

Uniwersytet Jagielloński - Collegium Medicum

**Krzysztof Bryniarski**

**Prezentacja antygeny przez makrofagi  
różniące się wrażliwością  
na cyklofosfamid**

**praca doktorska**

**Promotor: dr habil. med Janusz Marcinkiewicz**

**praca została wykonana  
w Katedrze Immunologii  
Collegium Medicum UJ**

**Kraków 1995**

Bibl. Medyczna CM UJ



1816095201

*PODZIĘKOWANIE*

*Serdecznie dziękuję Panu  
Docentowi Januszowi Marcinkiewiczowi  
za cenne uwagi i wskazówki oraz  
życzliwą krytykę w czasie  
wykonywania tej pracy.*

*Dziękuję także Panu Prof. dr habil.  
med. Włodzimierzowi Ptakowi za  
krytyczną ocenę pracy.*

## SPIS TREŚCI

Słowniczek skrótów	4
Wstęp	6
Cel pracy	15
Materialy i Metody	16
Wyniki	27
Dyskusja	34
Wnioski	48
Streszczenie	49
Ryciny i Tabele	51
Piśmiennictwo	64

## SŁOWNICZEK SKRÓTÓW

- APC - komórka prezentująca antygen (Antigen Presenting Cell)
- B-220 - antygen z grupy CD45 typowy dla limfocytów B
- BSA - albumina bydlęca (Bovine Serum Albumin)
- C3R - receptor dla składnika 3 dopełniacza
- CD4, 8 - antygeny powierzchniowe limfocytów T (cluster of differentiation) określające przynależność do odpowiedniej subpopulacji
- CY - cyklofosfamid
- DPBS - pozbawiona jonów wapnia i magnezu, zbuforowana fosforanami sól fizjologiczna
- EDTA - sól sodowa kwasu etyleno-dwuamino-czterooctowego
- FcR - receptor dla fragmentu Fc immunoglobuliny
- FCS - płodowa surowica cielęca (foetal calf serum)
- GM-CSF - czynnik stymulujący kolonie granulocytów i monocytów (granulocyte monocyte colony stimulating factor)
- IFN $\gamma$  - interferon  $\gamma$
- Ia - (immune response associated) określenie antygenów regionu I u myszy stosowane również do określenia antygenów klasy II MHC u człowieka
- indeks górny <sup>+</sup> lub <sup>-</sup> - oznacza istnienie (+) lub brak (-) odpowiedniej cechy
- IL-1,-6 - interleukina 1, interleukina 6
- LPS - lipopolisacharyd
- LT - leukotrien
- Mf - makrofag
- MfCY - makrofagi pobrane od dawców traktowanych cyklofosfamidem
- MHC I, II- antygeny zgodności tkankowej klasy I i II (Major histocompatibility complex I , II)
- MRBC - mysie erytrocyty (Mouse Red Blood Cells)
- MTT - 3,4-dwumetylotiazo-2,5-dwufenylotetrazolowy bromek
- NK - nadwrażliwość kontaktowa
- NTP - nadwrażliwość typu późnego

PCL - chlorek pikrylu (hapten)

PGE - prostaglandyna

PGI<sub>2</sub> - prostacyklina

RANTES - czynnik wpływający na aktywację limfocytów T (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted)

SN - supernatant = nadsącz

Spl - komórki śledziony (splenocyty)

SplCY - splenocyty pobrane od dawców traktowanych cyklofosfamidem

SRBC - erytrocyty barana (Seep Red Blood Cells)

TcR - receptor antygenowy limfocytów T (T cell receptor)

TGF- $\beta$  - czynnik różnicowania wzrostu  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ )

Tiog1 - podłoże tioglikolanowe

Th1, -2 - limfocyty T pomocnicze (helper) typu pierwszego, typu drugiego

Thy - komórki grasicy - tymocyty

Thy-1 - antygen powierzchniowy limfocytów T

ThyCY - tymocyty pobrane od dawców traktowanych cyklofosfamidem

TNBSA - kwas trójnitrobenzenosulfonowy

TNF- $\alpha$ , - $\beta$  - czynnik  $\alpha$  nekrotyzujący komórki guza (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  - $\beta$ )

Ts - limfocyty T supresyjne

TXA - tromboksan

## WSTĘP

W II połowie XIX wieku (ok. 1888 r.) rosyjski zoolog Miecznikow opisał komórki żerne, które pojawiają się w wysięku zapalnym i silnie fagocytują bakterie. Nazwał je makrofagami (19,20,116,141). Z biegiem lat terminem tym zaczęto określać heterogenną populację jednojądrzastych komórek, które cechuje aktywność fagocytarna. Zróżnicowanie makrofagów wyraża się ich odmiennością morfologiczną (różnorodnością kształtów i wielkością komórek), fenotypową (różną ekspresją markerów powierzchniowych), biochemiczną (odmienną aktywnością metaboliczną) oraz różnorodnością funkcjonalną. Heterogenność funkcjonalna związana jest z wielorakimi i odmiennymi zadaniami pełnionymi przez makrofagi w układzie immunologicznym (19,67,87,107,112,141,167,171,176).

### *1. Makrofagi tkankowe a wolno krążące makrofagi stanu zapalnego*

Istnieją dwie całkowicie odmiennie populacje makrofagów (112). Pierwszą grupę stanowią osiadłe makrofagi tkankowe konstytucyjnie występujące w różnych tkankach czy narządach organizmu. Druga pula to makrofagi procesu zapalnego, które są mobilizowane w szpiku kostnym, i po przejściu stadium monocytu pojawiają się odczynu zapalnego.

Makrofagi tkankowe stanowią zróżnicowaną populację komórkową o odmiennej lokalizacji:

- makrofagi szpiku kostnego, węzłów chłonnych, śledziony, wątroby oraz

- makrofagi płucne, błon surowiczych: opłucnej i otrzewnej, jelitowe, tkanki mózgowej czy kostnej (20,109).

Aktywność makrofagów tkankowych ulega modulowana jest czynnikami parakrynnymi wydzielanymi zarówno przez komórki immunokompetentne jak i inne komórki somatyczne oraz na drodze autokrynej, po stymulacji własnymi monokinami, rodnikami czy eikozanoidami. Stymulacja makrofagów różnorodnymi sygnałami sekrecyjnymi istotnie wpływa na wielorakość funkcjonalną makrofagów. Z jednej strony makrofagi tkankowe pełnią funkcję komórek pomocniczych dla komórek immunokompetentnych, z drugiej natomiast odgrywają istotną rolę w procesach nie związanych bezpośrednio z funkcją immunologiczną (np w śledzionie i w wątrobie odpowiedzialne są za gospo-

darke jonami zelaza) (20).

Makrofagi stanu zapalnego powstaja w szpiku kostnym, gdzie w procesie hemopoezy roznicuja sie z multipotencjalnych komorek macierzystych tzw. komorek pnia (stem cells). W rozwoju komorkowym osiagaja kolejno stadia monoblasta, promonocyta i dojrzewaja do postaci monocyta (67,109). W tej formie przenikaja przez bariere szpik-krew. W krwiobiegu, monocyty docieraja do wlosniczkowych naczyń krwionośnych penetrujacych tkanke zmieniona zapalnie. Za pomoca szeregu mechanizmow chemotaktycznych i adhezyjnych oraz wykorzystujac mechanizm diapedezy przenikaja one ze swiatla naczyń wlosowatych, miedzy komorkami sredbionka do sredowiska pozanaczyniowego i jako makrofagi osiagaja ognisko stanu zapalnego. Tam pojawiaja sie w kilka godzin po granulocytach, ktore stanowia pierwsza linie obrony przeciwzapalnej. Makrofagi wraz z granulocytami tworza w ognisku zapalnym komorkowy naciek zapalny z obrzeka, wysiekiem i innymi cechami zapalenia (20,67).

## 2. Aktywacja makrofagow

Roznorodne czynniki patologiczne (biologiczne, chemiczne czy fizyczne) stymulujace powstanie stanu zapalnego sa przyczyna pobudzenia makrofagow do przejscia od formy spoczynkowej do aktywnej. Glownymi czynnikami aktywujacyimi makrofagi sa IFN $\gamma$  oraz drobnoustroje i ich toksyny. Szczegolnie czesto stosowanymi do eksperymentalnej aktywacji makrofagow sa: lipopolisacharyd (10,26,35,66,142), dwu- i trojpeptydy muramylowe (67,141), BCG (54,150) oraz inne substancje o wlasnosciami adiuwancyjnych. Zdolnosc mobilizacyjnego dzialania czynnikow zapalnych na makrofagi wykorzystana zostala praktycznie do eksperymentalnego pozyskiwania makrofagow otrzewnowych poprzez iniekcje dootrzewnowe oleju mineralnego Marcol 52, podloza tioglikolanowego, kompletnego adiuwantu Freuda (CFA) czy lipopolisacharydu. Aktywowane makrofagi sa komorkami wiekszymi, o spotegowanej zdolnoscii do adherencji, formowania pseudopodiow, wzroszonej zdolnoscii do fakultatywnego wewnatrzkomorkowego zabijania (67,156). Aktywacja makrofagow przejawia sie rowniez ich wzmoszona aktywnoscia sekrecyjna.

### 3. Funkcje makrofagów

#### 3.1. Funkcja fagocytarna - działalność obronna i reparacyjna

Makrofagi pełnią podstawową funkcję obronną i reparacyjną. Zadania te są nieodłącznie związane z aktywnością fagocytarną makrofagów. Działalność reparacyjna tych komórek przejawiają się w procesie zablizniania ran i usuwaniu tkanek uszkodzonych pozapalnie, jak i w nieswoistej fagocytozie cząstek nieorganicznych (44) (pyły, kurz, elementy dymu tytoniowego). Funkcja obronna makrofagów wyraża się w procesie niespecyficznego fagocytozy bakterii, pierwotniaków i grzybów (14,17,67). Makrofagi eliminują kompleksy immunologiczne powstałe w wyniku reakcji antygeny z przeciwciałem w procesie "ułatwionej" fagocytozy (107) przy udziale błonowych receptorów powierzchniowych dla fragmentu Fc immunoglobulin (FcR) oraz dla trzeciego składnika dopełniacza (C3R) (4,19,42,141,-169). Niezależnie od rodzaju fagocytozy makrofagi niszczą zawartość fagosomu przy udziale enzymów proteolitycznych i wysoce reaktywnych chemicznie związków: tlenku azotu, rodników tlenowych, jonów nadtlenkowych (28,-67,126,156) neutralizując szereg patogenów.

#### 3.2. Makrofagi jako komórki prezentujące antygen.

Makrofagi odgrywają centralną rolę w procesie prezentacji antygeny jako komórki prezentujące antygen (APC). Pojawiający się w ustroju antygeny makrofagi poddają procesowi przetworzenia (processingu), fagocytując go, i częściowo trawiąc, przy udziale katepsyn w endosomach (14,47,93,-122,125). Tak przygotowany antygen, częściowo zdegradowany do fragmentów kilkunasto-, dwudziestokilku - aminokwasowych, ulega następnie połączeniu w cytoplazmie makrofaga z peptydowymi łańcuchami  $\alpha$  i  $\beta$  antygenów zgodności tkankowej klasy II (15). Po około 1 do 3 godzin od momentu rozpoczęcia processingu (49) kompleks ten pojawia się na powierzchni błony komórkowej. Tam prezentowany jest limfocytom albo  $CD4^+$  pomocniczym Th1 w odpowiedzi głównie komórkowej (zarówno klasycznej cytotoksycznej jak i nadwrażliwości typu późnego), limfocytom Th2 w odpowiedzi humoralnej lub limfocytom supresyjnym (119) (funkcja regulacyjna), a także limfocytom B dzięki rozpoznaniu antygeny jakiego te komórki dokonują na APC przy udziale receptorów antygenowych o charakterze immunoglobulin powierzchniowych. O intensywności procesu prezentacji decyduje  $IFN\gamma$  (37,-174) wytwarzany przez limfocyty. Makrofagi jako komórki prezentujące



antygen, stymulowane IFN $\gamma$  wykazują zwiększoną ekspresję antygenów zgodności tkankowej MHC klasy II, co ułatwia prezentację antygeny. W procesie rozpoznania antygeny na APC IFN- $\gamma$  aktywuje limfocyty Th1 i jednocześnie hamuje pobudzenie limfocytów Th2 (43). Natomiast za bezpośrednią i zwrotną regulację procesu prezentacji antygeny limfocytom Th1 odpowiedzialne są cytokiny makrofagowe IL-12 i TGF- $\beta$ . IL-12 wzmaga różnicowanie się limfocytów Th0 do Th1 (55,108,146), co ukierunkowuje rozpoznanie antygeny na tory odpowiedzi komórkowej a TGF- $\beta$  hamuje ją m.in. poprzez spadek ekspresji antygenów MHC kl.II na makrofagach działając przeciwstawnie do IFN $\gamma$  (68,105,155), choć z drugiej strony TGF- $\beta$  hamuje różnicowanie limfocytów Th0 w kierunku Th2 (118,151). Czynniki modulującymi prezentację antygeny są także limfokiny IL-4 i IL-10 produkowane przez limfocyty pomocnicze Th2. Stymulują one rozpoznanie antygenów na tory odpowiedzi humoralnej poprzez wpływ IL-4 na różnicowanie się limfocytów Th0 do Th2 (55,108,146) a także zmniejszenie ekspresji molekuł adhezyjnych B7 i MHC II na APC czynnie zaangażowanych w prezentację antygeny limfocytom pomocniczym (29,65,78,166) i obniżenie sekrecji szeregu cytokin (m.in. IL-1) przez makrofagi (40) co jest medowane przez IL-10.

### 3.3. Funkcja sekrecyjna makrofagów.

Makrofagi modulują odpowiedź immunologiczną poprzez syntezę szeregu czynników sekrecyjnych o charakterze cytokin: IL-1 (4), IL-6 (165), TNF- $\alpha$  (6,155,160), CSF-1 (7), IL-8 (69), IL-12 (146), TGF- $\beta$  (25), IFN- $\alpha$  (39) oraz eikozanoidów: prostaglandyny (PGE2) (134,138,172), prostacykliny PGI2 (21), tromboksanów A2 (21) i B2 (141) i leukotrienów (LTC4,LTB4) (4,74) a także makrofagowych białek zapalnych (MIP1- $\alpha$  i - $\beta$ ) (46,159). Makrofagi posiadają receptory dla wielu czynników modulujących odpowiedź immunologiczną, zarówno fizjologicznych - cytokin: IL-1 (90,181), IL-4 (153), TNF- $\alpha$  (90,155), GM-CSF (91), TGF- $\beta$  (41,105,123), IL-10 (40,166), IL-13, (31,60), IFN- $\gamma$  (50,129,155,181), RANTES (145), jak też i patologicznych - toksyn bakteryjnych - egzotoksyn (superantygeny) (33) jak i endotoksyn pod działaniem których funkcje makrofagów ulegają aktywacji lub zahamowaniu (78,108,141,165).

### 3.4. Makrofagi jako komórki efektorowe nadwrażliwości typu późnego.

Oprócz roli indukcyjnej w prezentacji antygeny makrofagi stanowią także niezbędny element fazy efektorowej nadwrażliwości typu późnego. Po antygenowo-swoistym pobudzeniu limfokinami ( $\text{IFN}\gamma$ , IL-2,  $\text{TNF-}\beta$ ) uwolnionymi z limfocytów efektorowych nadwrażliwości typu późnego  $\text{Th1 CD4}^+$  makrofagi dokonują antygenowo - nieswoistej fagocytozy w ognisku zapalnym. W ten sposób makrofagi eliminują prątki gruźlicy (14,150,170) i trądu (139), *Listerię monocytogenes* (14,55), *Corynebacterium parvum* (17,86), *Legionellę pneumophila* (156), pierwotniaki (*Toxoplasma gondii*) (14,61) *Leishmania* (26,61) *Trypanosoma crusei* (61) *Plasmodium* (61) i grzyby (67). Proces wewnątrzkomórkowego zabijania tych drobnoustrojów wzmagany jest wewnątrzkomórkową produkcją tlenku azotu (156) a hamowany zwrotnie przez  $\text{TGF-}\beta$  - produkt sekrecji aktywowanych makrofagów (123).

### 3.5. Rola makrofagów w obronie przeciwnowotworowej.

Makrofagi ujawniają także cytotoksyczną aktywność antynowotworową (1,38). Wykazują wówczas spadek ekspresji antygenów układu MHC klasy II, co może sugerować zmniejszenie aktywności prezentacji antygenów, pomimo wzmożenia sekrecji IL-1 i  $\text{PGE}_2$  (6). Proces eliminacji komórek nowotworowych przez makrofagi jest wielostopniowy i zdeterminowany wrażliwością komórek docelowych na wydzielany przez makrofagi czynnik nekrotyzujący komórki nowotworowe -  $\text{TNF-}\alpha$  (6,141,164) oraz wolne rodniki (rodniki tlenowe i NO) (5).

### 3.6. Regulacyjna rola makrofagów w procesie limfopoezy.

Makrofagi odpowiedzialne są za kontrolę hemopoezy zarówno w szpiku kostnym jak i w grasicy. W szpiku kostnym makrofagi stymulują syntezę progenitorów monocytarnych i makrofagowych a w grasicy wpływają na różnicowanie się tymocytów. Za regulację hemopoezy odpowiedzialne są wydzielane przez makrofagi substancje takie jak: IL-1 (114), GM-CSF (37,-39,65,116), CSF-1 (19,37,116), IL-6 (178),  $\text{TGF-}\beta$  (58), oraz  $\text{PGE}_2$  (141). Ta różnorodność funkcjonalna makrofagów sugeruje istnienie subpopulacji, które mimo tej samej lokalizacji tkankowej pełnią odmienne zadania w ustroju.

#### 4. Nadwrażliwość kontaktowa - modelem badawczym odmienności funkcjonalnej makrofagów.

Nadwrażliwość kontaktowa (NK) jest antygenowo - swoistą reakcją alergiczną typu komórkowego o charakterze nadwrażliwości typu późnego (NTP). Rozwija się ona po kontakcie ze skórą haptenu, który wiąże się z białkami skóry i wywołuje pobudzenie antygenowe. Antygen związany z powierzchnią skóry rozpoznawany jest na komórkach prezentujących antygen - APC (makrofagach MHC II<sup>+</sup>, komórkach dendrytycznych, komórkach Langerhansa) przez limfocyty CD4<sup>+</sup> Th1 (178), które następnie wędrują do węzłów chłonnych. Tam ulegają proliferacji i różnicowaniu do limfocytów efektorowych NK. To haptenuowo - swoiste uczulenie pojawia się w ustroju w 4 do 7 dni od pierwszego kontaktu z antygenem. W przypadku ponownej styczności tego haptenu ze skórą, swoiście uczulone efektorowe limfocyty T NTP lokalizują się w miejscu depozycji haptenu i wydzielają szereg limfokin (IL-2, IL-3, IFN $\gamma$  i limfotoksynę - TNF- $\beta$ ). Limfokiny te o silnym działaniu chemotaktycznym na makrofagi przyciągają je do miejsca depozycji haptenu. Klinikcznym efektem reakcji NK jest rumień i obrzęk a mikroskopowo stwierdza się obfity limfocytarno - makrofagowy naciek komórkowy (46) o największym nasileniu po 17 do 24 godzinach od ponownego kontaktu z haptenu. W warunkach doświadczalnych obrzęk skórny w miejscu depozycji haptenu można zmierzyć i wyrazić w umownych jednostkach (1U =  $1 \times 10^{-3}$  cm). Stanowi to podstawę analizy testu NK wykonywanego na zwierzętach. Najczęściej testowanym modelowym zwierzęciem doświadczalnym jest mysz. W celu wywołania NK u zwierząt najczęściej używa się następujących haptenuów: [trójnitrochlorobenzenu (TNP) - chlorku pikrylu (PCL), dwunitrochlorobenzenu (DNP) lub oksazolonu (OX)] (103). Stosuje się też zróżnicowane sposoby i drogi uczulenia. Reakcję uczulenia na haptenu wywołuje u zwierząt naskórna aplikacja haptenu albo podskórne podanie syngenicznych komórek (np. makrofagów) znakowanych haptenu. Natomiast podanie znakowanych haptenu makrofagów drogą dożylną wywołuje stan tolerancji (51, 131, 132).

#### 5. Próby zróżnicowania funkcjonalnie odmiennych subpopulacji makrofagowych.

Opisano już wiele prób oceny funkcjonalnego zróżnicowania

makrofagów. W tym celu wykorzystano skomplikowane i czasochłonne metody sedimentacji (86,87) i wirowania (162,168) w gradientach substancji obojętnych o różnych gęstościach, wykorzystujące różnice ciężaru właściwego makrofagów. Badania te w korelacji z testami funkcjonalnymi (cytotoksyczności antynowotworowej czy zdolności prezentacji antygenu w teście nadwrażliwości typu późnego) pozwoliły jedynie na wstępną i niejednoznaczną selekcję funkcjonalnie odmiennych populacji makrofagów.

Niepowodzeniem zakończyły się próby wyodrębnienia markera powierzchniowego jednoznacznie różnicującego makrofagi pod względem pełnionej przez nie odmiennej funkcji immunologicznej.

Zastosowanie naświetlania promieniami UV było kolejną próbą wyselekcjonowania funkcjonalnie odmiennych subpopulacji makrofagowych. Oryginalne badania Kripke i Daynes dotyczące naświetlania myszy wysokimi dawkami ultrafioletu dowodziły, że promieniowanie to powoduje:

- w śledzienie spadek liczby komórek prezentujących antygen;
- zahamowanie indukcji nadwrażliwości kontaktowej po stymulacji haptenem;
- zahamowanie obrony przeciwnowotworowej;
- wystąpienie limfocytów T supresyjnych hamujących odrzucenie przeszczepionych komórek nowotworowych oraz indukujących haptenowo swoistą tolerancję (34,94,149,161).

W swoich badaniach nad heterogennością makrofagów Dorf wykorzystał zjawisko, że makrofag jest konieczny do indukcji nadwrażliwości kontaktowej i jest wrażliwy na promieniowanie ultrafioletowe (124). Dorf wraz ze współpracownikami starał się scharakteryzować wpływ promieni UV na odmiennosc subpopulacji makrofagowych odpowiedzialnych za indukcję supresji, ale dogłębne badania doświadczalne dały niekorzystne wyniki wykazując, że promieniowanie UV nie różnicuje funkcjonalnie makrofagów (124).

Dalsze badania nad odmiennoscia funkcjonalna makrofagów i ich charakterystyką przeprowadzone również przez zespół badawczy pod kierunkiem Dorfa skoncentrowane były na sfuzjowaniu funkcjonalnie odmiennych komórek makrofagowych z makrofagową linią komórkową P388D1 i wyprodukowaniu różnych hybrydom makrofagowych. Zespół Dorfa uzyskał ich kilkadziesiąt, z których dwie reprezentowały skrajnie odmienne funkcjonalnie makrofagowe

linie komórkowe. Pierwsza z nich - linia 63 to hybrydoma indukująca supresję w teście nadwrażliwości kontaktowej (71,82,163). Drugą stanowi hybrydoma 59 odpowiedzialna za stymulację limfocytów Th1. Na modelu linii 59 i 63 zbadano zróżnicowanie fenotypowe odmiennych funkcjonalnie hybrydom makrofagowych - ekspresję antygenów Ia, receptorów powierzchniowych - Mac-1, Mac-2, Mac-3 a także wpływ cytokin na modulację funkcji linii makrofagowych. Stwierdzono przykładowo, że długotrwała stymulacja IFN $\gamma$  makrofagowej linii 59 wiąże się ze zmianą jej funkcji i zamiast stymulacji limfocytów Th1 w nadwrażliwości kontaktowej prowadzi do mobilizacji limfocytów supresyjnych, czyli funkcji charakterystycznej dla hybrydomy 63 (59). Badania te obejmują jednak sztuczny model hybrydom makrofagowych (64).

Jak dotąd nie udało się określić czynnika, który umożliwiłby w jednoznaczny sposób ocenę funkcjonalnego zróżnicowania makrofagów występujących naturalnie lub też zaindukowanych poprzez eksperymentalną stymulację czynnikami zapalnymi.

#### *6. Cyklofosfamid jako lek oraz czynnik funkcjonalnie różnicujący populacje makrofagów*

Wyniki badań Hausmana (52) i Kuchroo (82) zasugerowały zastosowanie cyklofosfamidu, leku cytostatycznego szeroko stosowanego w leczeniu chorób nowotworowych, w celu zróżnicowania makrofagów na funkcjonalnie odmienne subpopulacje. Traktowanie cyklofosfamidem dawców makrofagów stało się narzędziem badawczym dla oceny heterogenności funkcjonalnej tych komórek. Badania doświadczalne dowodzą, że podanie cyklofosfamidu biorcom limfocytów supresyjnych przełamuje stan areaktywności immunologicznej - czyli hamuje stan supresji w teście nadwrażliwości kontaktowej u myszy. Podobny efekt uzyskuje się, gdy dawcom makrofagów na dzień przed zbiorem tych komórek podamy niską dawkę cyklofosfamidu. Makrofagi te wyznakowane haptenem i podane dożylnie syngenicznym biorcom zamiast indukcji limfocytów supresyjnych prezentują antygen limfocytom Th1. Problem ten wymaga jednak szerszego opracowania co będzie przedmiotem badawczym tej pracy.

Cyklofosfamid jest lekiem z grupy alkilujących o działaniu przeciwnowotworowym i immunosupresyjnym, stosowanym w medycynie już od 1958 r.

CY, który "in vitro" jest nieaktywny, zostaje przekształcony w wątrobie do aktywnej formy 4-hydroperoksyklofosfamid przy udziale oksydazy mikrosomalnej. Następnie, już w tkankach, 4-hydroperoksyklofosfamid ulega spontanicznemu rozpadowi do aktywnych metabolitów: fosforamidu musztardowego i akroleiny (27,114), lub też pod wpływem dehydrogenazy aldehydowej, której niedobór wykazują komórki nowotworowe, przekształcony zostaje do nieaktywnych metabolitów, w czym wyraża się ochronna rola tego enzymu w komórkach nienowotworowych (113,114).

W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy cyklofosfamid wykorzystany został do zbadania funkcjonalnej różnorodności makrofagów wykazujących odmienną wrażliwość na ten związek.

## CEL PRACY

Celem pracy jest określenie wpływu cyklofosfamidu na zróżnicowanie populacji makrofagów otrzewnowych o odmiennych własnościach biologicznych i morfologicznych. Zadaniem pracy jest scharakteryzowanie subpopulacji makrofagów wrażliwych lub niewrażliwych na działanie cyklofosfamidu pod względem funkcjonalnym w korelacji z ich obrazem fenotypowym. W pracy zostanie dokonane porównanie badanych subpopulacji makrofagów otrzewnowych pod względem funkcjonalnym z:

- ich cechami fizycznymi (ciężarem właściwym);
- cechami biologicznymi (zdolnością do fagocytozy i adherencji);
- ekspresją antygenów Ia (IA, IE, IJ) oraz receptorów powierzchniowych (FcRI, FcRII, C3R, Mac-1, Mac-2 i Mac-3).

Charakterystyka badanych populacji Mφ poparta zostanie oceną ich zdolności do sekrecji cytokin: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 oraz innych substancji wpływających na odpowiedź immunologiczną (NO i PGE2).

## MATERIAŁY I METODY

### 1. Zwierzęta doświadczalne

Używano myszy wsobnych szczepu CBA/Ca, samców i samic w wieku 8-10 tygodni. Zwierzęta pochodziły z hodowli Katedry Immunologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Do testowania poziomu IL-1 użyto myszy wsobnych szczepu C57 B1/6 w wieku od 6 do 7 tygodni z hodowli Zakładu Immunologii Klinicznej PAIP CMUJ w Krakowie.

We wszystkich testach in vivo badane grupy zwierząt liczyły 4-5 myszy.

### 2. Odczynniki

Do badań doświadczalnych użyto następujących odczynników:

podłoże tioglikolanowe, lipopolisacharyd W (LPS) z *Escherichia coli* - 0111:B4 i fitohemaglutynina (Bacto-Phytohemagglutinin) - (Difco, Detroit, MI, USA); olej mineralny Markol 52 (Exxon Corp. New York, NY, USA); podwójnie rekrytalizowany chlorek pikrylu (PCL) (chlorek trójnitrofenylu) (Chemtronics, Swannanoa, NC, USA); kwas trójnitrobenzenosulfonowy (TNBSA) (Eastman Organic Chemicals, Rochester, NY, USA); węgiel żelaza (GAF Corp. St. Louis, MO, USA); Ficoll i Percoll (Pharmacia, Uppsala, Szwecja); podłoże RPMI-1640 (RPMI) (Gibco, Grand Island, NY, USA); heparyna (Polfar, Warszawa); Cyklofosfamid (CY), Akty-nomycyna D, akroleina, 3-[4,5-Dwumetylotiazolo-2,5-difenylotetrazolowy bromek (MTT), czterochlorek silikonu (Sigma, St. Louis, MO, USA); sól sodowa kwasu etylenodwuaminoczworoocowego (EDTA) (BDH, Poole, UK); 2-Merkaptoetanol, sól sodowa kwasu kakodylanowego (Fluka AG Busch SG, - Szwajcaria); [ $H^3$ ] PGE<sub>2</sub>RIA Kit (Advanced Magnetics Inc., Cambridge, MA, USA); izopropanol, kwas ortofosforowy (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), dwuchlorowodorek (N-(1-Naftylo)etylenodwuaminy, i kwas sulfanilowy, (POCh, Gliwice); kwas solny (HCl) (Zakł. Azotowe, Tarnów); azydek sodu (NaN<sub>3</sub>) (Merck, Darmstadt, Niemcy); N<sup>G</sup>-monometylo-L-arginina (L-NMMA) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA); rekombinowana IL-1 (rIL-1) (Natl. Institute for Biol. Standards and Controls, UK), mysie rekombinowane cytokiny TNF- $\alpha$  (2x10<sup>7</sup> U/ml) i IL-6 (1x10<sup>9</sup> U/ml)- (dar Dr B.Chain - University College, London, UK); wzorzec



metylowanej pochodnej PGE<sub>2</sub> (Amersham, Amersham, UK).

### 3.A. Przeciwciała monoklonalne

Anty-IA<sup>k</sup> (HB-42), anty-IE<sup>k</sup> (Y-19), i anty-FcRII (2.4-G2) - dar Dr C. A. Janeway'a, (Yale University, New Haven, CT, USA); anty-TNP IgG2a (H1-2b-10.12), anty TNP IgG2b (HI-826-10.12), - Dr F. T. Liew (Molecular Biology Institute, La Jolla, CA, USA); anty Mac-1 (M1/70) (CD11b) (Behringer, Mannheim, Niemcy); anty Mac-2 (M3/38.1.2.8), anty Mac-3 (M3/84.6.34), i F4/80 - dar Dr J. M. Rhodes, (Statens Seruminstitut, Copenhagen, Dania);

### 3.B. Inne przeciwciała i surowice

Przeciwciała kozie anty-szczurze IgG znakowane fluoresceiną [FITC-goat anti-rat IgG] (Organon Technica, West Chester, PA, USA); przeciwciała kozie anty-mysie IgG znakowane fluoresceiną [FITC-F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG] (Zymed, West Chester, PA, USA); przeciwciała królicze przeciwko metylowanej pochodnej PGE<sub>2</sub> (Amersham, Amersham Wlk.Brytania); królicza gammaglobulina izolowana metodą strącania siarczanem amonu i kwasem kaprylowym - (przez mgr K. Bryniarskiego). Płodowa surowica cielęca (FCS) (Gibco, Grand Island NY, USA); albumina bydlęca (BSA) (Sigma, St. Louis MO).

### 3.C. Linie komórkowe

W badaniach opisywanych w niniejszej pracy wykorzystano następujące linie komórkowe:

-linia B9 i L-929 uzyskane od Dr M. Chain'a (Department of Biology, - University College, London, UK).

## 4. Przygotowanie komórek

### 4.1. Makrofagi otrzewnowe (Mf)

Myszy otrzymały dootrzewnowo (i.p.) 2 ml oleju mineralnego (olej Markol 52, lub podłoża tioglikolanowego (tiogl). Pięć dni później zwierzętom zabitym przez dyslokację kręgow szyjnych wstrzyknięto i.p. 4 ml DPBS zawierającego 5 j heparyny / ml i delikatnie masowano powłoki brzuszne przez 1 min. Po otwarciu otrzewnej płyn zbierano a następnie komórki odwirowano przy 1500 obr./min. Krwinki czerwone usuwano przy

pomocy szoku osmotycznego. Odwirowane komórki zawieszano w 5 ml jałowej wody destylowanej a następnie osmotyczność wyrównywano dwukrotnie stężoną zbuforowaną solą fizjologiczną. Komórki odwirowano przy 1500 obr./min i dwukrotnie płukano DPBS. Z myszy otrzymano przeciętnie od  $1-3 \times 10^7$  komórek, wśród których makrofagi stanowiły około 90%. Żywotność komórek wynosiła blisko 100%.

#### 4.2 *Limfocyty grasicy, śledziony i węzłów chłonnych*

Grasicę, śledzionę oraz pachwinowe i pachowe węzły chłonne zbierano do zimnego ( $4^{\circ}\text{C}$ ) DPBS. Zawiesinę pojedynczych komórek uzyskiwano przez delikatne roztarcie pomiędzy matowymi, mikroskopowymi szkiełkami podstawowymi. Komórki pipetowano kilkakrotnie a następnie przesączono przez nylonową gazę (Nybolt 110) i 2-3 krotnie przemywano DPBS.

#### 4.3. *Traktowanie dawców komórek cyklofosfamidem*

Dawcom makrofagów, splenocytów lub tymocytów na 24 godziny przed zbiorem komórek podawano dożylnie cyklofosfamid w dawce 50 mg/kg wagi ciała myszy w 0.2 ml DPBS. Dawkę tą ustalono po wstępnej analizie wpływu różnych dawek cyklofosfamidu (20, 50 i 200 mg/kg) na zdolność makrofagów znakowanych haptenem do indukcji nadwrażliwości kontaktowej u syngenicznych biorców.

#### 4.4. *Traktowanie akroleiną makrofagów "in vitro"*

Makrofagi otrzewnowe indukowane tioglikolanem (jak opisano w pkt. 4.1) w ilości  $5 \times 10^5$ /ml 0.1% akroleiny poddawano 40 min inkubacji w temp.  $0^{\circ}\text{C}$ . Następnie Mf płukano 4 krotnie DPBS i po ocenie żywotności w teście z błękitem trypanu używano do dalszych testów.

#### 4.5. *Znakowanie komórek haptenem TNP*

Makrofagi otrzewnowe (Mf), splenocyty (Spl) i tymocyty (Th) znakowano haptenem TNP zgodnie z metodą opisaną przez Shearera (148). 10 mM roztwór TNBSA w DPBS adjustowano do pH 7.2 przy pomocy  $0.5\text{M Na}_2\text{HPO}_4$  i przechowywano zamrożony w  $-30^{\circ}\text{C}$ . Komórki w ilości  $5 \times 10^7$  inkubowano w 1 ml 3 mM roztworu TNBSA w DPBS przez 10 min w temp. pokojowej w ciemności po czym komórki płukano kilkakrotnie roztworem DPBS z dodatkiem 1% FCS.

Znakowanie komórek haptenem TNP nie wpływało w istotny sposób na ich żywotność.

#### 4.6. *Znakowanie erytrocytów haptenem TNP*

Jeden ml upakowanych mysich krwinek (MRBC) zawieszono w roztworze 20mg TNBSA w 7 ml buforu kakodylanowego i poddawano sprzęganiu w temperaturze pokojowej przez 10 min bez dostępu światła w temp pokojowej. Następnie niezwiązany z erytrocytami nadmiar haptenu odpłukiwano jednokrotnie DPBS z 1% BSA a potem kilkakrotnie DPBS. Zawiesinę krwinek znakowanych TNP (TNP-MRBC) stosowano do dalszych testów.

### 5. Metody separacji makrofagów

#### 5.1. *Separacja makrofagów na schodkowym gradiencie Ficollu*

Separacji komórek wysięku otrzewnowego na frakcje dokonywano poprzez ich wirowanie w schodkowym gradiencie Ficollu (53). Makrofagi przygotowane jak w pkt.4 zawieszono w roztworze DPBS z 1% FCS w koncentracji  $2 \times 10^7$  komórek / ml. Na przygotowany w silikonowanych, szklanych probówkach okrągłodennych o pojemności 30 ml, gradient Ficollu w DPBS o kolejnych stężeniach 10, 9, 8 i 5% nakładano ostrożnie 6 ml zawiesiny makrofagów i wirowano w wirówce z rotorem odchylnym przy  $1000 \times g$  przez 30 min w temp.  $4^{\circ}C$  (53). Zebrane na granicach stężeń Ficollu frakcje komórkowe odpłukiwano kilkakrotnie DPBS i przeliczone komórki używano do dalszych doświadczeń. Wirowanie w gradiencie nie wpływało na żywotność komórek. Podobną preparatykę stosowano w przypadku rozdziału makrofagów w gradiencie schodkowym albuminy bydlęcej (BSA) (roztwory 30, 20 15 i 11% w DPBS) (53) i Percollu (roztwory 63, 57, 51, 45 i 39% - gradient flotacyjny).

#### 5.2. *Separacja makrofagów na populacje adherentną i nieadherującą.*

Makrofagi otrzewnowe o koncentracji  $5 \times 10^7$  komórek w 8 ml podłoża RPMI 1640 z 2% FCS inkubowano na plastikowych płytkach Petriego o średnicy 9 cm (Fischer Scientific, nr kat. 8-757-12) przez 2 godz. w  $37^{\circ}C$ . Populację nieadherującą zbierano poprzez przemycie płytek tym samym podłożem. Populację adherującą odzyskiwano z tak przemytych płytek po ich 5 min inkubacji w  $4^{\circ}C$  z nałożonymi na płytkach 3 ml lodowatego 0.02%

roztworu EDTA w DPBS. Obie grupy komórek płukano dwukrotnie w DPBS przed ich dalszym użyciem do testów (53).

### 5.3. *Rozdział makrofagów pod względem ich własności fagocytarnych.*

Rozdziału komórek fagocytydujących i nefagocytydujących dokonano inkubując pełną populację makrofagów o koncentracji  $3 \times 10^7$  komórek w 4 ml RPMI z 4% FCS z zawiesiną 0.15g węgliku żelaza w 1ml DPBS w silikonowych probówkach szklanych. Komórki inkubowano przez 10 i 45 min w cieplarni w  $37^{\circ}\text{C}$ . Podczas inkubacji zawartość probówek mieszano co kilka minut. Rozdziału populacji fagocytydującej od niezdolnej do fagocytozy dokonano za pomocą magnesu poprzez usunięcie wolnego i sfagocytyowanego w makrofagach węgliku żelaza. Komórek fagocytydujących nie można było wykorzystać do testów ze względów preparatywnych (mała żywotność, niemożność podania dożylnego - ryzyko zatoru). Dalszym badaniom poddawano więc wyłącznie komórki nefagocytydujące. Komórki te po zakończeniu inkubacji i usunięciu populacji fagocytydującej wraz z węglikiem żelaza odpłukiwano dwukrotnie od podłoża w DPBS przed ich użyciem do dalszych testów (53).

## 6. Testy nadwrażliwości kontaktowej

### 6.1. *Wywołanie reakcji nadwrażliwości kontaktowej*

W siedem dni po dożylnym podaniu standardowej ilości ( $1 \times 10^6$ ) komórek (Mf, Spl, Th) znakowanych TNP, myszy testowano w kierunku nadwrażliwości kontaktowej (8). U zwierząt zmierzono grubość małżowiny usznej przy pomocy śruby mikrometrycznej (Mitutoyo) z numerycznym odczytem o dokładności 0.001 cm, a następnie rozprowadzono po obu stronach małżowiny po 1 kropli (igła 27 gauge, 1 kropla = 0.02 ml homologicznego 0.7% chlorku pikrylu rozpuszczonego w oliwie z oliwek). Grubość uszu mierzono po 24 godzinach dokonując zawsze dwóch pomiarów, a przyrost grubości, który jest różnicą pomiarów przed wywołaniem i po wywołaniu reakcji, wyrażano w jednostkach ( $1j = 10^{-3}$  cm). Dla określenia nieswoistego obrzęku wywołanego drażniącym działaniem haptenu a stanowiącego tło reakcji, do każdego doświadczenia włączano grupę kontrolną (negatywną), którą stanowiły zwierzęta nieuczulone. Wyniki grupy kontrolnej odejmowano od wyników grup doświadczalnych (8). W niektórych doświadczeniach zwierzęta uczulano przez aplikację na ogoloną skórę brzu-

cha i klatki piersiowej oraz tylne kończyny 0.15 ml 5% chlorku pikrylu w mieszaninie acetonu i etanolu (1:3). Zwierzęta używano do doświadczeń po 4 dniach od uczulenia (8).

### 6.2. *Adoptywny (bierny) transfer nadwrażliwości kontaktowej.*

Syngenicznym biorcom podawano  $7 \times 10^7$  komórek śledziony (Spl) dawców immunizowanych 7 dni wcześniej TNP-Mf lub TNP-MfCY. W przypadku biernego transferu komórek pochodzących od zwierząt uczulonych naskórną chlorkiem pikrylu, do transferu używano mieszaniny  $7 \times 10^7$  limfocytów śledziony i węzłów chłonnych pobranych w 4 dni po uczuleniu dawców (8,182). Bezpośrednio po transferze, dla określenia stopnia przeniesionej biernie nadwrażliwości kontaktowej, rozprowadzono hapten na małżowinach usznych. Pomiaru przyrostu ich grubości dokonywano po 24 godz.

### 6.3. *Test zahamowania supresji w transferze NK u myszy*

Syngenicznym biorcom podano dożylnie  $1 \times 10^6$  TNP-Mf lub TNP-MfCY. Podobnie syngenicznym biorcom podano w ilości standardowej znakowane TNP makrofagi, pobrane od myszy kontrolnych lub traktowanych CY i izolowane z dolnych, "ciężkich" frakcji gradientu Ficollu. Po 7 dniach, myszy te wraz z niestymulowaną grupą kontrolną uczulono PCL, zgodnie z protokołem w pkt.6.1. W cztery dni później reakcję zahamowania supresji oszacowano w teście NK (pkt.6.1.) aplikując na obie strony małżowiny usznej 0.7% roztwór PCL w oliwie mierząc przyrost obrzęku małżowiny usznej po 24 godz.

## 7. Testy rozetowe

### 7.1. *Rozety z przeciwciałami cytofilnymi IgG2a - ekspresja receptora FcRI*

Tworzenie rozet oceniano w zawieszynie komórkowej. Makrofagi o koncentracji  $2 \times 10^6$  w 1 ml DPBS inkubowano z monoklonalnymi przeciwciałami  $\alpha$ -TNP IgG2a o mianie oznaczonym w odczynie hemaglutynacji 1:320, w rozcieńczeniu 1:5 przez 45 min w  $4^\circ\text{C}$ , po czym przemywano komórki kilkakrotnie lodowatym DPBS. Następnie sporządzano mieszaninę makrofagów i mysich erytrocytów znakowanych TNP (TNP-MRBC) w proporcji 1:10 i inkubowano ją na rotatorze pionowym w  $4^\circ\text{C}$  przez 30 min. Oceny zdolności tworzenia rozet dokonywano w komorze Bürkera. Obliczano procentową zawartość makrofagów

przyłączających więcej niż 3 erytrocyty traktując je jako komórki rozetujące. Dla każdej z grup test wykonywano w duplikatach (53,111).

## 7.2. *Rozety EA IgG2b - ekspresja receptora FcRII*

Tworzenie rozet oceniano w zawiesinie komórkowej. Wyznakowane TNP 1% MRBC opsonizowano 1 jednostką hemaglutynacyjną przeciwciał  $\alpha$ -TNP IgG2b w temp. 37°C przez 30 min. Dwukrotnie odpłukane kompleksy TNP-MRBC -  $\alpha$ TNP IgG2b dodano do Mf w proporcji 10:1 i mieszaninę inkubowano na rotatorze pionowym w 4°C przez 30 min. Oceny zdolności tworzenia rozet dokonywano w komorze Bürkera. Obliczano procentową zawartość makrofagów przyłączających więcej niż 3 erytrocyty traktując je jako komórki rozetujące. Dla każdej z grup test wykonywano w duplikatach (53,111).

## 8. Preparatyka oznaczeń immunofluorescencyjnych.

### 8.1. *Preparatyka znakowania komórek do oznaczeń w cytofluorymetrze przepływowym FACScan*

Makrofagi o koncentracji  $2 \times 10^6$  w 1ml DPBS inkubowano z 10  $\mu$ l gammaglobuliny króliczej o stężeniu 30 mg/ml przez 20 min w temp. 0°C w celu ograniczenia nieswoistego wiązania przeciwciał. Po dwukrotnym płukaniu lodowatym DPBS z 0.02%  $\text{NaN}_3$  komórki zwirowano i płyn zdekantowano. Do zawiesiny komórek w objętości 200  $\mu$ l DPBS z 0.02%  $\text{NaN}_3$  dodawano 200  $\mu$ l mysich przeciwciał  $\alpha$  Ia w rozcieńczeniu 1:10 lub szczurzych przeciwciał  $\alpha$  FcRII,  $\alpha$  Mac-2 lub  $\alpha$  Mac-3 w rozc. 1:5, czy też przeciwciał  $\alpha$  Mac-1 w rozc. 1:100. Komórki inkubowano w 0°C przez 30 min po czym dwukrotnie płukano lodowatym DPBS z 0.02% azydkiem sodu. Następnie do osadu komórek zawieszonych w 200  $\mu$ l DPBS dodano po 1  $\mu$ l znakowanej FITC koziej surowicy  $\alpha$  mysie IgG lub znakowanej FITC koziej surowicy  $\alpha$  szczurze IgG - odpowiednio do gatunku z jakiego pochodziły przeciwciała znakujące determinanty na makrofagach. Komórki inkubowano na lodzie przez 20 min po czym płukano trzykrotnie w DPBS z 0.02%  $\text{NaN}_3$  zawieszając komórki do analizy w 400  $\mu$ l buforu DPBS z azydkiem. Równocześnie z próbkami badanymi przygotowano kontrolne próbki ślepe dla wykazania stopnia nieswoistej fluorescencji. Były nimi makrofagi blokowane króliczym IgG inkubowane jedynie z przeciwciałami związanymi z fluoresceiną z pominięciem znakowania przeciwciałami I stopnia. Procent fluoryzujących komórek oraz intensywność fluorescencji

cji mierzono w cytofluorymetrze przepływowym FACScan, mierząc 10 tys. komórek znakowanych po wykluczeniu z analizy komórek martwych za pomocą znakowania jodkiem propydydy dodając do wszystkich analizowanych próbek na 5 min przed ich oznaczeniem  $2\mu\text{g}$  tego odczynnika (81,167). Test wykonywano trzykrotnie w niezależnych doświadczeniach.

## 9. Metodyka badania zdolności sekrecyjnych makrofagów.

### 9.1. *Hodowla makrofagów*

Zawiesinę Mf kontrolnych lub od dawców traktowanych CY (MfCY) o koncentracji  $1 \times 10^6$  komórek w 1 ml podłoża RPMI 1640 z 5% FCS, w w trzykrotnie powtarzanych próbach o objętości 1 ml każdy, hodowano na 24 celowych płytkach hodowlanych w  $37^\circ\text{C}$  w środowisku 5%  $\text{CO}_2$  przez 24 godz. Część grup stymulowano lipopolisacharydem (LPS) w stężeniu 100 ng/ml hodowli (16). Supernatanty z hodowli zbierano po 24 godz. i do czasu oznaczeń badanych czynników sekrecyjnych przechowywano zamrożone w temp.  $-30^\circ\text{C}$ .

### 9.2.a. *Oznaczenie IL-1*

Test wykonywano na tymocytach pobranych od 6-7 tygodniowych myszy wsobnych szczepu C57 B1/6. Na okrągłodennej płytce 96 dołkowej wylano po 100  $\mu\text{l}$  zawiesiny tymocytów o koncentracji  $3 \times 10^7/\text{ml}$  do których dodano po 100  $\mu\text{l}$  standardu (1000 U IL-1/ml) lub 100  $\mu\text{l}$  supernatantów badanych w rozcieńczeniach 10, 100 i 1000 krotnych w podwójnych powtórzeniach próby. Hodowle te przeprowadzane były w obecności 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  fitohemaglutyniny przez 72 godziny. Cztery godziny przed zakończeniem hodowli do każdego z oczek dodawano po 0.5  $\mu\text{Ci}$   $\text{H}^3$ -tymidyny ( $[\text{H}^3]\text{TdR}$ ) (Amersham, Amersham, UK) i jej inkorporację badano po 4 godz. inkubacji. Aktywność  $\text{H}^3$ -tymidyny wbudowanej do komórek badano w liczniku scyntylicyjnym (Beckman). Aktywność próbki badanej jest wprost proporcjonalna do stężenia IL-1 w SN. (75,87,98).

### 9.3. *Oznaczenie IL-6*

Interleukinę 6 oznaczano w proliferacyjnym teście kolorymetrycznym przy użyciu linii B-9. Komórki tej linii po wstępnym trzykrotnym odplukaniu od podłoża i zawieszono w podłożu RPMI 1640 z 4% FCS w koncen-

tracji  $6 \times 10^4$  komórek / ml. Test wykonywano na 96-celowych płaskodennych płytkach hodowlanych. Próbę ślepią stanowiło 200  $\mu$ l podłoża RPMI z 2% FCS, kontrolę ujemną - mieszanina 100  $\mu$ l podłoża RPMI z 4% FCS i 100  $\mu$ l komórek linii B9 w RPMI. Standard (o stężeniu 5000 U/ml IL-6) rozcieńczano w stosunku 1:5 używając po 25  $\mu$ l wzorca i mieszając tą objętość w 100  $\mu$ l podłoża, powtarzając to pięciokrotne rozcieńczenie w każdej kolejnej z 8 cel aż do uzyskania końcowego rozcieńczenia 1:390 tys. Analogicznie rozcieńczano testowane supernatanty (SN) z hodowli makrofagów. Następnie do wszystkich dołków za wyjątkiem próby ślepej dodawano po 100  $\mu$ l zawiesiny komórek linii B-9. Tak przygotowaną płytkę inkubowano przez 3 doby w cieplarni w  $37^\circ\text{C}$  z 5%  $\text{CO}_2$ . W 3 dniu z każdego dołka płytki testowej usuwano po 120  $\mu$ l SN i dodawano do każdego dołka po 20  $\mu$ l roztworu MTT w DPBS o stężeniu 5mg/ml. MTT utleniony w mitochondriach żywych komórek zmienia zabarwienie z żółtego na niebieskie. Po 3.5 godzinach inkubacji płytki w  $37^\circ\text{C}$  do wszystkich cel płytki dodawano po 150  $\mu$ l zakwaszonego HCl izopropanolu (rozrywa błony komórkowe uwalniając zmetabolizowany barwnik). Płytkę inkubowano w ciemności, w temp. pokojowej do następnego dnia, kiedy w spektrofotometrze Sumal PE-2 dokonywano pomiaru ekstynkcji przy długości fali  $\lambda=570$  nm wobec ślepej próby (tzw.tło - 4 pierwsze dołki I rzędu płytki). Interpretacji zależności ekstynkcji od stężenia IL-6 dokonywano na podstawie analizy odczytu krzywej standardowej przyjmując za wartość zerową ekstynkcję zmierzoną w kontroli ujemnej. Stężenia IL-6 w próbkach badanych obliczano względem krzywej standardowej z uwzględnieniem stosowanego rozcieńczenia SN. Wyniki podawano w U IL-6/ml SN (36,117).

#### 9.4. Oznaczanie TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  oznaczano w teście kolorymetrycznym z użyciem linii komórkowej L-929 wrażliwej na cytotoksyczne działanie tej cytokiny. Odpłukane od podłoża i dwukrotnie przemyte komórki linii L-929 zawieszono w podłożu RPMI 1640z 4% FCS w koncentracji  $2 \times 10^5$  komórek / ml wylano na płaskodennej 96-dołkowej płytce do wszystkich cel, za wyjątkiem 4 pierwszych otworków pierwszego rzędu - próba ślepa. Następnego dnia na osobnej 96-dołkowej płytce przygotowano rozcieńczenia standardu i SN badanych w dwukrotnych lub trzykrotnych powtórzeniach stosując jako pierwsze



rozcieńczenie 1:4 (150  $\mu$ l RPMI + 50  $\mu$ l badanego SN lub standardu) a następnie 7-krotnie rozcieńczenie 1:2 (100  $\mu$ l w/w mieszaniny + 100  $\mu$ l RPMI). Na płytkę z wcześniej przygotowanymi komórkami linii L-929 przenoszono po 100  $\mu$ l tak przygotowanych rozcieńczeń poczynając od drugiego rzędu płytki. W rzędzie pierwszym 4 pierwsze cele stanowiły próbę ślepa - 200  $\mu$ l podłoża RPMI z 2% FCS, 4 dalsze cele I rzędu - wyłącznie komórki linii L-929 w RPMI z 2% FCS - kontrolę ujemną. Do wszystkich otworków na płytce dodano aktynomycynę w stężeniu 0.1 $\mu$ g / dołek i płytkę inkubowano 24 godz. w 37 $^{\circ}$ C w 5% CO<sub>2</sub>. Następnie po skontrolowaniu żywotności komórek płyn z płytki usuwano i zastępowano roztworem 0.5% MTT w DPBS w objętości 100  $\mu$ l na dołek. Płytkę inkubowano 3.5 godz. po czym roztwór MTT usuwano i płytkę zamrażano w celu rozbicia komórek. Na godzinę przed pomiarem na rozmrożoną płytkę nalewano po 100  $\mu$ l roztworu izopropanolu zakwaszonego HCl i oznaczano ekstynkcję przy długości fali 570 nm w spektrofotometrze Sumal PE-2 - stosując zasady pomiaru i analizy testu jak opisano w - pkt.10.3. Ekstynkcja badanego roztworu w tym teście jest funkcją odwrotnie proporcjonalną do poziomu TNF- $\alpha$  zawartego w badanym SN. Poziom TNF- $\alpha$  odczytywano z krzywej standardowej uwzględniając jednocześnie rozcieńczenie badanego SN. Wyniki podawano w U TNF- $\alpha$  / ml SN (117,134).

#### 9.5. Oznaczanie PGE<sub>2</sub>

Oznaczenie zostało wykonane firmowym testem radioimmunologicznym w oparciu o zasadę kompetycji między znakowaną J<sup>125</sup> metylovaną pochodną PGE<sub>2</sub> a nieznakowaną pochodną PGE<sub>2</sub> zawartą w próbkach badanych w stosunku do specyficznego przeciwciała króliczego skierowanego przeciw pochodnej metylowej PGE<sub>2</sub>. Pierwszym etapem jest przeprowadzenie PGE<sub>2</sub> w metylovaną pochodną. W tym celu do 100  $\mu$ l próbki badanej dodano 100  $\mu$ l roztworu chlorowodoru metoksyaminy w buforze octanowym i inkubowano przez 1 godz. w temp. 60 $^{\circ}$ C. Następnie do próbek wlewano po 100  $\mu$ l próbki badanej, 100  $\mu$ l standaryzowanej pochodnej PGE<sub>2</sub> znakowanej J<sup>125</sup> oraz 100  $\mu$ l specyficznego przeciwciała i inkubowano próbki w łaźni wodnej w 25 $^{\circ}$ C przez 2 godz. Następnie oddzielano niezwiązane z przeciwciałem ligandy dodając do każdej próbki 250  $\mu$ l odczynnika Amerlex-M (ośle przeciwciało  $\alpha$  królicze opłaszczony na cząstkach magnetycznego polimeru) i próbki inkubowano przez 15 min w temp. pokojowej, po czym wirowano 10 min w 4 $^{\circ}$ C przy 1500

obr/min. Po zdekantowaniu osadu radioaktywność każdej próbki mierzono w liczniku studzienkowym przez 1 min. Oznaczony poziom radioaktywności odpowiadał ilości związanej z przeciwciałem znakowanej  $J^{125}PGE_2$ , równoważnej ilości nieznakowanej  $PGE_2$  z próbki badanej. Stężenie prostaglandyny odczytywano przez interpolację z krzywej wzorcowej otrzymanej z pomiaru radioaktywności kolejnych rozcieńczeń standardu  $PGE_2$  znakowanej  $J^{125}$ .

#### 9.6. Oznaczanie NO/NO<sub>2</sub>

Test oznaczenia NO/NO<sub>2</sub> wykonywano na płaskodennej płytce 96-dołkowej wg. metody Dings'a z odczynnikiem Griess'a, którym jest sporządzona "ex tempore" mieszanina 1:1 (v/v) 1% kwasu sulfanilowego w 5% kwasie ortofosforowym z 0.1% wodnym roztworem chlorowodoru naftylenodwuminy. Standard NO/NO<sub>2</sub> o stężeniu 500  $\mu M$  NO<sub>2</sub> rozcieńczano w RPMI z 5% FCS, uzyskując kolejne stężenia 250, 125, 62, 31, 16, 8, 4, 2, i 1  $\mu M$  NO<sub>2</sub>. Kontrolę ujemną stanowiła mieszanina 100  $\mu l$  podłoża RPMI z 5% FCS i 100  $\mu l$  odczynnika Griess'a. Zarówno rozcieńczenia standardu jak i supernatanty badane oznaczano w podwójnych próbach. Supernatanty z hodowli Mf nakładano w ilości 100  $\mu l$  na celę. Następnie do wszystkich dołków dodawano po 100  $\mu l$  odczynnika Griess'a i płytkę inkubowano przez 10 min w ciemności w temp. pokojowej, po czym wartości ekstynkcji mierzono w spektrofotometrze Sumal PE-2 przy długości fali  $\lambda=550$  nm. Wartości stężenia NO/NO<sub>2</sub> w supernatantach badanych odczytywano z krzywej standardowej i wyrażano w  $\mu M$  NO/NO<sub>2</sub> (99).

Wartości stężenia NO/NO<sub>2</sub> w SN badanych porównano z wartościami otrzymanymi w przypadku hodowli Mf z inhibitorem produkcji tlenu azotu, którym jest analog L-argininy N<sup>G</sup>-monometylo-L-arginina (LNMA) (135). Inhibitor ten dodawano do kontrolnej próby ujemnej hodowli Mf w stężeniu 100  $\mu M$ .

#### Statystyczne opracowanie wyników

Wyniki poszczególnych grup w doświadczeniach przedstawiono jako średnią arytmetyczną  $\pm$  odchylenie standardowe ( $\bar{x} \pm SD$ ). Statystyczną istotność różnic pomiędzy grupami doświadczalnymi badano testem t-Studenta obliczając stopień swobody "p".

## WYNIKI

### 1. Wpływ cyklofosfamidu (CY) na indukcję nadwrażliwości kontaktowej (NK)

Nadwrażliwość kontaktową indukować można poprzez naskórną aplikację haptenu lub podskórne podanie makrofagów znakowanych haptenem syngenicznym biorcom. Powstaje wówczas populacja uczulonych na haptent limfocytów Th1. To uczulenie na haptent można przenieść na syngenicznych biorców w transferze biernym uczulonych limfocytów węzłów chłonnych lub śledziony. W NK obserwuje się również stan tolerancji będący wynikiem haptenowo - swoistego pobudzenia limfocytów T supresyjnych. Znany i opisany jest fenomen indukcji tolerancji immunologicznej po dożylnym podaniu makrofagów znakowanych haptenem syngenicznym biorcom (131). Wyznakowane TNP makrofagi kontrolne, tymocyty lub splenocyty podane tą drogą nie indukują NK u syngenicznych biorców ( $0.05 \pm 0.18 - 0.75 \pm 0.87$ ) (ryc.1 A, C, D). Również znakowane TNP tymocyty od dawców, którym podano dożylnie cyklofosfamid (TNP-ThCY) podane biorcom tą samą drogą dawały stan areaktywności immunologicznej w teście NK ( $0.45 \pm 1.06$ ) (ryc.1 gr.F). Modulujące działanie niskich dawek cyklofosfamidu na NK (patrz Materiały i metody pkt.4.3) ujawnione zostaje po dożylnym podaniu znakowanych haptenem, cyklofosfamidowych makrofagów wysięku otrzewnowego (TNP-MfCY) lub komórek śledziony (TNP-SplCY) pobranych od dawców traktowanych CY (ryc.1 gr. B i E).

Pozytywna reakcja NK związana jest jednak z fenomenem działania CY na makrofagi wynika z dobrze znanego faktu, że makrofagi stanowią kilka procent pełnej populacji komórek śledziony. Przeprowadzone badania na czystych populacjach Mf i MfCY śledziony po eliminacji limfocytów B i T przez zastosowanie przeciwciał odpowiednio  $\alpha$ -B220 i  $\alpha$ -Thy1 wraz z dopełniaczem, zachowały wszystkie własności populacji Mf i MfCY w testach NK. Wyników tych badań kontrolnych nie ujęto w pracy.

Standardowo do indukcji NK stosowano  $1 \times 10^6$  komórek znakowanych haptenem podawanych drogą dożylną. Stwierdzono, że makrofagi otrzewnowe pobrane od dawców traktowanych cyklofosfamidem wpływają na mechanizmy immunoregulacyjne w koncentracji TNP-MfCY dziesięć i stukrotnie niższych od dawki standardowej, uzyskując nadal pozytywny efekt indukcji nadwrażliwości kontaktowej niezależnie od czynnika indukującego Mf zarówno oleju mine-

ralnego ( $3.5 \pm 0.44 - 4.9 \pm 0.72$  wzgl.  $1.41 \pm 0.25$ ) jak i podłoża tioglikolanowego ( $5.2 \pm 1.62 - 6.7 \pm 1.45$  wzgl.  $1.0 \pm 0.71$ ) (ryc.2. gr. C - F wzgl. gr.A i gr.G - I wzgl. gr.B). Dalsze badania prowadzono wyłącznie na populacji makrofagów otrzewnowych indukowanych dootrzewnowym podaniem podłoża tioglikolanowego (Materiały i metody pkt.4.1).

## 2. Wpływ akroleiny na indukcję nadwrażliwości kontaktowej przez makrofagi.

Akroleina, powstający "in vivo" metabolit CY, wykazuje podobny wpływ na makrofagi jak podanie CY "in vivo". Makrofagi znakowane TNP i traktowane "in vitro" akroleiną (Materiały i metody pkt. 4.4) podane dożylnie biorcom (Materiały i metody pkt. 6.1) indukowały powstanie nadwrażliwości kontaktowej na TNP ( $5.2 \pm 1.5$  wzgl.  $0.2 \pm 0.19$ ) (ryc.3) podobnie jak Mf pobrane od dawców, którym podano CY.

## 3. Adoptywny transfer NK indukowany przez TNP-Mf

Badanie to przeprowadzono stosując transfer adoptywny (bierny) odporności. Opis schematu doświadczenia wraz z wynikami przedstawiono na ryc.4. Można stwierdzić, że uczulenie na hapten wywołane dożylnym podaniem TNP-MfCY lub naskórną aplikacją haptenu PCL można przenieść na syngenicznych nie uczulonych biorców za pomocą dożylnego podania limfocytów śledziony ( $3.7 \pm 1.28$ ) (gr.B). Również stan areaktywności immunologicznej wywołany dożylnym podaniem TNP-Mf przenieść można w analogiczny sposób w transferze biernym ( $1.0 \pm 0.81$ ) (gr.A). Na uwagę zasługuje fakt prawie zupełnego zahamowania przeniesienia nadwrażliwości na hapten za pośrednictwem splenocytów od dawców uczulonych naskórną jego aplikacją (gr.C) przez eferentne limfocyty supresyjne indukowane u dawców uczulonych dożylnym podaniem TNP-Mf (gr.A) w biernym transferze mieszaniny komórek śledziony od tych grup dawców po ich dożylnym podaniu syngenicznym, nieuczulonym biorcom ( $1.4 \pm 0.79$  wzgl.  $5.0 \pm 0.83$ ) (gr.D wzgl. - gr.C). Natomiast komórki śledziony od myszy uczulonych TNP-MfCY nie wykazywały aktywności supresyjnej w analogicznym transferze ( $4.1 \pm 0.40$ ) (gr.E).

#### 4. *Indukcja NK przez frakcje makrofagów rozdzielonych w nieciągłym gradiencie Ficollu, BSA i Percollu.*

Kolejną cechą mogącą zróżnicować subpopulacje Mf prezentujące antygen limfocytom Th1 od Mf które prezentują antygen limfocytom T supresyjnym są różnice ich ciężaru właściwego. Makrofagi kontrolne i od dawców traktowanych CY poddawano rozdziałowi w nieciągłym gradiencie Ficollu (Materiały i metody, pkt. 5.1) a następnie komórki z poszczególnych frakcji rozdziału znakowano haptenem i podawano nieuczulonym syngenicznym biorcom. Po 7 dniach stopień nadwrażliwości kontaktowej badano testem usznym. Jak przedstawiono na ryc.5 makrofagi o niskiej gęstości z interfaz 0/5, 5/8 i 8/9% indukują pozytywną reakcję NK ( $2.0 \pm 1.20 - 4.9 \pm 0.77$ ) (ryc.5 gr.B - gr.E prawej strony ryciny i gr.B - gr.E lewej strony ryciny), niezależnie czy pochodziły od myszy traktowanych czy nietraktowanych CY. Makrofagi o wyższej gęstości - z interfazy 9/10% i z pelety w przypadku dawców komórek kontrolnych, a z pelety w przypadku dawców traktowanych cyklofosfamidem nie indukują nadwrażliwości kontaktowej ( $0.05 \pm 0.23 - 0.5 \pm 0.41$ ) (ryc.6 gr.E i gr.F lewej strony i gr.F ze strony prawej). Frakcje lekkie stanowią niewielką (około 1-5% komórek) populację w odniesieniu do całkowitej ilości Mf poddanych rozdziałowi w gradiencie. Podobne rezultaty funkcjonalnego zróżnicowania w prezentacji antygeny otrzymano rozdzielając Mf w nieciągłym gradiencie BSA lub Percollu, gdzie lekkie frakcje izolowane z interfaz 11/15, 15/20 i 20-30% w przypadku gradientu BSA i 0/39, 39/45 i 45/51% w przypadku gradientu Percollu, w teście NK indukowały limfocyty Th1 mediujące nadwrażliwość kontaktową, podczas gdy frakcje wyższej gęstości w przypadku obu tych rozdziałów indukowały stan areaktywności.

#### 5. *Badanie zdolności do indukcji limfocytów supresyjnych przez MfCY z pelety*

Myszy CBA zaszczepiono dożylnie standardową dawką znakowanych haptenem Mf od dawców kontrolnych i traktowanych cyklofosfamidem. Te same dwie grupy makrofagów poddano rozdziałowi w nieciągłym gradiencie Ficollu i wyznakowane TNP Mf o wysokiej gęstości (z pelety) podano nieuczulonym syngenicznym biorcom (ryc.7 gr.D i E). Siedem dni później wszystkie zwierzęta, wraz z grupą kontrolną, która nie otrzymała TNP-Mf uczulono

naskórną aplikacją haptenu PCL (Materiały i metody pkt. 6.1). W 4 dni po uczuleniu, myszy testowano testem usznym. Kontrolne makrofagi frakcji ciężkiej (pelety) i pełna populacja tych Mf indukuje limfocyty supresyjne ( $3.2 \pm 1.1 - 4.5 \pm 0.7$ ). Natomiast w przypadku frakcji MfCY pelety tej indukcji nie wykazano ( $8.2 \pm 1.52$ ) a pełna populacja MfCY wykazuje zdolność prezentacji haptenu limfocytom Th1 ( $10.4 \pm 1.04$ ) (ryc. 7).

#### 6. Korelacja właściwości żernych Mf z ich zdolnością do indukcji NK.

W teście NK porównano zdolność makrofagów do prezentacji antygeny z takimi właściwościami jak fagocytoza i adherencja do powierzchni plastiku. Makrofagi niefagocytuujące lub słabo fagocytuujące cząsteczki węgla żelaza wykazują zdecydowaną preferencję do prezentacji antygeny limfocytom Th1 wywołując u ich biorców pozytywną reakcję w teście NK ( $4.3 \pm 0.54 - 5.8 \pm 1.10$  wzgl.  $0.6 \pm 0.03$ ) (ryc.5 gr.E i F wzgl. gr.A). Komórek, które sfagocytowały węgiel żelaza nie testowano ze względu na trudności techniczne, opisane w rozdziale Materiały i Metody pkt. 5.3. Również Mf nieadherentne wykazały statystycznie znamienne większą zdolność do indukcji NK niż Mf adherujące do płytek ( $5.8 \pm 0.80$  wzgl.  $2.7 \pm 0.94$ ) - (ryc.5 gr.D wzgl. gr.C).

#### 7. Wpływ działania CY na ekspresję receptorów FcRI FcRII na Mf

Badania ekspresji receptorów FcRI FcRII wykonywano testami tworzenia rozet z przeciwciałami cytofilnymi izotypu IgG2a i rozet EA IgG2b (Materiały i metody pkt.7 1-2). Badanie ekspresji receptorów FcRI i FcRII w populacji komórek Mf i MfCY rozdzielonych w gradiencie Ficollu wykazało statystycznie znamienne zmniejszenie ekspresji receptorów FcR na makrofagach frakcji niskiej gęstości w obu grupach dawców makrofagów (zarówno kontrolnych jak i traktowanych CY) ( $10.2 \pm 1.25 - 15.6 \pm 0.86$ ) w stosunku do komórek z frakcji pelet dla FcRI ( $27.0 \pm 1.17 - 32.7 \pm 1.88$ ) ( $p < 0.001$ ) a dla FcRII ( $7.6 \pm 1.17 - 14.0 \pm 1.63$  wzgl.  $27.5 \pm 1.17 - 32.0 \pm 4.95$ ) ( $p < 0.01$ ). Badania ekspresji receptorów Fc na MfCY względem grupy kontrolnej Mf wykazały statystycznie znamienne spadki ekspresji receptora FcRI zarówno we frakcjach lekkich ( $10.2 \pm 1.25$  wzgl.  $15.6 \pm 0.86$ ) - ( $p < 0.01$ ) jak i w pelecie ( $27.0 \pm 1.33$  wzgl.  $32.75 \pm 1.88$ ) ( $p < 0.05$ ). Ekspresja receptora FcRII po działaniu CY ulega obniżeniu na makrofagach

frakcji lekkich względem analogicznej grupy kontrolnej ( $7.6 \pm 1.17$  wzgl.  $14.0 \pm 1.63$ ) ( $p < 0.01$ ) a nie ulega istotnym zmianom w peletach (Tab. 1).

Gdy populacje Mf kontrolnych i MfCY zróżnicowano pod względem ich zdolności do fagocytozy i wówczas tą funkcję skorelowano z ekspresją receptora FcRI to wykazano, że ekspresja FcRI na niefagocytujących populacjach Mf kontrolnych jest około 13-krotnie niższa od ekspresji FcRI w pełnej populacji tych Mf ( $2.0 \pm 0.9$  wzgl.  $26.4 \pm 5.4$ ) ( $p < 0.01$ ). W analogicznych grupach niefagocytujących MfCY względem pełnej populacji MfCY ekspresja FcRI jest około 6-krotnie niższa ( $2.5 \pm 0.7$  wzgl.  $15.0 \pm 3.3$ ) ( $p < 0.01$ ). Pełna populacja MfCY wykazała niższą ekspresję FcRI w odniesieniu do pełnej populacji Mf kontrolnych ( $15.0 \pm 3.3$  wzgl.  $26.4 \pm 5.4$ ) ( $p < 0.05$ ). Ekspresja receptora FcRI na niefagocytujących Mf nie ulega zmianie pod wpływem działania CY (Tab.2).

#### 8. Analiza ekspresji antygenów Ia, Mac-1, Mac-2, Mac-3 i FcRII w cytofluorymetrze przepływowym FACScan.

Makrofagi niefrakcjonowane (pełna pula komórek) oraz Mf rozdzielane w schodkowym gradiencie Ficollu poddano cytofluorymetrycznej analizie ekspresji antygenów Ia ( $IA^k$  i  $IE^k$ ) i receptora FcRII (Materiały i metody pkt. 8.1). Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 3.

Badania ekspresji antygenów Ia nie wykazały istotnych różnic między Mf z grupy kontrolnej i traktowanej cyklofosfamidem. Brak też jest istotnego zróżnicowania w ekspresji antygenów Ia pomiędzy grupami o różnej gęstości, chociaż zaobserwowano tendencję wzrostu ekspresji tych antygenów wraz ze zmniejszeniem gęstości makrofagów.

Analiza wyników ekspresji receptora FcRII wskazuje, że jego ilość ulega zmniejszeniu w populacji MfCY (z 35-44% na 21-28%).

W tabeli 3 zamieszczono też wyniki cytofluorymetrycznego badania ekspresji antygenów Mac-1, Mac-2 i Mac-3 na Mf kontrolnych i MfCY. Ekspresja antygenów Mac-1 (C3R) i Mac-3 nie wykazała istotnego zróżnicowania pomiędzy badanymi grupami Mf i MfCY. W obu badanych grupach Mf wykazano niewielki wzrost ekspresji antygeny Mac-1 (C3R) wraz ze wzrostem gęstości komórek poddanych rozdziałowi w gradiencie Ficollu. Analiza wyników ekspresji receptora Mac-2 wykazała tendencję spadkową w grupach MfCY (z 62-83% na 52-65%). Nie wykazano statystycznie znamienych różnic w eks-

presji receptorów pomiędzy badanymi grupami Mf.

#### 9. Wydzielanie cytokin przez makrofagi kontrolne i makrofagi pobrane od dawców traktowanych cyklofosfamidem

W tabeli 4 przedstawiono wyniki dotyczące sekrecji monokin przez Mf. W SN z niestymulowanych hodowli MfCY zaobserwowano dwukrotny wzrost spontanicznego uwalniania IL-6 względem Mf kontrolnych ( $4500 \pm 250$  wzgl.  $1950 \pm 120$ ) ( $p < 0.05$ ) bez zmiany poziomów innych oznaczanych monokin. Natomiast populacje makrofagów stymulowanych LPS wykazują wysokie wzmoczenie swych zdolności wydzielniczych wszystkich badanych monokin. Analizując wyniki sekrecji TNF- $\alpha$  i IL-1 w grupach hodowanych z LPS Mf kontrolnych względem MfCY zaobserwowano czterokrotny wzrost wydzielania TNF- $\alpha$  ( $147 \pm 11.2$  wzgl.  $36 \pm 2.8$ ) ( $p < 0.01$ ) i około dwukrotny wzrost sekrecji IL-1 ( $932 \pm 123$  wzgl.  $380 \pm 278$ ) ( $p < 0.05$ ). Natomiast poziom IL-6 w supernatantach z hodowli MfCY stymulowanych LPS był pięciokrotnie wyższy od poziomu tej cytokiny w supernatantach Mf kontrolnych hodowanych w obecności LPS ( $181250 \pm 22000$  wzgl.  $36250 \pm 3100$ ) ( $p < 0.01$ ).

#### 10. Wyniki badań sekrecji PGE<sub>2</sub> w supernatantach z hodowli Mf i MfCY.

Badania poziomu PGE<sub>2</sub> w supernatantach z hodowli Mf i MfCY przeprowadzono metodą radioimmunologiczną (Materiały i metody pkt.9.5). Wyniki oznaczeń które przedstawiono na ryc. 8, wykazały brak statystycznie znamiennych różnic w populacjach Mf niestymulowanych. Supernatanty z hodowli makrofagowych stymulowanych LPS w populacji MfCY wykazały zwiększony poziom wydzielania prostaglandyny E<sub>2</sub> w odniesieniu do grupy Mf kontrolnych ( $777 \pm 40$  wzgl.  $525 \pm 49$ ) ( $p < 0.005$ ).

#### 11. Wyniki badań sekrecji tlenku azotu (NO/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) w supernatantach z hodowli Mf i MfCY.

Oznaczenia poziomu azotynów (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) - trwałych metabolitów tlenku azotu (NO) w supernatantach badanych grup makrofagów kontrolnych i MfCY, dokonano kolorymetryczną metodą Dings'a (Materiały i metody pkt.9.6) i przedstawiono na ryc.9. Nie wykazały one statystycznie znamiennych różnic pomiędzy grupami Mf i MfCY zarówno niestymulowanych jak i po stymulacji



LPS.

## DYSKUSJA

Makrofagi pełnią rozmaite funkcje i zaangażowane są na różnych etapach odpowiedzi immunologicznej. W fazie indukcyjnej tej odpowiedzi pełnią rolę komórki prezentującej antygen (APC) a w fazie efektorowej są komórkami cytotoksycznymi niszczącymi antygeny. Zarówno w fazie indukcyjnej jak i efektorowej makrofagi mogą pełnić swoje funkcje w sposób przeciwstawny. Różne subpopulacje Mf mogą odmiennie prezentować antygen różnym subpopulacjom limfocytów T.

Celem pracy było zbadanie różnorodności funkcjonalnej, fenotypowej i sekrecyjnej dwóch subpopulacji Mf prezentujących antygen subpopulacjom limfocytów Th1 lub Ts w testach nadwrażliwości kontaktowej. W celu ujawnienia zróżnicowania w zakresie subpopulacji Mf zastosowano cyklofosfamid, który stał się czynnikiem różnicującym ich funkcjonalną odmienność. Kolejnymi elementami różnicującym subpopulacje Mf były wcześniej już dostrzeżone przez innych badaczy funkcjonalne zróżnicowanie tych komórek w korelacji z ich odmiennym ciężarem właściwym (gęstością) lub aktywnością fagocytarną. W oparciu o te sposoby badania odmienności funkcjonalnej Mf - wrażliwości na CY i zróżnicowania ciężaru właściwego Mf lub ich aktywności żernej, przeprowadzono szereg doświadczeń mających na celu wyodrębnienie subpopulacji Mf indukujących NK lub aktywujących limfocyty Ts. Następnie tak zróżnicowane funkcjonalnie subpopulacje starano się scharakteryzować pod względem różnorodności ekspresji markerów powierzchniowych i sekrecji mediatorów.

NK stanowiąca model badawczy pracy w sposób klasyczny indukowana jest aplikacją naskórną haptenu (8). Można ją także wywołać podając drogą podskórną znakowane haptenu makrofagi otrzewnowe (131). Iniekcja drogą dożylną znakowanych haptenu makroflagów indukuje stan długotrwałej niewrażliwości immunologicznej, w której aktywność limfocytów Th1 zahamowana jest równoczesnym pobudzeniem  $CD8^+$  eferentnych limfocytów T supresyjnych. W przypadku wywołania stanu pobudzenia limfocytów Ts zwierzęta uczulone na skórę tym samym haptenu wykazują stan hyporeaktywności albo areaktywność na ten haptenu. Analiza własności immunogennych podanych dożylnie TNP-Mf od dawców traktowanych CY wykazała, że wpływają one na mechanizmy immunoregulacyjne. Transfer

TNP-MfCY na syngenicznych biorców dzięki stymulacji prezentacji antygeny (haptenu TNP związanego z błoną makrofaga) limfocytom Th1 ujawnia uczulenie na ten haptenu. Natomiast TNP-Mf pobrane od dawców kontrolnych podane biorcom tą samą dożylną drogą działają przeciwnie stymulując pobudzenie haptenu-swoistych eferentnych limfocytów supresyjnych, co w konsekwencji prowadzi do stanu areaktywności immunologicznej na haptenu. Podobny stan indukcji NK uzyskano podając dożylnie znakowane TNP-Mf, które wstępnie inkubowano z aktywnym metabolitem CY - akroleiną. Metabolit ten działa bezpośrednio na komórki Mf, podczas gdy CY wymaga wstępnego utlenienia "in vivo" w mikrosomach wątroby, by uzyskać czynną formę aktywnie wpływającą na komórki (27,113). Jednym z aktywnych metabolitów CY jest akroleina. Indukuje ona istotne zmiany w Mf i eliminuje aktywność bardzo wrażliwych Mf stymulujących limfocyty T supresyjne. W konsekwencji proces ten prowadzi do ujawnienia pozytywnej reakcji NK w odpowiedzi na haptenu. Działanie akroleiny związane jest z jej wysoką reaktywnością z grupami sulfhydryłowymi i aminowymi białek błonowych (101). Stan ten objawia się wysoką cytotoksycznością akroleiny i wynika z blokady szeregu mechanizmów enzymatycznych w komórkach poddanych działaniu akroleiny.

Kawabata (70) wykazał około 50% wzmożenie rozwoju nadwrażliwości typu późnego po dożylnym podaniu akroleiny myszom szczepu C57. Jak wykazały badania indukcja NK przez MfCY jest niezależna od tego w jaki sposób wywołano wysięk makrofagów w otrzewnej dawców tych komórek (olej mineralny, podłoże tioglikolanowe). Wpływ CY na indukcję NK możliwy jest do wykazania podaniem dożylnym TNP-MfCY już w niewielkiej dawce -  $1 \times 10^4$  TNP-MfCY na mysz.

Kolejne badania wykazały, że w transferze biernym można przekazać stan areaktywności indukowany dożylnym podaniem TNP-Mf kontrolnych dawcom uczulonych limfocytów - komórek śledzionowych (Spl) poprzez dożylną iniekcję tych komórek syngenicznym biorcom (158).

W niniejszej pracy zastosowano szereg sposobów separacji makrofagów pod względem zróżnicowania ich cech fizycznych i biologicznych. Różnicowania Mf pod względem ich odmiennej gęstości dokonano za pomocą wirowania tych komórek w nieciągłym gradiencie Ficollu. Tak wyosobnione frakcje Mf skorelowano równocześnie z ich zdolnością do prezentacji

antygeny limfocytom Th1 lub Ts w NK. Na podstawie tej analizy stwierdzono, że populacje Mf niskiej gęstości (z interfaz 0-9% Ficollu lub 0-30% BSA lub 0-51% Percollu) zdolne są do prezentacji antygeny limfocytom Th1 w przeciwieństwie do frakcji cięższych indukujących eferentne limfocyty supresyjne. Wpływ CY na mechanizmy regulacyjne indukcji NK jest widoczny w populacji pełnych Mf oraz we frakcji 9/10% Ficollu. Nie udało się wykazać zmian w komórkach pelety MfCY. W kolejnym doświadczeniu stwierdzono jednak, że Mf traktowane CY, zarówno pełnej puli komórkowej jak i pelety nie są zdolne do indukcji limfocytów T supresyjnych, w przeciwieństwie do kontrolnych Mf analogicznych grup (pełnej puli komórek jak i komórek z pelety).

Analiza wyników tych doświadczeń dowodzi, że CY działa wybiórczo na frakcję Mf z pelety znosząc zdolność do indukcji supresji poprzez brak stymulacji eferentnych limfocytów T supresyjnych. Domniemać można, że CY może ujawniać w Mf aktywność kontrasupresyjną. Makrofagowa frakcja niskiej gęstości nie zmienia swej aktywności do prezentacji antygeny limfocytom Th1 pod wpływem działania CY. Zarówno frakcja lekka Mf kontrolnych jak i traktowanych CY prezentuje antygeny limfocytom CD4<sup>+</sup> indukując pozytywną reakcję NK.

Tzehowal (162) wykazała podobne własności indukowanych tioglikolanem Mf otrzewnowych myszy szczepu Balb c i C3H/eB po ich rozdzieleniu w nieciągłym gradiencie BSA. W jej badaniach Mf frakcji lekkich (interfazy 8/11% BSA) wykazują zdolności prezentacji antygeny KLH limfocytom Th1, podczas gdy frakcje ciężkie Mf tej zdolności nie posiadają. Tzehowal wykazała omawianą odmienność funkcjonalną Mf w teście inkorporacji H<sup>3</sup>-tymidyny przez limfocyty pobrane z lokalnych węzłów chłonnych od biorców Mf wstępnie rozdzielonych w gradiencie BSA i inkubowanych z KLH. Wyniki przedstawione w mojej pracy wykazują podobieństwo do cytowanych przez Tzehowal. Także Lee (86) opisał, że frakcje o niskiej gęstości Mf kontrolnych silnie stymulują odporność antynowotworową w przeciwieństwie do frakcji o wyższej gęstości - dużych komórek Mf rozdzielanych przez sedimentację. Podobne wnioski przedstawiono w przytoczonej już wcześniej pracy Weinberga (175) analizującej heterogenność Mf w odporności antynowotworowej w zależności od ich ciężaru właściwego. W pracy tej zróżnicowanie funkcjonalne makrofagów w aktywności antynowotworowej

skorelowane zostało z ich odmienną gęstością w oparciu o rozdział w nieciągłym gradiencie BSA. Dowiedziono, że komórki niskiej gęstości (z interfaz 0-11% BSA) eliminują komórki nowotworowe, podczas gdy komórki frakcji cięższych o większej gęstości pozostają w ogóle nie zaangażowane w ten proces. Tolerancja Mf na komórki nowotworowe doprowadza do rozwoju procesu nowotworzenia (175).

Kolejnym sposobem badania różnorodności biologicznych funkcji Mf w przedstawionej pracy była ocena ich zdolności do adherencji i do fagocytozy w połączeniu z funkcjonalnym zróżnicowaniem komórek Mf w prezentacji antygeny odmiennym subpopulacjom limfocytów T (Th1 i Ts) w NK. W testach NK wykazano, że Mf nefagocytyjące i nieadherentne są zdolne do prezentacji antygeny limfocytom Th1, natomiast komórki adherentne nie prezentują antygeny limfocytów Th1, bądź też ta funkcja jest przesłonięta równoczesnym pobudzeniem eferentnych limfocytów T supresyjnych.

Do podobnych wniosków doszła Tzehowal, która wykazała powiązanie zdolności do fagocytozy przez Mf z pobudzeniem stanu areaktywności immunologicznej. Natomiast Mf słabo fagocytyjące opisała jako komórki wykazujące antygenowo - swoiste pobudzenie limfocytów Th1 (162).

Również Plasman twierdzi (128), że Mf frakcji ciężkiej wykazują wzmożoną aktywność fagocytarną i zwiększoną ekspresję receptora FcRII mierzoną w badaniu cytofluorymetrycznym.

Natomiast Dorf (51) wykazał, że linia 63, która mediuje stan tolerancji w testach NK jest hybrydomą komórkową o własnościach adherentnych, co zgodne jest z cechą Mf kontrolnych pelety indukujących tolerancję w naszym układzie badawczym.

Na podstawie zacytowanych prac stwierdzić można, że istnieje zgodność wyników niniejszej pracy z dotychczasowymi obserwacjami badaczy co do funkcji Mf w korelacji z ich aktywnością fagocytarną i zdolnościami do adherencji.

Wiadomo, że populacja Mf indukowanych tioglikolanem zawiera w swoim składzie ok.90% makrofagów. Resztę stanowią limfocyty T i B oraz granulocyty. W badaniach wstępnych, których wyników nie ujęto w niniejszej pracy wyeliminowano ewentualny wpływ limfocytów na indukcję pozytywnej reakcji NK usuwając je za pomocą przeciwciał  $\alpha$ -B220 i  $\alpha$ -Thy1 i

dopełniacza. Czyste populacje TNP-Mf i TNP-MfCY wykazywały identyczne własności prezentacji antygeny jak mieszanina komórek. Ma to istotne znaczenie dla stwierdzenia, że za odmienność funkcjonalną prezentacji antygeny w NK odpowiedzialne są Mf. Ponieważ komórki nieadherujące stanowią ok 30% pełnej populacji Mf tioglikolanowych a frakcja niskiej gęstości uzyskana po rozdzieleniu w gradiencie Ficollu stanowi od 1-5% ogólnej populacji komórek wysięku otrzewnowego stymulowanego tioglikolanem domniemać można było, że w tych frakcjach nastąpi istotne zagęszczenie komórek nie będących makrofagami. Nie ujęte w pracy badania dodatkowe badania immunocytochemiczne przeprowadzone na populacji komórek niskiej gęstości wykluczyły tę możliwość i wykazały, że komórki B220<sup>+</sup> i Thyl<sup>+</sup> stanowią w niej łącznie do 15% ogółu komórek frakcji lekkiej. Resztę stanowią komórki szeregu rozwojowego Mf, monocyty i młode Mf (ERMP-20 lub/i BM8 pozytywne) (89,96,116). Przeprowadzone badania, których wyników nie ujęto w niniejszej pracy, a dotyczące zróżnicowania dojrzałości subpopulacji Mf otrzewnowych wstępnie rozdzielonych na Mf o wysokiej i niskiej gęstości wykazały, że frakcja "lekka" z interfazy 0/9% Ficollu jest ERMP-20 pozytywna i zawiera głównie formy premakrofagowe (89,116). Natomiast frakcja ciężka - peleta jest F4/80 i BM8 pozytywna i stanowi mieszaninę monocytów oraz młodych i dojrzałych form Mf (9,57,96,116). Podobne sugestie dotyczące zróżnicowania dojrzałości Mf rozdzielanych pod względem ich ciężaru właściwego wysuwali Walker (167), Morioka (116), Plasman (128) i Lee (86).

W dalszym etapie prac badawczych zajęto się analizą cech morfologicznych i fenotypowych makrofagów o funkcjach APC. Analiza ekspresji receptorów FcRI i FcRII testami rozetowymi pozwoliła wykazać, że frakcje "lekke" Mf kontrolnych i MfCY wykazują niewielką ekspresję receptorów FcR w porównaniu do frakcji wysokiej gęstości tych Mf. Spostrzeżenia te potwierdziła analiza ekspresji receptora FcRI w pełnych populacjach Mf kontrolnych i MfCY względem populacji nefagocytyujących tych grup komórek. Populacje nefagocytyujące Mf i MfCY wykazały niewielką, około dziesięciokrotnie niższą ekspresję receptora FcRI w stosunku do pełnej populacji tych komórek. Stwierdzono, że traktowanie CY generalnie zuboża komórki Mf w receptory FcRI, co zostało wykazane testami tworzenia rozet EA a w przypadku receptora FcRII dodatkowo w

badaniu cytofluorymetrycznym.

Podobne tendencje do ekspresji receptora FcRI w zależności od gęstości badanych komórek wykazał Szabo (157), który analizował populację monocytów krwi ludzkiej rozdzielonych na subpopulację monocytów o niskiej i o wysokiej gęstości. Stwierdził on, że subpopulacja monocytów niskiej gęstości charakteryzuje się niewielką ekspresją receptora FcRI w stosunku do około 10-cio krotnie wyższej ekspresji tego receptora w populacji monocytów wysokiej gęstości.

Badania Walkera (167) przeprowadzone na mysich makrofagach szpiku kostnego szczepu C3H-Anf wykazały, że ekspresja receptora FcRI i cecha adherencji Mf narasta wraz z dojrzewaniem tych komórek. Tak więc populacja komórek adherentnych - dojrzałych Mf wykazuje około 5-cio krotnie zwiększoną ekspresję receptora FcRII mierzoną w teście immunocytofluorymetrycznym w porównaniu z nieadherentną populacją Mf.

Do podobnych wniosków doszła Plasman (128) analizując metodą cytofluorymetryczną ekspresję receptora FcRII w populacji mysich rezydualnych makrofagów otrzewnowych po ich wstępnej separacji w ciągłym gradiencie Percollu. Wykazała ona, że ekspresja receptora FcRII na komórkach rezydualnych Mf otrzewnowych narasta wraz ze wzrostem ich gęstości.

Serio (147) badał natomiast ekspresję receptorów FcRI i FcRII za pomocą testów tworzenia rozet EA na linii komórkowej IC-21 mysich makrofagów otrzewnowych. Komórki tej linii wstępnie poddał rozdzielaniu sedymentacyjnemu w nieciągłym gradiencie Percollu i ekspresję receptora FcRI i FcRII skorelował z aktywnością fagocytarną oraz cytolityczną Mf. Z przeprowadzonych przez niego analiz wynika, że Mf o wyższej gęstości, to komórki silnie fagocytujące i wykazujące wysoką ekspresję receptora FcRI i FcRII, natomiast Mf frakcji lekkich to komórki o wysokich właściwościach cytolitycznych i niższej ekspresji receptora FcRI oraz relatywnie niższej ekspresji receptora FcRII.

Kolejnym elementem poddanym analizie w niniejszej pracy była ekspresja makrofagowych markerów powierzchniowych: Mac-1 - receptora C3R (89), Mac-2 - galaktozo-specyficznej lektyny obecnej na dojrzałych makrofagach, odpowiedzialnej za cechę adherencji (89) oraz antygeny Mac-3 silnie ujawniającego się na Mf w stanach zapalnych (45).

Cytofluorymetryczna analiza tych determinant nie wykazała szczególnie istotnych różnic w zakresie ekspresji pomiędzy Mf kontrolnymi a MfCY, z wykazaniem nieznacznej tendencji do obniżenia ekspresji antygenów Mac-1 i Mac-2 w populacji MfCY. Domniemać można, że obniżenie ekspresji markera Mac-2 i Mac-1 jest związane z działaniem CY na populację dojrzałych (88,89) form Mf wysokiej gęstości. Brak różnic w ekspresji antygeny Mac-3 wynikać może z faktu, że poddane badaniu populacje Mf otrzewnowych indukowano u dawców tych komórek dootrzewnową iniekcją podłoża tioglikolanowego, które wykazuje silne działanie zapalne. Badania przeprowadzone metodą cytofluorymetryczną potwierdziła analiza wyników ekspresji omawianych markerów Mac-1,-2 i -3 uzyskanych metodą pośredniego znakowania immunoperoksydazowego cytospinowych preparatów Mf i MfCY pełnych populacji i subpopulacji tych Mf rozdzielanych w gradiencie Ficollu. Wyniki, które nie zostały ujęte w niniejszej pracy wykazały nieznamienne zwiększenie ekspresji badanych markerów w peletach obu typów Mf (kontrolnych i traktowanych CY). Badania ekspresji receptora dla dopełniacza C3R (89) metodą tworzenia rozet EAC przeprowadzone w populacji Mf kontrolnych, ale nie ujęte w niniejszej pracy potwierdzają obserwacje poczynione w testach cytofluorymetrycznych z udziałem monoklonalnych przeciwciał  $\alpha$  Mac-1. Wyniki obu tych badań dowodzą, że Mf frakcji lekkiej (interfazy 0/9% Ficollu) wykazują niższy poziom ekspresji tego receptora w porównaniu z frakcją wysokiej gęstości (peletą). Wyniki te znalazły także potwierdzenie w badaniach cytofluorymetrycznych (128), która opisała podobną zależność ekspresji receptora C3R (Mac-1, M1/70) w populacji Mf rozdzielanych w ciągłym gradiencie Percollu.

Walker natomiast (167) stwierdza, że wysoce adherentna populacja dojrzałych Mf szpiku kostnego wykazuje wzmożoną ekspresję markera Mac-2 i Mac-3. Sugeruje on też, że ekspresja markera Mac-2 i Mac-3 jest proporcjonalna do stopnia dojrzałości Mf.

Morikawa (115) zajmował się markerami powierzchniowymi komórki APC indukującej nadwrażliwość typu późnego. Twierdzi on, że jest to komórka fenotypowo  $Mac1^+$   $Mac2^-$  i  $Mac3^+$ , co jest zbliżone do fenotypu Mf kontrolnych indukujących NK frakcji lekkiej w schematach doświadczalnych zastosowanych w niniejszej pracy. Zwiększona ekspresja markera Mac-2 na makrofagach indukujących NK w naszym modelu badawczym wynikać może z



faktu indukowania Mf u dawców za pomocą podłoża tioglikolanowego, które wg Sato (143) wzmagają ekspresję markera Mac-2 na tych komórkach.

W badaniach Dorfa przeprowadzonych na makrofagowych liniach komórkowych o odmiennych własnościach prezentujących antygen w NK stwierdzono, że obie testowane linie komórkowe - zarówno linia 59 indukująca prezentację antygenów limfocytom Th1 jak i linia 63 stymulująca generację limfocytów T supresyjnych, nie wykazują zróżnicowania pod względem ekspresji antygenów Mac-1, -2 i -3 (64,72,163). Cytowane obserwacje Dorfa, Plasman Morikawa i Sato są zgodne z wynikami naszych oznaczeń ekspresji tych receptorów na Mf otrzewnowych myszy.

Ponieważ wiadomo, że rozpoznanie antygenowe na komórce prezentującej antygen odbywa się w kontekście układu zgodności MHC klasy II, dlatego w niniejszej pracy zbadano ekspresję tych antygenów na Mf kontrolnych i MfCY wstępnie zróżnicowanych pod względem ich gęstości w schodkowym gradiencie Ficollu. Ekspresję antygenów Ia myszy poddawano analizie cytofluorymetrycznej. Wyniki zamieszczone w niniejszej pracy nie wykazują statystycznie znamiennych różnic pomiędzy grupami Mf i MfCY jak i w obrębie grup jednego rodzaju dawcy Mf o różnych gęstościach komórek. Zaobserwowano jedynie tendencję narastania ekspresji antygenów IA i IE wraz ze zmniejszeniem gęstości komórek Mf.

Prezentacja antygenów przez Mf limfocytom Th1 odbywa się w kontekście układu MHC kl.II (IA, IE) a limfocytom supresywnym prawdopodobnie w kontekście obecnych na Mf antygenów IJ lub IA (17). Brayley - Mullen badała wpływ Mf śledziony na indukcję odpowiedzi humoralnej u myszy CAF1 i wykazała, że populacja Mf indukujących limfocyty Th jest IA lub IE pozytywna, podczas gdy Mf IA<sup>+</sup>, IJ<sup>+</sup> są populacją APC stymulujących stan tolerancji (17). Lee (86) przeprowadził badania nad subpopulacjami Mf otrzewnowych myszy CBA/CaJ, po wstępnym ich rozdzieleniu na frakcje o różnych gęstościach w teście sedymentacyjnym. Wykazał on, że ekspresja antygenów Ia na Mf maleje ze wzrostem gęstości tych komórek i jest najintensywniejsza we frakcjach o niskiej gęstości. Obserwacje Lee zgodne są z bliższymi do wyników uzyskanych w naszym modelu badawczym. Zarówno Morikawa (115) jak i Rutherford (141) wyraźnie zaznaczają, że Mf odpowiedzialne za stymulację nadwrażliwości typu późnego są komórkami o fenotypie Ia<sup>+</sup>, Mac1<sup>+</sup>, Mac2<sup>-</sup>, Mac3<sup>+</sup>. Analogiczny obraz fenotypowy posiada

frakcja niskiej gęstości Mf kontrolnych, która jak wykazaliśmy indukuje NK u syngenicznych biorców po dożylnym podaniu tych komórek znakowanych haptenem.

Dorf i wsp. analizowali natomiast ekspresję antygenów IA, IE i IJ na liniach makrofagowych 59 i 63 o odmiennych własnościach funkcjonalnych w prezentacji antygeny wykazała, że badane linie nie różnią się w sposób istotny pod względem ekspresji antygenów Ia (71).

Wiadomo, że rozpoznanie antygenowe przez limfocyty Th1 i Ts odbywa się w kontekście układu antygenów MHC klasy II. Wykazany w naszych doświadczeniach brak zróżnicowania populacji Mf w zakresie antygenów klasy Ia aktywujących rozpoznanie przez populacje limfocytów Th1 lub Ts, potwierdzony także przez innych badaczy (17,32,51,84,124), wynikać może z faktycznego stanu braku zróżnicowania lub też z różnego poziomu ich glikozylacji. Wysoki poziom glikozylacji antygenów Ia uważany jest przez niektórych badaczy za istotny w przypadku indukcji limfocytów T supresyjnych (18,104). Rozpoznanie kompleksu antygeny związanego z układem Ia przez limfocyty T bez udziału wspomagających sygnałów z komórki prezentującej lub w przypadku obecności czynników hamujących te sygnały prowadzić może do antygenowo-swoistej inaktywacji specyficznych limfocytów (anergia klonalna), bądź też do generacji limfocytów supresyjnych (13,110,154). W ten sposób wyspecjalizowane komórki prezentujące antygen warunkują stymulację optymalnych sygnałów wspomagających aktywację poszczególnych subpopulacji limfocytów T.

Powszechnie wiadomo, że wpływ poszczególnych monokin na pobudzenie subpopulacji limfocytów T jest wielokierunkowy i do tej pory nie jednoznacznie sprecyzowany. Ta sama cytokina może działać jako stymulator lub inhibitor odpowiedzi w zależności od działania innych towarzyszących sygnałów regulacyjnych. Wpływ na końcowy efekt ma także kolejność sekrecji odpowiednich czynników regulatorowych przez komórki APC (146,165). Dlatego też badania nad stymulacją komórek APC pojedynczymi oczyszczonymi rekombinantami cytokin w układzie "in vitro", nie oddaje rzeczywistego obrazu stymulacji komórkowej "in vivo" w układach regulacyjnych mediowanych przez mieszaninę cytokin, które mogą mieć działanie addytywne, synergistyczne lub antagonistyczne.

Wyniki doświadczeń zaprezentowane w niniejszej pracy wykazują

istotne różnice syntezy i sekrecji badanych cytokin i innych czynników regulacyjnych wydzielanych przez populacje makrofagów kontrolnych i makrofagów od dawców traktowanych cyklofosfamidem. Z analizy wyników oznaczeń IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$  wydzielanych przez Mf kontrolne i MfCY wynika, że populacje tych Mf wykazują istotną odmienność w zdolnościach do sekrecji tych cytokin po stymulacji LPS. W tych warunkach w supernatantach z hodowli Mf kontrolnych wykazano wysoki poziom IL-1 i TNF- $\alpha$  a niski poziom IL-6, podczas gdy MfCY charakteryzuje wysoki poziom sekrecji IL-6 przy jednocześnie niskim poziomie uwalniania IL-1 i TNF- $\alpha$ . Tak więc Mf prezentujące antygen limfocytom T supresyjnym posiadają wzór poziomu uwalnianych przez nie cytokin IL-1<sup>wysoki</sup> IL-6<sup>niski</sup> TNF- $\alpha$ <sup>wysoki</sup>, a MfCY mają wzór cytokinowy przeciwny - IL-1<sup>niski</sup> IL-6<sup>wysoki</sup> TNF- $\alpha$ <sup>niski</sup>. W badaniach pozostałych makrofagowych czynników sekrecyjnych nie wykazano zróżnicowania funkcjonalnie odmiennych subpopulacji Mf (np. w przypadku sekrecji NO/NO<sub>2</sub>). Natomiast uwalnianie PGE<sub>2</sub> było statystycznie znacznie wyższe w przypadku populacji MfCY po ich stymulacji LPS, w porównaniu do populacji Mf kontrolnych analogicznie stymulowanych.

Badania innych autorów prac dotyczących omawianych czynników sekrecyjnych dowodzą, że wzmożone wydzielanie IL-1 (174) z jednoczesnym obniżeniem sekrecji PGE<sub>2</sub> obserwowane jest w populacji monocytów ludzkich wysokiej gęstości (74) rozdzielanych w gradiencie BSA. Także wzmożoną sekrecję TNF- $\alpha$  obserwowano badając populację dojrzałych Mf (76,177) jak też Mf o wysokiej ekspresji receptora C3R (Mac-1) (16) i FcR (152). Wszystkie te cechy wg naszych badań charakteryzują populację Mf o wysokiej gęstości wrażliwych na cyklofosfamid odpowiedzialnych za prezentację antygenów limfocytom T supresyjnym. Inni badacze wykazali również niski poziom sekrecji IL-6 charakteryzujący populację dojrzałych Mf (144), chociaż istnieją także doniesienia o wzmożonym wydzielaniu IL-6 przez adherentne Mf (106).

Wykazane w moich badaniach relacje uwalnianych czynników sekrecyjnych w SN z hodowli Mf i MfCY pozostają zgodne z tym co przyjęto uważać na temat zmiennej funkcji regulacyjnej cytokin. Istnieje powszechna zgodność, że TNF- $\alpha$  jest czynnikiem indukującym wydzielanie IL-6 (24,79,183) i PGE<sub>2</sub> (6,177) oraz że sekrecja TNF- $\alpha$  hamowana jest zwrotnie przez IL-6 i PGE<sub>2</sub> poprzez wzrost poziomu cAMP (2,56,102,134,172). Dlatego też efektem

wysokiego wydzielania IL-6 i PGE<sub>2</sub> produkowanych przez MfCY może być niski poziom wydzielania TNF- $\alpha$  przez te komórki. Moje wyniki pozostają zgodne z obserwacjami, że PGE<sub>2</sub> może wzmacniać wydzielanie IL-6 (98,102). Jakkolwiek zarówno TNF- $\alpha$  (127,180) jak i IL-6 (63) mogą wzmacniać indukcję nadwrażliwości typu późnego, to ich wzajemne relacje i interakcje w systemie "in vivo" są bardziej skomplikowane niż w przedstawionym w niniejszej pracy prostym schemacie doświadczalnym "in vitro", co w dalszym ciągu jest przedmiotem kolejnych dociekań eksperymentalnych (97,180). Zróznicowane sekrecji cytokin przez odmienne funkcjonalnie populacje Mf kontrolnych i MfCY może być spowodowane wpływem innych cytokin (IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-12), których nie oznaczano w naszym modelu badawczym. O funkcji regulacyjnej tych cytokin na prezentację antygeny odmiennym subpopulacjom limfocytów T wspominałem we wstępie niniejszej pracy (Wstęp pkt. 3.2).

Pomimo, że nie znaleziono różnic w wydzielaniu NO/NO<sub>2</sub> pomiędzy subpopulacjami kontrolnych Mf i MfCY wykazano zdecydowany wzrost syntezy NO/NO<sub>2</sub> po stymulacji LPS. Wiadomo, że Mf otrzewnowe stymulowane podaniem podłoża tioglikolanowego produkują niewielkie ilości tlenu azotu (99) a jego sekrecję wzmacnia istotnie LPS (32). Nawet niewielki, nieoznaczalny metodą Dings'a poziom NO uwalniany przez Mf niestymulowane może mieć wpływ na własności immunoregulacyjne w limfocytach poprzez zmiany wewnątrzkomórkowego cGMP (32,73,95,99).

Podsumowując wyniki dotyczące odmienności fizycznych, biologicznych i fenotypowych cech Mf w korelacji z ich zdolnością prezentacji antygeny subpopulacjom limfocytów T stwierdzić można, że:

a) frakcja o niskiej gęstości to niewrażliwa na cyklofosfamid populacja młodych makrofagów i komórek premakrofagowych o niskiej zdolności do fagocytozy i adherencji, niewielkiej ekspresji receptorów FcRI i FcRII, zdolna do prezentacji antygeny limfocytom Th1. Pod względem zdolności do sekrecji cytokin charakteryzuje ją wzór IL-1<sup>niski</sup> IL-6<sup>wysoki</sup> TNF- $\alpha$ <sup>niski</sup>. Natomiast

b) makrofagowa frakcja wysokiej gęstości to wrażliwa na cyklofosfamid populacja młodych i dojrzałych form Mf o wysokiej zdolności do adherencji i fagocytozy, wzmożonej ekspresji receptorów FcRI, FcRII i C3R, prezentująca antygeny limfocytom T supresyjnym. Charakteryzuje ją wzór

poziomu cytokin IL-1<sup>wysoki</sup> IL-6<sup>niski</sup> TNF- $\alpha$ <sup>wysoki</sup> (100,158).

Mechanizm działania CY na komórki Mf nie został całkowicie wyjaśniony. Najprawdopodobniej jest on wypadkową działania wielu odrębnych czynników, z których pierwsze miejsce zajmuje mechanizm bezpośredniego toksycznego działania metabolitów CY (akroleiny) na komórki Mf zmieniające błonową i wewnątrzplazmatyczną aktywność peptydów i białek Mf pod wpływem jej silnego działania utleniającego na grupy sulfhydrylowe i aminowe (22,70,101). Toksyczność akroleiny objawia się denaturacją białek enzymatycznych (m.in. cytochromu C450, hydrolaz). Drugim elementem wpływającym na aktywność Mf po zadziałaniu CY są zmienione parametry sekrecyjne tych komórek w odniesieniu do Mf kontrolnych. Istotne znaczenie ma wpływ CY na wzmożone wydzielanie IL-6 przez populację MfCY w porównaniu do Mf kontrolnych. To stymulujące do syntezy i sekrecji IL-6 działanie CY potwierdzone zostało dalszymi badaniami innego metabolitu CY -fosforamidu musztardowego, którego analog nitrogen musztardowy (52), znany pod handlową nazwą jako Nitrogranulogen - wg moich niepublikowanych, wstępnych badań intensywnie wzmagają wydzielanie IL-6 w populacji Mf traktowanych tym lekiem *in vitro*, najprawdopodobniej na drodze stymulacji jądrowego DNA (3,52,101,113). Istotne znaczenie dla działania CY ma wzmożone wydzielanie IL-6, która jest cytokiną ochronną (62,166) dla młodych form premakrofagowych i przez wielu (7,62,77,178,179), choć nie wszystkich badaczy (136,137) uważana jest za podstawowy czynnik proliferacyjny komórek hemopoetycznych. Biorąc pod uwagę fakt, że CY wpływa głównie na populację Mf o wysokiej gęstości - z pelety, które na podstawie naszych badań, jak i innych badaczy stanowią grupę młodych i dojrzałych komórek Mf (86,128) stwierdzić można, że CY wpływa odmiennie na Mf na różnym etapie ich dojrzewania (140). Wzmożone wydzielanie IL-6 przez MfCY jest czynnikiem ochronnym przed toksycznością CY dla niedojrzałych form Mf z "lekkiej" frakcji - komórek niskiej gęstości (z interfazy 0/9% Ficollu).

CY nie jest idealnym czynnikiem różnicującym funkcjonalną odmienność subpopulacji Mf. Wynika to z faktu, że nie działa on bezpośrednio na komórki lecz za pośrednictwem aktywnych jego metabolitów. Dlatego też efektem działania CY na Mf jest suma efektów działania jego metabolitów na te komórki. Wpływ na indukcję NK MfCY zawdzięczają

działaniu akroleiny a wzrost wydzielania IL-6 jest spowodowany działaniem Nitrogranulogenu - analogu metabolitu CY - fosforamidu musztardowego. Natomiast akroleina nie wykazała wpływu na sekrecję cytokin ani też Nitrogranulogen nie wpływał na charakterystykę Mf w NK (wyniki nie przedstawione w pracy).

Toksyczne działanie CY i jego aktywnego metabolitu 4-hydroperoksycyklofosfamid na komórki szpiku kostnego hamuje zarówno IL-1 (114,130) jak i TNF- $\alpha$  (114). Domniemać więc można, że niski poziom tych cytokin wydzielanych przez MfCY jest wynikiem osłonowego ich wykorzystania w komórce Mf w obronie przed toksycznością CY. Potwierdzeniem tej tezy może być doniesienie Gosselin, wykazujące, że CY "oszczędza" prekursorów komórek supresyjnych, które to komórki po zaprzestaniu stymulacji CY w hodowli odzyskują aktywność supresyjną (48). Autorzy tej pracy odnoszą aktywność supresyjną co prawda bezpośrednio do komórek supresyjnych zaznaczając jednocześnie, że nie są to komórki docelowe dla działania CY a określając całą populację komórek wrażliwych na działanie CY jako adherentną, co sugerować może współudział w indukcji supresji adherentnych Mf o wysokim ciężarze właściwym.

Badania Nakano (120,121) dotyczące nieswoistych czynników supresyjnych produkowanych przez makrofago-podobne komórki supresyjne śledziona indukowane dożylnym podaniem znakowanych haptenem splenocytów wykazały hamujący wpływ CY na ich wydzielanie. Wg autora tych prac badane czynniki supresyjne są przyczyną wyhamowania biernego transferu NK po podaniu Mf znakowanych haptenem syngenicznym biorcom. Czynniki te wiążą się selektywnie do Ia pozytywnej, cyklofosfamidowo-wrażliwej populacji komórek adherentnych śledziona. Informacja ta potwierdza generowanie stanu supresji poprzez dożylne podanie Mf znakowanych haptenem, które to komórki stymulują w śledzionie indukcję makrofago-podobnych komórek supresyjnych wydzielających czynniki supresyjne, co może mieć bezpośredni wpływ na funkcjonalną odmienność makrofagów w odpowiedzi immunologicznej.

Kolejnym sugerowanym elementem wpływającym na wzmocnienie prezentacji antygenów limfocytom Th1 przez MfCY jest obserwowana w naszych dalszych badaniach, nie ujętych w niniejszej pracy, tendencja wzmoczonej ekspresji antygenów NLDC-145 w populacji MfCY w odniesieniu do Mf kontrolnych. Antygen NLDC-145 jest epitopem komórkowym pojawiającym się na komórkach

welonowatych i interdigitalnych z grupy komórek dendrytycznych (78,80) i być może wzmożona jego ekspresja w populacji MfCY jest także przyczyną odmienności funkcjonalnej tych komórek wzmagając ich funkcję aktywnej prezentacji antygeny limfocytom Th1 w NK. Domniemanie to jest oparte na analizie wyników wstępnych doświadczeń z użyciem przeciwciał NLDC-145, które spodziewamy się poddać dalszej weryfikacji w kolejnych układach doświadczalnych.

Reasumując mechanizm działania CY na Mf stwierdzić należy, że działa on za pośrednictwem swoich aktywnych metabolitów. Ma wpływ na sekrecję cytokin przez Mf ekspresję receptorów powierzchniowych i indukcję NK u myszy.

## WNIOSKI

Makrofagi otrzewnowe nie indukują nadwrażliwości kontaktowej po podaniu dożylnym tych komórek znakowanych haptenem. Traktowanie dawców tych komórek niskimi dawkami cyklofosfamidu zmienia aktywność funkcjonalną makrofagów i wyznakowane haptenem makrofagi podane dożylnie syngenicznym biorcom indukują nadwrażliwość kontaktową poprzez stymulację limfocytów Th1. Mechanizm działania cyklofosfamidu na makrofagi nie jest dokładnie poznany, ale na podstawie danych z literatury i własnych badań wynika, że za efekt działania cyklofosfamidu odpowiedzialne są jego aktywne metabolity - akroleina i fosforamid musztardowy. Charakterystyka makrofagów po podaniu cyklofosfamidu i makrofagów natywnych wykazała oprócz zróżnicowania funkcjonalnego odmienność tych subpopulacji w zakresie fenotypowym i zdolności do sekrecji monokin. Populację Mf, która prezentuje antygen limfocytom Th1 stanowi niewrażliwa na CY frakcja Mf o niskiej gęstości, nieadherująca i nefagocytująca, wykazująca niewielką ekspresję receptorów FcRI i FcRII. Pod względem zdolności do sekrecji cytokin charakteryzuje ją wzór  $IL-1^{niska} IL-6^{wysoka} TNF-\alpha^{niska}$ . Populacją Mf prezentujących antygen limfocytom Ts jest wrażliwa na CY frakcja makrofagów wysokiej gęstości, silnie adherująca i fagocytująca, która wykazuje wzmoczoną ekspresję receptorów FcRI i FcRII. Charakteryzuje ją wzór poziomu cytokin  $IL-1^{wysoki} IL-6^{niski} TNF-\alpha^{wysoki}$ .

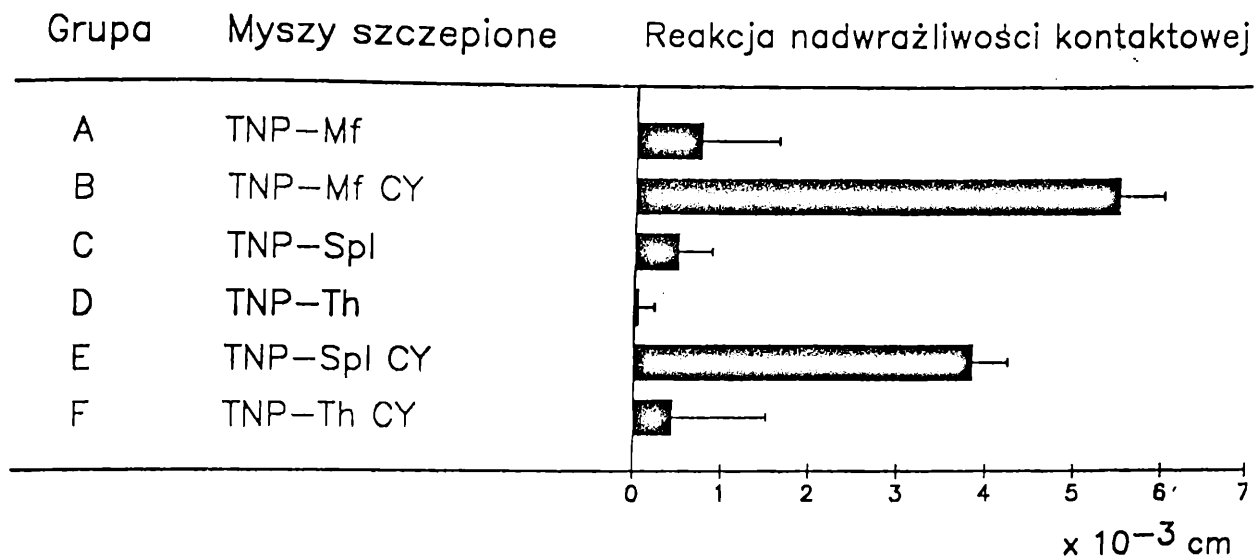


## STRESZCZENIE

W niniejszej pracy przedstawiono badania, które dokumentują funkcjonalne zróżnicowanie populacji makrofagów (Mf) otrzewnowych myszy pod względem zdolności do prezentacji antygeny zarówno limfocytom Th1 i jak i Ts w modelu nadwrażliwości kontaktowej (NK). Wykazano, że czynnikiem ujawniającym funkcjonalne zróżnicowanie w populacji Mf jest cyklofosfamid (CY) - lek przeciwnowotworowy z grupy alkilujących. Stwierdzono, że podanie CY dawcom Mf ujawnia w tej populacji makrofagów (MfCY) zdolność prezentacji antygeny (haptenu TNP opłaszczzonego na komórce) w transferze TNP-MfCY na syngenicznych biorców. Analogiczny transfer TNP-Mf od dawców kontrolnych stymuluje eferentne limfocyty supresyjne a w konsekwencji stan tolerancji na haptenu TNP możliwy do przeniesienia na nieuczulonych biorców w biernym transferze. Zdolność prezentacji antygeny subpopulacjom limfocytów Th1 i Ts przez różne subpopulacje Mf skorelowano z odmienną gęstością Mf po ich rozdzieleniu w schodkowym gradiencie Ficollu, jak również z ich aktywnością fagocytarną i zdolnościami do adherencji. Zbadano też wpływ CY na ekspresję rozmaitych receptorów powierzchniowych na Mf - FcRI, FcRII, C3R, Mac-2, Mac-3 i na charakterystykę uwalniania czynników sekrecyjnych przez badane subpopulacje Mf. Analiza wyników tych badań pozwoliła wysnuć wniosek, że populację Mf otrzewnowych myszy można zróżnicować na dwie subpopulacje odmiennie prezentujące antygen w NK. Pierwszą stanowi niewrażliwa na CY subpopulacja Mf indukujących w NK pobudzenie limfocytów Th1, złożona z niefagocytujących i nieadherentnych makrofagów o niskiej gęstości i wykazująca niewielką ekspresję receptorów FcR I, FcRII, C3R i Mac-2. Subpopulacja ta charakteryzuje się wzorem aktywności sekrecji cytokinowej  $IL-1^{niska}$   $IL-6^{wysoka}$   $TNF-\alpha^{niska}$ . Drugą subpopulację Mf stanowi wrażliwa na CY frakcja adherentnych i fagocytujących makrofagów o wysokiej gęstości i wzmożonej ekspresji receptorów powierzchniowych FcRI, FcRII, C3R i Mac-2, która w NK stymuluje pobudzenie eferentnych limfocytów T supresyjnych. Subpopulacja tych makrofagów charakteryzuje się wzorem aktywności uwalniania cytokin  $IL-1^{wysoka}$   $IL-6^{niska}$   $TNF-\alpha^{wysoka}$ . Rozważając mechanizm działania CY na Mf zasugerowano, że lek ten działa poprzez aktywne metabolity - akroleinę i

nitrogen musztardowy, które są bezpośrednią przyczyną ujawnienia odmienności subpopulacji Mf.

RYCINY I TABELE

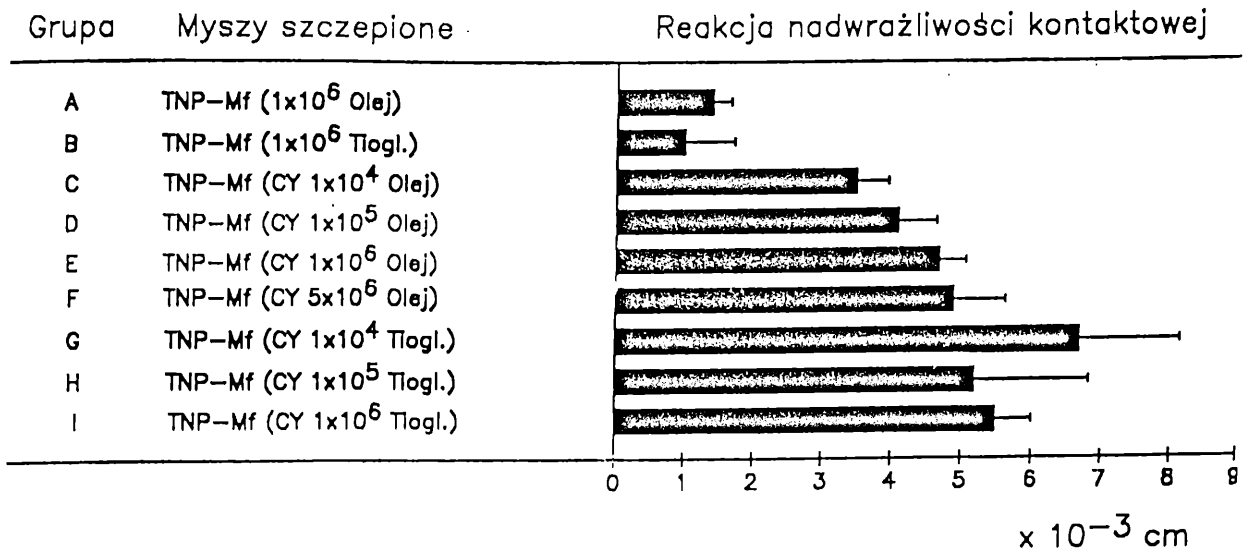


Ryc 1.

WPLYW CYKLOFOSFAMIDU (CY) NA INDUKCJĘ NADWRAZLIWOŚCI KONTAKTOWEJ (NK).

Myszom CBA podano dożylnie syngeniczne komórki znakowane haptenu TNP pobrane od dawców kontrolnych (gr.A,C,D) lub od dawców traktowanych CY (gr.B,E,F); w ilości  $1 \times 10^6$  komórek na mysz (Materiały i metody pkt.4.3). Po 7 dniach od transferu komórek oceniono reakcję NK w teście usznym, polegającym na aplikacji haptenu rozpuszczonego w oliwie na obie strony małżowiny (Materiały i metody pkt. 6.1). Pomiaru opuchnięcia małżowiny dokonywano mikrometrem inżynierskim (Mitutoyo). Wyniki testu przedstawiono w jednostkach wzrostu grubości małżowiny usznej ( $1U = 1 \times 10^{-3} \text{ cm}$ ), po odjęciu wartości kontroli negatywnej (niespecyficznego opuchnięcia małżowiny usznej zwierząt nieimmunizowanych pod wpływem haptenu). Wartości kontrolne reakcji są w granicach 1-2 U. Wyniki wyrażone są jako średnie arytmetyczne  $\pm$  SD. Każda z grup doświadczalnych liczyła 4 myszy.

Znamiennosc statystyczna wynosi: gr.A wzgl. gr.B  $p < 0,01$ , gr.C wzgl. gr.E  $p < 0,001$ , gr.D wzgl. gr.F - brak znamiennosci.

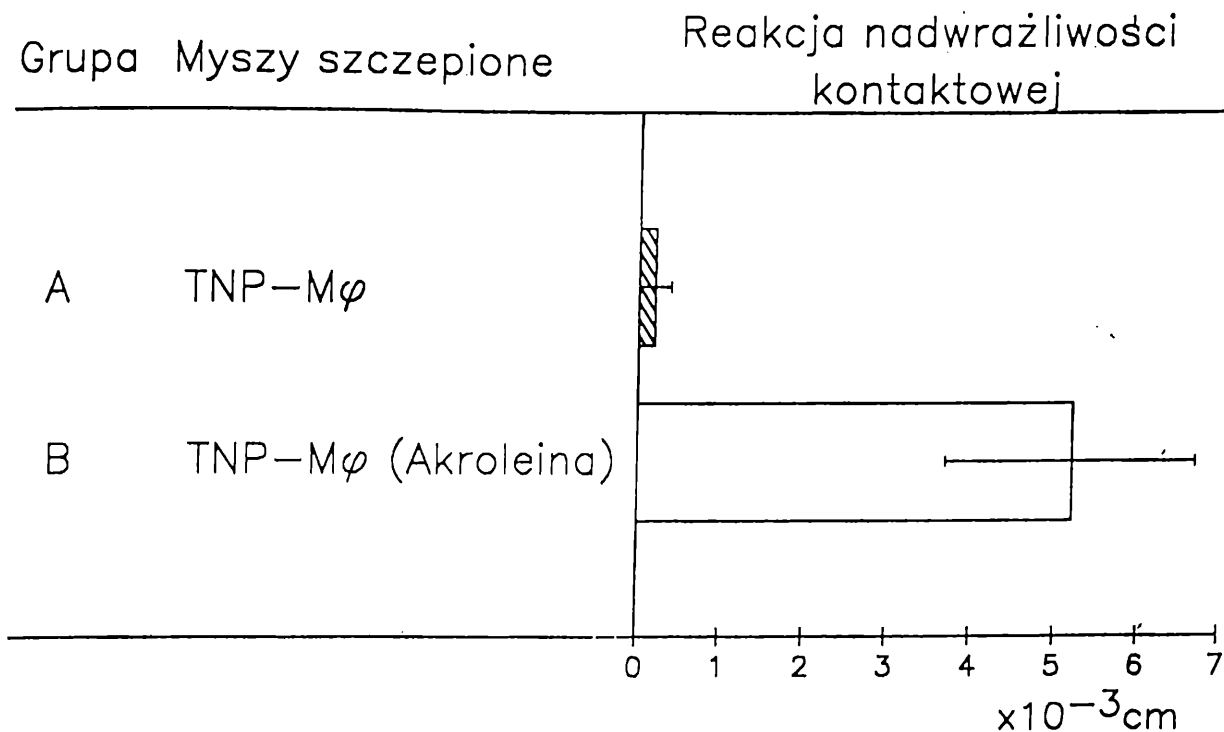


Ryc. 2.

#### WPLYW CY NA MF I INDUKCJĘ NK

Myszy CBA zostały uczulone poprzez dożylne podanie znakowanych TNP makrofagów otrzewnowych (Mf) indukowanych tioglikolanem lub olejem mineralnym (Marcol 52) od dawców kontrolnych lub traktowanych CY. Liczbę wstrzykniętych komórek podano w nawiasach. Pozostałe warunki doświadczenia są identyczne jak w opisie do ryc. 1. Każda z grup doświadczalnych liczyła 4 myszy.

Znamiennosc statystyczna między grupami A i C-F wynosi  $p < 0.005$ , grupami B i G-H wynosi  $p < 0,005$ .

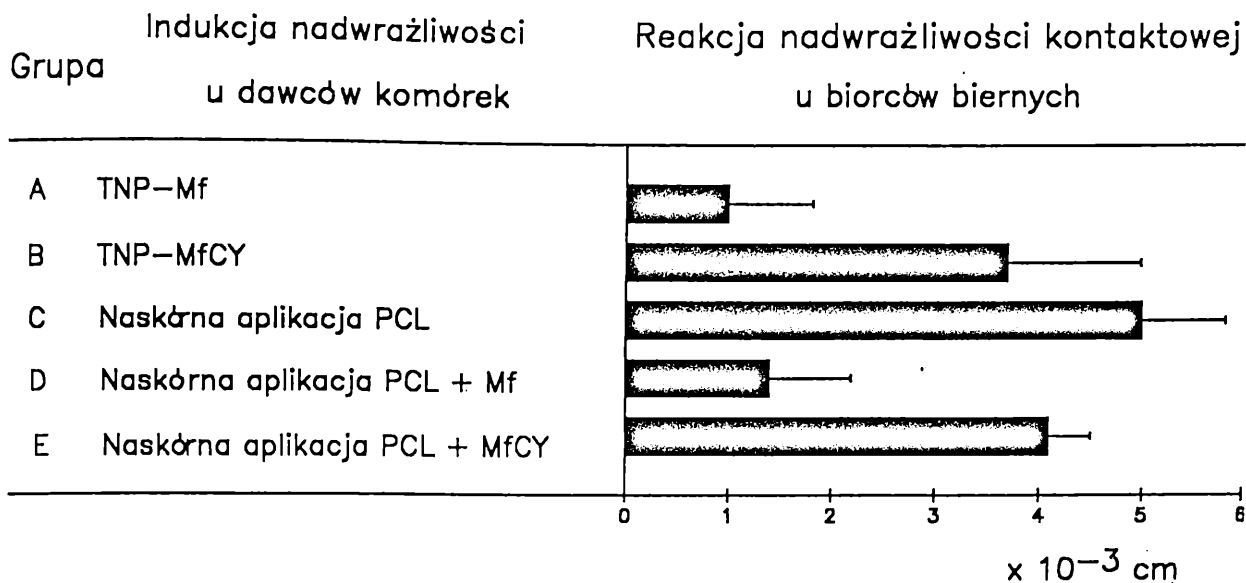


Ryc. 3.

#### WPLYW AKROLEINY NA INDUKCJĘ NADWRAZLIWOŚCI KONTAKTOWEJ

Makrofagi otrzewnowe myszy CBA inkubowano "in vitro" z metabolitem CY - akroleiną (Materiały i metody pkt. 4.4), następnie wyznakowano TNP i podano dożylnie syngenicznym biorcom. Nadwrażliwość kontaktową badano w teście usznym jak w opisie do ryc. 1. Każda z grup doświadczalnych liczyła po 4 myszy.

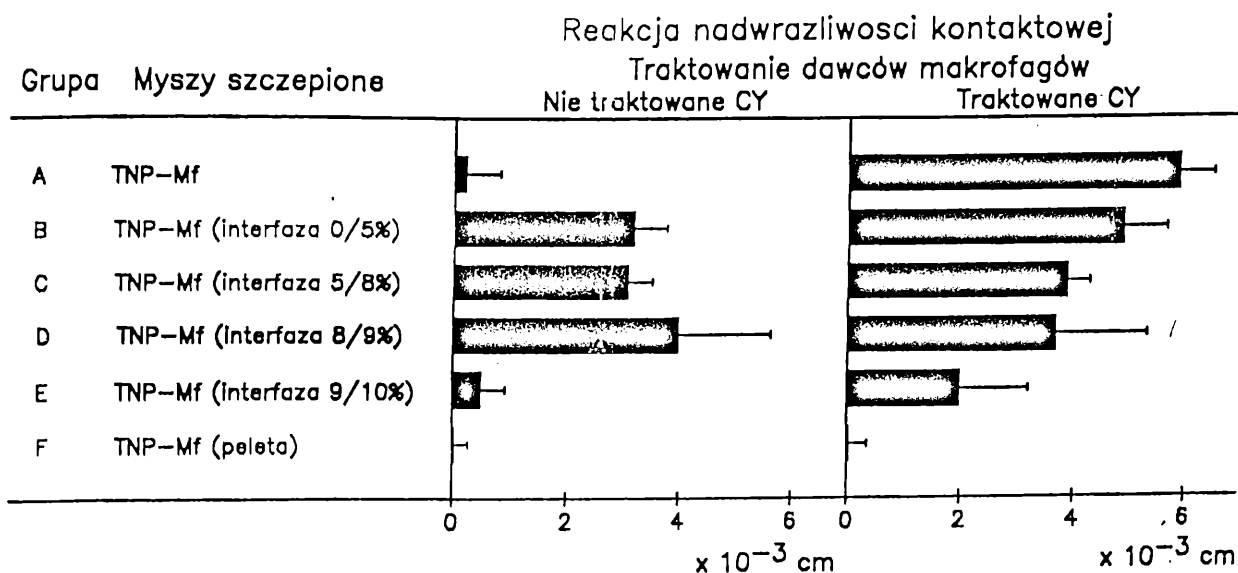
Znamienność statystyczna grupy A wzgl. B wynosi  $p < 0.005$ .



Ryc. 4.

ADOPTYWNY TRANSFER NADWRAZLIWOŚCI KONTAKTOWEJ INDUKOWANY U DAWCÓW PRZEZ TNP-Mf

Myszom CBA podano dożylnie makrofagi znakowane haptenu TNP od dawców kontrolnych (gr.A) i traktowanych CY (gr.B) (Materiały i Metody pkt.4.3). W grupie C dawców limfocytów uczulono na skórę haptenu PCL (Materiały i Metody pkt.6.1). Siedem dni po dożylnym transferze Mf (z grupy A i B) oraz cztery po naskórnej aplikacji haptenu (z grupy C) odpowiednio  $4 \times 10^7$  (gr. A i gr. B) i  $7 \times 10^7$  (gr. C) komórek śledzionowych od tych zwierząt zostało podanych dożylnie syngenicznym biorcom. Odpowiedź bierną oszacowano testem usznym. Grupa D i E myszy otrzymała  $7 \times 10^7$  komórek śledzionowych od myszy uczulanych naskórną haptenu PCL (z grupy C) łącznie z  $4 \times 10^7$  Spl od myszy z grupy A (gr. D) lub z grupy B (gr. E). Każda z grup doświadczalnych liczyła po 4 myszy. Znamienność statystyczna: gr.A względem gr.B ( $p < 0.05$ ) gr.C względem gr.D ( $p < 0.001$ ).

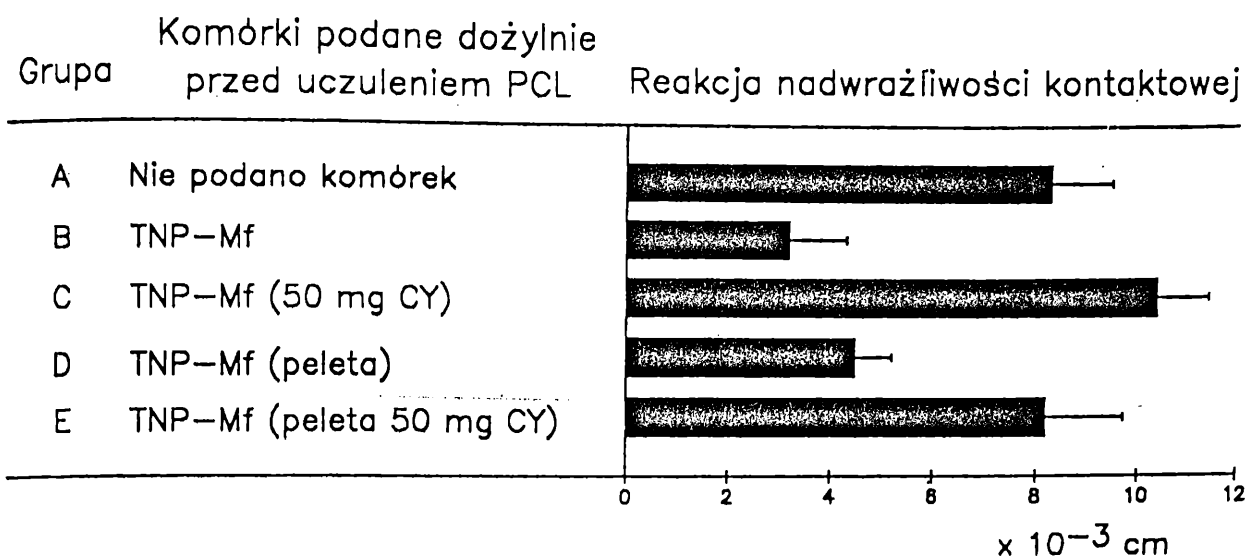


Ryc. 5.

#### INDUKCJA NK PRZEZ MF ROZDZIELANE W GRADIENTE FICOLLU

Makrofagi otrzewnowe od myszy kontrolnych i myszy traktowanych CY zostały rozdzielone w nieciągłym gradiencie Ficollu na kilka frakcji (stężenie Ficollu podano w nawiasach). Komórki te następnie zebrano, znakowano TNP i podano dożylnie syngenicznym biorcom w dawce  $1 \times 10^6$  / mysz. W grupie kontrolnej myszy otrzymały nierozdzieloną pełną populację TNP-Mf od dawców kontrolnych lub traktowanych CY (gr. A). Każda z grup badanych liczyła po 4 myszy.

Znamienność statystyczna dla Mf kontrolnych gr. A względem B - D  $p < 0.001$ , dla MfCY gr. A wzgl. C - E  $p < 0.05$ .



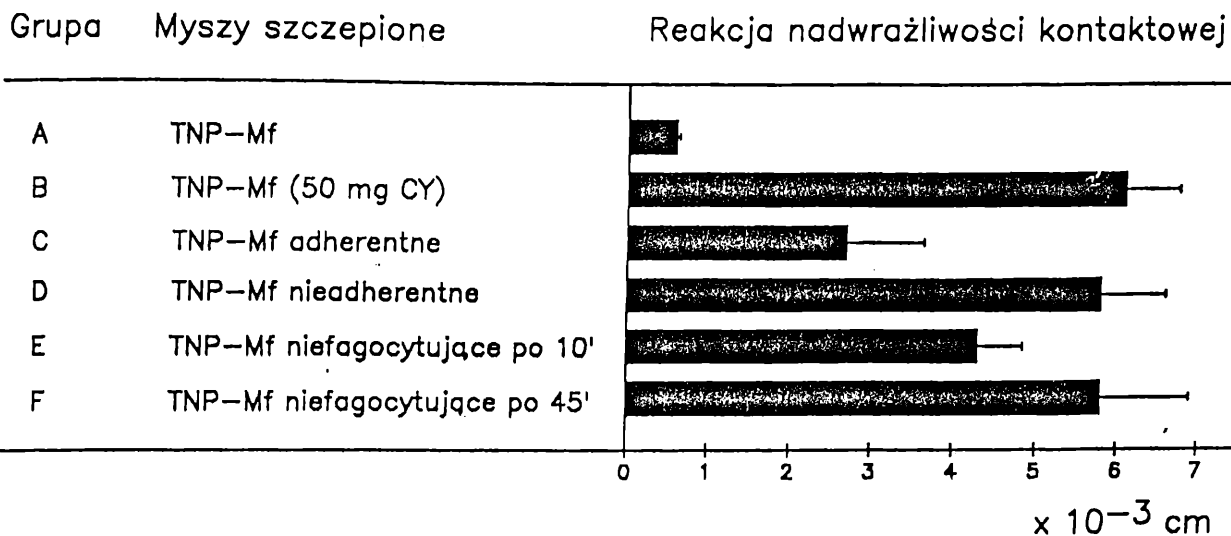
Ryc. 6.

BADANIE INDUKCJI LIMFOCYTÓW SUPRESYJNYCH PRZEZ MfCY Z O DUŻEJ GĘSTOŚCI

Makrofagi uzyskane od dawców kontrolnych (gr.A) lub traktowanych cyklofosfamidem (gr.B) podano syngenicznym (po  $1 \times 10^6$ ) lub rozdzielono w nieciągłym gradiencie Ficollu i po  $1 \times 10^6$  znakowanych TNP Mf wysokiej gęstości (z pelety) podano dożylnie syngenicznym biorcom (odpowiednio grupy D i E). Siedem dni później zwierzęta te oraz dodatkowo myszy z grupy kontrolnej (gr.A) uczulone zostały PCL na brzuch i wszystkie testowano w cztery dni później testem usznym nadwrażliwości kontaktowej. Wszystkie grupy badane liczyły po 4 myszy.

Znamiennosc statystyczna gr.A względem B ( $p < 0.002$ ) i gr.D względem E ( $p < 0.005$ ).





Ryc. 7.

#### KORELACJA AKTYWNOŚCI FAGOCYTARNEJ Mf I ICH ZDOLNOŚCI DO INDUKCJI NK

Myszom CBA podano dożylnie znakowane haptenum TNP makrofagi kontrolne (gr.A) lub Mf od dawców traktowanych cyklofosfamidem (gr.C). Podobnie podano komórki rozdzielane - adherentne lub nieadherujące (gr. C i D) i Mf nefagocytyjące węglika żelaza po 10 min lub po 45 min inkubacji (gr. E i F) (Materiały i metody pkt.5.2 i 5.3). Każdej z grup badanych liczyła po 4-5 myszy.

Znamiennosc statystyczna gr.A wzgl. gr.B, gr.D, i gr.E wynosi  $p < 0.001$  a gr.B wzgl. gr.D  $p < 0.005$ .

# Tabela nr 1

## BADANIA EKSPRESJI RECEPTORÓW FcRI i FcRII METODAMI TWORZENIA ROZET

GRUPA	A	B	C	D
	Mf 0/9%	MfCY 0/9%	Mf peleta	MfCY peleta
<b>ROZETY</b> 1. z IgG2a (FcRI)	15.6+/-0.86	10.2+/-1.25	32.75+/-1.88	27+/-1.33
2. EA IgG2b (FcRII)	14.0+/-1.63	7.6+/-1.17	27.5+/-1.17	32+/-4.95

Tabela 1

### WPLYW CYKLOFOSFAMIDU NA EKSPRESJĘ RECEPTORÓW FcRI I FcRII NA MAKROFAGACH

Makrofagi kontrolne i pobrane od dawców traktowanych CY rozdzielono w schodkowym gradiencie Ficollu na populacje o niskiej gęstości (z interfazy 0/9%) i wyższej gęstości - pelety. Tak przygotowane frakcje Mf kontrolnych i MfCY poddano analizie ekspresji receptorów FcRI i FcRII. Badania te wykonywano metodami tworzenia rozet z przeciwciałami cytofilnymi  $\alpha$ -TNP IgG2a (FcRI) i rozet EA (TNP-MRBC- $\alpha$  TNP IgG 2b) FcRII) (Materiały i metody pkt.7.1-2).

Statystyczna znamienność wyników wynosi:

dla gr.A-1 wzgl. C-1 i gr.B-1 wzgl. D-1 -  $p < 0.001$ ;

dla gr.A-2 wzgl. C-2, gr.B-2 wzgl. D-2, gr.B-1 wzgl. A-1 i gr.B-2 wzgl.

A-2 -  $p < 0.01$ ;

dla gr.D-1 wzgl.C-1 -  $p < 0.05$ .

Tabela nr 2

## KORELACJA FUNKCJI FAGOCYTARNEJ Mf ZE ZDOLNOŚCIĄ TWORZENIA ROZET Z IgG2a

ROZETY z IgG2a (FcRI)	PELNA PUŁA MAKROFAGÓW		MAKROFAGI			
	Mf	MfCY	NIEFAGOCYTUJĄCE		FAGOCYTUJĄCE	
			Mf	MfCY	Mf	MfCY
x	26.4	15	2.0	2.5	24	13
+/- SD	5.4	3.3	0.9	0.7	-	-

Tabela 2

### EKSPRESJA RECEPTORA FcR1 W KORELACJI Z FUNKCJĄ FAGOCYTARNĄ MAKROFAGÓW

W populacji Mf nefagocytydujących węglika żelaza od dawców kontrolnych lub traktowanych CY i w pełnej populacji tych komórek badano ekspresję receptora FcR1 metodą tworzenia rozet z przeciwciałami cytofilnymi IgG2a (Materiały i metody pkt. 5.3 i 7.1). Wartości ekspresji receptora FcRI dla populacji fagocytydującej podano szacunkowo odejmując od wartości tego receptora uzyskanej dla pełnej populacji wartość ekspresji FcRI dla populacji nefagocytydującej.

Statystyczna znamienność wyników wynosi:

dla gr. nefagocytydujących Mf wzgl. gr. pełnej populacji Mf -  $p < 0.01$ ;

dla gr. nefagocytydujących MfCY wzgl. gr. pełnej populacji MfCY, -  $p < 0.01$ ;

dla gr. pełnej populacji Mf wzgl. gr. pełnej populacji MfCY -  $p < 0.05$ .

Tabela nr 3

**EKSPRESJA DETERMINANT POWIERZCHNIOWYCH  
NA Mf I MfCY W BADANIACH CYTOFLUORYMETRYCZNYCH**

MAKROFAGI PEŁNEJ PULI			ROZDZIELANE W GRADIENTCIE FICOLLU									
ANTYGEN BADANY			FRAKCJE [%]									
	K	CY	0/5		5/8		8/9		9/10		PELETA	
			K	CY	K	CY	K	CY	K	CY	K	CY
I-A	12	7	18	6	13	14	11	12	13	8	6	5
I-E	3	3	6	7	6	4	6	4	6	4	1	3
FcRII	44	28	-	-	-	-	-	-	-	-	35	21
Mac-1	53	52	-	-	-	-	43	30	-	-	49	46
Mac-2	68	65	-	-	-	-	83	52	-	-	62	56
Mac-3	46	42	-	-	-	-	34	46	-	-	38	39

Tabela 3

ANALIZA EKSPRESJI ANTYPENÓW Ia, Mac-1, Mac-2, Mac-3, I FcRII NA Mf I MfCY

Powyższe determinanty makrofagowe oznaczono metodą pośredniej immunofluorescencji w zawieszynie komórkowej (Materiały i metody pkt.9.1) i poddano analizie cytofluorymetrycznej.

Tabela nr 4

## WYDZIELANIE CYTOKIN PRZEZ Mf I MfCY

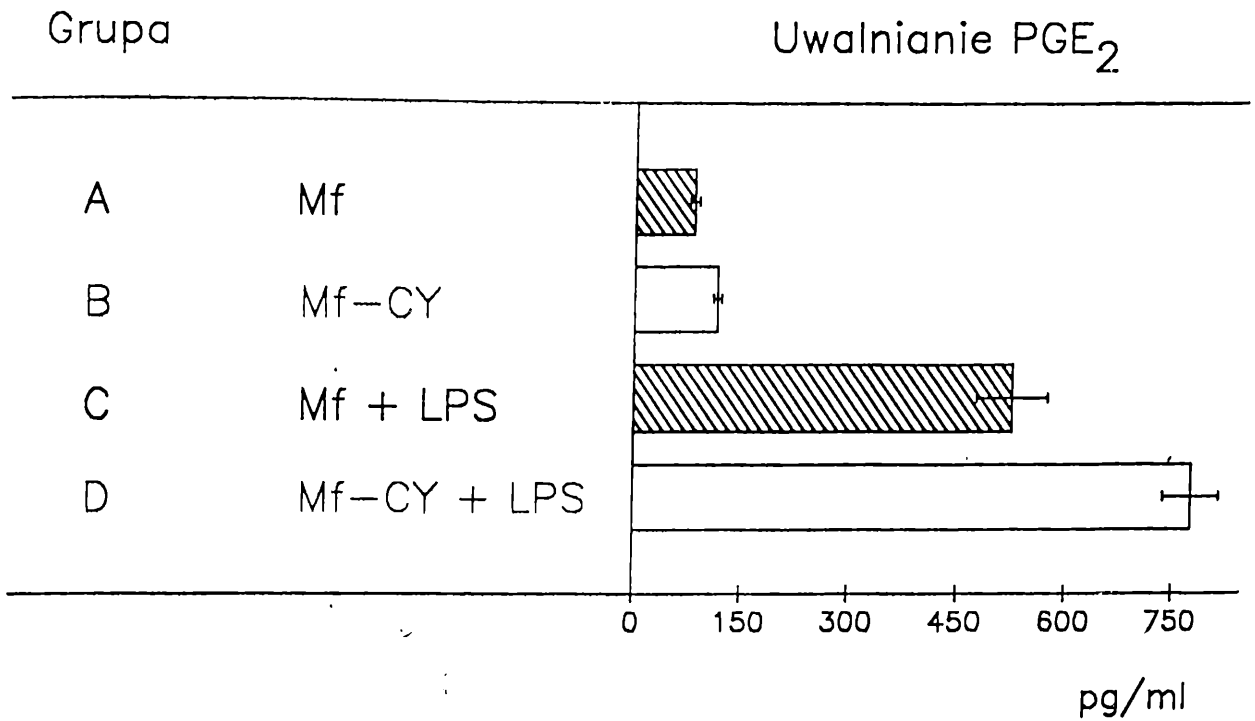
GRUPA	TNF- $\alpha$ [U/ml]	IL-1 [U/ml]	IL-6 [U/ml]
A Mf	18+/-0.8	<20	1950 +/- 120**
B MfCY	21+/-1.1	<20	4500 +/- 250**
C Mf+LPS	147+/-11.2*	932+/-123**	36250 +/-3100*
D MfCY+LPS	36+/- 2.8*	380+/-278**	181250+/-22000*

Wyniki wyrażono w wartościach średniej +/- SD  
 Statystyczne znamiennosc grupy D względem C:  
 p<0.01\* <0.05\*\*

Tabela 4

## WYDZIELANIE CYTOKIN PRZEZ MAKROFAGI KONTROLNE I MAKROFAGI OD DAWCÓW TRAKTOWANYCH CYKLOFOSFAMIDEM.

Makrofagi kontrolne i od dawców traktowanych CY były hodowane w koncentracji  $1 \times 10^6$  w 1 ml podłoża RPMI z 5% FCS (gr. A i B) oraz w obecności LPS w stężeniu 100 ng/ml jako stymulatora "in vitro" (gr. C i D). Supernatanty z hodowli zebrano po 24 godzinach i testowano poziom wydzielonej IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ . Jako standardów użyto rekombinowanych cytokin. Wyniki wyrażono w wartościach średniej arytmetycznej jednostek cytokin / ml supernatantu  $\pm$  SD. Badania wszystkich parametrów wykonano w na supernatantach pochodzących z pięciu niezależnych eksperymentów. Wyniki zamieszczone w tabeli są reprezentacyjne dla tych oznaczeń. pięciokrotnie a przedstawione wyniki są reprezentacyjne. Każda z grup zwierząt jako dawców makrofagów liczyła 3 do 6 myszy.

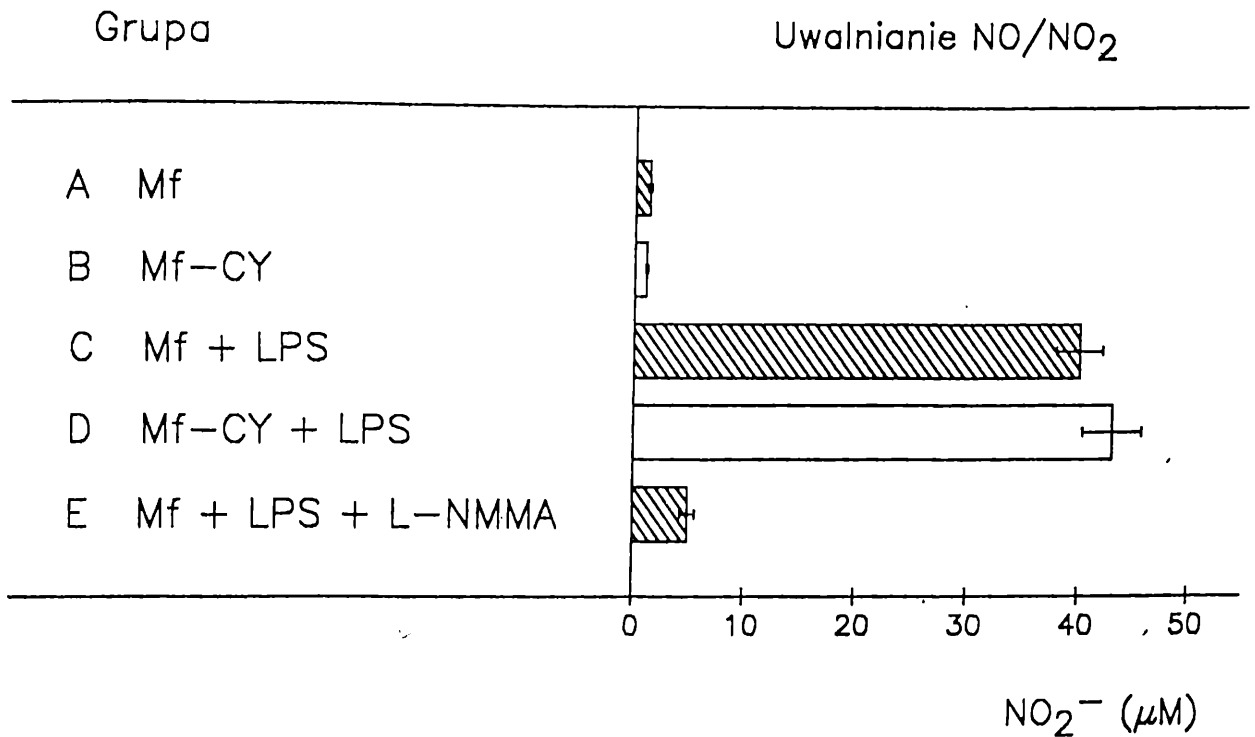


Ryc. 8.

WPLYW CY NA UWALNIANIE PGE<sub>2</sub> PRZEZ MF

Supernatanty z hodowli makrofagowych otrzymane wg opisu do tabeli 3 testowano na obecność PGE<sub>2</sub> metodą radioimmunologiczną w teście <sup>3</sup>H-PGE<sub>2</sub> RIA (Materiały i metody pkt.9.5). Wyniki przedstawiono w pg/ml jako wartość średnia ± SD z trzykrotnych powtórzeń.

Statystyczna znamienność gr. D względem C  $p < 0.05$ , gr.C wzgl. gr.A oraz gr.D wzgl. gr.B  $p < 0.005$ .



Ryc. 9.

WPLYW CY NA UWALNIANIE NO/NO<sub>2</sub> PRZEZ MF

Supernatanty z 24 godz. hodowli Mf i MfCY testowano metodą kolorymetryczną odczynnikiem Griess'a (Materiały i metody pkt.9.1, 9.6). Wyniki stężenia NO/NO<sub>2</sub> przedstawiono w μM jako wartość średniej arytmetycznej ± SD z potrójnego oznaczenia.

Znamierność statystyczna grup C i D względem A i B p<0.001. Brak znamierności statystycznej gr.C wzgl. gr.D.

## PISMIENNIC TWO

1. Adams D.O., Weiel J.I. i wsp.: Regulatory mechanism in tumoricidal activation.- Progress in leukocyte biology vol. 4, Macrophage biology. Alan R. Liss, Inc., New York, 1985 str. 3-14.
2. Aderka D., Junming L. Vilcek J.: IL-6 inhibits lipopolisaccharide - induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. J. Immunol. 143: 3517-3523, 1989.
3. Akira S., Isshiki H., Sugita T., Tanabe O., Kinoshita S., Nishio Y., Nakajima T., Hirano T., Kishimoto T.: A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL-6) is a member of C/EBP family." EMBO J. 9. 6: 1897-1906, 1990.
4. Akiyama Y., Stewenson G.W., Schlick E., Matsushima K., Miller P.J., Stevenson H.C.: Difrferential ability of human blood monocyte subsets to release various cytokines. J. Leukoc. Biol. 37: 519-530, 1985.
5. Albina J.E., Mills C.D., Henry W.L. Jr., Daldwell M.D.: Regulation of macrophage physiology by L-arginine. Role of the L-arginine deiminase pathway. J. Immunol. 143: 3641-3646, 1989.
6. Alleva D.G., Burger C.J., Elgert K.D.: Tumor growth increases Ia<sup>-</sup> macrophage synthesis of tumor necrosis factor and prostaglandin E<sub>2</sub>: changes in macrophage suppressor activity. J. Leukoc. Biol. 53: 550-558, 1993.
7. Armstrong J.W., Simske S.J., Beharka A.A., Balch S., Luttgies M.W., Chapes S.K.: Class I and class II major histocompatibility molecules play a role in bone marrow-derived macrophage development. J. Leukoc. Biol. 55: 658-661, 1994.
8. Asherson G.L., Ptak W.: Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. Active sensitization and passive transfer. Immunology 15: 405-416, 1968.
9. Austyn J.M. Gordon S.: F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. Eur. J. Immunol. 11: 805-815, 1981.



10. Beaty C.D., Franklin T.R., Uehara Y., Wilson C.B.: Lipopolisaccharide-induced cytokine production in human monocytes: role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. *Eur. J. Immunol.* 24: 1278-1284, 1994.
11. Berg S.F., Mjaaland S., Fossum S.: Comparing macrophages and dendritic leukocytes as antigen-presenting cells for humoral responses in vitro by antigen targeting. *Eur. J. Immunol.* 24: 1262-1268, 1994.
12. Betz M., Fox B.S.: Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J. Immunol.* 146: 108-113, 1991.
13. von Blomberg M., Sheper R.J., Mullink H., Polak L.: Differential capacity of macrophages from various sources to act as hapten - specific stimulator cells in vitro. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 68: 392-396, 1982.
14. Bouvier G., Benoliel A. M., Foa C., Bongrand P.: Relationship between phagosome acidification, phagosome-lysosome fusion, and mechanism of particle ingestion. *J. Leukoc. Biol.* 55: 729-734, 1994.
15. Braciale T.J., Braciale V.L.: Antigen presentation: structural themes and functional variations. *Immunol. Today* 12 4: 124-129, 1991.
16. Bradbury M.G., Moreno C.: Effect of lipoarabinomannan and mycobacteria on tumor necrosis factor production by different populations of murine macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 94: 57-63, 1993.
17. Brayley-Mullen H.: Distinct populations of antigen-presenting cells are required for activation of suppressor and contrasuppressor T cells by type III pneumococcal polysaccharide. *Cell. Immunol.* 128: 528-541, 1990.
18. Brown P.H., Thorbecke G.Y.: Characterization of the molecules on SJL/J lymphomas which stimulate syngeneic T cells. *J. Immunol.* 135: 3572-3580, 1985.
19. Bursuker I., Goldman R.: On the origin of macrophage heterogeneity: a hypothesis. *J. Reticuloendothel. Soc.* 33: 207-220, 1983.

20. Carr I.: The macrophage: A review of ultrastructural and function - Academic Press London, 1973 str. 1-52, 99-102.
21. Chandler D.B., Fulmer J.D.: Prostaglandin synthesis and release by subpopulations of rat alveolar macrophages. *J. Immunol.*, 139: 893-898 1987.
22. Chang T.K.H., Waxman D.J.: Cyclophosphamide modulates rat hepatic cytochrome P450 2C11 and steroid 5  $\alpha$ -reductase activity and messenger RNA levels through the combined action of acrolein and phosphoramidate mustard. *Cancer Res.* 53: 2490-2497, 1993.
23. Chen-Kiang S., Hsu W., Natkunam Y., Zhang X.: Nuclear signaling by interleukin-6. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 124-128, 1993.
24. Chouaib S., Branellec D., Buurman W.A.: More insights into the complex physiology of TNF. *Immunol. Today* 12. 5: 141-142, 1991.
25. Corradin S.B., Buchmuller-Rouiller Y., Smith J., Suardet L., Muel J.: Transforming growth factor  $\beta$ 1 regulation of macrophage activation depends on the triggering stimulus. *J. Leukoc. Biol.* 54: 423-429, 1993.
26. Corradin S.B., Muel J., Gallay P., Heumann D., Ulevitch R.J., Tobias P.S.: Enhancement of murine macrophage binding of and response to bacterial lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein. *J. Leukoc. Biol.* 52: 363-368, 1992.
27. Cowens J.W., Ozer H., Ehrke M.J., Greco W.R., Colvin M., Mihich E.: Inhibition of the development of suppressor cells in culture by 4-hydroperoxycyclophosphamide. *J. Immunol.* 132: 95-100, 1984.
28. Ding A.H., Nathan C.F., Stuehr D.J.: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparing of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141: 2407-2412, 1988.
29. Ding L., Linsley P.S., Huang L.Y., Germain R.N., Shevach E.M.: IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J. Immunol.* 151: 1224-1234, 1993.
30. Dinner U.E., Sinha A.A., Vercidis R., Lee K.C., Diener E.: Role of

- macrophages in B cell tolerance. *Cell. Immunol.* 97: 80-90, 1986.
31. Doyle A. G., Herbein G., Montaner L.J., Minty A.J., Caput D., Ferrara P., Gordon S.: Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon  $\gamma$ . *Eur. J. Immunol.* 24: 1441-1445, 1994.
  32. Drapier J.C., Hirling H., Wietzerbin J., Kaldy P., Kühn L.C.: Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *EMBO J.* 12, 9: 3643-3649, 1993.
  33. Dunne D.W., Resnick D., Greenberg J., Krieger., Joiner K.A.: The type I macrophage scavenger receptor binds to Gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1863-1867, 1994.
  34. Elmers C.A., Bergstresser P., Tigelaar E., Wood P.J., Streilein J.W.: Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low dose ultraviolet radiation. *J. Exp. Med.* 158: 781-794, 1983.
  35. Evans R., Kamdar S.J., Duffy T.M., Fuller J.: Sinergistic interaction of bacterial lipopolisaccharide and the monocyte-macrophage produced cytokine bioactivity. *J. Leukoc. Biol.* 51: 93-96, 1992.
  36. Fahmi H., Chaby R.: Selective reactivity of macrophages to endotoxin-induced production of tumor necrosis factor, elicited by an autocrine mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 53: 45-52, 1993.
  37. Falk L.A., Wahl L.M., Vogel S.N.: Analysis of Ia antigen in macrophages derived from bone marrow cells cultured in GM-CSF or MCSF. *J. Immunol.* 140: 2652-2660, 1988.
  38. Falk L.A., Hogan M.M., Vogel S.N.: Bone marrow progenitors cultured in the presence of GM-CSF versus MCSF differentiate into macrophages with distinct tumoricidal capacities. *J. Leukoc. Biol.* 43: 471-476, 1988.
  39. Falk L.A., Vogel S.N.: Differential production of IFN- $\alpha/\beta$  by CSF-1- and GM-CSF-derived macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 48: 43-49 1990.
  40. Ferguson T.A., Dube P., Griffith T.S.: Regulation of contact hypersensitivity by IL-10. *J. Exp. Med.* 179: 1594-1604, 1994.

41. Fontana A., Costam D.B., Frei K., Malipiero U., Pfister H.W.: Modulation of the immune response by TGF- $\beta$ . *Int. Arch. Allergy Immunol.* 99: 1-7, 1992.
42. Gaad S.J., Eher R., Majdic O. Knapp W.: Signal transduction via FcR and Mac-1  $\alpha$ -chain in monocytes and polimorfonuclear leukocytes. *Immunology* 81: 611-617, 1994.
43. Gajewski T.F., Joyce J., Fitch F.W.: Antiproliferative effect of IFN- $\gamma$  in immune regulation. Differential selection of Th1 and Th2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 143: 15-22, 1989.
44. Gardner D.E., Graham J. A., Miller F. J., Illing J.W., Coffin D.L.: Technique for differentiating particles that are cell-associated or ingested by macrophages. *Appl. Microbiol.* 25: 471-475, 1973.
45. Gardner R., Malick A.P., Yurochko A.D., Elgert K.D.: Shift in macrophage (M $\phi$ ) surface phenotypes during tumor growth: association of Mac-2<sup>+</sup> and Mac-3<sup>+</sup> M $\phi$  with Immunosuppressive activity. *Cell. Immunol.* 108: 225-268, 1987.
46. Gautam S., Battisto J. Major J.a., Armstrong D., Stoler M., Hamilton T.A.: Chemokine expression in trinitrochlorobenzene - mediated contact hypersensitivity. *J. Leukoc. Biol.* 55: 452-460, 1994.
47. Germain R.N.: MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 74: 287-299, 1994.
48. Gosselin D., Turcotte R., Lemieux S.: Cyclophosphamide treatment antagonizes the in vitro development of Mycobacterium lepraemurium - induced suppressor cell precursors. *Clin. Exp. Immunol.* 89: 185-191, 1992.
49. Gradehandt G., Rude E., Milbradt S.: Loading of antigenic peptides to MHC class II-heterodimers and to a complex with a higher molecular mass could be primary detected in macrophage lysosomes.-  
streszczenie refrefatu nr W27-46 z 12-go Europejskiego Zjazdu Immunologicznego 14-17.06.1994.
50. Gutterman J.U.: Cytokine therapeutics: Lessons from interferon  $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1198-1205, 1994.

51. Hausman P.B., Kawasaki H., O'Hara R.M.Jr., Minami M., Sherr D.H., Dorf M.: The role of accessory cells in the generation of effector suppressor T cells. *J. Immunol.* 137: 3717-3725, 1986.
52. Hemminki K.: Binding of metabolites of cyclophosphamide to DNA in rat liver microsomal system and in vivo in mice. *Cancer Res.* 45: 4237-4243, 1985.
53. Herscovitz H.B., Holden H.T., Bellanti J.A., Ghaffar A.: *Manual of Macrophage Methodology - Collection, Characterization and Function.* Marcel Dekker INC. New York & Basel, 1981 str. 63-68, 93-96, 98-102, 208-227.
54. Hilburger E.M., Zwilling B.S.: Antigen presentation by macrophages from bacille Calmette - Guerin (BCG)-resistant and -susceptible mice. *Clin. Exp. Immunol.* 96: 225-229, 1994.
55. Hsieh C.S., Macatonia S.E., Tripp C.S., Wolf S.F., O'Garra A., Murphy K.M.: Development of Th1 CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12 produced by Listeria - induced macrophages. *Science* 260: 547-549, 1993.
56. Hubbard N.E., Lim D., Sommers S.D., Erickson K.L.: Effects of in vitro exposure to arachidonic acid on TNF- $\alpha$  production by murine peritoneal macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 54: 105-110, 1993.
57. Hume D.A., Robinson A.P., Macpherson G.G., Gordon S.: The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs. *J. Exp. Med.* 158: 1522-1536, 1983.
58. Inamura N., Sone S., Okubo A., Singh S.M., Ogura T.: Heterogeneity in responses of human blood monocytes to GM-CSF. *J. Leukoc. Biol.* 47: 528-534, 1990.
59. Ishikura H., Jayaraman S., Kuchroo V., Diamond B., Saito S., Dorf M.E.: Functional analysis of cloned macrophage hybridomas. Modulation of suppressor T cell - inducing activity. *J. Immunol.* 143: 414-419, 1989.

60. Jacobsen S.E.W., Okkenhaug C., Veiby O.P., Caput D., Ferrara P., Minty A.: IL-13: novel role in direct regulation of proliferation and differentiation of primitive hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 180: 75-82, 1994.
61. James S.L., Nacy C.: Effector function of activated macrophages against parasites. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 518-523, 1993.
62. Jansen J.H., Kluin-Nelemans J.C., Van Damme J., Wientjens G.J.H.M., Willemze R., Fibbe W.E.: Interleukin 6 is a permissive factor for monocytic colony formation by human hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 175: 1151-1154, 1992.
63. Jayaraman S., Martin C., Dorf M.E.: Enhancement of in vivo cell - mediated immune responses by three distinct cytokines. *J. Immunol.* 144: 942-951, 1990.
64. Jayaraman S., Mensi N., Webb D.R., Dorf M.E.: Involvement of protein kinase c in competence induction of macrophages to generate T suppressor cells. *J. Immunol.* 146: 4085-4091, 1991.
65. Jenkins M.K., Johnson J.G.: Molecules involved in T-cell costimulation. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 361-367, 1993.
66. John H.A., Daene D., Haig D.: Generation of an bone marrow - derived myelomonocyte - like cell line by retroviral - mediated transformation. Immunological characterization and the effect of cytokines and lipopolisaccharides. *J. Leukoc. Biol.* 55: 785-792, 1994.
67. Johnston R.B.Jr.: Monocytes and macrophages. *N. Engl. J. Med.* 318: 747-752, 1988.
68. Kamijo R., Shapiro D., Le J., Huang S., Aguet M., Vilcek J.: Generation of nitric oxide and induction of major histocompatibility complex class II antigen in macrophages from mice lacking the interfefon  $\gamma$  receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6626-6630, 1993.
69. Kasahara K., Strieter R.M., Standiford T.J., Kunkel S.L.: Adherence in combination with lipopolisaccharide, TNF or IL-1 $\beta$  potentiates the induction of monocyte - derived IL-8. *Pathobiology* 61: 57-66, 1993.

70. Kawabata T., White K.L.Jr.: Enhancement of in vivo and in vitro murine immune responses by the cyclophosphamide metabolite acrolein. *Cancer Res.* 48: 41-45, 1988.
71. Kawasaki H., Martin K., Uchida T., Usui M., Noma T., Minami M., Dorf M.E.: Functional analysis of cloned macrophage hybridomas. Induction of suppressor T cell responses. *J. Immunol.* 137: 2145-2151, 1986.
72. Kawasaki H., Zupko K., Diamond B., Minami M., Dorf M.E.: Antibody inhibition of suppressor cell induction. *J. Immunol.* 138: 2063-2068, 1987.
73. Keller R., Keist R., Erb P., Aebischer T., De Libero G., Balzer M., Groskurth P., Keller H.U.: Expression of cellular effector functions and production of reactive nitrogen intermediates: a comparative study including T lymphocytes, T-like cells, neutrophil granulocytes, and mononuclear phagocytes. *Cell. Immunol.* 131: 398-403, 1990.
74. Khansari N., Chou Y.K., Fudenberg H.H.: Human monocyte heterogeneity: interleukin 1 and prostaglandin E<sub>2</sub> production by separate subsets. *Eur. J. Immunol.* 15: 48-51, 1985.
75. Kimball E.S., Schneider C.R., Fisher M.C., Clark M.C.: Levamisole causes differential cytokine expression by elicited mouse macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 52: 349-356, 1992.
76. Kindler V., Sappino A.P., Grau G.E., Piguet P.F., Vassalli P.: The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 56: 731-740, 1989.
77. Kishimoto T., Akira S., Taga T.: Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 258: 593-597, 1992.
78. Knight S.C., Stagg A.J.: Antigen-presenting cell types. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 374-382, 1993.
79. Kohase M., Henriksen - de Stefano D., May L.T. Vilcek J. Sehgal P.B.: Induction of  $\beta$ 2-IFN by TNF: a homeostatic mechanism in control of cell proliferation. *Cell* 45: 569-666, 1986.
80. Kraal.G., Breel M., Janse M., Bruin G.: Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal

- antibody. J. Exp. Med. 163: 981-997, 1986.
81. Kraj P.: Zastosowanie cytofluorymetrii przepływowej w badaniach immunologicznych. Polish J. Immunol. 16: 91-112, 1991.
  82. Kuchroo V.K., Minami M., Diamond B., Dorf M.: Functional analysis of cloned macrophage hybridomas. Differential ability to induce immunity or suppression. J. Immunol. 141: 10-16, 1988.
  83. Langermans J.A.M., Mayanski D.M., Nibbering P.H., Van der Hulst M.E.B., Van de Gevel, Van Furth R.: Effect of IFN $\gamma$  and endogenous TNF on the histopathological changes in the liver of *Listeria monocytogenes* infected mice. Immunology 81: 192-197, 1994.
  84. Lechler R.I., Norcross M.A., Germain R.W.: Qualitative and quantitative studies of antigen-presenting cell function by using I-A-expressing L cells. J. Immunol. 135: 2914-2922, 1985.
  85. Lee K.C., Shiozawa C., Shaw A., Diener E.: Requirement for accessory cells in the antibody response to T cell - independent antigen in vitro. Eur. J. Immunol. 6: 63-68, 1976.
  86. Lee K.H., Wilkinson A., Wong M.: Antigen - specific murine T-cells proliferation: role of macrophage surface Ia and factors. Cell. Immunol. 48: 79-90, 1979.
  87. Lee K.H., Wong M., McIntyre D.: Characterization of macrophage subpopulations responsive to activation by endotoxin and lymphokines. J. Immunol. 126: 2474-2479, 1981.
  88. Leenen P.J.M., Melis M., Slieker W.A.T., Van Ewijk W.: Murine macrophage precursor characterization. Monoclonal, antibodies against macrophage precursor antigens. Eur. J. Immunol. 20: 27-34, 1990.
  89. Leenen P.J.M., de Bruijn M.F.T.R., Voerman J.S.A., Campbell P.A., van Ewijk W.: Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. J. Immunol. Meth. 174: 5-19, 1994.
  90. Liao G., Simon S.R.: Temporal down-regulation of Fc $\gamma$ R III expression and Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis in human monocyte-derived macrophages induced by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . J. Leukoc. Biol. 55: 702-710, 1994.



91. Libert C., Takahashi N., Cauwels A., Brouckaert P., Bluethmann H., Fiers W.: Response of interleukin-6-deficient mice to tumor necrosis factor-induced metabolic changes and lethality. *Eur. J. Immunol.* 24: 2237-2242, 1994.
92. Limpens J., van Meijer M., van Santen H.M., Germeraad W.T.V., Hoeben-Schornagel K., Breel M., Scheper R.J., Kraal G.: Alterations in dendritic cell phenotype and function associated with immunoenhancing effects of a subcutaneously administered cyclophosphamide derivative. *Immunology* 73: 255-263, 1991.
93. Lindmark A., Gullbedrg U., Olsson I.: Processing and intracellular transport of cathepsin G and neutrophil elastase in leukemic myeloid cell line U-937 - modulation by brefeldin A ammonium chloride, and monensin. *J. Leukoc. Biol.* 55: 50-57, 1994.
94. Lynch H.D., Gurish M.F., Daynes R.A.: Relationship between epidermal langerhans cell density ATP-ase activity and induction of contact hypersensitivity. *J. Immunol.* 126: 1892-1897, 1981.
95. Madison D.V.: Pass the nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4329-4331, 1993.
96. Malorny U., Michels E., Sorg C.: A monoclonal antibody against an antigen present on mouse macrophages and absent from monocytes. *Cell. Tissue Res.* 243: 421-428, 1986.
97. Marcinkiewicz J.: Cell mediated immunity: role of IL-3 and IL-6 in the regulation of the contact sensitivity reaction. *Folia Histochem. Cytobiol.* 28: 107-120, 1990.
98. Marcinkiewicz J.: In vivo cytokine release by activated murine peritoneal macrophages: role of prostaglandins in the differential regulation of TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6. *Cytokine* 3: 327-332, 1991.
99. Marcinkiewicz J., Chain B.M.: Differential regulation of cytokine production by nitric oxide. *Immunology* 80: 146-159, 1993.
100. Marcinkiewicz J., Bryniarski K., Ptak W.: Cyclophosphamide uncovers two separate macrophage subpopulations with opposite immunogenic potential and different patterns of monokine production. *Cytokine* 6: 472-477, 1994.

101. Marinello A., Bansal K.S., Paul B., Koser P.L., Love J. Struck F.R., Gurtoo H.L.: Metabolism and binding of cyclophosphamide and its metabolite acrolein to rat hepatic microsomal cytochrome P-450. *Cancer Res.* 44: 4615-4621, 1984.
102. Martin C.A., Dorf M.E.: Differential regulation of IL-6, MIP-1 and JE/MCP-1 cytokine expression in macrophage cell lines. *Cell. Immunol.* 135: 245-258, 1991.
103. Martin S., Weltzien H.U.: T cell recognition of haptens, a molecular view. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 104: 10-16, 1994.
104. Matsushima G.K., Gilmore W., Casteel N., Frelinger J.A., Stohlman S.A.: Evidence for subpopulation of antigen - presenting cells specific for the induction of the delayed - type hypersensitivity response. *Cell. Immunol.* 119: 171-181, 1989.
105. McCatney-Francis N.L., Wahl S.M.: Transforming growth factor: a matter of life and death. *J. Leukoc. Biol.* 55: 401-409, 1994.
106. McIntosh J.K., Jablons D.M., Mule J.J., Nordan R.P., Rudikoff S., Lotze M.T., Rosenberg S.A.: In vivo induction of IL-6 by administration of exogenous cytokines and detection of de novo serum levels of IL-6 in tumor-bearing mice. *J. Immunol.* 143: 162-167, 1989.
107. McIntyre J., Rowley D., Jenkin C.R.: The functional heterogeneity of macrophages at the single cell level. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 45: 675-680, 1967.
108. McKnight A.J., Shea C.M., Wiens G.R., Rimm I.J., Abbas A.K.: Differentiation of  $V\beta 8.2^+$   $CD4^+$  T cells induced by superantigen: roles of antigen - presenting cells and cytokines. *Immunology* 81: 513-520, 1994.
109. van der Meer : Characteristic of mononuclear phagocytes in culture. The reticuloendothelial system - vol. I. Ian Carr & W.T. Daems, Plenum Publishing Corporation, 1980 str. 735-771.
110. Mills C.D.: Molecular basis of suppressor macrophages. Arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway. *J. Immunol.* 146: 2719-2723, 1991.

111. Mishell B.B., Shiigi S.M.: Selected Methods in Cellular Immunology. W.H. Freeman & Company, San Francisco, 1980 str. 219-224.
112. Montfort I., Tamayo R.P.,: Two antigenically types of macrophages (38862). Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 138: 204-207, 1971.
113. Moore J.M.: Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. Clin. Pharmacokinet. 20: 194-208, 1991.
114. Moreb J., Zucali J.R., Zhang Y., Colvin M.O., Gross M.A.: Role of aldehyde dehydrogenase in the protection of hematopoietic progenitor cells from 4-hydroperoxycyclophosphamide by IL-1 $\beta$  and TNF. Cancer Res. 52: 1770-1774, 1992.
115. Morikawa Y., Furotani M., Kuribayashi K., Matsuura N., Kakuda K.: The role of antigen-presenting cells in the regulation of delayed-type hypersensitivity. Immunology 77: 81-87, 1992.
116. Morioka Y., Naito M., Sato T., Takahashi K.: Immunophenotypic and ultrastructural heterogeneity of macrophage differentiation in bone marrow and fetal hematopoiesis of mouse in vitro and in vivo. J. Leukoc. Biol. 55: 642-651, 1994.
117. Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1984.
118. Mosmann T., Sad S.: Immune regulation of different T cell subsets by cytokines. J. Leukoc. Biol. - Supplement 33-139 abstr. 634, 1993.
119. Murphy D.B.: T cell mediated immunosuppression. Curr. Opin. Immunol. 5: 411-417, 1993.
120. Nakano Y.: Nonspecific regulatory mechanism of contact sensitivity: nonspecific suppressor factor (NSF)-treated intermediate cells produce a second nonspecific suppressor (NSF int.) (abstr.). Cell. Immunol. 143: 357-367, 1992.
121. Nakano Y., Hori S., Ihara M.: Nonspecific regulatory mechanism of contact sensitivity: nonspecific suppressor factor suppresses the antigen - presenting activity of dendritic cells to induce contact sensitivity. Cell. Immunol. 158: 228-240, 1994.
122. Neefjes J.J., Momburg F.: Cell biology of antigen presentation. Curr. Opin. Immunol. 5: 27-34, 1993.

123. Nelson B.J., Danielpour D., Rossio J.F., Turpin J., Nacy C.A.: Interleukin-2 suppress activated macrophage intercellular killing by inducing macrophages to secrete TGF- $\beta$ . *J. Leukoc. Biol.* 55: 81-90, 1994.
124. Noma T., Usui M., Dorf M.E.: Characterization of the accessory cells involved in suppressor T cell induction. *J. Immunol.* 134: 1374-1380, 1985.
125. van Noort J.M., Jacobs J.M.: Cathepsin D, but not cathepsin B, releases T cell stimulatory fragments from lysosome that are functional in the context of multiple murine class II MHC molecules. *Eur. J. Immunol.* 24: 2175-2180, 1994.
126. Nussler A.K., Billiar T.B.: Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukoc. Biol.* 54: 171-178, 1993.
127. Piguet P.F., Grau G.E., Hauser C., Vassalli P.: Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten - induced irritant and contact hypersensitivity reaction. *J. Exp. Med.* 173: 673-679, 1991.
128. Plasman N., Vray B.: Functional and receptor characterization of mouse peritoneal macrophages. & Trypanosoma infection of different macrophage fractions isolated on Percoll gradient. (abstr.) *Pathobiology* 60 (suppl 1): 28, 1992.
129. Politis A.D., Sivo J., Vogel S.N.: Multiple pathways of interferon - induced gene expression in murine macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 53: 583-590, 1993.
130. Proietti E., Tritarelli E., Gabrielle L., Testa U., Greco G., Pelosi E., Gabbianelli M., Belardelli F., Peschle C.: Combined interleukin 1 $\beta$  / interleukin 2 treatment in mice: synergistic myelostimulatory activity and protection against cyclophosphamide - induced myelosuppression. *Cancer Res.* 53: 569-576, 1993.
131. Ptak W., Różycka D., Askenase P.W., Gershon R.K.: Role of antigen - presenting cells in the development and persistence of contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 151: 362-735, 1980.
132. Ptak W., Bereta M., Ptak M., Iverson G.M., Green D.R.: Suppression and contrasuppression in the induction of contact sensitivity by the administration of cellbound antigen - antibody complexes. *J.*

- Immunol. 135: 2312-2318, 1985.
133. Ptak W., Ptak M., Gryglewski A.: Preferential induction of antigen - specific contrasuppressor T lymphocytes by trinitrophenyl (TNP) - substituted Langerhans cells. *Scand. J. Immunol.* 23: 555-560, 1986.
  134. Renz H., Gong J.H., Schmidt A., Nain M., Gemsa D.: Release of TNF- $\alpha$  from macrophages. Enhancement and suppression are dose - dependently regulated by prostaglandin E<sub>2</sub> and cyclic nucleotides. *J. Immunol.* 141: 2388-2393, 1988.
  135. Ress D.D., Balmer R.M.J., Schultz R., Hodson H.F., Moncada S.: Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 101: 746-752, 1990.
  136. Riedy M.C., Steward C.C.: Inhibitory role of interleukin-6 in macrophage proliferation. *J. Leukoc. Biol.* 52: 125-127, 1992.
  137. Riedy M.C., Steward C.C.: The requirement for a fetal bovine serum component and the inhibitory role of IL-6 on macrophage proliferation. *Proceedings* 33: 304 (1814), 1992.
  138. Riese J., Hoff T., Nordhoff A., DeWitt D.L., Resch K., Kaeber V.: Transient expression of prostaglandin endoperoxidase synthase-2 during mouse macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 55: 476-482, 1994.
  139. Rojas-Espinosa O.: Macrophages, Myeloperoxidase, and *Mycobacterium lepraemurium*. *J. Leukoc. Biol.* 43: 468-470, 1988.
  140. Rowley S.D., Brashem-Stein C., Andrews R., Bernstein I.D.: Hematopoietic precursors resistant to treatment with 4-hydroperoxy -cyclophosphamide: requirement for an interaction with marrow stroma in addition to hematopoietic growth factors for maximal generation of colony-forming activity. *Blood* 82: 60-65, 1993.
  141. Rutherford M.S., Witsell A., Schook L.B.: Mechanism generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited. *J. Leukoc. Biol.* 53: 602-618, 1993.
  142. Sato H., Fujiwara M., Bannai S.: Effect of lipopolysaccharide on transport and metabolism of arginine in mouse peritoneal macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 52: 161-164, 1992.
  143. Sato S., Hughes R.C.: Control of Mac-2 surface expression on murine macrophage cell lines. *Eur. J. Immunol.* 24: 216-221, 1994.

144. Scales W.E., Chensue S.W., Kunkel S.L.: Interleukin-6 expression in immunologically elicited murine macrophages. *Pathobiology* 60: 289-296, 1992.
145. Schall T.J., Bacon K., Toy K.J., Goeddel D.V.: Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347: 669-671, 1990.
146. Scott P.: Selective differentiation of CD4<sup>+</sup> T helper cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 391-397, 1993.
147. Serio C., Gandour D.M., Walker W.: Macrophage functional heterogeneity: evidence for different antibody-dependent effector cell activities and expression of Fc receptors among macrophage subpopulations. *J. Reticuloendothel. Soc.* 25: 197-206, 1979.
148. Shearer G.: Cell - mediated cytotoxicity to trinitrophenyl - modified syngeneic lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 4: 527-533, 1974.
149. Shimizu T., Streilein J.W.: Local and systemic consequences of acute, low-dose ultraviolet B radiation are mediated by different immune regulatory mechanisms. *Eur. J. Immunol.* 24: 1765-1770, 1994.
150. Silva C.L., Lowrie D.B.: A single mycobacterial protein (hsp 65) expressed by a transgenic antigen-presenting cell vaccinates mice against tuberculosis. *Immunology* 82: 244-248, 1994.
151. Stadecker M.J., Villanueva P.O.F.: Accessory cell signals regulate Th-cell responses: from basic immunology to a model of helminthic disease. *Immunol. Today* 15: 571-574, 1994.
152. Stein M., Gordon S.: Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. *Eur. J. Immunol.* 21: 431-437, 1991.
153. Stein M., Keshav S., Harris N., Grodon S.: IL-4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176: 287-292, 1992.
154. van Steventer G.A., Shimizu Y., Shaw S.: Role of multiple accessory molecules in T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 294-303, 1991.
155. Stout R.D.: Macrophage activation by T cells: cognate and non-cognate

- signals. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 398-403, 1993.
156. Summersgill J.T., Powell L.A., Buster B.L., Miller R.D., Ramirez J.A.: Killing of *Legionella pneumophila* by nitric oxide in  $\gamma$ -IFN - activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 52: 625-629, 1992.
  157. Szabo G., Miller-Graziano C.L., Wu J.Y., Takayama T., Kodys K.: Differential TNF production by human monocyte subset. *J. Leukoc. Biol.* 47: 206-216, 1990.
  158. Szczepanik M., Bryniarski K., Pryjma J., Ptak W.: Distinct populations of of antigen-presenting macrophages are required for induction of effector and regulatory cells in contact sensitivity response in mice. *J. Leukoc. Biol.* 53: 320-326, 1993.
  159. Tanaka Y., Adams D.H., Hubscher S., Hirano H., Siebenlist U., Shaw S.: T-cell adhesion induced by proteoglykan - immobilized cytokine MIP-1 $\beta$ . *Nature* 361: 79-82, 1993.
  160. Taschibana K., Chen G., Hang D.S., Scuderi P., Watson R.R.: Production of TNF- $\alpha$  by resident and activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 51: 251-255, 1992.
  161. Toews G.B., Bergstresser P.R., Streilein J.Y.: Epidermal langerhans cells density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J. Immunol.* 124: 445-453, 1980.
  162. Tzeheval E., De Baetselier P., Feldman M., Segal S: The peritoneal antigen - presenting macrophage: control and immunogenic properties of distinct subpopulations. *Eur. J. Immunol.* 11: 323-328, 1981.
  163. Uchida T., Ju S.T., Fay A., Liu Y.N., Dorf M.E.: Functional analysis of macrophage hybridomas. Production and initial characterization. *J. Immunol.* 134: 772-778, 1985.
  164. Urban J.L., Shepard H.M., Rothstein J.L., Sugarman B.J., Schreiber H.: TNF: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 5233-5237, 1986.
  165. Vink A., Uyttenhove C., Wauters P., Van Sinck J.: Accessory factors involved in the murine T cell activation. Distinct roles of IL-6, IL-1 and TNF. *Eur. J. Immunol.* 20: 1-6, 1990.

166. de Waal Malefyt R., Haanen J., Spits H., Roncarolo M.G., te Welde A., Figdor C., Johnson K., Kastelein R., Yssel H., de Vries J.E.: IL-10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* 174: 915-924, 1991.
167. Walker E.B., Akporiaye E.T., Warner N.L., Stewart C.C.: Characterization of subset of bone-derived macrophages by flow cytometry analysis. *J. Leukoc. Biol.* 37: 121-136, 1985.
168. Walker W.S.: Functional heterogeneity of macrophages: subclasses of peritoneal macrophages with different antigen-binding activities and immune complex receptors. *Immunology* 26: 1025-1037, 1974.
169. Wallace P.K., Howell A.L., Fanger M.W.: Role of Fc receptors in cancer and infectious disease. *J. Leukoc. Biol.* 55: 816-826, 1994.
170. Wallis R.S., Ellner J.J.: Cytokines and tuberculosis. *J. Leukoc. Biol.* 55: 676-681, 1994.
171. Wang S.Y., Mak K.L., Chen L.Y., Chou M.P., Ho C.K.: Heterogeneity of human blood monocyte: two subpopulations with different size, phenotypes and functions. *Immunology* 77: 298-303, 1992.
172. Watanabe S., Onozaki K., Yamamoto S., Okuyama H.: Regulation by dietary essential fatty acid balance of TNF production in mouse macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 53: 151-156, 1993.
173. Weaver C.T., Hawrylowicz C.M., Unanue E.R.: T helper cell subsets require the expression of distinct costimulatory signals by antigen - presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8181-8185, 1988.
174. Weaver C.T., Unanue E.R.: The costimulatory function of antigen - presenting cells. *Immunol. Today* 11: 49-54, 1990.
175. Weinberg D.S., Fishman M., Veit B.C.: Functional heterogeneity among peritoneal macrophages. Effector cell activity of macrophages against syngeneic and xenogeneic tumor cells. *Cell. Immunol.* 38: 94-104, 1978.
176. Witsell A.L., Schook L.B.: Macrophage heterogeneity occurs through a developmental mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1963-1967, 1991.



177. Witsell A.L., Schook L.B.: TNF- $\alpha$  is an autocrine growth regulator during macrophage differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4754-4758, 1992.
178. Wong G.G., Witek-Giannotti J.S., Temple P.A., Kriz R., Ferenz C., Hewick R.M., Clark S.C., Ikebuchi K., Ogawa M.: Stimulation of murine hematopoietic colony formation by human IL-6. J. Immunol. 140: 3040-3044, 1988.
179. Yonish-Rouach E., Restnitzky D., Lotem J. Sachs L., Kimchi A., Oren M.: Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by IL-6. Nature 352: 345-347, 1991.
180. Yoshikawa T., Kurimoto I, Streilein J.W.: TNF- $\alpha$  mediates ultraviolet light B-enhanced expression of contact hypersensitivity. Immunology 76: 264-271, 1992.
181. Yu S.F., Koerner T.J., Adams D.O.: Gene regulation in macrophage activation: differential regulation of genes encoding for TNF, IL-1, JE, and KC by IFN- $\gamma$  and LPS. J. Leukoc. Biol. 48: 412-419, 1990.
182. Zembala M., Asherson G.L.: T cell suppression of contact sensitivity in the mouse. The role of soluble suppressor factor and its interaction with macrophages. Eur. J. Immunol. 4: 799-804, 1974.
183. Zhang Y., Broser M., Rom W.N.: Activation of the IL-6 gene by mycobacterium tuberculosis or lipopolisaccharide is mediated by nuclear factors NF-IL6 and NF- $\kappa$ B. Proc. Natl. Acad. Sci USA 91: 2225-2229, 1994.

