

COLLEGIUM MEDICUM UNIwersYTETU JAGIELLOŃSKIEGO

W KRAKOWIE

Maciej Siedlar

**MECHANIZMY MOLEKULARNE INTERAKCJI
MONOCYTÓW CZŁOWIEKA Z KOMÓRKAMI
NOWOTWOROWYMI: INDUKCJA CZYNNIKÓW
CYTOTOKSYCZNYCH - CZYNNIKA
MARTWICY NOWOTWORÓW ALFA
I TLENKU AZOTU**

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Marek Zembala

Praca wykonana
w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Mikrobiologii
Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
w Krakowie
Kierownik: Prof. dr hab. med. Marek Zembala

Kraków 1994

Bibl. Medyczna CM UJ



1816095370

Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania

Panu Profesorowi dr hab. Markowi Zembali za jego olbrzymi wkład wniesiony w przygotowanie tej pracy oraz za zarażenie mnie swoim entuzjazmem do badań nad układem odpornościowym człowieka,

Panu Docentowi dr hab. Januszowi Marcinkiewiczowi za wprowadzenie mnie w tematykę badań nad tlenkiem azotu,

Panu dr Jerzemu Więckiewiczowi za naukę technik biologii molekularnej,

Panu Profesorowi dr hab. Tadeuszowi Popieli, dr Antoniemu Czuprynie i dr Antoniemu Szczepanikowi za pomoc w zbieraniu materiału klinicznego.

Praca ta nie powstałaby w niniejszej formie gdyby nie pomoc i rada moich Koleżanek i Kolegów z Zakładu Immunologii Klinicznej: dr Bożeny Mytar, dr Anny Pituch-Noworolskiej, mgr Marii Wołoszyn, Ireny Ruggiero, Marioli Hyszko, Agnieszki Fryt i mgr Marka Jasińskiego, którym pragnę serdecznie podziękować za przeszło czteroletni okres współpracy.

Najczęściej używane skróty:

ActD	aktinomycyna D
CAM	cząsteczki adhezyjne (z ang. cell adhesion molecules)
HLA	antygeny ludzkich leukocytów (z ang. human leukocyte antigens)
IFN γ	interferon gamma
IL-1,-2	interleukina 1, 2
iNOS	indukowalna syntaza tlenku azotu (z ang. inducible nitric oxide synthase)
L-NMMA	N ^G -monometylo-L-arginina
Leu-OMe	czynnik lizosomotropowy (ang. L-leucine methyl ester)
LPS	lipopolisacharyd
MHC	główny układ antygenów zgodności tkankowej (z ang. major histocompatibility complex)
MMC	mitomycyna C
NOS	syntaza tlenku azotu (z ang. nitric oxide synthase)
NO	tlenek azotu (z ang. nitric oxide)
PBMC	komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (z ang. peripheral blood mononuclear cells)
PMA	octan mirystyloforbolu (z ang. phorbol myristate acetate)
TIM	makrofagi naciekające nowotwór (z ang. tumour infiltrating macrophages)
TNF α	czynnik martwicy nowotworów alfa (z ang. tumour necrosis factor alpha)

Spis treści:

1.	<i>Wstęp</i>	1
1.1.	Makrofagi naciekające nowotwór.....	1
1.2.	Cząsteczki adhezyjne.....	6
1.2.1.	Integryny.....	6
1.2.1.1.	Podrodzina $\beta 1$ integryn.....	8
1.2.1.2.	Podrodzina $\beta 2$ integryn.....	8
1.2.1.3.	Podrodzina $\beta 3$ integryn.....	10
1.2.2.	Nadrodzina immunoglobulin.....	11
1.2.3.	Cząsteczka CD44.....	12
1.2.4.	Kaderyny.....	13
1.2.5.	Cząsteczki adhezyjne a nowotwór.....	14
1.3.	Rola antygenów zgodności tkankowej w przekazywaniu sygnału aktywującego monocyt.....	15
1.4.	Czynnik martwicy nowotworów alfa i tlenek azotu jako czynniki cytotoksyczne.....	16
1.4.1.	Czynnik martwicy nowotworów alfa.....	17
1.4.2.	Tlenek azotu.....	20
1.5.	Podsumowanie.....	24
2.	<i>Cel i założenia pracy</i>	26
3.	<i>Materiał i metody</i>	28
3.1.	Izolacja monocytów i limfocytów T.....	28
3.2.	Izolacja makrofagów mysich.....	29
3.3.	Izolacja komórek nowotworowych.....	29
3.4.	Hodowle komórkowe.....	30
3.5.	Hodowla monocytów z komórkami nowotworowymi w celu określenia produkcji TNF α	30
3.6.	Hodowla monocytów lub mysich makrofagów z komórkami nowotworowymi w celu określenia produkcji tlenu azotu (NO).....	31
3.7.	Przeciwciała monoklonalne i analiza cytofluorymetryczna (FACS).....	31
3.8.	Blokowanie przeciwciałami monoklonalnymi interakcji: monocyt-komórka nowotworowa.....	32
3.9.	Określenie poziomu TNF α w badanych nadsączach z hodowli komórkowych.....	32
3.10.	Określenie poziomu tlenu azotu w nadsączach.....	33
3.11.	Hamowanie syntezy tlenu azotu.....	33
3.12.	Hamowanie syntezy białek w monocytach.....	34
3.13.	Selektywna inaktywacja monocytów.....	34
3.14.	Przygotowanie sondy cDNA dla TNF α i hybrydyzacja <i>in situ</i>	34
3.15.	Immunoenzymatyczne wywołanie reakcji z sulfonowaną sondą.....	36
3.16.	Analiza statystyczna.....	36

4.	<i>Wyniki</i>	37
4.1.	Stymulacja monocytów do wydzielania TNF α	37
4.2.	Indukcja ekspresji genu dla TNF α w monocytach stymulowanych komórkami nowotworowymi.....	38
4.3.	Indukcja wydzielania tlenku azotu (NO) przez monocyty po stymulacji komórkami nowotworowymi.....	39
4.4.	IFN γ nie posiada zdolności do preaktywacji monocytów do wydzielania tlenku azotu.....	39
4.5.	Stymulacja monocytów różnymi komórkami nowotworowymi do wydzielania tlenku azotu.....	40
4.6.	Wpływ N ^G -monometylo-L-argininy na syntezę tlenku azotu w monocytach stymulowanych komórkami linii DeTa.....	41
4.7.	Brak zależności produkcji tlenku azotu w hodowli monocytów z komórkami DeTa od proliferacji komórek nowotworowych.....	42
4.8.	Wpływ czynnika lizosomotropowego i blokera syntezy białek na syntezę tlenku azotu w hodowli monocytów z komórkami nowotworowymi.....	42
4.9.	Rola cząsteczek adhezyjnych w interakcjach monocyt-komórka nowotworowa.....	44
	4.9.1. Indukcja produkcji TNF α	45
	4.9.2. Indukcja produkcji tlenku azotu.....	45
4.10.	Rola cząsteczek MHC klasy I i II w stymulacji monocytów komórkami nowotworowymi do produkcji TNF α i NO.....	46
	4.10.1. Produkcja TNF α	47
	4.10.2. Produkcja tlenku azotu.....	48
5.	<i>Dyskusja</i>	49
6.	<i>Wnioski</i>	62
7.	<i>Streszczenie</i>	63
8.	<i>Piśmiennictwo</i>	67

1. Wstęp.

Reakcja gospodarza na rozwijający się nowotwór wyraża się między innymi tworzeniem zapalnych nacieków złożonych z komórek jednojądrzastych. Zarówno limfocyty naciekające nowotwór (tumour infiltrating lymphocytes, TIL) jak i makrofagi naciekające nowotwór (tumour infiltrating macrophages, TIM) odgrywają ważną rolę w odpowiedzi przeciwnowotworowej człowieka. Interakcje pomiędzy komórką nowotworową a komórkami linii monocyt/makrofag są jak do tej pory mało poznane. Makrofagi znajdują się często w dużej liczbie w nacieku otaczającym tkankę nowotworową [Zembala i wsp., 1989]. TIM są źródłem produkowanych miejscowo cytokin, m. in. czynnika martwicy nowotworów (tumour necrosis factor α , TNF α), a także wykazują obecność determinant MHC klasy II [Zembala i wsp., 1989]. Jednakże TIM mogą tracić antygeny MHC klasy II w hodowli *in vitro*, co podkreśla wpływ mikrośrodowiska nowotworu na funkcjonalną aktywność monocytów/makrofagów [Peri i wsp., 1986]. Do chwili obecnej źródło sygnału odpowiedzialnego za indukcję syntezy i wydzielania TNF α przez TIM *in situ* pozostaje nieznane. Ponadto sytuację spotykaną w obrębie nacieku okołonowotworowego komplikuje fakt, że również niektóre komórki nowotworowe są w stanie syntetyzować TNF α [Beissert i wsp., 1989; Naylor i wsp., 1990, 1993], jak również wykazywać ekspresję determinant HLA-DR [Teh i wsp., 1992].

1.1. Makrofagi naciekające nowotwór.

Istnieje wiele wykluczających się poglądów na temat roli TIL oraz TIM w immunopatologii guza nowotworowego. Z jednej strony komórki te są odpowiedzialne za

destrukcję tkanki nowotworowej, a z drugiej mogą promować rozrost guza nowotworowego [Mantovani, 1990]. TIM stanowią zasadniczą komponentę komórkową nacieku okołonowotworowego [Mantovani i wsp., 1986; Mantovani, 1989]. Ich funkcje związane są z toczącymi się w okolicy nowotworu procesami zapalnymi, przebudową tkanki otaczającej nowotwór, zmianami zakrzepowymi w naczyniach krwionośnych drenujących guz nowotworowy, jak i z niszczeniem samych komórek nowotworowych. Obecność monocytów/makrofagów została wykazana w nowotworach jelita grubego [Horny i wsp., 1987], skóry [Broker i wsp., 1988], raku sutka [Horny i wsp., 1986] i innych [Zembala i wsp., 1989].

Różne czynniki mogą wpływać na stopień nacieczenia nowotworu przez TIM. Na podstawie analizy skrawków histologicznych pochodzących z raka jelita grubego stwierdzono, że monocyty/makrofagi są bardziej liczne w późnym stadium raka jelita grubego (stopień C wg. skali Duke'a) w porównaniu z rakiem wczesnym lub zdrową tkanką, ponadto TIM w większym stopniu naciekają nowotwór wykazujący ekspresję cząsteczek MHC klasy II [Allen i wsp., 1987]. Czynniki takie jak stopień unaczynienia nowotworu, ekspresja cząsteczek adhezyjnych na śródbłónkach naczyń lub samych komórkach nowotworowych, czy czynniki chemotaktyczne wydzielane przez komórki nowotworowe mogą także determinować liczbę TIM [Zembala i wsp., 1989; Mantovani, 1990].

Do chwili obecnej większość prób korelacji stopnia nacieczenia nowotworu przez TIM z rokowaniem była oparta na analizie konwencjonalnych skrawków histopatologicznych. Wnioski były często sprzeczne, ponieważ kierowano się niejednolitymi metodami interpretacji, badania dotyczyły wielu rodzajów nowotworów analizowanych w różnych stadiach klinicznych rozwoju choroby, a nacieki zapalne mógł być związany nie tylko z

właściwościami samych komórek nowotworowych ale i np. z współistniejącym zakażeniem. Tak więc publikowane wyniki z jednej strony podkreślają korelację pomiędzy obecnością TIM a korzystnym rokowaniem [Rilke i wsp., 1991], a z drugiej kwestionują związek pomiędzy wielkością nacieku leukocyтарnego a pomyślnym przebiegiem choroby nowotworowej [Van Netten i wsp., 1993a; Rosen i wsp., 1989].

W chorobie nowotworowej obserwowane jest często zjawisko zwiększonej aktywności funkcjonalnej monocytów, co może sugerować fakt uprzedniej ich aktywacji przez komórki rozwijającego się nowotworu [Zembala i wsp., 1989]. Tylko nieznaczna liczba makrofagów pochodzących ze zdrowych tkanek wykazuje obecność $\text{TNF}\alpha$ wykrywanego metodami immunoenzymatycznymi [Ruco i wsp., 1989]. Jednakże w rakach sutka, jajnika, nosogardzieli i jelita grubego wykazano obecność $\text{TNF}\alpha$ w licznych makrofagach za pomocą barwień immunoenzymatycznych, a metodami hybrydyzacji *in situ* ekspresję mRNA dla takich cytokin jak $\text{TNF}\alpha$, IL-1 (interleukina 1), $\text{TGF-}\beta$ (transforming growth factor β), PDGF (platelet-derived growth factor), IFN- γ (interferon γ), EGF (epidermal growth factor) lub FGF (fibroblast growth factor) [Beissert i wsp., 1989; Naylor i wsp., 1990; Zembala i wsp., 1989; Mantovani i wsp., 1992; Van Netten i wsp., 1993b]. Cytokiny te (np. $\text{TNF}\alpha$) są syntetyzowane przez makrofagi znajdujące w ścisłym sąsiedztwie lub w obrębie tkanki nowotworowej [Naylor i wsp., 1993], i jak wynika z badań przeprowadzonych *in vitro* oraz na modelach zwierzęcych, niektóre z nich (np. $\text{TNF}\alpha$, IFN γ , IL-1) biorą udział w toksycznym uszkodzeniu komórek nowotworowych przez monocyty/makrofagi. Obserwacje powyższe sugerują, że przynajmniej w niektórych wypadkach sygnału do syntezy cytokin przez TIM dostarcza kontakt z komórką nowotworową. Jednakże do chwili obecnej nie ustalono, czy sam kontakt błonowy jest wystarczającym bodźcem indukującym syntezę toksycznych

mediatorów w TIM, a jeśli tak, to jakie struktury powierzchniowe na monocytach/makrofagach i na komórkach nowotworowych są zaangażowane w ten dynamiczny proces.

Nacieki leukocytarne składające się w dużej części z TIM były przez długi czas rozpatrywane w kontekście swoistej, zależnej od limfocytów T odporności przeciwnowotworowej. Jednakże eksperymenty z użyciem ludzkich nowotworów przeszczepianych do myszy obciążonych genetycznym defektem odpowiedzi komórkowej ("nude") wykazały, że często swoista odpowiedź komórkowa nie odgrywa istotnej roli w tworzeniu nacieku złożonego z TIM, a zasadnicze znaczenie mają czynniki chemotaktyczne dla monocytów/makrofagów wydzielane przez same komórki nowotworowe [Mantovani, 1990; Mantovani i wsp., 1986]. Wydzielane przez komórki nowotworowe cytokiny: MCP-1, 2, 3 (monocyte chemotactic protein 1, 2, 3), M-CSF (monocyte colony-stimulating factor), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), VPF (vascular permeability factor) i inne, przyciągają monocyty/makrofagi w okolice rozwijającego się ogniska komórek nowotworowych unieruchamiając je w miejscu nacieku, a także hamują w TIM syntezę toksycznych mediatorów [Mantovani i wsp., 1992]. W ten sposób komórki nowotworowe "korzystają" z wydzielanych przez TIM czynników wzrostu, czynników pobudzających waskularyzację tkanki nowotworowej, jak i enzymów proteolitycznych ułatwiających tworzenie przerzutów. Z drugiej strony, aktywowane monocyty/makrofagi przyczyniają się do ograniczenia rozrostu nowotworu [Mantovani i wsp., 1986]. Komórki nowotworowe mogą migrację monocytów/makrofagów w obręb tkanki nowotworowej [Wang i wsp., 1986]. Tak więc istnieje rodzaj chwiejnej równowagi pomiędzy czynnikami chemotaktycznymi a czynnikami hamującymi migrację monocytów/makrofagów w obręb nowotworu.

Najprawdopodobniej funkcja TIM zależy od immunobiologii komórek danego guza nowotworowego, w związku z czym badania histopatologiczne nie mogą uchwycić dynamiki procesu wzajemnych interakcji TIM i komórek nowotworowych niosą ze sobą pewne ograniczenia. W celu wyjaśnienia mechanizmów interakcji monocytów/makrofagów z komórkami nowotworowymi *in situ*, został stworzony model *in vitro* wzajemnych oddziaływań komórkowych mający imitować sytuację spotykaną w pobliżu rozwijającego się guza nowotworowego [Zembala i wsp., 1993]. W tym układzie komórki nowotworowe są hodowane z monocytami krwi obwodowej, a stymulacja syntezy i wydzielania różnych czynników rozpuszczalnych odbywa się bez udziału limfocytów T i elementów macierzy zewnątrzkomórkowej.

Określenie czynników odpowiedzialnych za aktywację monocytów/makrofagów *in situ* wydaje się ważne, ponieważ komórki te izolowane z krwi obwodowej, nacieków towarzyszących guzom nowotworowym lub z wysięków do jam ciała związanych z procesem nowotworowym, mogą być celem interwencji terapeutycznej. TIM są zdolne niszczyć komórki nowotworowe poprzez ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity; komórkowa cytotoksyczność zależna od przeciwciał) lub na drodze niedostatecznie poznanego "bezpośredniego" mechanizmu [Triozzi, 1993; Bartholeyns, 1993]. Podejmowane są próby adoptywnej terapii za pomocą makrofagów otrzymanych z monocytów krwi obwodowej chorych na chorobę nowotworową, aktywowanych *in vitro* cytokinami i następnie podawanych z powrotem tym samym chorym. Podjęto też próby miejscowego podawania cytokin (np. do jamy otrzewnej), które potencjalnie są zdolne do aktywacji TIM [Mantovani i wsp., 1992; Andreesen i wsp., 1990; Lopez i wsp., 1992; Richters i wsp., 1993]. Obiecujące są próby terapii genowej, podczas której monocyty są transfekowane genami cytokin (np. $TNF\alpha$)

toksycznych dla komórek nowotworowych [Blankenstein i wsp., 1991], lub komórki nowotworowe są transfekowane genami kodującymi czynniki chemotaktyczne dla monocytów [Bottazzi i wsp., 1992]. W obu sytuacjach poznanie sygnałów prowadzących do aktywacji genów dla cytokin i innych czynników toksycznych jest zasadnicze dla tej formy immunoterapii.

1.2. Cząsteczki adhezyjne.

Cząsteczki adhezyjne (Cell Adhesion Molecules - CAM) odgrywają istotną rolę podczas embrio- i organogenezy ukierunkowując migrację i determinując lokalizację poszczególnych komórek. W układzie odpornościowym CAM biorą udział w rozpoznawaniu antygeny przez swoiste receptory limfocytów T (TcR); w reakcjach limfocyt-komórka prezentująca antygen, limfocyt-limfocyt, limfocyt-komórka docelowa. Cząsteczki te są bardzo istotne dla zjawisk przylegania leukocytów do komórek śródbłonna naczyń oraz do składników macierzy zewnątrzkomórkowej, a tym samym regulują migrację i recyrkulację komórek układu odpornościowego [Siedlar, 1992]. CAM zaangażowane są również w oddziaływania komórek układu odpornościowego z komórkami nowotworowymi [Rougon i wsp., 1992]. W chwili obecnej wyróżnia się kilka grup CAM. Są to: rodzina integryn, nadrodzina immunoglobulin, cząsteczka CD44, kaderyny i inne (np.: lektyny, adresyny naczyniowe, selektyny) [Albelda, 1993].

1.2.1. Integryny.

Integryny są glikoproteinami błonowymi biorącymi udział w zjawiskach przylegania oraz kontaktowaniu się wnętrza komórki ze środowiskiem zewnętrznym. Za ich pomocą

sygnał pochodzący z zewnątrz może zapoczątkować zmiany fenotypu, ekspresję różnych genów lub migrację komórki [Hynes, 1987; Hemler i wsp., 1990]. Z drugiej strony, cytoplazmatyczne sygnały mogą zmieniać ekspresję integryn na powierzchni komórki oraz ich aktywność funkcjonalną [Figdor i wsp., 1990; Rustin i wsp., 1989]. W ten sposób może zachodzić "dialog" poprzez błonę komórkową. Przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko determinantom antygenowym integryn mogą blokować ich interakcje z ligandami, co np. prowadzi do odrywania się hodowanych *in vitro* komórek nowotworowych od podłoża i zahamowania ich migracji i wzrostu [Knudsen i wsp., 1981; Schwartz, 1993]. Przyleganie leukocytów między sobą, lub do elementów macierzy zewnątrzkomórkowej, połączone jest z przejściowym wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Zjawisko to może być blokowane przy użyciu przeciwciał monoklonalnych przeciwko integrynom [Sikorski i wsp., 1991]. Obserwacje powyższe podkreślają znaczenie integryn jako cząsteczek odpowiedzialnych za zależną od przylegania regulację funkcji komórek [Hynes, 1992; Schwartz, 1992].

Integryny są heterodimerami zbudowanymi z niekowalencyjnie połączonych łańcuchów α i β [Buck i wsp., 1987; Hynes, 1992]. Pierwotnie zdefiniowano trzy podrodziny integryn, ze względu na występujący w każdej z nich wspólny łańcuch β (odpowiednio β_1 , β_2 i β_3), mogący łączyć się w obrębie podrodziny z różnymi łańcuchami α [Hynes, 1987]. Nowsze prace wykazały, że poszczególne łańcuchy α mogą łączyć się z więcej niż jednym łańcuchem β [Hynes, 1992]. Do chwili obecnej opisano co najmniej 8 różnych łańcuchów β i 13 łańcuchów α tworzących co najmniej 20 różnych cząsteczek integryn [Albelda, 1993; Bosman, 1993].

1.2.1.1. Podrodzina $\beta 1$ integryn.

Podrodzina $\beta 1$ lub VLA (very late antigen) składa się co najmniej z 8 cząsteczek (VLA 1-8), które to cząsteczki tworzą różne łańcuchy α połączone z łańcuchem $\beta 1$ (CD29). Znajdowane są na wielu typach komórek organizmu [Bosman, 1993]. Cząsteczki VLA łączą się z różnymi ligandami, w obrębie których nieswoiste miejsca wiążące tworzą różne ugrupowania aminokwasowe. Najlepiej poznana jest trójaminokwasowa sekwencja peptydowa -RGD-, którą tworzą: arginina (R), glicyna (G) i kwas asparaginowy (D) [Elices i wsp., 1991]. Integryny $\beta 1$ odgrywają znaczącą rolę w zjawiskach przylegania zachodzących podczas embriogenezy, regeneracji tkanek oraz w procesach związanych z hemostazą [Hemler, 1988; Hynes, 1987]. Wchodzą w interakcje z ligandami rozmieszczonymi zarówno na powierzchni komórek, jak i ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej, takimi jak: fibronektyna, kolagen, laminina, vitronektyna, trombospondyna [Bosman, 1993].

1.2.1.2. Podrodzina $\beta 2$ integryn.

W skład podrodziny $\beta 2$ lub podrodziny integryn leukocytarnych wchodzi trzy cząsteczki: LFA-1 (leukocyte function associated molecule-1), Mac-1 i p150,95 [Kishimoto i wsp., 1989]. Występują one prawie wyłącznie na powierzchni leukocytów. Integryny $\beta 2$ włączone są w procesy przylegania leukocytów do śródbłonek naczyń, fibroblastów, keratynocytów, komórek maziówki oraz do siebie nawzajem [Hemler, 1988]. Wymagają obecności w środowisku jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} , które stabilizują najprawdopodobniej strukturę łańcucha β lub też heterodimeru $\alpha\beta$ [Kirchofer i wsp., 1991].

LFA-1 (CD11a/CD18) bierze udział w szeregu zjawisk związanych z adhezją leukocytów, zarówno w procesach zależnych i niezależnych od antygeny. Przeciwciała

monoklonalne skierowane przeciw LFA-1 hamują większość poznanych procesów, w których zachodzi zjawisko szeroko rozumianej adherencji limfocytów T [Sanders i wsp., 1991]. Dotyczy to m.in. aktywności cytotoksycznej komórek NK (Natural Killers), LAK (Lymphokine-Activated Killer Cells), homotypowej adherencji monocytów (indukowanej interferonem- γ) oraz limfoblastów B (indukowanej PMA) [Magkoba i wsp., 1989; Noelle i wsp., 1990]. W ostrych stanach zapalnych LFA-1 związany jest ze zjawiskami niezależnego od antygeny przylegania leukocytów do śródbłonka naczyń, komórek maziówki, keratynocytów i fibroblastów [Lo i wsp., 1989; Mentzer i wsp., 1988]. Umożliwia to zarówno lokalizację procesu zapalnego, jak i diapedezę oraz migrację limfocytów i monocytów do uszkodzonych tkanek [Springer, 1990]. Ligandami dla LFA-1 są trzy glikoproteinowe cząsteczki należące do nadrodziny immunoglobulin: ICAM-1, 2 i 3 (intercellular adhesion molecule-1, -2 i -3), które są szeroko rozpowszechnione na powierzchni komórek organizmu [Bosman, 1993; Fougerolles i wsp., 1991].

Mac-1 (CD11b/CD18) po raz pierwszy cząsteczka ta została opisana jako wiążąca erytrocyty opłaszczone iC3b, stąd jej alternatywna nazwa: receptor dopełniacza typu 3 (CR-3). Razem z LFA-1 cząsteczka Mac-1 bierze udział w zjawisku przylegania monocytów i granulocytów obojętnochłonnych do komórek śródbłonka naczyniowego. W pewnych warunkach ICAM-1 może służyć jako ligand również dla Mac-1 [Anderson i wsp., 1986].

p150, 95 (CD11c/CD18) została zdefiniowana po raz pierwszy jako cząsteczka wiążąca fragment iC3b dopełniacza (receptor dopełniacza typu 4, CR-4) [Myones i wsp., 1988]. Bierze udział w zjawiskach fagocytozy, chemotaksji oraz przylegania monocytów i granulocytów obojętnochłonnych do śródbłonek naczyń [Stacker i wsp., 1991; Lo i wsp., 1989].

Ekspresja cząsteczek adhezyjnych może być związana z nabywaniem przez limfocyty kompetencji immunologicznej oraz ulegać zmianom w zależności od stopnia zróżnicowania morfologicznego lub funkcji komórek. Czynniki środowiska mogą również wpływać na ich ekspresję. Ekspresja Mac-1 na monocytach krwi obwodowej jest wyższa niż p150, 95. Po przejściu do tkanek i przekształceniu się w makrofagi tkankowe, proporcje te ulegają odwróceniu [Strassmann i wsp., 1985; Miller i wsp., 1988]. Makrofagi otrzewnowe nie wykazują ekspresji LFA-1, natomiast po stymulacji *in vivo* przez BCG (Bacillus Calmette-Guerin) cząsteczka ta pojawia się na ich powierzchni [Kishimoto i wsp., 1989]. Powyższe obserwacje świadczą o tym, jak duży wpływ na ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórki może mieć mikrośrodowisko.

1.2.1.3. Podrodzina $\beta 3$ integryn.

W skład podrodziny wchodzi dwie cząsteczki: VNR (Vitronectin Receptor; CD51/CD61) oraz glikoproteina płytkowa (gp) IIb/IIIa (CD41/CD61). gpIIb/IIIa występuje na płytkach krwi, natomiast VNR na komórkach śródbłonkowych, niektórych nowotworowych (np. czerniaka złośliwego) i innych [Kishimoto i wsp., 1989; Bosman, 1993]. $\beta 3$ integryny są zaangażowane w regulację procesów przylegania różnych typów komórek, a także płytek krwi do śródbłonka naczyń, a po jego zniszczeniu do elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Są obecne na wielu komórkach podczas morfogenezy. Integryny $\beta 3$ rozpoznają m.in. fragment peptydowy RGD [Bosman, 1993].

1.2.2. Nadrodzina immunoglobulin.

Charakterystyczną cechą strukturalną cząsteczek należących do nadrodziny immunoglobulin (immunoglobulin superfamily; Ig-SF) są domeny, każda zbudowana z ok. 70-110 aminokwasów, oraz stabilizujące je, wewnątrzdomenowe mostki dwusiarczkowe [Hunkapiller i wsp., 1989]. Cząsteczki zaliczane do Ig-SF biorą udział w interakcjach prowadzących do rozpoznawania się komórek układu odpornościowego pomiędzy sobą i rozpoznawania przez nie innych komórek organizmu [Williams i wsp., 1988]. Do Ig-SF zaliczane są takie cząsteczki jak: immunoglobuliny powierzchniowe, antygeny głównego kompleksu zgodności tkankowej, receptory limfocytów T, cząsteczki CD2, CD4, CD8, LFA-3 (leukocyte function associated molecule 3; CD58), N-CAM (neural cell adhesion molecule), ICAM-1, -2 i -3, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), CSF-1R (colony-stimulating factor-1 receptor), PDGF-R (platelet-derived growth factor receptor), CEA (carcinoembryonic antigen) i inne [Williams i wsp., 1988].

ICAM-1, której ekspresja wzmagana się zwłaszcza na powierzchni zapalnie zmienionego śródbłonka naczyń krwionośnych, zwiększa ryzyko tworzenia się przerzutów czerniaka złośliwego [Johnson i wsp., 1989]. Poziom wolnego ICAM-1 również zdaje się korelować z występowaniem nowotworów złośliwych [Tsujisaki i wsp., 1991].

VCAM-1 została opisana jako cząsteczka występująca na śródbłonku naczyń, służąca jako ligand dla znajdującej głównie na leukocytach VLA-4 [Elices i wsp., 1990]. Ponieważ cząsteczki VLA-4 mogą występować również na niektórych komórkach nowotworowych (np. czerniaka złośliwego), tak więc VCAM-1 prawdopodobnie bierze udział w procesie przylegania tychże komórek nowotworowych do śródbłonka naczyń i tworzeniu przerzutów [Albelda i wsp., 1990].

CEA został opisany pierwotnie jako glikoproteina płodowa znaleziona w surowicach chorych na raka jelita grubego. Podwyższony surowiczy poziom CEA występuje również w innych schorzeniach nowotworowych, a jego pomiar wykorzystuje się do monitorowania przebiegu pooperacyjnego w przypadku raków jelita grubego i płuc [Benchimol i wsp., 1989]. Patofizjologiczna funkcja tej cząsteczki nie została do końca poznana.

1.2.3. Cząsteczka CD44.

Cząsteczka CD44/Pgp-1, opisana po raz pierwszy jako receptor zasiedlania limfocytów [Jalkanen i wsp., 1985], jest glikoproteiną błonową odgrywającą ważną rolę w interakcjach leukocytów z innymi komórkami oraz z elementami macierzy zewnątrzkomórkowej. Poprzez swoją domenę cytoplazmatyczną może przenosić sygnał do wnętrza komórki [Shimizu i wsp., 1989]. CD44 jest receptorem dla cząsteczek kwasu hialuronowego, a także kolagenu [Aruffo i wsp., 1990; Seiter i wsp., 1993]. Występuje na wielu prawidłowych komórkach organizmu, a także często na komórkach nowotworowych [Hofmann i wsp., 1991; Mayer i wsp., 1993]. Wyróżnia się dwie podstawowe izoformy CD44: i) **CD44H**, cząsteczkę o ciężarze ok. 80-90 kD (lub ok. 180 kD jako rezultat dobudowania do CD44 chondroitynosiarczanów podczas obróbki posttranslacyjnej), występującą głównie na leukocytach, jak też i innych komórkach pochodzenia mezenchymalnego, mającą duże powinowactwo do kwasu hialuronowego [Aruffo i wsp., 1990], oraz ii) **CD44E**, o ciężarze ok. 130-150 kD, występującą głównie na komórkach pochodzenia nabłonkowego, o niskim powinowactwie do kwasu hialuronowego [Stamenkovic i wsp., 1991]. Opisanych zostało wiele innych izoform CD44. Tak duże zróżnicowanie budowy CD44 wynika po części z modyfikacji posttranskrypcyjnych. Różne warianty CD44 są generowane w wyniku procesu alternatywnego łączenia ("splicing") kilku

spośród ok. 10 zmiennych exonów (variable exons) z fragmentami pre-mRNA, które kodują niezmienny, "standardowy rdzeń" cząsteczki CD44 (CD44s, o ciężarze ok. 80-85 kD) [Screaton i wsp., 1992]. Tego typu warianty cząsteczki (CD44v1-v10), porównując do CD44s, różnią się pomiędzy sobą obecnością dodatkowych, kilkuaminokwasowych sekwencji w strukturze zewnątrzkomórkowego odcinka cząsteczki. Stosując taką klasyfikację, cząsteczka CD44E odpowiada np. izoformie CD44v8-v10 [Tolg i wsp., 1993]. Występowanie różnych izoform cząsteczki CD44 jest ograniczone do niewielu zdrowych tkanek oraz do linii lub guzów nowotworowych. Na przykład cząsteczka CD44 zawierająca aminokwasy kodowane przez exon v6 jest charakterystyczna dla przerzutującego raka jelita grubego, a zawierająca fragment polipeptydowy kodowany przez exony v5 i v6 dla raka żołądka typu jelitowego [Wielenga i wsp., 1993; Heider i wsp., 1993]. Obecność tak wielu wariantów CD44 może przemawiać za różnorodnością funkcji, jakie ta cząsteczka może pełnić w organizmie [Tolg i wsp., 1993].

1.2.4. Kaderyny.

Kaderyny są transbłonowymi glikoproteinami biorącymi udział we wzajemnych interakcjach tych samych rodzajów komórek. Ich funkcja zależna jest od obecności jonów wapnia [Takeichi, 1991]. Cząsteczki zaangażowane są w tworzenie i podtrzymywanie połączeń międzykomórkowych, a tym samym odpowiadają za zachowanie architektury tkankowej [Takeichi, 1990]. Wyróżnia się następujące kaderyny: E-kaderyny (występują na komórkach nabłonkowych), N-kaderyny (znajdowane na komórkach tkanki nerwowej i komórkach mięśniowych) oraz P-kaderyny (opisywane głównie na komórkach nabłonkowych) [Albelda, 1993]. Poszczególne kaderyny łączą się selektywnie z kaderynami tego samego

rodzaju [Nose i wsp., 1990]. Istnieje hipoteza twierdząca, że spadek poziomu ekspresji kaderyn na powierzchni komórek nowotworowych koreluje z ich zwiększonym przerzutowaniem [Mareel i wsp., 1991].

1.2.5. *Cząsteczki adhezyjne a nowotwór.*

Rodzaj cząsteczek adhezyjnych jakie ulegają ekspresji na komórkach nowotworowych *in situ* zwykle różni się od obserwowanego na komórkach nowotworowych w warunkach hodowli *in vitro* [Albelda, 1991]. Istnieje tendencja występowania niskiego poziomu cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek nowotworowych w stosunku do komórek zdrowej tkanki [Albelda, 1993]. Uzasadnia to łatwość, z jaką niektóre komórki nowotworowe mogą oddzielać się od ogniska pierwotnego tworząc odległe przerzuty, oraz trudności, jakie napotykają prawdopodobnie komórki układu odpornościowego przy rozpoznawaniu i niszczeniu komórek nowotworowych pozbawionych niektórych struktur powierzchniowych.

Pozostaje niejasnym, jakie cząsteczki na powierzchni monocytów/makrofagów są włączone w oddziaływania z komórkami nowotworowymi. Uważa się, że cząsteczki adhezyjne mogą odgrywać w tych interakcjach dużą rolę. Udowodniono, że cząsteczki LFA-1, ICAM-1 i -2 są istotne w procesach wymagających kontaktu i przylegania monocytów do limfocytów T oraz do śródbłona naczyń [Patarroyo i wsp., 1990]. Biorą one także udział w generowaniu *in vitro* z monocytów wielojądrowych komórek olbrzymich [Most i wsp., 1990]. W szczególności, integryny z podrodziny beta2 (CD11/CD18) są włączone w procesy zależnego od kontaktu, toksycznego uszkodzenia komórek nowotworowych przez aktywowane monocyty [Bernasconi, i wsp. 1991]. Ekspresja cząsteczek ICAM-1 na niektórych komórkach nowotworowych jest związana ze zwiększoną wrażliwością na

cytotoksyczne oddziaływanie monocytów [Webb i wsp., 1991].

Cząsteczka CD44 uważana jest za główny receptor dla kwasu hialuronowego, jak również i dla innych składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Tym samym ma istotne znaczenie dla procesów związanych z przyleganiem komórek pomiędzy sobą jak i z przyleganiem do komponentów macierzy [Haynes i wsp., 1989; Toyama-Sorimachi i wsp., 1993]. W ostatnim czasie wykazano, że cząsteczka CD44 na komórce nowotworowej jest włączona w oddziaływania komórek nowotworowych z elementami macierzy zewnątrzkomórkowej gospodarza i bierze udział w procesach rozrostu i przerzutowania guza [Knudson i wsp., 1990; Sy i wsp., 1992; Seiter i wsp., 1993; Mayer i wsp., 1993].

1.3. Rola antygenów zgodności tkankowej w przekazywaniu sygnału aktywującego monocyt.

Cząsteczki MHC klasy II na monocytach są niezbędne do prezentacji limfocytom T obcych antygenów podczas indukcji odpowiedzi immunologicznej. Uważa się, że po rozpoznaniu antygeny w kontekście MHC klasy II, komórki T ($CD4^+$) wytwarzają czynnik, który aktywuje monocyty do produkcji cytokin niezbędnych dla zaistnienia dalszych etapów odpowiedzi immunologicznej [Weaver i wsp., 1990]. Jednakże nie można wykluczyć, że bezpośrednie interakcje pomiędzy cząsteczką MHC klasy II, a niektórymi antygenami (czy superantygenami) mogą również, bez udziału limfocytów T, prowadzić do powstania sygnału indukującego produkcję cytokin.

Wykazano ostatnio, że niektóre superantygeny, takie jak *Staphylococcus enterotoxin A* (SEA) czy *toxic shock syndrome toxin 1* (TSST-1) mogą być ligandami dla cząsteczek MHC klasy II. Superantygeny mogą indukować syntezę niektórych cytokin (IL-6 i IL-8) w ludzkich komórkach maziówki, które wykazują ekspresję MHC klasy II w wyniku stymulacji

interferonem gamma [Mourad i wsp., 1992]. Ponadto TSST-1 indukuje syntezę IL-1 beta i TNF α w monocytach [Trede i wsp., 1991], a także aktywuje kinazę białkową C i kinazę tyrozynową w wyniku transbłonowego przenoszenia sygnału za pośrednictwem MHC klasy II [Scholl i wsp., 1992]. Droga przekazywania sygnału indukującego monocytę za pośrednictwem MHC klasy II jest analogiczna do sposobu aktywacji limfocytów T za pośrednictwem ich receptorów błonowych. TSST-1 aktywuje w monocycie jądrowe czynniki transkrypcyjne NF- κ B i AP-1 mogące z kolei aktywować transkrypcję genów różnego rodzaju monokin [Trede i wsp., 1994]. Należy zaznaczyć, że superantygeny gronkowcowe nie aktywowały wyżej opisanych szlaków sygnałowych po połączeniu się z cząsteczkami MHC klasy I [Cantor i wsp., 1993], co wskazuje na selektywność wzbudzania sygnałów. Ostatnie doniesienia sugerują, że również cząsteczki MHC klasy I mogą brać udział w przezbłonowym przenoszeniu sygnału aktywującego limfocyty T, najprawdopodobniej dzieje się to jednak na innej drodze niż w przypadku antygenów MHC klasy II [Dasgupta i wsp., 1990, 1994; Tscherning i wsp., 1994].

1.4. Czynniki martwicy nowotworów alfa i tlenek azotu jako czynniki cytotoksyczne.

Monocyty krwi obwodowej są często używane jako źródło jednojądrzastych fagocytów. W wielu aspektach monocyty wykazują podobne właściwości do makrofagów tkankowych, a w warunkach *in vitro* różnicują się (dojrzewają) w kierunku makrofagów [Dougherty i wsp., 1989]. Właściwości cytotoksyczne monocytów/makrofagów związane są z produkcją i uwalnianiem wielu toksycznych cząsteczek efektorowych. Są to m. in. wolne rodniki tlenowe (ROI), proteazy, jak również tlenek azotu (NO) i TNF α [Oppenheim i wsp., 1989; Feinman i wsp., 1987; Mavier i wsp., 1984; Martin i wsp., 1993; Adams, 1980]. Mechanizmy indukcji

syntezy i uwalniania TNF α oraz NO przez ludzkie monocyty po kontakcie z komórkami nowotworowymi dyskutowane są w niniejszej pracy.

1.4.1. Czynniki martwicy nowotworów alfa.

TNF α jest cytokiną wykazującą wiele rodzajów aktywności biologicznej. Odgrywa istotną rolę jako cząsteczka zaangażowana w regulację odpowiedzi immunologicznej, bierze udział w odpowiedzi organizmu na zakażenie różnymi mikroorganizmami, jest istotnym czynnikiem patogenetycznym szoku septycznego i prawdopodobnie wyniszczenia spotykanego w nowotworach, ponadto może być zaangażowana w proces zahamowania wznowy lub niszczenia nowotworu przez komórki układu odpornościowego [Beutler i wsp., 1985].

TNF α jest produkowany przez wiele komórek organizmu, jednak jego głównym źródłem pozostają monocyty/makrofagi, zwłaszcza np. *in vitro* po stymulacji lipopolisacharydem (LPS) lub estrami forbolu (np. PMA) [Matthews, 1981]. Inne komórki, takie jak: komórki tuczne, granulocyty obojętnochłonne, komórki Browicza-Kupffera, komórki mikrogleju czy makrofagi pęcherzyków płucnych, również mogą wytwarzać TNF α w odpowiedzi na stymulację LPS [Sidhu i wsp., 1993]. Limfocyty T, B i komórki NK także są zdolne do produkcji TNF α , lecz w odpowiedzi na inne stymulatory (np. fitohemaglutyninę; PHA lub konkanawalinę A; ConA) [Sidhu i wsp., 1993]. Większość komórek wymaga stymulacji do produkcji TNF α , jednakże niektóre białaczkowe limfocyty B lub komórki niektórych linii limfoblastycznych mogą wytwarzać TNF α spontanicznie [Foa i wsp., 1992]. Niektóre ludzkie linie nowotworowe, zwykle wykazujące odporność na toksyczne działanie TNF α , mogą go również konstytucyjnie produkować [Rubin i wsp., 1986].

Aktywny TNF α występuje w roztworze jako trimer [Corti i wsp., 1992]. Jego

biologiczne funkcje mediowane są poprzez wiązanie do specyficznych receptorów, znajdujących się na powierzchni większości komórek organizmu [Smith i wsp., 1992]. Dotychczas zostały zidentyfikowane dwa receptory dla $\text{TNF}\alpha$: TNF-R1 i TNF-R2 , o masach cząsteczkowych odpowiednio: 55 kDa i 75 kDa [Brockhaus i wsp., 1990]. Do transdukcji sygnału najprawdopodobniej konieczne jest związanie krzyżowe receptorów przez $\text{TNF}\alpha$ [Pennica i wsp., 1992], czego skutkiem może być aktywacja (przy udziale białka G) fosfolipazy A_2 (PLA_2). W wyniku aktywności PLA_2 powstaje kwas arachidonowy i lizofosfatydylocholina, które działają jako drugi przekaźnik [Yanaga i wsp., 1992; Schutze i wsp., 1989]. Oprócz aktywacji PLA_2 , dochodzi do pobudzenia innego enzymu - fosfolipazy C (PLC), której produktem jest diacyloglicerol (DAG) [Schutze i wsp., 1991]. Produkty obu fosfolipaz aktywują z kolei kinazę proteinową C (PKC) [Schutze i wsp., 1989]. W proces transdukcji sygnału zaangażowana jest prawdopodobnie również inna kinaza - aktywowana ceramidem kinaza proteinowa. Konieczny do jej aktywacji ceramid powstaje w wyniku hydrolizy sfingomieliny, z udziałem aktywowanej przez receptory dla $\text{TNF}\alpha$ sfingomielinazy [Kim i wsp., 1991; Dressler i wsp., 1992]. Obie kinazy powodują fosforylację inhibitorowego białka B ($\text{I}\kappa\text{B}$) wiążącego jądrowy czynnik transkrypcyjny B ($\text{NF}\kappa\text{B}$) [Ghosh i wsp., 1990], w wyniku czego $\text{NF}\kappa\text{B}$ odłącza się od $\text{I}\kappa\text{B}$ i zostaje uaktywniony. Może następnie zapoczątkować transkrypcję różnych genów zależnych od $\text{TNF}\alpha$, na przykład genów dla innych czynników transkrypcyjnych (AP-1 , IRF-1 , NF-GMa , EGR-1) [Stephens i wsp., 1992]. Sfingozyna, drugi oprócz ceramidu produkt hydrolizy sfingomieliny przez sfingomielinazę, aktywuje PLA_2 i cyklooksygenazę [Sidhu i wsp., 1993]. W ostatnim czasie stwierdzono, że wolne rodniki tlenowe produkowane w mitochondriach w wyniku działania $\text{TNF}\alpha$ na komórki linii L929 mogą również aktywować $\text{NF}\kappa\text{B}$. Tym samym wolne rodniki działają też

jako przekaźnik zależnych od TNF α sygnałów do jądra komórkowego [Schulze-Osthoff i wsp., 1993].

TNF α posiada właściwości cytotoksyczne, cytostatyczne (zahamowanie rozrostu komórek) lub stymulujące wzrost komórek, w zależności od rodzaju komórek na które działa, czy warunków samej hodowli. TNF α został opisany pierwotnie jako czynnik cytotoksyczny działający w warunkach zarówno *in vivo* [Carswell i wsp., 1975], jak i *in vitro* [Ruff i wsp., 1981]. Mechanizmy niszczenia komórek wrażliwych na TNF α nie są do końca wyjaśnione. W uszkodzenie komórki mogą być zaangażowane: proteazy serynowe [Suffys i wsp., 1988], PLA₂ [Kull, 1988; Mutch i wsp., 1992], wolne rodniki tlenowe [Schulze-Osthoff i wsp., 1992], enzymy lizosomalne [Liddil i wsp., 1989] lub endonukleazy [Wright i wsp., 1992]. Efektem ich działania może być martwica bądź apoptoza komórki [Bellomo i wsp., 1992]. Wcześniejsze badania sugerowały, że TNF α działa cytotoksycznie lub cytostatycznie wyłącznie na komórki transformowane, podczas gdy komórki zdrowe nie są wrażliwe na jego działanie [Fransen i wsp., 1986]. Ostatecznie okazało się, że zdrowe komórki mogą być również uszkodzane przez TNF α , a linie komórek nowotworowych wykazują różną wrażliwość na egzogenny TNF α . Mogą ulegać całkowitemu zniszczeniu lub nie reagować na TNF α wogóle [Bollon i wsp., 1988]. Oporność niektórych komórek nowotworowych na TNF α polega prawdopodobnie na defekcie mechanizmów przenoszenia sygnałów odpowiedzialnych za toksyczny efekt TNF α po jego związaniu z receptorami [Shepard i wsp., 1988]. Oporność może być także spowodowana uaktywnieniem się fizjologicznych mechanizmów chroniących zdrowe komórki przed toksycznym wpływem TNF α . Zaobserwowano, że preaktywacja niektórych komórek nowotworowych przy pomocy TNF α powoduje syntezę manganowej dyzmutazy nadtlenkowej (MnSOD), która chroni je przed toksycznym wpływem wolnych

rodników tlenowych [Wong i wsp., 1992].

TNF α może aktywować makrofagi do niszczenia komórek nowotworowych niewrażliwych na działanie egzogenego TNF α . Stymuluje wytwarzanie w makrofagach innych toksycznych mediatorów, np. nadtlenu wodoru [Hoffman i wsp., 1987], lub wzmacnia ekspresję związanego z błoną TNF α . Wykazano, że "uzbrojone" w ten sposób makrofagi mogą uszkadzać komórki linii nowotworowych odpornych na rozpuszczalny TNF α [Peck i wsp., 1989]. Ponadto TNF α indukuje na śródbłonkach naczyń ekspresję wielu cząsteczek adhezyjnych dla leukocytów, a tym samym przyczynia się do migracji komórek układu odpornościowego do ogniska guza nowotworowego [Bevilacqua i wsp., 1987]. Posiada też właściwości prokoagulacyjne, co może być przyczyną martwicy krwotocznej guza nowotworowego [Nawroth i wsp., 1988]. Tak więc w warunkach *in situ* TNF α uwalniany z TIM może być ważnym czynnikiem odpowiedzialnym za destrukcję tkanki nowotworowej.

1.4.2. Tlenek azotu.

Tlenek azotu jest gazem trudno rozpuszczalnym w wodzie, jego okres półtrwania wynosi ok. 4-60 sek. [Knowles i wsp., 1992]. NO pośredniczy w wielu zjawiskach fizjologicznych. Jest wydzielany przez śródbłonek naczyń krwionośnych, odpowiadając za rozkurcz mięśniówki gładkiej bierze udział w regulacji ciśnienia tętniczego krwi [Palmer i wsp., 1987]. Ponadto jest zaangażowany w cytotoksyczne uszkodzenie niektórych komórek nowotworowych przez makrofagi mysie i efekt bójczy wobec chorobotwórczych mikroorganizmów [Hibbs i wsp., 1988; Nathan i wsp., 1991], hamowanie przylegania i agregacji płytek krwi [Radomski i wsp., 1987; Moncada, 1992], przekazywanie sygnałów w centralnym i obwodowym (nerwy nie-adrenergiczne, nie-cholinergiczne) systemie nerwowym

[Bredt i wsp., 1990]- a tym samym regulację napięcia mięśniówki drzewa oskrzelowego, ciał jamistych, czy zwieraczy przewodu pokarmowego [Nathan, 1992; Blomqvist i wsp., 1993; Vanderwinden i wsp., 1992]. NO jest produktem utlenienia końcowego N^G-guanidynowego atomu L-argininy przez enzym zwany syntazą NO (NOS), przy czym jako ko-produkt reakcji powstaje L-cytrulina [Stuehr i wsp., 1992]. Aktywność NOS może być hamowana kompetycyjnie za pomocą N^ω-pochodnych L-argininy [Kiechle i wsp., 1993]. W warunkach fizjologicznych NO szybko przekształca się do azotynów i azotanów.

Wyróżnia się trzy izoformy NOS; NOS-I, II i III [Schmidt i wsp., 1993]. NOS-I i III (zwane też konstytutywnymi syntazami NO - cNOS) obecne są stale w cytozolu komórek centralnego i obwodowego układu nerwowego (NOS-I) [Bredt i wsp., 1991], lub w postaci związanej z błoną komórkową, w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych (NOS-III) [Marsden i wsp., 1992]. NO syntetyzowany przez izoformy cNOS działa jako fizjologiczny regulator napięcia mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych lub jako neurotransmitter. Obie izoformy cNOS wytwarzają niewielkie ilości NO przez krótki czas po zadziałaniu bodźców powodujących wzrost śródkomórkowego poziomu jonów Ca²⁺, przy czym dla aktywności enzymu konieczna jest obecność kalmoduliny. Z kolei NOS-II (zwana indukowalną syntazą NO - iNOS), jest nieobecna w komórkach spoczynkowych. Produkcja NO rozpoczyna się, gdy komórka zostanie uprzednio pobudzona, np. przez cytokiny (IL-1, IL-2, TNF α , IFN γ) lub lipopolisacharyd (LPS) do syntezy iNOS [Nussler i wsp., 1993]. Raz zsyntetyzowana, iNOS wiąże nieodwracalnie kalmodulinę niezależnie od jonów Ca²⁺ i wykazuje pełną aktywność, bez względu na aktualną koncentrację wolnych jonów Ca²⁺ w komórce [Schmidt i wsp., 1993]. iNOS produkuje duże ilości NO w sposób ciągły, aż do wyczerpania substratu lub degradacji samego enzymu. Regulacja aktywności iNOS zachodzi najprawdopodobniej

na poziomie transkrypcji DNA [Schmidt i wsp., 1993].

Ekspresja iNOS została po raz pierwszy opisana w mysich makrofagach, jednakże jej występowanie w różnych komórkach i tkankach u ssaków jest dość powszechne. U człowieka indukcję iNOS opisano do chwili obecnej w: hepatocytach, komórkach mięśniówki gładkiej i komórkach śródbłonna naczyń, niektórych komórkach szpiku, keratynocytach, komórkach mięśnia sercowego, chondrocytach i komórkach β wysp Langerhansa [Nussler i wsp., 1993; Palmer i wsp., 1993; Moncada i wsp., 1993]. Nieznaczną syntezę NO przez ludzkie monocyty/makrofagi obserwowano pośrednio podczas długotrwałej stymulacji w hodowli za pomocą GM-CSF+TNF α , IFN γ + TNF α i LPS [Denis, 1991; Munoz-Fernandez i wsp., 1992], jednakże dotychczas nie przedstawiono bezpośredniego dowodu na istnienie syntezy NO w monocytach [Moncada i wsp., 1993]. Wykazano ponadto niemożność indukcji syntezy iNOS za pomocą LPS i cytokin w ludzkich komórkach Browicza-Kupffera [Nussler i wsp., 1993].

Aktywność wszystkich trzech izoform NOS jest zależna od obecności zredukowanego fosforanu dwunukleotydu nikotynamido-adeninowego (NADPH), tetrahydrobiopteryny (BH $_4$), dwunukleotydu flawinowo-adeninowego (FAD) i mononukleotydu flawinowego (FMN) [Schmidt i wsp., 1993]. Indukcja aktywności NOS znajduje swój wyraz w różnorodnych reakcjach biochemicznych będących wyrazem licznych efektów biologicznych wywieranych przez NO na komórki docelowe. Niewielkie ilości NO uwalniane przez cNOS aktywują NO-zależne enzymy uczynniając odpowiednie szlaki sygnałowe. Aktywacja rozpuszczalnej cyklazy guanylowej poprzez łączenie się NO z żelazem hemowej grupy prostetycznej cyklazy, prowadzi do syntezy cGMP i wzrostu jego poziomu w komórce, czego skutkiem są liczne reakcje fizjologiczne, jak np. rozkurcz mięśniówki gładkiej naczyń

krwionośnych [Ignarro, 1991]. Z kolei duża ilość NO syntetyzowana przez iNOS również może aktywować cyklazę guanylową [Stuehr i wsp., 1992], lecz przede wszystkim unieczynniać enzymy mające w swych ośrodkach katalitycznych atomy żelaza i/lub siarki [Schmidt i wsp., 1993]. W ten sposób zostaje zainaktywowana czynność I i II kompleksu mitochondrialnego łańcucha oddechowego [Drapier i wsp., 1988], akonitazy - kluczowego enzymu cyklu Krebsa [Stuehr i wsp., 1989], reduktazy rybonukleotydowej niezbędnej do syntezy DNA [Kwon i wsp., 1991]. NO uszkadza również bezpośrednio DNA powodując jego dezaminację i pękanie podwójnej spirali oraz reaguje z wolnymi rodnikami tlenowymi tworząc toksyczne dla komórki połączenia [Wink i wsp., 1991; Beckman i wsp., 1990]. Tak więc cytotoksyczne działanie NO syntetyzowanego przez makrofagi, względem niektórych mikroorganizmów i komórek nowotworowych, może być przynajmniej w części zależne od aktywności iNOS [Nathan i wsp., 1991].

Tlenek azotu wydzielany przez aktywowane makrofagi mysie został opisany jako czynnik o działaniu toksycznym dla komórek nowotworowych [Hibbs i wsp., 1988; Keller i wsp., 1989]. Zaobserwowano ponadto, że niestymulowane szczurze makrofagi pęcherzyków płucnych hodowane z syngenicznymi komórkami grasiczaka wydzielają NO, który działa cytotoksycznie na komórki nowotworowe [Nozaki i wsp., 1993]. Makrofagi uzyskiwane od gryzoni wykazują aktywność iNOS [Lorsbach i wsp., 1993]. Mysie makrofagi produkują i wydzielają NO w wyniku stymulacji różnymi czynnikami, np. cytokinami, LPS, syngenicznymi lub allogenicznymi komórkami nowotworowymi [Ding i wsp., 1988; Isobe i wsp., 1993]. Jednakże mechanizmy aktywacji produkcji indukowalnej syntazy NO w ludzkich monocytach/makrofagach pozostają niejasne, a zdolność ludzkich monocytów/makrofagów do syntezy NO jest w dalszym ciągu wątpliwa [Cameron i wsp., 1990; Schneemann i wsp.,

1993; Nussler i wsp., 1993]. Chociaż ludzkie monocyty mogą być aktywowane *in vitro* do toksycznego uszkodzenia komórek nowotworowych przez takie czynniki jak IFN γ , IL-2 czy TNF α [Siedlar i wsp., 1992; Mantovani, 1989], to jednak ciągle istnieją wątpliwości co do roli NO jako cząsteczki efektorowej makrofagów człowieka [Martin i wsp., 1993; Petit i wsp., 1992].

1.5. Podsumowanie.

Pośród komórek naciekających tkankę nowotworową znaczny odsetek stanowią makrofagi. Monocyty/makrofagi stanowią heterogenną populację komórek o różnym stopniu zróżnicowania fenotypowego i funkcjonalnego. W zależności od ich lokalizacji w obrębie guza nowotworowego mogą pełnić odmienne role. Trudne jest więc jednoznaczne określenie funkcji TIM w reaktywności immunologicznej gospodarza na rozwijający się nowotwór. Zrozumienie interakcji pomiędzy monocytami/makrofagami a komórkami nowotworowymi *in situ* ma podstawowe znaczenie dla wyjaśnienia ich roli w immunobiologii guzów nowotworowych, a chociażby częściowe scharakteryzowanie wydzielanych przez nie czynników może mieć praktyczne implikacje dla terapii przeciwnowotworowej.

Aktywność cytotoksyczna makrofagów względem komórek nowotworowych jest między innymi mediowana przez TNF α , wolne rodniki azotowe (włączając w to tlenek azotu) i tlenowe, enzymy proteolityczne. W chwili obecnej stosunkowo dużo wiadomo na temat roli TNF α lub wolnych rodników w niszczeniu komórek nowotworowych przez monocyty/makrofagi. Nie wiadomo jednak, co jest bezpośrednim sygnałem do indukcji mechanizmów efektorowych.

W kontekście powyższych obserwacji został użyty system *in vitro* interakcji monocytów

człowieka (traktowanych jako komórki prekursorowe makrofagów tkankowych) z komórkami nowotworowymi w celu zbadania, czy bezpośredni kontakt monocyt-komórka nowotworowa prowadzi do syntezy $\text{TNF}\alpha$ i NO przez monocyty oraz w celu analizy cząsteczek powierzchniowych jakie mogłyby brać udział w tych interakcjach.

2. Cel i założenia pracy.

Makrofagi naciekające nowotwór (TIM) pochodzą z monocytów krwi obwodowej, które są przyciągane w miejsce nacieku nowotworowego przez czynniki chemotaktyczne lub niektóre cytokiny. Migrujące monocyty są aktywowane, a ich funkcja modyfikowana w mikrośrodku nowotworu poprzez interakcje z komórkami guza i/lub z limfocytami B, T, a także z monokinami wydzielanymi przez obecne już makrofagi (aktywność parakrynną). Tak więc trudne jest jednoznaczne scharakteryzowanie funkcji TIM. W powyższym kontekście postawiono sobie za cel:

1. Zbadanie, czy komórki nowotworowe mogą bezpośrednio stymulować monocyty krwi obwodowej człowieka (traktowane jako komórki prekursorowe makrofagów tkankowych) do syntezy *de novo* i wydzielania TNF α ; model *in vitro* interakcji *in situ* makrofaga z komórką nowotworową;
2. Określenie, czy komórki nowotworowe oraz inne stymulatory takie jak cytokiny lub LPS mogą stymulować monocyty człowieka do wydzielania tlenu azotu;
3. Zdefiniowanie struktur powierzchniowych na komórkach nowotworowych lub monocytach zaangażowanych w reakcje prowadzące do wydzielania przez monocyty substancji cytotoksycznych (TNF α i tlenu azotu);
4. Ustalenie, czy istnieją różnice w przekazywaniu sygnału do syntezy TNF α i NO w monocytach pod wpływem stymulacji przez komórki nowotworowe.

Badania immunocytochemiczne oraz hybrydyzacja *in situ* pozwalają na uzyskanie odpowiedzi na temat liczby i rodzaju komórek znajdujących w nacieku okołonowotworowym. Nie umożliwiają jednak określenia funkcji poszczególnych subpopulacji

komórek naciekających nowotwór, ani identyfikacji cząsteczek włączonych we wzajemne, dynamiczne interakcje monocytów/makrofagów z komórkami nowotworowymi. W związku z powyższym założono, że należy opracować model *in vitro* interakcji komórek nowotworowych z monocytami krwi obwodowej, naśladujący sytuację spotykaną *in situ*, nie obarczony wpływami jakie na oba rodzaje komórek może wywierać mikrośrodowisko nowotworu. W układzie tym istnieje możliwość określenia sposobu przenoszenia sygnału aktywującego monocyt do wydzielania niektórych toksycznych mediatorów po bezpośrednim kontakcie z komórką nowotworową.

3. Materiał i metody.

3.1. Izolacja monocytów i limfocytów T.

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) były izolowane z krwi żyłnej, pobieranej od zdrowych dawców na EDTA (roztwór 10%), za pomocą wirowania na standardowym gradiencie gęstości Ficoll/Isopaque (Pharmacia, Szwecja). Limfocyty T były izolowane z PBMC z wykorzystaniem metody tworzenia rozetek z traktowanymi neuraminidazą baraniami erytrocytami, z następnym wirowaniem na gradiencie Ficoll/Isopaque i hemolizą baranich krwinek buforem Gey'a. Monocyty były izolowane z PBMC metodą elutriacji. Użyto systemu elutriacyjnego JE-5.0 z wykorzystaniem 5 ml komory izolacyjnej Sandersona (Beckman, USA). Izolacja była przeprowadzana w temp. 10°C przy stałych obrotach rotora 3400/min. PBMC (100-200 ml, 2×10^6 /ml) były podawane do komory elutriacyjnej przy przepływie 18,5 ml/min i następnie elutriowane przez stopniowe zwiększanie przepływu aż do 25 ml/min. Zbierano 10 frakcji komórkowych (po 50 ml każda). Ostatnia frakcja (50 ml przy przepływie 30 ml/min) zbierana od momentu wyłączenia rotora była najbogatsza w monocyty; 85-90% czystości w analizie FACS (FACScanV, Becton-Dickinson, USA) z wykorzystaniem przeciwciała monoklonalnego Leu-M3 (Becton-Dickinson). Monocyty były zawieszane w koncentracji 1×10^6 /ml w podłożu RPMI-1640 (Biochrom, Niemcy) z antybiotykami (100 μ g/ml streptomycyny, 100 U/ml penicyliny, 25 μ g/ml gentamycyny), glutaminą (2 mM; Gibco, Wielka Brytania) i 10% płodową surowicą cielęcą (FCS, Biochrom) a następnie używane do dalszych eksperymentów.

3.2. Izolacja makrofagów mysich.

Mysie otrzewnowe makrofagi otrzymywano od 6-8 tygodniowych myszy wsobnych CBA/J płci męskiej. W celu indukcji akumulacji makrofagów, myszy były szczepione dootrzewnowo 2 ml thioglikolatu (Difco, USA). 5 dni później komórki były wypłukiwane z otrzewnej przy użyciu 5 ml PBS z heparyną (5 U/ml). Makrofagi były dalej izolowane przez adhezję do plastiku przez 2 godz. Komórki adherentne były następnie traktowane zimnym 0,02% EDTA w PBS (o temp. 4°C), płukane i zawieszane w koncentracji 1×10^6 /ml w medium RPMI-1640.

3.3. Izolacja komórek nowotworowych.

Komórki nowotworowe uzyskiwano z płynu wysiękowego chorych z rozsiewem nowotworowym do otrzewnej i wodobrzuszem. Zagęszczoną zawiesinę komórek z płynu wysiękowego otrzymanego po nakłuciu jamy otrzewnej wirowano na standardowym gradiencie Ficoll/Isopaque. Zawiesinę komórek otrzymanych z interfazy nawarstwiano na nieciągły gradient składający się z 10 ml 100% i 15 ml 75% Ficoll/Isopaque. Komórki wirowano 10 min. w temp. pokojowej przy 1700 obrotach/min. Komórki nowotworowe oceniano w mikroskopie świetlnym w stosunku do traktowanych jako artefakt komórek międzybłonka otrzewnej i leukocytów. Komórki nowotworowe były znajdowane na górze 75% frakcji Ficoll/Isopaque. Procedura była powtarzana 2-3 razy w wypadku niesatysfakcjonującego pierwotnego rozdziału. Następnie komórki były zawieszane w podłożu RPMI-1640 z antybiotykami oraz 20% FCS i hodowane metodą kolejnych pasażów aż do momentu wyprowadzenia linii nowotworowej.

3.4. Hodowle komórkowe.

Do eksperymentów użyto następujących komórek nowotworowych: utrwaloną linię ludzkich komórek raka jelita grubego DeTa [Bosslet i wsp., 1988]; ludzkie komórki raka trzustki HPC, ludzkie komórki raka żołądka CAV1 i ludzkie komórki raka jajnika CAOv1 (wyprowadzone w naszym laboratorium); ludzkie komórki raka pęcherza moczowego HU1703, ludzkie komórki nabłonka pęcherza moczowego HCV29 transfekowane onkogenem v-raf (T112) i komórki zdrowego ludzkiego nabłonka pęcherza moczowego HCV29 (otrzymane od doc. dr D. Duś, Zakład Immunologii Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław). Ludzkie zdrowe fibroblasty skórne-FMZ i komórki HCV29 były używane jako kontrola. Komórki hodowane były w podłożu RPMI-1640 z antybiotykami i glutaminą, w temp. 37°C, w 5% atmosferze CO₂ o podwyższonej wilgotności, pasażowane średnio 2 razy w tygodniu. W niektórych eksperymentach użyto traktowanych mitomycyną C (MMC; Sigma) komórek nowotworowych. Komórki były inkubowane z MMC (50 µg/ml) przez 20 min. w temp. 37°C, następnie płukane dwukrotnie w RPMI-1640 z 20% FCS przez 1 godz. i zawieszane w podłożu hodowlanym. Komórki nowotworowe były testowane na zanieczyszczenie *Mycoplasma sp.* przy użyciu standardowego podłoża PPLO.

3.5. Hodowla monocytów z komórkami nowotworowymi w celu określenia produkcji TNF α .

Monocyty (1 x 10⁶/ml) były hodowane z komórkami nowotworowymi w stosunku 10:1 na płaskodennych 96-dółkowych płytkach (Nunc). Komórki były hodowane przez 18 godz. w temp. 37°C, w 200 µl podłoża RPMI-1640 na dołek. Supernatanty były następnie zbierane i testowane na aktywność biologiczną i poziom TNF. W niektórych eksperymentach do stymulacji monocytów został użyty octan mirystyloforbolu (PMA - phorbol myristate acetate,

10 ng/ml; Sigma, Wielka Brytania).

3.6. Hodowla monocytów lub mysich makrofagów z komórkami nowotworowymi w celu określenia produkcji tlenku azotu (NO).

W celu indukcji produkcji NO, ludzkie monocyty lub mysie makrofagi otrzewnowe (1×10^6 /ml) były hodowane oddzielnie lub w obecności różnych stymulatorów w płaskodennych 96-dółkowych płytkach (Nunc). W praktyce do 100 μ l zawiesiny monocytów lub makrofagów dodawano stymulator zawieszony w 100 μ l podłoża. Kohodowle prowadzono przez 48 godz. w temp. 37°C w 5% atmosferze CO₂. Oprócz komórek nowotworowych (5×10^5 /ml lub 1×10^6 /ml traktowanych MMC) użyto następujących stymulatorów: ludzki rTNF α (100 U/ml, o aktywności 3×10^7 U/mg, otrzymany od prof. dr W. Steca, Polska Akademia Nauk, Łódź), IFN γ (500 U/ml, Genzyme), IL-2 (200 U/ml, EuroCetus) oraz LPS (10 μ g/ml, Sigma). Nadsącz był zbierany po 48 godz. od początku kohodowli i natychmiast testowany na zawartość azotynów.

3.7. Przeciwciała monoklonalne i analiza cytofluorymetryczna (FACS).

Zostały użyte przeciwciała monoklonalne przeciwko następującym antygenom: CD11a (LFA-1 α_1 chain), CD18 (LFA-1 β_2 chain), CD29 (VLA β_1 chain), CD44 (rozpoznające glikoproteinę o ciężarze 80-90 kD), CD51 (VNR), CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3) (wszystkie Immunotech, Francja). Ponadto zastosowano przeciwciała monoklonalne dla monomorficznych determinant HLA-DR (L243, ATCC, USA; BMA021, Behring, Niemcy) oraz dla monomorficznych determinant MHC klasy I (rozpoznające łańcuch ciężki α ; Behring). Jako kontrola służyły przeciwciała o korespondującym izotypie (OKT3, Ortho,

Niemcy) lub oczyszczone mysie izotypowe kontrole IgG₁ (MOPC1) i IgG_{2a} (obie immunoglobuliny Immunotech). Analiza cytofluorymetryczna była przeprowadzana przy użyciu FACScanV (Becton-Dickinson). Użyte przeciwciała były testowane na zanieczyszczenia endotoksyną bakteryjną przy użyciu Coatest Endotoxin (Chromogenix AB, Szwecja).

3.8. Blokowanie przeciwciałami monoklonalnymi interakcji: monocyt-komórka nowotworowa.

Różne przeciwciała monoklonalne oraz izotypowo zgodne przeciwciała kontrolne były dodawane w koncentracjach 1 $\mu\text{g/ml}$ do monocytów hodowanych z komórkami nowotworowymi. Równolegle monocyty lub komórki nowotworowe były preinkubowane przez 90 min. w temp. 37°C z tymi samymi przeciwciałami (o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$), następnie trzykrotnie płukane i dodawane odpowiednio do komórek nowotworowych lub monocytów. Komórki kohodowano przez 18 godz. w przypadku testowania nadsącza na obecność TNF lub 48 godz. w wypadku badania poziomu azotynów.

3.9. Określenie poziomu TNF α w badanych nadsączach z hodowli komórkowych.

Poziom czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF α) był określany za pomocą testu Elisa dla TNF α (TNF-alpha EASIA, Medgenix, Belgia). Jego aktywność biologiczna była oceniana w teście biologicznym z użyciem traktowanej aktinomycyną D mysiej linii fibroblastycznej L929. Test biologiczny przeprowadzano w następujący sposób: komórki L929 hodowano w płaskodennych 96-dołkowych płytkach (Nunc) w koncentracji 2 x 10⁴/dołek, w podłożu RPMI-1640 z 2% FCS. Po 18-godzinnej hodowli w 37°C badane nadsącze lub rekombinowany TNF α (wewnętrzny standard, testowany wcześniej w stosunku do standardu

86/659 rTNF α , NIBSC, Londyn) były dodawane do komórek L929 w dwukrotnych rozcieńczeniach podłożem RPMI-1640 z 2% FCS, począwszy od rozcieńczenia 1:10. Do każdego oczka dodawano aktinomycynę D (końcowe rozcieńczenie 1 μ g/ml, Sigma). Po 18 godz. inkubacji do komórek dodawano na 4 godz. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), a następnie ekstrahowano zredukowany barwnik za pomocą izopropanolu zawierającego 0,04 M HCl. Wyniki przedstawiano w U/ml odczytując je z krzywej standardowej rTNF α z wykorzystaniem kolorymetrycznego czytnika do płytek (Labsystems Multiskan PLUS, Finlandia) i programu komputerowego Labsystem.

3.10. Określenie poziomu tlenku azotu w nadsączach.

Produkcję tlenku azotu (NO) badano poprzez określenie poziomu azotynów (jako końcowego stabilnego produktu metabolizmu NO) w nadsączu. Użyto metody opisanej przez Ding'a i wsp. [Ding i wsp., 1988]. Próbkę badanych nadsączów (po 100 μ l) inkubowano przez 10 min. w temp. pokojowej z odczynnikami Griess'a (1% sulfanilamid/0,1% N-1-naphthylethylene diamine dihydrochloride/2,5% H₃PO₄). Absorbancja była mierzona przy długości fali 550 nm używając czytnika Labsystems Multiskan PLUS. Koncentrację azotynów odczytywano z krzywej standardowej używając NaNO₂ jako standardu.

3.11. Hamowanie syntezy tlenku azotu.

W celu hamowania aktywności syntazy tlenku azotu został użyty jej kompetycyjny inhibitor - N^G-monometylo-L-arginina (L-NMMA, Calbiochem, USA) w stężeniach 30-300 μ M [Hibbs i wsp., 1987]. W niektórych eksperymentach monocyty lub komórki nowotworowe były preinkubowane z tymi samymi dawkami L-NMMA przez 30 min. w 37°C, płukane, a

następnie dodawane odpowiednio do komórek nowotworowych lub monocytów.

3.12. Hamowanie syntezy białek w monocytach.

W celu zablokowania syntezy białek, monocyty były preinkubowane przez 30 min. w temp. 37°C z nieodwracalnymi inhibitorami syntezy białek - emetyną (10^{-7} - 10^{-5} M, Sigma) [Kowalczyk i wsp., 1984] lub aktinomycyną D (0,01-1 μ g/ml, Sigma). Emetyna lub aktinomycyna D były w niektórych eksperymentach dodawane do hodowli monocytów z komórkami nowotworowymi.

3.13. Selektywna inaktywacja monocytów.

Ponieważ w kohodowli monocytów z komórkami nowotworowymi zarówno jedne jak i drugie mogą potencjalnie produkować NO, do wybiórczej inaktywacji monocytów użyto czynnik lizosomotropowy Leu-OMe (L-leucine methyl ester, Sigma) [Thiele i wsp., 1983]. Monocyty były preinkubowane z różnymi koncentracjami (0,1-10 mM) Leu-OMe przez 30 min. w temp. 37°C przed dodaniem komórek nowotworowych lub Leu-OMe był dodawany do kohodowli.

3.14. Przygotowanie sondy cDNA dla TNF α i hybrydyzacja *in situ*.

Sonda cDNA dla ludzkiego TNF α była fragmentem restrykcyjnym (PstI-PstI) o wielkości 1178 par zasad w plazmidzie pGEM1 (otrzymanym od prof. W. Fiersa, Ghent University, Belgia). Fragment PstI-PstI był oczyszczany po trawieniu wektora enzymem restrykcyjnym PstI, przy pomocy elektroforezy w niskotopliwej agarozie (LMP, Sigma). Sonda była sulfonowana według instrukcji firmowej (Sigma). Służący jako kontrola plazmid

pGEM1 bez insertu dla TNF α , był preparowany identycznie. Monocyty i komórki nowotworowe hodowano przez 18 godz. w 24-dółkowej płytce (Nunc) na plastikowych szkiełkach (Thermanox, Nunc) pokrytych żelatyną, płukano dwukrotnie w PBS i utrwalano w 4% paraformaldehydzie przez 10 min. w temperaturze pokojowej, następnie płukano, odwadniano we wzrastających stężeniach etanolu i suszono. Po trawieniu proteinazą K (5 μ g/ml; Merck, Niemcy) przez 30 minut w 37°C i hydrolizie w 0,1 M HCl, komórki były płukane i ponownie utrwalane w 4% paraformaldehydzie. Następnie komórki poddawano prehybrydyzacji. Szkiełka były inkubowane z 200 μ l roztworu prehybrydyzacyjnego przez 2 godziny w temp. 42°C. Roztwór składał się z 500 μ l dejonizowanego 100% formamidu, 250 μ l 20 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M cytrynian sodu, pH 7,0), 50 μ l drożdżowego tRNA (10 mg/ml, Sigma), 10 μ l 100 x roztworu Denhardt'a (roztwór wodny zawierający 2% poliwinylpirolidonu, 2% cielejcej albuminy, 2% Ficoll'u), 10 μ l 5 M NaH₂PO₄, 80 μ l traktowanej DEPC (dwuetylopirowęglan, Sigma) destylowanej wody i 100 μ l świeżo zdenaturowanego DNA otrzymanego ze spermy łososia (1 mg/ml, Sigma). Po prehybrydyzacji komórki były hybrydyzowane z sulfonowaną sondą cDNA dla TNF α przez 18 godz. Roztwór hybrydyzacyjny składał się z 250 μ l 100% dejonizowanego formamidu, 75 μ l 20 x SSC i 12,5 μ l drożdżowego tRNA (10 mg/ml). Na każde szkiełko była nakładana mieszanina składająca się z 34 μ l roztworu hybrydyzacyjnego zmieszanego z 4-8 μ l zdenaturowanej i ochłodzonej na lodzie sondy dla TNF α , 1 μ l 50 x roztworu Denhardt'a, a na koniec uzupełniana do 50 μ l wolną od RNazy destylowaną wodą. Po hybrydyzacji szkiełka były płukane w 1 x SSC przez 10 min. w temp. 37°C, potem w 50% formamidzie w 1 x SSC i na koniec znów w 1 x SSC (w temp. pokojowej przez 10 min.) [Więckiewicz i wsp., 1993].

3.15. *Immunoenzymatyczne wywołanie reakcji z sulfonowaną sondą.*

Kohodowane komórki na szkiełkach Thermanox były inkubowane z roztworem blokującym (50 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, 0,3% Tween20, 25% odtłuszczone sproszkowane mleko, pH 7,5) przez 1 godz. w temp. pokojowej, a następnie z mysim przeciwciałem monoklonalnym anty-sulfonowany DNA (Sigma) rozcieńczonym 1:300 w roztworze blokującym (przez 1 godz. w temp. pokojowej). Po trzykrotnym płukaniu w PBS komórki inkubowano przez następną godzinę w temp. pokojowej z przeciwciałem anty-mysia-IgG₁ sprzęgniętym z alkaliczną fosfatazą (rozcieńczone 1:300 w roztworze blokującym). Szkiełka były następnie płukane, a reakcja wywoływana podczas 30-minutowej inkubacji komórek z roztworem NBT (nitroblue tetrazolium, Sigma) i BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylo-fosforan) w 0,1 M TRIS-HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5. Komórki były podbarwiane hematoksyliną i zatapiane na szkiełku podstawowym w roztworze gliceryny z żelatyną.

3.16. *Analiza statystyczna.*

Znamienność statystyczna pomiędzy grupami była określana przy użyciu niesparowanego dwustronnego testu *t*-Studenta. Wyniki uważano za statystycznie znamienne gdy $p < 0,05$.

4. Wyniki.

4.1. Stymulacja monocytów do wydzielania TNF α .

Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC), oczyszczone limfocyty T oraz monocyty otrzymane od zdrowych dawców hodowano w obecności nowotworowych komórek DeTa (rak jelita grubego). Po 18 godzinach nadsącz z kohodowli był zbierany i testowany na obecność TNF α . Komórki DeTa stymulowały PBMC i monocyty do produkcji TNF α (Rys.1). W tych samych warunkach limfocyty T stymulowane komórkami DeTa nie produkowały TNF α . Obserwowano jedynie niewielką spontaniczną produkcję TNF α przez PBMC lub monocyty (< 10 U/ml). Natomiast w supernatantach z hodowli samych komórek DeTa nie stwierdzono aktywności TNF α . Aktywność cytotoksyczna supernatantów względem komórek L929 była niemal kompletnie hamowana przez przeciwciało monoklonalne B7.21, anti-TNF α [Zembala, 1990]. Obserwacje te sugerowały, że monocyty były głównym źródłem TNF w PBMC oraz że TNF był typu α .

W celu określenia optymalnych warunków do produkcji TNF α , monocyty były hodowane z komórkami DeTa w różnych proporcjach. Komórki nowotworowe hodowane z monocytami, już w proporcji 0,05:1 stymulowały te ostatnie do produkcji TNF α (aktywność 412 U/ml) (Rys.2). Maksymalna produkcja TNF α (aktywność 508 U/ml) była stwierdzona przy proporcji komórek DeTa do monocytów jak 0,1:1 (oraz większych), i taki ich stosunek został wybrany do dalszych eksperymentów (Rys.2). Komórki raka żołądka CAV1 (świeżo wyizolowane od chorego) posiadały również zdolność stymulowania monocytów do nieco większej produkcji TNF α (Rys.3). W supernatantach z kohodowli monocytów otrzymanych od zdrowych dawców z fibroblastami (FMZ) wykazano niewielką aktywność TNF α (39,3

$\pm 21,7$ U/ml; średnia \pm SE obliczona z 12 kohodowli). Spontaniczna produkcja TNF α przez monocyty wynosiła $4,2 \pm 1,2$ U/ml.

W eksperymentach badających kinetykę wydzielania TNF α w hodowli monocytów z komórkami DeTa (i CAV1) wykazano, że komórki nowotworowe indukowały produkcję wykrywalnych ilości TNF α już po 4 godzinach hodowli, podczas gdy po 18 godzinach poziom TNF α osiągał plateau i nie zmieniał się zasadniczo po 48 godzinach (Rys.3). Dlatego w następnych eksperymentach komórki nowotworowe hodowano z monocytami przez 18 godz.

Wykorzystując świeżo wyizolowane od chorego komórki raka trzustki (HPC) stwierdzono, że posiadały one także zdolność do stymulowania monocytów do produkcji TNF α , którego ilość była porównywalna do poziomu tej cytokiny stwierdzonego w kohodowli z komórkami DeTa. Wyniki uzyskane testem biologicznym potwierdzono w teście ELISA (Rys.4). Produkcja TNF α przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi była wyższa niż po stymulacji PMA. Normalne komórki fibroblastyczne i komórki prawidłowego nabłonka dróg moczowych nie stymulowały monocytów do produkcji TNF α (Rys.4).

4.2. Indukcja ekspresji genu dla TNF α w monocytach stymulowanych komórkami nowotworowymi.

Monocyty od zdrowych dawców były hodowane z komórkami nowotworowymi linii DeTa. mRNA dla TNF α wykrywano za pomocą metody hybrydyzacji *in situ* używając sulfonowanej sondy cDNA dla TNF α . W kohodowli prowadzonej 4 godziny sygnał był widoczny w około 30% monocytów (Fot.2). Po 18 godzinach kohodowli sygnał był znacznie silniejszy (Fot.3), natomiast niestymulowane monocyty hodowane przez 18 godzin nie wykazywały sygnału dla TNF α -mRNA (dane nie przedstawiane). Obecność TNF α -mRNA wykrywano głównie w monocytach pozostających w ścisłym kontakcie z komórkami

nowotworowymi (Fot.2). Analogiczne obserwacje zostały poczynione w odniesieniu do komórek linii nowotworowej CAV1 otrzymanej od chorego z rakiem żołądka (Fot.4). W komórkach nowotworowych hodowanych z monocytami (Fot.2 i 3 w tle) oraz hodowanych oddzielnie (dane nie przedstawiane) nie wykryto TNF α -mRNA. Hybrydyzacja *in situ* z samym sulfonowanym wektorem bez insertu dla TNF α dała wynik negatywny (Fot.1). Wyciągnięto wniosek, że komórki nowotworowe mają zdolność do indukcji ekspresji *de novo* genu dla TNF α w ludzkich monocytach.

4.3. Indukcja wydzielania tlenku azotu (NO) przez monocyty po stymulacji komórkami nowotworowymi.

Ludzkie monocyty hodowano przez 48 godzin w obecności LPS (10 μ g/ml), IFN γ (500 U/ml), TNF α (100 U/ml) lub ich kombinacji. Pod wpływem stymulacji tymi czynnikami monocyty nie wydzielają NO. W przeciwieństwie do ludzkich monocytów, mysie makrofagi po dodaniu tych samych stymulatorów wydzielają NO (Rys.5). Jednakże ludzkie monocyty jak i mysie makrofagi otrzewnowe wydzielają NO w trakcie ich hodowli z nowotworowymi komórkami linii DeTa, chociaż ludzkie monocyty uwalniały mniej NO ($22,7 \pm 1,6 \mu$ M azotynów) niż komórki pochodzące od myszy ($66,2 \pm 18,7 \mu$ M azotynów). Wskazuje to na fakt, że jedynie komórki nowotworowe, a nie inne czynniki mogą indukować syntezę NO w ludzkich monocytach.

4.4. IFN γ nie posiada zdolności do preaktywacji monocytów do wydzielania tlenku azotu.

Brak wydzielania NO przez monocyty mógł wynikać z niedostatecznego stopnia ich aktywacji przed zadziałaniem stymulatora. Wiadomo, że mysie makrofagi mogą być

preaktywowane (1 sygnał) za pomocą IFN γ do wydzielania NO, którego produkcja zachodzi po ich dalszej stymulacji (2 sygnał) komórkami nowotworowymi lub cytokinami (np. IL-2) [Jiang i wsp., 1992]. Jednakże w przeprowadzonych eksperymentach monocyty człowieka preaktywowane *in vitro* przez 4 godziny hodowli w obecności IFN γ nie były zdolne do wydzielania NO po następczej stymulacji za pomocą IL-2 lub LPS. Natomiast monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi DeTa wydzielały NO (Rys.6), a jego poziom nie był wyższy w hodowlach monocytów z IFN γ . Sugerowało to, że monocyty człowieka są zdolne do produkcji NO tylko w odpowiedzi na niektóre sygnały stymulujące. Zatem monocyty człowieka zachowują się odmiennie od makrofagów mysich. Preaktywacja monocytów nie wpływa na ilość produkowanego przez nie tlenu azotu.

4.5. Stymulacja monocytów różnymi komórkami nowotworowymi do wydzielania tlenu azotu.

W celu ustalenia optymalnych warunków dla produkcji NO przez monocyty, komórki linii DeTa hodowano z monocytami w różnych proporcjach oraz stosując różne czasy kohodowli. Stwierdzono, że optymalna produkcja NO zachodzi w przypadku hodowli 1×10^5 monocytów z 1×10^4 komórek DeTa (Rys.7) przez 48 godzin (Rys.8) w objętości $100 \mu\text{l}$ podłoża. Aby upewnić się, że rzeczywiście monocyty, a nie limfocyty T odpowiadają za produkcję NO w hodowli z komórkami nowotworowymi, oczyszczone limfocyty T, monocyty lub PBMC od zdrowych dawców były przez 48 godz. hodowane w obecności komórek DeTa. Stwierdzono, że komórki DeTa stymulowały izolowane monocyty i PBMC do produkcji NO (Rys.9). Limfocyty T nie produkowały NO po stymulacji komórkami nowotworowymi. Spontaniczna produkcja NO przez PBMC i monocyty była niewielka ($< 6,5 \mu\text{M}$ azotynów).

Celem stymulacji monocytów do wydzielania NO użyto kilku różnych linii

nowotworowych. Jedynie komórki DeTa i w niewielkim stopniu CAV1 stymulowały monocyty do produkcji NO, podczas gdy komórki linii HPC, CAOv1, HU1703, T112, a także prawidłowe komórki nie wykazywały właściwości stymulujących (Rys.10).

Stwierdzono zatem, że jedynie niektóre komórki nowotworowe, a nie komórki prawidłowe, LPS lub cytokiny stymulują ludzkie monocyty do wydzielania NO. Wysoce ograniczona zdolność do indukcji syntezy NO nie była związane z niedojrzałością monocytów, albowiem monocyty hodowane *in vitro* przez 7 i 14 dni nie odpowiadały produkcją NO na stymulację LPS lub IFN γ . Ponadto komórki ludzkiej linii monocytarna U937 po stymulacji LPS lub IFN γ nie produkowały NO (dane nie prezentowane). Powyższe obserwacje sugerują istnienie innych mechanizmów prowadzących do indukcji sygnału do wydzielania NO w monocytach człowieka w porównaniu do makrofagów mysich.

4.6. Wpływ N^G-monometylo-L-argininy na syntezę tlenku azotu w monocytach stymulowanych komórkami linii DeTa.

N^G-monometylo-L-arginina (L-NMMA) jest specyficznym kompetycyjnym inhibitorem syntazy NO [Hibbs i wsp., 1987]. L-NMMA użyto w celu potwierdzenia tezy, że poziom azotynów odzwierciedla ilość NO wyprodukowanego przez monocyty, a nie przez komórki nowotworowe oraz że za produkcję NO odpowiada iNOS.

Zaobserwowano znamienne spadki produkcji NO ($p < 0.05$) w czasie hodowli monocytów z komórkami DeTa w obecności L-NMMA (Tabela 1). Na podstawie powyższej obserwacji stwierdzono, że za wytwarzanie tlenku azotu odpowiedzialna jest syntaza NO. Następnie zaobserwowano, że preinkubacja monocytów z L-NMMA przed dodaniem komórek nowotworowych powoduje znamienne ($p < 0.05$) spadki produkcji NO w kohodowli

(Tabela 1). Preinkubacja komórek nowotworowych nie wywoływała spadku produkcji NO w kohodowli (dane nie przedstawiane). Obserwacje te sugerują, że wzrost poziomu azotynów obserwowany podczas hodowli monocytów z komórkami nowotworowymi jest spowodowany produkcją NO przez syntazę NO obecną w monocytach.

4.7. Brak zależności produkcji tlenu azotu w hodowli monocytów z komórkami DeTa od proliferacji komórek nowotworowych.

Niektóre komórki nowotworowe wykazują zdolność do produkcji NO [Radomski i wsp., 1991; Werner-Felmayer i wsp., 1993]. W naszym układzie proliferujące komórki DeTa mogły być potencjalnym źródłem NO. Aby wykluczyć tę ewentualność, komórki nowotworowe przed dodaniem do monocytów preinkubowano z mitomycyną C (MMC) w celu zablokowania ich proliferacji, bez zahamowania metabolizmu. Ilość NO syntetyzowanego w kohodowli monocytów z komórkami DeTa traktowanymi MMC była porównywalna do uzyskiwanej w kohodowli monocytów z komórkami DeTa nie preinkubowanymi MMC (Rys.11). Sugeruje to, że poziom produkcji NO nie był uwarunkowany proliferacją komórek nowotworowych.

4.8. Wpływ czynnika lizosomotropowego i blokera syntezy białek na syntezę tlenu azotu w hodowli monocytów z komórkami nowotworowymi.

W kohodowli potencjalnym źródłem NO mogły być zarówno monocyty jak i komórki nowotworowe. W celu zidentyfikowania komórek produkujących NO użyto czynnika lizosomotropowy (Leu-OMe), który inaktywuje wybiórczo monocyty [Thiele i wsp., 1983]. Dodanie Leu-OMe do kohodowli monocytów z komórkami DeTa prowadziło do spadku

produkcji NO do poziomu tła (Rys.12). Podobny efekt uzyskano używając Leu-OMe do preinkubacji monocytów. W tym układzie Leu-OMe nie wpływał na spontaniczną produkcję NO przez monocyty. Sugerowało to, że w kohodowli monocyty są zasadniczym źródłem NO.

Makrofagi mysie posiadają indukowalną syntazę NO [Lorsbach i wsp., 1993]. Jednakże do tej pory nie udało się wykazać produkcji NO przez monocyty człowieka, stąd brak dowodów na występowanie aktywności iNOS w monocytach człowieka. Założono, że jeśli za produkcję NO przez monocyty człowieka po ich stymulacji komórkami nowotworowymi odpowiedzialna jest iNOS, to zahamowanie syntezy białek w monocytach powinno prowadzić do zahamowania produkcji NO. Preinkubacja monocytów z emetyną lub aktinomycyną D, nieodwracalnymi inhibitorami syntezy białek, niemal zupełnie zablokowała produkcję NO w kohodowli (Rys. 13 i 14). Dodanie emetyny lub aktinomycyny D do kohodowli dało podobny, zależny od dawki, efekt. Jednakże spontaniczna produkcja NO przez monocyty (i komórki nowotworowe - dane nie przedstawiane) nie była blokowana przez emetynę i aktinomycynę D. Może to sugerować obecność konstytutywnej syntazy NO w monocytach i komórkach nowotworowych. Preinkubacja komórek DeTa z emetyną, Leu-OMe lub aktinomycyną D nie miała wpływu na produkcję NO obserwowaną w hodowli monocytów z komórkami nowotworowymi.

Stwierdzono zatem, że aktywna synteza białek w monocytach jest konieczna do uwolnienia przez nie tlenu azotu. Na podstawie powyższych obserwacji można sądzić, że iNOS była syntetyzowana *de novo* w monocytach pod wpływem stymulacji komórkami nowotworowymi.

4.9. Rola cząsteczek adhezyjnych w interakcjach monocyt-komórka nowotworowa.

Uważa się, że cząsteczki adhezyjne odgrywają ważną rolę w interakcjach wymagających wzajemnego kontaktu komórek. Mają one szczególne znaczenie we wzajemnych oddziaływaniach pomiędzy komórkami NK lub monocytami a komórkami nowotworowymi [Schmidt i wsp., 1985; Springer, 1990].

Komórki HPC, izolowane od chorego i hodowane przez stosunkowo krótki czas, zostały użyte w dalszym ciągu do eksperymentów mających na celu wyjaśnienie, jakie cząsteczki na powierzchni komórek nowotworowych i monocytów są zaangażowane w ich wzajemne interakcje prowadzące do wydzielania przez monocyty czynników toksycznych dla komórek nowotworowych. Używana do badań linia HPC wykazywała ekspresję antygenów: CD29, CD44, CD51, CD54 i CD58. Wydawała się zatem dogodnym modelem do określenia roli wspomnianych struktur powierzchniowych w interakcjach komórek nowotworowych z monocytami.

W celu poznania struktur powierzchniowych istotnych dla wzajemnych oddziaływań badanych komórek, użyto szeregu przeciwciał monoklonalnych (reagujących z różnymi przedstawicielami rodziny cząsteczek adhezyjnych) do sprawdzenia ich wpływu na syntezę $\text{TNF}\alpha$ i NO. Wykorzystano również komórki DeTa, a uzyskane wyniki były podobne do tych, które otrzymano w przypadku hodowli monocytów z komórkami HPC. Rezultaty zostały przedstawione tylko w odniesieniu do HPC. Wyniki dotyczące badania poziomu TNF w supernatantach pochodzą z testu biologicznego, lecz zostały potwierdzone testem ELISA dla $\text{TNF}\alpha$.

4.9.1. Indukcja produkcji $TNF\alpha$.

Przeciwciała anty-CD11a, -CD18, -CD29, -CD51, -CD54, -CD58 dodawane do hodowli monocytów z komórkami HPC nie wpływały na produkcję $TNF\alpha$ (Rys.15). Stwierdzono natomiast, że przeciwciała anty-CD44 wykazywały silny efekt hamujący. Monocyty stymulowane PMA służyły jako kontrola. Wymienione wyżej przeciwciała (w tym anty-CD44) nie wywierały wpływu na produkcję $TNF\alpha$ przez monocyty stymulowane PMA. Wyniki z eksperymentów wykorzystujących do stymulacji komórki nowotworowe DeTa były podobne, aczkolwiek efekt blokowania produkcji $TNF\alpha$ przez monocyty był słabiej wyrażony.

Obecność cząsteczek CD44 stwierdzono zarówno na monocytach jak i na komórkach HPC. Przed dodaniem do kohodowli, monocyty lub komórki nowotworowe były preinkubowane z przeciwciałami anty-CD44 lub odpowiednią kontrolą izotypową. Preinkubacja komórek HPC w większym stopniu niż preinkubacja monocytów wpływała na obniżenie wydzielania $TNF\alpha$ przez monocyty w kohodowli z komórkami nowotworowymi (Rys.16). Preinkubacja z kontrolnym przeciwciałem tego samego izotypu (IgG_1) nie wpływała na produkcję $TNF\alpha$.

Powyższe obserwacje sugerują, że cząsteczki CD44 zlokalizowane na komórkach nowotworowych mogą być włączone w indukcję produkcji $TNF\alpha$ przez monocyty.

4.9.2. Indukcja produkcji tlenu azotu.

Komórki linii DeTa używane do indukcji syntezy NO nie wykazywały obecności cząsteczek adhezyjnych na swej powierzchni. Jednakże przeciwciała monoklonalne anty-CD29, -CD44 i -CD58 dodane do kohodowli monocytów z komórkami linii DeTa znamienne ($p < 0.05$) blokowały produkcję NO (Rys.17). Przeciwciała skierowane przeciwko

innym cząsteczkom adhezyjnym były bez wpływu na produkcję NO. Preinkubacja komórek nowotworowych lub monocytów z przeciwciałami anti-CD29, -CD44, i -CD58 nie powodowała znamienego zahamowania produkcji NO w kohodowli. Użyte jako kontrola przeciwciało OKT3 o izotypie IgG_{2a} (dla przeciwciał anti-CD29 i -CD58) lub mysia immunoglobulina o izotypie IgG₁ (dla przeciwciała anti-CD44), nie wpływały na produkcję NO przez monocyty w kohodowli. Powyższe obserwacje sugerują, że cząsteczki CD29, CD44 i CD58 zlokalizowane na powierzchni monocytów mogą być zaangażowane są w proces indukcji wydzielania NO pod wpływem stymulacji komórkami nowotworowymi.

4.10. Rola cząsteczek MHC klasy I i II w stymulacji monocytów komórkami nowotworowymi do produkcji TNF α i NO.

W nacieku komórkowym otaczającym tkankę nowotworową zarówno makrofagi jak i niektóre komórki guza produkują TNF α *in situ* i wykazują ekspresję cząsteczek MHC klasy II [Zembala i wsp., 1989; Teh i wsp., 1992; Beissert i wsp., 1989; Naylor i wsp., 1990; Zembala i wsp., 1990]. Powstało pytanie, czy cząsteczki MHC są zaangażowane w interakcje komórek nowotworowych i monocytów, a w szczególności w przenoszenie sygnału prowadzącego do produkcji TNF α i NO przez monocyty. Aby zbadać to zjawisko, przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko monomorficznym determinantom MHC klasy I lub HLA-DR dodawano do hodowli monocytów z komórkami nowotworowymi. Komórki HPC wykazywały ekspresję determinant MHC klasy I, natomiast komórki linii DeTa nie posiadały na swej powierzchni cząsteczek MHC.

4.10.1. Produkcja $TNF\alpha$.

Przeciwciała anty-HLA-DR (L243) hamowały w istotny sposób ($p < 0.05$) produkcję $TNF\alpha$ przez monocyty stymulowane komórkami HPC. Przeciwciała dla MHC klasy I lub kontrolne przeciwciało (OKT3) o tym samym izotypie (IgG_{2a}), a także mysia immunoglobulina o izotypie IgG_{2a} , pozostawały bez wpływu na produkcję $TNF\alpha$ przez monocyty (Rys.18a). Te same przeciwciała zostały użyte w celu zbadania, czy produkcja $TNF\alpha$ przez monocyty stymulowane PMA zostanie również zahamowana. Nie zaobserwowano efektu blokującego (Rys.18b). Także dodanie przeciwciała L243 do niestymulowanych monocytów nie pobudzało ich do wydzielania $TNF\alpha$. Efekt blokujący, choć mniej nasilony, obserwowano również przy użyciu innego przeciwciała anty-HLA-DR (BMA 021; dane nie przedstawiane).

Ponieważ potencjalnie zarówno monocyty jak i komórki nowotworowe mogą posiadać na swej powierzchni cząsteczki HLA-DR, tak więc komórki nowotworowe jak i monocyty były preinkubowane z przeciwciałami anty-HLA-DR, a następnie dodawane odpowiednio do monocytów lub komórek nowotworowych. Preinkubacja monocytów z przeciwciałem anty-HLA-DR prowadziła do istotnego ($p < 0.05$) zahamowania produkcji $TNF\alpha$ (Rys.19). Preinkubacja komórek nowotworowych nie miała wpływu na produkcję $TNF\alpha$ w kohodowli. Kontrolne przeciwciała nie miały znaczenia dla wydzielania $TNF\alpha$.

Wyniki te sugerują, że cząsteczki HLA-DR znajdujące się na monocytach są włączone w proces indukcji wydzielania $TNF\alpha$ po stymulacji niektórymi komórkami nowotworowymi.

4.10.2. Produkcja tlenku azotu.

Przeciwciało L243 dodane do hodowli monocytów z komórkami nowotworowymi DeTa hamowało w istotny sposób ($p < 0.05$) wydzielanie NO przez monocyty (Rys.20). Podobny, choć nieco słabiej wyrażony efekt hamujący, posiadało przeciwciało BMA 021 (również anti-HLA-DR; dane nie przedstawiane). Zaobserwowano jednak, że oprócz przeciwciał monoklonalnych anti-HLA-DR, również przeciwciała dla MHC klasy I w istotny sposób ($p < 0.05$) hamowały wydzielanie NO w kohodowli. Przeciwciało OKT3 (IgG_{2a}) użyte jako kontrola izotypowa (dla anti-HLA-DR i anti-MHC klasy I) pozostawało bez wpływu na produkcję NO. Preinkubacja monocytów lub komórek nowotworowych DeTa przeciwciałami anti-MHC klasa I lub anti-HLA-DR nie prowadziła do znamienego zahamowania produkcji NO w kohodowli.

Powyższe obserwacje wskazują, że cząsteczki MHC klasy I i HLA-DR, najprawdopodobniej te, które znajdują się na powierzchni monocytów, biorą udział w procesie przekazywania sygnału do indukcji syntezy NO przez monocyty po kontakcie z niektórymi komórkami nowotworowymi.

5. Dyskusja.

Pochodzenie TNF α znajdowanego w dużym stężeniu w surowicy niektórych chorych na nowotwory [Aderka i wsp., 1985; Balkwill i wsp., 1987; Zembala i wsp., 1988] pozostaje niejasne. Aktywowane makrofagi zdają się być głównym źródłem tej cytokiny [Wong i wsp., 1989]. Również monocyty krwi obwodowej izolowane od niektórych pacjentów z chorobą nowotworową wykazują zwiększoną zdolność do uwalniania TNF α [Aderka i wsp., 1985; Zembala i wsp., 1988]. W badaniach histopatologicznych stwierdzono, że TIM znakują się przeciwciałami monoklonalnymi dla TNF α lub wykazują obecność TNF α mRNA [Beisert i wsp., 1989]. Jednakże istnieją doniesienia, że również komórki nowotworowe mogą syntetyzować i wydzielać TNF α [Naylor i wsp., 1990]. Niejasna jest istota sygnału prowadzącego do indukcji ekspresji genu dla TNF α i jego wydzielania przez TIM, a także pytanie czy i jak makrofagi mogą rozróżniać komórki transformowane od prawidłowych, pozostaje bez odpowiedzi [Zembala i wsp., 1989].

W niniejszej pracy użyto hodowli ludzkich monocytów krwi obwodowej z komórkami nowotworowymi, jako modelu *in vitro* wzajemnych oddziaływań między TIM i nowotworem *in situ*. Stosując ten model wykazano:

- i) komórki nowotworowe mogą bezpośrednio stymulować ludzkie monocyty do syntezy i wydzielania TNF α ;
- ii) niektóre komórki nowotworowe mogą bezpośrednio stymulować ludzkie monocyty do syntezy i wydzielania tlenku azotu;
- iii) antygeny MHC klasy II oraz cząsteczki CD44 są włączone w interakcje monocytów z komórkami nowotworowymi prowadzące do syntezy TNF α :

iv) antygeny MHC klasy I i II oraz cząsteczki CD29, CD44 i CD58 biorą udział w interakcjach prowadzących do wydzielania tlenu azotu.

Kohodowla komórek linii DeTa (rak jelita grubego) oraz izolowanych od chorego komórek HPC (rak trzustki) z ludzkimi monocytami krwi obwodowej prowadziła do pojawienia się $\text{TNF}\alpha$ w nadsączu. Pozostawało to w zgodzie z wcześniejszymi obserwacjami stwierdzającymi obecność $\text{TNF}\alpha$ w nadsączu z hodowli mysich makrofagów otrzewnowych z transformowanymi nowotworowo, a nie z nietransformowanymi komórkami [Hasday i wsp., 1990]. Również w niniejszych eksperymentach prawidłowe ludzkie fibroblasty i komórki nabłonka pęcherza moczowego nie stymulowały monocytów do wydzielania $\text{TNF}\alpha$. Otwartym pytaniem pozostawało, jakie elementy budowy komórki nowotworowej stanowią bodziec indukujący w ludzkich monocytach syntezę $\text{TNF}\alpha$. Wcześniejsze badania opisujące zjawisko stymulacji ludzkich monocytów do wydzielania $\text{TNF}\alpha$ za pomocą izolowanych z komórek nowotworowych błon komórkowych [Janicke i wsp., 1990; Demarco i wsp., 1992] wskazywały, że są to struktury związane z powierzchnią komórki nowotworowej.

Przeprowadzone obserwacje wykazały, że $\text{TNF}\alpha$ mRNA występuje w monocytach hodowanych z komórkami nowotworowymi. Obserwacja ta przemawia za faktem, że komórka nowotworowa indukuje syntezę *de novo* $\text{TNF}\alpha$ w monocytach, a nie jedynie sprzyja uwalnianiu $\text{TNF}\alpha$ z istniejących już rezerw komórkowych lub z jego prekursorów [Wong i wsp., 1989]. W użytym modelu komórki nowotworowe nie stymulowały limfocytów T do produkcji $\text{TNF}\alpha$. Potwierdziło to sytuację znajdowaną *in situ*, bowiem obecność $\text{TNF}\alpha$ stwierdzano w skrawkach z tkanek nowotworowych w TIM, a nie w limfocytach [Beissert i wsp., 1989]. Czyni to zaproponowany model *in vitro* wiarygodnym i odzwierciedlającym sytuację obserwowaną w zapalnym nacieku okołonowotworowym.

Powyższe obserwacje rodzą pytanie, czy TIM mogą być stymulowane do produkcji TNF α w mikrośrodowisku nowotworu w sposób analogiczny jak monocyty w użytym modelu *in vitro*. Jak wspomniano wyżej, TNF α czy TNF α -mRNA znajdowano w TIM [Beissert i wsp., 1989]. Obecność TNF α -mRNA w TIM potwierdzono również metodą hybrydyzacji *in situ* we własnych badaniach z użyciem skrawków histopatologicznych raka żołądka (dane nie przedstawiane). W świetle tych obserwacji można stwierdzić, że system hodowli monocytów krwi obwodowej z komórkami nowotworowymi może być uważany za model *in vitro* interakcji zachodzących *in situ* pomiędzy TIM i komórkami nowotworowymi. Jest on wolny od wpływu innych elementów mikrośrodowiska guza nowotworowego, przynajmniej jeśli chodzi o zjawisko indukcji syntezy TNF α . Otwartym pozostaje pytanie, czy TIM są głównym źródłem TNF α znajdowanego we krwi chorych na nowotwory [Balkwill i wsp., 1987], ponieważ zarówno komórki nowotworowe [Naylor i wsp., 1990], jak i aktywowane monocyty [Aderka i wsp., 1985; Balkwill i wsp., 1987; Zembala i wsp., 1988, 1993] mogą syntetyzować TNF α .

Wykorzystując system hodowli ludzkich monocytów i komórek nowotworowych stwierdzono również, że w podobnych warunkach ludzkie monocyty po kontakcie z niektórymi komórkami nowotworowymi syntetyzują i wydzielają NO. Według dostępnych danych, przemiana cząsteczek L-argininy do NO wymaga uprzedniej indukcji syntazy NO. W przypadku makrofagów mysich, syntaza NO zostaje zaindukowana w makrofagu podczas bezpośredniego kontaktu z komórką nowotworową [Keller i wsp., 1989; Hibbs i wsp., 1988; Lorschbach i wsp., 1993; Nozaki i wsp., 1993]. U człowieka brak dowodów na obecność iNOS w monocytach/makrofagach i niniejsze doświadczenia są pierwszymi z tego zakresu.

Brak odpowiedniej sondy cDNA dla iNOS w ludzkich monocytach uniemożliwia

wykazanie obecności tego enzymu w mikrośrodowisku guza nowotworowego. Trzeba zatem zadać pytanie, czy rzeczywiście bezpośredni kontakt monocytów/makrofagów z komórkami nowotworowymi *in situ* może prowadzić do uwalniania NO, na co wskazują wyniki otrzymane w warunkach *in vitro*. Dowodem pośrednim może być stwierdzenie zwiększonej produkcji NO u chorych z nowotworami poddanych terapii z wykorzystaniem IL-2. Jednakże nie udało się określić jakie jest jego źródło komórkowe [Hibbs i wsp., 1992; Ochoa i wsp., 1992].

Stwierdzono, że cytokiny i LPS nie preaktywują ani nie aktywują monocytów człowieka (w przeciwieństwie do makrofagów mysich) do wydzielania NO. Wiadomo również, że niektóre cytokiny, jak: $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ czy IL-2, wzmagają cytotoksyczną aktywność ludzkich monocytów [Mantovani, 1989; Siedlar i wsp., 1992]. Tak więc prawdopodobnie po stymulacji monocytów cytokinami szlak metaboliczny, którego końcowym produktem jest NO (uwalniany jako toksyczny mediator), nie jest wykorzystywany. Ponadto zaobserwowano, że jedynie kohodowla z niektórymi komórkami nowotworowymi aktywowała ludzkie monocyty do produkcji NO. Z powyższych obserwacji wynika, że synteza NO w monocytach człowieka może być regulowana na innej drodze niż w makrofagach mysich, które mogą być aktywowane nie tylko przez komórki nowotworowe, ale LPS i cytokiny [Ding i wsp., 1988; Isobe i wsp., 1993]. Wniosek ten znajduje częściowe potwierdzenie w ostatnio publikowanych doniesieniach [Fuchs i wsp., 1994]. Opisane wyżej zjawiska implikują pośrednio, że w przypadku monocytów człowieka czynnikiem aktywującym syntezę NO może być bezpośredni kontakt z komórką nowotworową.

Na podstawie niniejszych obserwacji można sugerować, że u człowieka NO jest włączony jako cząsteczka efektorowa w odpowiedź gospodarza na rozwijający się nowotwór, a jego źródłem mogą być TIM. Spontaniczna produkcja NO przez komórki nowotworowe

i monocyty nie była zmieniona przez emetynę, Leu-OMe i aktinomycynę D, co może sugerować obecność konstytutywnej syntazy NO zarówno w komórkach nowotworowych jak i w monocytach. Rzeczywiście, w ostatnim czasie opisano aktywność konstytutywnej syntazy NO w komórkach ludzkich linii gruczolaka jelita grubego SW480, SW620 i raka szyjki macicy ME-180 [Radomski i wsp., 1991; Werner-Felmayer i wsp., 1993].

Zaobserwowano, że pewne komórki nowotworowe chociaż indukują syntezę $TNF\alpha$, nie są zdolne do pobudzenia wydzielania NO przez monocyty. Sugerować to może, że różne struktury powierzchniowe komórek nowotworowych mogą być odpowiedzialne za indukcję różnych mechanizmów efektorowych w monocytach. W tym kontekście monocyt/makrofag mógłby nie tylko odróżniać komórki transformowane nowotworowo od nietransformowanych, ale też byłby w stanie "rozróżniać" komórki nowotworowe pomiędzy sobą. Wniosek taki pozostaje w zgodzie z licznymi wcześniejszymi obserwacjami mówiącymi, że monocyty posiadają zdolność do dyskryminowania komórek transformowanych nowotworowo od zdrowych. Monocyty chorych na chorobę nowotworową i monocyty pochodzące od zdrowych dawców były w stanie niszczyć komórki nowotworowe nie uszkadzając równocześnie komórek zdrowych [Galligioni i wsp., 1993; Mantovani i wsp., 1979; Fidler i wsp., 1984]. Być może cząsteczka CD44 jest jedną ze struktur znajdujących się na powierzchni komórki nowotworowej, która indukuje sygnał prowadzący do uruchomienia w monocytach niektórych mechanizmów efektorowych (np. uwalniania $TNF\alpha$). Alternatywnie, te same determinanty komórek nowotworowych mogą reagować z różnymi strukturami powierzchni komórek efektorowych - jednakże uzyskane wyniki (patrz niżej) wydają się temu przeczyć.

Uważa się, że cząsteczki adhezyjne (np. LFA-1, ICAM-1) są niezwykle istotne dla wielu procesów wymagających wzajemnego kontaktu lub przylegania leukocytów. W

szczegółności ich udział jest konieczny dla indukcji procesu niszczenia komórek nowotworowych przez cytotoksyczne limfocyty T (CTL) lub komórki NK [Krensky i wsp., 1983; Schmidt i wsp., 1985]. Ponieważ wcześniejsze dane wskazywały, że bezpośredni kontakt pomiędzy komórką nowotworową a efektorową sprzyja uszkodzeniu tej pierwszej, postawiono pytanie, czy cząsteczki adhezyjne są zaangażowane w interakcje prowadzące do produkcji i wydzielania przez monocyty człowieka czynników uważanych za toksyczne dla komórek nowotworowych - $\text{TNF}\alpha$ i NO. Otrzymane wyniki wskazują, że przeciwciała monoklonalne dla CD11a, CD18, CD29, CD51, CD54 i CD58 nie blokowały produkcji $\text{TNF}\alpha$ w kohodowli monocytów z komórkami nowotworowymi, chociaż integryny leukocytarne (CD11a,b,c/CD18) mogą odgrywać dużą rolę w zależnym od bezpośredniego kontaktu uszkodzeniu komórek nowotworowych przez aktywowane monocyty [Bernasconi i wsp., 1991]. Monocyty posiadały na swej powierzchni wszystkie wspomniane cząsteczki, łącznie z CD44, a komórki HPC wykazywały ekspresję CD29, CD44, CD51, CD54 i CD58. Komórki DeTa nie posiadały na swej powierzchni żadnej z wyżej wymienionych determinant. Obserwacje te są podobne do stwierdzonego braku blokowania za pomocą przeciwciał anti-CD11a cytotoksycznego uszkodzenia komórek linii mastocytoma P815 (CD11a^+) przez cytotoksyczne limfocyty T [Pallison i wsp., 1992]. W tych samych warunkach przeciwciała monoklonalne przeciw CD29, CD44 i CD58 blokowały syntezę NO. Należy stwierdzić, że fakt blokowania syntezy NO przez przeciwciała anti-CD29 i -CD58, bez równoczesnego wpływu na syntezę $\text{TNF}\alpha$, podkreśla odrębność sygnałów, jakimi monocyty są pobudzane do syntezy różnych mediatorów o potencjalnym działaniu cytotoksycznym na komórki nowotworowe.

Efekt blokujący przeciwciał monoklonalnych dla CD44 wskazuje na rolę tej cząsteczki

we wzajemnych interakcjach pomiędzy monocytym a komórką nowotworową. Niewiele wiadomo jest na temat funkcji CD44. CD44 występuje na wielu prawidłowych i nowotworowych komórkach, a jej obecność koreluje z dynamiką wzrostu i zdolnością guza do przerzutowania [Knudson i wsp., 1990; Sy i wsp., 1992]. Częsteczka CD44 jest włączona w procesy przylegania pomiędzy różnymi komórkami. Sądzi się, że głównie kwas hialuronowy, jak też i inne elementy macierzy międzykomórkowej mogą służyć jako cząsteczkowe "pomosty" pomiędzy komórkami guza a komórkami podścieliska produkującymi dla tych pierwszych czynniki wzrostowe [Sy i wsp., 1991; Toyama-Sorimachi i wsp., 1993]. Przedstawione wyniki wskazują, że cząsteczki CD44 (w większym stopniu na komórkach nowotworowych w przypadku syntezy $\text{TNF}\alpha$) są zaangażowane w interakcje pomiędzy monocytami a komórkami nowotworowymi oraz że mogą ułatwiać produkcję $\text{TNF}\alpha$ i NO przez monocyty. Ponieważ większość monocytów posiada na swej powierzchni cząsteczki CD44, nie można wykluczyć sytuacji, że cząsteczki CD44 zarówno na monocytach jak i na komórkach nowotworowych mogą ułatwiać interakcje komórkowe prowadzące w końcowym efekcie do indukcji syntezy $\text{TNF}\alpha$ lub NO. Sytuacja może być analogiczna do spotykanej w wypadku wzajemnych interakcji cząsteczek LFA-1 i ICAM-1 na monocytach i limfocytach T [Dustin i wsp., 1991]. Ponieważ nie wszystkie komórki nowotworowe wykazują ekspresję CD44, być może cząsteczki te nie są uniwersalnym sygnałem indukującym wydzielanie cytokin i NO przez monocyty. W szczególności komórki linii DeTa nie posiadają determinant CD44, a stymulują monocyty do produkcji i wydzielania $\text{TNF}\alpha$ (choć nieco słabiej od komórek HPC) oraz NO. Z kolei komórki raka trzustki (HPC) wykazują ekspresję CD44 na swej powierzchni lecz stymulują monocyty tylko do produkcji $\text{TNF}\alpha$, a nie NO. Wydaje się więc możliwe, że obecność cząsteczek CD44 na powierzchni komórek nowotworowych

jest bardziej istotna dla indukcji syntezy $\text{TNF}\alpha$, a na powierzchni monocytów dla indukcji syntezy NO.

Preinkubacja komórek nowotworowych linii DeTa, jak też i monocytów z przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD44 (oraz anti-CD29 i -CD58) nie powodowała istotnego zahamowania uwalniania NO w kohodowli, w przeciwieństwie do przeciwciał dodawanych do kohodowli na stałe. Fakt ten może tłumaczyć zjawisko dużej dynamiki wymiany struktur powierzchniowych monocytów. Tak więc nie zawsze można określić wprost (jak to się udało w wypadku $\text{TNF}\alpha$, być może na skutek krótszego czasu trwania indukcji), na której z dwu kohodowanych komórek występuje cząsteczka odgrywająca zasadniczą rolę we wzajemnych interakcjach.

Wykazanie, że determinanty MHC mogą być związane z interakcjami monocyt-komórka nowotworowa, wydaje się intrygujące. Zasadniczą funkcją antygenów zgodności tkankowej jest ich udział w prezentacji antygenów konwencjonalnych limfocytom T cytotoksycznym (udział biorą MHC klasy I) lub pomocniczym (zaangażowane są MHC klasy II) [Bodmer, 1987]. Wiadomo, że antygeny MHC klasy I mogą odgrywać dużą rolę w procesie odpowiedzi immunologicznej na rozwijający się nowotwór. Utrata z powierzchni komórek nowotworu cząsteczek MHC klasy I kojarzy się często z progresją procesu nowotworowego. Zjawisko to może być spowodowane "ucieczką" transformowanych komórek spod nadzoru immunologicznego limfocytów T cytotoksycznych rozpoznających antygeny nowotworowe w kontekście MHC klasy I [Teh i wsp., 1992]. Determinanty MHC klasy II są również ważnymi cząsteczkami w odpowiedzi immunologicznej gospodarza na rozwijający się u niego nowotwór. Wynika to między innymi z obserwacji, że wzmożona ekspresja antygenów MHC klasy II na komórkach nowotworowych u myszy koreluje ze zmniejszoną

zdolnością do rozrostu guza [Morris i wsp., 1992] oraz jest związana z lepszym rokowaniem w niektórych nowotworach u ludzi [Esteban i wsp., 1990]. U myszy limfocyty CD4, a nie CD8 są odpowiedzialne za swoistą odpowiedź przeciwnowotworową, jako że usunięcie limfocytów CD4 wzmacnia rozrost guza [Morris i wsp., 1992]. Obserwacje powyższe mogą pośrednio wskazywać na rolę cząsteczek MHC klasy II w indukcji przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej.

Ludzkie komórki nowotworowe hodowane *in vitro* zwykle nie wykazują ekspresji determinant MHC klasy II, jednakże mogą być one indukowane za pomocą $IFN\gamma$ [Lahat i wsp., 1992]. Komórki nowotworowe użyte do przeprowadzenia niniejszych eksperymentów nie wykazywały konstytutywnej (ani po stymulacji $IFN\gamma$ - dane nie przedstawiane) ekspresji cząsteczek MHC klasy II. Mimo to, niektóre spośród nich miały zdolność stymulowania monocytów do syntezy oraz wydzielania $TNF\alpha$ i NO. Sekrecja $TNF\alpha$ i NO była blokowana po dodaniu przeciwciał monoklonalnych anti-HLA-DR do hodowli monocytów z komórkami nowotworowymi. Zahamowanie ekspresji *de novo* genu dla $TNF\alpha$ przy pomocy przeciwciał monoklonalnych anti-HLA-DR zostało również potwierdzone w następnych pracach [Zembała i wsp., 1994]. Sugeruje to, że cząsteczki MHC klasy II są włączone w interakcje pomiędzy komórkami nowotworowymi oraz monocytami, które to z kolei interakcje prowadzą do przekazania sygnału indukującego uwalnianie $TNF\alpha$ i NO przez monocyty. Swoistość oraz selektywność blokowania potwierdziły następujące obserwacje:

- i) przeciwciała monoklonalne anti-HLA-DR nie blokowały produkcji $TNF\alpha$ przez monocyty stymulowane PMA;
- ii) przeciwciała monoklonalne o tym samym izotypie co anti-HLA-DR nie miały właściwości blokujących;

iii) preinkubacja monocytów, a nie komórek nowotworowych z przeciwciałami monoklonalnymi anti-HLA-DR prowadziła do zahamowania produkcji $\text{TNF}\alpha$.

W ostatnim czasie wykazano rolę cząsteczek MHC klasy II w przenoszeniu sygnału w limfocytach B, komórkach maziówki i monocytach. Stwierdzono, że limfocyty B ulegają różnicowaniu i proliferacji po związaniu przez cząsteczki MHC klasy II superantygeny TSST-1 (toxic shock syndrome toxin 1) [Mourad i wsp., 1989]. Również interakcje superantygenów takich jak TSST-1 lub paciorkowcowa enterotoksyna B z cząsteczkami MHC klasy II na ludzkich komórkach maziówki [Mourad i wsp., 1992] lub monocytach [Trede i wsp., 1991] wzmagają ekspresję genów dla $\text{IL-1}\beta$ i $\text{TNF}\alpha$. Było to związane z aktywacją wewnątrz komórki kinazy tyrozynowej i białkowej kinazy C [Trede i wsp., 1994].

Wszystkie powyższe informacje sugerują, że cząsteczki MHC klasy II odgrywają ważną rolę w stymulacji monocytów do produkcji $\text{TNF}\alpha$ i NO. Może to stanowić nowy mechanizm, za pomocą którego komórki mezenchymy, również makrofagi tkankowe posiadające na swej powierzchni cząsteczki MHC klasy II [Zembala i wsp., 1989], są stymulowane w bezpośrednim sąsiedztwie komórek nowotworowych do wydzielania cytotoksycznych czynników, takich jak $\text{TNF}\alpha$ i NO.

Niniejsze obserwacje wskazują, że uwalnianie NO (w przeciwieństwie do uwalniania $\text{TNF}\alpha$) przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi (DeTa) było blokowane także przez przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw łańcuchowi ciężkiemu cząsteczek MHC klasy I. Tak więc prawdopodobnie antygeny MHC klasy I, oprócz antygenów MHC klasy II, są zaangażowane w procesy indukcji syntezy i uwalniania NO. Obserwacja ta jest o tyle interesująca, że do chwili obecnej antygeny MHC klasy I były rozpatrywane głównie w kontekście prezentacji limfocytom T "wewnątrzpochodnych" antygenów wirusowych lub

nowotworowych [Kourilsky i wsp., 1989]. Ich udział w przenoszeniu sygnału do wnętrza komórki był opisywany jedynie w przypadku przenoszenia sygnału aktywującego limfocyty T [Tscherning i wsp., 1994; Dasgupta i wsp., 1990]. Być może, łańcuch ciężki cząsteczki MHC klasy I pełni na powierzchni monocytu podczas indukcji syntezy NO przez komórkę nowotworową analogiczną rolę, jak cząsteczka CD28 na limfocycie T, reagująca z cząsteczką B7 na komórce prezentującej antygen. Interakcja ta dostarcza "drugi sygnał" limfocytowi T, pozwalając mu uniknąć anergii na prezentowany antygen [Wade i wsp., 1993]. W przypadku łańcucha ciężkiego MHC klasy I, nieznany ligand na komórce nowotworowej mógłby dostarczać również "drugi sygnał", aktywując monocyt do syntezy indukowalnej syntazy NO oraz następnie do produkcji NO. Za tą koncepcją może przemawiać fakt, że antygeny MHC klasy I mogą bezpośrednio, bez konieczności wewnątrzkomórkowego sprzężenia, przyłączać niektóre, na przykład wirusowe, białka [Kubitscheck i wsp., 1992; Townsend i wsp., 1989; Cerundolo i wsp., 1991]. Tak więc, być może, cząsteczki MHC klasy I i II monocytu mogą bezpośrednio wiązać bliżej nieokreślone ligandy na powierzchni komórki nowotworowej, co prowadzi w efekcie do indukcji syntezy NO. Fakt obecności lub braku odpowiednich ligandów na komórkach nowotworowych dla jednej lub obu rodzajów cząsteczek MHC lub cząsteczek adhezyjnych tłumaczyłby w części obserwację, że tylko niektóre komórki nowotworowe mogą indukować syntezę NO i/lub $\text{TNF}\alpha$ w monocytach.

Przeprowadzone badania nie dały odpowiedzi na pytanie, jakie cząsteczki na komórkach nowotworowych stanowią ligandy odpowiedzialne za indukcję produkcji $\text{TNF}\alpha$ i NO przez monocyty. Fakt, że syntezę $\text{TNF}\alpha$ w kohodowli blokowały przeciwciała monoklonalne tylko anti-CD44 i anti-HLA-DR, a syntezę NO przeciwciała anti-CD29, -CD44, -CD58, anti-MHC klasa I i anti-HLA-DR, może świadczyć o tym, iż w indukcję

syntezy i uwalniania NO zaangażowany jest szerszy niż w przypadku TNF α "wachlarz" struktur powierzchniowych monocytu, dla których muszą istnieć na powierzchni komórki nowotworowej odpowiednie ligandy. To tłumaczyłoby względnie małą częstość występowania komórek nowotworowych zdolnych do indukcji syntezy NO (na przetestowane przez nas 16 linii komórek nowotworowych - dane przedstawione częściowo- jedynie dwie były zdolne do stymulacji iNOS).

Praca niniejsza pozwoliła na identyfikację tylko niektórych mechanizmów prowadzących w monocytach człowieka do indukcji syntezy czynników toksycznych dla komórek nowotworowych. Stwierdzono, że do aktywacji monocytu może wystarczyć jego kontakt z powierzchnią komórki nowotworowej oraz to, że aktywacja różnych mechanizmów efektorowych w monocycie odbywa się różnymi drogami. Konsekwencją może być zmienna aktywność cytotoksyczna monocytów względem różnych komórek nowotworowych w zależności od tego, jaki szlak sygnałowy został aktualnie uruchomiony i jaka jest wrażliwość danej komórki nowotworowej na wytworzony czynnik toksyczny. Zmieniać się więc może "efektywność" niszczenia nowotworu przez naciekające go monocyty/makrofagi w zależności od immunobiologii mikrośrodowiska guza.

Przedstawione wyniki mogą jedynie częściowo wyjaśnić mechanizmy operujące *in vivo* w obrębie nacieku nowotworowego, bowiem eksperymenty doprowadziły do identyfikacji tylko niektórych cząsteczek na powierzchni monocytu/makrofaga odpowiedzialnych za przenoszenie sygnału do produkcji mediatorów toksycznych dla komórek nowotworowych. Ich wyzwolenie nie przesądza jednak o końcowym wyniku interakcji TIM-komórki nowotworowe, bowiem wrażliwość tych ostatnich na toksyczne uszkodzenie, ekspresja receptorów jak i produkcja czynników neutralizujących mediatory (wolne receptory,

inhibitory cytokin) stanowić będzie również istotny element we wzajemnej grze pomiędzy układem odpornościowym gospodarza a rozwijającym się nowotworem.

6. Wnioski.

- 1) Komórki nowotworowe posiadają zdolność do indukowania ekspresji genu oraz syntezy $\text{TNF}\alpha$ w monocytach człowieka.
- 2) Cząsteczki adhezyjne CD44 występujące na komórkach nowotworowych są włączone w indukcję syntezy i uwalniania $\text{TNF}\alpha$ przez monocyty.
- 3) Cząsteczki HLA-DR monocytów mogą być zaangażowane w indukcję syntezy $\text{TNF}\alpha$ po kontakcie z komórkami nowotworowymi.
- 4) Komórki niektórych ludzkich linii nowotworowych hodowane z monocytami stymulują tę ostatnie do produkcji tlenu azotu.
- 5) Cytokiny i LPS nie stymulują monocytów człowieka (w przeciwieństwie do makrofagów mysich) do produkcji tlenu azotu.
- 6) Indukcja syntezy tlenu azotu w makrofagach mysich przebiega najprawdopodobniej na innej drodze niż w przypadku ludzkich monocytów.
- 7) Cząsteczki adhezyjne CD29, CD44 i CD58 (znajdujące się na monocytach) są włączone w indukcję syntezy tlenu azotu w monocytach stymulowanych komórkami nowotworowymi.
- 8) Łańcuch ciężki cząsteczki MHC klasy I oraz cząsteczka HLA-DR monocytów biorą udział w przekazywaniu sygnału indukującego syntezę tlenu azotu w ludzkich monocytach stymulowanych niektórymi komórkami nowotworowymi.

7. Streszczenie.

Makrofagi stanowią znaczny odsetek pośród komórek naciekających tkankę nowotworową. Istnieją dane sugerujące związek ze stopniem nacieczenia nowotworu przez komórki linii monocyt/makrofag a rokowaniem. Zrozumienie interakcji pomiędzy monocytami/makrofagami a komórkami nowotworowymi *in situ* ma podstawowe znaczenie dla wyjaśnienia ich roli w immunobiologii nowotworów, a w dalszym etapie dla opracowania nowych form immunoterapii nowotworów (terapia genowa). Makrofagi wydzielają czynniki hamujące rozwój nowotworu oraz wykazują bezpośredni wpływ cytotoksyczny na zmienione nowotworowo komórki. Komórki nowotworowe z kolei, wydzielają czynniki działające chemotaktycznie na monocyty/makrofagi oraz wpływają na ich różnicowanie.

Monocyty/makrofagi stanowią heterogenną populację komórek o różnym stopniu zróżnicowania fenotypowego i funkcjonalnego. W zależności od ich lokalizacji w obrębie nacieku nowotworowego mogą pełnić odmienne role (wzmaganie lub hamowanie wzrostu guza). Trudne jest więc jednoznaczne określenie funkcji TIM w reaktywności immunologicznej gospodarza na rozwijający się nowotwór.

Aktywność cytotoksyczna makrofagów względem komórek nowotworowych jest między innymi mediowana przez $TNF\alpha$, wolne rodniki tlenowe i azotowe, enzymy proteolityczne. W chwili obecnej stosunkowo dużo wiadomo na temat roli $TNF\alpha$ lub wolnych rodników w niszczeniu komórek nowotworowych przez monocyty/makrofagi. Nie wiadomo jednak, co jest bezpośrednim sygnałem do indukcji mechanizmów efektorowych.

Badania immunocytochemiczne oraz hybrydyzacja *in situ* pozwalają na uzyskanie odpowiedzi na temat liczby i rodzaju komórek znajdujących w nacieku

okołonowotworowym. Nie umożliwiają jednak określenia funkcji poszczególnych subpopulacji komórek naciekających nowotwór, ani identyfikacji cząsteczek włączonych we wzajemne, dynamiczne interakcje monocytów/makrofagów z komórkami nowotworowymi. W związku z powyższym, opracowano model interakcji *in vitro* komórek nowotworowych z monocytami krwi obwodowej (traktowanymi jako komórki prekursorowe makrofagów tkankowych), naśladujący sytuację spotykaną *in situ*. Model ten nie jest obciążony wpływami jakie na oba rodzaje komórek może wywierać mikrośrodowisko nowotworu. W układzie tym istnieje możliwość określenia sposobu przenoszenia sygnału aktywującego monocyt do wydzielania niektórych toksycznych mediatorów po bezpośrednim kontakcie z komórką nowotworową.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że niektóre komórki nowotworowe hodowane z monocytami człowieka posiadały zdolność do indukowania w monocytach ekspresji genu i produkcji $\text{TNF}\alpha$. Stwierdzono, że w powyższe interakcje zaangażowane były cząsteczki CD44, przede wszystkim te, które znajdowały się na powierzchni komórek nowotworowych. Z kolei cząsteczki HLA-DR na powierzchni monocytów brały udział w przenoszeniu sygnału indukującego syntezę $\text{TNF}\alpha$ po kontakcie z komórką nowotworową. Wnioski te wyciągnięto na podstawie eksperymentów, w których wzajemne interakcje monocytów i komórek nowotworowych blokowano za pomocą przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko różnym strukturom powierzchniowym monocytów i komórek nowotworowych. Stosując metodę hybrydyzacji *in situ* wykazano ekspresję genu dla $\text{TNF}\alpha$ w monocytach, zachodzącą w kohodowli po kontakcie z komórkami nowotworowymi.

Niniejsze badania wykazały, że niektóre komórki nowotworowe indukują syntezę NO w monocytach. W celu upewnienia się, że komórki nowotworowe indukują syntezę *de novo* iNOS (która z kolei produkuje NO) w monocytach, hamowano nieodwracalnie syntezę białek

przez zastosowanie emetyny lub aktinomycyny D. Inaktywowano też selektywnie monocyty za pomocą czynnika lizosomotropowego LeuOMe. Zabiegi te (w stopniu proporcjonalnym do stężenia użytego reagentu) hamowały produkcję NO w kohodowli. W dalszych doświadczeniach wykazano, że indukcja syntezy NO w mysich makrofagach przebiega najprawdopodobniej na innej drodze niż w przypadku monocytów człowieka. Monocyty, w przeciwieństwie do makrofagów mysich, nie produkowały NO pod wpływem stymulacji LPS lub cytokinami. Preaktywacja monocytów za pomocą IFN γ również nie wpływała na produkcję NO.

Następnie badano, jakie cząsteczki na powierzchni monocytów i komórek nowotworowych są zaangażowane we wzajemne interakcje prowadzące do uwalniania NO przez monocyty w kohodowli. Analogicznie jak w przypadku badań nad indukcją wydzielania TNF α , hodowano monocyty i komórki nowotworowe w obecności przeciwciał monoklonalnych dla różnych cząsteczek adhezyjnych, antygenów MHC klasy I i cząsteczek HLA-DR. Przeciwciała dla cząsteczek CD29, CD44 i CD58 znajdujących się tylko na monocytach hamowały w sposób istotny produkcję NO. Zaobserwowano także, że monomorficzne przeciwciała skierowane przeciwko łańcuchowi ciężkiemu antygenów MHC klasy I oraz cząsteczek HLA-DR także hamują uwalnianie NO w kohodowli. Stwierdzono więc, że cząsteczki adhezyjne CD29, CD44 i CD58 są włączone w indukcję syntezy NO w monocytach, a antygeny MHC biorą udział w przekazywaniu sygnału indukującego syntezę NO w monocytach po stymulacji niektórymi komórkami nowotworowymi.

Praca niniejsza pozwoliła na identyfikację tylko niektórych mechanizmów prowadzących w monocytach człowieka do indukcji syntezy czynników toksycznych dla komórek nowotworowych. Niniejsze obserwacje sugerują selektywność interakcji

monocytów/makrofagów z komórkami nowotworowymi oraz udział różnych struktur powierzchniowych reagujących komórek we wzbudzaniu odmiennych cząsteczek efektorowych.

8. Piśmiennictwo.

- Adams, D.O. (1980). Effector mechanisms of cytolytically activated macrophages. 1. Secretion of neutral proteases and effect of protease inhibitors. *J. Immunol.*, **124**, 286.
- Aderka, D., Fisher, S., Levo, Y., Holtmann, H., Halm, T., Wallach, D. (1985). Cachectin-tumour necrosis factor production by cancer patients. *Lancet*, **ii**, 1190.
- Albelda, S.M., Mette, S.A., Elder, D.E. (1990). Integrin distribution in malignant melanoma: association of the $\beta 3$ subunit with tumor progression. *Cancer Res.*, **50**, 6757.
- Albelda, S.M. (1991). Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **4**, 195.
- Albelda, S.M. (1993). Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab. Invest.*, **68**, 4.
- Allen, A.C.A., Hogg, N. (1987). Association of colorectal tumor epithelium expressing HLA-D/DR with CD8-positive T-cells and mononuclear phagocytes. *Cancer Res.*, **47**, 2919.
- Anderson, D.C., Miller, L.J., Schmalstieg, F.C. (1986). Contributions of the Mac-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte functions: structure-function assessments employing subunit-specific monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, **137**, 15.
- Andreesen, R., Scheibenbogen, C., Brugger, W., Krause, S., Meerpohl, H-G., Leser, H-G., Engler, H., Lohr, G.W. (1990). Adoptive transfer of tumor cytotoxic macrophages generated in vitro from circulating blood monocytes: a new approach to cancer immunotherapy. *Cancer Res.*, **50**, 7450.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*, **61**, 1303.
- Balkwill, F., Burke, F., Talbot, D., Tavernier, J., Osborne, S., Naylor, S., Durbin, H., Fiers, W. (1987). Evidence for tumour necrosis factor-cachectin production in cancer. *Lancet*, **1229**, 32.
- Bartholeyns, J. (1993). Monocytes and macrophages in cancer immunotherapy. *Res. Immunol.*, **4**, 288.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 1620.
- Beissert, S., Bergholz, M., Waase, I., Lepsien, G., Schauer, A., Pfizenmaier, K., Kronke, M. (1989). Regulation of tumour necrosis factor gene expression in colorectal adenocarcinoma: in vivo analysis by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5064.
- Bellomo, G., Perotti, M., Taddei, F., Mirabelli, Finardi, G., Nicotera, P. (1992). Tumour necrosis factor α induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free Ca^{2+} concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res.*, **52**, 1342.
- Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shirota, K., Stanners, C.P. (1989). Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*, **57**, 327.
- Bernasconi, S., Peri, G., Sironi, M., Mantovani, A. (1991). Involvement of leucocyte (beta2) integrins (CD11/CD18) in human monocyte tumoricidal activity. *Int. J. Cancer*, **49**, 2.

- Beutler, B.A., Milsark, I.W., Cerami, A. (1985). Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution and metabolic fate in vivo. *J. Immunol.*, **135**, 3972.
- Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Mendick, D.L., Cotran, R.S., Gimbrone, M.A. (1987). Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 9238.
- Blankenstein, T., Quin, Z.H., Uberla, K. (1991). Tumor suppression after tumor cell-targeted TNF α gene transfer. *J. Exp. Med.*, **173**, 1047.
- Blomqvist, H., Wickerts, C.J., Andreen, M. (1993). Enhanced pneumonia resolution by inhalation of nitric oxide. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, **37**, 110.
- Bodmer, W.F. (1987). The HLA system: Structure and function. *J. Clin. Pathol.*, **40**, 948.
- Bollon, A.P., Berent, S.L., Torczynski, R.M., Hill, N.O., Jia, F.L., Joher, A., Pichyangkul, S., Kahn, A. (1988). Human cytokines, tumor necrosis factor and interferons: gene cloning, animal studies and clinical trials. *J. Cell Biochem.*, **36**, 353.
- Bosman, F.T. (1993). Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. *Histochem. J.*, **25**, 469.
- Bosslet, K. and Sedlacek, H.H. (1988). Characterization of a colon carcinoma cell line for tumor immunotherapy. *Cancer Detect. Prevent.*, **12**, 461.
- Bottazzi, B., Walter, S., Govoni, D., Colotta, F., Mantovani, A. (1992). Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth and susceptibility to IL-2 therapy of a murine melanoma. *J. Immunol.*, **148**, 1280.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Snyder, S.H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, **347**, 768.
- Bredt, D.S., Glatt, C.E., Hwang, P.M., Fotuhi, M., Dawson, T.M., Snyder, S.H. (1991). Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, **7**, 615.
- Brocker, E.B., Zwaldo, G., Holzmann, B., Macher, E., Sorg, C. (1988). Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression. *Int. J. Cancer*, **41**, 562.
- Brockhaus, M., Schoenfeld, H.-J., Schlaeger, E.-J., Hunziker, W., Loetscher, H. (1990). Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 3127.
- Buck, C.A., Horwitz, A.F. (1987). Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **3**, 179.
- Cameron, M.L., Granger, D.L., Weinberg, J.B., Lozumbo, W.J., Koren, H.S. (1990). Human alveolar and peritoneal macrophages mediate fungistasis independently of L-arginine oxidation of nitrite and nitrate. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **142**, 1313.
- Cantor, H., Crump, A.L., Raman, V.K., Liu, H., Markowitz, J.S., Grusby, J., Glimcher, I.H. (1993). Immunoregulatory effects of superantigens: interactions of staphylococcal enterotoxins with host MHC and non-MHC products. *Imm. Rev.*, **131**, 27.
- Carswell, E.A., Old, J.L., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, N. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3666.

- Cerundolo, V., Elliott, T., Elvin, J., Bastin, J., Rammensee, H-G., Townsend, A., (1991). The binding affinity and dissociation rates of peptides for class I major histocompatibility complex molecules. *Eur. J. Immunol.*, **21**, 2069.
- Corti, A., Fassina, G., Marcucci, F., Barbanti, E., Cassani, G. (1992). Oligomeric tumor necrosis factor α slowly converts into inactive forms at bioactive levels. *Biochem. J.*, **284**, 905.
- Dasgupta, J.D., Egea, E., Relias, V., Iglesias, A., Gladstone, P., Yunis, E.J. (1990). Involvement of major histocompatibility complex class I antigens in T cell activation. *Eur. J. Immunol.*, **20**, 1553.
- Dasgupta, J.D., Granja, C.B., Yunis, E.J., Relias, V. (1994). MHC class I antigens regulate CD3-induced tyrosine phosphorylation of proteins in T cells. *Int. Immunol.*, **6**, 481.
- Demarco, R., Ensor, J.G., Hasday, J.D. (1992). Tumor stimulated release of tumor necrosis factor alpha by human monocyte-derived macrophages. *Cell. Immunol.*, **140**, 301
- Denis, M. (1991). Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J. Leukoc. Biol.*, **49**, 380.
- Ding, A., Nathan, C.F., Stuehr, D.J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.*, **141**, 2407.
- Dougherty, G.J. and McBride, W.H. (1989). Monocyte differentiation in vitro. *W: Human Monocytes*. M. Zembala and G. L. Asherson, editors. Academic Press, London, str. 49.
- Drapier, J.-C., Hibbs, J.B. (1988). Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J. Immunol.*, **140**, 2829.
- Dressler, K.A., Mathias, S., Kolesnick, R.N. (1992). Tumor necrosis factor- α activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell free system. *Science*, **255**, 1715.
- Dustin, M.L., Springer, T.A. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature*, **341**, 619.
- Dustin, M.L., Springer, T.A. (1991). Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu. Rev. Immunol.*, **9**, 27.
- Elices, M.J., Osborn, L., Takada, Y. (1990). VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*, **60**, 577.
- Elices, M.J., Urryl, L.A., Hemler, M.E. (1991). Receptor functions for the integrin VLA-3: fibronectin, collagen, and laminin binding are differential influenced by Arg-Gly-Asp peptide and by divalent cations. *J. Cell. Biol.*, **112**, 169.
- Esteban, F., Riuzcabello, F., Concha, A., Perezayala, M., Sanchezrosas, J., Garrido, F. (1990). HLA-DR expression is associated with excellent prognosis in squamous carcinoma of the larynx. *Clin. Exp. Metastasis.*, **8**, 319.
- Feinman, R., Henriksen-DeStefano, D., Tsujimoto, M., Vileck, J. (1987). Tumor necrosis factor is an important mediator of tumor cell killing by human monocytes. *J. Immunol.*, **138**, 635.
- Fidler, I.J., Kleinerman, E.S. (1984). Lymphokine-activated human blood monocytes destroy tumor cells but not normal cells under cocultivation conditions. *J. clin. Oncol.*, **2**, 937.

- Figdor, C.G., van Kooyk, Y., Keizer, G.D. (1990). On the mode of action of LFA-1. *Immunol. Today*, **11**, 277.
- Foa, R., Francia di Celle, P., Trentini, L., Tos, A.G., Bellone, G., Carbone, A., Attisano, C., Massaia, M. (1992). Constitutive production of tumor necrosis factor-alpha in hairy cell leukemia: possible role in the pathogenesis of the cytopenia(s) and effect of treatment with interferon-alpha. *J. clin. Oncol.*, **10**, 954.
- Fougerolles, A.R., Stacker, S.A., Schwarting, R. (1991). Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J. Exp. Med.*, **174**, 253.
- Fransen, L., Van Der Heyden, J., Ruyschaert, R., Fiers, W. (1986). Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon- γ on a variety of normal and transformed human cell lines. *Eur. J. Cancer clin. Oncol.*, **22**, 419.
- Fuchs, D., Murr, C., Reibnegger, G., Weiss, G., Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Wachter, H. (1994). Nitric oxide synthase and antimicrobial armature of human macrophages. *J. Infect. Dis.*, **169**, 224.
- Galligioni, E., Quai, M., Spada, A., Favaro, D., Santarosa, M., Talamini, R., Monfardini, S. (1993). Activation of cytolytic activity in peripheral blood monocytes of renal cancer patients against non-cultured autologous tumor cells. *Int. J. Cancer*, **55**, 380.
- Ghosh, S., Baltimore, D. (1990). Activation in vitro of NF κ B by phosphorylation of its inhibitor I κ B. *Nature*, **344**, 678.
- Hasday, J.D., Shah, E.M., Liebermann, A.P. (1990). Macrophage tumor necrosis factor- α release is induced by contact with some tumors. *J. Immunol.*, **145**, 371.
- Haynes, B.F., Telen, M.J., Hale, L.P., Denning, S.M. (1989). CD44 - a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol. Today*, **10**, 423.
- Heider, K.-H., Dammrich, J., Skroch-Angel, P., Muller-Hermelink, H.-K., Vollmers, H.P., Herrlich, P., Ponta, H. (1993). Differential expression of CD44 splice variants in intestinal- and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res.*, **53**, 4197.
- Hemler, M.E. (1988). Adhesive protein receptors on hematopoietic cells. *Immunol. Today*, **9**, 109.
- Hemler, M.E., Elices, M.J., Parker, C. (1990). Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol. Rev.*, **114**, 45.
- Hibbs, J.B. Jr., Vavrin, Z., Taintor, R.R. (1987). L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.*, **138**, 550.
- Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Vavrin, Z., Rachlin, E.M. (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 87.
- Hibbs, J.B. Jr., Westenfelder, C., Taintor, R., Vavrin, Z., Kablitz, C., Baranowski, R.L., Ward, J.H., Menlove, R.L., McMurry, M.P., Kushner, J.P., Samlowski, W.E. (1992). Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J. Clin. Invest.*, **89**, 867.
- Hoffman, M., Weinberg, J.B. (1987). Tumor necrosis factor alpha induces hydrogen peroxide production and Fc receptor expression, but not Ia antigen-expression by peritoneal macrophages. *J. Leuk. Biol.*, **42**, 704.

- Hofmann, M., Rudy, W., Zoller, M., Tolg, C., Ponta, H., Herrlich, P., Gunthert, U. (1991). Human tumor cell lines express CD44 splice variants: the homologous sequences confer metastatic behavior in rats. *Cancer Res.*, **51**, 5292.
- Horny, H-P., Horst, H-A. (1986). Lymphoreticular infiltrates in invasive ductal breast cancer. A histological and immunological study. *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)*, **409**, 275.
- Horny, H-P., Horst, H-A. (1987). Lymphoreticular infiltrates in adenocarcinoma of the large intestine. *Pathol. Res. Pract.*, **182**, 222.
- Hunkapiller, T.H., Hood, L. (1989). Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv. Immunol.*, **44**, 1.
- Hynes, R.O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, **48**, 549.
- Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**, 11.
- Ignarro, L.J. (1991). Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 485.
- Isobe, K-i. and Nakashima, I. (1993). Abundant production of nitric oxide from murine macrophages by direct stimulation of tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **192**, 499.
- Jalkanen, S., Bargatze, R.F., Herron, L.R., Butcher, E.C. (1985). A lymphoid cell surface protein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur. J. Immunol.*, **16**, 1195.
- Janicke, R., Mannel, D.N. (1990). Distinct tumor cell membrane constituents activate human monocytes for tumor necrosis factor synthesis. *J. Immunol.*, **144**, 1144.
- Jiang, H., Stewart, C.A., Fast, D.J., Leu, R.W. (1992). Tumor target-derived soluble factor synergizes with IFN- γ and IL-2 to activate macrophages for tumor necrosis factor and nitric oxide production to mediate cytotoxicity of the same target. *J. Immunol.*, **149**, 2137.
- Johnson, J.P., Stade, B.G., Holzmann, B., Schwablee, W., Riethmuller, G. (1989). De novo expression of intercellular-adhesion molecule in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 641.
- Keller, R. and Keist, R. (1989). Abilities of activated macrophages to manifest tumoricidal activity and to generate reactive nitrogen intermediates: a comparative study in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 968.
- Kiechle, F.L., Malinski, T. (1993). Nitric oxide - biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am. J. Clin. Pathol.*, **100**, 567.
- Kim, M.-Y., Linardic, C., Obeid, L., Hannun, Y. (1991). Identification of sphingomyelin turnover as an effecto mechanism for the action of tumor necrosis factor α and γ -interferon: specific role in cell differentiation. *J. Biol. Chem.*, **266**, 484.
- Kirchofer, D., Grzesiak, J., Pierschbacher, M.D. (1991). Calcium as a potential physiological regulator of integrin-mediated cell adhesion. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4471.
- Kishimoto, T.K., Larson, R.S., Corbi, A.L. (1989). The leukocyte integrins: LFA-1, Mac-1 and gp150,95. *Adv. Immunol.*, **46**, 149.
- Knowles, R.G., Moncada, S. (1992). Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 399.

- Knudsen, K.A., Rao, P.E., Damsky, C.H., Buck, C.A. (1981). Membrane glycoproteins involved in cell-substratum interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 6071.
- Knudson, C.B. and Knudson, W. (1990). Similar epithelial-stromal interactions in the regulation of hyaluronate production during limb morphogenesis and tumor invasion. *Cancer Lett.*, **52**, 113.
- Kourilsky, P., Claverie, J.M., (1989). MHC-antigen interaction: what does the T cell receptor see ? *Adv. Immunol.*, **45**, 107.
- Kowalczyk, D., Staykova, M., Litwora, E., Pryjma, J., Zembala, M. (1984). Partial purification and physicochemical properties of human T cell migration inhibitory factor (TIF). *J. Clin. Lab. Immunol.*, **15**, 105.
- Krensky, A.M., Sanchez-Madrid, F., Robbins, E., Nnagy, J.A., Springer, T.A., Burakoff, S.J. (1983). The functional significance of, distribution and structure of LFA-1, LFA-2 and LFA-3: cell surface antigens associated with CTL-target interactions. *J. Immunol.*, **131**, 611.
- Kubitscheck, U., Levi, R., Horwitz, R.J., Arnon, R., Pecht, I (1992). Peptide binding to class I molecules of the major histocompatibility complex on the surface of living target cells. *Scand. J. Immunol.*, **36**, 341.
- Kull, F.C. (1988). Reduction in tumor necrosis factor receptor affinity and cytotoxicity by glucocorticoids. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **153**, 402.
- Kwon, N.S., Stuehr, D.J., Nathan, C.F. (1991). Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J. Exp. Med.*, **174**, 761.
- Lahat, N., Sheinfeld, M., Sobel, E., Kinary, A., Kraiem, Z. (1992). Divergent effects of cytokines on human leukocyte antigen-DR antigen expression of neoplastic and non-neoplastic human thyroid cells. *Cancer*, **69**, 1799.
- Liddil, J.D., Dorr, R.T., Scuderi, P. (1989). Association of lysosomal activity with sensitivity and resistance to tumor necrosis factor in murine L929 cells. *Cancer Res.*, **49**, 788.
- Lo, S.K., Detmers, P.A., Levin, S.M. (1989). Transient adhesion of neutrophils to endothelium. *J. Exp. Med.*, **169**, 1779.
- Lopez, M., Fechtenbaum, J., David, B., Martinache, C., Chokri, M. (1992). Adoptive immunotherapy with activated macrophages grown in vitro from blood monocytes in cancer patients: a pilot study. *J. Immunol.*, **11**, 209.
- Lorsbach, R.B., Murphy, W.J., Lowenstein, C.J., Snyder, S.H., Rll, S.W. (1993). Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon- γ and lipopolisaccharide. *J. Biol. Chem.*, **268**, 1908.
- Makgoba, M.W., Sanders, M.E., Shaw, S. (1989). The CD2 - LFA-3 and LFA-1 - ICAM-1 pathways: relevance to T-cell recognition. *Immunol. Today*, **10**, 417.
- Mantovani, A., Jerrells, T.R., Dean, J.H., Herberman, R.B. (1979). Cytolytic and cytostatic activity on tumor cells of circulating human monocytes. *Int. J. Cancer*, **23**, 18.
- Mantovani, A., Ming, W.J., Balotta, C., Abdeljalil, B., Bottazzi, B. (1986). Origin and regulation of tumor-associated macrophages: the role of tumor-derived chemotactic factor. *Biochem. Biophys. Acta*, **865**, 59.
- Mantovani, A. (1989). Cytotoxic killing of tumour cells by monocytes. *W: Human Monocytes*. M. Zembala and G.I. Asherson, editors. Academic Press, London, str. 303.
- Mantovani, A. (1990). Tumor-associated macrophages. *Curr. Opin. Immunol.*, **2**, 689.

- Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., Ruco, L. (1992). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today*, **13**, 265.
- Mareel, M.M., Behrens, J., Birchmeier, W. (1991). Down-regulation of E-cadherin expression in madin darby canine kidney (MDCK) cells inside tumors of nude mice. *Int. J. Cancer*, **47**, 922.
- Marsden, P.A., Schappert, K.T., Chen, H.S., Flowers, M., Sundell, C.L. (1992). Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.*, **307**, 287.
- Martin, J.H.J. and Edwards S.W. (1993). Changes in mechanisms of monocyte/macrophage-mediated cytotoxicity during culture. Reactive oxygen intermediates are involved in monocyte-mediated cytotoxicity, whereas reactive nitrogen intermediates are employed by macrophages in tumor cell killing. *J. Immunol.*, **150**, 3478.
- Matthews, N. (1981). Production of an antitumor cytotoxin by human monocytes. *Immunology*, **44**, 135.
- Mavier, P. and Edgington T.S. (1984). Human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. 1. Demonstration of an oxygen-dependent myeloperoxidase-independent mechanism. *J. Immunol.*, **132**, 1980.
- Mayer, B., Jauch, K.W., Gunthert, U., Figdor, C.G., Schildberg, F.W., Funke I., Johnson, J.P. (1993). De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet*, **342**, 1019.
- Mentzer, S.J., Rothlein, R., Springer, T.A. (1988). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is involved in the cytolytic lymphocyte interaction with human synovial cells. *J. Cell. Physiol.*, **137**, 173.
- Miller, L.J., Schwarting, R., Springer, T.A. (1988). Regulated expression of the Mac-1, LFA-1, gp 150,95 glycoprotein family during leukocyte differentiation. *J. Immunol.*, **137**, 2891.
- Moncada, S. (1992). The L-arginine:nitric oxide pathway. *Acta physiol. Scand.*, **145**, 201.
- Moncada, S., Higgs, A. (1993). The L-arginine - nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, **329**, 2002.
- Morris, A.G., Darley, R.L., Bateman, W.J. (1992). The loss of class II MHC antigen expression by ras-transformed murine fibroblasts passaged as tumours correlates with increased tumorigenicity but it is not mediated by T cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, **35**, 46.
- Most, J., Neumayer, H.P., Dierich, M.P. (1990). Cytokine-induced generation of multinucleated giant cells in vitro require interferon-gamma and expression of LFA-1. *Eur. J. Immunol.*, **20**, 1661.
- Mourad, W., Scholl, P., Diez, A., Geha, R., Chatilla, T. (1989). The staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1 triggers B cell proliferation and differentiation via major histocompatibility complex-unrestricted cognate T/B cell interaction. *J. Exp. Med.*, **170**, 2011.
- Mourad, W., Mehindate, K., Schall, T.J., McColl, S.R. (1992). Engagement of major histocompatibility complex class II molecules by superantigen induces inflammatory cytokine expression in human rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J. Exp. Med.*, **175**, 613.
- Munoz-Fernandez, M.A., Fernandez, M.A., Fresno, M. (1992). Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF α and IFN γ through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol. Lett.*, **33**, 35.
- Mutch, D.G., Powell, C.B., Kao, M.-S., Collins, J.L. (1992). Resistance to cytolysis by tumor necrosis factor α in malignant gynecological cell lines is associated with the expression of protein(s) that prevent the activation of phospholipase A₂ by tumor necrosis factor α . *Cancer Res.*, **52**, 866.

- Myones, B.L., Dalzell, J.G., Hogg, N. (1988). Neutrophil and monocyte cell surface gp 150,95 has receptor (CR4) activity resembling CR3. *J. Clin. Invest.*, **82**, 640.
- Nathan, C.F., Hibbs, J.B. (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.*, **3**, 65.
- Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.*, **6**, 3051.
- Nawroth, P.D., Handley, D., Matsueda, G., DeWaal, R., Gerlach, H., Blohm, D., Stern, D. (1988). Tumor necrosis factor/cachectin induced intravascular fibrin formation in meth A fibrosarcomas. *J. exp. Med.*, **168**, 637.
- Naylor, S.M., Malik, S.T.A., Stamp, G.W.H., Jobling, T., Balkwill, F.R. (1990). In situ detection of tumour necrosis factor in human ovarian cancer specimens. *Eur. J. Cancer*, **26**, 1027.
- Naylor, S.M., Stamp, G.W., Foulkes, W.D., Eccles, D., Balkwill, F.R. (1993). Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J. Clin. Invest.*, **91**, 2194.
- Noelle, R.J., Snow, E.Ch. (1990). Cognate interactions between helper T-cells and B-cells. *Immunol. Today*, **11**, 361.
- Nose, A., Tsuji, K., Takeichi, M. (1990). Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell*, **61**, 147.
- Nozaki, Y., Isobe, K.I., Nakashima, I., Shimokata, K. (1993). Tumor cytotoxicity of nitric oxide produced from alveolar macrophages directly stimulated with tumor cells. *Intern. J. Oncol.*, **2**, 1053.
- Nussler, A.K., Billiar, T.R. (1993). Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukoc. Biol.*, **54**, 171.
- Ochoa, J.B., Curti, B., Peitzman, A.B., Simmons, R.L., Billiar, T.R., Hoffman, R., Rault, R., Longo, D.L., Urba, W.J., Ochoa, A.C. (1992). Increased circulating nitrogen oxides after human tumor immunotherapy: correlation with toxic hemodynamic changes. *J. Natl. Cancer Inst.*, **84**, 864.
- Oppenheim, J.J. and Leonard E.J. (1989). Introduction. *W: Human Monocytes*. M. Zembala and G.L. Asherson, editors. Academic Press, London, str. 1.
- Pallison, M.J., Altemeyer, A., Moosbrugger, I., Warter, S., Hauptmann, G., Bischoff, P. (1992). Anti-(human LFA-1) monoclonal antibodies bind P815 murine tumours. *Cancer Immunol. Immunother.*, **31**, 407-413.
- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**, 524.
- Palmer, R.M.J., Hickery, M.S., Charles, I.G., Moncada, S., Bayliss, M.T. (1993). Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 398.
- Patarroyo, M., Prieto, J., Rincon, J., Timonen, T., Lundberg, C., Lindbom, L., Asjo, B., Gahmberg, C.G. (1990). Leukocyte-cell adhesion: a molecular process fundamental in leukocyte physiology. *Immunol. Rev.*, **114**, 67.
- Peck, R., Brockhaus, M., Frey, J.D. (1989). Cell surface tumor necrosis factor (TNF) accounts for monocyte- and lymphocyte-mediated killing of TNF-resistant target cells. *Cell. Immunol.*, **122**, 1.
- Pennica, D., Kohr, W.J., Fendly, B.M., Shire, S.J., Raab, H.E., Borchardt, P.E., Lewis, M., Goeddel, D.V. (1992). Characterization of a recombinant extracellular domain of the type I tumor necrosis factor receptor: evidence for tumor necrosis factor- α induced receptor aggregation. *Biochemistry*, **31**, 1134.

- Peri, G., Rossi, V., Taraboletti, G., Erroi, A., Mantovani, A. (1986). Ia antigen expression and IL-1 activity in murine tumour-associated macrophages. *Immunology*, **59**, 527.
- Petit, J.F., Martinache, C., Lopez, M. (1992). The cytostatic activity acquired by human monocytes during their differentiation into macrophages is independent of NO and TNF- α . *Pathobiol.*, **60** (Suppl.1), 27 (Abstr.).
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J., Moncada, S. (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, **II**, 1057.
- Radomski, M.W., Jenkins, D.C., Holmes, L., Moncada, S. (1991). Human colorectal adenocarcinoma cells: differential nitric oxide synthesis determines their ability to aggregate platelets. *Cancer Res.*, **51**, 6073.
- Richters, C.D., Burger, C.W., van de Loosdrecht, A.A., van Rijswijk, R.E.N. (1993). The cellular composition in the peritoneal cavity and the cytotoxic function of the peritoneal cells from patients with ovarian cancer; effect of tumor necrosis factor alpha treatment. *Cancer Lett.*, **68**, 25.
- Rilke, F., Colnaghi, M.L., Cascinelli, N. (1991). Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int. J. Cancer*, **49**, 44.
- Rosen, P.P., Groshen, S., Saigo, P.E., Kinne, D.W., Hellman, S. (1989). Pathological prognostic factors in stage I and II breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J. Clin. Oncol.*, **7**, 1239.
- Rougon, G., Durbec, P., Figarella-Branger, D. (1992). Adhesion molecules in cancer. *Cancer J.*, **5**, 137.
- Rubin, B.Y., Anderson, S.L., Sullivan, S.A., Williamson, B.D., Carswell, E.A., Old, L.J. (1986). Nonhematopoietic cells selected for resistance to tumor necrosis factor produce tumor necrosis factor. *J. exp. Med.*, **164**, 1350.
- Ruco, L.P., Stoppacciaro, A., Pomponi, D. (1989). Immunoreactivity for IL-1 β and TNF α in human lymphoid and nonlymphoid tissues. *Am. J. Pathol.*, **135**, 889.
- Ruff, M.R., Gifford, G.E. (1981). Rabbit tumor necrosis factor mechanism of action. *Infect. Immun.*, **31**, 380.
- Sanders, V.M., Vitetta, E.S. (1991). B-cell-associated LFA-1 and T-cell associated ICAM-1 transiently cluster in the area of contact between interacting cells. *Cell. Immunol.*, **132**, 45.
- Schmidt, H.H.H.W., Lohmann, S.M., Walter, U. (1993). The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Bioch. Biophys. Acta*, **1178**, 153.
- Schmidt, R.E., Bartley, G., Levine, H., Schlossman, S.F., Ritz, J. (1985). Functional characterization of LFA-1 antigens in the interaction of human NK clones and target cells. *J. Immunol.*, **135**, 1020.
- Schneemann, M., Schoedon, G., Hofer, S., Blau, N., Guerrero, L., Schaffner, A. (1993). Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *J. Infect. Dis.*, **167**, 1358
- Scholl, P.R., Trede, N., Chatila, T.A., Geha, R.S. (1992). Role of protein tyrosine phosphorylation in monokine induction by the staphylococcal superantigen toxic shock syndrome toxin-1. *J. Immunol.*, **148**, 237.
- Schuger, L., Varani, J., Marks, R.M., Kunkel, S.L., Johnson, K.J., Ward, P.A. (1989). Cytotoxicity of tumor necrosis factor- α for human umbilical vein endothelial cells. *Lab. Invest.*, **61**, 62.
- Schulze-Osthoff, K., Bakker, A.C., Vanhaesebroeck, B., Beyaert, R., Jacob, W.A., Fiers, W. (1992). Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. *J. Biol. Chem.*, **267**, 5317.
- Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., Vandevoorde, V., Haegeman, G., Fiers, W. (1993). Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO J.*, **12**, 3095.

- Schutze, S., Scheurich, P., Pfizenmaier, K., Kronke, M. (1989). Tumor necrosis factor signal transduction. *J. biol. Chem.*, **264**, 3562.
- Schuyze, S., Berkovic, D., Tornsing, O., Unger, C., Kronke, M. (1991). Tumor necrosis factor induces rapid production of 1'2'diacylglycerol by a phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *J. exp. Med.*, **174**, 975.
- Schwartz, M.A. (1992). Signaling by integrins. *Trends Cell Biol.*, **2**, 304.
- Schwartz, M.A. (1993). Signaling by integrins: implications for tumorigenesis. *Cancer Res.*, **53**, 1503.
- Screaton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U., Bell, J.I. (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 12160.
- Seiter, B.S., Areg, R., Reber, S., Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., Matzku, S., Zoller, M. (1993). Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J. Exp. Med.*, **177**, 443.
- Shepard, H.M., Lewis, G.D. (1988). Resistance of tumor cells to tumor necrosis factor. *J. clin. Immunol.*, **8**, 333.
- Shimizu, Y., Van Seventer, G.A., Siraganian, R., Wahl, L., Shaw, S. (1989). Dual role of the CD44 molecule in T cell adhesion and activation. *J. Immunol.*, **143**, 2457.
- Sidhu, R.S., Bollon, A.P. (1993). Tumor necrosis factor activities and cancer therapy - a perspective. *Pharmac. Ther.*, **57**, 79.
- Siedlar, M., Uracz, W., Zembala, M. (1992). Augmentation of monocyte-mediated cytotoxic activity by a low dose tumour necrosis factor measured by the kinetic colorimetric microplate assay. *Immunol. Lett.*, **34**, 249.
- Siedlar, M. (1992). *Integryny. Pol. J. Immunol.*, **XVII**, 3.
- Sikorski, J., Andersson, R., Patarroyo, M., Andersson, T. (1991). Calcium signaling capacity of the CD11b/CD18 integrin on human neutrophils. *Exp. Cell Res.*, **195**, 504.
- Smith, R.A., Baglioni, C. (1992) Characterization of TNF receptors. W: *Tumor necrosis factor: structure, function and mechanism of action*. Aggarwal, B.B., Vilcek, J., edytorzy. Marcel Dekker, New York, str. 131.
- Springer, T.A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, **346**, 425.
- Stacker, S.A., Springer, T.A. (1991). Leukocyte integrin gp 150,95 (CD11c/CD18) functions as an adhesion molecule binding to a counter-receptor on stimulated endothelium. *J. Immunol.*, **146**, 648.
- Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amiot, M., Seed, B. (1991). The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate bearing cells. *EMBO J.*, **10**, 343.
- Stephens, J.M., Butts, M.D., Pekala, P.H. (1992). Regulation of transcription factor mRNA accumulation during 3T3-L1 preadipocyte differentiation by tumor necrosis factor- α . *J. Molec. Endocr.*, **9**, 61.
- Strassmann, G., Springer, T.A., Haskill, S.J. (1985). Antigens associated with the activation of murine mononuclear phagocytes in vivo: differential expression of lymphocyte function associated antigen in several stages of development. *Cell. Immunol.*, **94**, 265.
- Stuehr, D.J., Gross, S.S., Sakuma, I., Levi, R., Nathan, C.F. (1989). Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J. Exp. Med.*, **169**, 1011.

- Stuehr, D.J., Griffith, O.W. (1992). Mammalian nitric oxide synthases. *Adv. Enzymol. Mol. Relat. Areas Biol.*, **65**, 287.
- Suffys, P., Beyaert, R., VanRoy, F., Fiers, W. (1988). Involvement of a serine protease in tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.*, **178**, 257.
- Sy, M.S., Guo, Y.J., Stamenkovic, I. (1991). Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo. *J. Exp. Med.*, **174**, 859.
- Sy, M.S., Guo, Y.J., Stamenkovic, I. (1992). Inhibition of tumor growth in vivo with a soluble CD44-immunoglobulin fusion protein. *J. Exp. Med.*, **176**, 623.
- Takeichi, M. (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Ann. Rev. Biochem.*, **59**, 237.
- Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, **251**, 1451.
- Teh, M., Lee, Y.S. (1992). HLA-DR antigen expression in intestinal-type and diffuse-type gastric cancer. *Cancer*, **69**, 1104.
- Thiele, D.L., Kurosaka, M., Lipsky, P.E. (1983). Phenotype of the accessory cell necessary for mitogen-stimulated T and B cell responses in human peripheral blood: delineation by its sensitivity to the lysosomotropic agent, L-leucine methyl ester. *J. Immunol.*, **131**, 2282.
- Tolg, C., Hofmann, M., Herrlich, P., Ponta, H. (1993). Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucl. Ac. Res.*, **21**, 1225.
- Townsend, A., Ohlen, C., Bastin, J., Ljunggren, H-G., Foster, L., Karre, K. (1989). Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature*, **340**, 443.
- Toyama-Sorimachi, N., Miyake, K., Miyasaka, M. (1993). Activation of CD44 induces ICAM-1/LFA-1-independent, Ca^{2+} , Mg^{2+} -independent adhesion pathway in lymphocyte-endothelial cell interaction. *Eur. J. Immunol.*, **23**, 439.
- Trede, N.S., Geha, R.S., Chatila, T. (1991). Transcriptional activation of IL-1 beta and tumour necrosis factor alpha genes by MHC class II ligands. *J. Immunol.*, **146**, 2310.
- Trede, N.S., Morio, T., Scholl, P.R., Geha, R.S., Chatila, T. (1994). Early activation events induced by the staphylococcal superantigen toxic shock syndrome toxin-1 in human peripheral blood monocytes. *Clin. Immunol. Immunopath.*, **70**, 137.
- Triozi, P.L. (1993). Identification and activation of tumor-reactive cells for adoptive immunotherapy. *Stem Cells*, **11**, 204.
- Tscherning, T., Claesson, M.H. (1994). Signal transduction via MHC class-I molecules in T cells. *Scand. J. Immunol.*, **39**, 117.
- Tsujisaki, M., Imai, K., Hirata, H. (1991). Detection of circulating intercellular adhesion molecule-1 antigen in malignant diseases. *Clin. Exp. Immunol.*, **85**, 3.
- Van Netten, J.P., Ashmead, B.J., Parker, R.L., Thornton, I.G., Fletcher, C., Cavers, D., Coy, P., Bridgen, M.L. (1993a). Macrophage-tumor associations: a factor in metastasis of breast cancer? *J. Leuk. Biol.*, **54**, 360.
- Van Netten, J.P., George, E.J., Ashmead, B.J., Fletcher, C., Thornton, I.G., Coy, P. (1993b). Macrophage-tumor cell associations in breast cancer. *Lancet*, **342**, 872.

- Vanderwinden, J.-M., Mailleux, P., Schiffmann, S.N., Vanderhaeghen, J.-J., De Laet, M.-H. (1992). Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *N. Engl. J. Med.*, **327**, 511.
- Vitolo, D., Zerbe, T., Kanbour, A., Dahl, C., Herbermann, R.B., Whiteside, T.L. (1992). Expression of mRNA for cytokines in tumor-infiltrating mononuclear cells in ovarian adenocarcinoma and invasive breast cancer. *Int. J. Cancer*, **51**, 573.
- Wade, W.F., Davoust, J., Salamero, J., Andre, P., Watts, T.H., Cambier, J.C. (1993). Structural compartmentalization of MHC class II signaling function. *Immunol. Today*, **14**, 539.
- Wang, J.M., Cianciolo, G.J., Snyderman, R., Mantovani (1986). Coexistence of a chemotactic factor and a retroviral P15E-related chemotaxis inhibitor in human tumor cell culture supernatants. *J. Immunol.*, **137**, 2726.
- Weaver, C.T., Unanue, E.R. (1990). The costimulatory function of antigen-presenting cells. *Immunol. Today*, **11**, 49.
- Webb, D.S., Shimizu, Y., Van Seventer, G.A., Shaw, S., Gerrard, T.L. (1990). LFA-3, CD44, and CD45: Physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science*, **249**, 1295.
- Webb, D.S., Mostowski, H.S., Gerrard, T.L. (1991). Cytokine-induced enhancement of ICAM-1 expression results in increased vulnerability of tumor cells to monocyte-mediated lysis. *J. Immunol.*, **146**, 3682.
- Werner-Felmayer, G., Werner, E.R., Fuchs, D., Hausen, A., Mayer, B., Reibnegger, G., Weiss, G., Wachter, H. (1993). Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase activity in the human cervix carcinoma cell line ME-180. *Biochem. J.*, **289**, 357.
- Więckiewicz, J., Jasiński, M., Mytar, B., Jasińska, A., Uracz, W. (1993). Detection, by in situ hybridization using sulphonated cDNA probe, the specific mRNA for HLA-DR α induced in monocyte cell lines by recombinant interferon γ . *Arch. Imm. Ther. Exp.*, **41**, 165.
- Wielenga, V.J.M., Heider, K.-H., Offerhaus, G.J.A., Adolf, G.R., van den Berg, F.M., Ponta, H., Herrlich, P., Pals, S.T. (1993). Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.*, **53**, 4754.
- Williams, A.F., Barclay, A.N. (1988). The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Ann. Rev. Immunol.*, **6**, 381.
- Wink, D.A., Kasprzak, K.S., Maragos, C.M., Elespuru, R.K., Misra, J. (1991). DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*, **254**, 1001.
- Wong, G.H., Goeddel, D. (1989). Tumour necrosis factor. *W: Human monocytes*. M. Zembala and G.L. Asherson, editors. Academic Press, London, str. 195.
- Wong, G.H., Kamb, A., Elwell, J.H., Oberley, L.W., Goeddel, D.V. (1992). MnSOD induction by TNF and its protective role. *W: Tumor necrosis factor: the molecule and their emerging role in medicine*. Beutler, B., edytor. Raven Press, New York, str. 473.
- Wright, S.C., Kumor, P., Tam, A.W., Shen, N., Varma, M., Larrick, J.W. (1992). Apoptosis and DNA fragmentation precede TNF-induced cytolysis in U937 cells. *J. Cell Biochem.*, **48**, 344.
- Yanaga, F., Abe, M., Koga, T., Hirata, M. (1992). Signal transduction by tumor necrosis factor α is mediated through a guanine nucleotide-binding protein in osteoblast-like cell line, MC3T3-E1. *J. biol. Chem.*, **267**, 5114.
- Zembala, M., Mytar, B., Wołoszyn, M., Popiela, T., Uracz, W., Czupryna, A. (1988). Monocyte TNF production in gastrointestinal cancer. *Lancet*, **II**, 1262.

Zembala, M., Buckle, A.M. (1989). Monocytes in malignant disease. *W: Human monocytes*. M. Zembala and G. L. Asherson, edytorzy. Academic Press, London, str. 513.

Zembala, M., Kowalczyk, D., Pryjma, J., Ruggiero, I., Mytar, B., Kłysik, J., Stec, W.J. (1990). The role of tumour necrosis factor in the regulation of antigen presentation by human monocytes. *Intern. Immunol.*, **2**, 337.

Zembala, M., Czupryna, A., Więckiewicz, J., Jasiński, M., Pryjma, J., Ruggiero, I., Siedlar, M., Popiela, T. (1993). Tumour-cell-induced production of tumour necrosis factor by monocytes of gastric cancer patients receiving BCG immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, **36**, 127.

Zembala, M., Siedlar, M., Ruggiero, I., Więckiewicz, J., Mytar, B., Mattei, M., Colizzi, V. (1994). The MHC class II and CD44 molecules are involved in the induction of tumour necrosis factor (TNF) gene expression by human monocytes stimulated with tumour cells. *Int. J. Cancer*, **56**, 269.

Tabela 1. Zahamowanie produkcji tlenu azotu przez L-NMMA w hodowli monocytów z komórkami nowotworowymi DeTa.

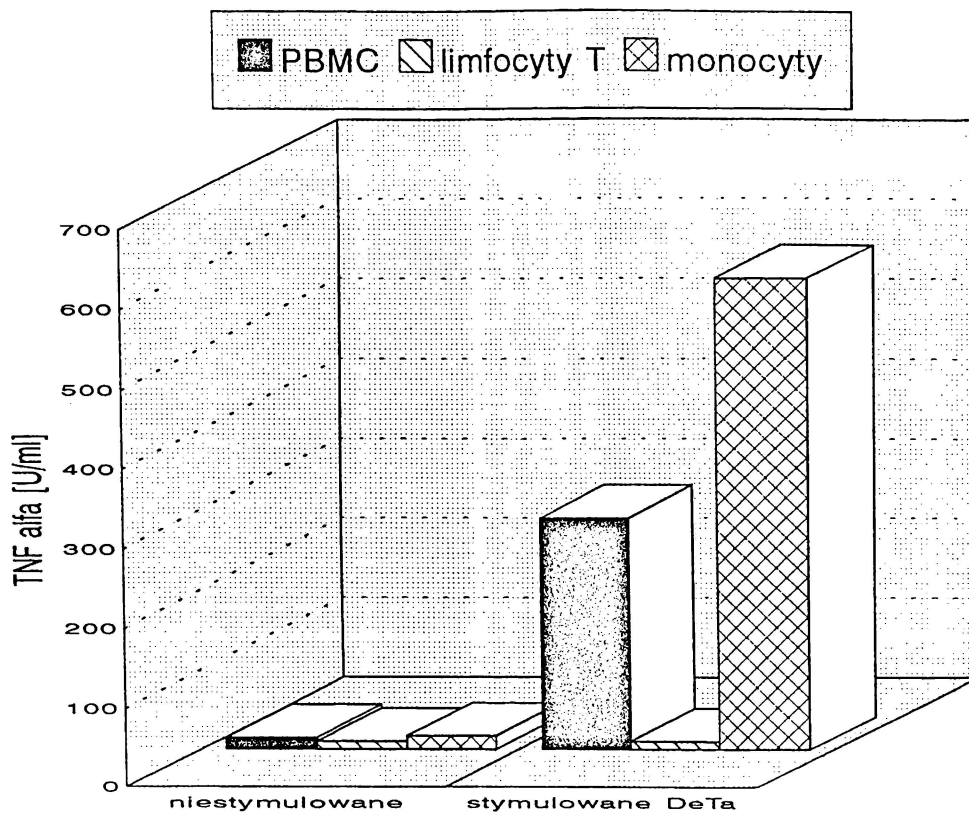
	<i>n</i>	L-NMMA [μM]			
		0	30	100	300
MO + DeTa + L-NMMA	3	24.5 $\pm 3.2^{\text{a}}$	19.1 ± 1.4	13.0 ± 2.7	9.8 ± 2.3
MO preinkubowane L-NMMA + DeTa	3	20.5 ± 2.1	12.3 ± 1.2	4.7 ± 1.0	5.1 ± 1.1

^{a)} - poziom azotynów [μM]; wartość średnia $\pm\text{SD}$

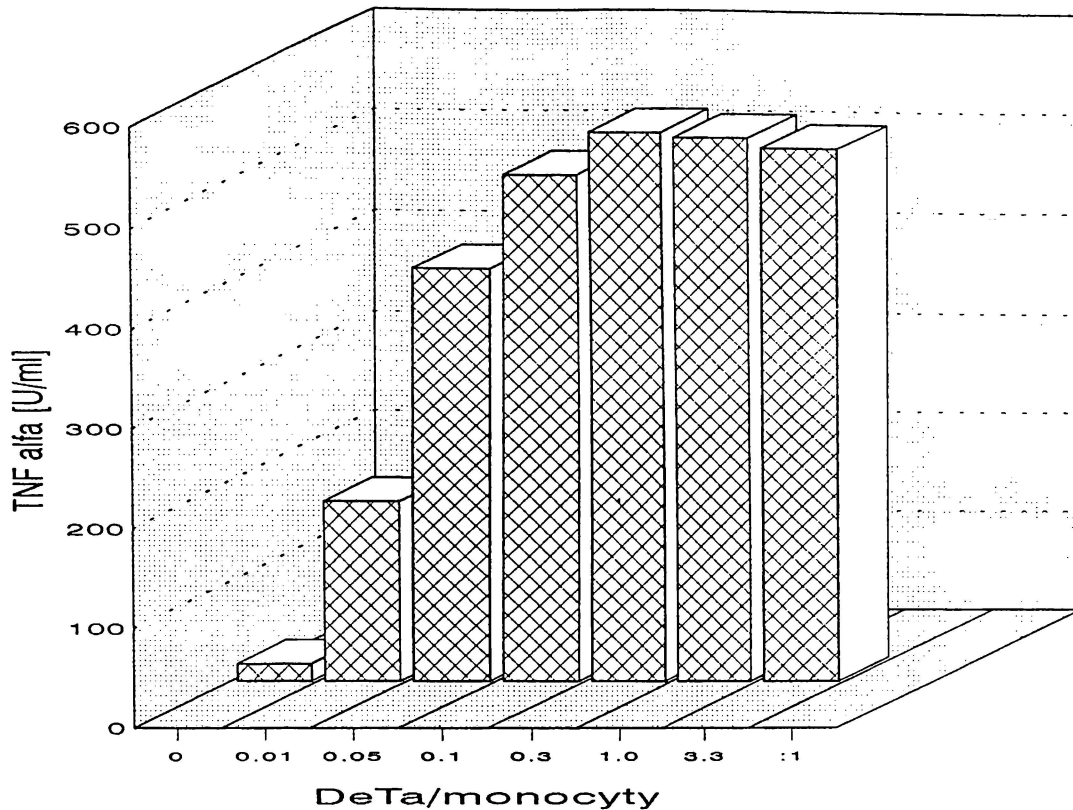
n - ilość eksperymentów

MO - monocyty

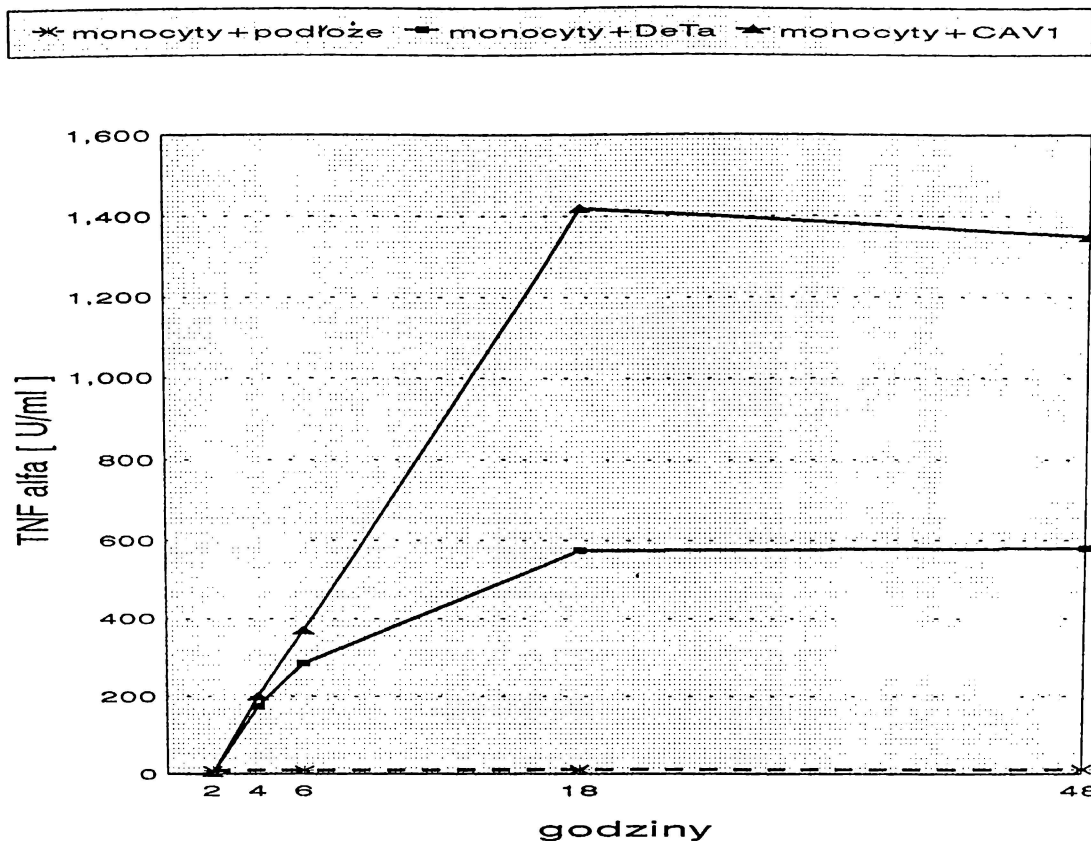
L-NMMA - N^{G} -monometylo-L-arginina



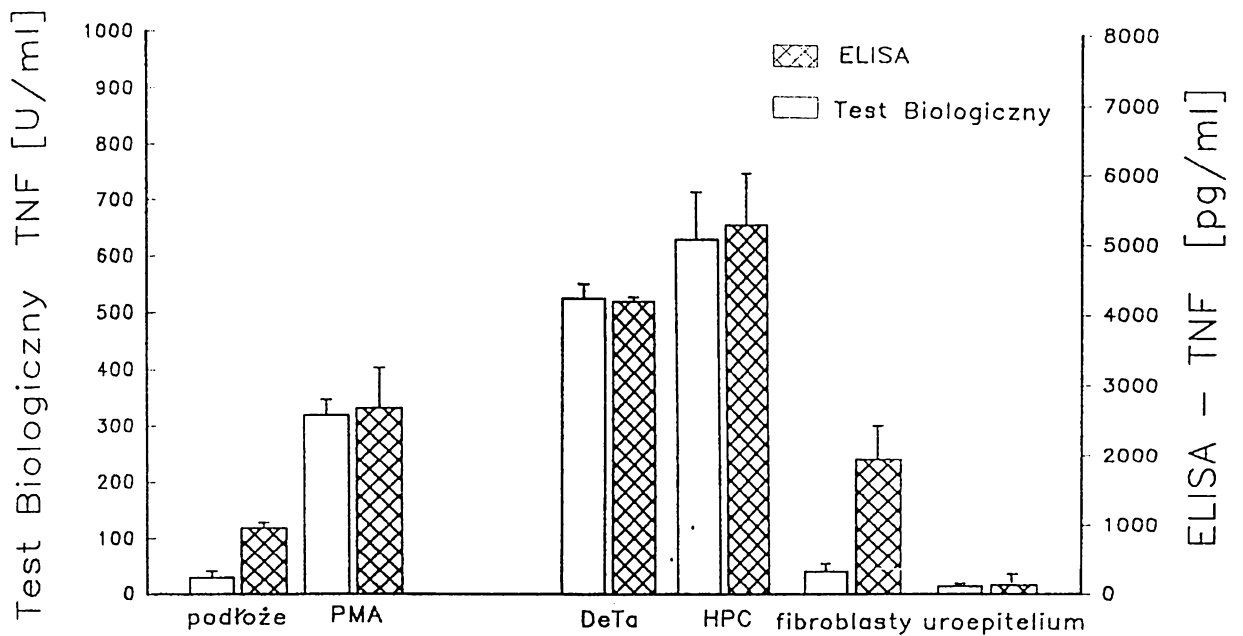
Rys.1 Produkcja TNF α przez niestymulowane komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC), limfocyty T i monocyty lub hodowane z komórkami nowotworowymi DeTa (stymulowane DeTa). Przedstawiono wyniki jednego reprezentatywnego eksperymentu dla trzech przeprowadzonych.



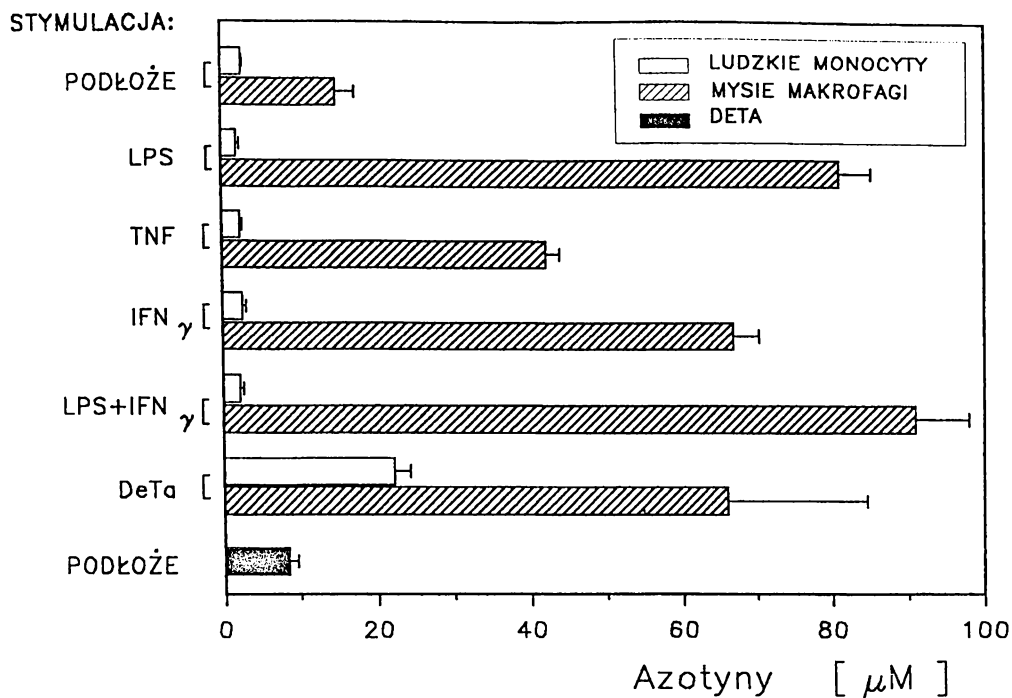
Rys.2 Produkcja TNF α przez monocyty (1×10^6 /ml) stymulowane różnymi ilościami komórek nowotworowych DeTa. Przedstawiono wyniki jednego reprezentatywnego eksperymentu dla trzech przeprowadzonych.



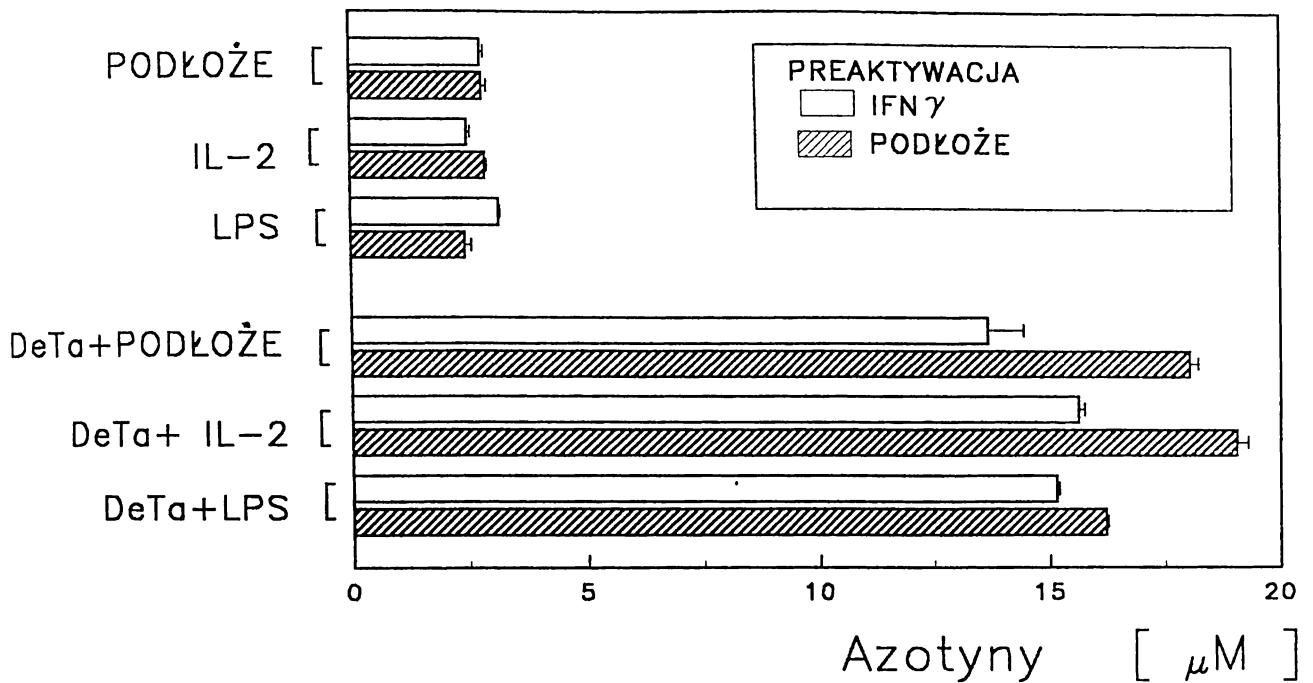
Rys.3 Dynamika wydzielania $TNF\alpha$ przez niestymulowane monocyty (monocyty + podłoże) oraz w hodowli monocytów z komórkami nowotworowymi DeTa lub CAV1. Przedstawiono wyniki jednego reprezentatywnego eksperymentu dla trzech przeprowadzonych.



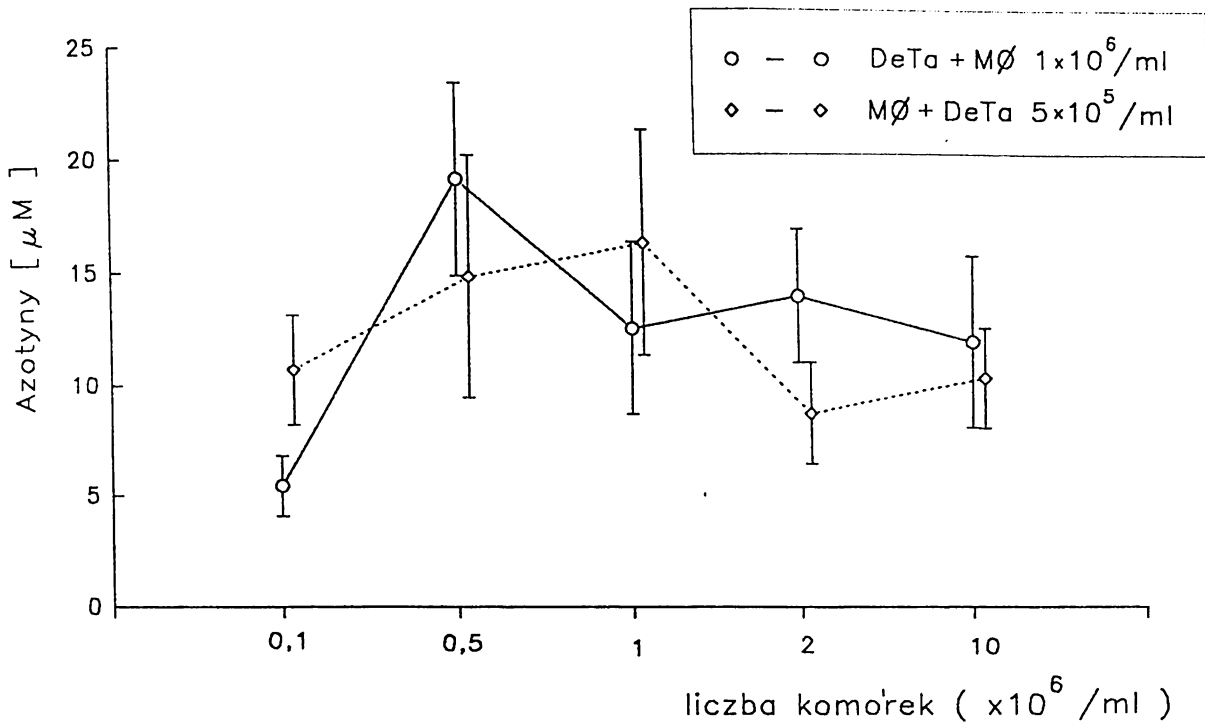
Rys.4 Wydzielanie $TNF\alpha$ przez ludzkie monocyty stymulowane PMA, komórkami nowotworowymi (DeTa i HPC), normalnymi fibroblastami oraz komórkami nabłonka pęcherza moczowego (uroepitelium). Wyniki przedstawione jako wartość średnia z pięciu niezależnych eksperymentów ($\pm SE$) wyrażono w U/ml (pochodzące z testu biologicznego) lub w pg/ml (mierzone testem ELISA).



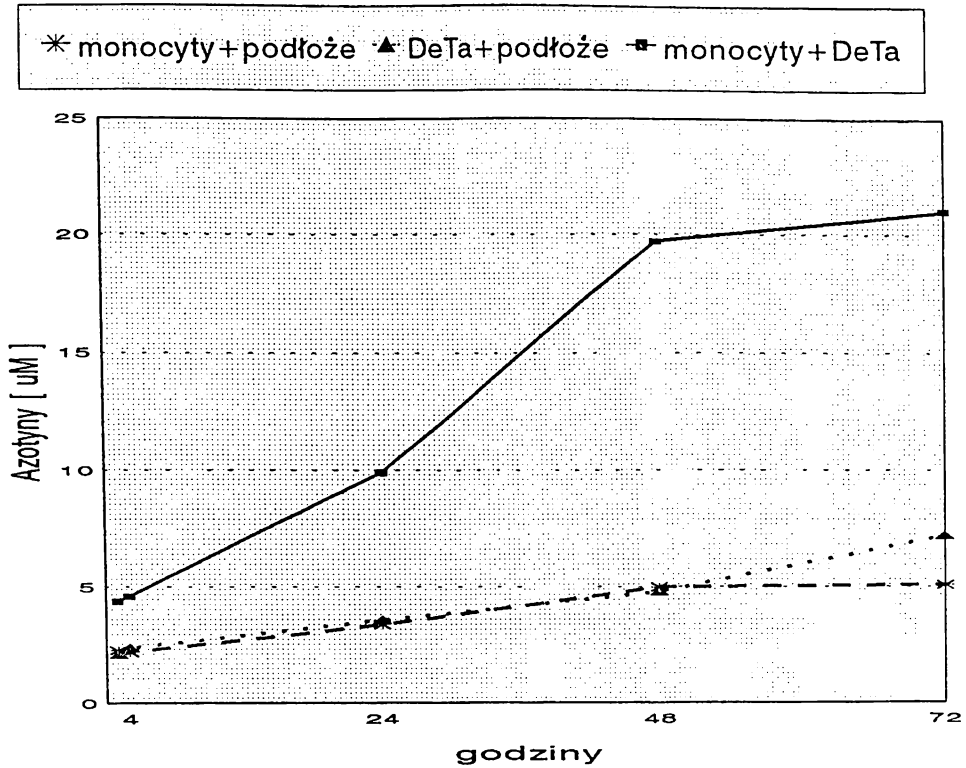
Rys.5 Produkcja tlenku azotu przez ludzkie monocyty lub mysie makrofagi hodowane z różnymi stymulatorami. Wyniki przedstawione jako wartość średnia z pięciu niezależnych eksperymentów (\pm SE).



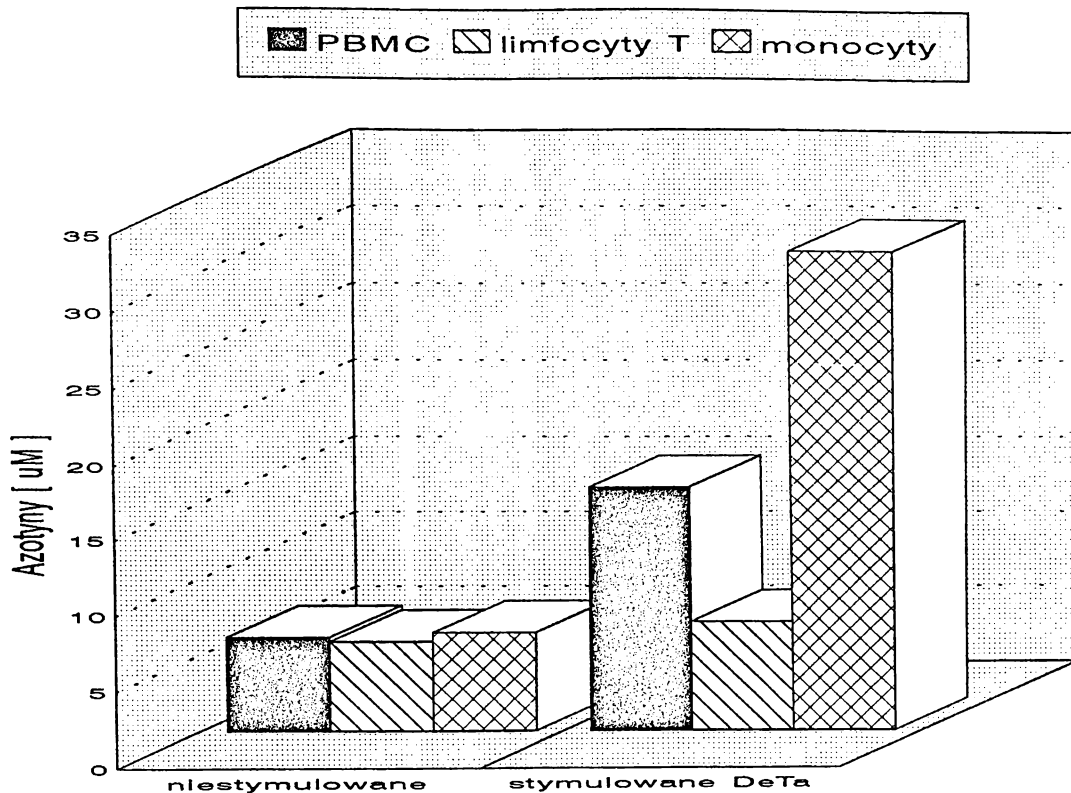
Rys.6 Wpływ preaktywacji monocytów za pomocą IFN γ na produkcję tlenku azotu. Monocyty były preaktywowane przez 4 godziny za pomocą IFN γ , a następnie stymulowane przy użyciu IL-2, LPS, komórek nowotworowych DeTa lub ich kombinacji. Monocyty nie traktowane IFN γ (podłoże) służyły jako kontrola. Wyniki przedstawione jako średnia wartość (\pm SE) z eksperymentu przeprowadzonego w tryplikatach. Analogiczne dane otrzymano w dwóch innych eksperymentach.



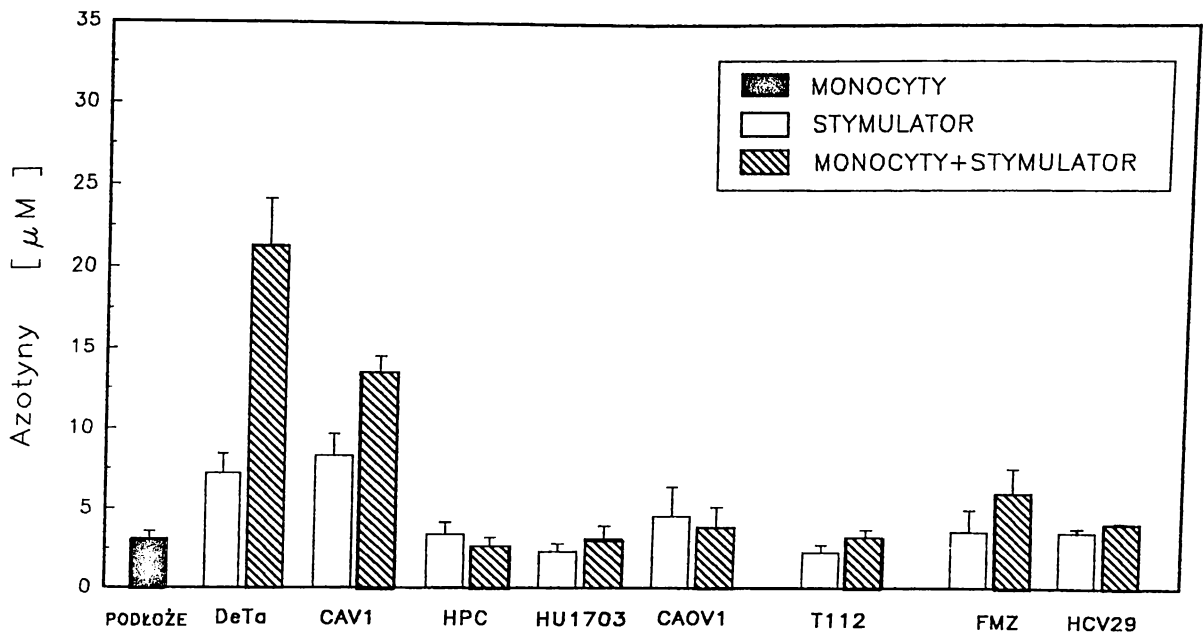
Rys.7 Produkcja tlenu azotu w hodowli monocytów ($M\phi$) z komórkami nowotworowymi DeTa przy ustalonej liczbie monocytów ($1 \times 10^6 / \text{ml}$) lub ustalonej liczbie komórek DeTa ($1 \times 10^5 / \text{ml}$). Wyniki przedstawione jako wartość średnia z czterech niezależnych eksperymentów ($\pm\text{SD}$).



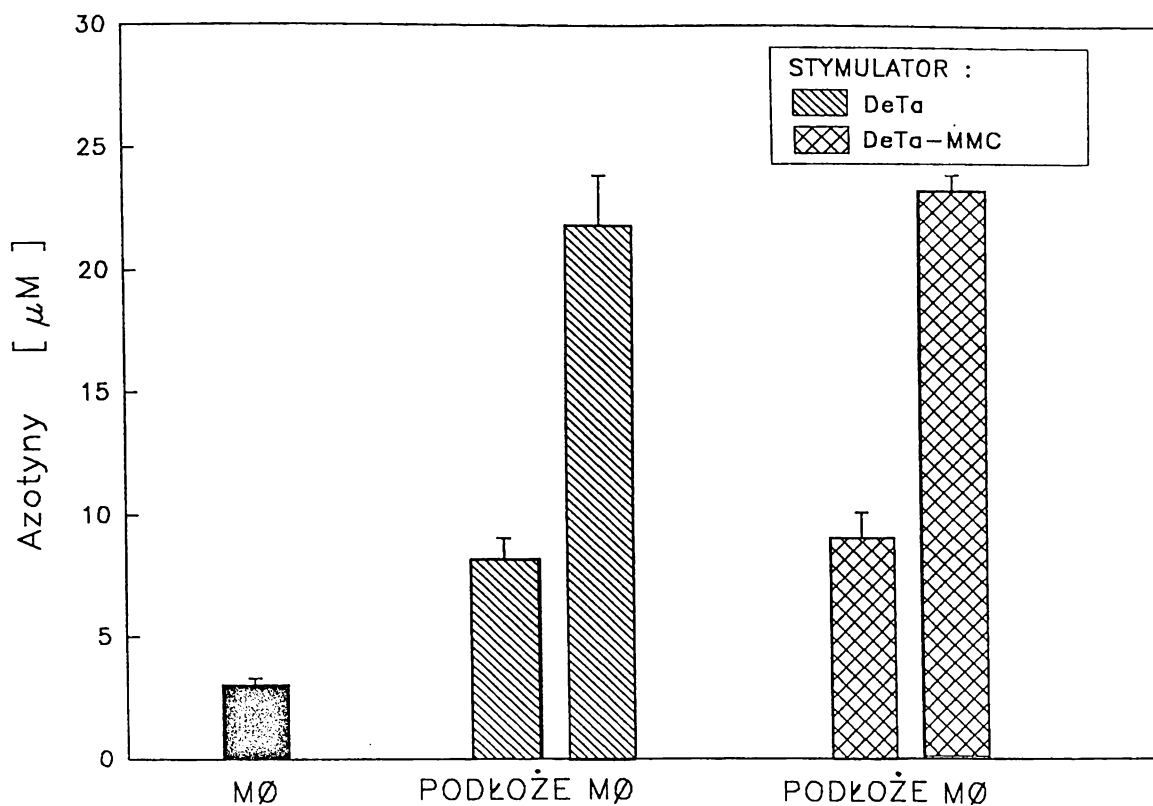
Rys.8 Dynamika wydzielania tlenu azotu przez monocyty hodowane samodzielnie lub w kohodowli z komórkami nowotworowymi DeTa. Przedstawiono wyniki jednego reprezentatywnego eksperymentu dla trzech przeprowadzonych.



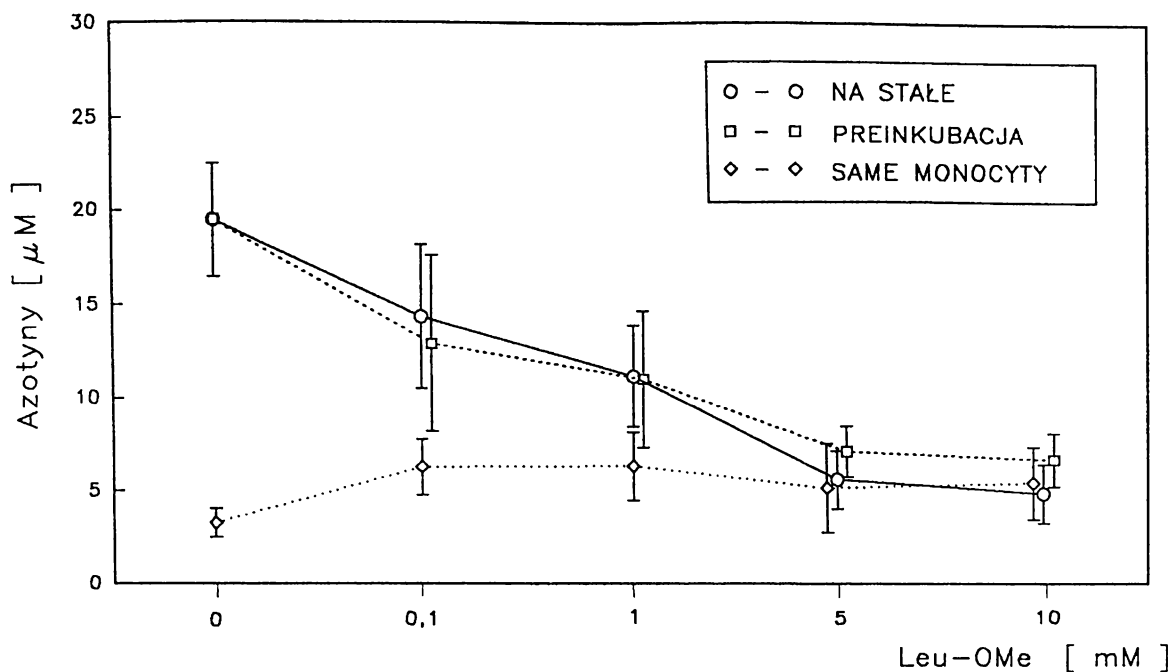
Rys.9 Produkcja tlenu azotu przez niestymulowane komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC), limfocyty T i monocyty lub hodowane z komórkami nowotworowymi DeTa (stymulowane DeTa). Przedstawiono wyniki jednego reprezentatywnego eksperymentu dla trzech przeprowadzonych.



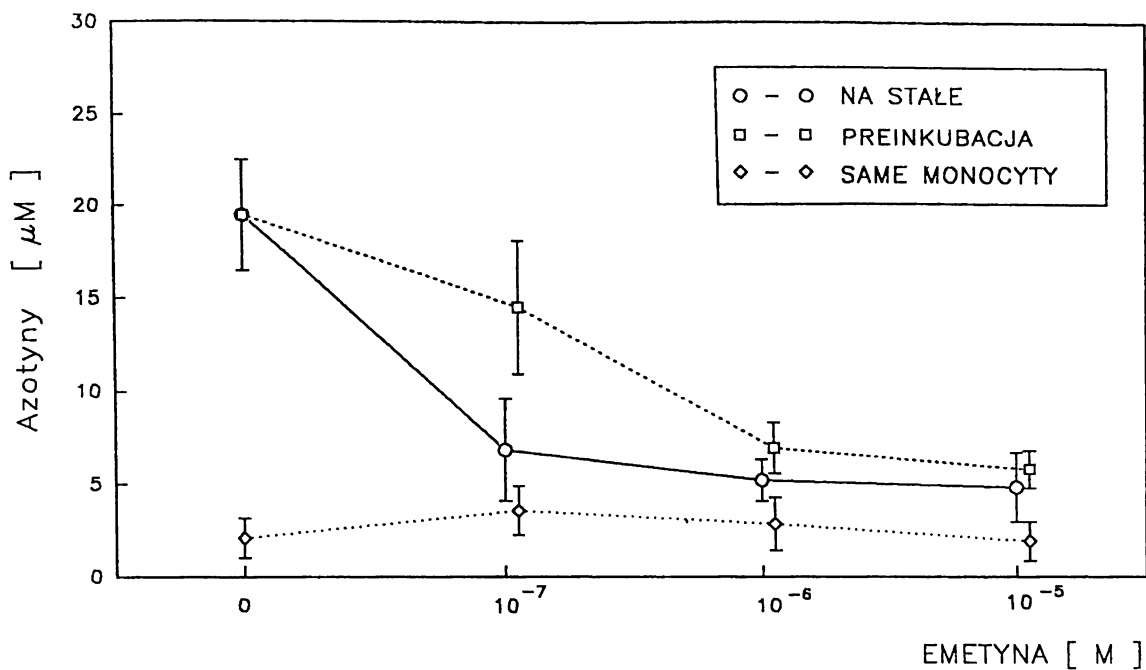
Rys.10 Produkcja tlenu azotu przez ludzkie monocyty hodowane z różnymi liniami ludzkich komórek nowotworowych (stymulator): DeTa, CAV1, HPC, HU1703, CAOv1, T112 (komórki HCV29 transfekowane onkogenem v-raf) oraz nietransformowanymi nowotworowo komórkami linii FMZ i HCV29. Wyniki przedstawione jako wartość średnia z czterech niezależnych eksperymentów (\pm SE).



Rys.11 Produkcja tlenku azotu przez monocyty ($M\emptyset$) hodowane z komórkami nowotworowymi DeTa lub z komórkami DeTa traktowanymi uprzednio mitomycyną C (DeTa-MMC). Wyniki przedstawione jako wartość średnia z czterech niezależnych eksperymentów (\pm SE).

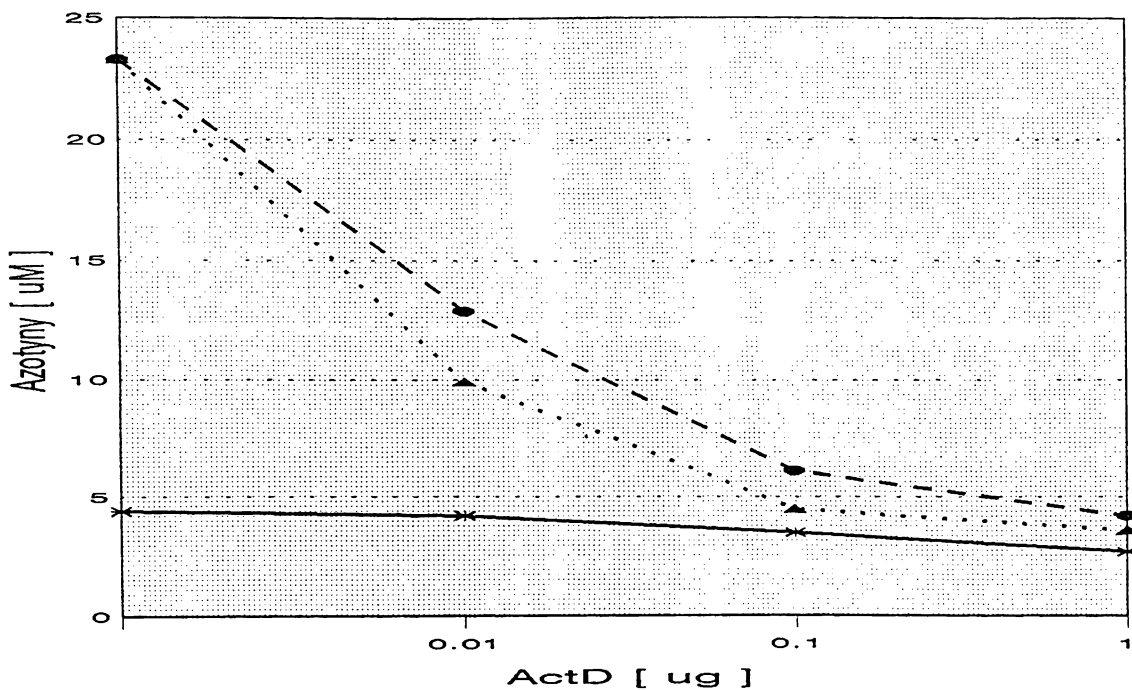


Rys.12 Wpływ czynnika lizosomotropowego LeuOMe na produkcję tlenku azotu przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi DeTa. W niektórych eksperymentach monocyty były preinkubowane z Leu-OME przed dodaniem komórek DeTa do hodowli. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość z pięciu niezależnych eksperymentów (\pm SE).

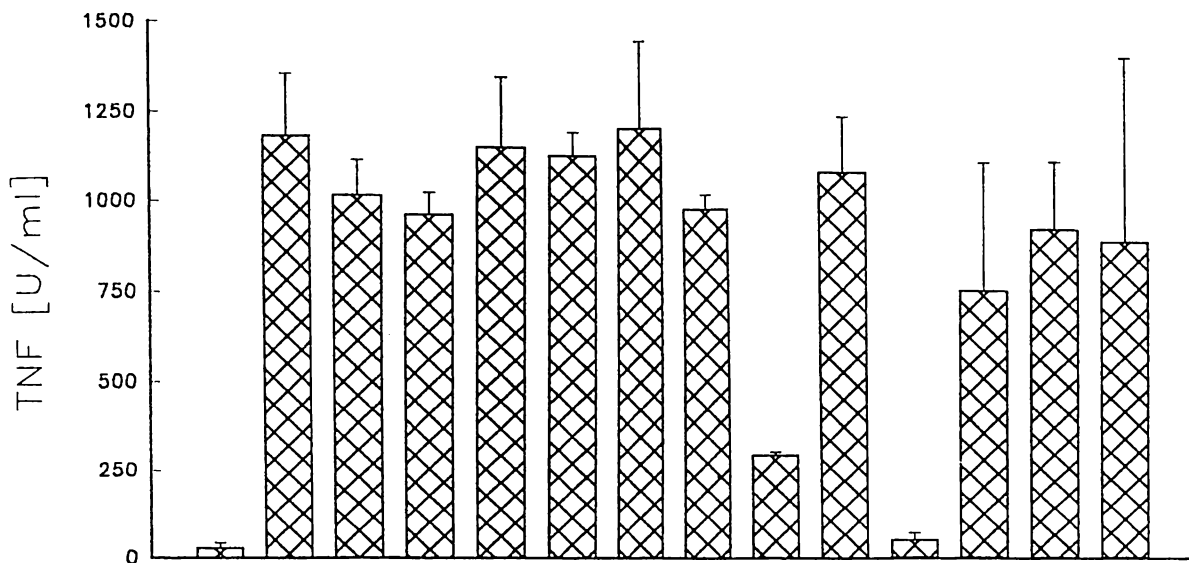


Rys. 13 Wpływ emetyny (nieodwracalnego inhibitora syntezy białek) na produkcję tlenku azotu przez monocyty stymulowane komórkami nowotworowymi DeTa. W niektórych eksperymentach monocyty były preinkubowane z emetyną przed dodaniem komórek DeTa do hodowli. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z pięciu niezależnych eksperymentów (\pm SE).

* Monocyty+podłoże ▲ Monocyty+DeTa+ActD ◆ Monocyty pr.ActD+DeTa

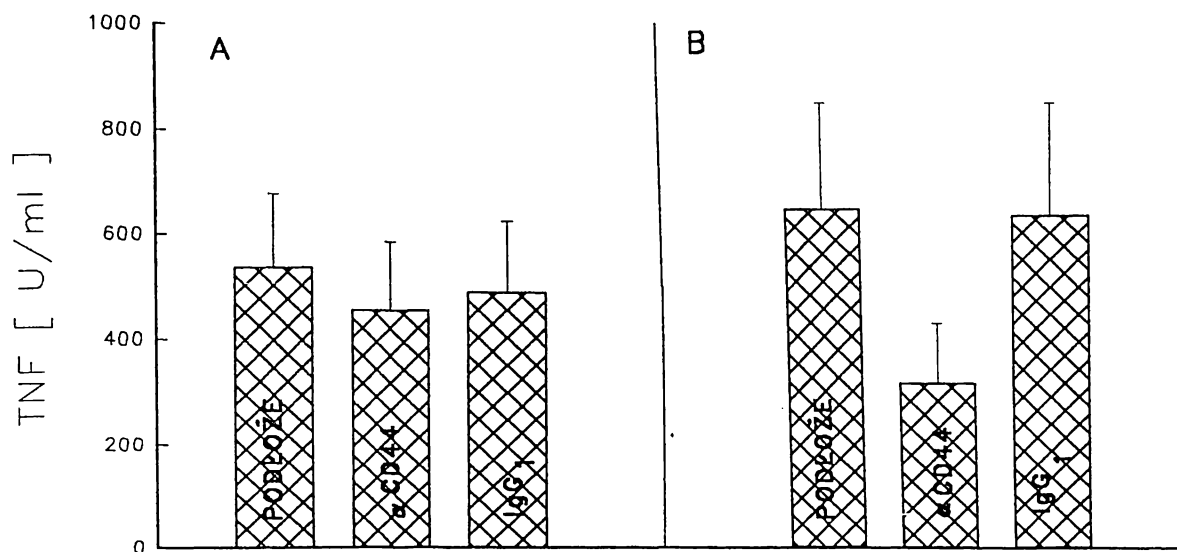


Rys.14 Produkcja tlenu azotu przez monocyty hodowane z komórkami nowotworowymi DeTa w obecności aktinomycyny D (ActD). W niektórych eksperymentach monocyty były preinkubowane z ActD. Przedstawiono wyniki jednego reprezentatywnego eksperymentu dla trzech przeprowadzonych.

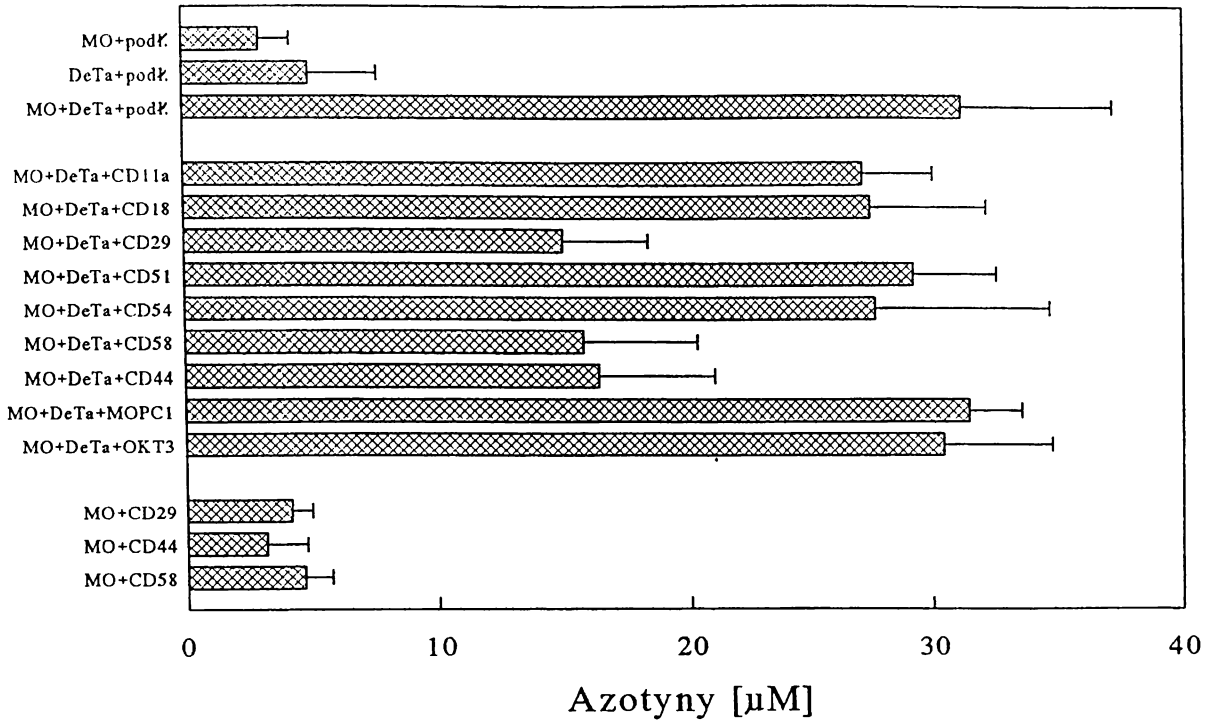


Stymulator	---	HPC	HPC	HPC	HPC	HPC	HPC	HPC	HPC	HPC	---	PMA	PMA	PMA
mAb	---	Podłoże	CD11 α	CD18	CD29	CD51	CD54	CD58	CD44	IgG ₁	CD44	Podłoże	CD44	IgG ₁

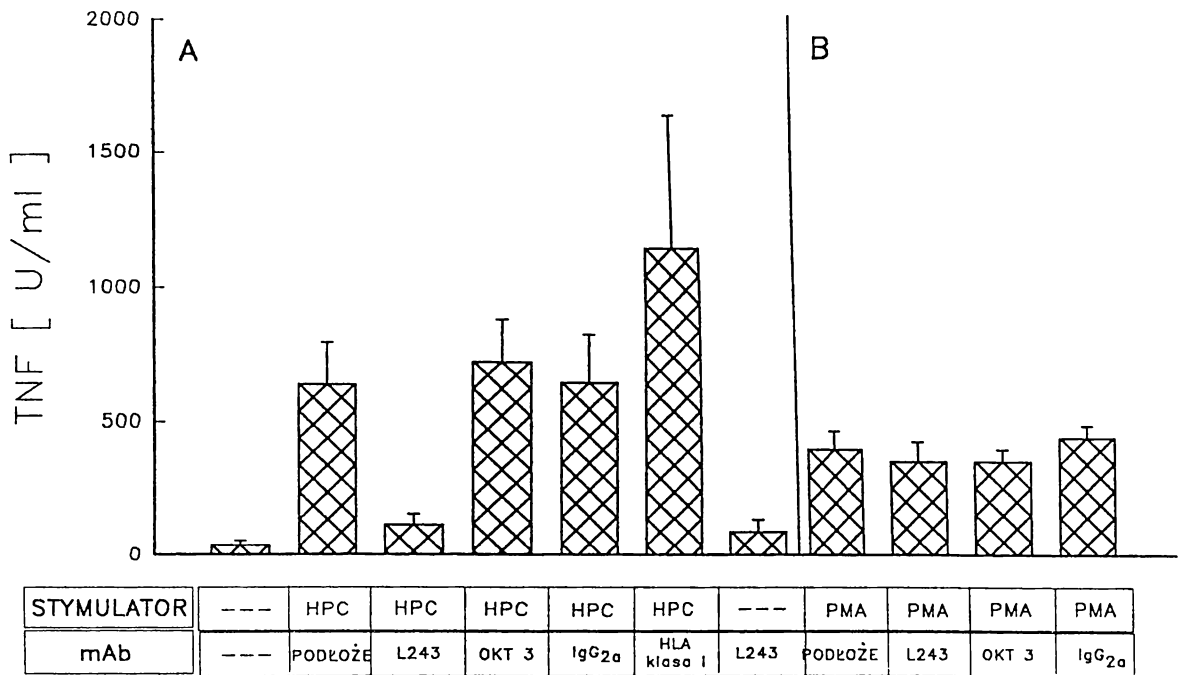
Rys.15 Wpływ przeciwciał monoklonalnych (mAb) dla różnych cząsteczek adhezyjnych na wydzielanie TNF α przez monocyty hodowane z komórkami nowotworowymi HPC. Mysia immunoglobulina o izotypie IgG₁ została użyta jako kontrola dla przeciwciał monoklonalnych anti-CD44. Ostatnie trzy słupki przedstawiają kontrolę: monocyty stymulowane PMA. Wyniki przedstawione jako wartość średnia z czterech niezależnych eksperymentów (\pm SE).



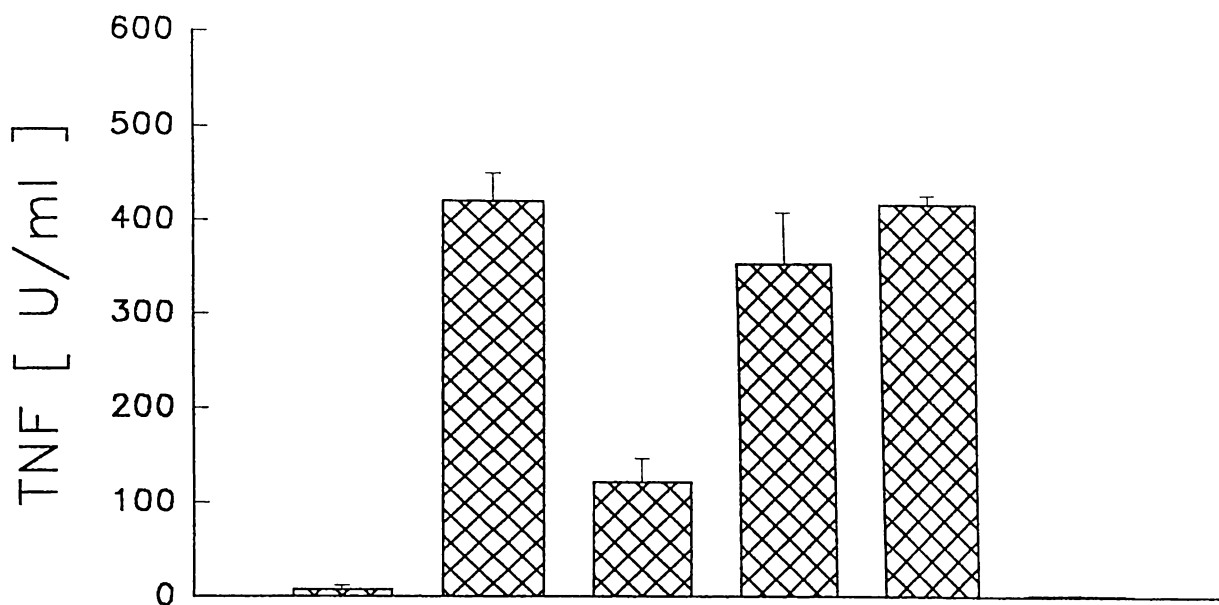
Rys.16 Wpływ preinkubacji (przy użyciu przeciwciał monoklonalnych anti-CD44 oraz mysiej immunoglobuliny o izotypie IgG₁ jako kontroli) monocytów (A) lub komórek nowotworowych HPC (B) na produkcję TNF α podczas kohodowli. Wyniki przedstawione jako wartość średnia z pięciu niezależnych eksperymentów (\pm SE).



Rys.17 Wpływ przeciwciał monoklonalnych dla różnych cząsteczek adhezyjnych na produkcję tlenu azotu przez monocyty (MO) stymulowane komórkami nowotworowymi DeTa. Przeciwciało OKT3 (o izotypie IgG_{2a}) lub mysią immunoglobulinę o izotypie IgG_1 (MOPC1) użyto jako kontrole. Wyniki przedstawione jako wartość średnia z pięciu niezależnych eksperymentów ($\pm\text{SE}$).

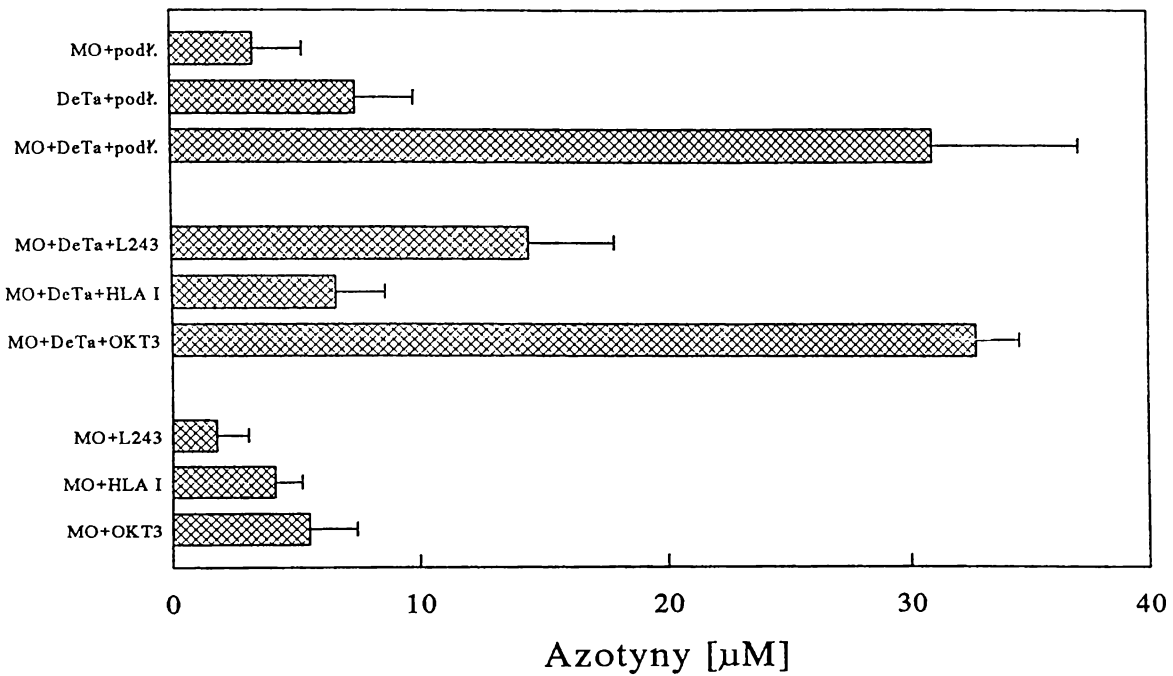


Rys.18 Wpływ monomorficznych przeciwciał monoklonalnych (mAb) anty-HLA klasa I (dla łańcucha ciężkiego) i anty-HLA-DR (L243) na produkcję TNF α przez monocytę stymulowaną komórkami nowotworowymi HPC (A) lub PMA (B). Jako kontrole użyto przeciwciała OKT3 (o izotypie IgG_{2a}) i myszą immunoglobulinę o izotypie IgG_{2a}. Wyniki przedstawione jako wartość średnia z czterech niezależnych eksperymentów (\pm SE).

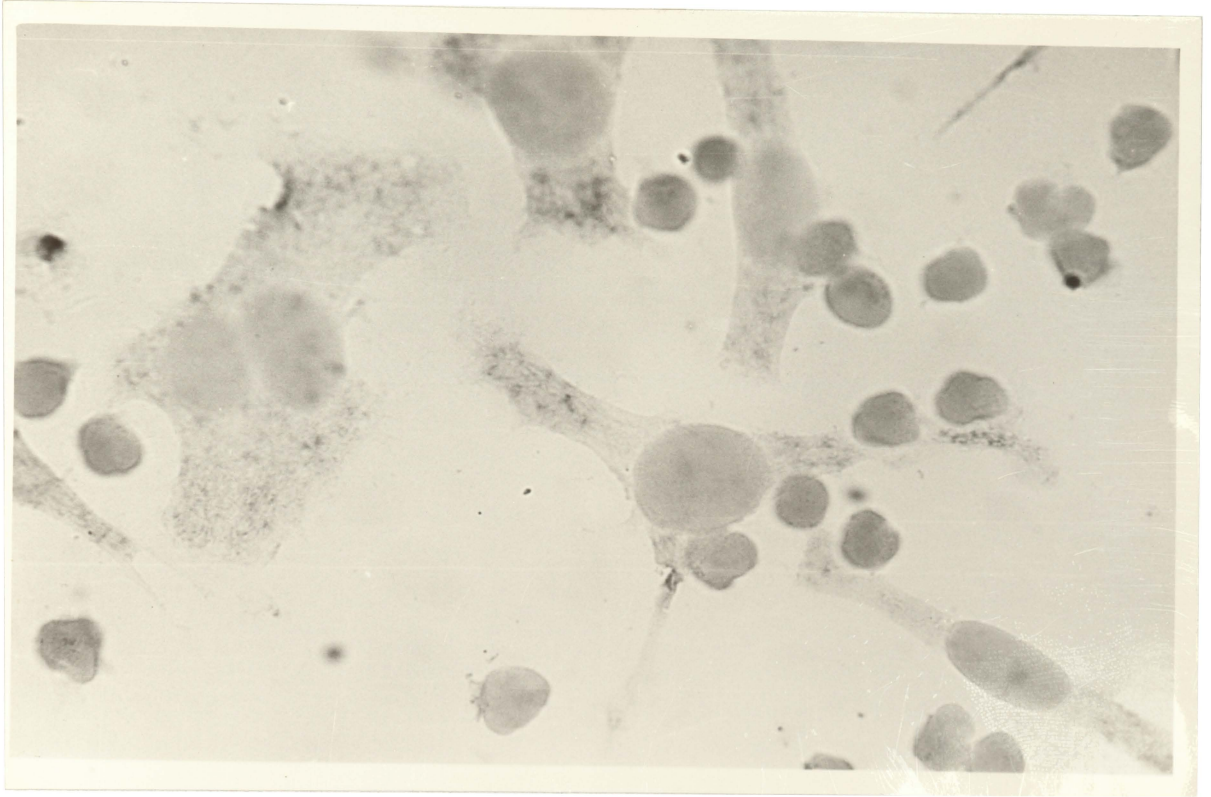


STYMULATOR	---	HPC	HPC	HPC	HPC	---
PREINKUBACJA z mAb	PODŁOŻE	PODŁOŻE	L243	OKT3	IgG _{2a}	L243

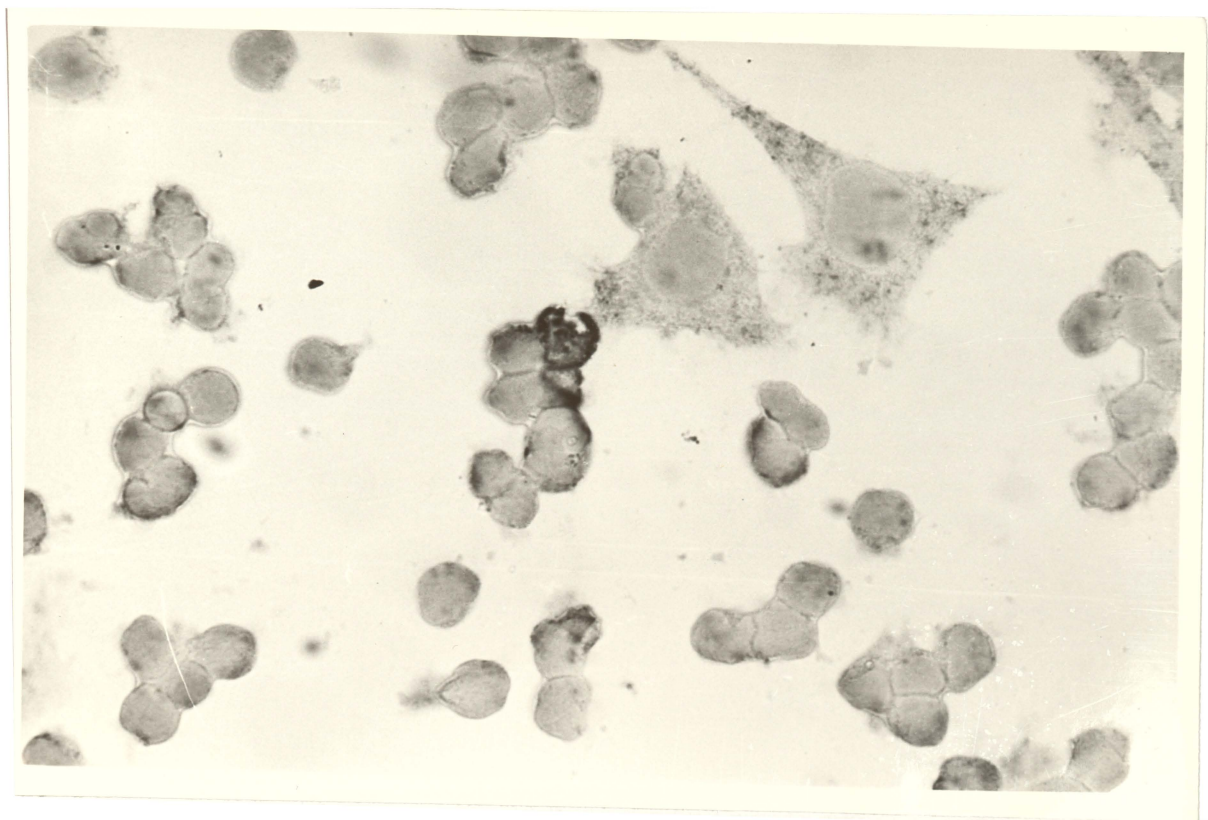
Rys.19 Wpływ preinkubacji monocytów z monomorficznymi przeciwciałami monoklonalnymi (mAb) anti-HLA-DR (L243) na produkcję TNF α po stymulacji komórkami nowotworowymi HPC. Jako kontrole do preinkubacji użyto przeciwciała OKT3 (o izotypie IgG_{2a}) i mysią immunoglobulinę o izotypie IgG_{2a}. Wyniki przedstawione jako wartość średnia z czterech niezależnych eksperymentów (\pm SE). Preinkubacja komórek nowotworowych HPC z przeciwciałami anti-HLA-DR nie wpływała hamująco na produkcję TNF α w kohodowli (dane nie przedstawiane).



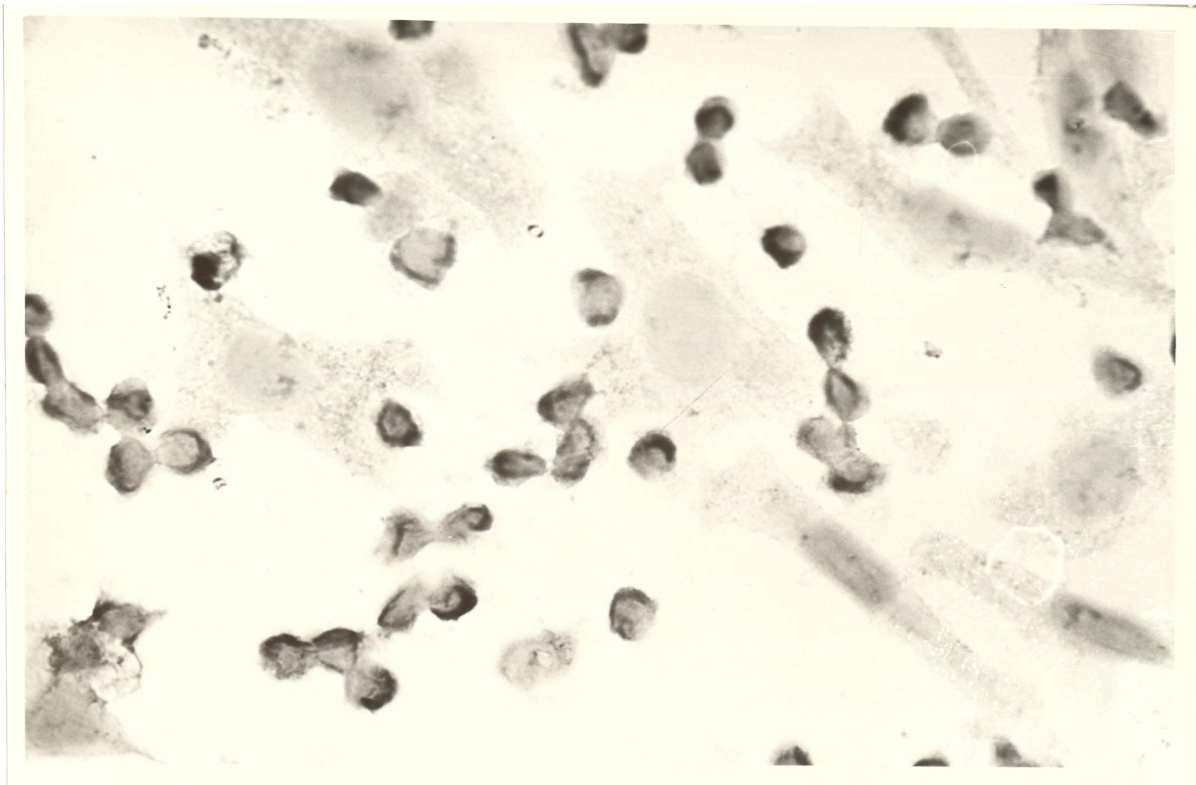
Rys.20 Wpływ monomorficznych przeciwciał monoklonalnych anti-HLA klasa I (HLA I; dla łańcucha ciężkiego) i anti-HLA-DR (L243) na produkcję tlenku azotu przez monocyty (MO) po stymulacji komórkami nowotworowymi DeTa. Jako kontrolę użyto przeciwciała OKT3 o izotypie IgG_{2a}. Wyniki przedstawione jako wartość średnia z sześciu niezależnych eksperymentów (\pm SE).



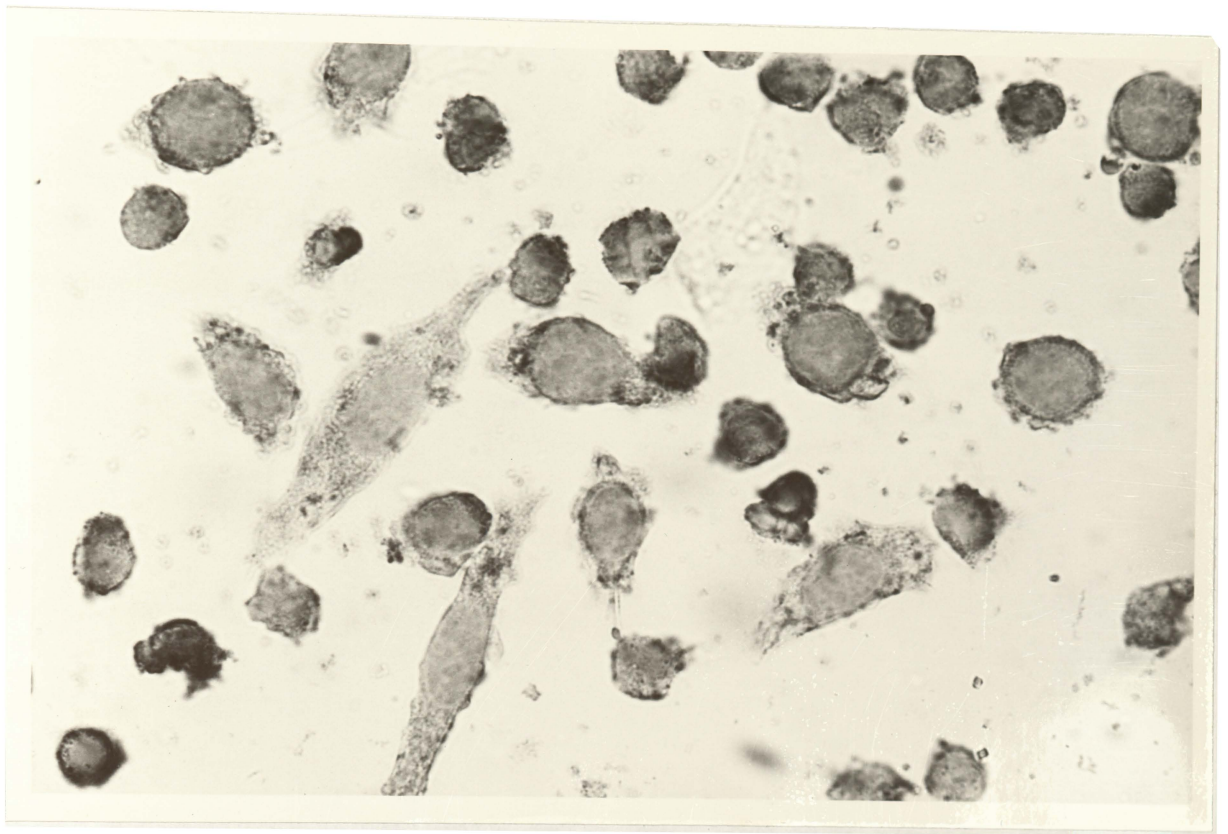
Fot.1 Ślepa hybrydyzacja *in situ* w hodowli monocytów z komórkami nowotworowymi DeTa z zastosowaniem sulfonowanego plazmidu pGEM1, bez specyficznego dla $TNF\alpha$ insertu.



Fot.2 Ekspresja $\text{TNF}\alpha$ mRNA w monocytach hodowanych z komórkami nowotworowymi DeTa przez 4 godziny.



Fot.3 Ekspresja $TNF\alpha$ mRNA w monocytach hodowanych z komórkami nowotworowymi DeTa przez 18 godzin.



Fot.4 Ekspresja $TNF\alpha$ mRNA w monocytach hodowanych z komórkami nowotworowymi CAV1 przez 18 godzin.