

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE - SKŁODOWSKA  
LUBLIN—POLONIA

VOL. XIX, 55

SECTIO D

1964

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

Daniel CHIBOWSKI

**Zmiany morfologiczne komórek raka puchlinowego Ehrlicha  
w przebiegu immunologicznej lizy**

**Морфологические изменения клеток АОЭ  
в процессе иммунологического лизиса**

**Morphological Changes of the Cells of Ehrlich's Experimental  
Ascites Carcinoma in the Course of Immunological Lysis**

Od początku badań immunologicznych liczni badacze pracowali nad zagadnieniem możliwości leczenia nowotworów złośliwych przy pomocy serologicznie specyficznych surowic. Zagadnienie to podjęto w ostatnich latach na nowo w związku z pomyślnymi wynikami doświadczeń nad autoalergicznym uszkodzeniem tarczycy i mózgu. Powstało pytanie, czy nie można by osiągnąć zniszczenia tkanki nowotworowej na drodze immunologicznej, jeżeli tą metodą można uszkodzić narządy prawidłowe. Istnieją dwie możliwości zbliżenia się do specyficznej seroterapii nowotworów. Pierwszą z nich jest aktywna immunizacja nosiciela własnym guzem lub specyficznym dla niego materiałem antygenowym. Drugą zaś — bierne przeszczepianie nowotworów o specyficznej surowicy, wyprodukowanej na innym osobniku tego samego lub innego gatunku. Obie te możliwości oparte są na wspólnym założeniu, że tkanka nowotworowa posiada pewne odmienne antygeny od antygenów obecnych w tkankach prawidłowych. Antygeny swoiste dla tkanki nowotworowej powinny być zdolne do wyprodukowania specyficznych przeciwciał, wykazujących niszczące działanie w stosunku do komórek nowotworowych.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

1. Badania przeprowadzono na wysiękowym raku Ehrlicha<sup>1</sup> przeszczepianym na samcach i samicach myszy szczepu A. Strong<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> W pracy tej używam skrótów: RPE — rak puchlinowy Ehrlicha. RNA — kwas rybonukleinowy. DNA — kwas dezoksyrybonukleinowy.

<sup>2</sup> RPE i myszy szczepu A. Strong otrzymaliśmy od dr H. N. Grenn'a. Department of Experimental Pathology and Cancer Research, School of Medicine, Leeds 2, Anglia.

2. Produkcja specyficznych przeciwciał. Króliki wagi około 3 kg, żywione dietą zwykłą immunizowano w następujący sposób: po 1 ml 5% zawiesiny trzykrotnie przemytych w 0,5 M NaCl komórek RPE wstrzyknięto dożylnie, podskórnice, śródskórnice, domięśniowo i dootrzewnowo wg metody podanej przez Flaxa (6).

3. Surowice królików, które najlepiej zareagowały na immunizację zmieszano razem i określono miano aglutynacji w stosunku do komórek RPE i erytrocytów mysich wg metody podanej przez Fitcha (5).

4. Doświadczenie na zwierzętach: A — grupom 8 myszek z wszczepionym rakiem puchlinowym Ehrlicha (0,2 ml) podawano dootrzewnowo 3 mg<sup>3</sup> immunizowanych  $\gamma$ -globulin w 1 mililitrze dopełniacza<sup>4</sup> w 4, 5 i 6 dniu wzrostu guza. Innym grupom myszek podawano w ten sam sposób  $\gamma$ -globuliny bez dopełniacza, sam dopełniacz oraz 0,15 M roztwór NaCl. 5, 6 i 7 dnia po przeszczepieniu pobierano płyn z jamy brzusznej i wykonywano rozmazy. Rozmazy utrwalano w płynie Carnoya do barwienia wg metody Bracheta w modyfikacji Godlewskiego i Vorbrodta (12).

Rozmazy do barwienia oranżem akrydyny wg Bertalanffego (1, 2) utrwalono w mieszaninie alkoholu i eteru  $\text{C}_2\text{H}_5$ . Preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym wyposażonym w 10 amp. lampę łukową Zeissa stosując jako filtr wzbudzający — filtr Schotta BG<sub>12</sub>, a jako filtr zamykający filtr „Euphos” OG<sub>1</sub>. Zmiany wielkości komórek oceniano przy pomocy obiektywu okularowego f-my Zeiss.

5. Badania *in vitro*. Preparaty sporządzano w następujący sposób: 2 części surowicy anty RPE mieszano z 2 częściami 5% zawiesiny komórek RPE w 0,15 M NaCl i 2 częściami dopełniacza. Tak przygotowaną zawiesinę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C, pobierając po 5, 10, 30, 60, 90 i 120 minutach kilka kropeł zawiesiny. Pobrany płyn przykrywano szkiełkiem nakrywkowym, którego brzegi pokrywano zbufoowaną gliceryną o pH 7,2. Preparaty oglądano w urządzeniu kontrastującym fazy f-my Zeiss. W celu analizy rozmieszczenia kwasów nukleinowych zawiesinę komórek przygotowanych w podany sposób mieszano na szkiełku podstawowym z kroplą oranżu akrydyny w rozcieńczeniu 1:1000 w buforze fosforanowym o pH 7,6. Preparaty zamykano w podany sposób i oglądano w mikroskopie luminescencyjnym. W celu sprawdzenia swoistości zabarwienia RNA i DNA zastosowano trawienie enzymatyczne RNA-za i DNA-za<sup>5</sup>.

## WYNIKI BADAŃ

A. Test aglutynacji komórek wykazał następujące miana: dla komórek RPE 1:3072, dla erytrocytów mysich 1:256.

B. Badania nad wpływem przeciwciał na wzrost guza i długość przeżycia mysz.

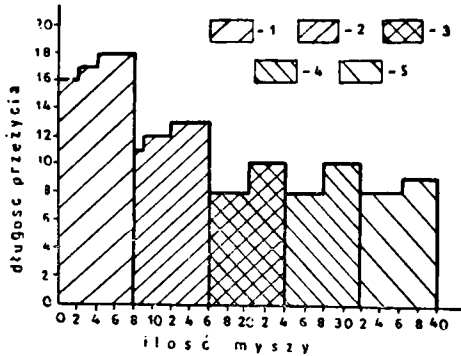
Myszy, którym podawano  $\gamma$ -globuliny z komplemencem żyły w przybliżeniu 2-krotnie dłużej od myszy traktowanych 0,15 M NaCl dopełniaczem i myszy kontrolnych. Myszy, którym podawano  $\gamma$ -globuliny

<sup>3</sup> Ilość gamma globulin w surowicy określano przy pomocy elektroforezy bibułowej.

<sup>4</sup> Stosowano zliofilizowany dopełniacz Lub. Wytw. Surowic i Szczepionek.

<sup>5</sup> RNA-aza krystaliczna f-my B.D.H., Anglia, DNA-aza krystaliczna f-my Fluka A. G., Szwajcaria.

bez dopełniacza żyły przeciętnie 3 dni dłużej od myszy kontrolnych, a 5 dni krócej od myszy traktowanych antiserum i dopełniaczem. Uzyskane wyniki graficznie przedstawiono na ryc. 1. Myszy traktowane antiserum i komplementem wykazywały znacznie mniejszy przyrost wagi w porównaniu z grupami myszy kontrolnych. Myszy, którym podawano same  $\gamma$ -globuliny bez dopełniacza nie wykazywały zmniejszenia przyrostu wagi. Wyniki tego doświadczenia podane są na ryc. 2.



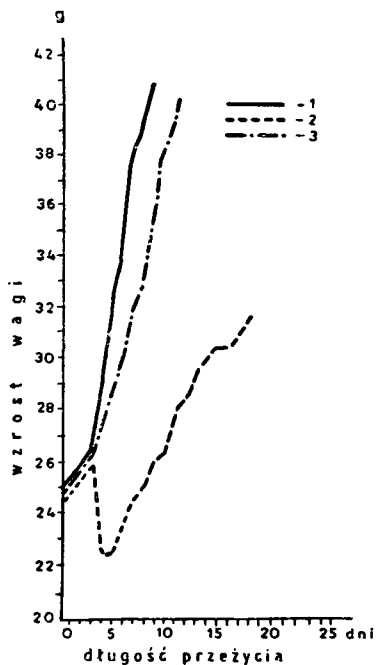
Ryc. 1

1 —  $\gamma$ -glob. + komplement, 2 —  $\gamma$ -glob. + NaCl,  
3 — komplement + NaCl, 4 — NaCl, 5 — kontrola

### C. Badania cytologiczne nad wpływem antiserum i komplementu *in vitro*.

Po zastosowaniu 3 mg  $\gamma$ -globulin w 1 ml. komplementu w 3, 4, 5 dniu wzrostu guza barwieniem wg metody Bracheta oraz błękitem toluidyny wykazano, że około 70% komórek charakteryzuje się znacznym obrzękiem cytoplazmy, połączonym z wyraźną utratą RNA, który gromadzi się na obwodzie komórki oraz w „pęcherzykach” przytwierdzonych do powierzchni błony komórkowej (ryc. 4). Ten typowy obraz komórek, obserwowany po upływie 72 godz. od podania immunizowanej  $\gamma$ -globuliny rozwija się stopniowo, począwszy od nieznacznego obrzęku cytoplazmy, a skończywszy na obumieraniu komórek. Na ryc. 3 widoczne są komórki nowotworowe od myszy traktowanych 0,15 M roztworem NaCl, żadne zmiany patologiczne nie są tu widoczne. Podobne obrazy obserwowano przy stosowaniu samego dopełniacza oraz  $\gamma$ -globulin od kontrolnych królików. Po stosowaniu immunizowanych  $\gamma$ -globulin bez dopełniacza zmiany cytotoksyczne polegały jedynie na nieznacznym obrzęku cytoplazmy i tworzeniu się pojedynczych cytoplazmatycznych wypustek. Wykonane pomiary wielkości komórek przy pomocy mikrometru okularowego wykazały, że po traktowaniu komórek RPE immunizowanymi

$\gamma$ -globulinami i komplementem wymiary ich znacznie się zwiększyły. Obliczeniem stosunku procentowego poszczególnych komórek wykazano, że po traktowaniu immunizowanymi  $\gamma$ -globulinami i komplementem ilość uszkodzonych komórek znacznie wzrastała, przy miernym wzroście komórek mezotelialnych, limfocytów i granulocytów. Indeks mitotyczny był w przybliżeniu taki sam po stosowaniu  $\gamma$ -globulin, jak przed ich podaniem. Dane te są podsumowane w tab. 1.



Ryc. 2

1 — kontrola + NaCl, 2 —  $\gamma$ -glob. + komplement  
3 —  $\gamma$ -glob. + NaCl

Aby sprawdzić wpływ ilości antyserum i komplementu (podanych jednorazowo) na zmiany morfologiczne w komórkach RPE podano grupie 5 myszek jednorazowo 9 mg  $\gamma$ -globulin w 3 ml dopełniacza. Przed podaniem antyserum pobrano płyn z jamy brzusznej i ilość komórek liczono w komorze Thoma-Zeissa wg metody (21). Czynność tę wykonywano codziennie aż do zgonu mysz. Jednocześnie wykonywano rozmazy barwiąc je zielenią metylową i pyroniną oraz błękitem toluidyny. W pierwszym dniu po podaniu  $\gamma$ -globulin i komplementu ilość komórek spadła z 217 400 do 1 400. Makroskopowo w płynie obserwowano duże skupiska zglutynowanych komórek, które zabarwione błękitem tolui-

dyny jak również wg metody Bracheta i Feulgena wykazywały prawie całkowitą utratę barwności zarówno RNA jak i DNA (ryc. 5). Wśród tych komórek widoczne były pojedyncze leukocyty. Nieliczne komórki, leżące poza grupami zaglutynowanych komórek wykazywały zmiany cytolityczne. Niektóre z nich jednak nie odbiegały swym wyglądem od komórek prawidłowych (ryc. 6). Dalsze obserwacje wykazały stopniowy wzrost ilości komórek, który tuż przed zgonem zwierząt doszedł do 150 000 w 1 mm<sup>3</sup>. Czas przeżycia tych zwierząt był również dwukrotnie dłuższy od czasu przeżycia zwierząt kontrolnych. Zmiany cytolityczne w komórkach nie ulegających aglutynacji nie odbiegały swym wyglądem od obrazu komórek obserwowanego po 3-krotnym stosowaniu małych dawek antiserum i komplementu.

Tab. 1. Wpływ podania  $\gamma$ -globulin i komplementu na zmianę składu komórek w płynie wysiękowym

Typ komórek	Po traktowaniu $\gamma$ globulinami i komplementem	
	$\gamma$ glob. od królików immunizowanych	$\gamma$ globuliny od królików kontrolnych
komórki nieuszkodzone	procent *) 10,0	procent *) 81,0
komórki uszkodzone	68,0	3,0
komórki w okresie podziału	1,1	1,2
komórki mesotel'alne	10,6	5,2
granulocyty	6,8	3,4
limfocyty	3,4	1,2
przeciętna średnia komórek **	17,2 $\mu$ (wym. 12,6—20,8)	10,9 $\mu$ (wym. 8,9—13,6)

\* Liczono 1000 komórek w każdej z grup.

\*\* Mierzono 200 komórek w każdej z grup.

Badania *in vitro*. Komórki traktowane antiserum w sposób podany w metodyce obserwowano w mikroskopie kontrastującym fazy oraz w mikroskopie fluorescencyjnym. Przy stosowaniu rozcieńczonej 12% surowicy obserwowano po 5 min. inkubacji tworzenie się pojedynczych „pęcherzyków” na powierzchni komórek, które stopniowo łącząc się ze sobą doprowadzały po 30 minutach do znacznego obrzęku cytoplazmy. Obrzysy komórek w tych przypadkach były nierównomierne.

Przy stosowaniu surowicy stężonej (25%) obrzęk komórek po 5 min. był równomierny, w miarę upływu czasu stopniowo się powiększający. Naj-

większe rozmiary komórki osiągały po 30 min. inkubacji. W pierwszej minucie inkubacji jądro było niewidoczne. Uwidaczniało się w miarę obrzęku cytoplazmy. Wokół zazwyczaj przesuniętego na obwód jądra widoczny był pas zagęszczonej cytoplazmy o dość regularnych obrysach. Na obwodzie komórek wyraźnie była widoczna przejaśniona cytoplazma, otoczona rozciągniętą błoną komórkową. Uszkodzenia ciągłości błony komórkowej nie dostrzegano. Dodanie heparyny, która blokuje system komplementarny w znacznym stopniu hamowało działanie cytotoksyczne przeciwciał. Dodanie w nadmiarze dopełniacza powoduje przywrócenie efektu cytotoksycznego. Również dodanie do płynu inkubacyjnego wersenianu sodu w stężeniu 0,01 M w znacznym stopniu hamuje (prawie całkowicie) działanie cytotoksyczne przeciwciał. Dodanie jonów  $Mg^{++}$   $Ca^{++}$  w stężeniu 0,02 M powoduje ponownie powstawanie zmian cytotoksycznych.

W celu sprawdzenia żywotności komórek RPE poddanych działaniu antiserum i komplementu zastosowano przyżyciowe barwienie 0,01% błękitem trypanu wg (13). Wszystkie komórki traktowane antiserum i komplementem już po 10 minutach wykazywały intensywne zabarwienie jądra na kolor niebieski (ryc. 7) w przeciwieństwie do komórek kontrolnych, które po 2 godz. inkubacji nie wykazywały barwliwości jąder, ani zmian cytotoksycznych (ryc. 8). Świadczy to o znacznym uszkodzeniu żywotności komórek, ponieważ od dawna przyjmuje się za pewnik, że żywe jądro nie barwi się (13, 19).

Celem zbadania wpływu antiserum i komplementu na rozmieszczenie RNA i DNA w komórkach *in vitro* zastosowano metodę barwienia oranżem akrydyny wg Bertalanffego (1, 2). Przy pomocy tego barwienia wykazano, że po 4-minutowej inkubacji komórek w antiserum i komplemente w pobliżu błony komórkowej i w obrębie ziarnistości cytoplazmatycznych zgrupowanych wokół jądra gromadzi się RNA (ryc. 9). Przestrzeń komórkowa pomiędzy tymi dwoma ugrupowaniami jest prawie całkowicie pozbawiona RNA. Po upływie 20 minut zawartość RNA w komórce ulega wyrównaniu z wyjątkiem pasa ziarnistości cytoplazmatycznych wokół jądra. Po 30 minutach inkubacji widoczna jest dalsza utrata kwasu rybonukleinowego, pojedyncze komórki prawie go nie zawierają (ryc. 10) i zaczynają ulegać rozpadowi. Po godzinnej inkubacji protoplazma jest całkowicie pozbawiona RNA, a jądra zaczynają ulegać obrzękowi, tracąc jednocześnie DNA. W podłożu preparatu widoczna jest duża ilość czerwonych ziarnistości (prawdopodobnie agregaty RNA).

## OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Badaniami *in vitro* ustalono, że obrzęk cytoplazmy komórek RPE pojawia się jedynie w obecności komplementu i surowicy skierowanej przeciwko tym komórkom. Wyblokowanie działania komplementu przez inkubowanie go w łaźni wodnej w temperaturze 56°C przez 30 minut (inaktywacja frakcji C<sub>1</sub>) jak również dodanie wersenianu sodu w celu usunięcia jonów Mg<sup>++</sup> Ca<sup>++</sup>, które są niezbędne do prawidłowego działania komplementu, czy też heparyny, w znacznym stopniu hamowało powstanie obrzęku cytoplazmy komórek RPE, a nawet zapobiegało mu całkowicie. Badania nad rozmieszczeniem kwasu rybonukleinowego wykonane metodą fluorescencyjną wykazały, że po 4 minutach inkubacji komórek RPE w antiserum i komplemente RNA jest obecny jedynie w pobliżu błony komórkowej i w obrębie ziarnistości cytoplazmatycznych, zgrupowanych wokół jądra komórkowego. Po 30 min. inkubacji widoczna była dalsza utrata RNA, którego stężenie w obrębie cytoplazmy ulega wyrównaniu, a w pojedynczych komórkach brak go prawie całkowicie. Po godzinnej inkubacji protoplazma jest prawie całkowicie pozbawiona RNA we wszystkich komórkach, a jądra ulegają wyraźnemu obrzękowi i zaczynają tracić DNA. W podłożu preparatu widoczna jest duża ilość czerwono barwiących się kul (najprawdopodobniej agregaty RNA). Zastosowane barwienie komórek RPE błękitem trypanu, wykazało znaczne obniżenie ich aktywności życiowych, już po 10-minutowej inkubacji w antiserum i komplemente. Badania *in vitro* nad wpływem swoistych przeciwciał i komplementu wykazały, że myszy traktowane  $\gamma$ -globulinami anty-RPE i komplementem, żyły w przybliżeniu dwukrotnie dłużej od myszy kontrolnych, przybierając jednocześnie znacznie mniej na wadze. Zmiany te najprawdopodobniej były spowodowane przez obumieranie komórek z powodu immunologicznej lizy, która obserwowana była w 68% komórek. Komórki ulegające lizie były wyraźnie powiększone, RNA ulegał przesunięciu na obwód komórki, do powierzchni błony komórkowej przytwierdzone były „frędzelki” dające wyraźne odczyny histochemiczne na RNA. Zmiany cytotoksyczne przebiegały stopniowo, od początkowego miernego obrzęku aż do rozpadu komórki. Wśród obumierających komórek RPE widoczna była duża ilość granulocytów, limfocytów i komórek mezotelialnych. Obecność tych komórek należy traktować jako odczyn na obumarłe komórki RPE. Powyższe zmiany występowały przy podawaniu surowicy zawierającej około 3 mg  $\gamma$ -globulin w 1 ml komplementu i stosowaniu ich przez okres trzech dni. Przy jednorazowym podaniu około 9 ml  $\gamma$ -globuliny w 3 ml dopełniacza w obrazie mikroskopowym dominowały zaglutynowane komórki RPE ulegające obu-

mieraniu (prawie całkowita utrata barwliwości zarówno cytoplazmy, jak i jąder przy zastosowaniu metod histochemicznych na RNA i DNA). W grupie kontrolnej myszy, którym podawano  $\gamma$ -globuliny w soli fizjologicznej występowały jedynie znikome zmiany cytotoksyczne. Podanie samego dopełniacza i roztworu fizjologicznego NaCl nie powodowało żadnych zmian morfologicznych, ani nie wykazywało wpływu na wzrost guza, jak też i na długość przeżycia zwierząt.

Procentowe obliczenie stosunku poszczególnych komórek w płynie wysiękowym po stosowaniu  $\gamma$ -globulin i komplementu wykazało znaczny wzrost zwyrodniałych komórek nowotworowych oraz mierny wzrost komórek takich jak mezotelialne, granulocyty i limfocyty, przy nieznacznie obniżonym indeksie mitotycznym. Dane te mogą wskazywać, że działanie cytotoksyczne przeciwciał i komplementu na zahamowanie wzrostu guza nie jest uzależnione od zahamowania podziału komórek. Obecność pojedynczych, nie uszkodzonych komórek przemawiać może za pewną immunoselekcją komórek RPE (Hauschka cyt. wg 5), która jest przyczyną braku efektu terapeutycznego po stosowaniu  $\gamma$ -globulin i komplementu.

Uzyskane dane, jak również dane innych autorów (5, 6, 16, 22, 23) wskazują wyraźnie, że działanie heterologicznych  $\gamma$ -globulin, skierowanych przeciwko komórkom RPE jest ściśle uzależnione od obecności dopełniacza. Prace doświadczalne przeprowadzone przez Green'a, Goldberga i wsp. (7, 8, 9) nad działaniem przeciwciał i komplementu na komórki raka wysiękowego Krebsa wykazały, że działanie przeciwciał i komplementu polega na uszkodzeniu przepuszczalności błony komórkowej w sposób, który umożliwia doprowadzenie do szybkiej równowagi kationów pomiędzy wnętrzem komórki a otaczającym ją środowiskiem. Komórki tracą jon  $K^+$ , na którego miejsce wchodzi jon  $Na^+$ , w rezultacie czego objętość komórek odpowiada biernej różnicy ciśnienia osmotycznego, istniejącego między wnętrzem komórki a płynem inkubacyjnym. Utrata przez komórki kontroli wewnątrzkomórkowego stężenia kationów jest niejasna. Być może chodzi tu o uszkodzenie struktury błony komórkowej z tworzeniem się w niej funkcjonalnych „dziur” lub też dochodzi do unieczynnienia mechanizmów energetyczno-enzymatycznych, odpowiedzialnych za prawidłową kontrolę stężenia jonów w obrębie komórki. Badania w mikroskopie elektronowym przeprowadzone przez Greena i Goldberga (10, 11), Estona, Goldberga i Greena (4) oraz Löblich'a i Landschütza (17) wykazały, że same przeciwciała bez dopełniacza powodują tylko aglutynację mikrokosmków, a znakowane ferrytyną przeciwciała są obecne jedynie na powierzchni błony komórkowej. Dodanie kom-



plementu zapoczątkowuje zmiany cytolityczne, które, uszkadzając błonę komórkową, umożliwiają przeciwciałom dostanie się do wnętrza komórki.

Goldberg i Green (10) przy pomocy ultrawierowania i badań w mikroskopie elektronowym wykazali, że RNA uciekający z komórek pod wpływem działania przeciwciał i komplementu posiada wymiary 150 Å. Podobne do wyżej opisanych zmiany cytologiczne w komórkach wysiękowych raków mysich można otrzymać również po podaniu fizjologicznych surowic ludzi i różnych zwierząt. Świadczy to o obecności w tych surowicach nie poznanych bliżej, naturalnych przeciwciał (14). Badania nad zwiększeniem objętości i utratą suchej masy przez komórki RPE, poddane działaniu antyserum i komplementu, wykonane przez Lee i wsp. (15) przy pomocy mikroskopu interferencyjnego wykazały, że komórki RPE poddane działaniu antyserum traciły po 3 godz. inkubacji 49,1% suchej masy, a powierzchnia ich zwiększała się o 253%. Komórki poddane działaniu normalnych  $\gamma$ -globulin traciły minimalną ilość suchej masy (3,3—3,9%), a powierzchnia ich wzrastała jedynie o 11,7%. Badania biochemiczne wykonane przez Greena i Goldberga (7) wykazały utratę około 66% wolnych aminokwasów i rybonukleoproteidów, 90% potasu wewnątrzkomórkowego oraz 75% cytoplazmatycznego RNA. Ilość DNA zasadniczo nie ulegała zmianie, a utratę protein oceniano na 30—60%. Badania przeprowadzone przez Flaxa (6), Bickisa i wsp. (3) oraz Löblich, Landschütza (17) nad oddychaniem tkankowym i glikolizą wykazały zahamowanie tych procesów. Autorzy nie są pewni, czy zahamowanie to uzależnione jest od zmian morfologicznych, czy odwrotnie — zmiany morfologiczne uzależnione są od zmian biochemicznych. Löblich i Landschütz uważają jednak, że zmiany strukturalne cytoplazmy są przyczyną zahamowania glikolizy, a zahamowanie oddychania tkankowego pojawiające się po prawie całkowitym zniszczeniu mitochondrii jest przyczyną śmierci komórek. Działanie cytotoksyczne heterologicznych przeciwciał nie jest swoiste jedynie w stosunku do komórek guza, przeciwko któremu zostały one wyprodukowane, gdyż wywierają one identyczny wpływ na wszystkie wysiękowe raki mysie, a także i na erytrocyty (6, 8, 14, 23).

Podsumowując dane uzyskane z przeglądu piśmiennictwa, jak również dane własne, można stwierdzić, że zmiany cytotoksyczne obserwowane w komórkach RPE po traktowaniu ich heterologicznymi przeciwciałami i komplementem są:

a) uzależnione od obecności komplementu i b) niespecyficzne dla danego typu nowotworu i najprawdopodobniej nie związane z obec-

nością swoistych antygenów „nowotworowych” a jedynie uzależnione od antygenowych różnic pomiędzy donatorem a akceptorem, wywołanych przez odmienne geny zgodności tkankowej i chociaż guzy te dają się przeszczepiać na wszystkie gatunki myszy nie dowodzi to braku wszystkich antygenów, mogących wywołać izoimmunologiczną odpowiedź (18).

Pogląd, że zmiany cytotoksyczne wywołane przez działanie heterologicznych przeciwciał nie dowodzą obecności swoistych antygenów w komórkach nowotworowych, a przemawiają jedynie za działaniem kompleksu antygen-przeciwciało-komplement, został potwierdzony przez Selicha i wsp. (20), którym udało się uzyskać antyserum przeciwko albuminie ludzkiej lub bydłowej, znakowanej sulforodaminą B, które w obecności dopełniacza działało na komórki RPE zabarwione tym barwnikiem (hapten) w sposób identyczny do działania przeciwciał heterologicznych anty RPE i dopełniacza. Pomimo dużego nagromadzenia materiału faktycznego, zagadnienie seroterapii i profilaktyki nowotworów złośliwych pozostaje w dalszym ciągu sprawą nie rozstrzygniętą i otwartą.

#### PIŚMIENICTWO

1. Bertalanffy F. D.: *Cancer Research* **21**, 422—426, 1961.
2. von Bertalanffy L., Masin M., Masin F.: *Cancer* **11**, 873—887, 1958.
3. Bicks I. J.: *Cancer Research*. **19**, 602—607, 1960.
4. Easton J. M., Goldberg B., Green H.: *J. Exper. Med.*, **115**, 275—288, 1962.
5. Fitch F. W.: *Archiv. of Pathology*, **73**, 66—82, 1962.
6. Flax M. H.: *Cancer Research*. **16**, 774—782, 1956.
7. Green H. N., Fleischer R. A., Barrow D., Goldberg B.: *J. Exper. Med.*, **109**, 511—521, 1959.
8. Green H., Barrow P., Goldberg B.: *J. Exper. Med.*, **110**, 669—713, 1959.
9. Green H., Silverblatt E.: *Nature*, **186**, 646—647, 1960.
10. Goldberg B., Green H.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**, 645—650, 1960.
11. Goldberg B., Green H.: *J. Exper. Med.*, **109**, 505—510, 1959.
12. Godlewski H., Vorbrodtt A.: *Folia Morphologica*. **5**, 137—144, 1954.
13. King D. W. i wsp.: *Am. J. Path.*, **35**, 1067—1075, 1959.
14. Landy M. i wsp.: *Cancer Research*. **20**, 1279—1291, 1960.
15. Lee H., Richards V., Klausner G.: *Cancer Research*. **20**, 1415—1421, 1960.
16. Lindren A.: *Am. J. Clin. Path.*, **34**, 426—433, 1960.
17. Löblich H. J., Landschütz Chr.: *Zeit. für Krebsforsch.*, **63**, 335—344, 1960.
18. Milgrom F.: *Cancer Research*., **21**, 862—868, 1961.
19. Seeger P. G., Schacht W.: *Acta Histochemica*. **6**, 139—169, 1958.

20. Seelich F., Kaiser E., Springer K.: Zeitschrift für Krebsforsch., 64, 448—458, 1962.
21. Sykora I.: Neoplasma. 8, 395—401, 1961.
22. Wiesler R. W. i wsp.: Cancer Research. 16, 761—774, 1956.
23. Wiesler R. W., Flax M. H.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 69, 773—794, 1957.

## OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 3. Komórki RPE po podaniu NaCl, zabarwione wg metody Bracheta. Widoczne regularne obrysy komórek. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 4. Komórki RPE po podaniu 6 mg  $\gamma$ -globulin. Widoczny znaczny obrzęk cytoplazmy. RNA przesunięty na obwód komórki i zgrupowany w „pęcherzykach” przytwierdzonych do powierzchni komórek. Barwienie błękitem toluidyny, pH 4,7. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 5. Komórki RPE po jednorazowym podaniu 9 mg  $\gamma$ -globulin w 3 ml dopełniacza. 24 godziny po podaniu  $\gamma$ -globulin i dopełniacza. Widoczne zaglutynowane, obumierające komórki RPE. Barwione błękitem toluidyny pH 4,7. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 6. Komórki RPE po jednorazowym podaniu 9 mg  $\gamma$ -globulin w 3 ml dopełniacza. 36 godzin po podaniu  $\gamma$ -globulin i dopełniacza. Widoczne obumarłe komórki RPE nie barwiące się błękitem toluidyny. W lewym dolnym rogu zdjęcia, komórka o wyglądzie prawidłowym. Barwione błękitem toluidyny pH 4,7. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 7. Komórki RPE po 10-minutowej inkubacji w antiserum i komplemencie. Wyraźnie zaznaczony obrzęk cytoplazmy. Wszystkie jądra komórkowe są zabarwione na kolor niebieski. Barwienie błękitem trypanu. Zdjęcia wykonane w mikroskopie kontrastowo-fazowym. Pow. ca 360 ×.

Ryc. 8. Komórki RPE po 2-godzinnej inkubacji w zbuforowanym płynie fizjologicznym, zabarwione błękitem trypanu. Wygląd komórek nie wykazuje różnic w porównaniu z komórkami pobranymi bezpośrednio z płynu wysiękowego. Zdjęcia wykonane w mikroskopie kontrastowo-fazowym. Pow. ca 360 ×.

Ryc. 9. Komórki RPE po 4-minutowej inkubacji. RNA gromadzi się w pobliżu błony komórkowej i w obrębie ziarnistości cytoplazmatycznych zgrupowanych wokół jądra. Komórki RPE inkubowane w antiserum i dopełniaczu, zabarwione oranżem akrydyny\*. Mikroskop luminescencyjny. Pow. 1152 ×.

Ryc. 10. Komórki RPE po 30-minutowej inkubacji. Widoczny dalszy spadek stężenia RNA w komórkach. Pojedyncze komórki, ulegające rozpadowi (komórka w środku zdjęcia) są pozbawione RNA prawie całkowicie (szarzielona fluorescencja). Komórki RPE inkubowane w antiserum i dopełniaczu, zabarwione oranżem akrydyny\*. Mikroskop luminescencyjny. Pow. 1152 ×.

## РЕЗЮМЕ

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. В ходе действия цитотоксического антитела и компонента клетки теряют значительную часть РНК, которая выходит из вне

\* RNA флуоризује колорем црвоним, DNA флуоризује колорем жолтым.

клетки при одновременном значительном их набухании. Действие цитотоксических антител полностью зависит от присутствия компонента.

2. Не все клетки АОЭ одинаково подвергаются цитотоксическим изменениям, некоторые имеют вид нормальных клеток. Можно предположить, что эти клетки участвуют в дальнейшем росте опухоли по определенной регрессии из-за применения антисерум и компонента.

Рис. 3. Клетки АОЭ по введению NaCl, окрашенные методом Брашета. Видны регулярные контуры клеток. Увеличение 480 X.

Рис. 4. Клетки АОЭ по введению 6 мг  $\gamma$ -глобулин. РНК расположена ближе в оболочке клетки и сгруппирована в „пузырьках”, присоединенных к поверхности клетки. Окрашен тулоидинблау рН 4,7. Увеличение 480 X.

Рис. 5. Клетки АОЭ после одноразового введения 9 мл  $\gamma$ -глобулин в трех мл компонента. 24 часа после введения  $\gamma$ -глобулин и компонента. Видны саглютинированные некротизирующие клетки АОЭ. Окраска тулоидинблау рН 4,7. Увеличение 480 X.

Рис. 6. Клетки АОЭ после одноразового введения 9 мл  $\gamma$ -глобулин в трех мл компонента. 36 часов после введения  $\gamma$ -глобулин и компонента. Видны снекротизированные клетки АОЭ, не окрашивающиеся тулоидинблау. В левом углу рисунка видна неизменная клетка. Окраска тулоидинблау рН 4,7. Увеличение 480 X.

Рис. 7. Клетки АОЭ после десятиминутной инкубации в антисерум и компоненте. Отчетливо виден отек протоплазмы. Все ядра клеток окрашены в голубой цвет. Окраска трипановым голубым. Снимки сделаны в контрастно-фазовом микроскопе. Увеличение 360 X.

Рис. 8. Клетки АОЭ после двухчасовой инкубации в субферованной физиологической соли. Окрашены трипановым голубым. Вид клеток не обнаруживает разницу в сравнении с клетками, взятыми непосредственно из асцитной жидкости. Снимки сделаны в контрастно-фазовом микроскопе. Увеличение 360 X.

Рис. 9. Клетки АОЭ после 4-минутной инкубации. РНК нагромождена вблизи клеточной оболочки и в сфере протоплазматической зернистости, сгруппированной вокруг ядра. Клетки АОЭ инкубированные в антисерум и компоненте. Окрашены акридином оранжевым\*. Люминесценционный микроскоп. Увеличение 1152 X.

Рис. 10. Клетки АОЭ после 30-минутной инкубации. Видно дальнейшее уменьшение насыщения РНК в клетках. Одиночные распадающиеся клетки (клетка в середине снимка) почти совершенно не содержат РНК. Клетки АОЭ, инкубированные в антисерум и компоненте. Окрашены акридином оранжевым\* Люминесценционный микроскоп. Увеличение 1152 X.

\* РНК — флюоризует красным цветом  
ДНК — флюоризует желтым цветом

## SUMMARY

From these investigations the following conclusions can be drawn.

1. In the course of the cytotoxic action of the antibodies and the complement, the cells lose a considerable quantity of RNA which exudes from the cells when these swell considerably. The cytotoxic action of the antibodies strictly depends on the presence of a complement. 2. Not all EAT cells undergo identical cytotoxic changes, some do not differ in appearance from normal cells. These cells are probably responsible for the further growth of the tumour after a period of remission due to the administration of the antiserum and the complement.

## EXPLANATIONS OF FIGURES

Fig. 3. EAT cells after application of NaCl. Brachet's method of staining. Regular outlines of the cells are visible. Magn. 480 X.

Fig. 4. EAT cells after the application of 6 mg of  $\gamma$ -globulins. Considerable oedema of the cytoplasm is visible. RNA displaced to the periphery of the cell and grouped in „vesicles” attached to the cell surface. Toluidine blue staining, pH 4.7. Magn. 480 X.

Fig. 5. EAT cells after single application of 9 mg of  $\gamma$ -globulins in 3 ml of complement. 24 hours after the application of  $\gamma$ -globulins and the complement. The agglutinated necrobiotic EAT cells are visible. Toluidine blue staining, pH 4.7. Magn. 480 X.

Fig. 6. EAT cells after single application of 9 mg of  $\gamma$ -globulins in 3 ml of complement. 36 hours after the application of  $\gamma$ -globulins and the complement. Necrotic EAT cells non-staining with toluidine blue are visible. In the left bottom corner of the photograph a normal cell is visible. Toluidine blue staining, pH 4.7. Magn. 480 X.

Fig. 7. EAT cells after 10 min. of the incubation period in the antiserum and complement. Distinct oedema of the cytoplasm. All the nuclei are stained with trypan blue. The photograph is taken by the phase-contrast microscope. Magn. 360 X.

Fig. 8. EAT cells after 2 hrs. of the incubation period in buffered saline physiological solution, stained with trypan blue. The cells do not differ in appearance from those taken immediately from exudative fluid. The photograph is taken by the phase-contrast microscope. Magn. 360 X.

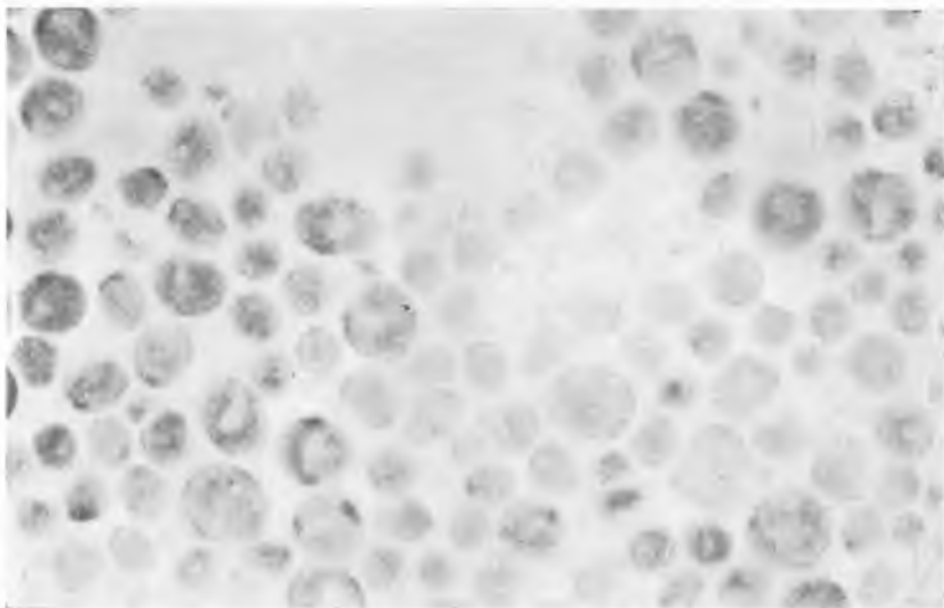
Fig. 9. EAT cells after 4 min. of the incubation period. RNA concentrates in the neighbourhood of the granules of the cytoplasm around the nucleus. EAT cells incubated in the antiserum and complement, stained with acridine orange. Luminescence microscope\*. Magn. 1152 X.

Fig. 10. EAT cells after 4 min. of the incubation period. Further decrease of RNA concentration in the cells is visible. Single disintegrating cells (a cell in the middle of the photograph) deprived of RNA almost completely (gray-green fluorescence). EAT cells incubated in the antiserum and complement, stained with acridine orange. Luminescence microscope \*. Magn. 1152 X.

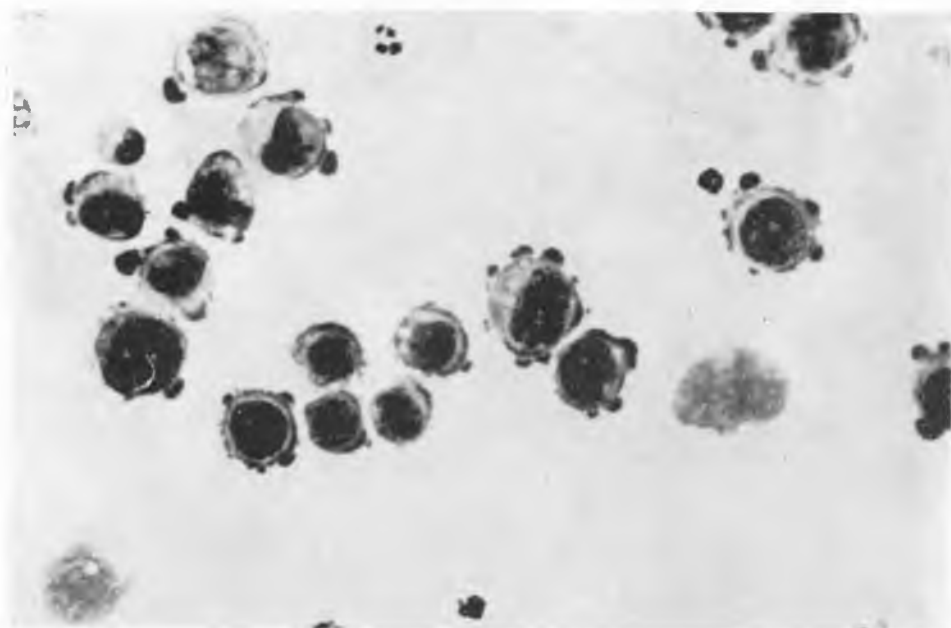
---

\* RNA fluorescences red, DNA fluorescences yellow.

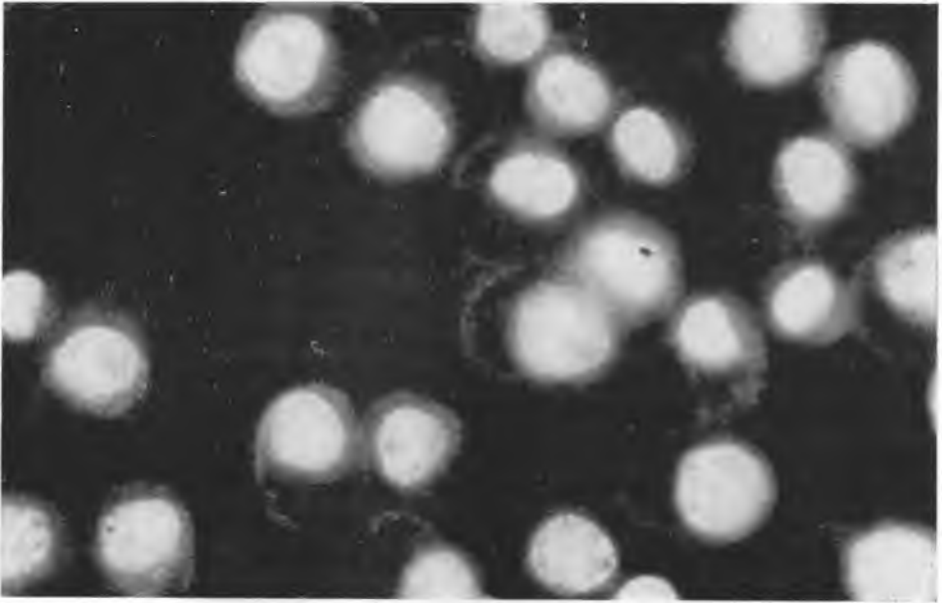
Pracę otrzymano 5 V 1964.



Ryc. 3



Ryc. 4



Ryc. 9



Ryc. 10