
Katedra i II Klinika Położnictwa i Chorób Kobięcych. Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr Józef Tynecki

Maria WAGA-RZUCIDŁO

**Próba oceny wykrywalności komórek nowotworowych we krwi
obwodowej w chorobie rakowej narządu rodnej kobiety**

Попытка оценки выявления опухолевых клеток в периферической крови
при раке женских половых органов

An Attempt at Detecting Tumour Cells in the Peripheral Blood
of Women with Carcinoma of the Reproductive System

Próby wykrywania raka za pomocą badań cytologicznych krwi obwodowej datują się od dawna, lecz doniesieniom tym wówczas nie przypisywano większego znaczenia. Dopiero w ostatnich latach wzbudziło żywe zainteresowanie zjawisko obecności komórek nowotworowych we krwi. Pierwsze badania nad wykrywalnością komórek nowotworowych we krwi pochodzą sprzed stu lat. W 1868 r. Ashworth (3) podał krótką wzmiankę a w późniejszych latach Aschoff (2) i Quensel (26) stwierdzili komórki nowotworowe we krwi zmarłych na schorzenia nowotworowe. Schleip (30), Ward (35), Marcus (199) wykazali je w chorobach złośliwych przewodu pokarmowego i oddechowego, ale były to doniesienia o charakterze kazuistycznym. Dopiero systematyczne badania Poola i Dunlopa traktują komórki nowotworowe we krwi jako przyczynę powstawania przerzutów lub nawrotów choroby nadając temu zjawisku znaczenie kliniczne i prognostyczne.

Wraz z rozwojem techniki wyodrębniania komórek nowotworowych we krwi ukazywały się dalsze prace (4, 8, 9, 10, 11, 17, 18, 24, 27, 28, 32, 33, 34, 36, 37). Wyniki uzyskiwane przez poszczególnych autorów wahają się w granicach od 0 do 100% a różnice być może zależne są od sposobu izolowania i barwienia komórek. Każda z dotychczasowych metod izolowania komórek nowotworowych ma na celu usunięcie czerwonych ciałek krwi i oddzielenie białych ciałek wraz z komórkami nowotworowymi. Eliminację erytrocytów uzyskiwano przez ich hemolizę za pomocą kwasu octowego (23), saponin (10, 14, 17) i streptolizyny (18, 16). Wyosobnienie komórek wraz z białymi ciałkami krwi otrzymywano przez odpowiednie wirowanie (11, 13, 16). Aby zwiększyć dokładność rozdziału komórek, niektórzy autorzy uzupełniają wirowanie filtrowaniem (18) lub sedymentacją stosując albu-

miny (27), olej silikonowy (32), fibrynogen (21, 28) lub dekstran (7) wykorzystując różnicę ciężaru właściwego komórek nowotworowych w odniesieniu do pozostałych elementów krwi.

Przy trudnej diagnostyce cytologicznej komórek nowotworowych, a w szczególności komórek nowotworowych z krwi, bardzo przydatną okazała się metoda barwienia przy pomocy barwnika Acridine-Orange (AO), którą wprowadzili do badań Bertalanffy (6, 22), Armstrong (1) oraz Schümmelfeder (31). Metoda ta polega na polichromatycznym barwieniu AO dwu istotnych składowych każdej komórki, kwasów rybo- i desoxyrybonukleinowego oraz ocena ich w mikroskopie fluorescencyjnym. Komórki nowotworowe odznaczające się wysoką synteza białek, a więc o dużym stężeniu kwasów nukleinowych po zabarwieniu AO, wykazują żywą fluorescencję cytoplazmy w tonacjach czerwonych do czerwieni płonącej oraz zielono żółtą fluorescencję hiperchromatycznych jąder obok charakterystycznych cech morfotycznych. Biorąc pod uwagę zalety mikroskopii fluorescencyjnej postanowiłam porównać wartości rozpoznawcze komórek nowotworowych barwionych AO oraz hematoksyliną i eozyną (HE). Celem zaś pracy było poczynienie spostrzeżeń nad występowaniem komórek nowotworowych we krwi obwodowej w odniesieniu do spostrzeganych obrazów klinicznych.

MATERIAŁ I METODYKA

Badaniami na obecność komórek nowotworowych we krwi obwodowej objęto 80 chorych, w tym 60 przypadków ze zmianami nowotworowymi (36 przypadków z rakiem szyjki macicy, 12 z rakiem trzonu macicy i 12 z rakiem jajnika) oraz 20 chorych kontrolnych z nadżerkami części pochwowej macicy, krwawieniami międzymiesiączkowymi i stanami zapalnymi przydatków. U wszystkich chorych krew pobierano z żyły łokciowej dwu lub trzykrotnie: przed zabiegiem, w czasie zabiegu diagnostycznego oraz operacyjnego.

Niezależnie od badań komórek nowotworowych we krwi przeprowadzano badania cytologiczne rozmazów z części pochwowej szyjki macicy, aspiracyjnych z jamy macicy, guzów jajnikowych, płynów z jamy otrzewnowej oraz z tkanek pooperacyjnych. Badania te wykonywano celem rozpoznawania i porównania z komórkami nowotworowymi stwierdzanymi we krwi obwodowej. Rozpoznanie kliniczne i cytologiczne uzupełniano badaniem histopatologicznym. Izolowanie komórek nowotworowych z krwi obwodowej przeprowadzano zmodyfikowaną metodą Longa i wsp. (16) gdzie hemolizę czerwonych ciałek krwi uzyskiwano przez działanie saponinami a nie przez inkubację ze streptolizyną O. Preparaty barwiono wg met. Bertalanffy (5) przy pomocy AO i oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym ME-2, oraz barwiono hematoksyliną i eozyną (HE).

WYNIKI BADAŃ

1. Rak części pochwowej szyjki macicy

Po przebadaniu krwi i zastosowaniu barwienia AO stwierdzono komórki nowotworowe przed zabiegiem w 3 przypadkach, w czasie zabiegu diagnostycznego w 8 przypadkach na 36 badanych, a w czasie zabiegu operacyjnego w 1 przypadku na 8 operowanych. Przy pomocy barwienia HE w pierwszym badaniu uzyskano 2 wyniki dodatnie, w drugim

5 dodatnich, zaś w trzecim także 1 wynik dodatni. Nie stwierdzono komórek nowotworowych we krwi obwodowej w raku przedinwazyjnym i w stopniu pierwszym choroby w poszczególnych etapach badania. Spotykano je we krwi w pojedynczych przypadkach, począwszy od II stopnia choroby we wszystkich okresach badania. We wszystkich przypadkach potwierdzono badaniem histopatologicznym rozpoznanie kliniczne i cytologiczne rozmazów z części pochwowej oraz z krwi obwodowej u poszczególnych chorych.

Liczba komórek nowotworowych, stwierdzanych w preparatach z krwi obwodowej u chorych z rakiem szyjki macicy, wynosiła od jednej do trzech. Przeważnie występowały pojedynczo (ryc. 1, 3, 4), rzadko dwie (ryc. 5). Barwione roztworem AO wykazywały czerwone zabarwienia cytoplazmy, względnie pomarańczowo-czerwoną fluorescencję charakterystyczną dla metody barwienia w AO. Jądra zaś komórek nowotworowych fluoryzowały w kolorach żółto-zielonych. Jąderka o wyraźnym zabarwieniu spotykano w pojedynczych przypadkach. Stwierdzono w większości przypadków, że fluorescencja jąder i cytoplazmy była mniej jaskrawa w komórkach nowotworowych z krwi obwodowej w stosunku do komórek z tkanki macierzystej.

W preparatach uzyskanych bezpośrednio z tkanek nowotworowych części pochwowej szyjki macicy, komórki nowotworowe i ich jądra wykazywały różnorodność form co do wielkości i kształtu oraz wykazywały charakterystyczne cechy morfologiczne obok bardzo wyraźnych cech fluorescencji dla metody barwienia w AO. Komórki te występowały w dużych skupiskach z płonącą czerwienią cytoplazmy, kontrastującą bardzo wyraźnie z żółtą fluorescencją jąder (ryc. 2).

2. Rak trzonu macicy

Obecność komórek nowotworowych we krwi obwodowej przy barwieniu AO stwierdzono w 1 przypadku przed zabiegiem, w 2 przypadkach w czasie zabiegu operacyjnego na 6 operowanych. Po zastosowaniu barwienia HE w pierwszym badaniu wszystkie wyniki były ujemne, w drugim 1 dodatni i w trzecim badaniu 1 dodatni.

Komórki nowotworowe we krwi obwodowej w raku trzonu macicy występowały także pojedynczo (ryc. 6), a po zabarwieniu AO dawały takie same charakterystyczne kolory fluorescencji, jak komórki raka szyjki macicy. Obraz morfologiczny komórek nowotworowych błony śluzowej jamy macicy jest nieco inny od komórek nowotworowych raka płaskonabłonkowego. Komórki są przeważnie małe, wykazują nieznaczną różnorodność form, chociaż można spotkać także i komórki duże.

3. Rak jajnika

W grupie tej stwierdzano komórki nowotworowe we krwi w 1 przypadku w obu metodach barwienia w pierwszym badaniu, zaś w drugim badaniu AO stwierdzono w 2 przypadkach, a HE w 1 przypadku na 12 badanych. W trzecim badaniu po otwarciu jamy brzusznej i manipulacjach na guzie stwierdzono komórki nowotworowe jedną i drugą metodą barwienia w 4 przypadkach na 9 operowanych, czyli 44,4%. W preparatach cytologicznych, uzyskanych z płynów z jamy otrzewnowej, aspiracyjnych z guzów jajnikowych oraz tkanek pooperacyjnych stwierdzono komórki nowotworowe w 100% przypadków badanych, co zostało potwierdzone badaniem histopatologicznym.

Komórki nowotworowe spotykane we krwi obwodowej u chorych z rakiem jajnika nie różniły się swym wyglądem, wielkością i ilością oraz właściwościami barwienia (ryc. 7) od komórek nowotworowych we krwi badanych z grupy 1 i 2, z wyjątkiem jednego przypadku — raka zarodkowego, gdzie różnica zaznaczała się w wielkości i liczbie znalezionych komórek we krwi (około 20). Charakteryzowały się dużym hiperchromatycznym jądrem o wyraźnie zaznaczonej chromatynie i widocznym jąderku. Jądra fluoryzowały w kolorze zielono-żółtym, a jąderko — blado-pomarańczowym. Cytoplazma wokół jądra w postaci niewielkiej obwódki fluoryzowała jaskrawą czerwień (ryc. 8).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Na ogólną liczbę badanych chorych z rakiem narządu rodno stwierdzono, że przy barwieniu AO i fluorescencyjnej ocenie wykryto komórki nowotworowe we krwi obwodowej w pierwszym badaniu u 8,3% przypadków, w drugim u 20%, a w trzecim u 30,4%. Metodą barwienia HE wykryto tylko u 5% w pierwszym badaniu, w drugim u 11,6%, zaś w trzecim u 26,3% na 60 badanych. Poza tym wyniki badań własnych wskazują na pewną zależność obecności komórek nowotworowych we krwi od stopnia zaawansowania choroby i wykonywanych zabiegów chirurgicznych. W stopniu O nie wykryto komórek nowotworowych we krwi w poszczególnych okresach badania. W stopniu I także ich nie wykryto w dwu pierwszych badaniach. Natomiast wykryto je w czasie zabiegu operacyjnego w 1 przypadku na 7 operowanych, tj. 14,2%. Począwszy od II stopnia choroby stwierdzono komórki nowotworowe we wszystkich okresach badania, z tym że liczba przypadków z wykrytymi komórkami nowotworowymi we krwi wzrastała w zależności od stopnia zaawansowania choroby, zabiegu diagnostycznego i operacyjnego.

W czasie zabiegu diagnostycznego wykryto: metodą barwienia AO

w II stopnia u 23,3%, w III stopniu u 26,3%, w IV stopniu u 27,2%, zaś w czasie zabiegu operacyjnego: w I stopniu u 14,2%, w drugim stopniu u 33,3%, w III stopniu u 60%. Na podkreślenie zasługuje fakt, że największy procent wykrywalności komórek nowotworowych we krwi, uzyskano w czasie zabiegów operacyjnych przy raku jajnika (44,4%), gdzie przypadki dotyczyły późniejszego okresu choroby. Mniejszy w raku trzonu macicy — 33,3%, zaś w raku szyjki macicy tylko u 12,5%, na co zwrócił uwagę Soost (33). Należy przypuszczać i tłumaczyć różnice tym, że wśród operowanych z rakiem szyjki macicy przeważały przypadki w stopniach O i I choroby, natomiast wszystkie przypadki raka jajnika dotyczyły późniejszego okresu choroby.

Komórki nowotworowe, spotykane we krwi obwodowej, różniły się od innych elementów krwi nie tylko fluorescencją, ale także i wielkością. Były większe około 2—6 razy od białych ciałek krwi, ale mniejsze i bardziej okrągłe od komórek pochodzących bezpośrednio z tkanki macierzystej, na co wskazali inni autorzy (29, 12, 25, 34). Cytoplazma komórek posiadała nieregularne kształty i obrysy, czasami obserwowano wodniczki. Komórki nowotworowe stwierdzane przez nas we krwi obwodowej spełniały kryteria morfologiczne i fluorescencyjne z uwzględnieniem pewnych zmian, jakim ulegają w czasie wędrówki w krwiobiegu. Mikroskopia fluorescencyjna jest cennym uzupełnieniem metod barwienia, wykazujących morfologiczne cechy komórek złośliwych (15, 20), i ułatwia ich rozpoznanie w małej liczbie.

Na podstawie przeprowadzonych badań doszliśmy do następujących wniosków:

1. Wolne komórki nowotworowe we krwi obwodowej częściej można stwierdzić w czasie zabiegów operacyjnych i to szczególnie w raku jajnika, rzadziej w raku trzonu i szyjki macicy.

2. Różnice w częstości występowania komórek nowotworowych we krwi obwodowej mogą być tłumaczone stopniem zaawansowania choroby, budową histologiczną i większą łatwością złuszczenia oraz przechodzenia ich do krwi przy raku jajników.

3. Czynnikiem sprzyjającym dla wysiewu komórek nowotworowych do krwiobiegu są zabiegi chirurgiczne.

4. Cytochemiczne barwienie przy pomocy fluorochromu AO pozwala na częstsze wykrywanie komórek nowotworowych we krwi obwodowej ze względu na charakterystyczną fluorescencję elementów komórkowych w porównaniu z morfologiczną oceną preparatów przy barwieniu HE.

5. Wykrywanie komórek nowotworowych we krwi obwodowej przy nowotworach złośliwych narządu rodowego za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej jest cennym badaniem pomocniczym.

PIŚMIENICTWO

1. Armstrong J. A.: *Exper. Cell. Res.* **11**, 640—643, 1956.
2. Achoff L.: *Münch. Med. Wschr.* **53**, 337—339, 1906.
3. Ashworth cyt. wg Soost H. J.: *Dtsch. Med. Wschr.* **85**, 893—899, 1960.
4. Baldus F.: *Klin. Wschr.* **38**, 845—846, 1960.
5. Bertalanffy F. D.: *Mikroskopie* **15**, 67—72, 1960.
6. Bertalanffy L., Masin M., Masin F.: *Cancer (Philad)* **11**, 873—887, 1958.
7. Blichowski A.: Wpływ urazu operacyjnego na rozsiew komórek nowotworowych drogą krwi. Monogr. A. M. Łódź 1964.
8. Diddle A. W., Sholes D. M., Hollingsworth J., Kinlaw S.: *Am. J. Gynec.* **78**, 582—585, 1959.
9. Drye J., Rumage W., Anderson D.: *Annales Surg.* **155**, 733—740, 1962.
10. Engel H. C.: *Acta Chir. Scand. Supl.* 201. Stocchholm 1955.
11. Fisher E. R., Turnbull R. B.: *Surg. Gyn. Obstet.* **100**, 102—108, 1955.
12. Gerkowicz K.: *Klinika Oczna* **35**, 405—410, 1965.
13. Herbeuval R., Herbeuval H., Cuny G., Duheille J.: *Presse Med.* **69**, 149—153, 1961.
14. Herbeuval R., Herbeuval H., Duheille J.: *Triangle* **6**, 47—52, 1963.
15. Ishikawa Y., Fukushima N., Uno H., Tohoku J.: *Exper. Med.* **77**, 164—170, 1962.
16. Long L., Roberts S., Grath R., Grew E.: *J. Am. Med. Assoc.* **170**, 1785—1788, 1959.
17. Ludwig W.: *Onkologia* **14**, 174—185, 1961.
18. Melmgren R. A., Pruitt J. C., del Vecchio P. R., Potter J. F.: *J. Nat. Cancer Inst.* **20**, 1203—1213, 1958.
19. Marcus H.: *Ztschr. Krebsforsch.* **16**, 217—230, 1919.
20. Marks R., Goodwin A. M.: *Brit. J. Cancer* **16**, 390—399, 1962.
21. Moore G. E., Sandberg A., Schubarg J. R.: *Annal. Surg.* **146**, 580—587, 1957.
22. Pirożyński W. J., Bertalanffy L.: *A. M. W. Arch. Path.* **54**, 450—457, 1952.
23. Pool E. H., Dunlop G. R.: *Am. J. Cancer* **21**, 99—103, 1934.
24. Potter J. F., Longenbaugh G., Chu E., Dillen J., Romadahl M., Malmgren: *Surg. Gyn. Obstet.* **110**, 734—738, 1960.
25. Pruitt J. C., Hilberg A. W., Mochead R. P., Mengoli H. F.: *Surg. Gyn. Obstet.* **114**, 179—188, 1962.
26. Quensel, cyt. wg Soost H. J.: *Dtsch. Med. Wschr.* **85**, 893—899, 1960.
27. Roberts S., Watne A., AcGrath R., McGrew E., Cole W. H.: *A. M. W. Arch. Surg.* **76**, 346—349, 1958.
28. Roberts S., Long L., Jonasson O., Grath R., Grew E., Warren H., Cole M.: *Surg. Gyn. Obstet.* **111**, 3—11, 1960.
29. Saito H.: *Acta Med. Biol.* **9**, 131—150 (Nigata) 1961.
30. Schleip K., cyt. wg Potter J. F.: *Surg. Gyn. Obstet.* **110**, 734—738, 1960.
31. Schümmelfeder N., Ebschner H. J., Krogh E.: *Naturwissenschaften* **44**, 467—468, 1957.
32. Seal S. H.: *Cancer* **12**, 590—595, 1959.
33. Soost H. J.: *Geburtsh. Frauenhk.* **21**, 1—9, 1961.

34. Soszka S., Kazanowska W., Gulanowska: *Gin. Pol.* 10, 1125—1131, 1965.
35. Ward G. R.: *Lancet* 1, 676—677, 1913.
36. Whang J.: *Ztschr. Krebsforsch.* 62, 397—407, 1958.
37. Wimhöffer H., Wagner D., Schunck R.: *Zentrbl. Gyn.* 85, 10—21, 1963.

Otrzymano 4 VII 1969.

OBJAŚNIENIE RYCIN

Ryc. 1. *Ca atypicum partim clarocellulare* części pochwowej szyjki macicy. Duża pojedyncza komórka nowotworowa z krwi obwodowej. Jądro duże hiperchromatyczne o zabarwieniu żółtym. Cytoplazma w postaci małej obwódki o jaszkrawo czerwonej fluorescencji (pow. 320 X).

Ryc. 2 Ten sam przypadek j. w. Rozmaz bezpośredni z tkanki nowotworowej szyjki macicy. Komórki nowotworowe różnej wielkości i kształtu wykazują cechy morfologiczne oraz charakterystyczną fluorescencję cytoplazmy i jąder (pow. 320 X).

Ryc. 3. *Ca solidum partim clarocellulare probabiliter planoepitheliale* części pochwowej szyjki macicy. Pojedyncza komórka nowotworowa ze krwi obwodowej o nieregularnych obrysach cytoplazmy. Żywo czerwono fluoryzująca cytoplazma przysłania obrysy jądra. Jąderko powiększone w kolorze żywo pomarańczowym (pow. 320 X).

Ryc. 4. *Ca planoepitheliale* części pochwowej szyjki macicy. Komórka nowotworowa z krwi obwodowej, cytoplazma wykazuje pomarańczowo czerwona fluorescencję o nieco zniszczonych brzegach. Jądro położone ekscentrycznie o żółtozielonkawej fluorescencji (pow. 320).

Ryc. 5. *Ca solidum probabiliter planoepitheliale* części pochwowej szyjki macicy. Dwie komórki nowotworowe z krwi obwodowej o jądrach powiększonych, różnego kształtu. W cytoplazmie widoczna wakuolizacja. Barwienie hematoksyliną i eoźną (pow. 480 X).

Ryc. 6. *Ca solidum adenogenes* błony śluzowej jamy macicy. Pojedynczo komórka nowotworowa z krwi obwodowej wykazuje czerwono pomarańczową fluorescencję cytoplazmy w postaci wąskiego rąbka. Jądro powiększone leżące ekscentrycznie o żółtozielonym zabarwieniu (pow. 320 X).

Ryc. 7 *Cystadenocarcinoma papillare* jajnika. Widoczne trzy komórki nowotworowe we krwi obwodowej, różnej wielkości, okrągłe, wykazujące charakterystyczną fluorescencję cytoplazmy i jąder (pow. 320 X).

Ryc 8. *Carcinoma embrionale* jajnika. Pojedyncza komórka nowotworowa z krwi obwodowej różniąca się bardzo wyraźnie od białych ciałek krwi cechami budowy i fluorescencją. W środku widoczne jąderko (pow. 320 X).

РЕЗЮМЕ

Проведены исследования по выявлению опухолевых клеток в периферической крови 60 женщин больных раком половых органов. Каждую больную исследовали 2 или 3 раза: перед, во время и после

диагностических или операционных вмешательств. Изолирование опухолевых клеток из крови проводилось по модифицированному методу Лонга. Гемолиз эритроцитов получался при помощи сапонина, а не путем инкубации стрептолизином О. Препараты окрашивались по методу Берталяньффы акридиновым оранжем (АО) и исследовались при помощи люминисцентной микроскопии (аппарат МЛ-2). Одновременно проводились исследования по методу окраски гематоксилин-эозином (HE). Окрашиванием АО и оценкой под флюоресцентным микроскопом опухолевые клетки в периферической крови были обнаружены при I исследовании у 8,3% больных, при II исследовании — у 20%, а при III — в 30,4%. Методом окрашивания HE обнаружили только при I исследовании 5%, при другом — 11,6%, при III — 26,3%. Следует подчеркнуть, что самый высокий процент выявления опухолевых клеток в периферической крови был получен во время операционных вмешательств при раке яичников (44,4%), меньший — при раке матки (33,3%), а при раке шейки матки только 12,5%. Эта разница объясняется тем, что среди оперированных больных с раком шейки матки преобладали случаи 0 и I степени, а случаи рака яичников относились к поздней стадии болезни.

На основе проведенных исследований установлено, что чаще всего присутствие опухолевых клеток в периферической крови можно установить при хирургических вмешательствах, а также при большой запущенности опухолевого процесса, особенно при раке яичников.

Цитохимическая окраска при помощи АО и оценка под флюоресцентным микроскопом являются ценным вспомогательным исследованием и позволяют обнаружить опухолевые клетки в крови чаще, чем при окрашивании гематоксилин-эозином (HE).

S U M M A R Y

Investigations were carried out in order to detect tumour cells in the peripheral blood of 60 female patients affected with carcinoma of the reproductive system. Each female patient was examined twice or three times before, and during, diagnostic and surgical procedures. The isolation of tumour cells in the peripheral blood of the female patients was performed by the modified method of Long. Hemolysis of red corpuscles was obtained by the use of saponins and not by the incubation with streptolysin O. The preparations were stained with acridine orange (AO) by the method of Bertalanffy and were examined under the fluorescence microscope ML-2. Parallel examinations were carried out by staining preparations with haematoxylin and eosin (HE).

The examinations of the female patients by AO staining and by the use of fluorescence microscope revealed tumour cells in the peripheral blood in 8.3%, 20.0% and 30.4% of cases in the first, second and third examination, respectively. By the use of HE tumour cells were detected in the peripheral blood in 5.0%, 11.6% and 26.3% of cases in the first, second and third examination, respectively. It is worth noting that the highest percentage of tumour cells, detected in the peripheral blood, was obtained during surgical procedures of the ovary (44.4%). When the uterus and the cervix were affected, the per cent values were 33.3% and 12.5% of cases, respectively. The explanation is as follows: surgical cases of the cervix were mostly of 0 or 1 degree, while female patients with affected ovaries presented an advanced stage of cancer.

The results of the author's investigations indicate that tumour cells in the peripheral blood are frequently detected during surgical procedures, the frequency being much related to the degree of malignancy, especially in cancer of the ovary. According to the author the cytochemical staining with AO, including the use of the fluorescence microscope, is a more useful method than that of HE staining as far as detecting of tumour cells in the peripheral blood is concerned.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. *Ca atypicum clarocellulare* of the vaginal cervix. A single large tumour cell from the peripheral blood, with a large yellow hyperchromatic nucleus. Narrow rim of cytoplasm showing bright red fluorescence. Magn. 320 X.

Fig. 2. The same case. Smear from tumour tissue of the cervix. Tumour cells varying in size and shape, showing morphological features and fluorescence of cytoplasm and nuclei. Magn. 320 X.

Fig. 3. *Ca solidum partim clarocellulare probabiliter planoepitheliale* of the vaginal cervix. A single tumour cell from the peripheral blood, with irregular outlines of cytoplasm. Intense red cytoplasm showing fluorescence screening outlines of nucleus. An intense red-orange enlarged nucleolus. Magn. 320 X.

Fig. 4. *Ca planoepitheliale* of the vaginal cervix. A malignant tissue from the peripheral blood with a cytoplasm showing red-orange fluorescence. Blurred outlines of nucleus. An intense red-orange enlarged nucleolus. Magn. 320 X. Magn. 320 X.

Fig. 5. *Ca solidum probabiliter planoepitheliale* of the vaginal cervix. Two tumour cells from the peripheral blood with enlarged nuclei, varying in size. Cytoplasm shows vacuolization. HE staining. Magn. 480 X.

Fig. 6. *Ca solidum adenogenes uteri* of the *endometrium*. A single tumour cell from the peripheral blood showing red-orange fluorescence in a narrow rim of cytoplasm. Enlarged, eccentric yellow-green nucleus. Magn. 320 X.

Fig. 7. *Cystadenocarcinoma papillare* of the ovary. Three round malignant cells from the peripheral blood, varying in size, showing fluorescence of cytoplasm and nuclei. Magn. 320 ×.

Fig. 8. *Carcinoma embrionale* of the ovary. A single tumour cell from the peripheral blood, distinctly differing from white blood corpuscles in structure and type of fluorescence. A nucleolus is situated in the centre. Magn. 320 ×.



