

УДК 576-08

*Зубарева Е.В.,
Москаленко М.И.,
Надеждин С.В.,
Шаповалова С.В.*

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ
ЭКЗОГЕННОЙ ГИПЕРТЕРМИИ
НА СВОЙСТВА ЛИМФОЦИТОВ
КРОВИ В ОПЫТАХ IN VITRO**

Зубарева Екатерина Владимировна

*старший преподаватель Ткафедры экологии, физиологии и биологической эволюции,
кандидат биологических наук*

Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия; *E-mail: zubareva-e@yandex.ru*

Москаленко Мария Ивановна

ассистент кафедры медико-биологических дисциплин

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, ул. Победы,
85, г. Белгород, 308015, Россия; *E-mail: zubareva-e@yandex.ru*

Надеждин Сергей Викторович

*доцент кафедры экологии, физиологии и биологической эволюции,
кандидат биологических наук, доцент*

Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия; *E-mail: zubareva-e@yandex.ru*

Шаповалова Снежана Владимировна, студент

Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия; *E-mail: zubareva-e@yandex.ru*

АННОТАЦИЯ

Целью работы явилось изучение в опытах in vitro динамики физико-механических (пластичность) и функциональных (проницаемость плазмалеммы) свойств белых клеток крови при разной температуре инкубации: +37°C, +42°C.

Работа выполнена на лабораторных белых крысах, весом 300-350 г. Забор крови осуществлялся с соблюдением всех правил и норм работы с животными. Пластичность клеток оценивали по изменениям геометрической формы на основе регистрации параметров (диаметр, высота, объём, площадь проекции клетки на подложку) на сканирующем зондовом микроскопе (NT-MDT, Россия). Оценку проницаемости плазмалеммы проводили с использованием флуоресцентного зонда на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (Nikon, Япония).

Установлено, что повышение температуры до +42°C сопровождается снижением проницаемости мембраны и пластичности при увеличении объёма. Изменения свидетельствуют о том, что увеличение температуры является не только опосредованным (через белки теплового шока), но и «прямым» сигналом для функциональных перестроек на клеточном уровне.

Ключевые слова: лимфоциты; пластичность; проницаемость мембраны; объём клеток; экзогенная гипертермия.

UDC 576-08

Zubareva E.V.,
Moskalenko M.I.,
Nadezhdin S.V.,
Shapovalova S.V.

**THE ESTIMATION OF
EXOGENOUS HYPERTHERMIA
INFLUENCE ON THE BLOOD
LYMPHOCYTES' PROPERTIES IN
THE IN VITRO EXPERIMENTS**

Zubareva Ekaterina Vladimirovna

PhD in Biology, Senior Lecturer

Belgorod State National Research University, 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

E-mail: zubareva-e@yandex.ru

Moskalenko Maria Ivanovna

Assistant Lecturer

Belgorod State National Research University, 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

E-mail: zubareva-e@yandex.ru

Nadezhdin Sergey Victorovich

PhD in Biology, Associate Professor

Belgorod State National Research University, 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

E-mail: zubareva-e@yandex.ru

Shapovalova Snezhana Vladimirovna

Student

Belgorod State National Research University, 85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia,

E-mail: zubareva-e@yandex.ru

ABSTRACT

The purpose of the research was to evaluate the dynamics of lymphocytes' physiomechanical (plasticity) and functional (cytolemma permeability) properties in various temperatures (+37°C, +42°C) in the *in vitro* experiments.

The investigation was carried out on white laboratory rats weighing 300- 350 g. The blood samples were taken in accordance with all standards and rules of the work with animals. The cells' plasticity was estimated by the investigation of changes in the geometric shape of cells through registration of parameters (diameter, height, volume, area of the cell projection on the substrate) with the use of an atomic force microscope (NT-MDT, Russia). The cytolemma permeability was estimated with a confocal laser scanning microscope (Nikon, Japan) with the use of a fluorescent probe.

It was revealed that the influence of a high temperature (+42°C) is accompanied by a decrease of cytolemma permeability, plasticity of lymphocytes' and an increase of cells' volume. The changes indicate that the temperature increase is not just an indirect signal (via the heat shock proteins) but also a "direct" signal to the functional reorganization on the cell level.

Keywords: lymphocytes; plasticity; cytolemma permeability; cell's volume; exogenous hyperthermia.

Исследование клеточных механизмов адаптации к действию факторов внешней среды, в том числе экзогенной гипертермии, является актуальной проблемой современной физиологии.

Такие показатели как объём, пластичность, проницаемость клеточной мембраны являются индикатором состояния клетки и играют важную роль в формировании её морфофункционального статуса, который определяет особенности микрореологических реакций и физиологической активности лейкоцитов, выполняющих в организме комплекс важных функций [4, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 17].

Изучение динамики свойств лейкоцитов крови в опытах *in vitro* в условиях действия температуры диапазона физиологической нормы (+37°C) и при умеренной тепловой нагрузке (+42°C) [7] позволит оценить влияние клеточных изменений на адаптивные возможности организма [1, 14].

Цель работы: изучение в опытах *in vitro* динамики физико-механических (пластичность) и функциональных (проницаемость плазмалеммы) свойств белых клеток крови при разной температуре инкубации: +37°C, +42°C.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на лабораторных белых крысах линии Вистар, весом 300-350 г. Забор крови осуществлялся с соблюдением всех правил и норм работы с лабораторными животными. Кровь у животных брали путём декапитации после дачи лёгкого эфирного наркоза. В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 10 ед./мл.

Из цельной крови получали суспензию лейкоцитов. Для этого кровь центрифугировали в течение 10 минут при 1500 об./мин, собирали лейкоцитарное кольцо, примесь эритроцитов разрушали 0,83% раствором хлорида аммония [2, 3]. Затем суспензию снова центрифугировали – в течение 4 минут при 1000 об./мин. Клетки дважды отмывали изотоническим буферным раствором, центрифугировали в течение 2 минут при 1000 об./мин.

Проведено две серии экспериментов. В первой серии оценивали влияние экзогенной гипертермии на морфометрические, физико-механические свойства лимфоцитов. Полученную у животных кровь делили на две части. Первую инкубировали при температуре физиологической нормы (+37°C) – группа «Экспозиция крови (37°C)», вторую – при по-

вышенной температуре окружающей среды (+42°C) – группа «Экспозиция крови (42°C)». По истечении 30 минут выделяли лейкоциты общепринятым способом. Из клеток готовили мазки, фиксировали их 2,5% раствором глутарового альдегида и исследовали геометрические параметры (диаметр, высоту, объём, площадь проекции клетки на подложку) методом полуконтактной атомно-силовой микроскопии на воздухе (СЗМ ИНТЕГРА Вита, NT-MDT, Россия). Зная высоту и площадь соприкосновения клетки с подложкой, вычисляли коэффициент уплощённости лимфоцитов по формуле (1):

$$K_y = S'/h \quad (1)$$

где K_y – коэффициент уплощённости (отн. ед.); S' – площадь проекции клетки на подложку ($\mu\text{м}^2$); h – высота клетки ($\mu\text{м}$).

Во второй серии из цельной крови сразу получали суспензию лейкоцитов, делили её на две пробы, инкубацию клеток осуществляли в течение 30 минут в термостате с добавлением питательной среды RPMI (НПП «ПанЭко», Москва). Первая проба подвергалась действию температуры +37°C – группа «Экспозиция суспензии клеток (37°C)». Вторая проба – температуры +42°C – группа «Экспозиция суспензии клеток (42°C)».

После истечения времени инкубации проводили оценку проницаемости плазмалеммы клеток с использованием флуоресцентного зонда на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (КЛСМ, Nikon, Япония). Лейкоциты наносили на покровные стекла с ячейками (Secure-Seal spacer, Cat. – S24737, Molecular Probes, Inc. USA) и помещали на предметный столик КЛСМ. Осуществляли запуск КЛСМ и программы управления C1 plus. В суспензию клеток (80 $\mu\text{л}$) добавляли 0,5 $\mu\text{л}$ 1 mM раствора кальцеина AM (Calcein AM, Cat. C3100MP, Molecular Probes, Inc. USA) и запускали процесс сканирования в режиме временных серий. Преимущество данного флуоресцентного зонда – в свободном проникновении через плазматическую мембрану живых клеток посредством простой диффузии [11, 15]. Проникнув в клетку, ацетооксиметиловый эфир кальцеина в результате гидролиза клеточными эстеразами, превращается в полианион кальцеин, который обладает флуоресценцией в зелёной области спектра ($\lambda_{\text{abs}} = 490 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ нм}$) и удерживается в клетках с целостной мембраной благодаря своему заряду [6]. Оценку проницаемости

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЭКЗОГЕННОЙ ГИПЕРТЕРМИИ НА СВОЙСТВА
ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ В ОПЫТАХ *IN VITRO*

плазмалеммы лимфоцитов осуществляли, рассчитав коэффициент проникновения флуоресцентного зонда – кальцеина АМ, по следующей формуле (2):
$$K_{\text{п}} = \text{Int}_{\text{max}}/t, \quad (2)$$

где $K_{\text{п}}$ – коэффициент проникновения флуоресцентного зонда (усл.ед.); Int_{max} – значение максимальной интенсивности (усл.ед.); t – время максимального пика интенсивности излучения флуоресцентного зонда (с).

**Результаты исследования
и их обсуждение**

Исследование морфометрических параметров лимфоцитов, подвергавшихся действию экзогенной гипертермии в опытах *in vitro*,

проводили методом полуконтактной атомно-силовой микроскопии на воздухе. Полученные в результате эксперимента данные занесены в таблицу 1.

Изменение распластанности лимфоцитов на поверхности подложки под влиянием тепловой нагрузки оценивали по коэффициенту уплощённости клеток (рис. 1).

Установлено, что действие на кровь повышенной температуры приводит к увеличению объёма клеток и снижению их распластанности, по сравнению с соответствующими показателями лимфоцитов, инкубированных в условиях температуры физиологической нормы (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1

**Геометрические параметры лимфоцитов,
полученные методом полуконтактной СЗМ на воздухе**

Table 1

Lymphocytes' geometric parameters obtained with the semicontact atomic force microscopy

Группа	Показатель, единица измерения			
	D, мкм	h, мкм	S', мкм ²	V, мкм ³
Экспозиция крови (37°C)	12,02 ± 0,61	0,66 ± 0,13	116,55 ± 11,70	76,85 ± 18,72
Экспозиция крови (42°C)	9,55 ± 0,41	1,52 ± 0,15*	72,69 ± 6,28	108,21 ± 12,02

Примечание: D – диаметр клетки (M±m); h – высота клетки (M±m); S' – площадь проекции клетки на подложку (M±m); V – объём клетки (M±m); * – достоверность различий по сравнению с группой «Экспозиция крови (37°C)»; (критерий Вилкоксона, p<0,05).

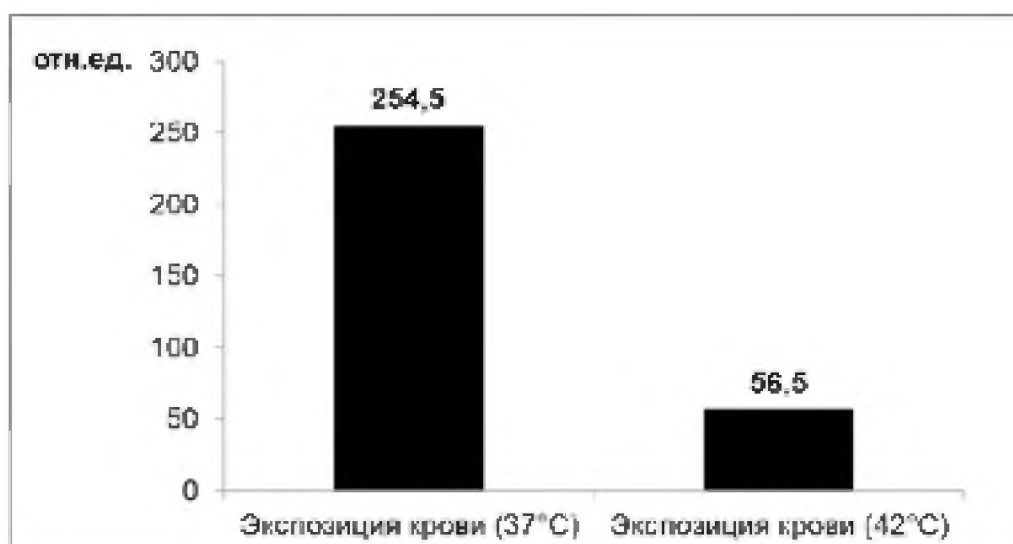


Рис.1. Коэффициент уплощённости лимфоцитов (отн.ед.), инкубированных при разной температуре

Figure 1. Coefficient of flatness of lymphocytes (relative units) incubated under different temperatures

В результате исследования проб на КЛСМ было установлено, что при инкубации суспензии клеток при повышенной температуре (+42°C) насыщение протоплазмы лимфо-

цитов кальцеином АМ происходит быстрее, по сравнению со временем проникновения флуоресцентного зонда в клетки, которые подвергали действию температуры физио-

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЭКЗОГЕННОЙ ГИПЕРТЕРМИИ НА СВОЙСТВА
ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ В ОПЫТАХ IN VITRO

логической нормы *in vitro*. Однако под влиянием повышенной температуры отмечается снижение коэффициента проникновения кальцеина АМ в клетки (табл. 2).

Методом КЛСМ выявлено, что экспозиция лимфоцитов при температуре +42°C со-

провождается снижением интенсивности флуоресценции, по сравнению со значением данного показателя клеток, инкубированных при температуре физиологической нормы (табл. 3, рис.2, 3).

Таблица 2

Полученные методом КЛСМ показатели, характеризующие насыщение протоплазмы лимфоцитов кальцеином АМ

Table 2

The characteristics of lymphocytes' protoplasm saturation of calcein AM obtained with the confocal laser scanning microscopy

Группа	Время проникновения флуоресцентного зонда в клетку, с	Коэффициент проникновения, усл. ед.
Экспозиция суспензии клеток (37°C)	1152,75 ± 13,39	0,74
Экспозиция суспензии клеток (42°C)	980,30 ± 12,90*	0,51

Примечание: (M±m); * - достоверность отличий по сравнению с группой «Экспозиция суспензии клеток (37°C)» (критерий Вилкоксона, p<0,05).

Таблица 3

Показатель интенсивности флуоресценции лимфоцитов, полученный методом КЛСМ

Table 3

The characteristic of lymphocytes' fluorescence strength obtained with the confocal laser scanning microscopy

Группа	Интенсивность флуоресценции, усл.ед.
Экспозиция суспензии клеток (37°C)	854,82 ± 10,42
Экспозиция суспензии клеток (42°C)	504,32 ± 7,37*

Примечание: (M±m); * - достоверность отличий по сравнению с группой «Экспозиция суспензии клеток (37°C)» (критерий Вилкоксона, p<0,05).

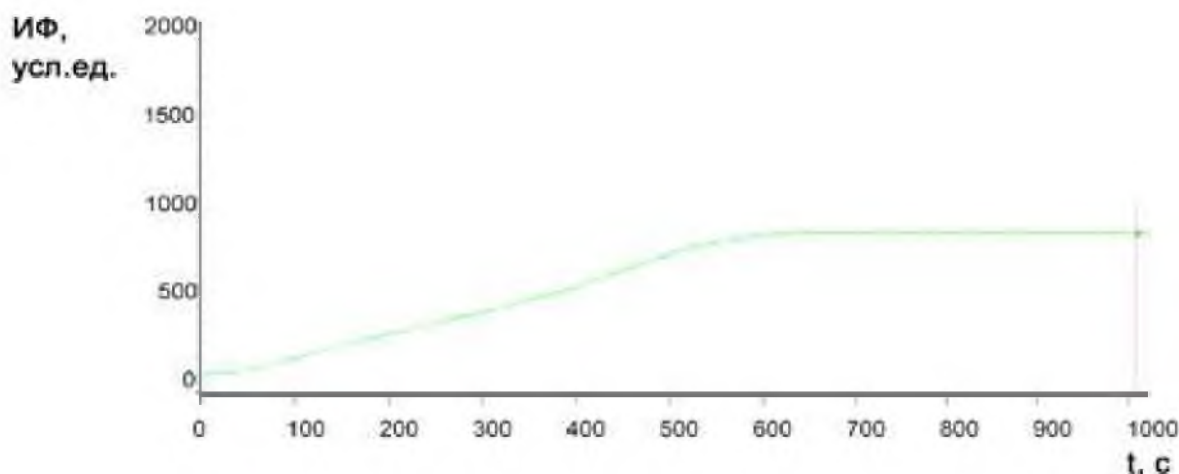


Рис.2. График изменения интенсивности флуоресценции клеток группы «Экспозиция суспензии клеток (37°C)» в заданный промежуток времени (ИФ – интенсивность флуоресценции, в усл.ед.; t – время, в секундах).
Figure 2. Graph of cells' fluorescence strength changes during given time period of the group "Exposition of cells suspension (37°C)" (ИФ - fluorescence strength, conventional units; t – time, seconds).

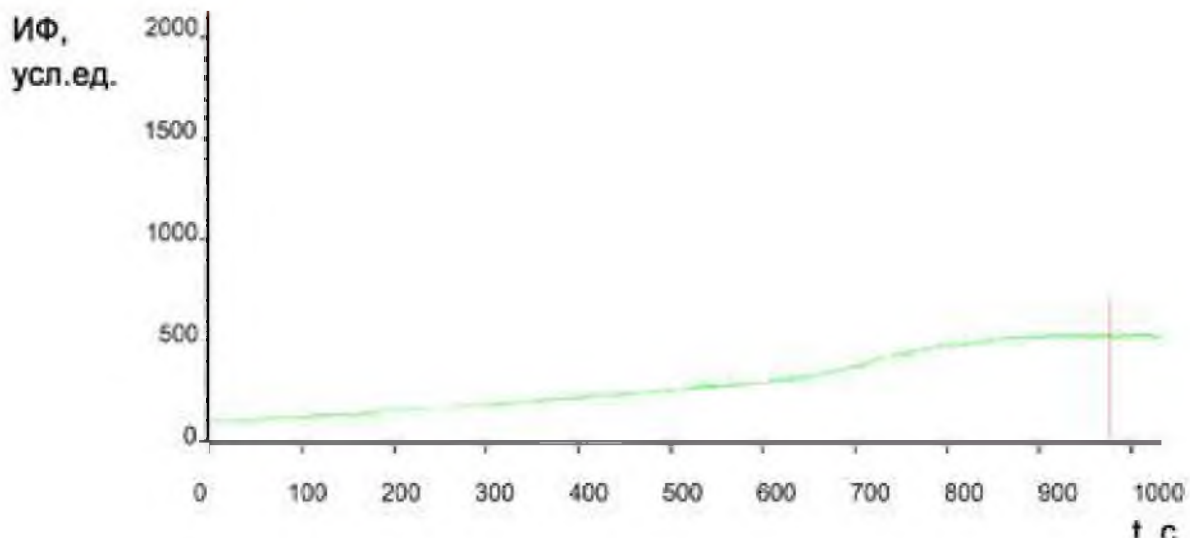
**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЭКЗОГЕННОЙ ГИПЕРТЕРМИИ НА СВОЙСТВА
ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ В ОПЫТАХ IN VITRO**


Рис.3. График изменения интенсивности флуоресценции клеток группы «Экспозиция суспензии клеток (42°C)» в заданный промежуток времени (ИФ – интенсивность флуоресценции, в усл.ед.; t – время, в секундах).
 Figure 3. Graph of cells' fluorescence strength changes during a given time period of the group "Exposition of cells suspension (42°C)" (ИФ – fluorescence strength, conventional units; t – time, seconds).

Рассчитанный коэффициент проникновения флуоресцентного зонда показал снижение проницаемости плазмалеммы у лимфоцитов, подвергавшихся действию повышенной температуры, по сравнению с соответствующим показателем клеток, инкубированных в условиях действия температуры диапазона физиологической нормы. Исходя из того, что лимфоциты были отмыты изотоническим раствором, а затем подверглись нагреванию, можно предположить, что увеличение температуры внешней среды непосредственно влияет на структурные элементы плазмалеммы, вызывая фазовый переход липидного компонента [5].

Заключение

В ходе проведенного исследования установлено, что инкубация крови в условиях повышенной температуры (+42°C) вызывает увеличение объема лимфоцитов и уменьшение их распластанности. Нагревание лимфоцитов приводит к уменьшению проницаемости плазмалеммы для веществ, проходящих в клетку в результате простой диффузии.

Экспозиция суспензии клеток в условиях температуры физиологической нормы (+37°C) и при повышенной температуре (+42°C) в

опытах *in vitro* исключает возможность регуляции морфофизиологических характеристик клеток гуморальными факторами, вырабатываемыми в организме. То есть изменение морфофункциональных свойств белых клеток крови при их экзогенном перегревании, является следствием активации внутриклеточных механизмов регуляции функционального состояния лейкоцитов. В работе Wiegant F.A.C. и соавторов [18] сообщается также, что тепловая нагрузка на клетки способна повлечь за собой перестройку их цитоскелета, что, в свою очередь, отражается на морфологических параметрах лимфоцитов.

Увеличение клеточного объема при повышении температуры, скорее всего, есть следствие фазового перехода липидного компонента мембраны.

Однако снижение распластывания лимфоцитов на подложке и повышение «контроля» за проникновением веществ в клетку свидетельствует о том, что увеличение температуры является не только опосредованным (через белки теплового шока), но и «прямым» сигналом для функциональных перестроек на клеточном уровне.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Горичева В.Д. Функциональные свойства и реактивность лейкоцитов крови в условиях гипертермии: Дис. ... к.б.н. Ярославль: ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, 2000. 133 с.
2. Дуглас С.Д., Куи П.Г. Исследование фагоцитоза в клинической практике. М.: Медицина, 1983. 112 с.
3. Зимин Ю.И., Редькин А.П. Угнетение нестимулированными лимфоцитами спонтанной миграции лейкоцитов под агаром // Иммунология. 1987. № 1. С. 71-73.
4. Иванов К.П., Мельникова Н.Н. Роль лейкоцитов в динамике микроциркуляции в норме и при патологии // Гематология и трансфузиология. 2004. № 1. С. 3-13.
5. Харакоз Д.П. О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое-твердое» в биологических мембранах // Успехи биологической химии. 2001. №4. С. 333-364.
6. Abbas A., Lichtman A., Pober J. Cellular and Molecular Immunology. – N.Y.: Saunders Co, 1991. Pp. 14-21.
7. Alfieri R.R., Petronini P.G., Bonelli M.A., Desenzani S., Cavazzoni A., Borghetti A.F., Wheeler K.P. Roles of compatible osmolytes and heat shock protein 70 in the induction of tolerance to stresses in porcine endothelial cells // J. Physiol. 2004. Vol. 555.3. Pp. 757-767.
8. Beck F.X., Burger-Kentischer A., Müller E. Cellular response to osmotic stress in the renal medulla // Pflugers Archiv European journal of physiology. 1998. Vol. 436. Pp. 814-827.
9. Davis C.E., Rychak J.J., Hosticka B., Davis S.C., J. Edward John III, Tucker A.L., Norris P.M., Moorman J.R. A novel method for measuring dynamic changes in cell volume // Journal of Applied Physiology. 2004. Vol. 96. Pp. 1886-1893.
10. Ebner H.L., Cordas A., Pafundo D.E., Schwarzbaum P.J., Pelster B., Krumschnabel G. Importance of cytoskeletal elements in volume regulatory responses of trout hepatocytes // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 2005. Vol. 289. Pp. R877-R890.
11. Gatti R., Belletti S., Orlandini G. et al. Comparison of Annexin V and Calcein-AM as Early Vital Markers of Apoptosis in Adherent Cells by Confocal Laser Microscopy // The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 1998. Vol. 46 (8). Pp. 895-900.
12. Lang F. Mechanisms and significance of cell volume regulation // Journal of the American college of nutrition. 2007. Vol. 26. No.5. Pp. 613S-623S.
13. Mc Manus M.L. Cell volume regulation in normal and pathological state // The New England Journal of Medicine. 1995. Vol. 9. Pp. 1260.
14. Moseley P.L. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism // Journal of applied physiology. 1997. Vol. 83. Issue 5. Pp. 1413-1417.
15. Prats M., Tocanne J.F., Teissie J. Lateral proton conduction along a lipid-water interface layer: a molecular mechanism for the role of hydration water molecules // Biochimie. 1989. Vol. 71. № 1. Pp. 33-36.
16. Wehner F., Olsen H., Tinel H., Kinne-Safra E., Kinne R.K.H. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 2003. Vol. 148. Pp. 1-80.
17. Wehner F., Tinel H. Osmolyte and Na⁺ transport balances of rat hepatocytes as a function of hypertonic stress // Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 2000. Vol. 441. Pp. 12-24.
18. Wiegant F.A.C., P.M.P. van Bergen en Henegouwen, G. van Dongen, Linnemans W.A.M. Stress-induced thermotolerance of the cytoskeleton of mouse neuroblastoma N2A cells and rat reuber H35 hepatoma cells // Cancer Research. 1987. Vol. 47. Pp. 1674-1680.

REFERENCES:

1. Goricheva V.D. Functional Properties and Reactivity of Blood Leucocytes under Hyperthermia Conditions: Dis. ... k.b.n. Yaroslavl': YaG-PU im. K.D. Ushinskogo, 2000. 133 p.
2. Duglas S.D., Kui P.G. Investigation of Phagocytosis in Clinical Practice. M.: Meditsina, 1983. 112 p.
3. Zimin Yu.I., Red'kin A.P. Immunology. 1987. № 1. Pp. 71-73.
4. Ivanov K.P., Mel'nikova N.N. The Role of Leucocytes in the Dynamics of Microcirculation in the Norm and Pathology // *Gematologija i transfuziologija*. 2004. № 1. Pp. 3-13.
5. Harakoz D.P. On the Possible Physiological Role of a Phase Transition from the Liquid into the Solid // *Uspehi biologicheskoy himii*. 2001. №4. Pp. 333-364.
6. Abbas A., Lichtman A., Pober J. Cellular and Molecular Immunology. N.Y.: Saunders Co, 1991. Pp. 14-21.
7. Alfieri R.R., Petronini P.G., Bonelli M.A., Desenzani S., Cavazzoni A., Borghetti A.F., Wheeler K.P. Roles of compatible osmolytes and heat shock protein 70 in the induction of tolerance to stresses in porcine endothelial cells // *J. Physiol*. 2004. Vol.555.3. P.757-767.
8. Beck F.X., Burger-Kentischer A., Müller E. Cellular response to osmotic stress in the renal medulla // *Pflugers Archiv European journal of physiology*. 1998. Vol.436. Pp.814-827.
9. Davis C.E., Rychak J.J., Hosticka B., Davis S.C., J. Edward John III, Tucker A.L., Norris P.M., Moorman J.R. A novel method for measuring dynamic changes in cell volume // *Journal of Applied Physiology*. 2004. Vol.96. Pp.1886-1893.
10. Ebner H.L., Cordas A., Pafundo D.E., Schwarzbach P.J., Pelster B., Krumschnabel G. Importance of cytoskeletal elements in volume regulatory responses of trout hepatocytes // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol*. 2005. Vol.289. Pp. R877-R890.
11. Gatti R., Belletti S., Orlandini G. et al. Comparison of Annexin V and Calcein-AM as Early Vital Markers of Apoptosis in Adherent Cells by Confocal Laser Microscopy // *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1998. Vol. 46 (8). Pp. 895-900.
12. Lang F. Mechanisms and significance of cell volume regulation // *Journal of the American college of nutrition*. 2007. Vol.26. No.5. Pp.613S-623S.
13. Mc Manus M.L. Cell volume regulation in normal and pathological state // *The New England Journal of Medicine*. 1995. Vol.9. Pp. 1260.
14. Moseley P.L. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism // *Journal of applied physiology*. 1997. Vol.83. Issue 5. Pp. 1413-1417.
15. Prats M., Tocanne J.F., Teissie J. Lateral proton conduction along a lipid-water interface layer: a molecular mechanism for the role of hydration water molecules // *Biochimie*. 1989. Vol. 71. № 1. Pp. 33-36.
16. Wehner F., Olsen H., Tinel H., Kinne-Safra E., Kinne R.K.H. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 2003. Vol.148. Pp.1-80.
17. Wehner F., Tinel H. Osmolyte and Na⁺ transport balances of rat hepatocytes as a function of hypertonic stress // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol*. 2000. Vol.441. Pp.12-24.
18. Wiegant F.A.C., P.M.P. van Bergen en Hene-gouwen, G. van Dongen, Linnemans W.A.M. Stress-induced thermotolerance of the cytoskeleton of mouse neuroblastoma N2A cells and rat reuber H35 hepatoma cells // *Cancer Research*. 1987. Vol.47. Pp.1674-1680.