

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE - SKŁODOWSKA  
LUBLIN—POLONIA

VOL. XIX, 52

SECTIO D

1964

---

Katedra i Zakład Anatomii Patologicznej, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: prof. dr med. Stanisław Mahrburg

Daniel CHIBOWSKI

**Badania immunohistochemiczne komórek raka puchlinowego Ehrlicha**

**Иммуногистохимические исследования клеток водяного рака Эрлиха**

**An Immunohistochemical Investigation of the Cells of Ehrlich's  
Ascites Carcinoma**

Zasadniczym problemem w immunologii złośliwych nowotworów jest rozstrzygnięcie zagadnienia zmian składników antygenowych w komórkach w toku kancerogenezy. Dostateczne opracowanie tego zagadnienia pozwoli być może na wczesną serodiagnostykę i seroterapię nowotworów. Pionierskie prace nad antygenową strukturą nowotworów złośliwych podjęte były niezależnie od siebie w latach trzydziestych naszego stulecia przez Hirszfelda i wsp. w Polsce (13) oraz Witebskiego i wsp. w Niemczech (cyt. wg 18). Przed kilkunastu laty Zilber i jego szkoła zapoczątkowali rozległe badania nad składnikami antygenowymi nowotworów złośliwych ludzkich i zwierzęcych przy pomocy metody uczulania i odczulania świnek morskich (24, 25, 26). Tą drogą wykazali oni we frakcji nukleoproteinowej obecność antygenów nie występujących w tkankach prawidłowych w przypadkach białaczki ludzkiej, jak również i w nowotworach zwierzęcych (wątrobiaku myszy C3H wywołanym ortoazobenzotoluenem, mięsaku Rousa i brodawczaku Shopa). Khramkova i wsp. (16), posługując się metodą precipitacji w żelu wg Oüchterlona oraz Abelew i wsp. (1), tą samą techniką, wykazali w przeszczepialnym wątrobiaku myszy C3H antygen nieobecny w normalnej wątrobie, ani w innych narządach myszy tego szczepu. Jednocześnie nowotwór ten był pozbawiony antygeny obecnego w prawidłowej wątrobie. Hiramoto i wsp. (14) wykazali przy pomocy metody immunohistochemicznej brak swoistych narządowo antygenów w doświadczalnych wątrobiakach szczurów. Wykazano również brak specyficznych narządowo antygenów w przypadku raka płaskonabłonkowego skóry u ludzi (19), jak również w przypadkach ludzkich raków przewodu pokarmowego. Wydaje się więc, że można obecnie uważać za fakt doświadczalnie udowodniony, że w procesie kancerogenezy dochodzi nie tylko do powstawania nowych kompleksów antygenowych, lecz również do utraty niektórych właściwości antygenowych komórek prawidłowych. Interesującą hipotezę

kancerogenezy opartej na nowych osiągnięciach biochemii kwasów nukleinowych, w połączeniu z immunologiczną koncepcją powstawania raka wg Green'a (10, 11), podaje ostatnio Burch (5).

### CEL BADANIA

Celem badań jest analiza budowy antygenowej komórek RPE\*, przy zastosowaniu metody fluoryzujących przeciwciał.

### Materiał i metody badań

1. Badania przeprowadzono na wysiękowym raku Ehrlicha, przeszczepionym na samcach i samicach myszy szczepu A Strong\*\*.

2. Specyficzne przeciwciała uzyskiwano w następujący sposób: króliki wagi około 3 kg żywione dietą zwykłą immunizowano wg następującej metody: po 1 ml 5% zawiesiny trzykrotnie przemytych w 0,15 M NaCl komórek RPE wstrzykiwano dożylnie, podskórnie, śródskórnie, domięśniowo i dootrzewnowo wg następującego schematu:

1 tydzień — pierwszego dnia szczepiono komórki RPE wraz z adjuwantem Freund'a, 2 i 3 dnia 5% zawiesiną komórek RPE, 5 dni odpoczynku.

2, 3 i 4 tydzień — króliki szczepiono co 3 dzień 5% zawiesiną komórek RPE w soli fizjologicznej. Tydzień odpoczynku, po czym pobrano krew drogą punkcji serca w celu określenia miana aglutynacji. Aby uzyskać bardziej aktywną surowicę, stosowano dwukrotną reimmunizację. Surowice królików, które najlepiej zareagowały na immunizację mieszano razem i określano miano aglutynacji w stosunku do komórek RPE i erytrocytów mysich wg metody podanej przez Fitcha (9).

3. Ponieważ uważa się, że przeciwciała występują we frakcji  $\gamma$ -globulin surowicy króliczej, frakcja ta była analizowana jako miara wytworzonych przeciwciał. Ilość ogólną białek oznaczano refraktometrem Zeissa, a frakcje białkowe za pomocą elektroforezy bibułowej, używając buforu weronalowego o pH 8,6. Czas trwania rozdzielania wynosił 8 godzin przy napięciu 260 V. Paski zabarwione czernią amidową 10 B cięto na poszczególne frakcje, ługowe 0,4% NaOH i oznaczano w fotometrze Pulfricha. Badanie to wykonano przed rozpoczęciem immunizacji, a następnie po jej ukończeniu.

4. Badania immunohistochemiczne. Surowicę otrzymaną od królików immunizowanych komórkami RPE w podany sposób mieszano razem, dodając w celach konserwacyjnych merthiolat w stężeniu 1:10 000. Znakowanie FIT-em\*\*\* przeprowadzono wg metody podanej przez Nairna (19), używając 0,05 mg FIT-u na 1 mg białek surowicy. Po 18 godzinach mieszania w temp. 2°C koniugatę przeniesiono do woreczka dializującego i dializowano przez 8 dni, wobec często zmienianego 0,15 M NaCl o pH 7,1. Tak przygotowaną koniugatę przechowywano w lodówce w temp. 4°C. W celu zlikwidowania barwienia nieswoistego wytrząsano koniugatę przez godzinę z pudrem acetonowym z wątroby szczura, następnie

\* W pracy używam następujących skrótów: FIT — fluoresceiny izotiocyjanian. RPE — rak puchlinowy Ehrlicha.

\*\* RPE i myszy szczepu A Strong otrzymaliśmy od dr H. N. Green'a, Department of Experimental Pathology and Cancer Research, School of Medicine, Leeds 2, Anglia.

\*\*\* FIT f-my Sylvania Chemical Corp., Orange, N.Y. USA.

roztwór odwirowywano przez 20 minut przy 16 000 obrotów na minutę w temp. 2°C (stosowano 200 mg pudru acetonowego na 1 ml koniugaty). W ten sposób oczyszczona koniugata była absorbowana zliofilizowanymi komórkami RPE oraz świeżą całkowitą krwią mysia. Heparynizowaną krew mysia dodawano w ilości 1 ml na 2 ml znakowanych globulin. Zliofilizowane komórki RPE dodawano w proporcji 200 mg na 1 ml znakowanej surowicy. W celu skompensowania rozcieńczenia znakowanej surowicy, powstałego na skutek dodawania krwi mysiej, dolewano 1 ml 0,15 M NaCl na każde 2 ml surowicy absorbowanej pudrem z wątroby szczura i zliofilizowanymi komórkami RPE. Rozmazy wykonywano ze świeżo pobranego płynu wysiękowego lub 3-krotnie przemytych komórek RPE w 0,15 M NaCl o pH 7,1. Rozmazy suszono w eksykatorze próżniowym nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, niektóre z nich barwiono bezpośrednio po wysuszeniu, inne zaś utrwalano przez 30 minut w 96 % etanolu. W celu zbadania reakcji krzyżowych skrawki z nerek, wątroby oraz płuc skrojono w kryostacie w temp. -20°C. Tak wykonane rozmazy i preparaty „barwiono” znakowanymi globulinami anty RPE, stosując metodę bezpośrednią wg Coonsa w modyfikacji Mellorsa (17). W badaniach mikroskopowych posługiwano się 10 amperową lampą łukową f-my Zeiss z przystawką do zwykłego mikroskopu. Jako filtru wzbudzającego używano filtru Schotta BG<sub>12</sub> grubości 4 mm. Rolę filtru zamykającego spełniał filtr „Euphos” OG<sub>1</sub>. Zdjęcia wykonywano na filmie negatywowym „Fluorofilm Z” produkcji polskiej.

#### WYNIKI BADAŃ

**A.** Badania elektroforetyczne. Elektroforezą bibułową wykazano, że surowica królików immunizowanych komórkami RPE zawiera znacznie wyższy poziom  $\gamma$ -globulin w porównaniu z surowicą pobraną przed immunizacją. Wyniki badań elektroforetycznych przedstawione są w tab. 1.

Tab. 1. Analiza elektroforetyczna króliczych surowic przed i po immunizacji  
Electrophoretic analysis of the rabbit sera before and after agglutination

Frakcje białek	Surowica królików przed immunizacją		Surowica królików immunizowanych	
	gr/100 ml	%	gr/100 ml	%
białko całkowite	6,70	100	7,70	100
albuminy	3,84	57,43	3,42	44,41
globuliny całkowite	2,85	42,58	4,28	55,43
$\alpha$ -globuliny	0,93	13,88	1,09	14,01
$\beta$ -globuliny	0,92	13,70	1,18	15,32
$\gamma$ -globuliny	1,01	15,00	2,01	26,10

**B.** Miana aglutynacji surowicy znakowanej FIT-em określane były zarówno w stosunku do komórek RPE, jak i mysich erytrocytów. Wyniki zestawione są w tab. 2.

Tab. 2. Miana aglutynacji dla komórek RPE i erytrocytów mysich  
 Titers of agglutination for the RPE cells and mouse erythrocytes

Znakowane FIT-em anty RPE globuliny, absorbowane:	Erytrocyty mysie	Komórki RPE
niczym	1 : 256	1 : 3072
pudrem z wątroby szczura	1 : 192	1 : 2048
pudrem z wątroby myszy	1 : 192	1 : 2048
całkowitą krwią mysią	1 : 96	1 : 2048
zliofilizowanymi komórkami RPE	1 : 48	1 : 192
globuliny od królików kontrolnych, absorbowane:		
niczym	1 : 16	1 : 16
pudrem z wątroby szczura	1 : 16	1 : 16
pudrem z wątroby myszy	1 : 16	1 : 16

Przy barwieniu rozmazów wykonywanych ze świeżo pobranego płynu wysiękowego i utrwalonych w 96 % alkoholu etylowym oraz suszonych w eksykatorze próżniowym nad  $P_2O_5$  obserwowano intensywną fluorescencję komórek RPE oraz dość znaczną fluorescencję podłoża (ryc. 1). Wychodząc z założenia, że fluorescencja podłoża, jak również wzmożona fluorescencja komórek RPE uzależniona jest od obecności różnych ilości białek surowicy mysiej w płynie wysiękowym, w badaniach specyficzności antyserum przeciwko komórkom RPE oraz jego reagowaniu z poszczególnymi składnikami tych komórek, używano komórek RPE 3-krotnie przemytych w 0,15 M NaCl. Rozmazy wykonane z przemytych i nie utrwalonych komórek RPE barwione znakowaną surowicą anty RPE, absorbowaną wątrobą mysią oraz heparynizowaną świeżą krwią mysią nie wykazywały uchwytnych różnic. We wszystkich wypadkach cytoplazma fluoryzowała jasno-żółto-zielonkawo, wykazując intensywniejszą fluorescencję na obwodzie komórki. Zabarwienie jąder było nieuchwytnie (ryc. 2 i 3). Komórki poddane działaniu fluoryzujących przeciwciał absorbowanych zliofilizowanymi komórkami RPE wykazywały jedynie fluorescencję błony komórkowej i cytoplazmy, której nie udało się uchwycić na zdjęciu. Rozmazy wykonane z przemytych komórek RPE i utrwalone w 96 % etanolu, poza nieznacznym zmniejszeniem intensywności fluorescencji, nie wykazały uchwytnych różnic w porównaniu z rozmazami nie utrwalanymi (ryc. 4). We wszystkich przypadkach leukocyty fluoryzowały jasno. Mniejszą intensywność fluorescencji komórek RPE utrwalanych w 96 % etanolu należy łączyć

prawdopodobnie z uszkodzeniem przez alkohol materiału antygenowego komórek.

W celu zbliżenia badań do warunków panujących „*in vivo*” przeprowadzono badania immunohistochemiczne na żywych komórkach RPE. Przemycie w 0,15 M NaCl, pH 7,1 komórki RPE zawieszono w znakowanej surowicy anty RPE absorbowanej wątrołą szczurzą oraz świeżą, heparynizowaną całkowitą krwią mysia. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej komórki przemycano w 0,15 M NaCl, pH 7,1 i badano w mikroskopie fluorescencyjnym jako mokry preparat. Komórki inkubowane w antyserum znakowanym FIT-em absorbowanym wątrołą szczurzą i świeżą krwią mysia wykazywały intensywny rąbek fluorescencji, ograniczony jedynie do błony komórkowej (ryc. 5). Komórki inkubowane w antyserum absorbowanym zliofilizowanymi komórkami RPE nie wykazywały fluorescencji. Wszystkie komórki inkubowane w antyserum wykazywały wybitną aglutynację, najmniejszą jednak w antyserum absorbowanym zliofilizowanymi komórkami RPE. Dane te wskazują, że wyniki uzyskane przy działaniu fluoryzującymi przeciwciałami na rozmazy komórek RPE są pewnego rodzaju „artefaktami”, wynikającymi z uszkodzenia błony komórkowej przez utrwalanie i suszenie preparatów, co umożliwiło przeciwciałom na wnikięcie do wnętrza cytoplazmy. Chcąc się przekonać, czy błona komórkowa uszkodzona przez cytotoksyczne przeciwciała przepuszcza takie makrocząsteczki jak gamma globuliny do wnętrza, a wychodząc z założenia, że gamma globuliny skierowane przeciwko komórkom RPE wiążą się z antygenami błony komórkowej i z tego powodu nie wnikają do cytoplazmy, przeprowadzono następujące doświadczenie. Po 10-minutowej inkubacji komórek RPE (0,2 ml 10 % zawiesiny) w płynie składającym się z 0,2 ml nie rozcieńczonej, nie znakowanej FIT-em surowicy anty RPE i 0,2 ml dopełniacza dodano 0,2 ml globulin króliczych anty ludzkiej globulinie 7 S\*. Komórki RPE inkubowano w temperaturze pokojowej przez dalsze 20 minut. Wykonane mokre preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym. Zaobserwowano wyraźnie zmiany cytotoksyczne oraz aglutynację komórek. Pojedyncze duże komórki nie ulegały zmianom cytotoksycznym. W żadnej z komórek nie udało się zaobserwować fluoryzujących ziarnistości ani w obrębie jądra, ani w cytoplazmie (ryc. 6). Gdyby metoda ta była wystarczająco czuła, można by przyjąć, że w przebiegu cytotoksycznego działania przeciwciał skierowanych przeciwko komórkom RPE dochodzi jedynie do wybiórczego uszkodzenia przepuszczalności błony komórkowej.

\* Króliczą globulinę anty ludzkiej globulinie 7 S otrzymano z Pracowni Immunohistochemicznej z Z.A.P. w Warszawie.

Aby sprawdzić, czy fluoryzujące przeciwciała skierowane przeciwko komórkom RPE zawierają, oprócz przeciwciał swoistych, również przeciwciała reagujące z normalnymi antygenami tkanek mysich, zabarwiono skrojone w kryostacie, nie utrwalone skrawki wątroby i nerek fluoryzującymi przeciwciałami. anty RPE. Uzyskano intensywną, rozlaną fluorescencję kłębków nerkowych oraz mniej intensywną fluorescencję przestrzeni śródmiąższowych (ryc. 7). Absorbacja wątroby i krwią mysią nie miała większego wpływu na intensywność fluorescencji. Skrawki wątroby mysiej wykazywały umiarkowaną fluorescencję wzdłuż powierzchni zatok oraz w obrębie ścian naczyń. Dane te świadczą o obecności w komórkach RPE antygenów wspólnych dla komórek RPE jak również i normalnych tkanek mysich.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Rak puchlinowy Ehrlicha (RPE) był często używany jako model dowodzący na analizę budowy antygenowej komórek nowotworowych. Easty i Ambrose (6), używając dyfuzji w żelu i innych metod, stwierdzili, że komórki RPE posiadają obok antygenów obecnych w nerkach, śledzionie, wątrobie i krwi również antygeny typowe dla komórek RPE. Baszkajew (4) stosując precypitację w żelu, wykazał w komórkach RPE obecność heterogennych antygenów, wspólnych z antygenami nerki świnki morskiej oraz ludzkiego żołądka zarówno prawidłowego, jak i zmienionego rakowo. Badacze ci wykazali w komórkach RPE obok antygenów nowotworowych również antygeny wspólne z prawidłowymi tkankami myszy. Wyniki uzyskane w naszych badaniach przy użyciu metody immunohistochemicznej wskazują również na to, że w komórkach RPE obok swoistych dla nich antygenów, występują także antygeny wspólnie z antygenami obecnymi w tkankach prawidłowych. Dane te są zgodne z wynikami osiągniętymi przez Fitcha (9). Charakter tych reakcji krzyżowych nie jest znany. Pewne przeciwciała mogą być skierowane przeciwko błonom podstawowym, jednak fluorescencja zatok wątrobowych wskazuje, że nie tylko te przeciwciała są obecne. Również antygenowi Forsmana nie można przypisać tych reakcji krzyżowych, ponieważ Julius i De Vries (15) wykazali, że w postaci wysiękowej raka puchlinowego Ehrlicha antygen ten jest nieobecny. Widzimy więc, że konieczna jest dokładna analiza antygenów w prawidłowych tkankach mysich, aby można było wyciągnąć wnioski odnośnie różnic w budowie antygenowej w przypadkach nowotworów. Wydaje się, że zastosowanie różnych utrwalaczy oraz różnorodnej preparatyki enzymatycznej może dostarczyć informacji odnośnie tego

zagadnienia. Również badania przy pomocy monospecyficznych przeciwciał, wprowadzone ostatnio przez badaczy radzieckich (2, 8, 16) pozwolą być może na ustalenie dokładnej budowy antygenowej poszczególnych narządów zwierząt doświadczalnych. W przypadkach gdy błona komórkowa traciła swą integralność na skutek utrwalania i suszenia rozmazu, znakowane FIT-em globuliny anty RPE powodowały fluorescencję błony komórkowej, jak również całej cytoplazmy. W mokrych preparatach wykonanych z komórek RPE inkubowanych w znakowanym FIT-em antyserum fluorescencja była widoczna jedynie na powierzchni błony komórkowej. To doświadczenie, zbliżone najbardziej do warunków „*in vivo*” wskazuje, że w ustroju żywym prawdopodobnie z komórką łączą się te przeciwciała, które są skierowane przeciwko antygenom obecnym w błonie komórkowej. Brak fluorescencji cytoplazmy przy inkubowaniu komórek w antyserum znakowanym FIT-em, jak również w komórkach poddanych cytotoksycznemu działaniu przeciwciał z następującą inkubacją w króliczych globulinach antyludzkiej  $\gamma$ -globulinie 7S wskazuje na to, że cząsteczki przeciwciał nie wnikają do wnętrza cytoplazmy. Easton, Green i Goldberg (7), badając to zagadnienie w mikroskopie elektronowym, przy użyciu przeciwciał znakowanych ferrytyną, wykazali jednak ich obecność w obrębie cytoplazmy. Występowanie fluorescencji zarówno na powierzchni komórek RPE (błona komórkowa), jak i w obrębie cytoplazmy po ich utrwaleniu, czy też wysuszeniu, można interpretować jako dowód wspólnej budowy antygenowej błony komórkowej i siateczki endoplazmatycznej, co byłoby zgodne z koncepcjami Greena (10, 11) oraz z hipotezą Burcha (5), jakkolwiek jest mało prawdopodobne, aby wykazany swoisty antygen odpowiadał hipotetycznemu autoantygenowi wg założenia Greena i Burcha. Hiramoto i wsp. (14) wykazali, że znakowane fluorescencją przeciwciała przeciwko wysiękowej postaci mięsaka limfatycznego Murphego „barwią” jego komórki, a znakowane przeciwciała przeciwko włóknikowi szczurczemu cają zabarwienie komórek jedynie sporadycznie. Zastosowane przez nas przemycanie komórek używanych do immunizacji królików, jak również barwienie fluoryzującymi przeciwciałami komórek przemitych, pozwala wnioskować, że uzyskane reakcje immunohistochemiczne są uzależnione jedynie od antygenów obecnych w komórkach RPE. Również Fitch (9) uważa, że umiejscowienie anty RPE globulin na powierzchni komórek nie jest wynikiem obecności przeciwciał przeciwko włóknikowi.

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Heterologiczna surowica królicza przeciwko komórkom RPE zawiera przeciwciała skierowane przeciwko tym komórkom oraz przeciwciała reagujące z kłębkami nerkowymi, śródbłonkami zatok wątroby i ścianami naczyń. Można sądzić, że komórki RPE zawierają obok swoistych antygenów również antygeny wspólne z tkankami prawidłowymi.

2. W powstawaniu zmian cytotoksycznych główną rolę odgrywają przeciwciała skierowane przeciwko antygenom błony komórkowej.

3. Fluorescencja cytoplazmy po uszkodzeniu integralności błony komórkowej przemawia za tym, że błona i zrąb cytoplazmy posiadają pewne wspólne cechy w budowie antygenowej.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Abelew G. I.: Dokł. Akad. Nauk. ZSRR. **124**, 1328—1330, 1950.
2. Abelew G. I. i wsp.: *Neoplasma*. **9**, 125—129, 1962.
3. Awdiejew G. J., Baszkajew J. C.: *Biul. Exp., Biol. Med.* **28**, 77—79, 1963.
4. Baszkajew J. C.: *Woprosy Onkologii*. **7**, 65—67, 1961.
5. Burch P. R. J.: *Nature*. **197**, 1145—1151, 1963.
6. Easty G. C., Ambrose Z. J.: *Brit. J. Cancer*. **11**, 287, 1957.
7. Easton J. M., Goldberg B., Green H.: *J. Exper. Med.*, **115**, 275—288, 1962.
8. Engelhardt N. V. i wsp.: *Neoplasma*. **10**, 133—141, 1963.
9. Fitch F. W.: *Archiv. of Pathology*, **73**, 66—82, 1962.
10. Green H. N.: *Immunological Aspect of Cancer*, Butterworths, London 1957.
11. Green H. N.: *Ciba Foundation Symposium on Carcinogenesis Mechanism of Action*, 1959, 131—160.
12. Hauschka T. S.: *Cancer Research*. **12**, 615—633, 1952.
13. Hirszfeld L. i wsp.: *Nowotwory*. **11**, 4—34, 1936.
14. Hiromoto R. i wsp.: *Cancer Research*. **19**, 874—877, 1959.
15. Julius H. W., De Vries P. J.: *Nature*. **182**, 1165—1166, 1958.
16. Khramkow N. J. i wsp.: *Neoplasma*. **10**, 127—131, 1963.
17. Mellors R. C.: *Analytical Cytology*. Mc Graw-Hill Book Company, N. Y. 1959.
18. Milgrom F.: *Cancer Research*. **21**, 862—868, 1961.
19. Nairn R. C.: *Fluorescent Protein Tracing*. Livingstone LTD, Ed'nburgh 1962.
20. Ryżewska A. i wsp.: *Nowotwory*. **10**, 81—89, 1960.
21. Ryżewska A.: *Nowotwory*. **10**, 229—234, 1960.
22. Ryżewska A.: *Nowotwory*. **12**, 251—253, 1962.
23. Ryżewska A.: *Nowotwory*. **12**, 85—94, 1962.
24. Zilber L. A.: *Neoplasma*. **6**, 337—352, 1959.
25. Zilber L. A.: *Woprosy Onkologii*. **5**, 265—270, 1959.
26. Zilber L. A.: *Woprosy Onkologii*. **8**, 63—74, 1962.



## OBJAŚNIENIA DO RYCIN

Ryc. 1. Rozmaz z nie przemytych komórek RPE, suszony nad  $P_2O_5$ , „barwiony” surowicą nieabsorbowaną. Widoczna intensywne fluorescencja całych komórek, oraz dość znaczna fluorescencja podłoża preparatów. Komórki RPE „zabarwione” surowicą anty RPE znakowaną FIT-em. Mikroskop luminescencyjny. Pow. ca 780 X.

Ryc. 2. Rozmaz z przemytych komórek RPE, suszony nad  $P_2O_5$ , „barwiony” surowicą absorbowaną proszkiem acetonowym z wątroby szczura. Widoczna wyraźna fluorescencja całej protoplazmy z nasileniem intensywności na obwodzie komórek. Brak fluorescencji podłoża i jąder komórkowych. Komórki RPE „zabarwione” surowicą anty RPE znakowaną FIT-em. Mikroskop luminescencyjny. Pow. ca 780 X.

Ryc. 3. Rozmaz wykonany w wyżej podany sposób „zabarwiono” surowicą absorbowaną, świeżą heparynizowaną krwią mysia. Otrzymane rezultaty są identyczne z widocznymi na rycinie 2. Komórki RPE „zabarwione” surowicą anty RPE znakowaną FIT-em. Mikroskop luminescencyjny. Pow. ca. 780 X.

Ryc. 4. Rozmaz z przemytych komórek RPE utrwalonych w 96% etanolu. Obrazy podobne do widocznych na rycinie 2 i 3 z wyjątkiem zmniejszenia intensywności fluorescencji. Komórki RPE „zabarwione” surowicą anty RPE znakowaną FIT-em. Mikroskop luminescencyjny. Pow. ca. 780 X.

Ryc. 5. Komórki RPE inkubowane w surowicy anty RPE znakowanej FIT-em. Fluorescencja jest ograniczona wyłącznie do powierzchni komórek. Komórki RPE „zabarwione” surowicą anty RPE znakowaną FIT-em. Mikroskop luminescencyjny. Pow. ca. 780 X.

Ryc. 6. Komórki RPE poddane uprzednio działaniu przeciwciał i komplementu, a następnie inkubowane w króliczej gamma globulinie anty ludzkiej globulinie 7S. Widoczna aglutynacja komórek i wyraźne zmiany cytotoksyczne. Brak materiału fluoryzującego we wnętrzu komórek. Pow. ca. 500 X.

Ryc. 7. Nerka, widoczna rozlana fluorescencja kłębków nerkowych oraz przestrzeni śródmiąższowych. Pow. ca 192 X.

## РЕЗЮМЕ

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Гетерологическая сыворотка кролика против клеток АОЭ содержит антитела, направленные против этих клеток, так как антитела взаимодействуют с почечными клубочками, эндотелиальными пазухами печени и стенками сосудов, а это позволяет предположить, что клетки АОЭ содержат, кроме свойственных антигенов, также совместные с тканями антигены.

2. В образовании изменений цитотоксичных главную роль играли антитела, направленные против антигенов клеточной оболочки.

3. Флуоресценция протоплазмы после нарушения интегральности клеточной оболочки говорит о том, что оболочки и основа протоплазмы имеют совместную антигеновую структуру.

Рис. 1. Размаз с промытых клеток АОЭ, высушенный над  $P_2O_5$ , окрашен неабсорбированной сывороткой. Видна интенсивная флюоресценция целых клеток, а также относительно большая флюоресценция субстрата препарата. Клетки АОЭ окрашены сывороткой анти-АОЭ обозначенной FIT-ом. Люминесцентный микроскоп. Увелич. 780 X.

Рис. 2. Размаз с промытых клеток АОЭ, высушенный над  $P_2O_5$ , окрашен сывороткой абсорбированной ацетоновым порошком из печени крыс. Выразительно видна флюоресценция всей протоплазмы с увеличением интенсивности вокруг оболочки клеток. Отсутствие флюоресценции основы и ядер клеток. Клетки АОЭ окрашены сывороткой анти-АОЭ, обозначенной FIT-ом. Люминесцентный микроскоп. Увелич. 780 X.

Рис. 3. Размаз, приготовленный как выше, окрашен сывороткой абсорбированной свежей гепаринизованной кровью мыши. Полученный результат такой же, как на рис. 2. Клетки АОЭ окрашены сывороткой анти-АОЭ, обозначенной FIT-ом. Люминесцентный микроскоп. Увелич. 780 X.

Рис. 4. Размазы с промытых клеток АОЭ, зафиксированных в 96 % этиловом спирте. Картины похожие на изображение на рис. 2 и 3, за исключением уменьшения интенсивности флюоресценции. Клетки АОЭ окрашены сывороткой анти-АОЭ, обозначенной FIT-ом. Люминесцентный микроскоп. Увелич. 780 X.

Рис. 5. Клетки АОЭ инкубированные в сыворотке анти-АОЭ, обозначенной FIT-ом. Флюоресценция ограничена только до поверхности клеток. Клетки АОЭ окрашены сывороткой анти-АОЭ, обозначенной FIT-ом. Люминесцентный микроскоп. Увелич. 780 X.

Рис. 6. Клетки АОЭ подвергнутые прежде действию противтел и комплекта, потом инкубированные в кроличьей гамма-глобулине античеловечьей глобулине 7S. Видна аглютинация клеток с выразительными цитотоксическими изменениями. Отсутствие флюоресцентного материала внутри клеток. Увелич. 500 X.

Рис. 7. Почка, видна разлитая флюоресценция почечных клубочков, а также интерстициальных пространств. Увелич. 192 X.

---

## SUMMARY

On the basis of these investigations the following conclusions may be drawn. 1. A heterological serum from rabbits against the cells of EAT contains, besides antibodies directed against these cells, antibodies reacting with normal glomerules, the mesothelia of the liver sinuses and the walls of blood vessels. This fact permits to conclude that EAT cells contain the antigens of normal tissues besides their specific antigens. 2. When cytotoxic changes occur the chief part is played by the antibodies directed against the antigens of the cell membrane. 3. After the integrity of the cell membrane has been damaged, the fluorescence of the cytoplasm indicates that the cell membrane and the cytoplasmic stroma have some common features with the antigen structure.

## EXPLANATIONS OF FIGURES

Fig. 1. Smear of nonwashed EAT cells, dried upon  $P_2O_5$ , „stained” with nonabsorbed serum. The intense fluorescence of whole cells and visible fluorescence of the medium of the preparations. EAT cells „stained” with serum anti EAT labelled with FIT. Luminescence microscope. Magn. 780  $\times$ .

Fig. 2. Smear from washed EAT cells dried upon  $P_2O_5$ , „stained” with serum absorbed with acetone powder from the liver of the rat. The intense fluorescence of the whole protoplasm with distinct intensity on the periphery of the cell. Absence of fluorescence in the medium and in the cell nuclei. EAT cells „stained” with serum anti EAT labelled with FIT. Luminescence microscope. Magn. 780  $\times$ .

Fig. 3. Smear obtained in the same way, „stained” with serum absorbed with fresh heparinized blood of the mouse. The results obtained are identical with those shown in Fig. 2. EAT cells „stained” with serum anti EAT labelled with FIT. Luminescence microscope. Magn. 780  $\times$ .

Fig. 4. Smear from washed cells fixed in 96 % ethanol. The pictures are similar to those shown in Figs. 2 and 3 except for a decreased fluorescence. EAT cells „stained” with serum anti EAT labelled with FIT. Luminescence microscope. Magn. 780  $\times$ .

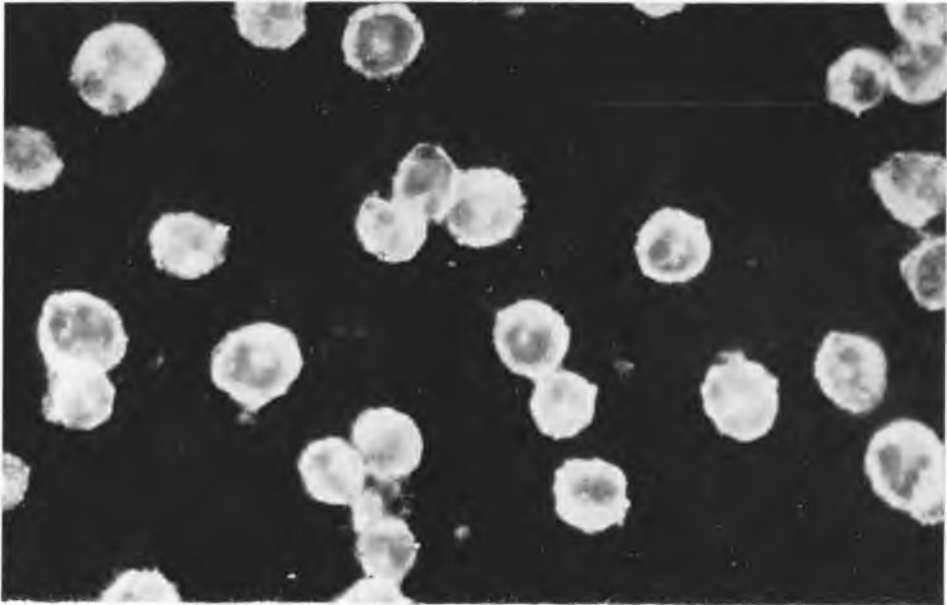
Fig. 5. EAT cells incubated in anti EAT serum labelled with FIT. Fluorescence is limited exclusively to the surface of the cells. EAT cells „stained” with serum anti EAT labelled with FIT. Magn. 780  $\times$ .

Fig. 6. EAT cells treated previously with antibodies and the complement, and next incubated in the rabbit  $\gamma$ -globulin anti-human globulin 7S. The agglutination of the cells and distinct cytotoxic changes are visible. Absence of fluorescence inside the cells. Magn. 500  $\times$ .

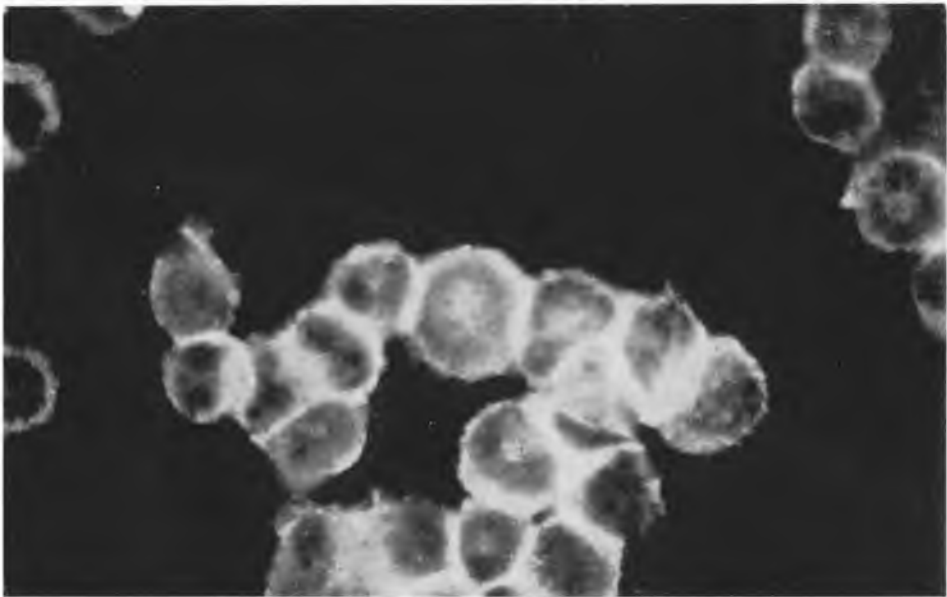
Fig. 7. Kidney. Diffuse fluorescence of the kidney glomerules and of the interstitial spaces is visible.

Pracę otrzymano 5 V 1964.

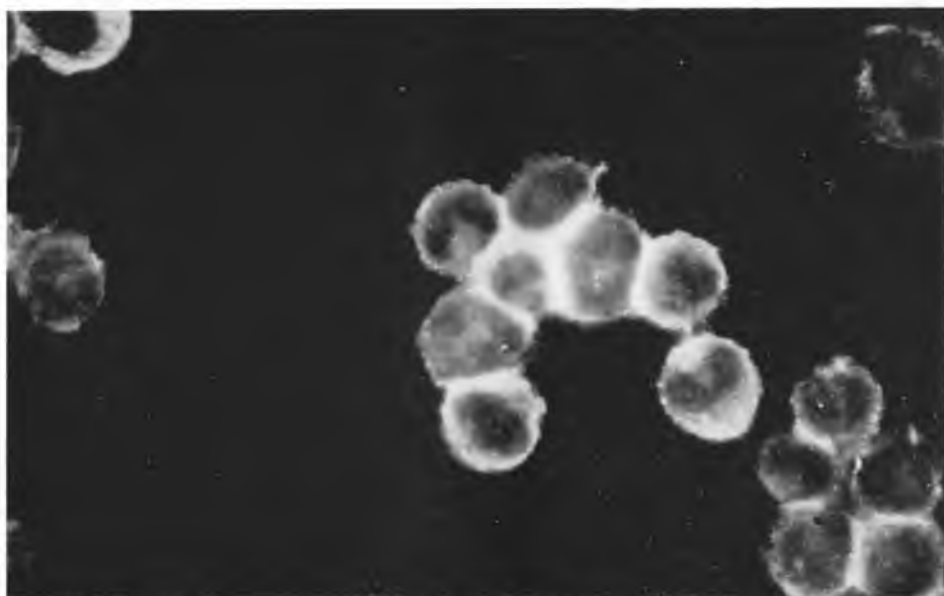




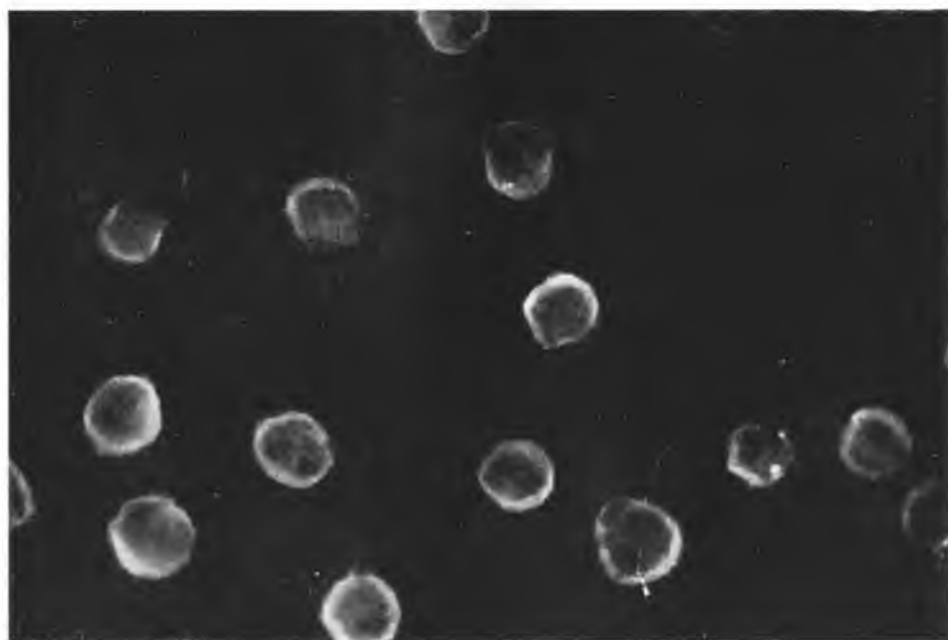
Ryc. 1



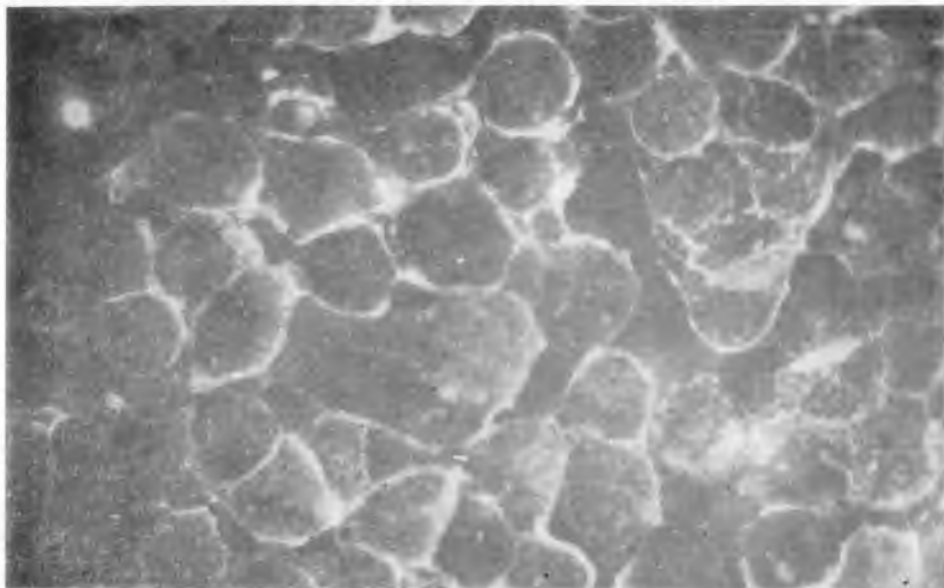
Ryc. 2



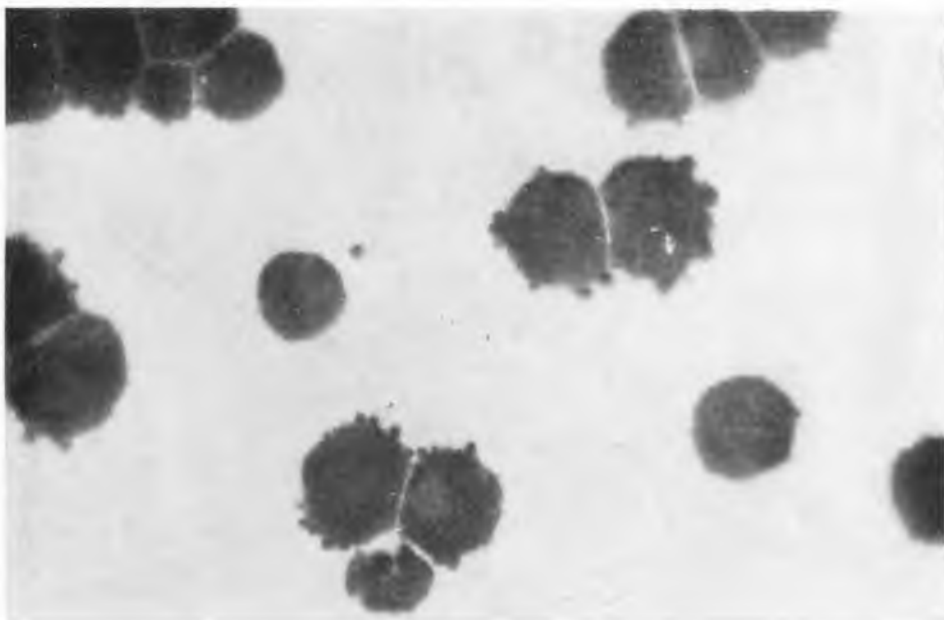
Ryc. 3



Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6



Ryc. 7