/min do temp.  $-25^{\circ}\text{C}$  /248K/  
a następnie z prędkością 30 deg/min do temp.  $-173^{\circ}\text{C}$  /100K/
- IV. Chłodzenie z prędkością 2 deg/min do temp.  $-25^{\circ}\text{C}$  /248K/  
a następnie z prędkością 70 deg/min do temp.  $-173^{\circ}\text{C}$  /100K/
- V. Chłodzenie z prędkością 3 deg/min do temp.  $-15^{\circ}\text{C}$  /258K/  
a następnie z prędkością 30 deg/min do temp.  $-173^{\circ}\text{C}$  /100K/
- VI. Chłodzenie z prędkością 3 deg/min do temp.  $-25^{\circ}\text{C}$  /248K/  
a następnie z prędkością 70 deg/min do temp.  $-173^{\circ}\text{C}$  /100K/
- VII. Chłodzenie z prędkością 4,4 deg/min do temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  /253K/  
a następnie z prędkością 70 deg/min do temp.  $-173^{\circ}\text{C}$  /100K/
- VIII. Chłodzenie z prędkością 5 deg/min do temp.  $-25^{\circ}\text{C}$  /248K/  
a następnie z prędkością 70 deg/min do temp.  $-173^{\circ}\text{C}$  /100K/
- IX. Chłodzenie z prędkością 6 deg/min do temp.  $-25^{\circ}\text{C}$  /248K/  
a następnie z prędkością 70 deg/min do temp.  $-173^{\circ}\text{C}$  /100K/
- X. Chłodzenie z prędkością 21 deg/min do temp.  $-42^{\circ}\text{C}$  /228K/  
a następnie zanurzenie w ciekłym azocie
- XI. Bezpośrednie zanurzenie w ciekłym azocie  $-196^{\circ}\text{C}$  /74K/

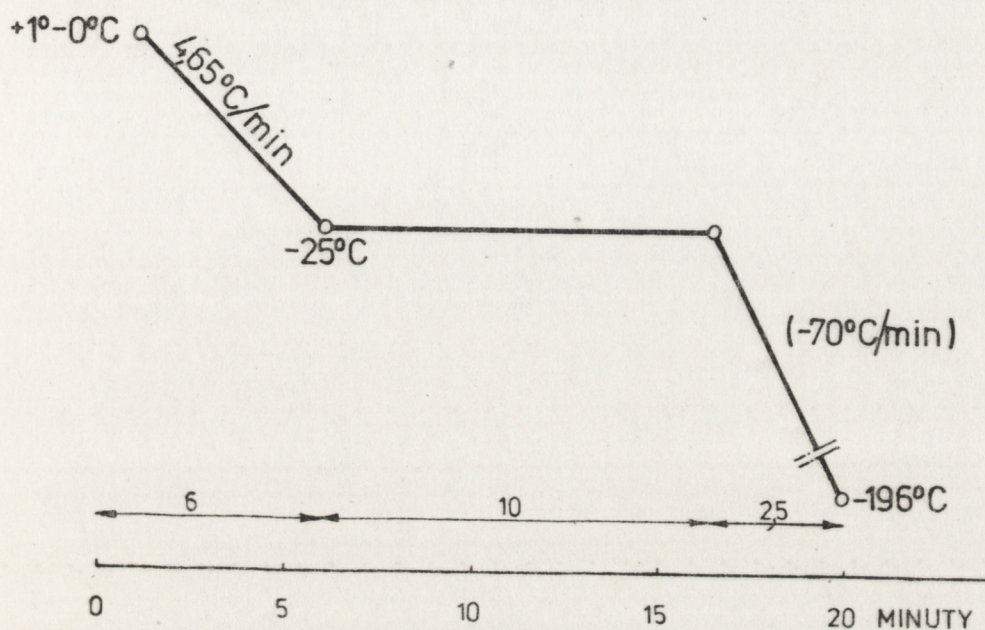
Równolegle zamrażano ampułki, zawierające makrofagi otrzewnowe z dodatkiem środka kriochronnego i ampułki, w których umieszczono makrofagi w medium, bez dodatku DMSO. Efektywność poszczególnych metod zamrażania sprawdzano oceniając żywotność komórek po rozmrożeniu. Opierając się na wynikach, otrzymanych przy różnych sposobach schładzania wybrano jako sposób optymalny zamrażania z szybkością 5 deg/min do temp.  $-25^{\circ}\text{C}$  /248K/, a po 10 minutach przetrzymywania, z prędkością 70 deg/min do  $173^{\circ}\text{C}$  /100K/.

Zamrażanie makroflagów przeprowadzano w sposób kontrolowany w komorze, z nadmuchem zimnego gazu na ampułki. Temperaturę strumienia gazu, napędzanego wentylatorem, regulowano poprzez wtrysk ciekłego azotu. Dopływ ciekłego azotu sterowano przy użyciu programera, realizującego nastawiony przebieg temperatury w komorze.

Sterowanie procesem zamrażania prowadzono w oparciu o pomiar temperatury gazu w komorze. Dla oceny rozbieżności pomiędzy rozkładem temperatury wewnątrz ampułki i w komorze do zamrażania, przeprowadzano jednocześnie pomiary temperatury powierzchni ampułki, zamrażanej cieczy mniej więcej w środku geometrycznym jej objętości i temperatury gazu w komorze. Do pomiarów zastosowano termometry termoelektryczne żelazo - konstantan, w metalowej osłonie o średnicy 0,25 mm.

Ampułki zamrażano z prędkością 4,65 deg/min do temp.  $-25^{\circ}\text{C}$  /248K/ i po 10 minutach przetrzymywania w tej temperaturze, temperaturę obniżano z prędkością 70 deg/min do  $-173^{\circ}\text{C}$  /100K/ ryc.2/

Po zamrożeniu ampułki przenoszono do zbiorników z ciekłym azotem i przechowywano je w temp. 77 K przez okres od 24 godz. do 3 miesięcy.



Rycina 2. Schemat dwustopniowego zamrażania makrofagów otrzewnowych myszy

d. Rozmrażanie makrofagów. Rozmrażanie komórek przeprowadzono poprzez przeniesienie ampułek bezpośrednio z ciekłego azotu do łaźni wodnej o temp.  $37^{\circ}\text{C}$ . Zawiesinę komórek przepłukano inaktywowaną surowicą cielecą, osad zawieszano w surowicy.

e. Odzysk komórek. Określano go procentowo, porównując liczbę makrofagów, uzyskaną po rozmrożeniu, w stosunku do ogólnej liczby komórek zamrożonych.

f. Żywotność komórek. Oznaczano przy pomocy testu z 0,25% błękitem trypanu. Komórki liczone w komorze Bürkera, określając procentową zawartość żywych, niewybarwionych komórek.

g. Zdolność fagocytozy. Do oznaczania poziomu fagocytozy makrofagów używano krwinek barana, opłaszczonych surowicą hemolityczną.

Przygotowanie komórek docelowych: krwinki barana przepłukano czterokrotnie 0,9% roztworem NaCl, sporządzając zawiesinę 25%. Do znakowania komórek chromianem sodu  $^{51}\text{Cr}$  używano  $3 \times 10^8$  komórek i 300  $\mu\text{Ci}$   $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ . Tak przygotowaną mieszaninę inkubowano w łaźni wodnej w temp.  $37^\circ\text{C}$ , przez 60 min stale mieszając /3/.

Po wyznakowaniu, zawiesinę komórek odwirowywano /2000 obr. przez 10 min/, po usunięciu nadsącza, osad krwinek przepłukano trzykrotnie buforem weronalowym GVB, przygotowując 1% zawiesinę krwinek w GVB.

Do 10 ml 1% krwinek barana, wyznakowanych  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  /SRBC $^{51}\text{Cr}$ / dodano 10 ml 0,0025% roztworu surowicy hemolitycznej w GVB. Inkubację przeprowadzano w temp. pokojowej przez 15 min, po czym zawiesinę komórek odwirowywano, osad zawieszano w płynie Eagle'a MEM, doprowadzając liczbę SRBC $^{51}\text{Cr}$  do  $10^8$  komórek w 1 ml medium.

Do testu fagocytozy używano  $10^6$  makrofagów i  $10^7$  erytrocytów barana, znakowanych  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ . Medium w ilości 1 ml stanowił płyn Eagle'a MEM z dodatkiem 20% inaktywowanej surowicy cielęcej. Probówki z zawiesiną makrofagów i komórek docelowych inkubowano w temp.  $37^\circ\text{C}$ , w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  w powietrzu, przez okres 4 godzin. Po 4 godzinach do każdej probówki dodawano 2 ml płynu Eagle'a w celu zatrzymania reakcji /120/. Po odwirowaniu /1600 obrotów, 10 min/ ostrożnie zciągnięto nadsącz, przenosząc go do innej probówki. Radioaktywność tego nadsącza była miarą spontanicznie uwolnionego chromu ze znakowanych krwinek. Osad komórek, pozostały po usunięciu supernatantu zawierał makrofagi, sfagocytowane SRBC $^{51}\text{Cr}$  i wolne erytrocyty barana, przyłączone lub nie do makrofagów.



Do osadu tego dodawano 2 ml wody destylowanej dla wywołania szoku osmotycznego krwinek. Po dokładnym wymieszaniu, zawiesinę komórek pozostawiono na 5 min. w temp. pokojowej, po czym odwirowano, zbierając nadsącz i mierząc jego aktywność w liczniku /Gamma - counter Tesla/. Wartość uzyskana jest miarą chromu, uwolnionego z niesfagocytowanych erytrocytów barana, pozostających na zewnątrz makrofagów. Osad komórek zawieszano w 1 ml 0,9% roztworu soli i oznaczano jego radioaktywność, ilość impulsów, pochodziła z chromu, związanego z erytrocytami barana, które uległy interioryzacji przez makrofagi. Całkowitą radioaktywność w każdej próbówce obliczano, dodając aktywność  $^{51}\text{Cr}$  we wszystkich trzech, uzyskanych frakcjach.

Procent sfagocytowanych krwinek barana obliczano, posługując się następującym wzorem:

$$\% \text{ sfagocytowanych SRBC } ^{51}\text{Cr} = \frac{C}{A + B + C} \times 100\%$$

gdzie:

- A - radioaktywność nadsączu, będąca miarą spontanicznie uwolnionego  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$
- B - radioaktywność, pochodząca z  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  uwolnionego poprzez hemolizę niesfagocytowanych erytrocytów
- C - radioaktywność osadu, wskazująca na ilość  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  związanego z erytrocytami, które uległy interioryzacji przez makrofagi

h. Test migracji makrofagów. Zawiesinę  $25 \times 10^6$  makrofagów odwirowano /1600 obrotów, 10 min/, nadsącz usuwano, a do osadu komórek dodawano 0,1 ml osocza mysiego. Po dokładnym wymieszaniu pipetą pasteurowską, do każdej próbki dodawano 0,1 ml 0,1% roztworu siarczanu protaminy /Roche/, a następnie 0,2 ml trombiny /400 j/ml/. Po kilkunastu sekundach tworzyły się skrzepy, które cięto na korku, na fragmenty wielkości ok.  $1 \text{ mm}^3$ . Tak przygotowane fragmenty skrzepu, umieszczano w centrum baseników pleksiglasowej płytki /Linbro/ i dodawano 0,2 ml medium, stanowiącego płyn Eagle'a MEM z dodatkiem 20% inaktywowanej surowicy cielęcej. Płytkę pozostawiono w temp.  $37^\circ\text{C}$ , w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  w powietrzu, przez okres 24 godz. Po tym czasie odczytywano, przy użyciu powiększalnika, wielkość migracji, obrysowując na papierze jej zasięg i granicę skrzepu. Wartości migracji skrzepowej przedstawiano w postaci różnicy pierwiastków  $R_a$  pomiędzy pierwiastkiem z pola całości: migracji i skrzepu  $/S_I/$  a między pierwiastkiem pola skrzepu  $/S_{II}/$

$$R_a = S_I - S_{II}$$

i. Zdolność tworzenia roetek EA i EAC jako wyraz ekspresji receptorów Fc i C3. Przygotowanie opłaszczonych erytrocytów barana /39/: Krwinki barana, zawieszono w płynie Alsever'a, przepłukiwano trzykrotnie w 0,9% roztworze NaCl, sporządzając 5% zawiesinę erytrocytów w buforze weronalowym /VBG/. Jako źródło komponent C1, C4, C2, C3 dopełniacza używano surowicy

myszy AKR z defektem C5 dopełniacza. Próbki surowicy w objętości 0,1 ml były zamrażane i przechowywane w temp.  $-70^{\circ}\text{C}$  /200K/. Ig G królika /Cordis, Miami/, skierowane przeciw erytrocytom barana /13 mg białka/ml/ były używane w rozcieńczeniu 1 : 1000. Ig M królika /Cordis, Miami/, skierowane przeciw erytrocytom barana /0,04 mg/ml/ były stosowane, rozcieńczone 1 : 100.

1 ml 5% zawiesiny erytrocytów barana w płynie Eagle'a MEM inkubowano z 1 ml Ig G królika przeciw krwinkom barana, rozcieńczonej 1 : 1000 w 0,9% roztworze NaCl i analogicznie 1 ml 5% SRBC zmieszano z 1 ml Ig M królika, rozcieńczonej 1 : 100. Mieszanki pozostawiano w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  przez 15 minut. Do opłaszczonych, przeciwciałami Ig M, erytrocytów barana dodawano równą ilość surowicy myszy AKR, rozcieńczonej w buforze weronalowym GVB w stosunku 1 : 10 i inkubowano w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  /307K/ przez 10 min.

Zawiesiny erytrocytów opłaszczonych Ig G /EA/ i IgM oraz C<sup>e</sup> /EAC/ odwirowywano przez 5 min w temp. pokojowej /2000 obrotów/. Sporządzano 0,5% zawiesiny opłaszczonych erytrocytów barana w płynie Eagle'a MEM i pozostawiano przez 30 min w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ .

Makrofagi po rozmrożeniu, umieszczano w basenikach płytki pleksyglasowej /Linbro/, zawierających na dnie lamelki wielkości 11 x 11 mm. Koncentracja komórek w jednym baseniku płytki wynosiła  $5 \times 10^5$  makrofagów. Medium w ilości 2 ml składało się z płynu Eagle'a z 15 mM Hepes /Sigma/ + 20% zdekompentowanej surowicy cielecej. Po 4 godz. inkubacji w temp.  $37^{\circ}\text{C}$ , usuwano medium znad lamelek, lamelki przepłukiwano płynem Eagle'a MEM t 15 mM Hepes i pozostawiano w tym

pływie przez 30 min. inkubacji płytki w temp. 4°C. Po tym czasie do każdego z baseników płytki dodawano 0,2 ml 0,5% EA lub EAC i inkubowano przez 60 min. w temp. 4°C. Po 1 godz. lamelki przepłukiwano zimnym płynem Eagle'a MEM, suszono, utrwalano metanolem i barwiono metodą Giemsy - May Grünwalda. Oglądano w mikroskopie świetlnym, pod imersją, w powiększeniu 2000 razy, licząc ilość komórek, z przyczepionymi do ich powierzchni erytrocytami /co najmniej 3 krwinki/. Procentowa zawartość komórek, tworzących rozetki EA i EAC określano w stosunku do ogólnej ilości komórek równej 300.

j. C y t o t o k s y c z n o ś ć n i e s w o i s t a .  
Przygotowanie komórek docelowych: Komórki raka Ehrlicha, rosnące w postaci zawiesiny w płynie puchlinowym jamy otrzewnej myszy pasażowano na myszach Swiss, podając 0,2 ml zawiesiny komórek w ilości  $10^7$ . Po 10 dniach pobierano komórki raka Ehrlicha, trzykrotnie przepłukując 0,9% roztworem NaCl i odwirowując /2000 obr., 10 min/. Zawiesinę komórek raka w ilości  $3 \times 10^7$ /ml płynu Eagle'a inkubowano z 300 qCi  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  w łaźni wodnej, w temp. 37°C /307 K/ przez 60 min, stale mieszając. Niezwiązany z komórkami raka Ehrlicha  $^{51}\text{Cr}$  odpłukiwano przez czterokrotne przepłukiwanie komórek płynem Eagle'a MEM. Po czym liczone komórki raka, doprowadzając ilość do  $2 \times 10^6$ /ml medium.

Makrofagi otrzewnowe myszy po rozmrożeniu, umieszczano w probówkach w ilości  $10^6$  komórek/ml medium składającego się z płynu Eagle'a MEM + 20% zdekompementowanej surowicy cielej. Do tak przygotowanej zawiesiny komórek dodawano 0,01 ml komórek raka Ehrlicha /RE/, znakowanych  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ .

Stosunek komórek efektorowych do docelowych wynosił 50:1. W analogiczny sposób przygotowano test, używając makrofagów niezamrożonych, kontrolnych.

Miarą spontanicznego uwolnienia chromu były próby, zawierające medium i komórki docelowe bez obecności makrofagów, jako komórek efektorowych.

Probówki umieszczano w temp. 37°C /307 K/, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> w powietrzu, na okres 4 godzin. Po upływie tego czasu, próby odwirowano /2000 obr., 10 min/ i zciągano połowę objętości nadsącza, przenosząc go do odpowiednich probówek.

Radioaktywność prób mierzono w liczniku /Gamma counter Tesla/. Miarą cytotoksyczności była procentowa ilość uwolnionego <sup>51</sup>Cr w stosunku do całej ilości <sup>51</sup>Cr, wprowadzonego z komórkami raka Ehrlicha do zawiesiny makrofagów. Wartości oceniano po odjęciu ilości, spontanicznie uwolnionego Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>. Miarą zdolności cytotoksycznej makrofagów była ilość impulsów, pochodząca z uwolnionego Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> z komórek raka Ehrlicha obliczona w oparciu o wzór:

$$\% \text{ uwolnionego } ^{51}\text{Cr} = \frac{2 \times A}{A + B} \times 100\%$$

gdzie:

A - połowa nadsącza, zebranego po odwirowaniu próby zawierającego uwolniony <sup>51</sup>Cr z komórek docelowych.

B - nadsącz i osad, czyli ilość <sup>51</sup>Cr, wprowadzona do zawiesiny makrofagów na początku testu.

Analogicznie obliczano wartości w kontroli, gdzie procent uwolnionego chromu był miarą spontanicznej lizy komórek docelowych.

Cytotoksyczność makrofagów = D - K

gdzie:

D - procent uwolnionego  $^{51}\text{Cr}$  w zawieszynie makrofagów

K - procent spontanicznie uwolnionego chromu

### C. Metody statystyczne

Uzyskane wyniki interpretowano w postaci wartości bezwzględnych /X/. Z wyników kolejnych pomiarów w grupach, wyliczano średnie  $\bar{x}$ , odchylenia standardowe /SD/ i standardowe błędy średnich /SE/.

Oceniając żywotność komórek po rozmrożeniu porównywano średnie wartości żywych komórek po zamrożeniu i przed zamrożeniem, testem t Studenta. Z uwagi na to, iż wartości leżały poza granicami 20-80% stosowano transformację  $y = \arcsin \sqrt{p}$  gdzie p jest frakcją. Dla porównania wartości t stosowano analizę wariancji jednoczynnikowej. /Transformacja arcsin  $\sqrt{p}$  jest konieczna dla wystabilizowania wariancji i znormalizowania rozkładu frakcji jeśli rozkład nie jest rozkładem normalnym/.

Oceniając stopień odzysku komórek stosowano test t - Studenta, po uprzedniej transformacji  $y = \arcsin \sqrt{p}$ , ze względu na to iż procenty  $> 80$ . Porównując odzysk komórek w poszczególnych 7 grupach stosowano analizę wariancji.

Przy ocenie istotności różnic między zdolnością fagocytozy makrofagów zamrożonych i niezamrożonych, obliczano wspólny błąd losowy dla każdej pary, porównywanych grup /makrofagi

zamrożone i kontrolne/. Średnie, będące średnimi z trzech eksperymentów, porównywano zmodyfikowanym testem t Studenta

$$t = \frac{\bar{X}_{\text{zamroz}} - \bar{X}_{\text{kontr}}}{D_{\text{różnicy}}} \quad \text{gdzie}$$

$D_{\text{różnicy}}$  - ocena różnicy wspólnych wariancji.

Wszystkich obliczeń dokonano na zmiennych transformowanych  $y = \arcsin \sqrt{p}$  gdzie  $p$  oznacza frakcję.

Oceniając zdolność spontanicznej migracji makrofagów zamrożonych i kontrolnych, porównywano średnie między sobą, posługując się testem t - Studenta.

Przy ocenie zdolności cytotoksycznej, porównywano średnie makrofagów zamrożonych i kontrolnych testem t - Studenta po uprzednim transformowaniu  $y = \arcsin \sqrt{p}$ , gdzie  $p$  jest frakcją.

Oceniając zdolność ekspresji receptorów, poprzez ilość wytworzonych rozetek, porównywano średnie makrofagów zamrożonych i niezamrożonych testem t - Studenta, a następnie obliczono wspólny błąd losowy, metodą analizy wariancji jednoczynnikowej.

Ocenę istotności różnic między makrofagami zamrożonymi a kontrolnymi, przeprowadzano na poziomie istotności  $p = 0,01$ .

Uzyskane średnie wyniki przedstawiono w postaci tabel, zawierających  $\bar{X}$ , SD, SE,  $\arcsin \sqrt{p}$  i istotność różnic między średnimi na poziomie istotności  $p = 0,01$ .

#### 4. W Y N I K I

##### S c h e m a t   z a m r a ż a n i a   k o m ó r e k

Spośród jedenastu różnych metod schładzania /Ryc.3./ wybrano VIII, która pozwoliła na uzyskanie 88% żywych komórek.

##### Ż y w o t n o ś ć   k o m ó r e k

Ilość żywych makrofagów, otrzewnowych po zamrożeniu i różnym czasie przechowywania, wahała się w granicach 58 - 75,7 %, podczas gdy żywotność makrofagów przed procesem zamrażania wynosiła 96,4 - 97,9 % /Ryc.4/. W każdej grupie były różnice istotne statystycznie pomiędzy ilością żywych makrofagów przed zamrożeniem i po zamrożeniu /Tabela 1/.

##### S t o p i e Ń   o d z y s k u   m a k r o f a g ó w

Ilość makrofagów, pozostała po rozmrożeniu komórek w stosunku do ilości komórek przed zamrożeniem, przyjętej jako 100%, wahała się w granicach 76 - 100% /Ryc.5/.

Nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic, porównując ilość komórek przed i po zamrożeniu, tylko w dwóch grupach: po przechowywaniu, trwającym 3 i 90 dni. W pozostałych grupach czasowych ilość komórek, odzyskanych po zamrożeniu, znamienne różniła się od ilości makrofagów przed zamrożeniem /Tabela 2/. Nie stwierdzono natomiast zróżnicowania odzysku w porównywanych między sobą, siedmiu grupach czasowych.



### Z d o l n o ś ć   f a g o c y t o z y

Ilość krwinek barana, opłaszczonych surowicą hemolityczną, znakowanych  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ , sfagocytowanych przez makrofagi, przechowywane w ciekłym azocie wahała się od 8,6% do 20,6%, podczas gdy zdolność fagocytozy SRBC  $^{14}\text{Cr}$  przez makrofagi niezamrożone wynosiła odpowiednio 10,6 - 27% /Ryc.6 i 7/.

Dla grup, dotyczących przechowywania makrofagów przez 1 dzień, 3 dni, 7, 60 i 90 dni stwierdzono różnice między makrofagami rozmrożonymi, a kontrolnymi /niezamrażanymi/ na wysokim poziomie istotności 0,01 /Tabela 3/. Nie wykryto różnic znamiennej statystycznie w grupach przechowywania makrofagów przez 14 dni i 30 dni.

### Z d o l n o ś ć   s p o n t a n i c z n e j   m i g r a c j i

Wartości, określające zasięg migracji makrofagów, przechowywanych w ciekłym azocie wahały się w granicach od  $0,30 \text{ cm}^2$  do  $0,50 \text{ cm}^2$ . W przypadku makrofagów kontrolnych /niezamrożonych/ wartości kształtowały się następująco: od  $0,37 \text{ cm}^2$  do  $0,51 \text{ cm}^2$  /Ryc.8/.

Różnice średnich pomiędzy makrofagami rozmrożonymi, a makrofagami kontrolnymi były znamienne statystycznie tylko w jednym doświadczeniu, dotyczącym makrofagów przechowywanych przez okres 14 dni i 30 dni. Dwa następne doświadczenia z makrofagami, przechowywanymi 14 dni i 30 dni w ciekłym azocie nie wykazywały różnic, znamiennej statystycznych w porównaniu z makrofagami niezamrożanymi.

Zdolność migracji makrofagów w pozostałych grupach czasowych nie różniła się znamiennej statystycznie od zdolności migracji makrofagów kontrolnych /Tabela 4/.

### C y t o t o k s y c z n o ś ć   n i e s w o i s t a

Wartości efektu cytotoksycznego makrofagów zamrożonych wahały się w granicach 5,9 - 14,6%. Średnie zdolności niszczenia komórek nowotworowych przez makrofagi niezamrożone wynosiły odpowiednio od 5,8 - 16,3% /Ryc.9/.

Porównując wartości uwolnienia <sup>51</sup>chromu ze zniszczonych komórek raka Erlicha, w przypadku makrofagów zamrożonych i przechowywanych w ciekłym azocie oraz makrofagów kontrolnych, nie stwierdza się różnic znamiennych statystycznie /Tabela 5/.

### Z d o l n o ś ć   e k s p r e s j i   r e c e p t o r ó w   Fc

Ilość makrofagów, które po rozmrożeniu tworzyły EA rozetki, wahała się w poszczególnych grupach czasowych w granicach 71,3 - 75%. Wśród makrofagów kontrolnych ilość komórek, tworzących rozetki wynosiła 71,1 - 76,5% /Ryc.10 i 11/.

W żadnej grupie nie stwierdza się znamiennych statystycznie różnic między makrofagami zamrożonymi i przechowywanymi w ciekłym azocie, a makrofagami niezamrożonymi /Tabela 6/.

### Z d o l n o ś ć   e k s p r e s j i   r e c e p t o r ó w   C3b

Wartości, określające ilość makrofagów zamrożonych, zdolnych tworzyć rozetki EAC, wahały się w granicach 77 - 80%, odpowiednio ilości makrofagów kontrolnych zawarte były w przedziale 78 - 81,7% /Tabela 7/.

Porównując ilość makrofagów zamrożonych, tworzących rozetki EAC i makrofagi kontrolne, brak było statystycznie znamiennych różnic między wartościami w grupie doświadczalnej i kontrolnej /Ryc.12, 13/.

## 5. O M Ő W I E N I E W Y N I K Ő W

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że proces chłodzenia, zamrażania i przechowywania makrofagów otrzewnych myszy pozwala odzyskać komórki, o zachowanych funkcjach biologicznych.

Doświadczenia, wykonane na początku pracy wykazały iż sposób zamrażania makrofagów ma istotny wpływ na wielkość odzysku komórek i ich żywotności.

W przyjętym ostatecznie modelu doświadczalnym, zastosowano opracowaną przez Farranta i wsp. /27/ metodę dwustopniowego zamrażania komórek. Polega ona na schładzaniu komórek do temperatury  $-25^{\circ}\text{C}$  i pozostawieniu ich w tej temperaturze przez 10 min., przed następnym obniżeniem temperatury do  $-196^{\circ}\text{C}$ .

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych, dotyczących zamrażania makrofagów metodą dwustopniowego schładzania.

Pozostawienie komórek, będących w stanie zamrażania, w stałej temperaturze zabezpiecza makrofagi przed uszkodzeniem w trakcie schładzania do bardzo niskich temperatur przechowywania. Pozwala to na obkurczanie się komórek i jednoczesną redukcję ilości kryształów lodu wewnątrzkomórkowego, tworzących się w drugiej fazie zamrażania /26/.

Zabezpieczenie komórek przed uszkodzeniem w niskich temperaturach, zbliżonych do temperatury przechowywania, poprzez pozostawienie makrofagów w temp.  $-25^{\circ}\text{C}$  musi korelować z szybkością chłodzenia w I fazie. Szybkie schładzanie powoduje wy-

tworzenie się kryształów lodu wewnątrz komórki już we wstępnym okresie i niezdolność do obkurczania.

Obserwacje te mają wielkie znaczenie przy wyborze techniki zamrażania i mogą także wpływać na stan rozmrażania komórek.

Odzysk komórek po rozmrożeniu wynosił średnio 90,4% i nie zmieniał się w zależności od czasu przechowywania makrofagów. Wyniki te były wyższe od cytowanych przez innych autorów /37,43/.

Hem i wsp. /43/ podali stopień odzysku makrofagów otrzewnowych szczura równy 51,6%. Stosowano tam jednak inną technikę schładzania. Makrofagi zamrażano, obniżając temperaturę z prędkością 6 deg/min do  $-60^{\circ}\text{C}$  /213 K/, a następnie przenoszono do zbiornika z ciekłym azotem.

Żywotność makrofagów po rozmrożeniu wynosiła średnio 67,9% i była zbliżona we wszystkich grupach, różniących się okresem przechowywania, z wyjątkiem jednej. Po 60 dniach przechowywania makrofagów w ciekłym azocie wyraźnie ujawniły się zmiany żywotności komórek, które przyjmowały najniższą wartość 58%.

Ganguly i wsp. /33/ zamrażając makrofagi otrzewnowe świnki morskiej, uzyskali podobne rezultaty. Przeciętna wartość żywych komórek po przechowywaniu w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$  /193 K/ wynosiła 77,8% z wyraźnym obniżeniem ilości żywych komórek po dwumiesięcznej prezerwacji.

Pomimo iż wartości te odbiegały od ilości żywych makrofagów w pozostałych grupach czasowych, fakt ten nie miał większego znaczenia, tym bardziej, że żywotność komórek po 90 i 120

dniach przechowywania wracała do normy i utrzymywała się na poziomie średniej.

Ilość sfagocytowanych SRBC  $^{51}\text{Cr}$ , opłaszczonych surowicą hemolityczną, przez makrofagi, poddane zamrożeniu wynosiła 14,9%. Makrofagi kontrolne, niezamrożone fagocytowały 20,9% ogólnej liczby krwinek.

Czas przechowywania makrofagów w ciekłym azocie nie miał wpływu na poziom fagocytozy.

W badaniach Hem'a i wsp. /43/ 75% makrofagów wykazywało zdolność przylegania do szkła po rozmrożeniu i wszystkie te komórki fagocytowały lateks.

W związku z wyborem metody oznaczania zdolności fagocytarnej makrofagów poprzez określenie maksymalnej ilości krwinek, które uległy interioryzacji, nie można podać konkretnej liczby makrofagów, które zdolne były do fagocytozy, a tym bardziej porównać jej z wynikami innych autorów ze względu na różnice w metodyce.

Poziom fagocytozy w naszych badaniach określano na podstawie ilości erytrocytów zawartych wewnątrz makrofagów w stosunku do całej ilości krwinek, mogących ulec fagocytozie.

Spontaniczna migracja makrofagów po rozmrożeniu nie różniła się od aktywności migracyjnej komórek niezamrożonych. Średnia wartość migracji makrofagów, przechowywanych w ciekłym azocie wynosiła  $0,35 \text{ cm}^2$  podczas gdy średnia wartość kontrolna była równa  $0,41 \text{ cm}^2$ .

Dean i wsp. /20/ obserwowali znaczny spadek zdolności migracji wśród zamrożonych monocytów ludzkich w porównaniu z kontrolą.

Zmniejszenie aktywności migracyjnej, zamrożonych makrofagów

świnki morskiej obserwowali również Ganguly i wsp. /33/. Fakt ten mógł mieć związek z obecnością limfokin, a wśród nich czynnika, hamującego migrację /MIF/, produkowanych przez limfocyty, które stanowiły ok. 4% populacji zamrażanych komórek wysięku otrzewnowego. W naszych badaniach zasięg migracji makrofagów zamrożonych był bardzo zbliżony do wartości kontrolnej.

Zdolność cytotoksyczna makrofagów zamrożonych w stosunku do komórek raka Ehrlicha wynosiła 10,3% i pozostawała na poziomie cytotoksyczności nieswoistej makrofagów, nie poddanych mrożeniu, której wartość była równa 9,9%.

W niektórych przypadkach, po przechowywaniu komórek przez 14, 30 i 60 dni, poziom cytotoksyczności makrofagów był wyższy niż w kontroli. Zjawisko to, mogło być wynikiem niespecyficznego, dodatkowego aktywacji komórek w czasie procesu schładzania.

Zwiększona cytotoksyczność makrofagów zamrożonych mogła pochodzić również z cytolizy komórek docelowych przez martwe makrofagi, z odsłoniętym aparatem enzymatycznym, której wartość nakładła się na poziom cytotoksyczności żywych makrofagów.

Cytoliza, wywołana przez martwe makrofagi, których ilość po rozmrożeniu wynosiła ok. 30% mogła mieć istotne znaczenie ilościowe, natomiast w kontroli, gdzie udział makrofagów martwych w zawieszynie komórek, był niewielki /ok. 5%/ mogła być niezauważona.

Podobne rezultaty, zwiększonej odpowiedzi na PHA limfocytów zamrożonych w stosunku do kontroli obserwowali Hem i wsp.

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac, dotyczących

poziomu cytotoksyczności makrofagów, przechowywanych w ciekłym azocie. Istnieją natomiast doniesienia, dotyczące cytotoksyczności przechowywanych limfocytów.

Ortaldo i wsp. /79/ oceniali aktywność cytotoksyczną swoistą limfocytów szczurzych w stosunku do różnych komórek nowotworowych. Limfocyty po rozmrożeniu wykazywały 55 - 75% swej zdolności cytotoksycznej przed zamrożeniem.

Wg Holden'a i wsp. /49/ uczulone limfocyty mysie zachowują swoistą aktywność cytotoksyczną po rozmrożeniu na poziomie 85%.

Badając zdolność cytotoksyczną uczulonych limfocytów owcy po zamrożeniu, Grant /37/ opisywał, że jedynie komórki, pobierane w momencie szczytu odpowiedzi immunologicznej i w końcowym jej etapie przejawiały aktywność cytotoksyczną.

Ekspresja receptorów Fc na powierzchni zamrożonych makrofagów wynosiła średnio ok. 73% i pozostawała na poziomie ekspresji receptorów Fc makrofagów kontrolnych /74%/.

Wg Hem'a i wsp. /43/ makrofagi rozmrożone wykorzystywały tylko 50% erytrocytów opłaszczonych immunoglobuliną G, tworząc rozetki w stosunku do makrofagów nie poddanych mrożeniu.

Ilość aktywnych receptorów C3b na błonie komórkowej makrofagów, poddanych uprzednio zamrożeniu wynosiła ok. 78%, podobnie jak w przypadku komórek kontrolnych.

Hem i wsp. /43/ podali iż ilość krwinek barana przyczepionych do powierzchni makrofagów rozmrożonych wynosiła 50% w porównaniu z kontrolą.

Birkeland /6/ w swojej pracy, dotyczącej tworzenia rozetek przez limfocyty T i B po rozmrożeniu - stwierdził, że nie ma

różnic ilościowych pomiędzy limfocytami poddanymi mrożeniu, a kontrolnymi jeśli chodzi o zdolność przyczepiania do powierzchni makrofagów, bez względu na metodę oceny receptorów powierzchniowych na limfocytach T i B.



## 6. W N I O S K I

1. Opracowano metodę przechowywania makrofagów otrzewnowych myszy w temp. - 196°C, pozwalającą na odzysk 76 - 100% komórek, z zachowanymi funkcjami biologicznymi, polegającą na stopniowym schładzaniu komórek z prędkością 5°C/min. do temperatury -25°C i pozostawieniu ich w tej temperaturze przez 10 min., a następnie obniżeniu temperatury z prędkością 70°C/min do temperatury ciekłego azotu.
2. Przechowywane tą metodą makrofagi zachowywały przez okres 3 miesięcy żywotność w granicach 58 - 76%.
3. Stwierdzono iż po rozmrożeniu zdolność fagocytarna tych komórek utrzymywała się w granicach 8,6 - 20,6%, spontaniczna migracja w granicach 0,3 - 0,5 cm<sup>2</sup>, cytotoksyczność w stosunku do komórek raka Ehrlicha w granicach 5,9 - 14,6%.
4. Rozmrożone makrofagi zachowywały zdolność ekspresji receptorów powierzchniowych Fc w granicach 71,3 - 75% i C3b w granicach 77 - 80%.
5. Możliwość skutecznego przechowywania makrofagów pozwala na uzyskanie stałej puli komórek do badań immunologicznych, zapewniając powtarzalność wyników, a także stwarza możliwości doświadczalnego przeszczepiania tych komórek.

7. P I Ś M I E N N I C T W O

1. Bar Eli M., Gallily R.: The effect of macrophage hydrolytic enzyme levels on the uptake and degradation of antigen and immune complexes. *J.Reticuloend. Soc.* 1975, 18,317
2. Bell R.B., Mc Ivor K.L.: The effects of a macrophage-derived cytotoxin on the growth and metabolism of target cells. *Cell.Immunol.* 1976,22,19
3. Beller D.J., Farr A.G., Unanue E.R.: Regulation of lymphocyte proliferation and differentiation by macrophages. *Fed. Proc.* 1978,37,91
4. Bennedsen J., Risgaard S., Rhodes J.M., Larsen S.O.: In vitro studies on normal, stimulated and immunologically, activated mouse macrophages. III. Intracellular multiplication of *Listeria monocytogenes*. *Acta path. microbiol. scand.* 1977,85,246
5. Bianco C., Griffin F.M., Silverstein S.C.: Studies of the macrophage activation. *J.Exp.Med.* 1975,141,1278
6. Birkeland S.A.: Rosette formation tests for T and B lymphocytes using frozen-stored cells. *Acta path.microbiol.scand.* 1975,83,298
7. Bodel P., Miller H.: Pyrogen from mouse macrophages causes fever in mice. *Proc.Soc.Exp.Biol.and Med.* 1976,151,93
8. Boxer L.A., Stossel T.P.: Interaction of actin, myosin and an actinbinding protein of chronic myelogenous leukemia leukocytes. *J.Clin.Invest.* 1976,57,964

9. Bradfield J.W.B.: Control of spillover. The importance of Kupffer-cell function in clinical medicine. *The Lancet* 1974, Oct, 883
10. Brockier J., Samarut C., Revillard J.P.: A rosette technique for identification of human mononuclear cells bearing Fc receptors. *Biomedicine* 1975, 23, 206
11. Bucana C., Hoyer L.C., Hobbs B., Breesman S., Mc Daniel M., Hanna M.G.: Morphological evidence for the translocation of lysosomal organelles from cytotoxic macrophages into the cytoplasm of tumour target cells. *Cancer Res.* 1976, 36, 4444
12. Cheung H.T., Cantarow W.D., Sundharadas G.: Colchicine and cytochalasin B /CB/ effects on random movement, spreading and adhesion of mouse macrophages. *Exp. Cell Res.* 1978, 111, 95
13. Churchill W.H., Plesseus W.F., Sulis C.A., David J.R.: Macrophage activated as suspension cultures with lymphocyte mediators devoid of antigen become cytotoxic for tumours cells. *J. Immunol.* 1975, 115, 781
14. Cohn Z.A., Wiener E.: The particulate hydrolases of macrophages. I. Comparative enzymology isolation and properties. *J. Exp. Med.* 1963, 118, 1009
15. Currie G.A., Basham C.: Activated macrophages release a factor which lyses malignant cells but not normal cells. *J. Exp. Med.* 1975, 142, 1600
16. Daems W.T.: *Advances Experimental Medicine and Biology* 1976, 73a, 27

17. Dannenberg A.M.: Macrophages in inflammation and infection. New Engl. J.Med. 1975,Sept,489
18. Davies P.: Essential role of macrophages in chronic inflammatory processes. Schweiz.med.Wschr. 1976,40,1351
19. David J.R.: Macrophage activation by lymphocytes mediators. Fed.Proc. 1975,34,1730
20. Dean D.A., Strong D.M.: Improved assay for monocyte chemotaxis using frozen stored responder cells. J.Immun.Methods 1977,14,65
21. Den Otter W., Dullens H.F.J., van Loveren H., Pels E.: Anti-tumour effects of macrophages injected into animals: A review. W: The macrophage and cancer. Red.K.James, B.Mc Bride, A.Stuart. Edinburgh 1977
22. Edelson P.J., Zwiebel R., Cohn Z.A.: The pinocytic rate of activated macrophages. J.Exp.Med. 1975,142,1150
23. Ehlenberger A.G. Nussenzweig V.: The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. J.Exp.Med. 1977,145,357
24. Erb P., Feldmann M., Hogg N.: Role of macrophages in the generation of T helper cells. IV. Nature of genetically related factor derived from macrophages incubated with soluble antigens. Eur.J.Immunol. 1976,6,365
25. Evans B., Cox H., Alexander P.: Immunological specific activation of macrophage armed with specific macrophage arming factor /SMAF/. Proc.Soc.Exp.Biol./NY/ 1973,143,256
26. Farrant J., Walter C.A., Knight S.C.: Cryopreservation and selection of cells. Cryoimmunology INSERM 1976,62,61

27. Farrant J., Walter C.A., Lee H., Mc Gann L.E.: Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. *Cryobiology* 1977,14,273
28. Feldmann M., Nossal G.J.V.: Tolerance, enhancement and the regulation of interactions between T cells, B cells and macrophages. *Transpl.Rev.* 1972,13,3
29. Van Furth R., Diesselhoff - den Dulk M.M.C., Mattie H.: Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. *J.Exp.Med.* 1973,138,1314
30. van Furth R.: Origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *Ann. New York Ac.Sc.* 1976,278,161
31. Gallily R., Eliahu H.: Mechanism and specificity of macrophage - mediated cytotoxicity. *Cell Immunol.* 1976,25,245
32. Gallin E.K., Gallin J.I.: Interaction of chemotactic factors with human macrophages. Induction of transmembrane potential changes. *J.Cell Biol.* 1977,75,277
33. Ganguly R., Miller D., Czaruk K.P., Senterfitt V., Waldman R.H.: Effects of freezing and storing on the biological properties of macrophages. *J.Immun.Methods* 1975,8,101
34. Gelfand J.A., Fanci A.S., Green I., Frank M.M.: A simple method for the determination of complement receptor - bearing mononuclear cells. *J.Immunol* 1976,116,595
35. Gordon S., Cohn Z.A.: The macrophage. *Int.Rev.Cytol.* 1973,36,171

36. Granger G.A., Weiser R.S.: Homograft target cells. Contact destruction in vitro by immune macrophages. Science 1966, 151,97
37. Grant C.K., Powles R.: The cryopreservation of immunocompetent cells. Cryobiology 1973,10,290
38. Grant C.K.: A simple method for the preservation of lymphocytes. Retention of specific immune effector functions by frozen - stored cells. Clin.exp.Immunol. 1976,23,166
39. Griffin F.M., Griffin J.A., Leider J.E., Silverstein S.C.: Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle - bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. J.Exp.Med. 1975,142,1263
40. Griffin F.M., Bianco C., Silverstein C.: Characterization of the macrophage receptor for complement and demonstration of its functional independence from the receptor for the Fc portion of immunoglobulin G. J.Exp.Med. 1975,141,1269
41. Griffin F.M., Griffin J.A., Silverstein S.C.: Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with antiimmunoglobulin IgG - coated bone marrow - derived lymphocytes. J.Exp.Med. 1976,144,788
42. Hall N.D., Lohmann-Matthes M.L., Knufermann H., Kickhofen B.: Characterization of macrophage cytotoxicity factor /MCF/. Int.Archs. of All. and Appl. Immunol. 1977,53,37
43. Hem E., Munthe Kaas A.Ch.: Freezing of rat macrophages. Cryobiology 1977,14,649
44. Hertel-Wulft B.: An in vitro assay for the quantitation

of phagocytic cells of different anatomic origin. Acta path.microbiol.scand. 1977,85,253

45. Heusser Ch.H., Anderson C.L., Grey H.M.: Receptors for IgG: subclass specificity of receptors on different mouse cell types and the definition of two distinct receptors on a macrophage cell line. J.Exp.Med. 1977,145,1316
46. Hibbs J.B.: The macrophage as a tumoricidal effector cell: A review of in vivo and in vitro studies on the mechanism of the activated macrophage non - specific cytotoxin reaction. W: The macrophage in neoplasia. Red. M.Fink. New York Academic Press 1976
47. Hibbs J.B.: Role of activated macrophages in nonspecific resistance to neoplasia. J.Reticuloendoth.Soc. 1976,20,223
48. Holland P., Holland N.K., Cohn Z.A.: The selective inhibition of macrophage phagocytic receptors by anti membrane antibodies. J.Exp.Med. 1972,135,458
49. Holden H.T., Oldham R.K., Ortaldo J.R., Hrberman R.B.: Standardization of the Chromium-51 release, cell mediated cytotoxicity assay: Cryopreservation of mouse effector and target cells. J.Natl.Cancer Inst. 1977,58,611
50. Holtermann O.A., Casale G.P., Klein E.: Tumor cells destruction by macrophages. J.Med. 1972,3,305
51. Jewett M.A.S., Gupta S., Hansen J.A., Cunningham-Rundles S., Siegal F.P., Good R.A., Dupont B.: The use of cryopreserved lymphocytes for longitudinal studies of immune function and enumeration of subpopulations. Clin.exp.Immunol. 1976,25,449

52. Karnovsky M.L.: Metabolic basis of phagocytic activity. *Physiol.Rev.* 1962,42,143
53. Keller R.: Mononuclear phagocytes and antitumor resistance: A discussion. W: *The macrophage and cancer.* Red. K.James, B.Mc Bride, A.Stuart. Edinburgh 1977
54. Kirchner H., Holden H.T., Herberman R.B.: Splenic suppressor macrophages induced in mice by injection of *Corynebacterium parvum*. *J.Immunol.* 1975,115,1212
55. Krahenbuhl J.L., Lambert L.H., Remington J.S.: The effects of activated macrophages on tumour target cells: Escape from cytostasis. *Cell.Immunol.* 1976,25,279
56. Kung J.T., Brooks S.B., Jakway J.P., Leonard L.L., Talmage D.W.: Suppression of in vitro cytotoxic response by macrophages due to induced arginase. *J.Exp.Med.* 1977,146,665
57. von Leden H., Cahan W.G.: *Cryobiology: the basic for Cryosurgery.* W: *Cryogenic in Surgery.* Medical Examination Publishing C.O. 1971
58. Lejeune F.J.: Role of macrophages in immunity, with special reference to tumour immunology. A review. *Biomedicine* 1975,22,25
59. Lipsky P.E., Rosenthal A.S.: Macrophage - lymphocyte interaction antigen - independent binding of guinea pig lymph node lymphocytes by macrophages. *J.Immunol.* 1975,115,440
60. Lohmann-Matthes M.L. W: *Immunobiology of the macrophage.* Red. D.S.Nelson. Academic Press, New York 1976
61. Mantovani B., Rabinovitch M., Nussenzweig V.: Phagocytosis of immune complexes by macrophages. Different roles of the



- macrophage receptor sites for complement /C3/ and for immunoglobulin IgG. *J.Exp.Med.* 1972,135,780
62. Mazur P.: Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science Magazine*, 1970,168,939
63. Mazur P.: Mechanism of injury and protection in cells and tissues at low temperatures. *Cryoimmunology INSERM* 1976,62,37
64. Mazur P.: The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 1977, 14,251
65. Mazur P., Williamson J.R.: Macrophage deformability and phagocytosis. *J.Cell Biol.* 1977,75,185
66. Melsom H., Sanner T., Seljelid R.: Macrophage cytolytic factor. *Exp.Cell Res.* 1975,94,221
67. Michl J., Ohlbaum D.J., Silverstein S.C.: 2-deoxyglucose selectively inhibits Fc and complement receptor - mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. I. Description of the inhibitory effects. *J.Exp.Med.* 1976,144,1465
68. Michl J., Ohlbaum D.J., Silverstein S.C.: 2-deoxyglucose selectively inhibits Fc and complement receptor mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. II. Dissociation of the inhibitory effects of 2-deoxyglucose on phagocytosis and APT generation. *J.Exp.Med.* 1976,144,1484
69. Moore M.A.S.: Regulatory role of macrophages in hemopoiesis. *J.Reticuloendoth.Soc.* 1976,20,89
70. Munthe-Kaas A.Ch.: In vitro studies on liver macrophages /Kupffer cells/ from the rat. Oslo 1977

71. Nelson R.D., Quie P.G., Simmons R.L.: Chemotaxis under agarose. A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J.Immunol.* 1975,115,1650
72. Nelson D.E.: Immunobiology of the macrophages. Academic Press. New York 1976
73. North R.J., Kirstein D.P., Tuttle R.L.: Subversion of host defense mechanism by murine tumors. I. A circulating factor that suppresses macrophage - mediated resistance to injection. *J.Exp.Med.* 1976,143,559
74. Oehler J.R., Herberman R.B., Campbell D.A., Djeu J.V.: Inhibition of rat mixed lymphocyte cultures by suppressor macrophages. *Cell.Immunol.* 1977,29,238
75. Ohta H., Shimizu K.: Maturation and interrelationship of mouse mononuclear phagocytes in bone marrow, peripheral blood and peritoneal cavity in terms of erythrophagocytic activity. *Tohoku J.Exp.Med.* 1975,116,111
76. Oliver J.M., Berlin R.D.: Macrophage membranes. W: Immunobiology of the macrophage. Ed. D.S.Nelson. Academic Press New York 1976
77. Opitz H.G., Niethammer D., Lemke H., Flad H.D., Huget R.: Inhibition of <sup>3</sup>H-thymidine incorporation of lymphocytes by soluble factor from macrophages. *Cell.Immunol.* 1975,16,379
78. Opitz H.G., Niethammer D., Jackson R.C., Lemke H., Huget R., Flad H.D.: Biochemical characterization of a factor released by macrophages. *Cell.Immunol.* 1975,18,70

79. Ortaldo J.R., Oldham R.K., Holden H.T., Herberman R.B.: Immune response to gross virus - induced lymphoma cryopreservation of functional activity of rat lymphocytes and tumor cells. *Cell.Immunol.* 1976,25,60
80. Paprillo J.E., Fanci A.S.: Apparent direct cellular cytotoxicity mediated via cytophilic antibody. Multiple Fc receptor bearing effector cell populations mediating cytophilic antibody induced cytotoxicity. *Immunology* 1977,33, 839
81. Pavillard E.R.S., Rowley D.: A comparison of the phagocytosis and bacterial ability of guinea pig alveolar and mouse PE macrophages. *Aust.J.Exp.Biol.* 1962,40,207
82. Pearsall N.N., Weiser R.S.: *The macrophage.* Red. Lea and Febiger. Philadelphia 1970
83. Pfizenmaier K., Trostmann H., Rollinghoff M., Wagner H.: Cell mediated allograft responses in vitro. VI. Studies on macrophage - mediated cytotoxicity. *Immunology* 1975,29,967
84. Pierce C.W., Kapp J.A.: Functions of macrophages in antibody responses in vitro. *Fed.Proc.* 1978,37,86
85. Plesseus W.F.: Increased binding and killing of neuraminidase - galactose oxidase - treated tumor cells by normal macrophages. *J.Immunol.* 1977,119,167
86. Polliack A., Gordon S.: Scanning electron microscopy of murine macrophages. Surface characteristics during maturation, activation and phagocytosis. *Lab.Invest.* 1975,33,469
87. Ptak W., Hanczakowska M.: Alloantibody - induced cytotoxicity of macrophages. *J.Immunol.* 1975,115,796

88. Ptak W., Gershon R.K.: Immunosuppression effected by macrophage surfaces. *J.Immunol.* 1975,115,1346
89. Puvion F., Fray A., Halpern B.: A cytochemical study of the in vitro interaction between normal and activated mouse peritoneal macrophages and tumor cells. *J.Ultrastr. Res.* 1976,54,95
90. Rabellino E.M., Metcalf D.: Receptors for C3 and IgG on macrophage, neutrophil and eosinophil colony cells grown in vitro. *J.Immunol.* 1975,115,688
91. Rabbinovitch M.: The dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis by macrophages. *Exp.Cell. Res.* 1967,46,19
92. Rao V.S., Mokyr M.B., Gershon R., Mitchell M.S.: Specific Tcell - dependent, antigen - antibody mediated suppression of macrophages: abrogation by nonspecifically stimulated T cells. *J.Immunol.* 1977,118,2117
93. Rhodes J.: Macrophage heterogeneity in receptor activity: The activation of macrophage Fc receptor function in vivo and in vitro. *J.Immunol.* 1975,114,976
94. Romans D.G., Pinteric L., Falk R.E., Dorrington K.J.: Redistribution of the Fc receptor on human blood monocytes and peritoneal macrophages induced by immunoglobulin G - sensitized erythrocytes. *J.Immunol.* 1976,116,1473
95. Roos D.: Oxidative killing of microorganism by phagocytic cells. *TIBS* 1977,March,61
96. Rosenthal A.S., Shevach E.M.: Function of macrophages in antigen recognition by quinea pig T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 1973,138,1194

97. Rosenthal A.S., Lipsky P.E., Shevach E.M.: Macrophage - lymphocyte interaction and antigen recognition. Fed. Proc. 1978,37,1743
98. Rosenthal A.S., Barciński M.A., Rosenwasser L.J.: Function of macrophages in genetic control of immune responsiveness. Fed.Proc. 1978,37,79
99. Rowlands D.T., Daniele R.P.: Surface receptors in the immune response. New Engl.J.Med. 1975,July,26
100. Schorlemmer H.U., Allison A.C.: Effects of activated complement components on enzyme secretion by macrophages. Immunology 1976,31,781
101. Schroit A.J., Gallily R.: Macrophage phagocytic recognition sites. Demonstration of selectivity by hetero- and alloantisera. Immunology 1977,33,121
102. Schwartz R.H.: Studies of Ia antigens on murine peritoneal macrophages. Scand.J.Immunol. 1976
103. Shands J.W., Axelrod B.J.: Mouse peritoneal macrophages: tritiated thymidine labeling and cell kinetics. J.Reticuloendoth. Soc. 1977,21,69
104. Shin H.S., Hayden M., Langley S., Kaliss N., Smith M.R.: Antibody mediated suppression of grafted lymphoma. III. Evaluation of the role of thymic function, non thymus derived lymphocytes, macrophages, platelets and polymorphonuclear leukocytes to syngeneic and allogeneic hosts. J.Immunol. 1975,114,1255
105. Siegel B.V.: The macrophage and cancer. J.Reticuloendoth. Soc. 1976,20,219

106. Singer S.J.: The molecular organization of membranes. *Ann.Rev.Biochem.* 1974,43,805
107. van Snick J.L., Markowitz B., Masson P.L.: The ingestion and digestion of human lactoferrin by mouse peritoneal macrophages and the transfer of its iron into ferritin. *J.Exp.Med.* 1977,146,817
108. Spector W.G.: Macrophage turnover and traffic. A review. W: *The macrophage and cancer.* Red. K.James, B.Mc Bride, A. Stuart. Edinburgh 1977
109. Stuart A.E.: The heterogeneity of macrophages. A review. W: *The macrophage and cancer.* Red. K.James, B.Mc Bride, A.Stuart. Edinburgh 1977
110. Unanue E.R., Cerottini J.Ch.: The function of macrophages in the immune response. *Sem.Hematol.* 1970,7,225
111. Unanue E.R.: The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. *Adv.Immunol.* 1972,15,95
112. Unanue E.R., Kiely J.M.: Synthesis and secretion of a mitogenic protein by macrophages: description of a superinduction phenomenon. *J.Immunol.* 1977,119,925
113. Unkeless J.V.: The presence of two Fc receptors on mouse macrophages: evidence from a variant cell line and differential trypsin sensitivity. *J.Exp.Med.* 1977,145,931
114. Vassali J.D., Reich E.: Macrophage plasminogen activator: induction by products of activated lymphoid cells. *J.Exp.Med.* 1977,145,429

115. Wagner H., Feldmann M., Boyle W., Schrader J.W.: Cell mediated immune response in vitro. III. The requirement for macrophages in cytotoxic reactions against cell-found and subcellular alloantigens. *J.Exp.Med.* 1972,136, 331
116. Wahl S.M., Wilton J.M., Rosenstreich D.L., Oppenheim J.J.: The role of macrophages in the production of lymphokines by T and B lymphocytes. *J.Immunol.* 1975,114,1296
117. Walker W.S.: Macrophage sub-populations and their functions in the in vitro immune response. *Fed.Proc./Abst./* 1970,29,572
118. Walker W.S.: Functional heterogeneity of macrophages: Subclasses of peritoneal macrophages with different antigen-binding activities and immune complex receptors. *J.Immunol.* 1974,26,1025
119. Walker W.S.: Functional heterogeneity of macrophages in the induction and expression of aquired immunity. *J.Reticuloend.Soc.* 1976,20,57
120. Walker W.S., Demus A.: Antibody-dependent cytolysis of chicken erythrocytes by an in vitro - established line of mouse peritoneal macrophages. *J.Immunol.* 1975,114,765
121. Walter C.A., Knight S.C., Farrant J.: Ultrastructural appearance of freeze substituted lymphocytes frozen by interrupting rapid cooling with a period at  $-26^{\circ}\text{C}$ . *Cryobiology.* 1975,12,103
122. Watanuki W., Haga S.: The statistical distribution of macrophage migration distance and its application to MIF test. *J.Immunol.Methods* 1977,15,331

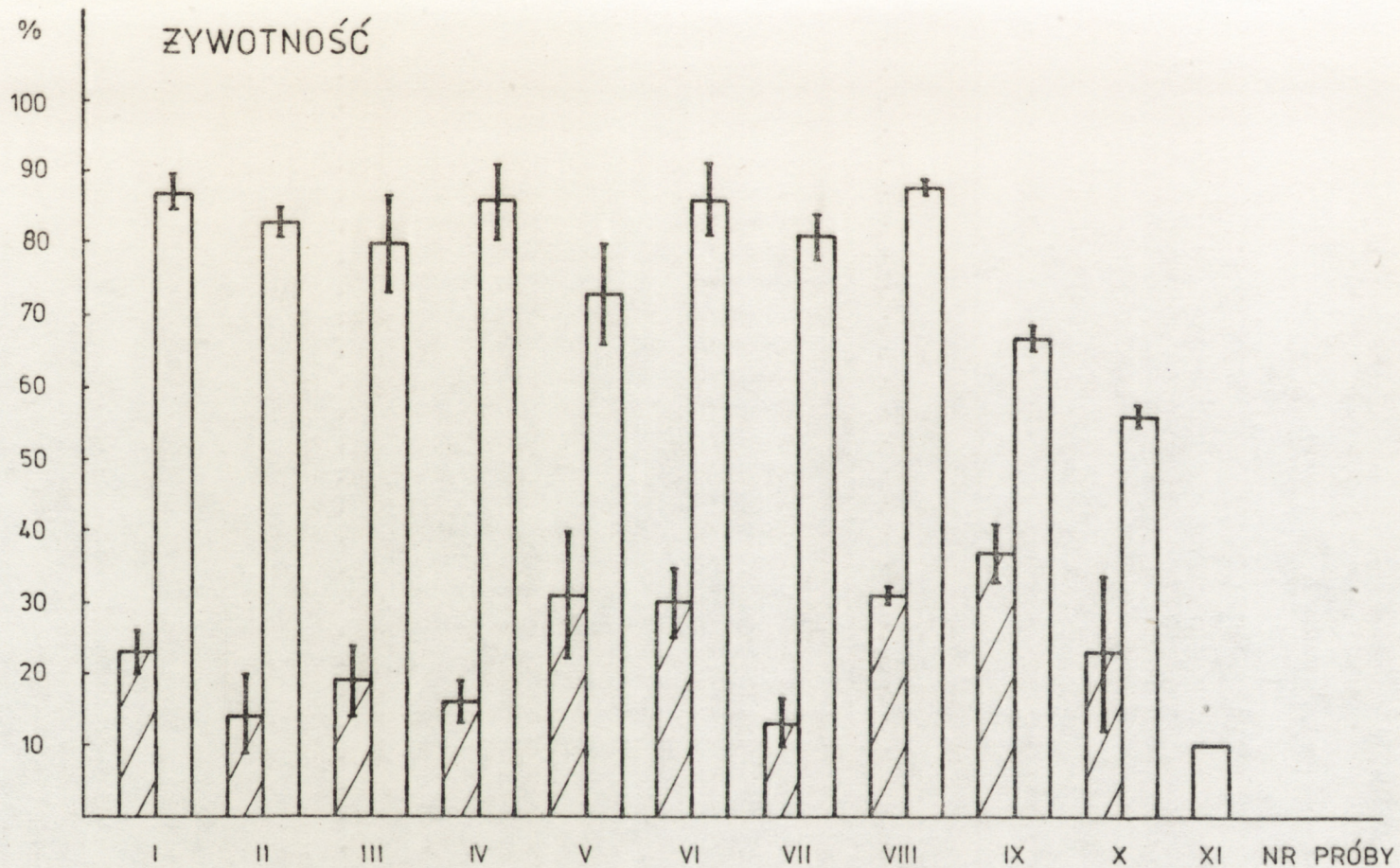
123. Weiss L., Graves D.: Effects of migration inhibiting factors on the in vitro detachment of macrophages. J.Immunol. 1975,115,1362
124. Weiss A., Fitch F.M.: Macrophages suppress CTL generation in rat mixed leukocytes cultures. 1977,119,510
125. Wellek B., Hahn H., Opferkuch W.: Opsonizing activities of IgG, IgM antibodies and C3b inactivator-cleaved third component of complement in macrophage phagocytosis. Agents and Actions 1976,6,260
126. Werb Z., Gordon S.: Elastase secretion by stimulated macrophages. Characterization and regulation. J.Exp.Med. 1975,142,361
127. Werb Z., Gordon S.: Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. J.Exp.Med. 1975,142,346
128. Wiener E., Culelaru Z.: The intracellular distribution of cathepsins and other acid hydrolases in mouse peritoneal macrophages. J.Reticuloend.Soc. 1975,17,319
129. Wilkinson P.C.: Cellular and molecular aspects of chemotaxis of macrophages and monocytes. W: Immunobiology of the macrophage. Red. D.S.Nelson. Academic Press, New York, 1976
130. Wing E.J., Remington J.S.: Studies on the regulation of lymphocyte reactivity by normal and activated macrophages. Cell Immunol. 1977,30,108
131. Zarzycki J.: Cytoplazma. W: Histologii zwierząt domowych i człowieka. PWRiL 1971.



132. Zembala M., Ptak W., Hanczakowska M.: The induction of delayed hypersensitivity by macrophage-associated antigen. The role of macrophage cytophilic antibody. *Immunol.* 1974,26,465
133. Zembala M., Ptak W., Hanczakowska M.: Macrophage and lymphocyte-cooperation in target cell destruction in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 1973,15,461

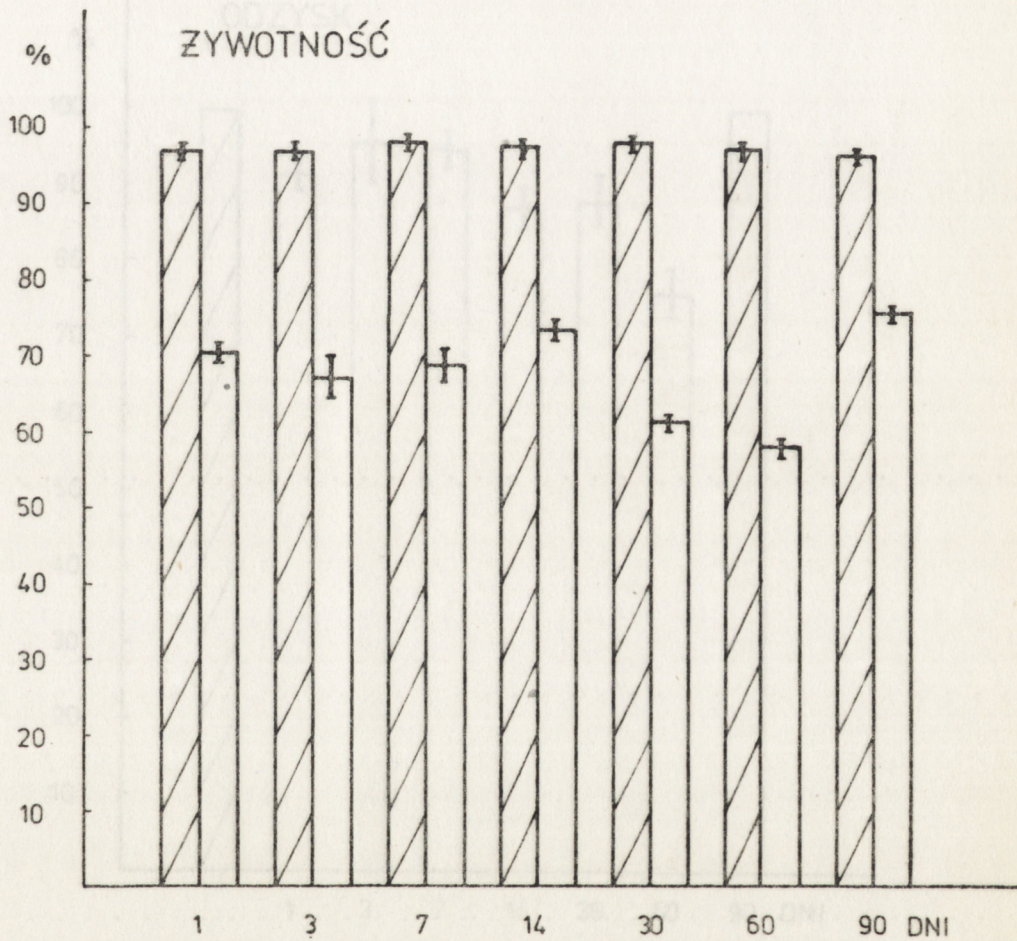
OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW, UŻYWANYCH W PRACY

- BCG - Bacille, Calmette, Guerin - atenuowane prątki gruźlicy
- DMSO - dwumetylosulfotlenek
- EA - erytrocyty opłaszczane przeciwciałami IgG
- EAC - erytrocyty opłaszczane przeciwciałami IgM i dopełniaczem
- GVB - gelatin veronal bufor - bufor weronalowy
- MIF - migration inhibition factor - czynnik hamujący migrację makrofagów
- PEC - peritoneal exudate cells - komórki wysięku otrzewnowego
- PFC - plaque forming cells
- PHA - phytohemaglutynin - fitohemaglutynina
- RE - komórki raka Ehrlicha
- SMAF - specific macrophage arming factor - czynnik "uzbrajający" makrofagi
- SRBC - sheep red blood cells - erytrocyty barana



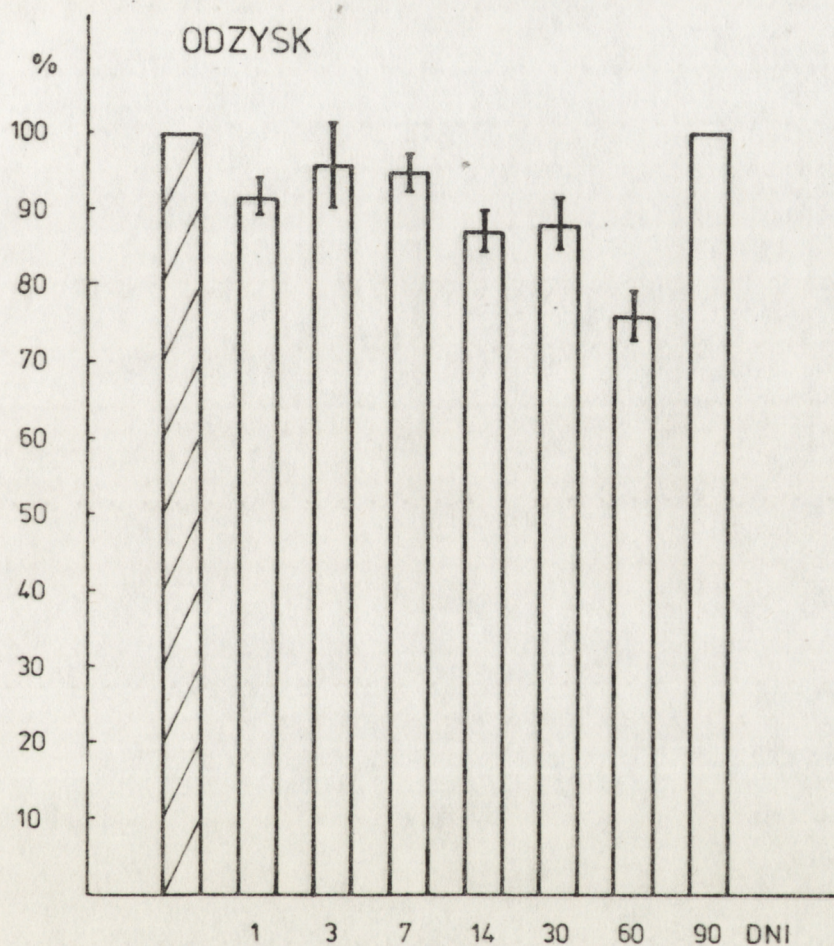
Rycina 3. Żywotność makrofagów otrzewnowych myszy zamrażanych różnymi metodami /I - XI - kolejność schematów zamrażania/

- makrofagi z dodatkiem DMSO
- ▨ makrofagi bez środka kriochronnego



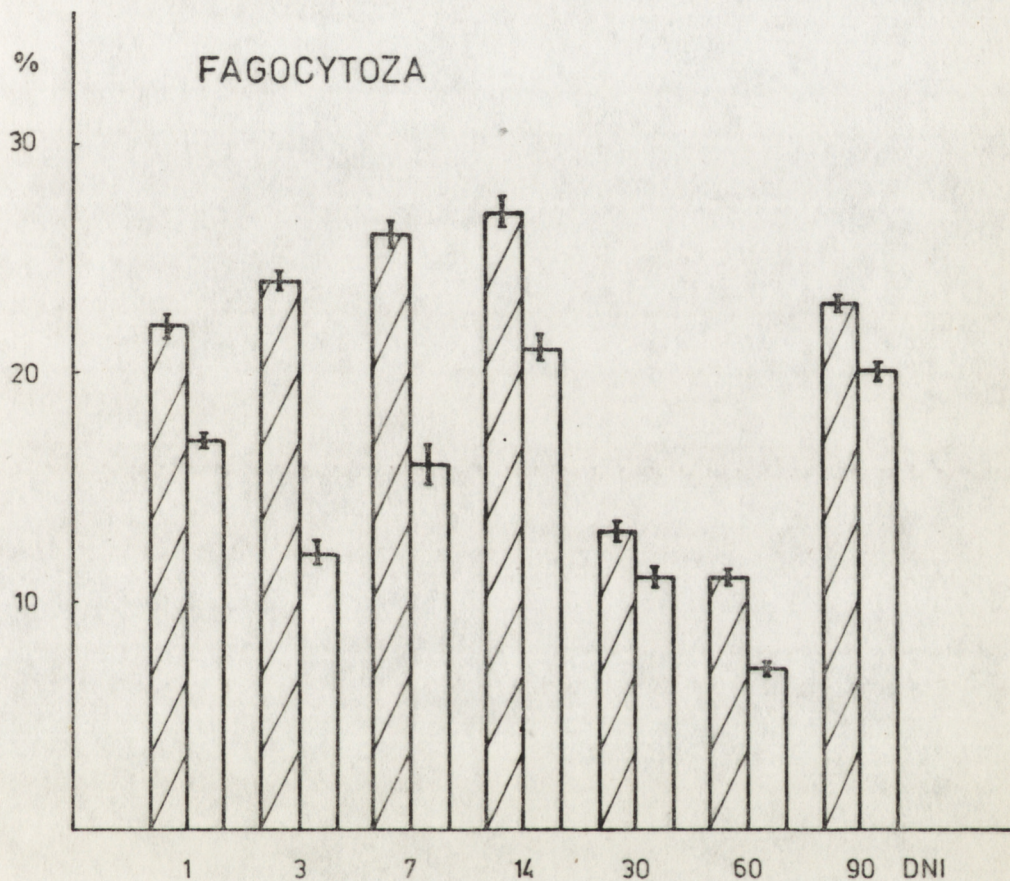
Rycina 4. Żywotność makrofagów otrzewnowych myszy

- makrofagi po przechowywaniu
- makrofagi przed zamrożeniem



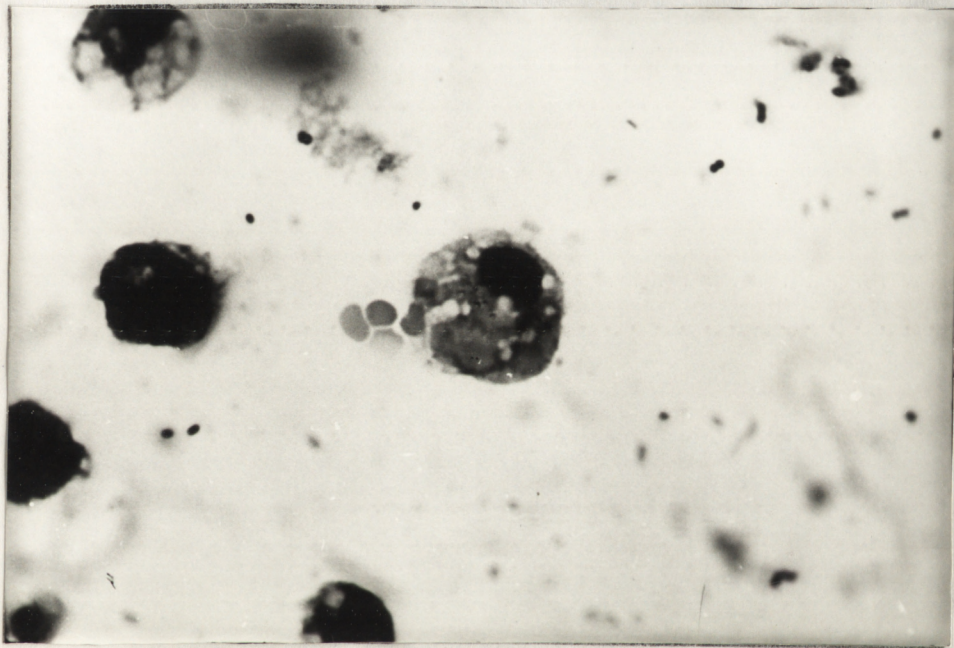
Rycina 5. Odzysk makrofagów otrzewnowych myszy

- makrofagi po przechowywaniu
- makrofagi przed zamrożeniem

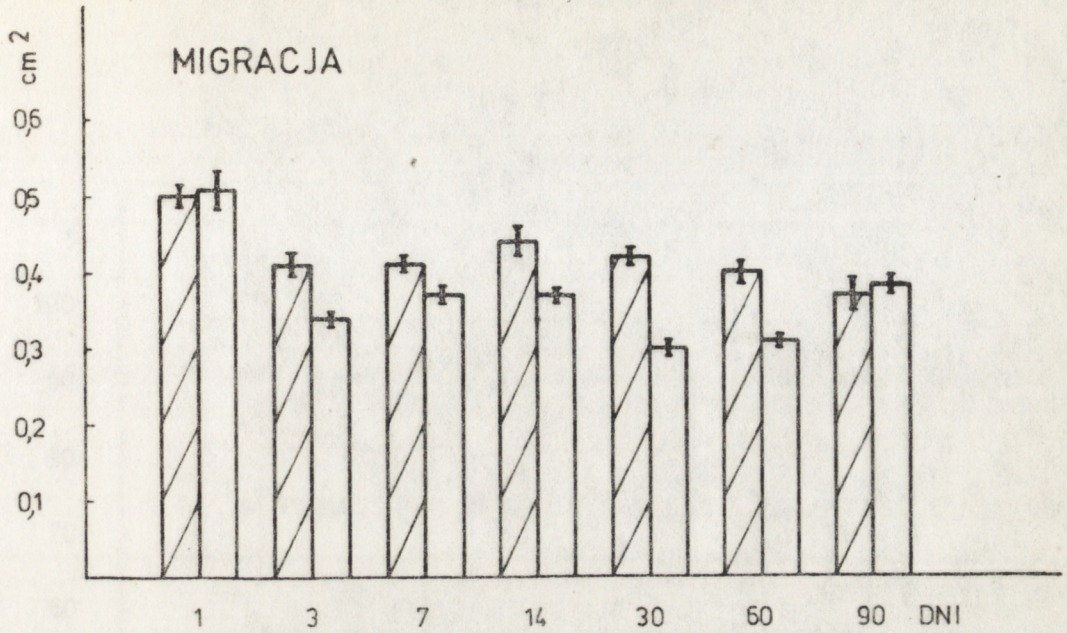


Rycina 6. Zdolność fagocytozy SRBC  $^{51}\text{Cr}$  przez makrofagi otrzewnowe myszy

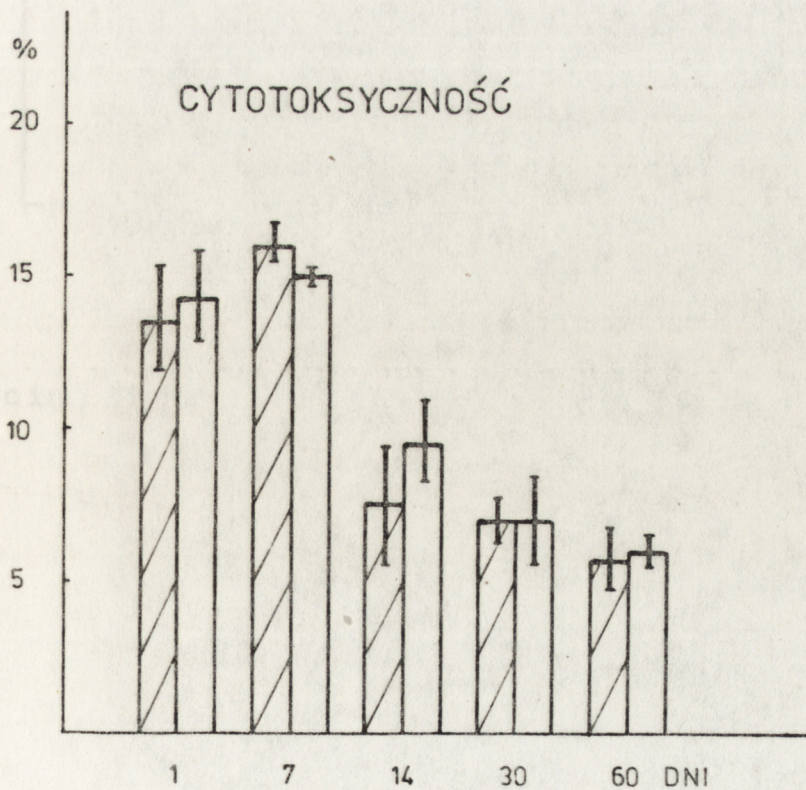
- makrofagi po różnym okresie przechowywania
- makrofagi niezamrożone /kontrolne/



Rycina 7. Fagocytoza SRBC  $^{51}\text{Cr}$  przez makrofagi  
przechowywane w temp.  $-196^{\circ}\text{C}$

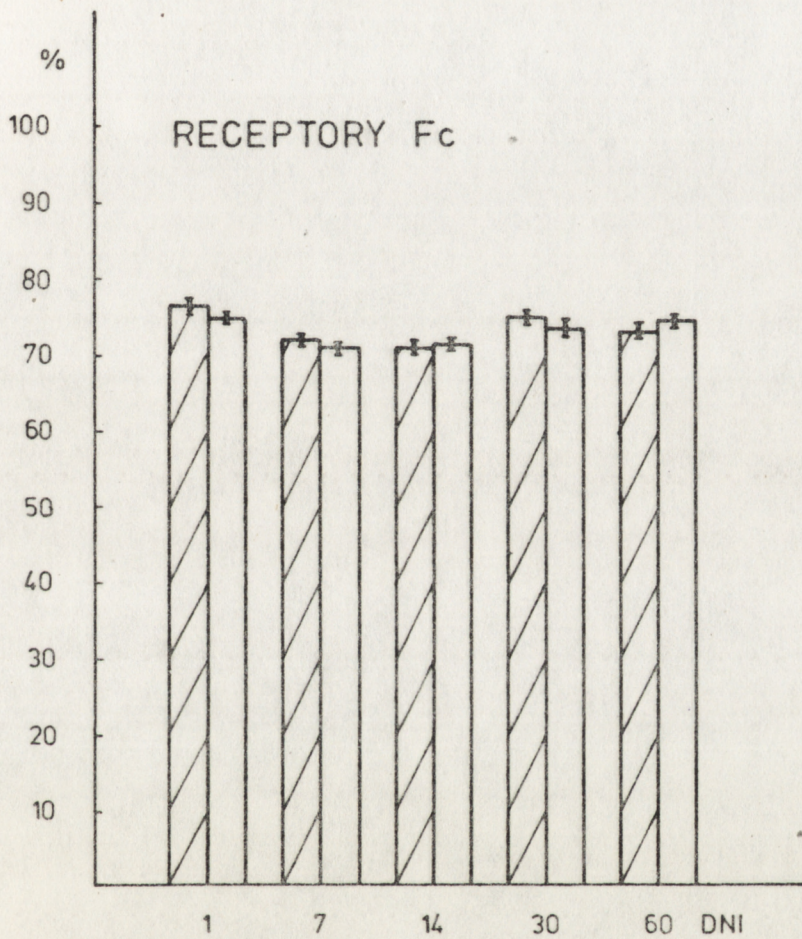


Rycina 8. Zdolność spontanicznej migracji makrofagów otrzewnowych myszy. Symbole - patrz ryc.6

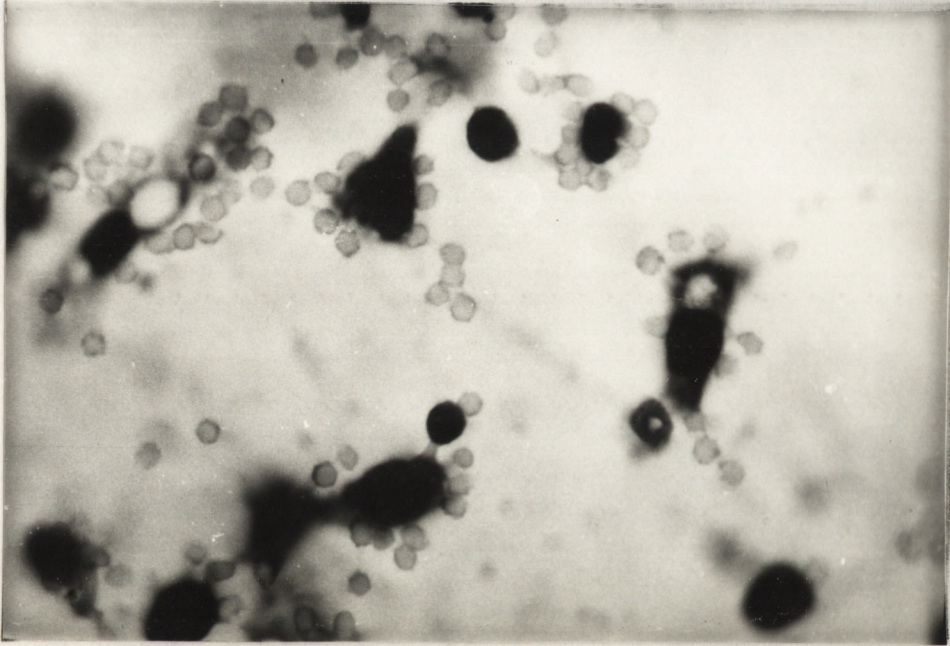


Rycina 9. Cytotoksyczność nieswoista makrofagów otrzewnowych myszy. Symbole - patrz ryc.6

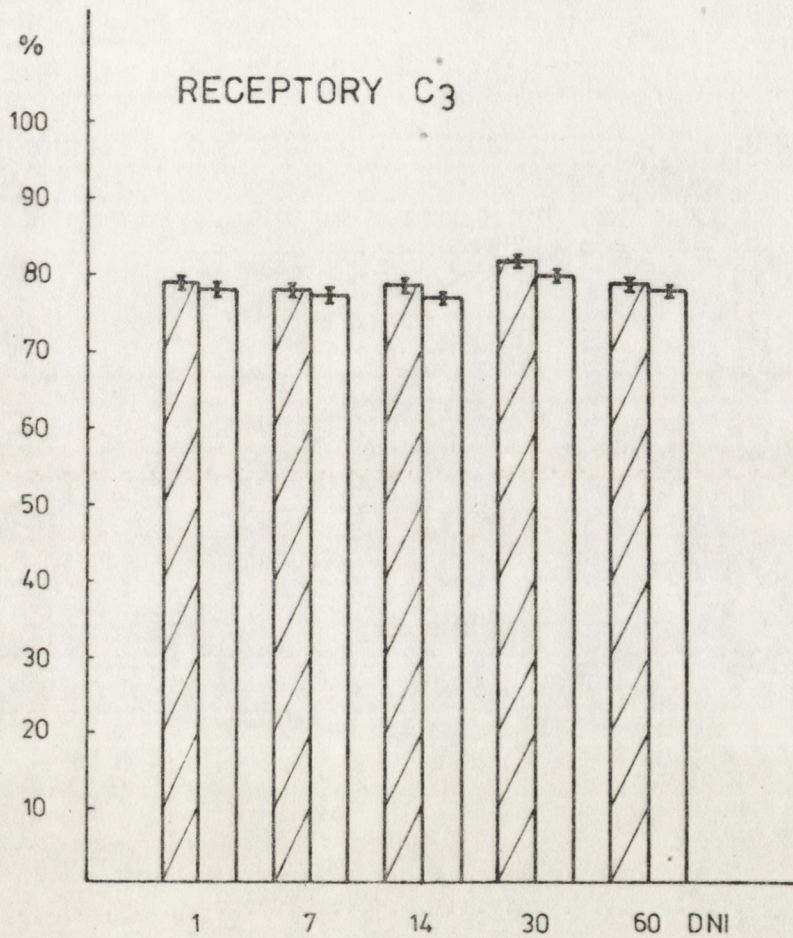




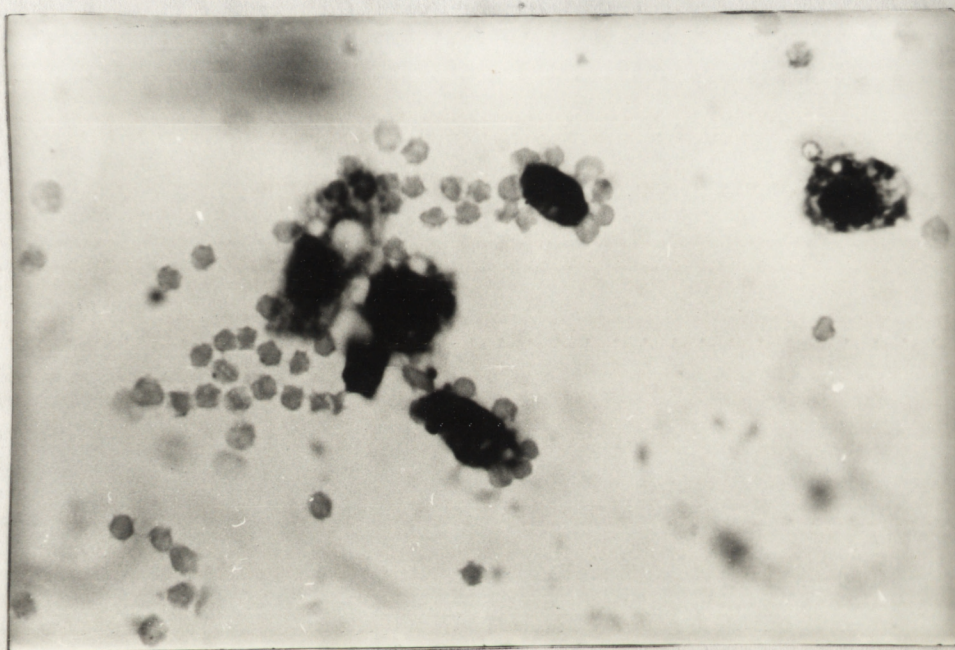
Rycina 10. Ilość wytworzonych EA rozetek przez makrofagi otrzewnowe myszy. Symbole - patrz ryc.6.



Rycina 11. Rozetki EA utworzone z erytrocytów opłaszczonych IgG, ułożonych wokół makrofagów przechowywanych w temp.  $-196^{\circ}\text{C}$



Rycina 12. Ilość wytworzonych EAC rozetek przez makrofagi otrzewnowe myszy. Symbole - patrz ryc.6



Rycina 13. Rozetki EAC utworzone z erytrocytów barana opłaszczonych IgM i dopełniaczem, ułożonych wokół makrofagów przechowywanych w temp.  $-196^{\circ}\text{C}$

Tabela 1. Żywotność makrofagów otrzewnowych myszy

Czas /dni/	1	3	7	14	30	60	90
Makrofagi po przechowywaniu /D/							
$\bar{X}$	70,5	67,3	69,3	73,5	61,5	58,0	75,7
arc sin $\sqrt{p}$	57,0	55,09	56,34	58,99	51,64	49,57	60,48
SD	5,56	8,66	11,08	6,50	5,35	5,51	2,34
SE	2,27	5,00	4,52	2,45	2,18	2,25	1,35
Makrofagi przed zamrożeniem /K/							
$\bar{X}$	97,2	97,0	97,9	97,5	97,7	96,9	96,4
arc sin $\sqrt{p}$	80,31	80,12	81,73	80,85	81,24	79,92	79,04
SD	5,24	1,70	4,19	4,31	4,58	4,98	1,70
SE	2,14	0,98	1,71	1,63	1,87	2,03	0,98
Istotność statystyczna	++	+	+	++	++	++	++

Tabela 2. Stopień odzysku makrofagów otrzewnowych myszy

Czas /dni/	1	3	7	14	30	60	90
Makrofagi po przechowywaniu $\bar{X}$	91,6	95,9	94,7	87,1	87,7	76,0	100,0
arc sin $\sqrt{p}$	73,18	78,31	76,67	68,86	69,50	60,65	
SD	14,23	20,24	11,96	14,57	16,40	16,31	
SE	5,81	11,68	4,88	5,50	6,69	6,66	
Makrofagi przed zamrożeniem $\bar{X}$	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Istotność statystyczna	+	-	+	+	+	+	-

Tablica 3. Zdolność fagocytozy SRBC <sup>51</sup>Cr przez makrofagi otrzymane myszy

Czas /dni/	1	3	7	14	30	60	90	
Makrofagi po prze- chowywaniu I eksp.	$\bar{X}$	14,2	10,9	15,8	23,7	12,1	7,7	14,7
	arc sin $\sqrt{p}$	22,04	19,32	23,40	28,90	20,25	16,10	22,58
	SD	2,85	1,14	2,76	5,40	2,34	0,36	1,30
SE	1,64	0,72	1,59	3,12	1,35	0,20	0,75	
Makrofagi nieza- eróżne	$\bar{X}$	23,9	22,8	31,7	37,2	14,6	10,3	20,3
	arc sin $\sqrt{p}$	29,26	28,53	34,20	37,61	22,30	18,74	26,75
	SD	0,53	1,00	3,18	1,56	3,52	1,54	0,40
SE	0,30	0,57	1,84	0,90	2,03	0,89	0,23	
Makrofagi po prze- chowywaniu II eksp.	$\bar{X}$	25,9	13,0	14,1	19,1	7,0	9,8	22,8
	arc sin $\sqrt{p}$	30,62	21,10	22,04	25,88	15,33	18,23	28,52
	SD	0,88	1,74	1,97	1,11	1,73	0,19	1,05
SE	0,50	1,01	1,13	0,64	1,00	0,11	0,60	
Makrofagi nieza- eróżne	$\bar{X}$	29,2	20,6	14,4	14,6	10,6	13,3	29,6
	arc sin $\sqrt{p}$	32,58	26,96	22,31	22,30	19,01	21,42	33,00
	SD	4,40	1,76	1,27	3,52	0,66	0,62	1,00
SE	2,54	1,01	0,73	2,03	0,38	0,36	0,58	
Makrofagi po prze- chowywaniu III eksp.	$\bar{X}$	9,3	12,4	18,6	19,1	13,5	8,3	22,1
	arc sin $\sqrt{p}$	17,78	20,61	25,41	25,67	21,52	16,73	28,14
	SD	0,40	2,06	4,58	0,35	1,67	1,14	1,08
SE	0,23	1,19	2,64	0,20	0,96	0,83	0,62	
Makrofagi nieza- eróżne	$\bar{X}$	13,3	29,7	31,7	29,2	13,1	10,6	20,2
	arc sin $\sqrt{p}$	21,42	33,00	34,25	31,86	21,23	19,01	26,75
	SD	0,62	1,00	3,18	2,35	0,17	0,66	0,40
SE	0,36	0,58	1,84	1,36	0,10	0,38	0,23	
Istotność statystyczna	++	++	++	-	-	++	++	

Tablica 4. Zdolność spontanicznej migracji makrofagów otrzewnowych myszy

Czas /dni/		1	3	7	14	30	60	90
Makrofagi po przechowywaniu I eksp.	-							
	X	0,43	0,34	0,44	0,37	0,29	0,29	0,32
	SD	0,11	0,06	0,04	0,06	0,08	0,05	0,08
	SE	0,03	0,02	0,01	0,02	0,03	0,02	0,03
Makrofagi niezamrożone	-							
	X	0,46	0,33	0,43	0,33	0,37	0,37	0,40
	SD	0,14	0,09	0,06	0,06	0,06	0,08	0,09
	SE	0,04	0,03	0,01	0,02	0,02	0,03	0,04
Makrofagi po przechowywaniu II eksp.	-							
	X	0,60	0,34	0,34	0,372	0,32	0,31	0,54
	SD	0,28	0,00	0,08	0,02	0,05	0,06	0,17
	SE	0,08	0,00	0,04	0,00	0,02	0,02	0,07
Makrofagi niezamrożone	-							
	X	0,55	0,49	0,38	0,46	0,47	0,37	0,40
	SD	0,08	0,04	0,06	0,06	0,08	0,06	0,09
	SE	0,02	0,02	0,02	0,02x	0,02x	0,02	0,04
Makrofagi po przechowywaniu III eksp.	-							
	X			0,35	0,36		0,34	0,30
	SD			0,08	0,07		0,00	0,04
	SE			0,02	0,02		0,00	0,01
Makrofagi niezamrożone	-							
	X			0,43	0,53		0,46	0,33
	SD			0,06	0,23		0,14	0,09
	SE			0,01	0,08		0,04	0,03
Istotność statystyczna	-	-	-	-	-	-	-	-



Tablica 5. Cytotoksyczność nieswoista makrofagów otrzewnowych myszy

Czas /dni/	1	7	14	30	60	
Makrofagi po przecho- wywaniu	$\bar{X}$	14,39	14,66	9,55	6,80	5,92
	arc sin $\sqrt{p}$	22,29	22,50	18,00	15,11	14,08
	SD	5,01	0,85	4,05	3,92	1,53
	SE	2,89	0,49	2,86	2,77	1,08
Makrofagi niezamro- żone	$\bar{X}$	13,48	16,34	7,43	6,76	5,88
	arc sin $\sqrt{p}$	21,53	23,84	15,82	15,07	14,03
	SD	6,00	1,76	5,18	2,06	2,66
	SE	3,46	1,02	3,67	1,46	1,88
Istotność statystyczna	-	-	-	-	-	

Tabela 6. Ilość wytworzonych rozetek EA przez makrofagi otrzewnowe myszy

Czas /dni/		1	7	14	30	60
Makrofagi po przechowywaniu I eksp.	$\bar{X}$	77,3	70,0	70,0	75,0	77,0
	SD	2,30	0,00	0,00	1,41	1,41
	SE	1,33	0,00	0,00	1,00	1,00
Makrofagi niezamrożone	$\bar{X}$	79,0	73,00	70,0	77,0	73,3
	SD	1,41	1,41	2,82	1,41	3,05
	SE	1,00	1,00	2,00	1,00	1,76
Makrofagi po przechowywaniu II eksp.	$\bar{X}$	75,0	70,0	73,0	74,0	75,3
	SD	1,41	2,82	1,41	5,65	1,15
	SE	1,00	2,00	1,00	4,00	0,66
Makrofagi niezamrożone	$\bar{X}$	76,0	71,3	72,0	77,0	73,0
	SD	5,65	4,16	0,00	1,41	1,41
	SE	4,00	2,40	0,00	1,00	1,00
Makrofagi po przechowywaniu III eksp.	$\bar{X}$	72,7	72,7	71,0	72,0	71,0
	SD	3,05	2,30	1,41	2,82	1,41
	SE	1,76	1,33	1,00	2,00	1,00
Makrofagi niezamrożone	$\bar{X}$	74,6	73,0	71,3	72,0	72,0
	SD	3,05	1,41	2,30	2,83	5,65
	SE	1,76	1,00	1,33	2,00	4,00
Istotność statystyczna		- <a href="http://rcin.org.pl">http://rcin.org.pl</a>		-	-	-

Tabela 7. Ilość wytworzonych rozetek EAC przez makrofagi otrzewnowe myszy

Czas /dni/	1	7	14	30	60
Makrofagi po przecho- wywaniu					
$\bar{X}$	78,6	77,3	77,0	80,0	78,0
SD	2,56	5,60	1,67	2,82	2,30
SE	0,90	2,29	0,68	1,15	0,87
Makrofagi niezamrożone					
$\bar{X}$	79,3	78,0	78,6	81,7	79,0
SD	4,84	3,09	4,85	1,96	2,44
SE	1,97	1,26	1,84	0,80	1,00
Istotność statystyczna	-	-	-	-	-