

684578

ALEKSANDER GARLICKI

NACIEKI Z KOMÓREK ODCZYNOWYCH W PRZESZCZEPIALNYCH
NOWOTWORACH U MYSZY.

PROMOTOR: PROF. DR HAB. MED. ZBIGNIEW CHŁAP

Bibl. Medyczna CM UJ



1816095877

PRACA NINIEJSZA ZOSTAŁA WYKONANA
W ZAKŁADZIE PATOFIZJOLOGII
INSTYTUTU PATOLOGII
AKADEMII MEDYCZNEJ W KRAKOWIE.

Serdecznie dziękuję Panu Profesorowi
Zbigniewowi CHŁAPOWI za inspirację do
przeprowadzenia badań, opiekę i pomoc
w czasie wykonywania tej pracy.
Dziękuję również wszystkim Koleżankom
i Kolegom za pomoc w przeprowadzeniu
doświadczeń oraz za okazaną życzliwość.

SPIS TREŚCI

	Strona
WSTĘP	1
MATERIAŁ I METODY BADAN	7
DOŚWIADCZENIE I	12
DOŚWIADCZENIE II	24
DOŚWIADCZENIE III	34
OMOWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI SZCZEGÓŁOWE Z DOŚWIADCZEŃ	45
DYSKUSJA	62
WNIOSKI	72a
ZDJECIA, TABELI I RYCINY	73
STRESZCZENIE	85
FIŚMIENNICTWO	88

WSTĘP

Występowanie i biologiczne znaczenie nacieków złożonych z komórek układu limfatycznego, granulocytarnego i makrofagów towarzyszących wzrostowi nowotworowemu jest przedmiotem licznych aktualnie prowadzonych prac przez wielu badaczy różnych specjalności /1,2,4,7,8,9,10,13, 18,39,40,42,43,45,46,50,57,59,65,70,75,78,81,83,88,106, 107/.

Powszechnie przyjmuje się, że pojawienie się nacieków złożonych z tych komórek, określanym mianem komórek odczynowych, w guzie nowotworowym i jego najbliższym otoczeniu można traktować jako wyraz odporności przeciwnowotworowej organizmu /Baldwin, Evans, Haskill, Klein, Svenneving, Wood/.

Mimo, że problem ten znany jest w patologii onkologicznej od wielu lat, to jednak szereg zagadnień pozostaje nadal nierozstrzygniętych.

Między innymi dyskutowane są pytania w jakim stopniu nacieki te są wykładnikiem morfologicznym reakcji organizmu zmierzającej do ograniczenia wzrostu względnie odrzucenia nowotworu oraz w jakim zakresie nagromadzenie limfocytów, granulocytów i makrofagów związane jest z procesami martwicy zwykle towarzyszącej szybkiemu wzrostowi nowotworu /9, 10,18,29,30,40,50,57,70,83,85,92,98/.

W większości doniesień podkreśla się jednak cechy specyficzności okołoguzowych odczynów komórkowych, co potwierdzają przede wszystkim wyniki badań nad aktywnością przeciwnowotworową limfocytów, granulocytów i makrofagów izo-

lowanych z guza i jego otoczenia jak również bezpośredni udział wszystkich komórek odczynowych w procesach destrukcji komórek ulegających transformacji nowotworowej /1,5, 7,9,10,18,28,29,30,40,50,57,59,70,83,85,92,98,102/.

Podstawowe koncepcje dotyczące miejscowych stosunków między gospodarzem, a guzem nowotworowym oparte są o następujące dane.

Wielu autorów stwierdza istnienie wyraźnej zależności pomiędzy nasileniem reakcji odpornościowych na antygeny nowotworowe, a dynamiką wzrostu nowotworów, a także rokowaniem zwłaszcza co do czasu przeżycia organizmu obciążonego chorobą nowotworową.

Tak więc we wczesnej fazie rozwoju nowotworów obserwuje się żywe reakcje miejscowe skierowane przeciwko komórkom nowotworowym, a wyrażające się występowaniem rozległych nacieków z komórek odczynowych głównie limfocytów. W późniejszych okresach, a zwłaszcza w procesie tzw. samoistnej regresji złośliwych guzów nowotworowych występują obfite nacieki złożone z efektorowych komórek gospodarza guza głównie makrofagów i limfocytów o znacznej aktywności cytotoksycznej /4,6,13,15,16,29,32,37,44,47,50,55,69,97,98/.

Obrona przeciwnowotworowa ustroju jest więc zależna od nieswoistych i swoistych mechanizmów odpornościowych odpowiedzialnych za rozpoznawanie i eliminowanie komórek obcych antygenowo.

Możliwe jest również istnienie odporności przeciwnowotworowej na poziomie mikrośrodowiska tkankowego. Fenomen ten może mieć charakter nieswoisty i wywodzić się może z samej istoty różnicowania się tkanek /26,41,48/.

Z badań doświadczalnych i obserwacji klinicznych wynika, iż zasadniczą rolę w odporności przeciwnowotworowej odgrywają reakcje immunologiczne typu komórkowego, podczas których komórka nowotworowa ulega bezpośredniemu zniszczeniu przez wykonawcze komórki cytolityczne.

W związku z tym powstał problem kompetencji tych komórek odczynowych. Przyjmuje się, że głównymi komórkami efektorowymi są dojrzałe limfocyty T, które po ich wcześniejszej stymulacji przez antygeny nowotworowe ulegają przemianie w komórki swoiście cytotoksyczne w stosunku do danej komórki nowotworowej. Jest to pogląd zgodny z teorią nadzoru immunologicznego podaną przez Burneta zakładającą, iż wyspecjalizowane komórki układu odpornościowego zdolne są do rozpoznawania i niszczenia obcych antygenowo komórek w tym również komórek nowotworowych.

Teoria ta nie została jednak w pełni udokumentowana.

Z nowszych badań prowadzonych na zwierzętach z wrodzonym lub sztucznie wywołanym niedoborem limfocytów T wynika bowiem, iż częstość występowania u nich nowotworów spontanicznych lub indukowanych chemicznie czy też przez wirusy, nie jest większa niż u osobników ze sprawnym układem odpornościowym /Rygaard, Povlsen, Vandeputte/.

Z drugiej strony wiadomo od dawna z obserwacji klinicznych, że chorzy z niedomogą immunologiczną oraz osoby starsze częściej zapadają na choroby nowotworowe.

Wzrost wskaźnika zapadalności na nowotwory zanotowano także u osób poddanych immunosupresji, natomiast zaniechanie terapii immunosupresyjnej przywracające kompetencję immunologiczną stwarzało korzystne warunki dla regresji

nowotworu.

W końcu lat siedemdziesiątych wykazano, że aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych przejawiają nie tylko limfocyty ale także, a być może przede wszystkim aktywowane komórki grupy mono-makrofagów /Adams, Alexander, Cameron, Wood/.

W ubiegłym roku zostało opublikowanych wiele prac, które jak się wydaje potwierdzają to stanowisko i które wykazały ostatecznie, iż czynnikiem najsilniej aktywującym te komórki jest interleukina 2 /24,58,84/.

Stosunkowo niedawno okazało się również, że aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych wykazują komórki nie zaliczane ani do limfocytów T ani B i nie posiadające własności fagocytarnych. Zostały one określone mianem komórek zerowych /null cells/. Wśród komórek tej grupy zidentyfikowano tzw. komórki K tj. "zabójcy" /killer/ i komórki NK tj. "naturalni zabójcy" /natural killer/.

Charakteryzują się one zdolnością do nieswoistego i spontanicznego niszczenia komórek nowotworowych i uważane są za komórki "pierwszej linii" w aktywnej obronie ustroju przed niekontrolowaną proliferacją komórek nowotworowych /17,19,35,36,49,66,80,96,99,102/.

Pojawienie się nacieku komórkowego jest uwarunkowane niewątpliwie szeregiem czynników jak typ guza, immunogenność nowotworu jak i stan immunologiczny gospodarza.

Mimo braku dostatecznych danych o podstawowych mechanizmach kontroli wzrostu guza nowotworowego przez komórki odczynowe wielkie zainteresowanie budzą nadal publikacje dotyczące ich znaczenia w patoklinice chorób nowotworo-

wych u ludzi.

Obserwacje dotyczące miejscowej odpowiedzi immunologicznej ustroju na rosnący nowotwór mają w patologii człowieka charakter pośredni. Niemniej jednak pojawienie się nacieku zwłaszcza złożonego z komórek jednojądrzastych jest uznawane przez wielu badaczy za dowód odpowiedzi typu komórkowego pozostającej w związku z rozwijającym się nowotworem. Ponadto uważa się, że występowanie takich nacieków w obrębie i w otoczeniu guza nowotworowego polepsza rokowanie co do przeżycia chorego.

Powszechnie cytuje się również, iż od dawna opisywane tzw. samoistne regresje nowotworów jakkolwiek są zjawiskiem rzadkim, są z reguły poprzedzone gromadzeniem się nacieku złożonego z komórek odczynowych w obrębie guza /28,32,37,44,55,69,97,98/.

Wobec tak złożonej patogenezy pojawienia się nacieków z komórek odczynowych zależnych od typu guza i fazy jego wzrostu, staje się zrozumiałym fakt publikowania prac o często rozbieżnych poglądach i wynikach.

W tym świetle wydawało się celowe przeprowadzenie badań nad związkiem między obecnością lub brakiem odczynu komórkowego, a dynamiką wzrostu różnych typów przeszczepialnych nowotworów w odniesieniu do stanu immunologicznego gospodarza oraz o ustalenie kryteriów obiektywnej oceny tych zależności.

Praca niniejsza stanowi część badań prowadzonych przez Zakład Patofizjologii Instytutu Patologii AM w Krakowie w ramach Programu Rządowego nr 6 "Zwalczanie Chorób Nowotworowych".

Dla realizacji badań będących przedmiotem niniejszej pracy zaplanowano kilka modeli doświadczalnych, których celem było ustalenie:

- występowania różnic ilościowych i jakościowych, względnie braku takich różnic w składzie nacieku z komórek odczynowych /limfocyty, granulocyty, makrofagi/ w obrębie i w otoczeniu różnych typów przeszczepialnych nowotworów w kolejnych fazach wzrostu guzów.
- stwierdzenie czy różnice w składzie nacieku komórkowego mają związek z przebiegiem procesu nowotworowego tj. szybkością wzrostu guzów.
- przeprowadzenie oceny wpływu immunosupresji przez napromieniowanie dawką 300 radów całego ciała na wzrost guzów nowotworowych, a także na skład ilościowy i jakościowy nacieku z komórek odczynowych w otoczeniu i w obrębie guza nowotworowego.

MATERIAŁ I METODY BADAN

A. Materiał:

W doświadczeniach posłużono się trzema typami przeszczepialnych nowotworów rosnących u myszy:

1. Sarcoma L_1 /Sa L_1 / - pierwotnie samoistny guz płuc u myszy szczepu Balb/c. Histologicznie jest to nisko zróżnicowany mięsak.

Nowotwór cechuje się dość szybkim wzrostem miejscowym, naciekaniem tkanek: daje przerzuty do płuc i węzłów chłonnych.

Jest oceniany jako guz o dużej immunogenności.

Pochodzenie guza: Instytut Onkologii w Warszawie.

2. Lewis Lung Carcinoma /LLC/ - jest samoistnym, nisko zróżnicowanym nowotworem nabłonkowym o szybkim miejscowym wzroście, wczesnie powodującym przerzuty w płucach i węzłach chłonnych.

Jest uważany za guz o wysokiej immunogenności.

Pochodzenie guza: Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu.

3. Mięsak metylocholanantrenowy /MCA-Sa/ - jest przeszczepialnym mięsakiem indukowanym jednorazowym podaniem metylocholanantrenu w dawce 0,1 mg podskórnie myszom szczepu C₅₇B1. Guz ten wykazuje znaczny polimorfizm komórkowy, bardzo szybki wzrost miejscowy z naciekaniem otaczających tkanek, nie tworzy jednak zazwyczaj samoistnych przerzutów.

Pochodzenie guza: Zakład Patofizjologii Instytutu Patologii w Krakowie.

Nowotwory przeszczepiano podskórnice stosując dla guza SaL₁ przeszczep zawiesiny komórek nowotworowych w liczbie $1,3 \times 10^5$, dla guza LLC przeszczep trokarem fragmentów guza o objętości $0,5 \text{ mm}^3$ tj. ok. $1,3 \times 10^6$ komórek oraz dla guza MCA-Sa przeszczep zawiesiny komórek nowotworowych w liczbie $6,4 \times 10^5$.

B. Metody badań:

1. Ocena szybkości wzrostu guzów.

Pomiary guzów dokonywano co dwa lub trzy dni. Guzy były mierzone w trzech płaszczyznach przy użyciu suwaka mikrometrycznego, następnie obliczano średnią z trzech pomiarów guzów:

2. Badanie komórek odczynowych w zawieszynie masy guza przy użyciu technik cytologicznych.

Do badań pobierano guz bez fragmentów tkanek martwiczo zmienionych wraz z niewielkim marginesem otaczającej tkanki, następnie rozdrabniano mechanicznie i poddawano działaniu trypsyny /trypsyna firmy Difco 1:250 w płynie Hanksa, temperatura 37°C /.

Czas trypsynowania dobierano oddzielnie dla każdego rodzaju guza. Optymalnie wynosił dla guzów SaL₁ 35-40 minut, dla guza LLC 5-7 minut, a dla guza MCA-Sa 20 minut. Uzyskaną zawiesinę komórek przepłukiwano dwukrotnie ochłodzonym płynem Hanksa.

Dla uzyskania zawiesiny z małych guzów /średnica 2 do 6 milimetrów/ pulowano materiał tkankowy z kilku guzów, natomiast w guzach o większych rozmiarach /powyżej 8 milimetrów średnicy/ trypsynowano oddzielnie tkankę każdego guza. Z uzyskanej w ten sposób zawiesiny sporządzano po 8 preparatów cytologicznych przy użyciu techniki filtrów Milliporea /Millipore Filter Type AA-0,8 μm i HA-0,45 μm /. Preparaty kontrolne barwiono hematoksyliną i eozyną oraz metodą Giemsy.

W preparatach cytologicznych oceniano:

- a/ proporcję komórek nacieku odczynowego do komórek nowotworowych, licząc w każdym preparacie 4 x 500 komórek. Wyniki przedstawiono jako odsetek komórek odczynowych w zawiesinie.
- b/ skład nacieku z komórek odczynowych licząc w każdym preparacie 4 x 500 komórek odczynowych, które różnicowano na podstawie cech morfologicznych /komórki limfoidalne, granulocyty, mono-makrofagi/, następnie obliczano średnią dla każdego preparatu. Wyniki przedstawiano w postaci odsetka poszczególnych komórek odczynowych.

3. Frakcjonowanie zawiesiny komórkowej.

Frakcjonowanie zawiesiny komórkowej przeprowadzano w części doświadczeń /doświadczenia I i III/ dla uzyskania czystych frakcji lub frakcji wzbogaconych w komórki odczynowe.

Rozdział zawiesiny komórek przeprowadzono stosując metodę frakcjonowania w jednofazowym roztworze ficoll-uropolina o gęstości 1,077 oraz rozdział w gradiencie skokowym ficoll-uropolina o kolejnych stężeniach, gdzie najniższą warstwę

stanowił roztwór o gęstości 1,077 /100%/ a dwie kolejne warstwy uzyskano przez rozcieńczenie solą fizjologiczną w stosunku 1:1 /50%/ i 1:3 /25%/. Zawiesinę komórek ostrożnie nakładano na roztwór ficoll-uropolina i wirowano przez 35 minut przy 400 g, 200 g, 100 g i 50 g.

Przeprowadzone doświadczenia nie pozwoliły na uzyskanie czystych frakcji komórkowych a tylko na otrzymanie frakcji wzbogaconych w populację komórek odczynowych. Najefektywniejszym sposobem okazało się wirowanie przy 50 g na gradiencie skokowym dla badanej zawiesiny komórkowej, ponieważ pozwoliło na dwukrotne wzbogacenie frakcji w komórki odczynowe. Ten sposób rozdzielania zawiesiny komórkowej stosowano w dalszych badaniach.

4. Test cytotoksyczny.

Test ten przeprowadzono dla oceny zawartości limfocytów T w zawieszynie komórkowej. Dla jego wykonania przygotowano następujące materiały:

- zawiesina komórkowa z tkanki guza frakcjonowana w gradiencie skokowym ficoll-uropolina przy 50 g, w czasie 35 minut.
- monoklonalna surowica antytymocytarna /Monoclonal Anti-Mouse Thy 1,2 produkcji Miles Laboratories LTD/.
- dopełniacz króliczy preadsorbowany każdorazowo komórkami /homogenatem/ śledzionowymi myszy szczepu na których był wykonywany test.

Wykonanie:

2×10^6 komórek uzyskanych drogą frakcjonowania zawieszano w 0,5 ml MEM /podłoże Eaglea/ i inkubowano z surowicą antytymocytarną o ostatecznym rozcieńczeniu 1:2000 przez 45 minut

w temperaturze 37°C. Po zakończonej inkubacji próbkę delikatnie mieszano, pobierano kroplę na szkiełko podstawowe, przykrywano szkiełkiem nakrywkowym i liczone w każdym preparacie 200 do 300 komórek o cechach limfocyta posługując się mikroskopem kontrastowo-fazowym. Wyniki przedstawiono w postaci odsetka martwych limfocytów.

Jako układy kontrolne stosowano:

a/komórki zawieszono w MEM, inkubowane przez 60 minut w temp. 37°C,

b/komórki zawieszano w MEM, inkubowane z surowicą cytotoksyczną o mianie 1:2000 przez 60 minut w temp. 37°C,

c/komórki zawieszono w MEM, inkubowane z dodatkiem dopełniacza w rozcieńczeniu 1:16 przez 30 minut w temperaturze 37°C.

5. Napromienienia myszy dokonano przy pomocy Gammatronu 3 /Siemens FGR/ dawką 300 radów na całe ciało w warunkach standardowych /źródło ^{60}Co / w Instytucie Onkologii w Krakowie.

6. Ocena histologiczna.

Do badań histologicznych pobierano guz z otaczającymi tkankami oraz węzły chłonne znajdujące się w pobliżu guza /pachowe i pachwinowe/. Pobrany materiał utrwalano w 8% zbuforowanej formalinie i następnie barwiono rutynowo hematoxyliną i eozyną. W ocenie histologicznej uwzględniano obfitość i skład nacieku z komórek odczynowych w obrębie guza i w tkankach otaczających oraz rozległość martwicy.

7. Ocena hematologiczna.

Do badań hematologicznych tj. oceny liczby krwinek białych

w krwi obwodowej pobierano materiał z ogona badanej myszy. Krew pobierano do mieszalnika dopełniano płynem Turka, delikatnie mieszano i liczono następnie liczbę krwinek białych rutynowo w komorze Bürkera.

8. Metody oceny matematycznej.

Analizy uzyskanych wyników dokonano przy użyciu testu t-Studenta.

DOŚWIADCZENIE I

Zawiera dwie grupy doświadczalne:

1. Celem pierwszego doświadczenia jest przeprowadzenie oceny szybkości wzrostu guza SaL₁, różnic w liczbie komórek odczynowych w trakcie rozwoju guza i ocenę składu nacieku z komórek odczynowych, w tym także limfocytów T w obrębie guza.
2. Celem drugiego doświadczenia jest przeprowadzenie oceny wpływu immunosupresji przez napromienienie gospodarza guza SaL₁ przed przeszczepem guza na tempo wzrostu guza, ocenę różnic w liczbie komórek odczynowych oraz w składzie nacieku z komórek odczynowych w trakcie rozwoju guza.

Wykonanie:

Do badań użyto 74 myszy szczepu Balb/c. Zwierzęta podzielono na dwie grupy:

1 grupa 21 myszy, którym przeszczepiono guz SaL₁ przez podskórne wprowadzenie zawiesiny komórek guza - $1,3 \times 10^5$
/żywołność 85-90%/.

2 grupa 53 myszy szczepu Balb/c została napromieniona dawką 300 radów /źródło ^{60}Co / na całe ciało w warunkach standardowych.

Następnego dnia dokonano przeszczepu guza SaL₁ wprowadzając podskórnie zawiesinę $1,3 \times 10^5$ komórek guza /żywotność 85-90%/.

W obu grupach doświadczalnych przeprowadzono następujące badania:

- ocenę szybkości wzrostu guza /Tab.1, Wykres 1/,
- ocenę cytologiczną zawiesiny komórkowej z tkanki guza dla określenia liczby i składu jakościowego komórek odczynowych przy użyciu techniki Milliporea /Tab.2,3, Ryc.1,2,3,4/,
- test cytotoksyczny dla oceny liczby limfocytów T w zawieszynie komórek guza /tylko w grupie myszy bez napromienienia/ /Tab.4/,
- histologiczną ocenę preparatów z tkanek guza,
- ocenę hematologiczną liczby krwinek białych w krwi obwodowej /Tab.5, Wykres 2/.

Tabela 1.

Porównanie szybkości wzrostu guzów przeszczepialnych SaL₁ w grupie myszy obciążonych guzem i w grupie myszy uprzednio napromienionych, a następnie obciążonych guzem SaL₁.

dzień pomiaru	średnica guzów w mm		
	SaL ₁ /gr.I/	SaL ₁ 300 r /gr.II/	p
7	0,44 ± 0,52	0,25 ± 0,46	ns
9	1,10 ± 2,26	0,75 ± 1,03	ns
12	3,50 ± 3,96	6,30 ± 2,14	ns
15	6,40 ± 5,36	7,50 ± 2,80	ns
18	7,80 ± 5,24	10,01 ± 3,67	ns

Wyniki:

W obu grupach doświadczalnych uzyskano wzrost guza u wszystkich zwierząt. Szybkość wzrostu guzów w grupie myszy jedynie obciążonych nowotworem w porównaniu do grupy myszy obciążonych guzem i uprzednio napromienionych jest w okresie początkowym zbliżona /od 7 do 9 dnia pomiaru/, w następnych dniach zaznacza się wyraźna tendencja do przyśpieszenia tempa wzrostu guza w grupie myszy, które były uprzednio napromienione /od 12 do 18 dnia pomiaru/.

Wykres 1.

Porównanie szybkości wzrostu guza SaL₁ w grupie myszy obciążonych tym guzem i u myszy napromienionych, a następnie obciążonych guzem.

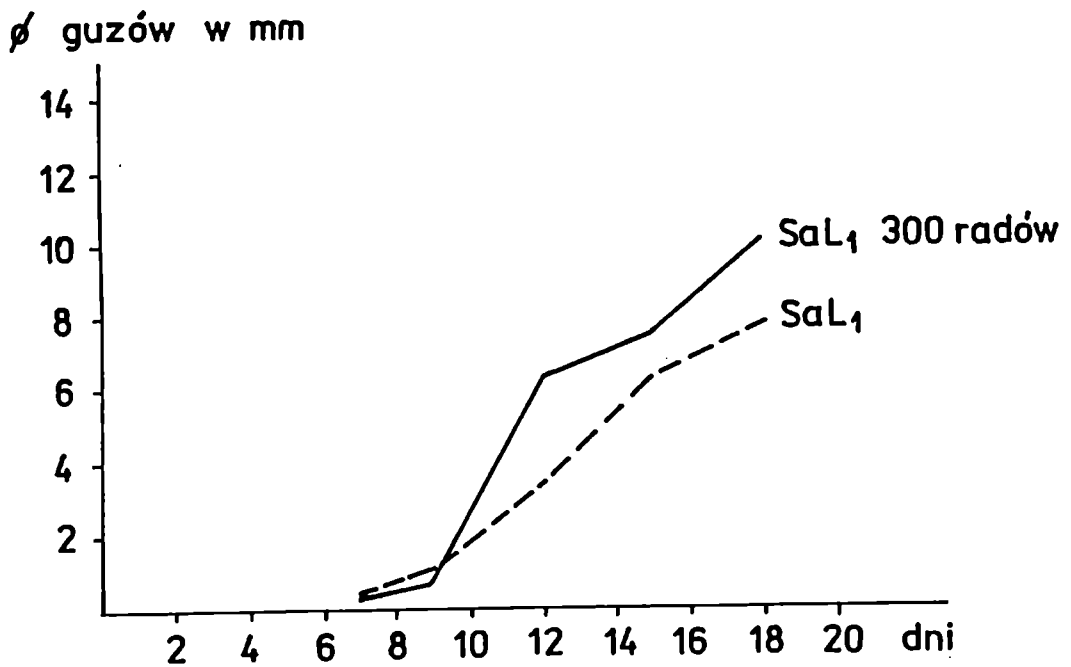


Tabela 2.

Odsetek komórek odczynowych w guzach SaL₁ w grupie myszy obciążonych guzem i w grupie myszy uprzednio napromienionych, a następnie obciążonych guzem SaL₁.

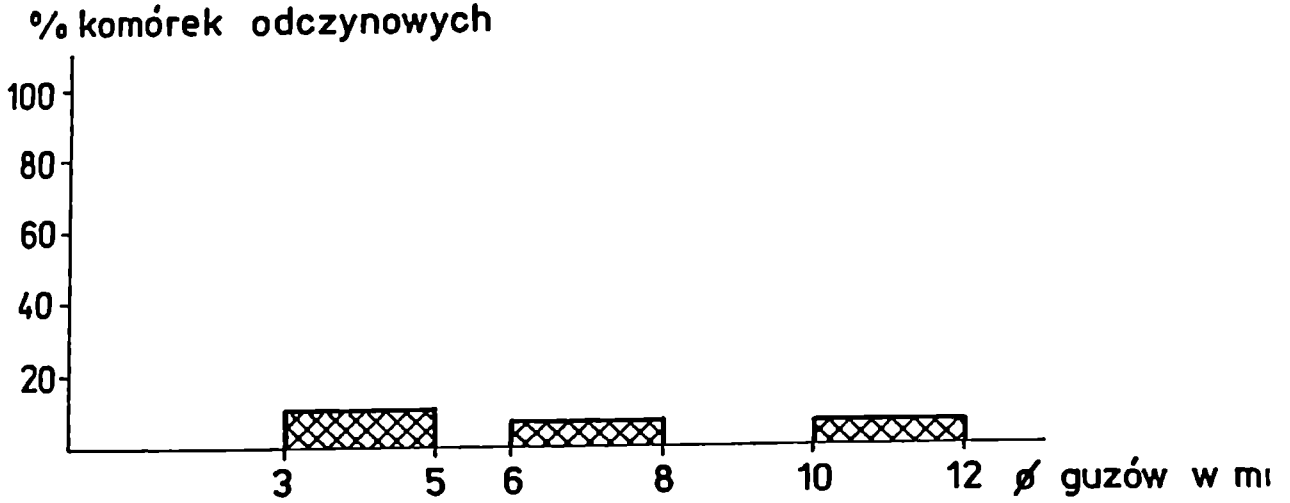
grupa	średnica guzów w mm		
	3-5	6-8	10-12
SaL ₁ /I/	10,00 ± 1,68	6,50 ± 2,55	6,40 ± 1,90
SaL ₁ 300r /II/	10,43 ± 1,06	33,46 ± 13,4	12,03 ± 2,47
p	p < 0,9	p < 0,001	p < 0,001

Wyniki:

W guzach o niewielkich rozmiarach tj. o średnicy 3-5 mm odsetek komórek odczynowych u myszy obciążonych guzem i w grupie myszy uprzednio napromienionych zachowuje się podobnie. W guzach o średnicy 6-8 mm w grupie myszy napromienionych odsetek komórek odczynowych szybko znamienne rośnie przy czym tendencja ta utrzymuje się również w guzach o średnicy 10-12 mm, jednakże w mniejszym stopniu.

Rycina 1.

Odsetek komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza SaL₁.



Rycina 2.

Odsetek komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza SaL₁ u myszy uprzednio napromienionych.

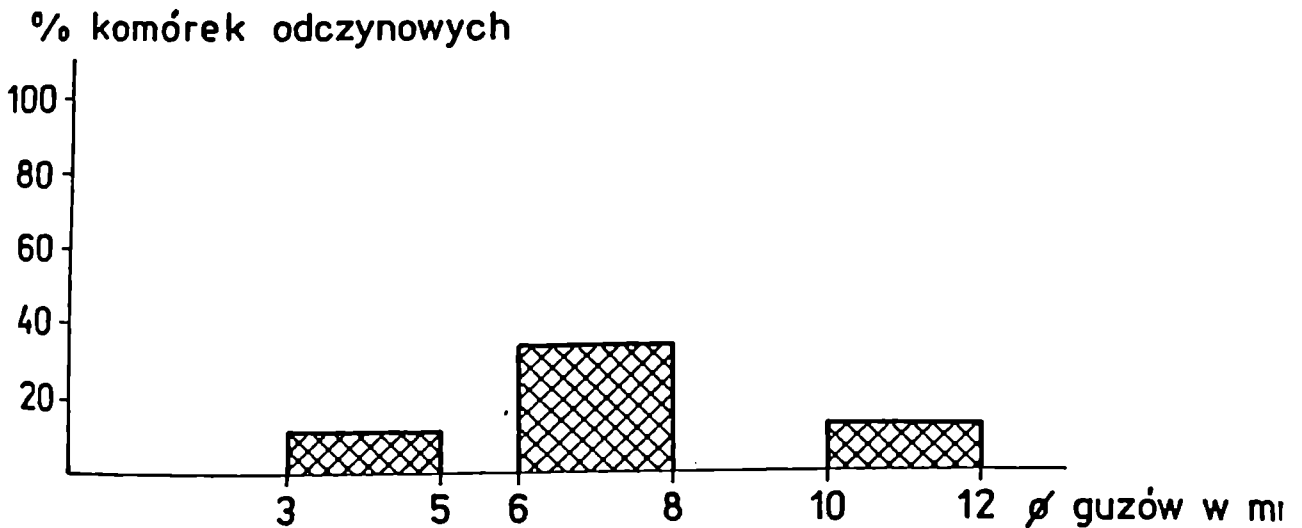


Tabela 3.

Skład jakościowy nacieków z komórek odczynowych u myszy obciążonych guzem SaL₁/I/ i w grupie myszy uprzednio napromienionych i obciążonych guzem SaL₁/II/.

Skład nacieku	grupa	średnica guzów w mm		
		3-5	6-8	10-12
Komórki limfoidalne	SaL ₁	65,71 ± 5,60	76,80 ± 2,30	84,70 ± 11,50
	SaL ₁ 300 r	23,50 ± 11,00	96,50 ± 2,60	56,70 ± 12,70
granulocyty	SaL ₁	28,60 ± 5,70	20,50 ± 3,80	14,10 ± 10,40
	SaL ₁ 300 r	74,50 ± 11,90	2,85 ± 2,70	42,30 ± 12,70
makrofagi	SaL ₁	5,60 ± 2,60	3,00 ± 3,40	1,10 ± 2,00
	SaL ₁ 300 r	1,90 ± 2,10	0,60 ± 0,80	0,90 ± 0,90
p		p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Wyniki:

Grupa I: Analiza nacieku w grupie myszy obciążonych guzem SaL₁ wykazała, iż przeważającą część nacieku stanowią komórki limfoidalne, których odsetek zwiększa się w miarę wzrostu guza. Drugą co do liczebności pulę komórek odczynowych stanowią granulocyty, których odsetek zmniejsza się

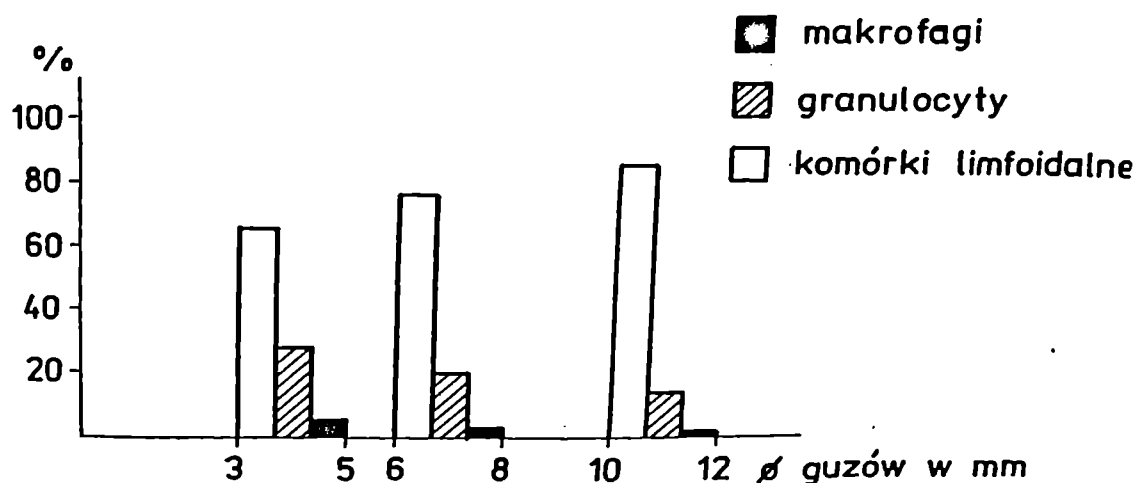
w kolejnych fazach wzrostu guza! Najmniej liczne są makrofagi, odsetek tych komórek maleje w miarę wzrostu guza.

Grupa II. Napromienienie myszy dawką 300 radów powoduje szereg zasadniczych zmian w składzie nacieku, a mianowicie wzrasta liczba granulocytów w guzach wczesnego i późnego okresu, natomiast w guzach o średnicy 6-8 mm stwierdzono gwałtowny, przejściowy spadek liczby granulocytów. Liczba komórek limfoidalnych w nacieku wczesnego okresu jest wyraźnie niższa niż w grupie I, w guzach średnich obserwuje się szybki wzrost w porównaniu z grupą I, ale w guzach dużych /10-12 mm/ liczba komórek limfoidalnych jest znacznie niższa.

Napromienienie powoduje zmniejszenie liczby makrofagów w nacieku odczynowym w okresie całej obserwacji wzrostu guza.

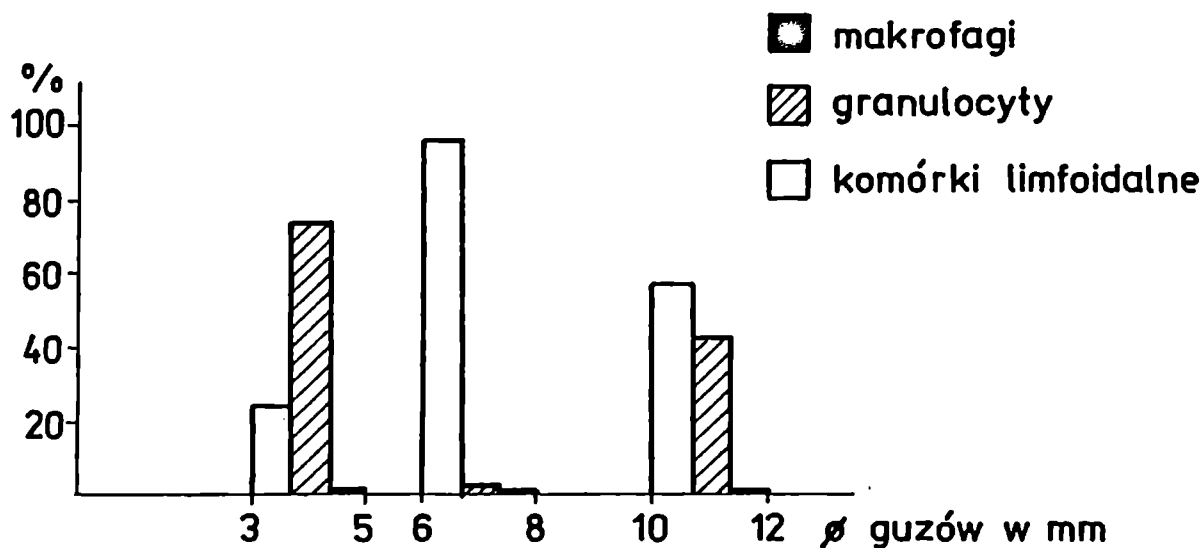
Rycina 3.

Skład nacieku z komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza SaL₁.



Rycina 4.

Skład nacieku z komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza SaL₁ u myszy uprzednio napromienionych.



Test cytotoksyczny.

Tabela 4 przedstawia wyniki testu cytotoksycznego w postaci odsetka limfocytów T w nacieku z komórek odczynowych u myszy obciążonych guzem SaL₁.

Tabela 4.

	Średnica guzów w mm		
SaL ₁	4	8	11
	53,5	29,0	74,5

Wyniki:

Z powyższych danych wynika, iż udział procentowy limfocytów

T jest różny w składzie nacieku, a mianowicie: w guzach o średnicy 4 mm odsetek limfocytów T wynosił 53,5%, w guzach o średnicy 8-9 mm odsetek ten zmniejszał się do 29%, a w guzach dużych o średnicy 11 mm ponownie wzrastał do 74,5%.

Techniczne warunki wykonania testu przedstawiono w części "Materiał i metody badań" na stronie 8 .

Badania kontrolne histologiczne.

W materiale pobranym od myszy obciążonych guzem SaL₁ stwierdzono naciekający wzrost wszystkich guzów. W utkanie guza oraz w strefie inwazji guza w tkanki otaczające widoczne są nacieki z komórek odczynowych złożone głównie z granulocytów, limfocytów oraz mniej licznych makrofagów. W otoczeniu guza widoczny jest odczyn fibroblastyczny i angioplazja. Pojedyncze ogniska martwicy pojawiają się już we wczesnym okresie wzrostu guzów. W obrębie samego guza stwierdza się w świetle naczyń krwionośnych, a również w ich otoczeniu nagromadzenie leukocytów.

W grupie myszy obciążonych guzem i uprzednio napromienionych stwierdza się w obrazie histologicznym w początkowym okresie wzrostu guzów obfite nacieki złożone głównie z granulocytów i makrofagów, a w znacznie mniejszym stopniu skupienia limfocytów. W guzach o dużych rozmiarach widoczne są nacieki mieszane złożone z granulocytów wraz z obfitymi skupieniami limfocytów, plazmocytów i makrofagów.

Badanie hematologiczne liczby krwinek białych w krwi obwodowej.

Tabela 5.

Liczba krwinek białych w krwi obwodowej u myszy obciążonych guzem SaL₁ i w grupie myszy napromienionych, a następnie obciążonych guzem SaL₁.

W tabeli podano wartości średnie, $\times 10^3/\text{mm}^3$

dzień pomiaru	SaL ₁ gr.I	SaL ₁ 300 r gr.II
1	12,8 ± 3,0	13,4 ± 1,9
3	14,3 ± 5,2	2,9 ± 0,2
10	12,9 ± 3,5	8,0 ± 2,2
20	16,4 ± 3,4	8,1 ± 3,2

Wyniki:

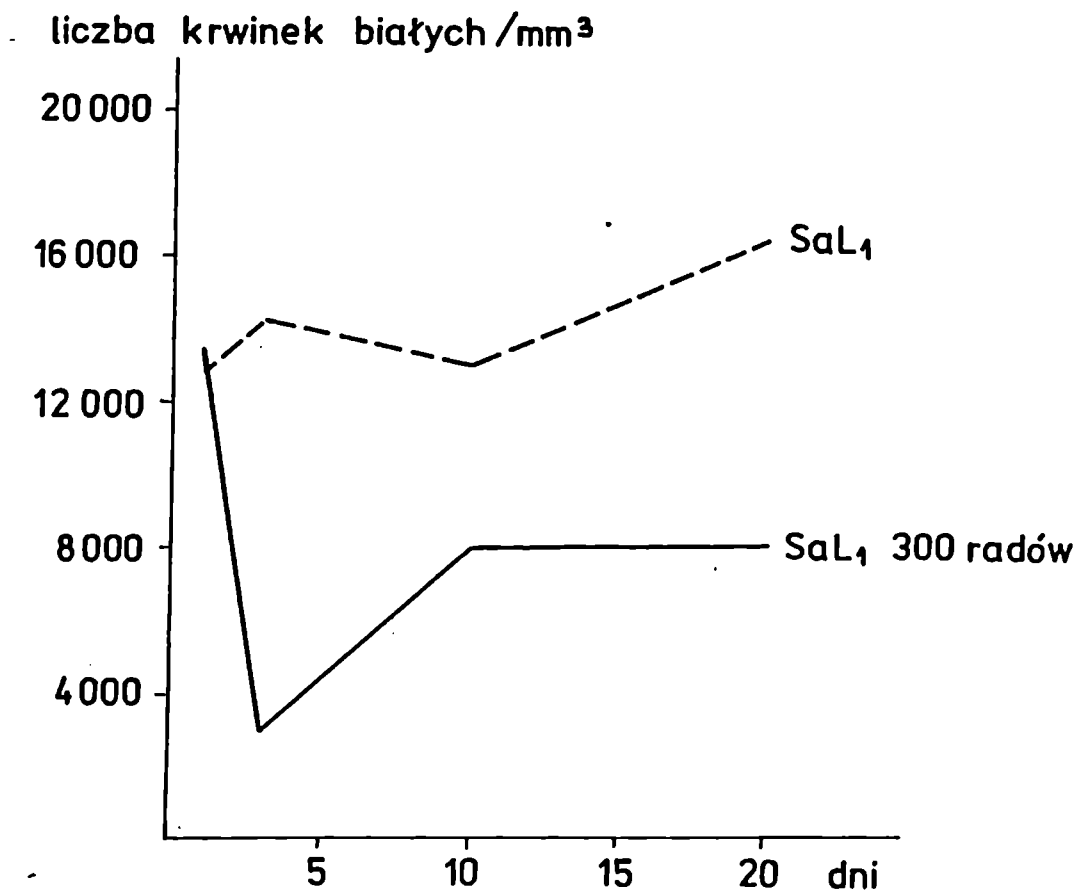
Stwierdzono, iż uprzednie napromienienie myszy obciążonych guzem SaL₁ spowodowało znaczny spadek liczby krwinek białych w krwi obwodowej.

Zmniejszenie liczby krwinek białych krwi obwodowej utrzymywało się od 3 do 20 dnia obserwacji.

Przed rozpoczęciem doświadczeń dokonano oceny liczby krwinek białych w krwi obwodowej u myszy zdrowych. Liczba leukocytów wynosiła od 12 800 do 13 400/ mm^3 .

Wykres 2.

Liczba krwinek białych krwi obwodowej w grupie zwierząt obciążonych guzem SaL₁ i w grupie myszy napromienionych, a następnie obciążonych guzem SaL₁.



DOŚWIADCZENIE II

Zawiera dwie grupy doświadczalne:

1. Celem pierwszego doświadczenia jest przeprowadzenie oceny szybkości wzrostu guza LLC, różnic w liczbie komórek odczynowych w trakcie rozwoju guza i ocenę składu nacieku z komórek odczynowych.
2. Celem drugiego doświadczenia jest przeprowadzenie oceny wpływu immunosupresji przez napromienienie gospodarza guza, przed przeszczepem guza LLC na szybkość wzrostu guza, odsetek komórek odczynowych w trakcie rozwoju guza i ocenę składu nacieku z komórek odczynowych.

Wykonanie:

Do badań użyto 60 myszy szczepu C₅₇B1, wiek myszy 12-16 tygodni.

Zwierzęta podzielono na dwie grupy.

1 grupa o liczebności 20 myszy szczepu C₅₇B1, którym przeszczepiono guza LLC przez podskórne wprowadzenie trokarem fragmentów guza o objętości 0,5 mm³ co odpowiada ok. 1,3 X 10⁶ komórek.

2 grupa 40 myszy szczepu C₅₇B1 została napromieniona dawką 300 radów na całe ciało w warunkach standardowych. Następnego dnia dokonano podskórnego przeszczepu guza LLC/przy pomocy trokaru, objętość przeszczepionych fragmentów guza 0,5 mm³ co odpowiada ok. 1,3 x 10⁶ komórek.

W obu grupach doświadczalnych przeprowadzono następujące badania:

- ocenę szybkości wzrostu guzów /Tab.6, Wykres 3/,
- ocenę cytologiczną zawiesiny komórkowej z tkanki guza dla określenia liczby i składu jakościowego komórek odczynowych przy użyciu techniki Milliporea /Tab.7,8, Ryc.5,6,7,8/,
- histologiczną ocenę preparatów z tkanek guza,
- ocenę hematologiczną liczby krwinek białych w krwi obwodowej /Tab.9, Wykres 4/.

Tabela 6.

Porównanie szybkości wzrostu guzów przeszczepialnych LLC u myszy obciążonych nowotworem i w grupie myszy uprzednio napromienionych i następnie obciążonych guzem LLC.

dzień pomiaru	średnica guzów w mm		
	LLC/gr.I/	LLC 300r /gr.II/	p
7	1,15 ± 1,2	2,66 ± 1,96	ns
9	-	-	-
12	3,42 ± 3,15	3,36 ± 3,76	ns
15	6,35 ± 3,61	7,3 ± 2,88	ns
18	10,71 ± 5,1	14,18 ± 2,04	ns

Wyniki:

W obu modelach doświadczalnych uzyskano wzrost guza u wszystkich zwierząt. W grupie zwierząt obciążonych gu-

zem i uprzednio napromienionych obserwuje się wyraźną tendencję do przyśpieszenia tempa wzrostu guza, szczególnie w końcowym okresie obserwacji tj. od 15 dnia.

Stopień przyśpieszenia tempa wzrostu guza LLC u gospodarza uprzednio napromienionego odpowiada w przybliżeniu przyśpieszeniu tempa wzrostu guza SaL₁ w doświadczeniu I.

Wykres 3.

Porównanie szybkości wzrostu guza LLC w grupie myszy obciążonych tym guzem i u myszy napromienionych, a następnie obciążonych guzem.

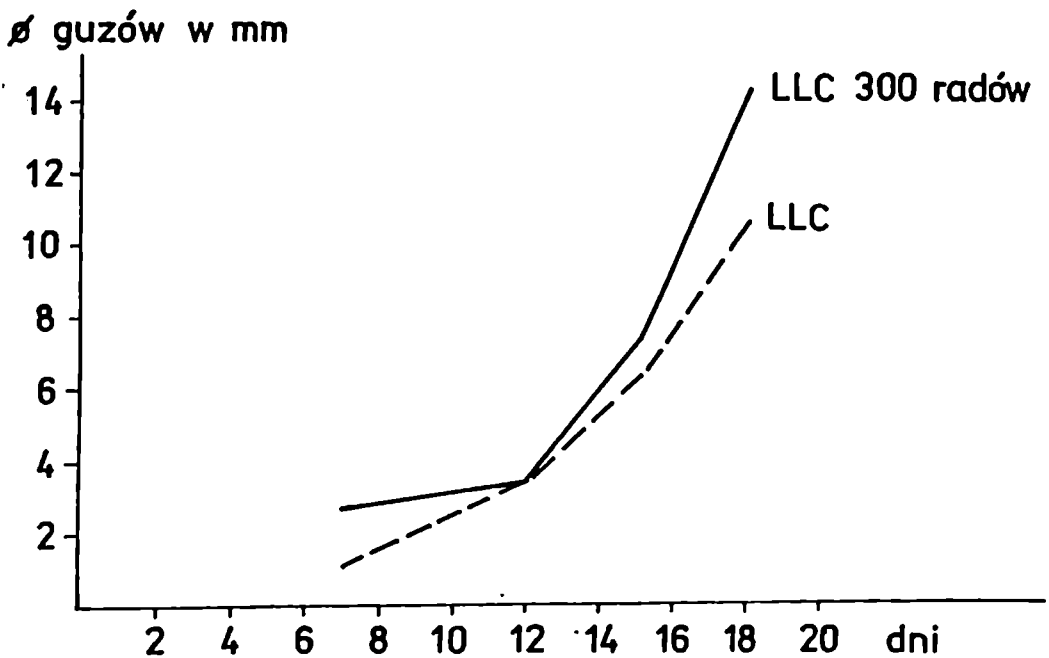


Tabela 7.

Odsetek komórek odczynowych w guzach LLC w grupie myszy obciążonych guzem i w grupie myszy uprzednio napromienionych, a następnie obciążonych guzem LLC.

grupa	średnica guzów w mm		
	3-5	6-8	10-12
LLC /gr.I/	8,10 ± 1,94	5,60 ± 0,92	5,20 ± 2,27
LLC 300 radów /gr.II/	16,52 ± 5,36	9,95 ± 0,99	13,42 ± 7,01
p	p < 0,02	p < 0,001	p < 0,05

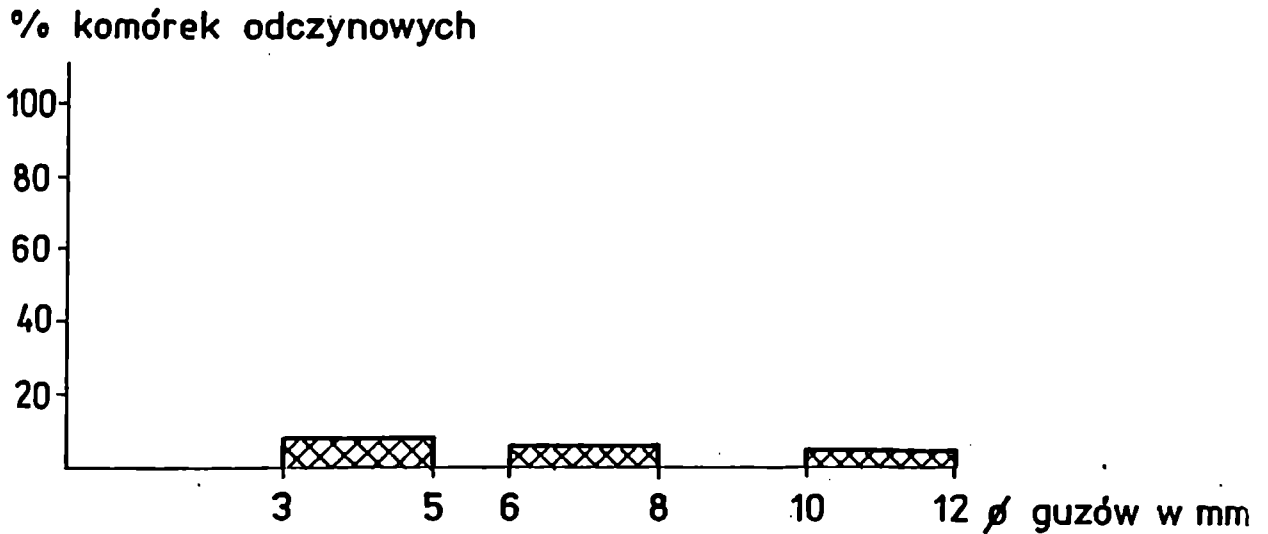
Wyniki:

W grupie zwierząt obciążonych guzem odsetek komórek odczynowych, który stanowi w małych guzach tj. o średnicy 3-5 mm ok.8% w kolejnych fazach wzrostu guza ulega obniżeniu do ok.5%, podobnie jak w grupie myszy obciążonych guzem SaL₁ w doświadczeniu I.

U zwierząt obciążonych guzem i uprzednio napromienionych odsetek komórek odczynowych jest wyższy niż w grupie I i wynosi 16% w guzach małych, wyższy odsetek komórek odczynowych występuje w guzach średnich i dużych podobnie jak to miało miejsce w doświadczeniu I.

Rycina 5.

Odsetek komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza LLC.



Rycina 6.

Odsetek komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza LLC u myszy uprzednio napromienionych.

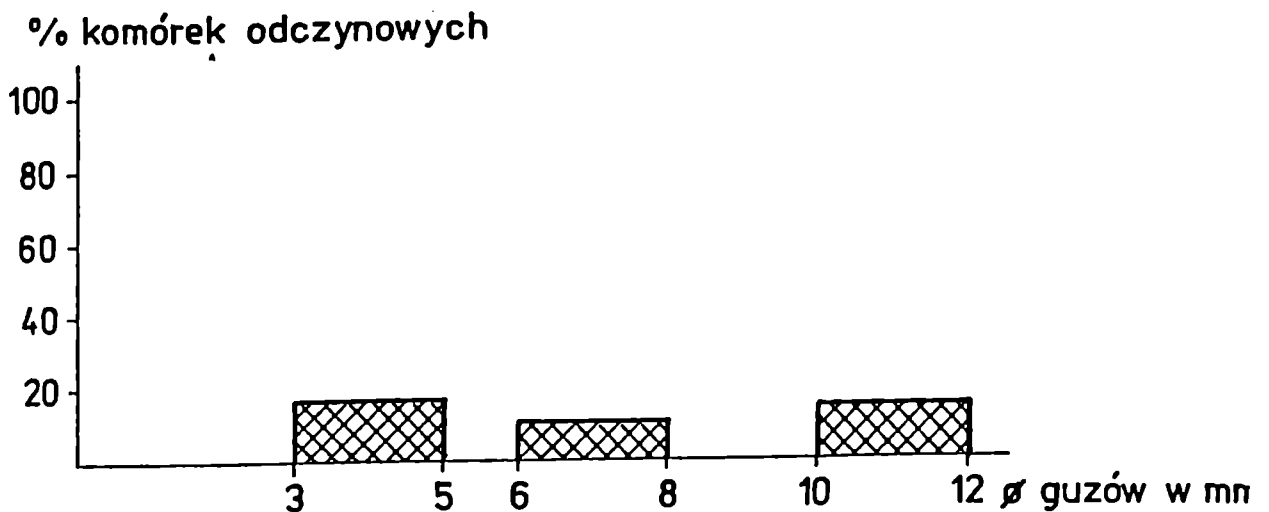


Tabela 8.

Skład jakościowy nacieku z komórek odczynowych u myszy obciążonych guzem LLC /gr.I/ i w grupie myszy uprzednio napromienionych, a następnie obciążonych guzem LLC /gr.II/.

skład nacieku	grupa	średnica guzów w mm		
		3-5	6-8	10-12
komórki limfoidalne	LLC	13,70 ± 2,80	16,20 ± 8,00	14,00 ± 4,40
	LLC 300 radów	24,90 ± 11,60	31,65 ± 9,90	48,60 ± 10,60
granulocyty	LLC	81,00 ± 4,10	78,60 ± 8,60	79,20 ± 5,30
	LLC 300 radów	73,90 ± 10,70	67,70 ± 9,60	50,70 ± 10,50
makrofagi	LLC	5,20 ± 2,80	5,10 ± 2,20	6,30 ± 2,80
	LLC 300 radów	0,60 ± 0,80	0,90 ± 1,80	0,60 ± 1,30
P		p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Wyniki:

Grupa I. Najliczniejszą grupę komórek w składzie nacieku w guzie LLC stanowią granulocyty, ich liczba pozostaje w zasadzie podobna w okresie całej obserwacji wzrostu guza.

Komórki limfoidalne stanowią niewielki odsetek tj. 14-16% składu nacieku odczynowego w okresie wzrostu guza.

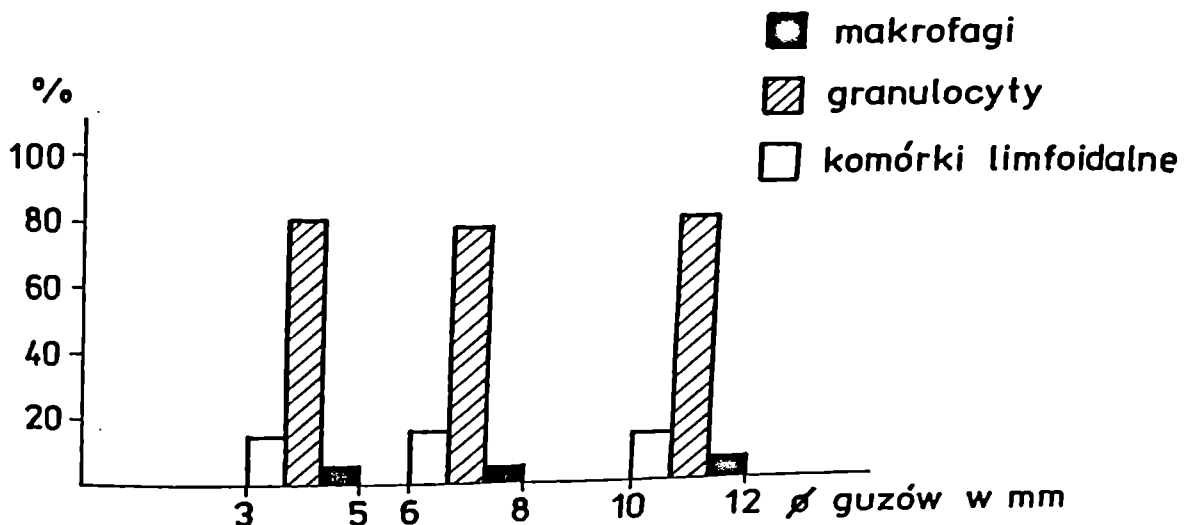
Najmniej liczne są makrofagi, stanowiące 5-6% komórek odczynowych we wszystkich fazach wzrostu guza.

Grupa II. Pod wpływem napromienienia dochodzi do zmniejszenia się liczby granulocytów w nacieku odczynowym, zjawisko to nasila się w kolejnych fazach wzrostu guza.

Liczba komórek limfoidalnych po napromienieniu myszy wyraźnie zwiększa się w nacieku odczynowym i stale wzrasta w miarę powiększania się wymiarów guza. Napromienienie powoduje wyraźny spadek liczby makrofagów zawartych w nacieku odczynowym, zjawisko to występuje w ciągu całej obserwacji wzrostu guza, podobnie jak miało to miejsce w doświadczeniu I.

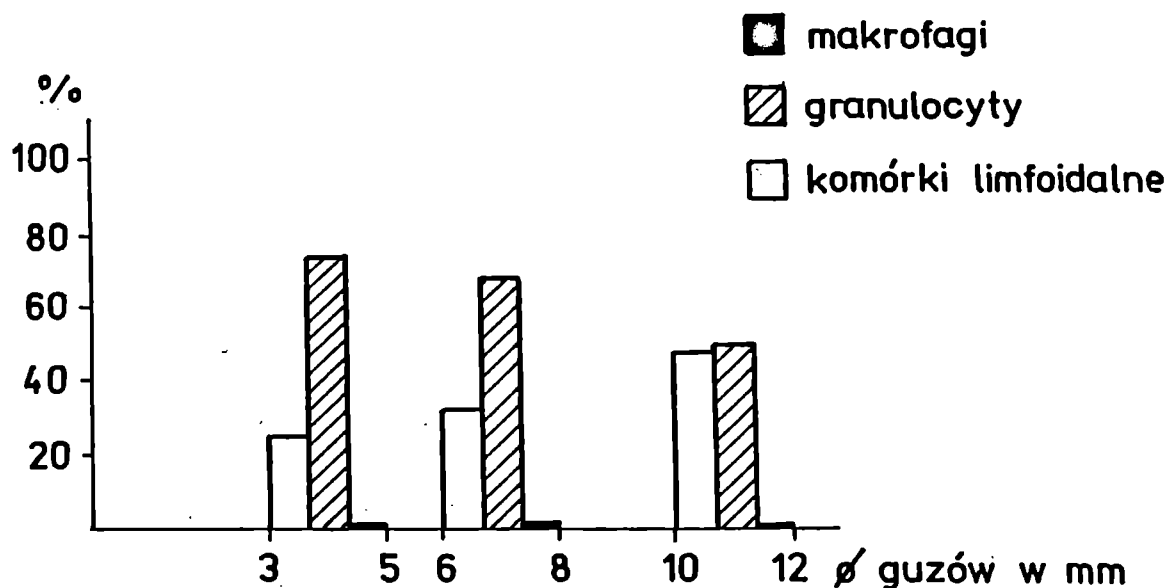
Rycina 7.

Skład nacieku z komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza LLC.



Rycina 8.

Skład nacieku z komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza LLC u myszy uprzednio napromienionych.



Badanie kontrolne histologiczne.

Obszarom inwazji guza do otaczających tkanek towarzyszą obfite nacieki z komórek odczynowych a także tworzenie się ziarniny z fibroplazją.

Wraz z pojawieniem się większych obszarów martwicy w obrębie guza, w naciekach okołoguzowych przeważają granulocyty. Martwica utkania guzów pojawia się wcześniej, już w guzach o średnicy 5 do 6 milimetrów.

W grupie myszy obciążonych guzem i uprzednio napromienionych stwierdza się w guzach małych nacieki komórkowe złożone głównie z granulocytów, zaś na obwodzie guza w mniejszym stopniu widoczne są komórki limfoidalne.

W miarę wzrostu guza na obwodzie nacieki z komórek odczynowych mającymi charakter odczynu granulo-histo-limfocytarnego.

Badanie hematologiczne liczby krwinek białych w krwi obwodowej.

Tabela 9.

Liczba krwinek białych w krwi obwodowej u myszy obciążonych guzem LLC i w grupie myszy napromienionych, a następnie obciążonych guzem LLC.

W tabeli przedstawiono wartości średnie, $\times 10^3/\text{mm}^3$.

dzień pomiaru	LLC ₁ gr.I	LLC ₁ 300 radów gr.II
1	11,5 ± 2,8	11,3 ± 2,2
3	8,9 ± 2,1	1,7 ± 0,4
10	18,8 ± 3,7	11,2 ± 2,2
20	22,7 ± 7,8	18,8 ± 6,3

Wyniki:

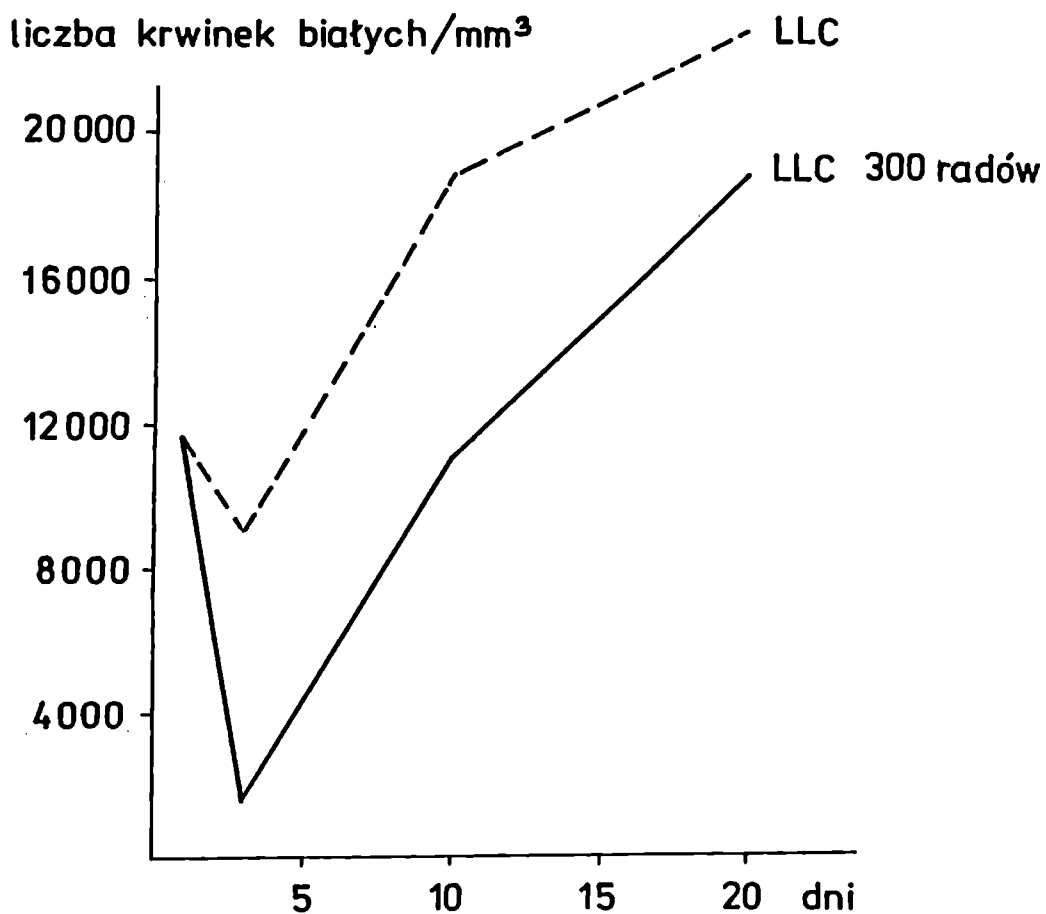
Napromienienie gospodarza guza LLC powodowało obniżenie liczby krwinek białych krwi obwodowej.

Zmniejszenie liczby krwinek białych było szczególnie gwałtowne w 3 dniu obserwacji i utrzymywało się, jakkolwiek w mniejszym stopniu w ciągu całej obserwacji.

Przed rozpoczęciem doświadczeń liczba krwinek białych krwi obwodowej wynosiła ok. 12 000/mm³.

Wykres 4.

Liczba krwinek białych krwi obwodowej w grupie zwierząt obciążonych guzem LLC i w grupie myszy napromienionych, a następnie obciążonych guzem LLC.



DOŚWIADCZENIE III

Zawiera dwie grupy doświadczalne:

1. Celem pierwszego doświadczenia jest przeprowadzenie oceny szybkości wzrostu guza MCA-Sa, różnic w liczbie komórek odczynowych w trakcie rozwoju guza i ocenę składu nacieku z komórek odczynowych, w tym także limfocytów T w obrębie guza.
2. Celem drugiego doświadczenia jest przeprowadzenie oceny wpływu immunosupresji przez napromienienie gospodarza guza MCA-Sa przed przeszczepem guza na tempo wzrostu guza, ocenę różnic w liczbie komórek odczynowych oraz różnic w składzie nacieku z komórek odczynowych w trakcie rozwoju guza.

Wykonanie:

Do badań użyto 83 myszy szczepu C₅₇Bl w wieku 10-12 tygodni. Zwierzęta podzielono na dwie grupy.

1 grupa o liczebności 23 myszy, którym przeszczepiono guz MCA-Sa wprowadzając podskórnie zawiesinę komórek nowotworu, $6,4 \times 10^5$ /żywołność komórek 80-85%/.

2 grupa o liczebności 60 myszy szczepu C₅₇Bl została napromieniona dawką 30 radów /źródło ⁶⁰Co/ na całe ciało w warunkach standardowych.

Następnego dnia dokonano przeszczepu guza MCA-Sa wprowadzając podskórnie zawiesinę $6,4 \times 10^5$ komórek nowotworu

/żywołność komórek 80-85%/.

W obu grupach doświadczalnych przeprowadzono następujące badania:

- ocenę szybkości wzrostu guza /Tab.10, Wykres 5/,
- ocenę cytologiczną zawiesiny komórkowej z tkanki guza dla określenia liczby i składu jakościowego komórek odczynowych przy użyciu techniki Milliporea /Tab.11,12, Ryc.9,10,11,12/,
- test cytotoksyczny dla oceny liczby limfocytów T w zawieszynie komórek guza /tylko w grupie myszy bez napromienienia/ /Tab.13/,
- histologiczną ocenę preparatów z tkanek guza,
- ocenę hematologiczną liczby krwinek białych krwi obwodowej /Tab.14, Wykres 6/.

Tabela 10.

Porównanie wzrostu guzów MCA-Sa w grupie myszy obciążonych guzem i w grupie myszy uprzednio napromienionych, a następnie obciążonych guzem MCA-Sa.

dzień pomiaru	średnica guzów w mm		
	MCA-Sa /gr.I/	MCA-Sa 300 r./gr.II/	p
7	2,25 ± 1,11	2,10± 1,17	ns
9	3,8 ± 1,41	3,10± 1,44	ns
12	8,17 ± 1,73	8,03± 2,52	ns
15	11,43 ± 0,98	11,30± 2,22	ns
18	12,50 ± 0,90	14,20± 2,22	ns

Wyniki:

W obu grupach doświadczeń uzyskano wzrost guza u wszystkich zwierząt.

Analiza szybkości wzrostu guza w grupie I tj. zwierząt obciążonych MCA-Sa i w grupie II tj. myszy obciążonych guzem i uprzednio napromienionych nie wykazała tak znaczących różnic, jakie obserwowano w doświadczeniach I i II.

Wykres 5.

Porównanie szybkości wzrostu guza MCA-Sa w grupie myszy obciążonych tym guzem i u myszy napromienionych, a następnie obciążonych guzem.

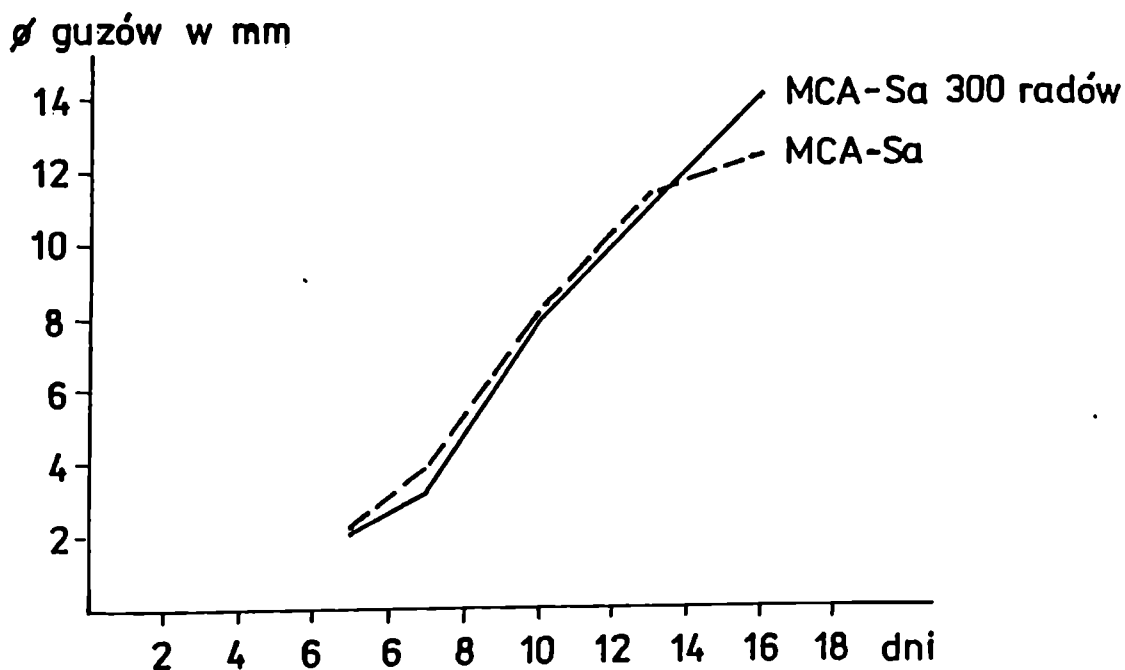


Tabela 11.

Odsetek komórek odczynowych w guzach MCA-Sa w grupie myszy obciążonych guzem i w grupie myszy uprzednio napromienionych, a następnie obciążonych guzem MCA-Sa.

grupa	średnica guzów w mm		
	3-5	6-8	10-12
MCA-Sa /gr.I/	23,4 ± 1,23	17,6 ± 1,42	14,9 ± 1,32
MCA-Sa 300 radów /gr.II/	5,73 ± 0,78	4,05 ± 0,67	3,95 ± 1,16
P	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

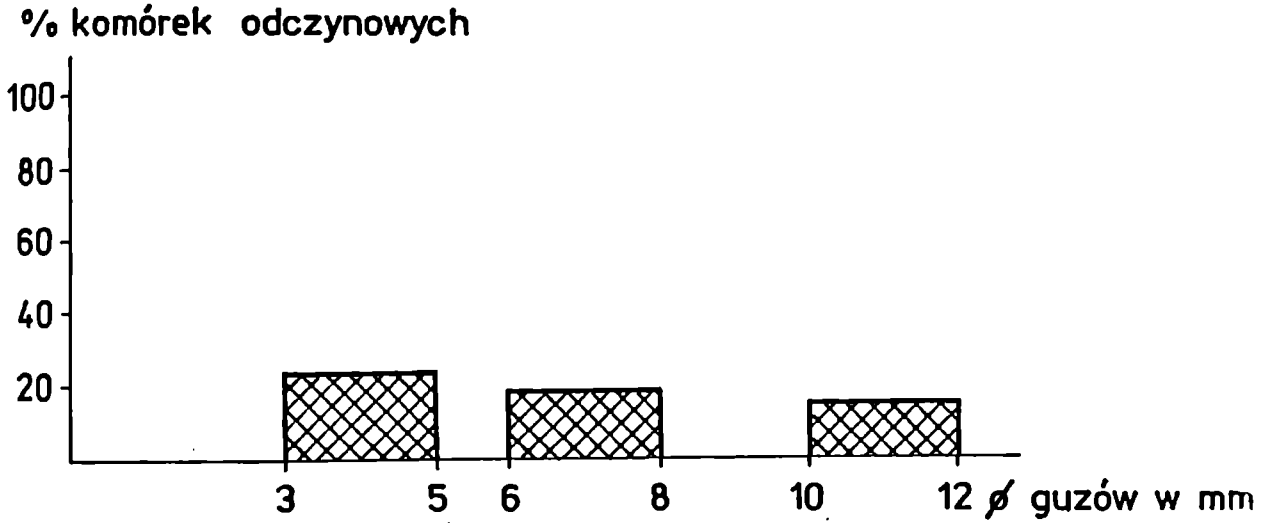
Wyniki:

W grupie I odsetek komórek odczynowych jest wysoki w porównaniu do guzów SaL₁ i LLC, odwrotnie niż miało to miejsce w doświadczeniu I i II.

Napromienienie myszy obciążonych guzem MCA-Sa spowodowało znaczne obniżenie się odsetka komórek odczynowych w obrębie guza, odwrotnie niż to obserwowano w doświadczeniu I i II.

Rycina 9.

Odsetek komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza MCA-Sa.



Rycina 10.

Odsetek komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza MCA-Sa u myszy uprzednio napromienionych.

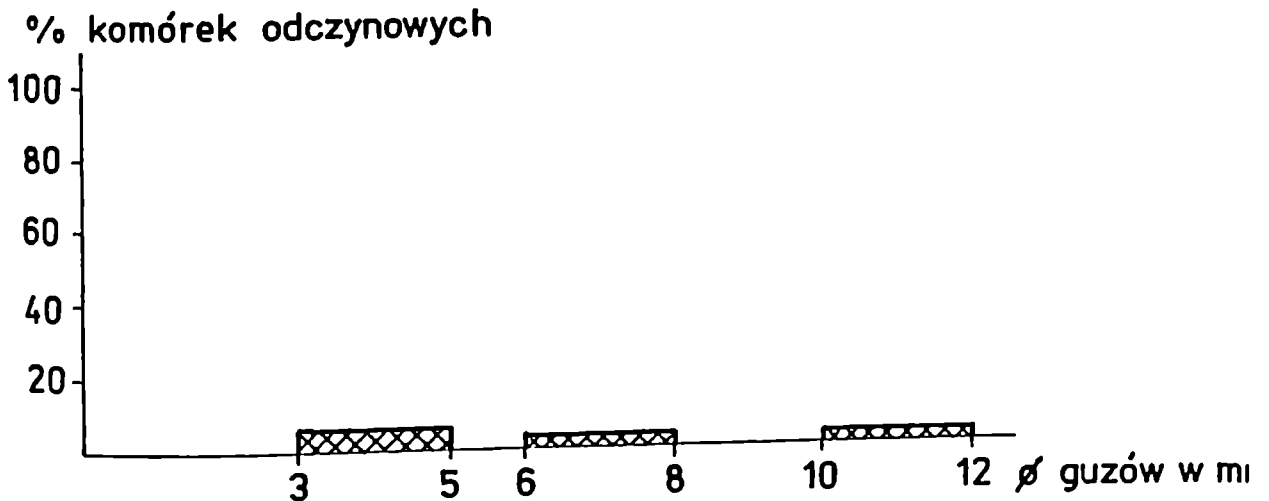


Tabela 12.

Skład jakościowy nacieku z komórek odczynowych u myszy obciążonych guzem MCA-Sa /gr I/ i w grupie myszy uprzednio napromienionych, a następnie obciążonych guzem MCA-Sa /gr.II/.

skład nacieku	grupa	średnica guzów w mm		
		3-5	6-8	10-12
komórki limfoidalne	MCA-Sa	66,10 ± 5,60	70,50 ± 6,30	88,00 ± 5,60
	MCA-Sa 300 radów	48,40 ± 10,13	83,70 ± 3,60	62,80 ± 3,80
granulocyty	MCA-Sa	29,40 ± 4,50	26,60 ± 7,10	10,35 ± 4,50
	MCA-Sa 300 radów	50,70 ± 8,10	15,20 ± 5,10	36,80 ± 3,60
makrofagi	MCA-Sa	4,40 ± 2,10	2,90 ± 2,40	1,60 ± 2,20
	MCA-Sa 300 radów	0,80 ± 1,10	0,50 ± 0,70	0,20 ± 0,40
P		p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Wyniki:

Grupa I. U myszy obciążonych guzem MCA-Sa najliczniejszą część nacieku stanowią komórki limfoidalne, przy zwiększającym się ich odsetku w miarę wzrostu guza. Proporcjonalnie odsetek granulocytów wynoszący początkowo ok.30%, w miarę wzrostu guza ulega zmniejszeniu do ok.10%.

Makrofagi stanowią w nacieku ok.4% we wczesnej fazie wzrostu guzów w późniejszych etapach wzrostu guza ich odsetek

zmniejsza się do ok. 1,6%, podobnie jak obserwowano to w doświadczeniach I i II.

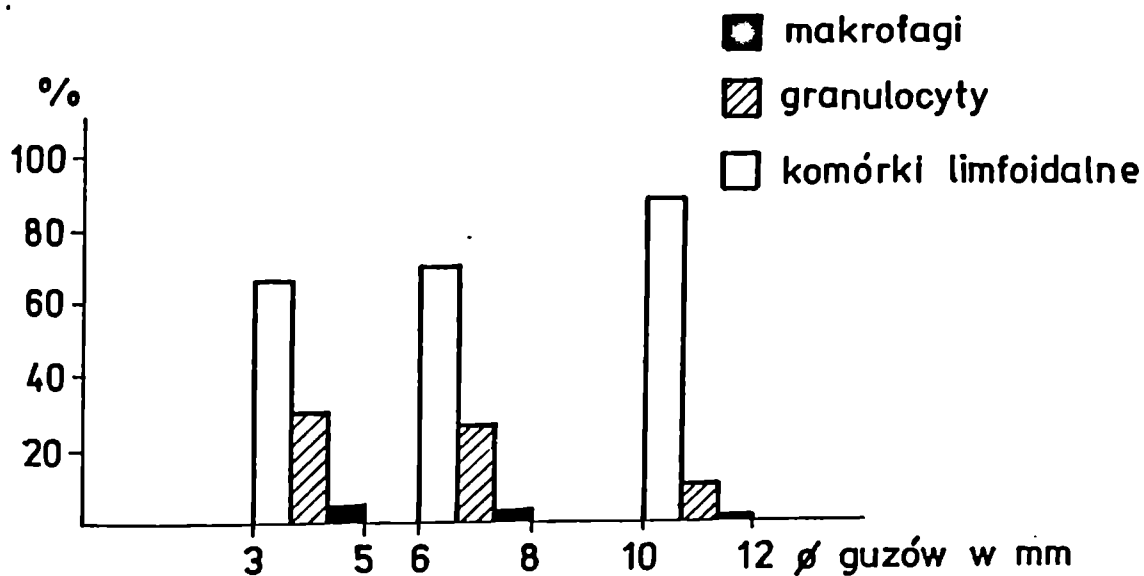
Grupa II. Napromienienie powoduje zwiększenie odsetka granulocytów w guzach wczesnego i późnego okresu, natomiast w guzach o średnicy 6-8 mm stwierdzono gwałtowny, przejściowy spadek liczby granulocytów /podobnie jak w guzach SaL₁ w doświadczeniu I, Tabela 3/.

Liczba komórek limfoidalnych w nacieku wykazuje niecharakterystyczne znaczne odchylenia.

Pod wpływem napromienienia liczba makrofagów ulega wybitnemu obniżeniu, zjawisko to utrzymuje się w okresie całej obserwacji wzrostu guzów i jest analogiczne do wyników uzyskanych w doświadczeniu I i II.

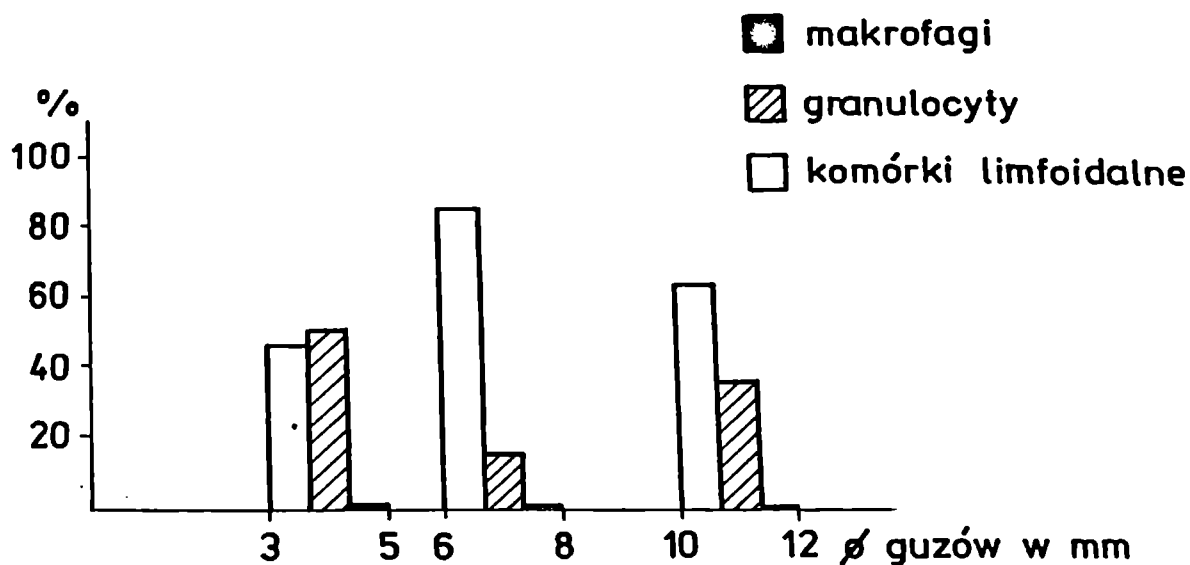
Rycina 11.

Skład nacieku z komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza MCA-Sa.



Rycina 12.

Skład nacieku z komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza MCA-Sa po uprzednim napromienieniu myszy.



Test cytotoksyczny.

Tabela 13 przedstawia wyniki testu cytotoksycznego w postaci odsetka limfocytów T w naciekach z komórek odczynowych u myszy obciążonych guzem MCA-Sa.

Tabela 13.

średnica guza w mm

	4	8	11
MCA-Sa	77,0 ± 12,0	-	52,9 ± 2,9

Wyniki:

Liczba limfocytów T ulega znacznym odchyleniom w kolejnych fazach wzrostu guza i wynosi w guzach małych 77% a w guzach dużych ok. 53%. Limfocyty T stanowią w guzie MCA-Sa duży odsetek puli ogólnej limfocytów biorących udział w odczynie.

Badanie kontrolne histologiczne.

Guz charakteryzuje się naciekającym typem wzrostu. W obrębie guza stwierdza się nacieki komórek odczynowych, w których przeważają limfocyty, mniej liczne są granulocyty, a najmniej liczne makrofagi. Ogniskowo na obwodzie guzów obok komórek odczynowych widoczny jest rozplem ziarninowo-fibroblastyczny. W sąsiedztwie ognisk martwiczych występują obfite nacieki granulocytarne.

W grupie myszy obciążonych guzem i uprzednio napromienionych w preparatach z guza stwierdza się nacieki mieszane, złożony z dość licznych granulocytów, limfocytów i makrofagów. Obok ognisk martwicy widoczne są skupienia prawie wyłącznie granulocytów i makrofagów.

W większych guzach nacieki są skąpe, w przeważającej części złożony z limfocytów.

Badanie hematologiczne liczby krwinek białych w krwi obwodowej.

Tabela 14.

Liczba krwinek białych w krwi obwodowej u myszy obciążonych guzem MCA-Sa i w grupie myszy napromienionych, a następnie obciążonych guzem MCA-Sa.

W tabeli przedstawiono wartości średnie, $\times 10^3/\text{mm}^3$.

dzień pomiaru	MCA-Sa gr. I	MCA-Sa 300 radów gr. II
1	14,8 \pm 2,3	10,6 \pm 2,0
3	14,1 \pm 2,3	1,7 \pm 0,6
10	10,9 \pm 2,4	4,5 \pm 0,9
20	26,7 \pm 7,3	9,6 \pm 0,8

Wyniki:

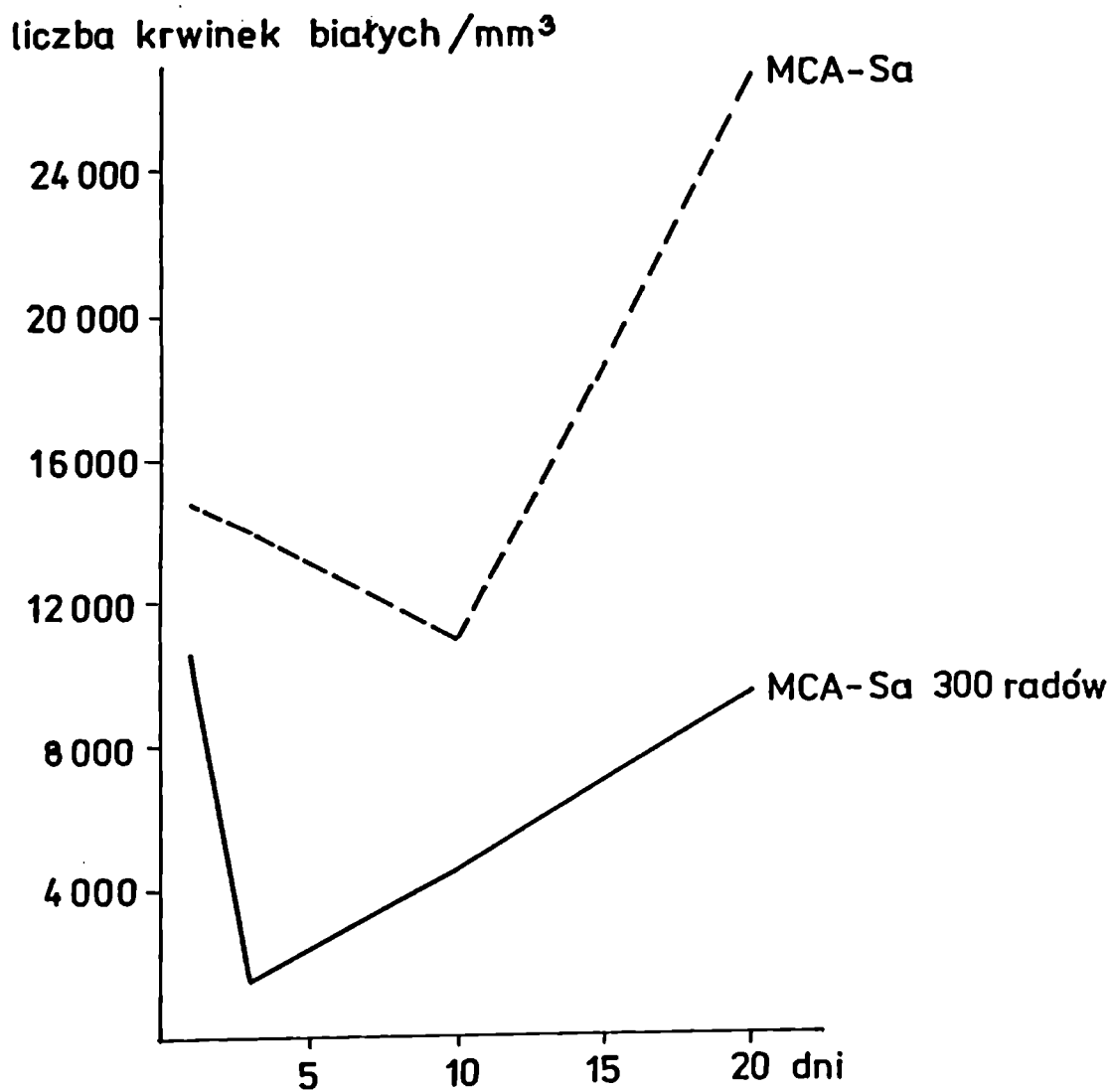
Stwierdzono, że napromienienie gospodarza guza MCA-Sa powodowało znaczny spadek liczby krwinek białych krwi obwodowej.

Zmniejszenie liczby krwinek białych było szczególnie zauważalne w 3 dniu obserwacji i utrzymywało się, jakkolwiek w mniejszym stopniu, w ciągu całej obserwacji.

Przed rozpoczęciem doświadczeń przeprowadzono ocenę liczby krwinek białych w krwi obwodowej, która wynosiła ok. 12 000/mm³.

Wykres 6

Liczba krwinek białych krwi obwodowej w grupie zwierząt obciążonych guzem MCA-Sa i w grupie myszy napromienionych, a następnie obciążonych guzem MCA-Sa.



OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI SZCZEGÓŁOWE Z DOŚWIADCZEN

W przeprowadzonych doświadczeniach posłużono się trzema typami nowotworów przeszczepialnych tj. SaL₁, LLC i MCA-Sa, różniących się zarówno histogenetycznym pochodzeniem jak i własnościami biologicznymi tj. tempem wzrostu, immunogennością, zdolnością przerzutowania.

Przed przystąpieniem do właściwych doświadczeń poddano ocenie wpływ napromienienia myszy /na całe ciało/ dawką 300 radów na liczbę krwinek białych krwi obwodowej.

Stwierdzono, iż napromienienie myszy spowodowało charakterystyczne zmniejszenie się liczby krwinek białych w krwi obwodowej we wszystkich doświadczeniach tj. I, II, III.

Następnie przeprowadzono dokładną ocenę tempa wzrostu trzech badanych typów guzów w zwykłych warunkach doświadczalnych oraz w warunkach immunosupresji po napromienieniu dawką 300 radów zwierząt obciążonych następnie guzem. Porównując tempo wzrostu trzech guzów stwierdzono, iż stosunkowo wolny wzrost wykazywał mięsak SaL₁ a najszybciej rósł mięsak indukowany metylocholanantrenem MCA-Sa. Obserwacja tempa wzrostu guzów w warunkach immunosupresji dostarczyła następujących danych.

W przypadku guza SaL₁ początkowo tempo wzrostu guza było podobne zarówno w zwykłych warunkach doświadczalnych jak i w warunkach immunosupresji. Od ok. 12 dnia obserwacji wzrost guzów ulegał przyspieszeniu w grupie zwierząt uprzednio napromienionych /doświadczenie I/.

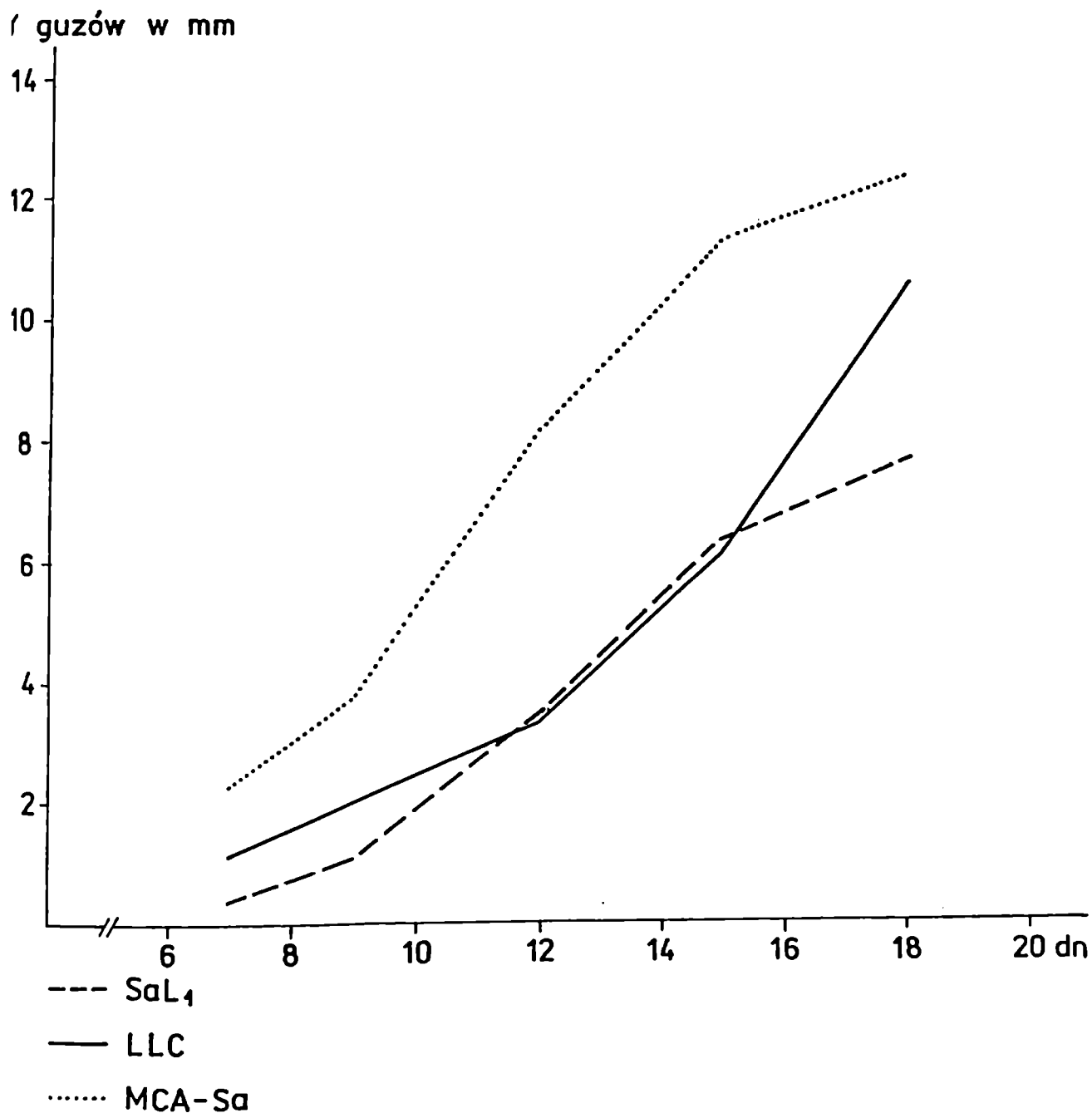
W doświadczeniu II - typ guza LLC, tempo wzrostu guza jest również podobne w zwykłych warunkach doświadczalnych jak i w warunkach immunosupresji. Szybkość wzrostu guza ule-

gała zwiększeniu poczynając od ok. 15 dnia obserwacji w grupie zwierząt napromienionych:

Natomiast w doświadczeniu III - typ guza MCA-Sa szybkość wzrostu guzów u myszy obciążonych mięsakiem MCA-Sa i uprzednio napromienionych była zbliżona do grupy myszy obciążonych guzem. Nie stwierdzono więc przyspieszenia tempa wzrostu guza w warunkach immunosupresji jak to miało miejsce w doświadczeniach I i II.

Wykres 7.

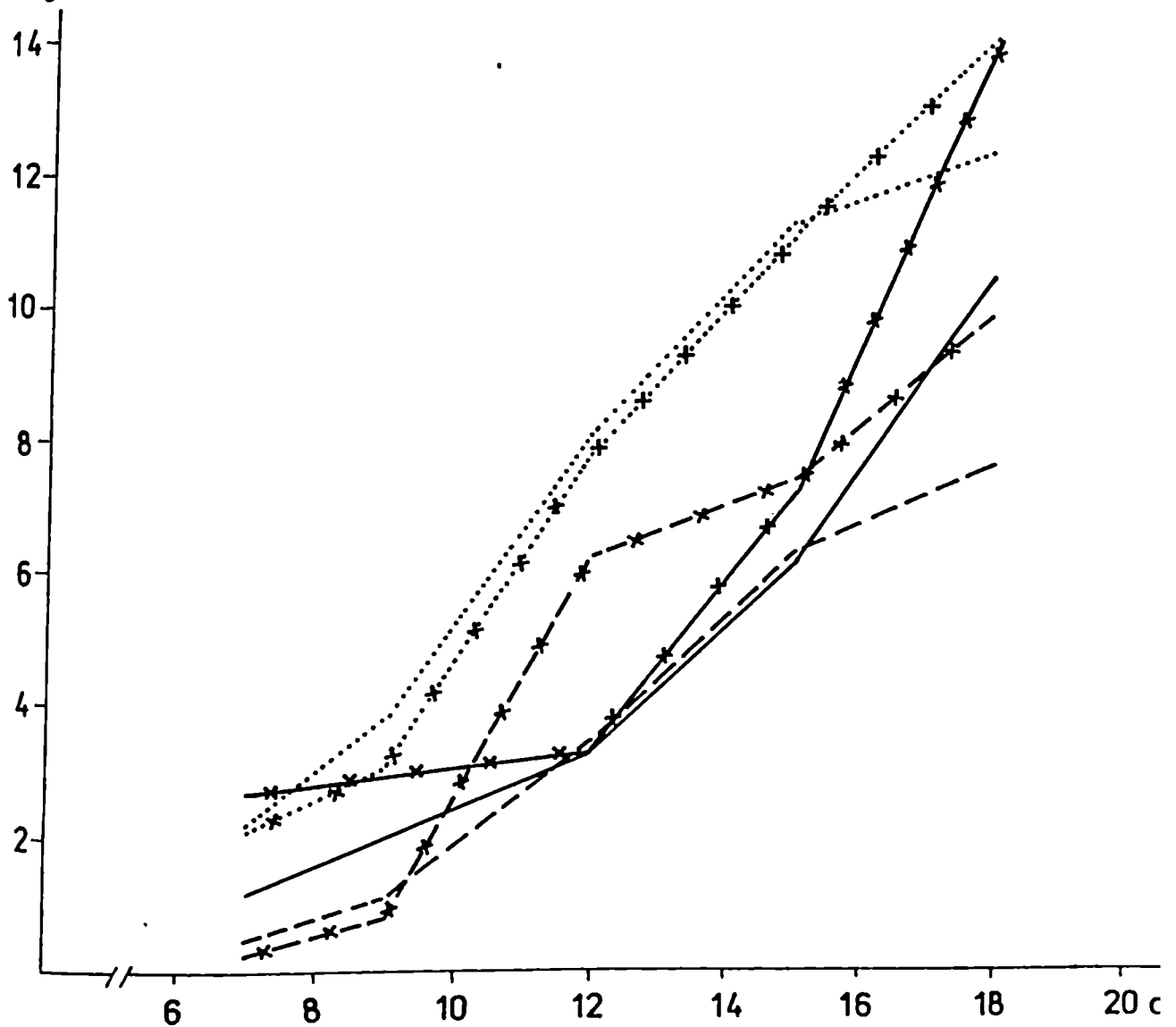
Wzrost przeszczepów podskórnych guzów SaL₁, LLC i MCA-Sa.



Wykres 8.

Porównanie wzrostu trzech typów przeszczepialnych guzów tj. SaL₁, LLC i MCA-Sa w zwykłych warunkach doświadczalnych i w warunkach immunosupresji gospodarza guza.

Ø guzów w mm



···*··· MCA-Sa 300radów —*— LLC 300 radów -*- SaL1 300 radów
····· MCA-Sa — LLC ---- SaL1

Pierwszym zagadnieniem, którego rozwiązanie miały przynieść podjęte badania doświadczalne było następujące: czy poszczególne typy guzów nowotworowych różnią się odsetkiem komórek odczynowych w warunkach normalnego wzrostu oraz czy napromienienie gospodarza guza powoduje istotne zmiany w tym zakresie.

Z analizy odsetka komórek odczynowych w guzie SaL₁ w grupach myszy obciążonych guzem i myszy uprzednio napromienionych wynika, iż odsetek komórek odczynowych wynoszący w normalnych warunkach wzrostu guza od 6 do 10%, w wyniku immunosupresji wzrastał do wartości 10 do 33%.

Zwraca uwagę, iż najwyższe wartości odsetkowe stwierdzono w guzach o wielkości 6 do 8 mm /doświadczenie I/.

Podobnie w guzie LLC odsetek komórek odczynowych w warunkach normalnego wzrostu wynosił 5% do 8%. Immunosupresja spowodowała zwiększenie odsetka komórek odczynowych, który wynosił 9% do 16%.

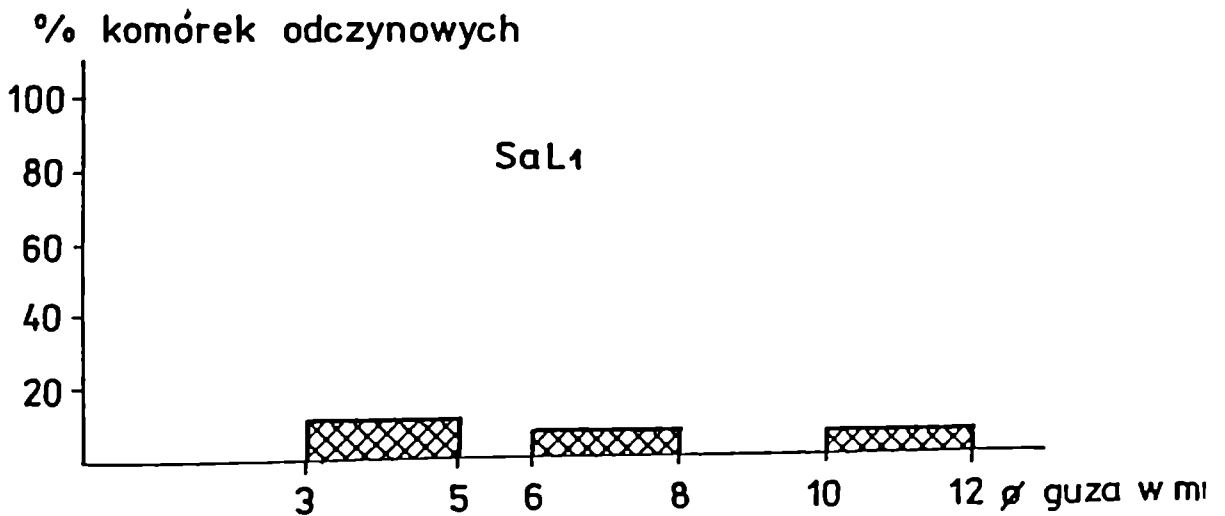
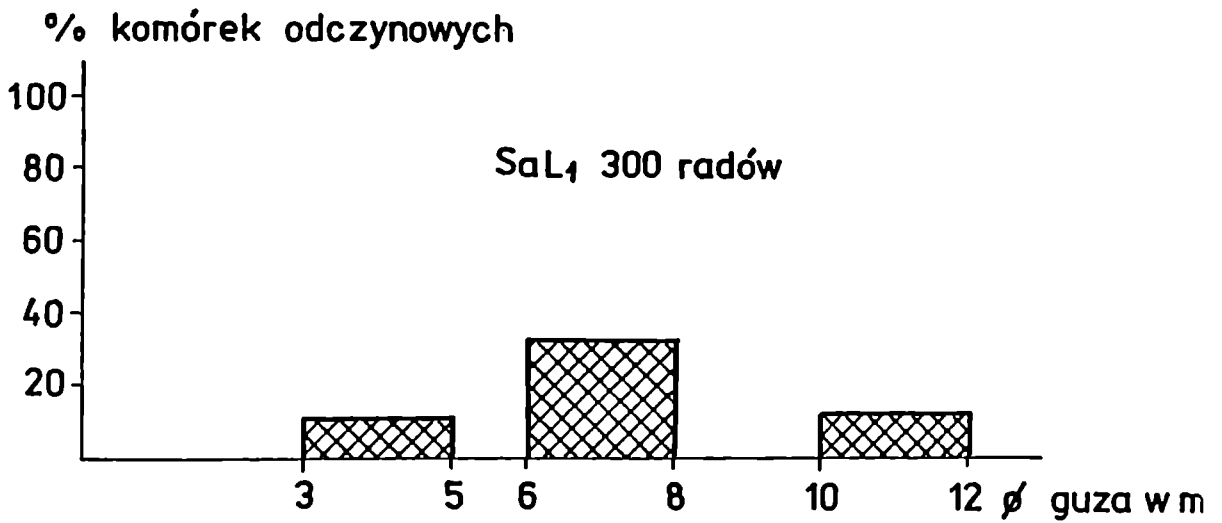
W guzie MCA-Sa odsetek komórek odczynowych był stosunkowo wysoki w normalnych warunkach wzrostu tego guza i wynosił 15% do 23%.

Napromienienie gospodarza guza spowodowało znaczne zmniejszenie się liczby komórek odczynowych do wartości 4% do 6%.

Na podstawie tych wyników należy stwierdzić odmienny niż w doświadczeniach I i II typ reaktywności komórkowej w zastosowanym modelu doświadczalnym z guzem MCA-Sa.

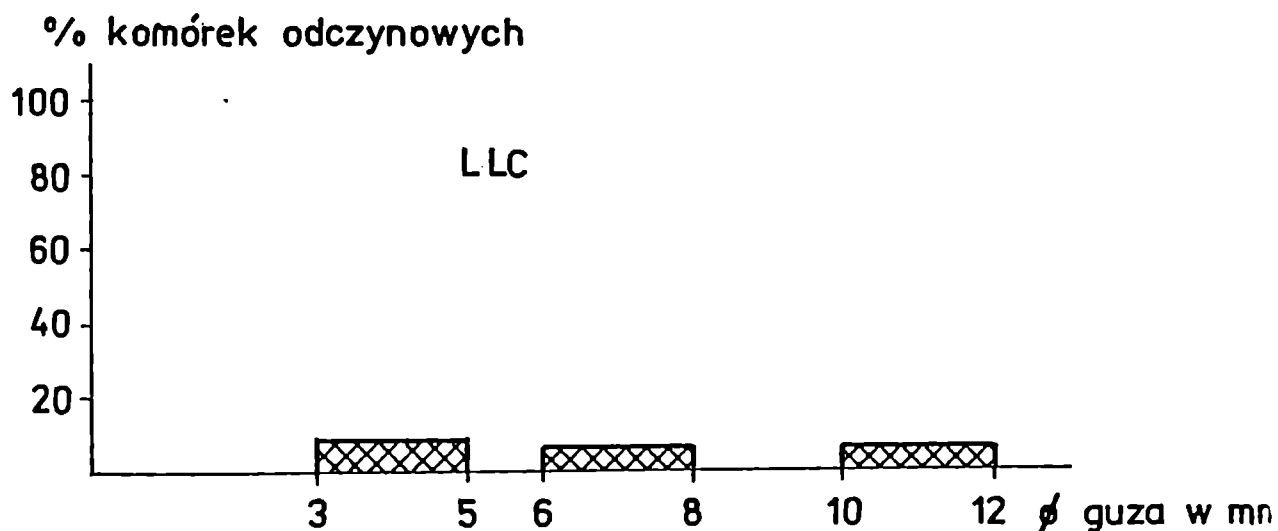
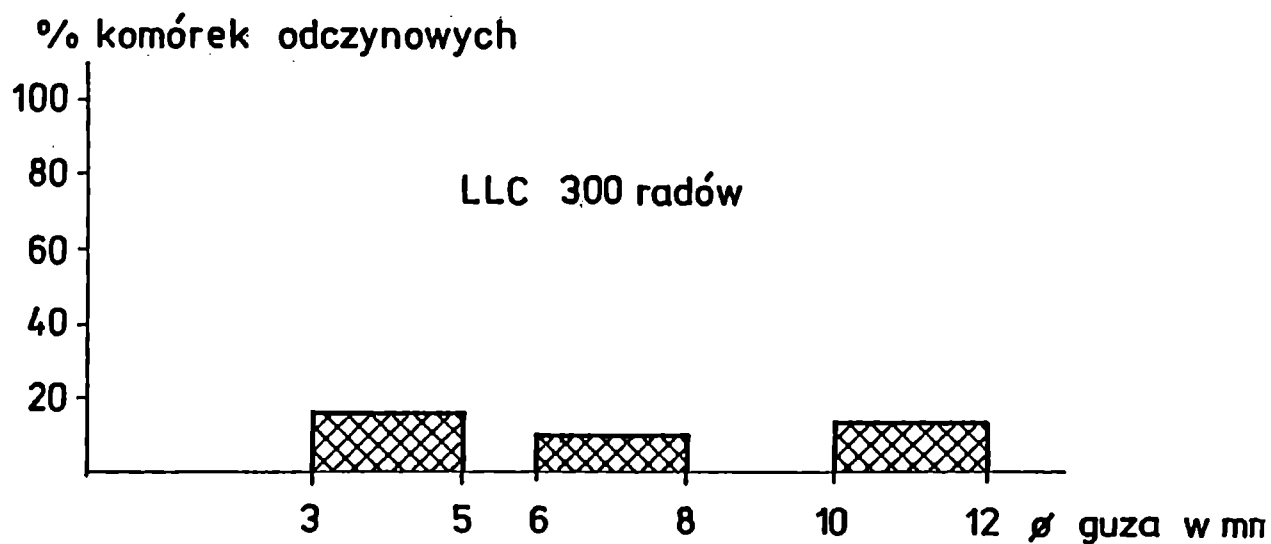
Rycina 13.

Odsetek komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza SaL₁ w zwykłych warunkach doświadczalnych oraz w warunkach immunosupresji.



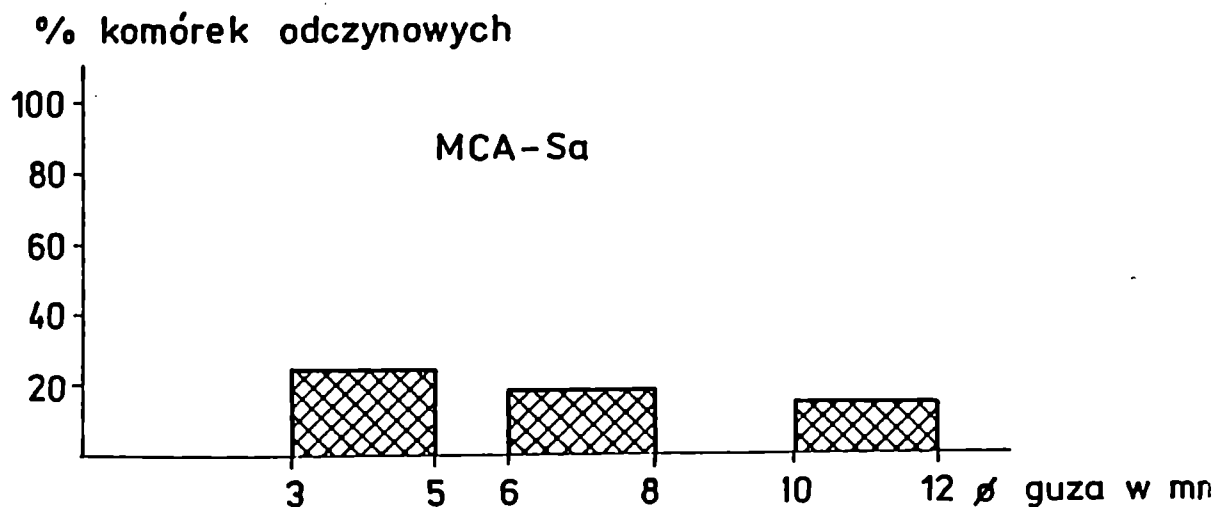
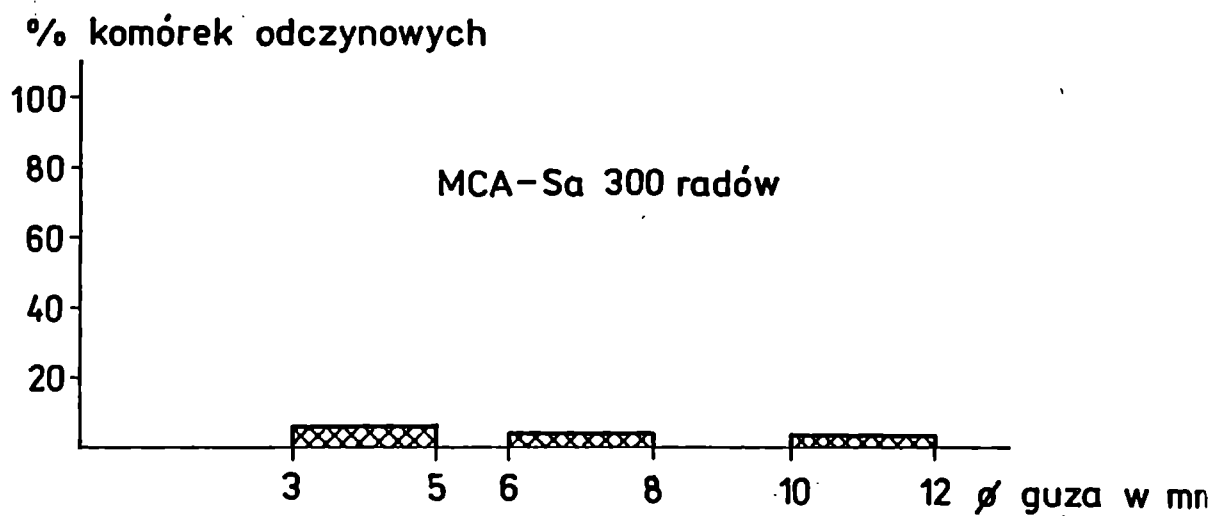
Rycina 14.

Odsetek komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza LLC w zwykłych warunkach doświadczalnych oraz w warunkach immunosupresji.



Rycina 15:

Odsetek komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza MCA-Sa w zwykłych warunkach doświadczalnych oraz w warunkach immunosupresji.



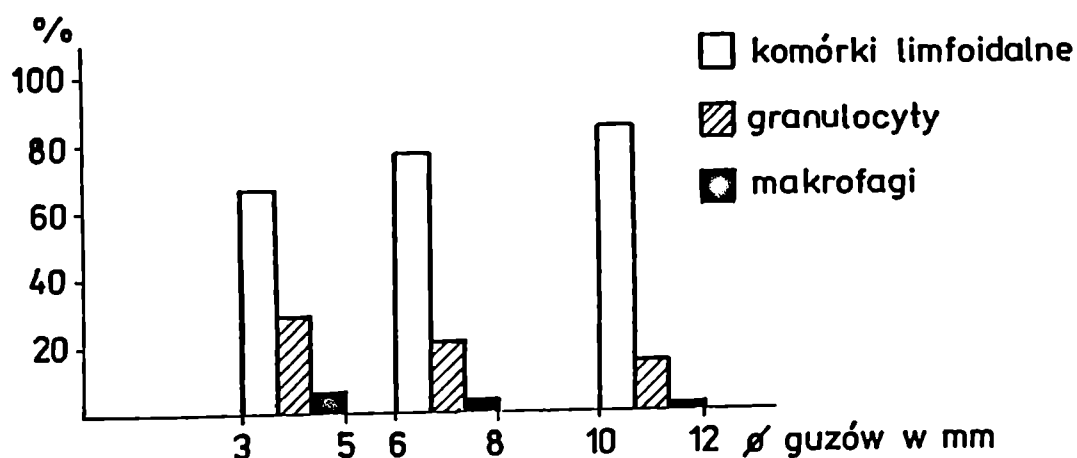
Drugie zagadnienie dotyczyło stwierdzanych różnic w składzie komórek odczynowych tj: komórek limfoidalnych, granulocytów i makrofagów badanych w trakcie wzrostu trzech typów guzów w zwykłych warunkach doświadczalnych oraz po napromienieniu gospodarza guza dawką 300 radów.

W doświadczeniu I opartym o typ guza SaL₁ poddano analizie cytologicznej skład nacieku z komórek odczynowych w obrębie i w otoczeniu guza.

W grupie zwierząt obciążonych tym guzem stwierdzono, iż najliczniejszą populacją komórek odczynowych stanowią komórki limfoidalne /65-85%. Zawartość granulocytów wśród komórek odczynowych wynosiła 14 do 28%. Makrofagi stanowiły niewielki odsetek komórek nacieku /1-5%.

Rycina 16.

Skład nacieku z komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza SaL₁.

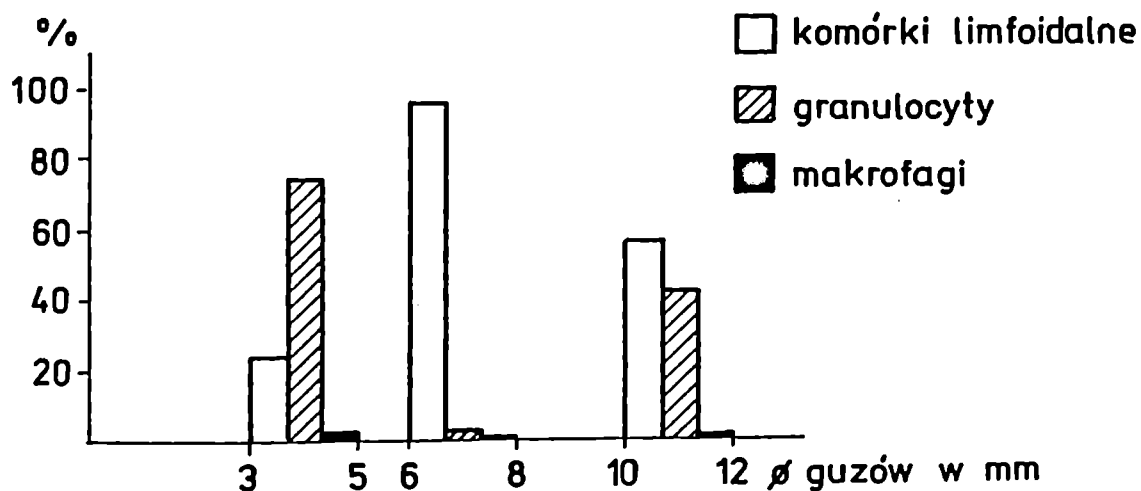


Napromienienie gospodarza guza spowodowało zmiany składu komórkowego nacieku odczynowego.

Odsetek granulocytów wśród komórek odczynowych zwiększył się /42%-74%/, natomiast zawartość komórek limfoidalnych w nacieku zmniejszyła się /23%-56%/! Zmniejszył się również odsetek makrofagów do wartości 0,6%-2%. Odrębnego omówienia wymaga skład nacieku z komórek odczynowych w guzach SaL₁ i MCA-Sa o średnicy 6 do 8 mm po napromienieniu gospodarza guza. W tym okresie stwierdzono niezwykle zmiany składu nacieku komórkowego w guzie SaL₁ w porównaniu z pozostałymi danymi, a mianowicie najliczniejszą populację komórek odczynowych stanowiły tu komórki limfoidalne 96%, granulocyty 3%, a makrofagi ok.0,6% składu komórkowego nacieku. Podobne zmiany cytologiczne obserwowano w tym okresie wzrostu guza /6-8 mm/ w zakresie odsetka komórek odczynowych /str. 49/ oraz w doświadczeniu III w odniesieniu do składu komórek odczynowych w guzie MCA-Sa /str.52/.

Rycina 17:

Skład nacieku z komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza SaL₁ u zwierząt uprzednio napromienionych.

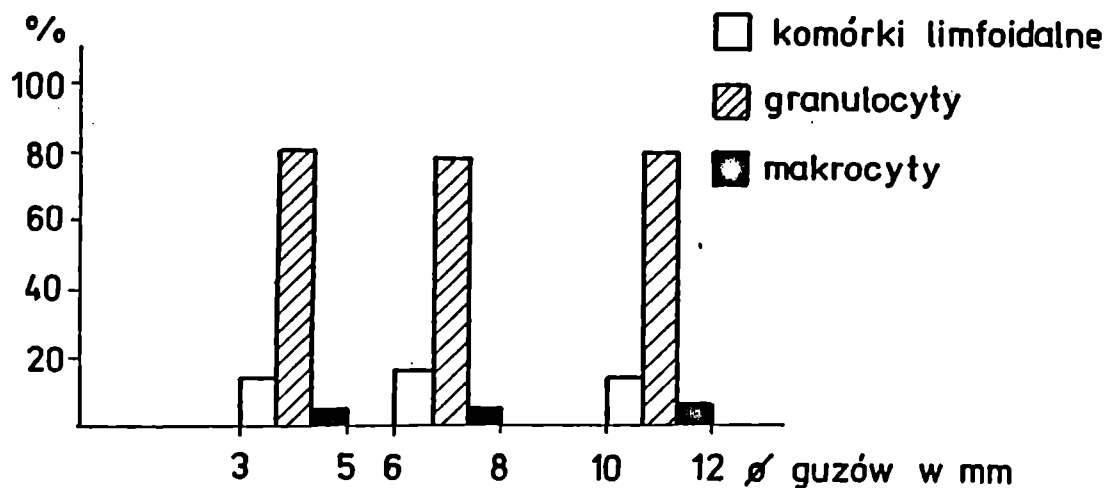


W dowiadczeniu II cytologiczny skład nacieku z komórek odczynowych w guzie LLC i jego otoczeniu w zwykłych warunkach doświadczalnych przedstawiał się następująco. Najliczniej bo w 80 % reprezentowane były granulocyty. Komórki limfoidalne stanowiły 14% do 16% składu nacieku, a makrofagi 5% do 6%.

Warto podkreślić stabilne zachowanie się składu nacieku z komórek odczynowych w zwykłych warunkach wzrostu guza LLC.

Rycina 18.

Skład nacieku z komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza LLC.

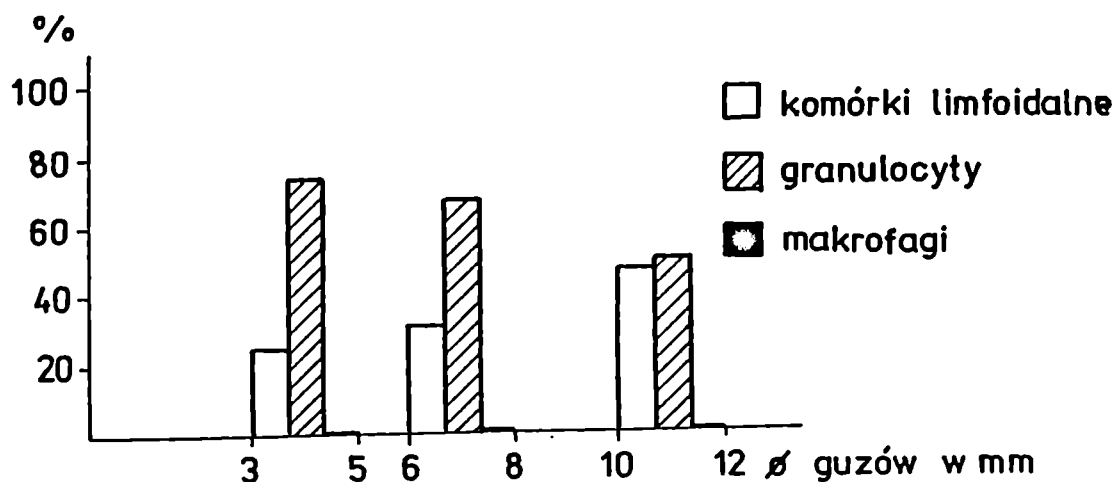


Napromienienie myszy obciążonych guzem LLC spowodowało zmniejszenie się odsetka granulocytów w nacieku odczynowym /50% do 70%/.

Odsetek komórek limfoidalnych zwiększył się i stanowił 24% do 48% populacji komórek odczynowych. Liczba makrofagów zmniejszyła się do wartości 0,6% do 1%.

Rycina 19.

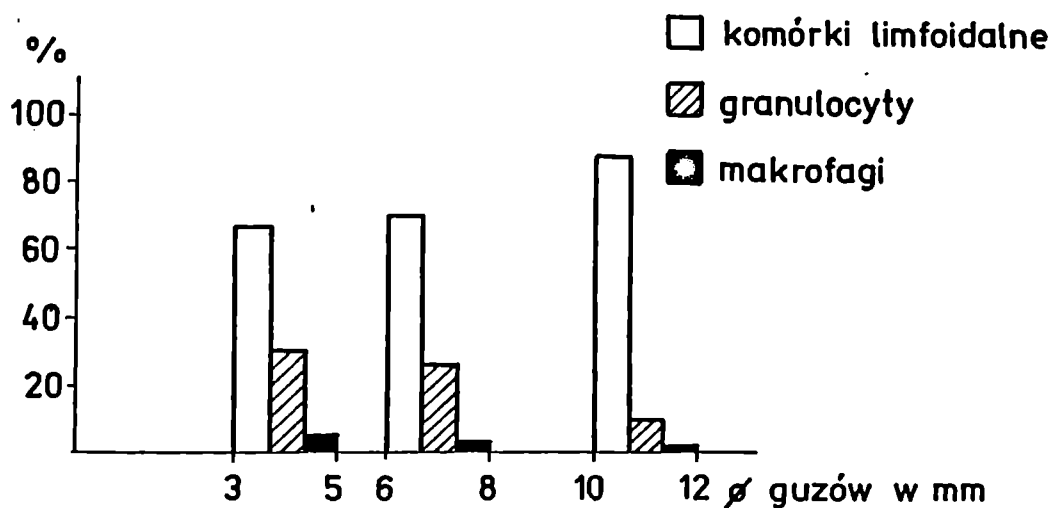
Skład nacieku z komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza LLC u zwierząt uprzednio napromienionych.



W doświadczeniu III w guzie MCA-Sa najliczniejszą populację komórek odczynowych stanowiły komórki limfoidalne 66% do 88%. Mniej liczne wśród komórek nacieku były granulocyty 10% do 29%. Makrofagi zaś stanowiły 1,6% do 4,4% całej populacji komórek odczynowych.

Rycina 20.

Skład nacieku z komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza MCA-Sa.



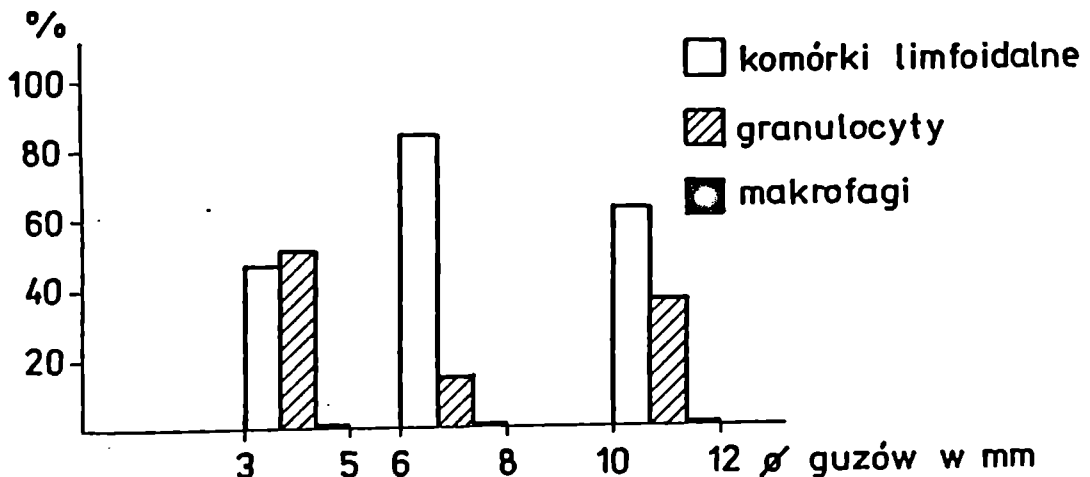
W wyniku napromienienia gospodarza guza MCA-Sa stwierdzono następujące zmiany składu komórkowego nacieku odczynowego, a mianowicie: zmniejszenie odsetka komórek limfoidalnych do wartości 48% do 63% i makrofagów do 0,2% do 0,8% z równoczesnym zwiększeniem odsetka granulocytów do 37%-50% całkowitej populacji komórek odczynowych.

Również w tym doświadczeniu, podobnie jak i doświadczeniu I /str. 54/, osobnego omówienia wymaga wyraźna zmiana składu cytologicznego nacieku odczynowego w guzie o średnicy 6 mm do 8 mm po uprzednim napromienieniu gospodarza guza.

Skład populacji komórek odczynowych przedstawiał się bowiem następująco: komórki limfoidalne 84%, granulocyty 15%, makrofagi 0,5%.

Rycina 21.

Skład nacieku z komórek odczynowych w różnych fazach wzrostu guza MCA-Sa u zwierząt uprzednio napromienionych.



Kolejnym zagadnieniem wynikającym z analizy dwóch poprzednich było pytanie, czy liczba komórek odczynowych lub ich skład cytologiczny mógł mieć związek z przebiegiem procesu nowotworowego, którego wykładnikiem było tempo wzrostu guzów. Analiza zachowania się odsetka komórek odczynowych wykazała różnice pomiędzy poszczególnymi typami guzów oraz zmienność liczby komórek odczynowych w kolejnych okresach wzrostu badanych nowotworów. Szczególnie obfity był naciek odczynowy w obrębie i w otoczeniu guza MCA-Sa. W materiale komórkowym uzyskanym z guzów SaL₁ i LLC odsetek komórek odczynowych był mniejszy. Dane te mogą wskazywać na brak korelacji między liczbą komórek odczynowych, a tempem wzrostu guza w badanych modelach doświadczalnych /Ryc.22-27, Tab.15-20/.

Wspólną cechą dla trzech badanych guzów tj. SaL₁, LLC i MCA-Sa było obserwowane przez nas stałe zmniejszenie się odsetka komórek odczynowych w miarę powiększania się masy guzów /Ryc.22-27, Tab.15-20/.

Napromienienie gospodarza guza dawką 300 radów spowodowało poza przyśpieszeniem wzrostu guzów szereg istotnych zmian w odsetku komórek odczynowych w poszczególnych typach badanych nowotworów przeszczepialnych. I tak zaobserwowano zmniejszenie liczby komórek odczynowych w obrębie i w otoczeniu guza MCA-Sa. W tym typie guza stwierdzono, że odsetek komórek odczynowych był podobny w kolejnych fazach wzrostu. W wyniku napromienienia zwiększył się natomiast odsetek komórek odczynowych w obrębie i w otoczeniu guzów SaL₁ i LLC.

Analiza cytologiczna składu nacieku z komórek odczynowych wykazała również znaczne różnice pomiędzy poszczególnymi typami guzów jak i zmienność w kolejnych fazach wzrostu badanych guzów.

Wśród komórek odczynowych pochodzących z tkanki guzów SaL₁ i MCA-Sa najliczniejszą populację stanowiły komórki limfoidalne, zaś w guzie LLC granulocyty. Makrofagi były najmniej licznymi komórkami nacieku we wszystkich badanych nowotworach.

Stwierdzono również, że w miarę wzrostu badanych guzów tj. SaL₁, LLC i MCA-Sa dochodziło do zmian wzajemnych proporcji komórek limfoidalnych i granulocytów.

W guzach SaL₁ i MCA-Sa w miarę powiększania się ich masy wzrastał odsetek komórek limfoidalnych. Natomiast w materiale komórkowym uzyskanym z guza LLC skład cytologiczny nacieku odczynowego był zasadniczo podobny w kolejnych fazach wzrostu guza.

Napromienienie myszy dawką 300 radów przed przeszczepieniem badanych guzów wywołało szereg zmian w składzie cytologicznym nacieku odczynowego. Wystąpiły bowiem niecharakterystyczne zmiany w składzie nacieku z komórek odczynowych pochodzących z tkanek guzów SaL₁ i MCA-Sa w kolejnych fazach wzrostu tych guzów.

W składzie cytologicznym nacieku odczynowego w guzie LLC stwierdzono natomiast, iż odsetek komórek limfoidalnych zwiększał się w miarę wzrostu tego guza.

Ryciny dotyczące przedstawionych wyżej zagadnień zostały przedstawione na stronach 79-84 tej pracy wraz z tabelami zawierającymi dane liczbowe odnośnie tempa wzrostu

trzech badanych guzów, odsetka komórek odczynowych i składu cytologicznego nacieków w obrębie i w otoczeniu tych guzów.

DYSKUSJA

Z przeglądu piśmiennictwa z ostatniego dziesięciolecia dotyczącego zagadnień patomechanizmów reakcji miejscowych gospodarza guza, a zwłaszcza roli komórek odczynowych wynika, iż zagadnienie to stało się przedmiotem zainteresowania wielu ośrodków badawczych /1,2,4,5,9,10,11,15,16,17,18,21,24,25,30,33,35,38,46,56,64,70,90,91,92,93,94,101,102,106,107/.

Jednocześnie zwraca uwagę fakt bardzo wielu różnych lub wręcz sprzecznych opinii na ten temat. Wydaje się, że jedną z przyczyn takiego stanu jest nieprecyzyjne określenie przez badaczy zarówno liczebności nacieku z komórek odczynowych, brak określenia proporcji do komórek nowotworowych, a także składu tych komórek. W rezultacie publikowane dane są nieporównywalne, opierają się bowiem często na takich określeniach jak: "obfity naciek", "polimorficzny skład komórek", "przewaga limfocytów" itp. Warto również podkreślić, że obraz histologiczny nowotworu nie daje możliwości dokładnej oceny liczebności i wzajemnych proporcji komórek nacieku odczynowego. Wprowadzenie technik immunologicznych z użyciem np. przeciwciał monoklonalnych, radioizotopów przyniosło znakomite rezultaty w zakresie identyfikacji komórek biorących udział w nacieku odczynowym. Są to jednak techniki wymagające bardzo dużego doświadczenia w tak zwężonych specjalnościach, a przede wszystkim odpowiedniego wyposażenia laboratoryjnego i nierzadko bardzo kosztowne.

Dla oceny dynamiki pojawienia się nacieków z komórek od-

czynowych zaadaptowaliśmy więc w naszych warunkach laboratoryjnych technikę filtrów Milliporea, pozwalającą na uzyskanie czytelnych preparatów cytologicznych, umożliwiającą szybką ocenę wartości procentowych komórek odczynowych do nowotworowych, a także na ich identyfikację. W ograniczonym zakresie posłużyliśmy się również oceną immunologiczną limfocytów subpopulacji T przy użyciu odpowiednich surowic /Monoclonal Anti-Mouse Thy 1,2 produkcji Miles Laboratories LTD/.

Doboru modeli doświadczalnych guzów nowotworowych dokonano w oparciu o wieloletnie badania prowadzone przez Zakład Patofizjologii Instytutu Patologii w ramach Rządowego Programu Badawczo-Rozwojowego nr 6 pt. "Zwalczanie chorób nowotworowych". Celem tego doboru było posłużenie się w doświadczeniach zarówno zwierzętami jak i guzami nowotworowymi o różnych właściwościach biologicznych. Wyniki tych doświadczeń pozwoliły na dokładne ustalenie zmian ilościowych i jakościowych komórek tworzących nacieki w obrębie guza, które można podsumować następująco:

Badania dotyczące oceny nacieków z komórek odczynowych w trzech typach nowotworów przeszczepialnych tj. mięsaku płuc /SaL₁/, raku płuc Lewis /LLC/ i mięsaku indukowanym podaniem metylocholantrenu /MCA-Sa/ wykazały znaczne różnice w liczbie komórek odczynowych i w składzie komórkowym nacieku w poszczególnych guzach w zależności od okresu ich wzrostu. Stwierdzono również, iż immunosupresyjne oddziaływanie na gospodarza guza przez napromienienie dawką 300 radów powoduje istotne zmiany

czynowych zaadaptowaliśmy więc w naszych warunkach laboratoryjnych technikę filtrów Milliporea, pozwalającą na uzyskanie czytelnych preparatów cytologicznych, umożliwiającą szybką ocenę wartości procentowych komórek odczynowych do nowotworowych, a także na ich identyfikację. W ograniczonym zakresie posłużyliśmy się również oceną immunologiczną limfocytów subpopulacji T przy użyciu odpowiednich surowic /Monoclonal Anti-Mouse Thy 1,2 produkcji Miles Laboratories LTD/.

Doboru modeli doświadczalnych guzów nowotworowych dokonano w oparciu o wieloletnie badania prowadzone przez Zakład Patofizjologii Instytutu Patologii w ramach Rządowego Programu Badawczo-Rozwojowego nr 6 pt. "Zwalczanie chorób nowotworowych". Celem tego doboru było posłużenie się w doświadczeniach zarówno zwierzętami jak i guzami nowotworowymi o różnych właściwościach biologicznych. Wyniki tych doświadczeń pozwoliły na dokładne ustalenie zmian ilościowych i jakościowych komórek tworzących nacieki w obrębie guza, które można podsumować następująco:

Badania dotyczące oceny nacieków z komórek odczynowych w trzech typach nowotworów przeszczepialnych tj. mięsaku płuc /SaL₁/, raku płuc Lewis /LLC/ i mięsaku indukowanym podaniem metylocholantrenu /MCA-Sa/ wykazały znaczne różnice w liczbie komórek odczynowych i w składzie komórkowym nacieku w poszczególnych guzach w zależności od okresu ich wzrostu. Stwierdzono również, iż immunosupresyjne oddziaływanie na gospodarza guza przez napromienienie dawką 300 radów powoduje istotne zmiany

w liczebności i w składzie nacieków odczynowych w obrębie badanych guzów nowotworowych.

Nasze badania przeprowadzone w oparciu o ocenę zawiesiny komórkowej uzyskanej z guza nowotworowego wykazały także, iż odsetek komórek nacieku może być znaczny w niektórych guzach. Analiza szybkości wzrostu guzów SaL₁ i LLC w porównaniu do grupy zwierząt uprzednio napromienionych, a następnie obciążonych tymi guzami wykazała w początkowym okresie, iż szybkość wzrostu guzów w obu badanych modelach jest podobna, natomiast ulega wyraźnemu przyspieszeniu w warunkach immunosupresji w późniejszym okresie obserwacji. U myszy obciążonych guzem MCA-Sa i w grupie zwierząt uprzednio napromienionych, a następnie obciążonych tym guzem, tempo wzrostu nie wykazuje tak charakterystycznych różnic w trakcie całej obserwacji.

Zastosowane przez nas techniki badań pozwoliły na bardziej szczegółowe rozważania w zakresie liczby komórek odczynowych i ich składu w badanych guzach.

Tak więc stwierdzono, że liczebność tych komórek w obrębie trzech badanych guzów w zwykłych warunkach doświadczalnych zmniejsza się regularnie w miarę wzrostu guzów. Jest to związane, jak można sądzić, z gwałtownym przyrostem masy guza, a więc liczby komórek /których 1 ml zawiesiny zawiera ok. 10^6 komórek/. Immunosupresja gospodarza guza powoduje z kolei znamienne wzrost liczby komórek odczynowych w grupach myszy obciążonych guzami SaL₁ i LLC, natomiast w grupie myszy obciążonych guzem MCA-Sa i uprzednio napromienionych liczba komórek od-

czynowych nie ulega zwiększeniu a nawet maleje. Wyjaśnienie tego zjawiska jest trudne, dotyczy bowiem zarówno przyczyn związanych z różną promienioczułością guzów, wrażliwości gospodarza guza na napromienienie jak też szybkością i rozległością powstawania ognisk martwiczych i innych czynników /3,6,18,51,67,69,71,81,82,95,100/.

Drugie zagadnienie, któremu poświęcone były doświadczenia dotyczyło analizy cytologicznej składu nacieków z komórek odczynowych. Wykazano, iż badane trzy guzy przeszczepialne różnią się w tym zakresie. W guzie LLC najliczniejszą pulę komórek odczynowych stanowiły granulocyty, drugie co do liczebności były komórki limfoidalne, a proporcjonalnie najmniej liczne były makrofagi. W tym guzie skład komórkowy nacieku pozostawał zasadniczo niezmienny w kolejnych fazach wzrostu guza. W obrębie guzów SaL₁ i MCA-Sa najliczniejszą pulę komórek odczynowych były komórki limfoidalne, ze zwiększającym się ich odsetkiem w kolejnych fazach wzrostu guzów. Wstępna ocena subpopulacji limfocytów T przy użyciu surowic monoklonalnych nie wykazała korelacji między ich liczbą, a fazą wzrostu guzów.

Drugą co do liczebności pulę stanowiły granulocyty a ich odsetek zmniejszał się w miarę wzrostu guzów.

Makrofagi były najmniej liczne, a ich liczba również zmniejszała się w trakcie wzrostu guzów.

Immunosupresja gospodarza guza LLC spowodowała zmiany w składzie nacieku odczynowego, a mianowicie zmniejszenie liczby granulocytów i makrofagów oraz zwiększenie liczby komórek limfoidalnych w nacieku. Skład cytologiczny

nacieku w tym guzie ulegał również zmianom w kolejnych fazach wzrostu guza. Immunosupresja zwierząt obciążonych guzami SaL₁ i MCA-Sa spowodowała zwiększenie liczby granulocytów i zmniejszenie liczby komórek limfoidalnych oraz makrofagów w nacieku odczynowym.

Stwierdzone w naszych badaniach różnice dotyczące liczebności i składu nacieku z komórek odczynowych w trzech typach przeszczepialnych nowotworów tj. SaL₁, LLC i MCA-Sa podtrzymują stanowisko większości autorów, którzy wskazują na zmienność nacieku komórkowego w różnych typach guzów doświadczalnych, a także i w nowotworach u ludzi /8,22, 60,73,83,92,105/.

Jedynie niewielka część badaczy przedstawia dane wskazujące, iż w badanych przez nich nowotworach, wprawdzie liczba komórek nacieku odczynowego jest bardzo wysoka, ale skład komórkowy nacieku odczynowego ma pozostawać w zasadzie niezmienny w trakcie rozwoju guza nowotworowego /20,23,34/.

Poza ustaleniem kryteriów matematycznej oceny nacieków prowadzone badania cytologiczne miały na celu dostarczenie bliższych danych dla poznania podstawowego problemu, a mianowicie, czy i w jakim zakresie obecność i skład komórkowy nacieku odczynowego są wyrazem reakcji obronnej ustroju zmierzającego do destrukcji guza nowotworowego.

Istnieje wiele danych przemawiających za stanowiskiem, iż pojawienie się nacieku odczynowego w obrębie guza nowotworowego i/lub jego najbliższym sąsiedztwie jest wykładnikiem miejscowej reakcji ustroju, która w pewnych warunkach może doprowadzić do zniszczenia komórek nowotworowych i regresji guza /4,37,44,47,55,73,85,97,98/.

Wielu autorów stwierdza również związek między pojawieniem się nacieku z komórek odczynowych a korzystniejszym rokowaniem /29,73,74,83,86,87,97,98/. Szczególnie liczne są w tym zakresie obserwacje kliniczno-patologiczne. Ostatnio ukazały się interesujące publikacje stwierdzające, że obecność obfitych nacieków odczynowych w raku sutka, złożonych głównie z limfocytów T ma mieć związek z brakiem przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych /Shimokawara i wsp. 1982/. Warto wspomnieć, że korelacja przeżycia z obecnością nacieków limfoidalnych w rakach sutka była przedstawiona w piśmiennictwie polskim już trzydzieści lat temu /Niepołomska/.

Podobne spostrzeżenia dotyczące roli pojawiającego się nacieku odczynowego przedstawione zostały w przypadkach wielu różnych nowotworów ludzkich jak np. raku skóry, raku jelita grubego, żołądka. Autorzy tych prac podają zwykle, iż skład komórkowy nacieku odczynowego był różny, nie precyzując jednak zarówno jego liczebności jak i składu komórkowego i często zależny od typu badanego guza nowotworowego. Wyjaśnienie tych sprzecznych niekiedy opinii możliwe było jedynie dzięki podjęciu systematycznych badań głównie doświadczalnych, które ponadto miały określić rolę poszczególnych komórek biorących udział w naciekaniu i ewentualnym niszczeniu guza.

Jak wspomnieliśmy wyżej w składzie nacieku odczynowego opisywane są przede wszystkim komórki limfoidalne, granulocyty i makrofagi.

W myśl współczesnych poglądów o współdziałaniu komórek w odczynach obronnych ustroju, uważa się, iż każda z tych komórek jak i szereg innych komórek, o których niżej, może być odpowiedzialna w pewnych warunkach za destrukcję guza nowotworowego.

Tak więc w reakcjach immunologicznych typu komórkowego, którym przypisuje się zasadniczą rolę w obronie przeciwnowotworowej zaangażowane są różne subpopulacje limfocytów T, mono-makrofagi, granulocyty obojętnochłonne i kwasochłonne, bazofile i komórki tuczne jak również komórki określane mianem K /killer/ i NK /natural killer/ /7,12, 13, 17, 18, 19, 27, 28, 33, 35, 36, 40, 49, 50, 54, 57, 59, 68, 70, 90, 91, 93, 94, 96/.

W wyniku wielu bardzo intensywnie prowadzonych prac na ten temat zarysowuje się następujący schemat reaktywności organizmu. Pierwszą linię obrony przeciwnowotworowej przypisuje się aktywności zależnej od komórek typu NK. Komórki te posiadają bowiem zdolność uszkodzenia komórek nowotworowych, przy czym ten rodzaj cytotoksyczności jest zjawiskiem naturalnym, występującym bez uprzedniej immunizacji i odbywa się bez udziału dopełniacza i przeciwciał.

Aktywność cytolityczna komórek NK poprzedzona jest połączeniem z komórką nowotworową poprzez odpowiedni receptor rozpoznawczy w wyniku czego dochodzi do lizy komórki nowotworowej. Również tzw. aktywowane makrofagi wykazują nieswoiste działanie cytolityczne w stosunku do komórek nowotworowych. Efekt cytotoksyczny makrofagów ma zależeć m.in. od uwolnionego przez nie nadtlenu wodoru. Mechanizm rozpoznawania przez makrofaga komórki nowotworowej

może być zależny od specyficznych przeciwciał, jak również może być mechanizmem molekularnym, niezależnym od obecności przeciwciał i czynników pochodzenia limfocytarnego /1,2,14,59,89/.

Makrofagi odgrywają prawdopodobnie kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej uczestnicząc w prezentacji antygenów limfocytom T jak również poprzez wydzielanie szerokiego spektrum substancji aktywnych biologicznie takich jak niektóre składowe dopełniacza, interferon, prostaglandyny a także monokiny wpływając na zachowanie się innych komórek takich jak limfocyty T. W ten sposób makrofagi biorą udział również w mechanizmach nieswoistej odporności cytotoksycznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym /13,70,104,105/.

Aktywność komórek NK i makrofagów może być niewystarczająca w stosunku do rozwijającego się guza nowotworowego i stąd uruchomienie innych mechanizmów odczynowości komórkowej. Przede wszystkim stwierdza się, że antygeny guzowe powodują uczulenie różnych populacji limfocytów T. W ten sposób zaktywowane limfocyty T mogą niszczyć komórki nowotworowe poprzez ich swoiste cytotoksyczne uszkodzenie. Również komórki K, które występują w organizmie w warunkach naturalnych mają zdolność cytotoksycznego uszkodzenia komórek nowotworowych uprzednio opłaszczonych przeciwciałami IgG, skierowanymi przeciw ich antygenom powierzchniowym.

W piśmiennictwie z ostatnich lat obserwuje się wyraźny wzrost zainteresowania także rolą komórek układu granulocytarnego w reakcjach organizmu na rozwijający się no-

wotwór /12, 17, 53, 54, 63, 68/.

Obecnie uważa się, iż w odpowiedzi przeciwnowotworowej wykazują one dużą aktywność. Z szeregu prac wynika, iż granulocyty obojętnochłonne mogą oddziaływać bezpośrednio cytotoksycznie na komórki nowotworowe. Mechanizm tej aktywności cytotoksycznej nie jest w pełni jasny, lecz prawdopodobnie zależy od fagocytarnego układu mieloproksydazy i nadtlenu wodoru. Może również zależeć od obecności przeciwciał skierowanych przeciw komórkom nowotworowym. Przyjmuje się, iż reakcja cytotoksyczności granulocytów w stosunku do komórki nowotworowej jest specyficzna immunologicznie. Następną grupę komórek szeregu granulocytarnego, które mogą uczestniczyć w cytotoksycznym uszkodzeniu komórek nowotworowych stanowią granulocyty kwasochłonne.

Istnieje bogate piśmiennictwo dotyczące roli nacieków eozynofilowych w nowotworach u ludzi /12, 53, 63, 72, 73, 74/. Eozynofile mogą najprawdopodobniej uszkadzać komórki zmienione nowotworowo dzięki mechanizmom zależnym od przeciwciał. Czynnikiem powodującymi destrukcję jest zarówno wytwarzanie nadtlenu, halogenacja zależna od eozynoperoksydazy i jonów chloru jak i zasadowe białko eozynofilów /63, 72/.

Stosunkowo najmniej danych opublikowano na temat udziału komórek bazofilnych lub tucznych w tworzeniu się odpowiedzi ustroju obciążonego nowotworem. Wielu badaczy podkreśla jednak ich obecność w różnych typach nowotworów i w różnych fazach ich rozwoju /27, 52, 61/.

Mastocyty występują częściej w nowotworach o bogatym

podścielisku i biologicznie mniej złośliwych. Mechanizm oddziaływania tych komórek jest bardzo złożony i wzbudza wiele dyskusji /27,52,61/.

Jak wynika z tego bardzo krótkiego przeglądu, w odpowiedzi ustroju na pojawienie się komórek nowotworowych wytwarza się odczyn komórkowy ze strony gospodarza, w który zostają włączone liczne komórki różnych układów. Dzięki wzajemnemu oddziaływaniu poszczególnych elementów tego odczynu powstaje dynamiczny i zmienny w czasie naciek w obrębie i w otoczeniu guza, nazywany dawniej umownie "naciekiem zapalnym". Skład i liczba komórek biorących udział w tym odczynie, a przede wszystkim stopień ich aktywności ma w określonych warunkach decydujące znaczenie w procesie hamowania wzrostu nowotworowego lub jego regresji.

Jakie czynniki decydują o liczbie i składzie komórek odczynowych ?

Niewątpliwie skład cytologiczny tego odczynu zależy od różnych czynników, do których należy przede wszystkim: stan ogólny i immunologiczny gospodarza guza, a między innymi możliwość produkcji prawidłowych i aktywnych komórek immunologicznie kompetentnych, pochodzenie histogenetyczne guza, a z drugiej strony współistnienie mechanizmów chroniących nowotwór przed destrukcją przy udziale komórek odczynowych zdolnych do rozpoznawania antygenów guzowych i produkcji przeciwciał, szybkości replikacji komórek nowotworowych, która często przewyższa tempo podziałów komórek odczynowych.

Odrębne zagadnienie stanowią występujące różnice fenotypowe wśród komórek nowotworowych, co może znacznie utrudniać ich rozpoznawanie i niszczenie przez komórki odczynowe /6,103/.

W świetle powyższych, wciąż dyskusyjnych danych przedstawione badania własne miały na celu umożliwienie precyzyjnego udokumentowania tego bardzo dynamicznego obrazu jakim jest reakcja organizmu na rozwijający się nowotwór. Badania te stanowiły również punkt wyjścia do dalszych założeń prac doświadczalnych Zakładu Patofizjologii Instytutu Patologii, których celem były próby modyfikacji liczby i składu nacieku z komórek odczynowych u gospodarza guza poddanego immunostymulacji wyciągami z grasic cielęcych /Program Rządowy nr 6 "Zwalczanie chorób nowotworowych"/.

WNIOSKI

1. Stwierdzono, iż w naturalnych warunkach doświadczeń każdy z trzech badanych nowotworów przeszczepialnych tj. mięsak płuc /SaL₁/ ,rak płuc Lewis /LLC/ oraz mięsak metylocholanantrenowy /MCA-Sa/ różnią się:
 - a/ tempem wzrostu
 - b/ odsetkiem i składem komórek odczynowych tj. granulocytów, limfocytów /T/ i makrofagów,
 - c/ zmianami w zakresie komórek odczynowych w trakcie rozwoju guza, ze zmniejszeniem się odsetka tych komórek w miarę powiększania się masy guza.

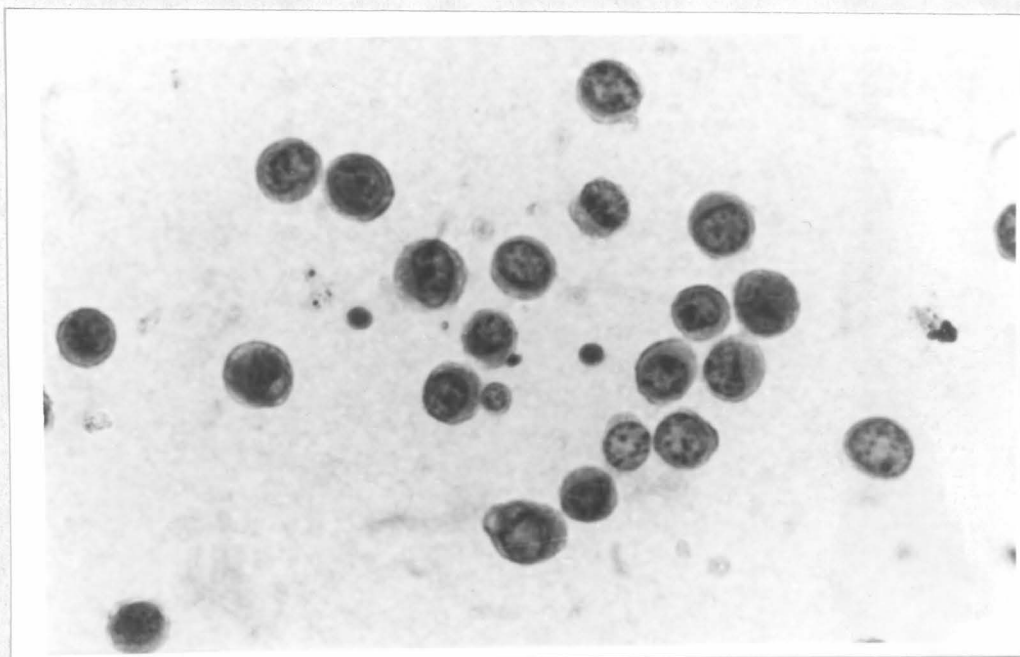
2. Wykazano, iż immunosupresja wywołana przez napromienienie gospodarza guza powoduje:
 - a/ zmianę tempa wzrostu guzów ze znamienym przyspieszeniem wzrostu guzów SaL₁ i LLC,
 - b/ zaburzenia w proporcjach komórek nowotworowych do odczynowych i zmiany w składzie tych komórek,
 - c/ charakterystyczne obniżenie się liczby krwinek białych we krwi /leukopenia/ we wszystkich trzech modelach doświadczalnych.

ZDJECIA

Zdjęcie 1.

Komórki odczynowe i nowotworowe w zawieszynie z guza SaL₁.

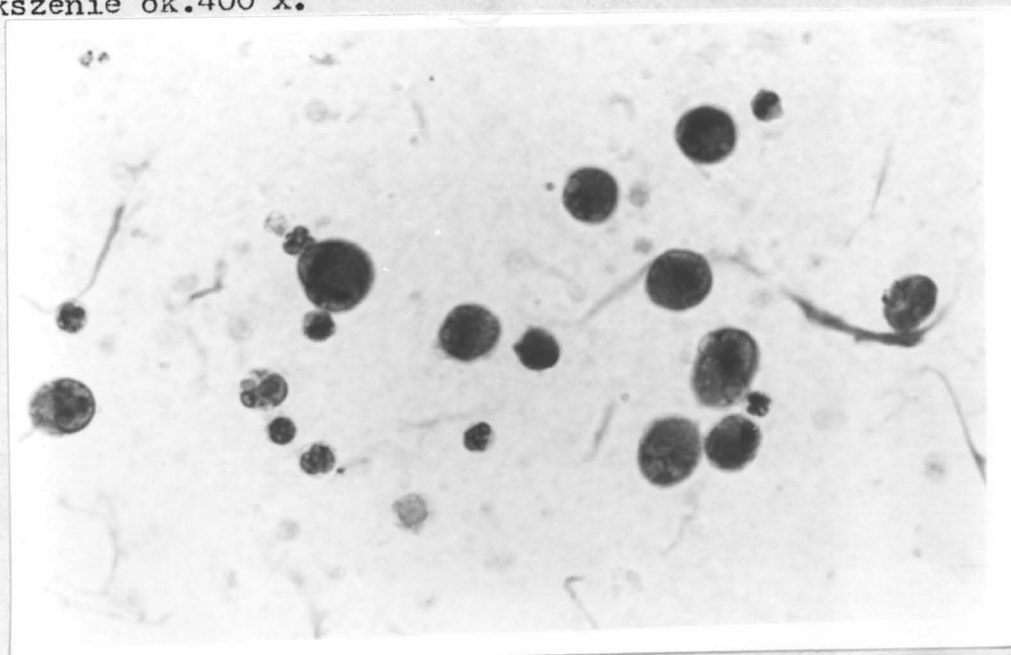
Powiększenie ok.400 x.



Zdjęcie 2.

Komórki odczynowe i nowotworowe w zawieszynie z guza LLC.

Powiększenie ok.400 x.



Zdjęcie 3.

Komórki odczynowe i nowotworowe w zawieszynie z guza MCA-Sa.
Powiększenie ok.400 x.

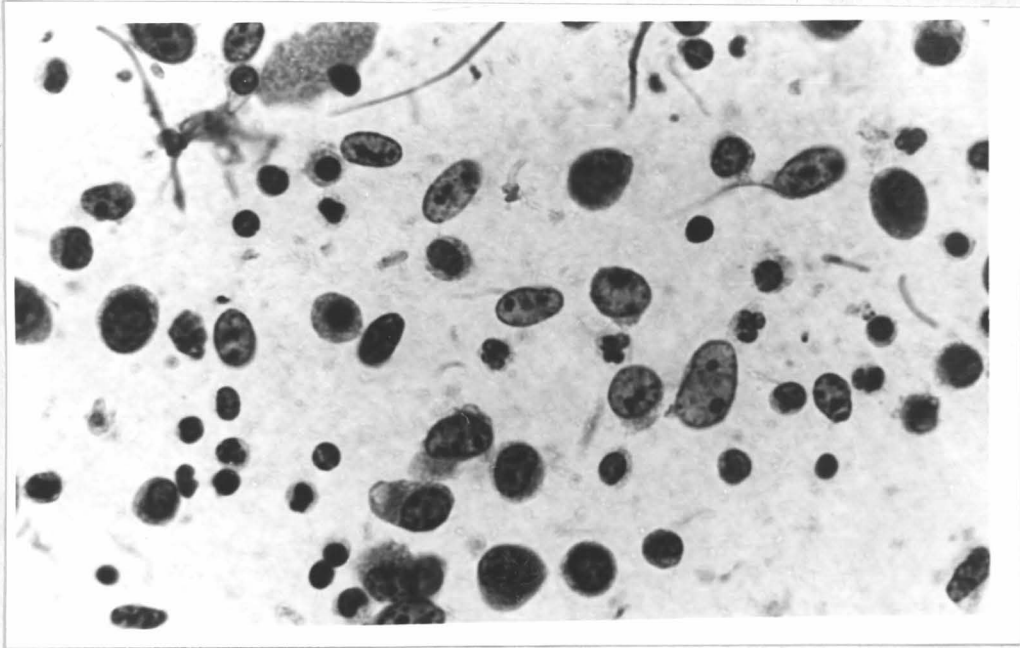


Tabela 15.

Szybkość wzrostu.

Porównanie 3 typów guzów przeszczepialnych.

Dzień wzrostu guza	średnica guzów w mm - wartości średnie		
	SaL ₁	LIC	MCA-Sa
7	0,44 ± 0,52	1,15 ± 1,2	2,25 ± 1,11
9	1,10 ± 2,26	-	3,8 ± 1,41
12	3,50 ± 3,96	3,42 ± 3,15	8,17 ± 1,73
15	6,40 ± 5,36	6,35 ± 3,61	11,43 ± 0,98
18	7,80 ± 5,24	10,71 ± 5,1	12,5 ± 0,90

Tabela 16:

Szybkość wzrostu.

Porównanie 3 typów guzów przeszczepialnych u myszy
napromienionych.

Dzień wzrostu guza	średnica guzów w mm - wartości średnie		
	300 r + SaL ₁	300 r + LIC	300 r + MCA-Sa
7	0,25 ± 0,46	2,66 ± 1,96	2,1 ± 1,17
9	0,75 ± 1,03	-	3,1 ± 1,44
12	6,30 ± 2,14	3,36 ± 3,76	8,03 ± 2,54
15	7,50 ± 2,80	7,3 ± 2,88	11,3 ± 2,22
18	10,01 ± 3,67	14,18 ± 2,04	14,2 ± 2,22

Tabela 17.

Odsetek komórek odczynowych w obrębie trzech typów guzów przeszczepialnych tj. SaL₁, LLC, MCA-Sa.

Guz	średnica guzów w mm /wartości średnie/		
	3-5	6-8	10-12
SaL ₁	10,00 ± 1,68	6,50 ± 2,55	6,40 ± 1,90
LLC	8,10 ± 1,94	5,60 ± 0,92	5,20 ± 2,27
MCA-Sa	23,4 ± 1,23	17,6 ± 1,42	14,9 ± 1,32

Tabela 18.

Odsetek komórek odczynowych w obrębie trzech typów guzów przeszczepialnych tj. SaL₁, LLC, MCA-Sa u zwierząt uprzednio napromienionych dawką 300 radów.

Guz	średnica guzów w mm /wartości średnie/		
	3-5	6-8	10-12
SaL ₁	10,43 ± 1,06	33,46 ± 13,4	12,03 ± 2,47
LLC	16,52 ± 5,36	9,95 ± 0,99	13,42 ± 7,01
MCA-Sa	5,73 ± 0,78	4,05 ± 0,67	3,95 ± 1,16

Tabela 19.

Porównanie składu nacieków z komórek odczynowych u zwierząt obciążonych guzami SaL₁, LLC, MCA-Sa.

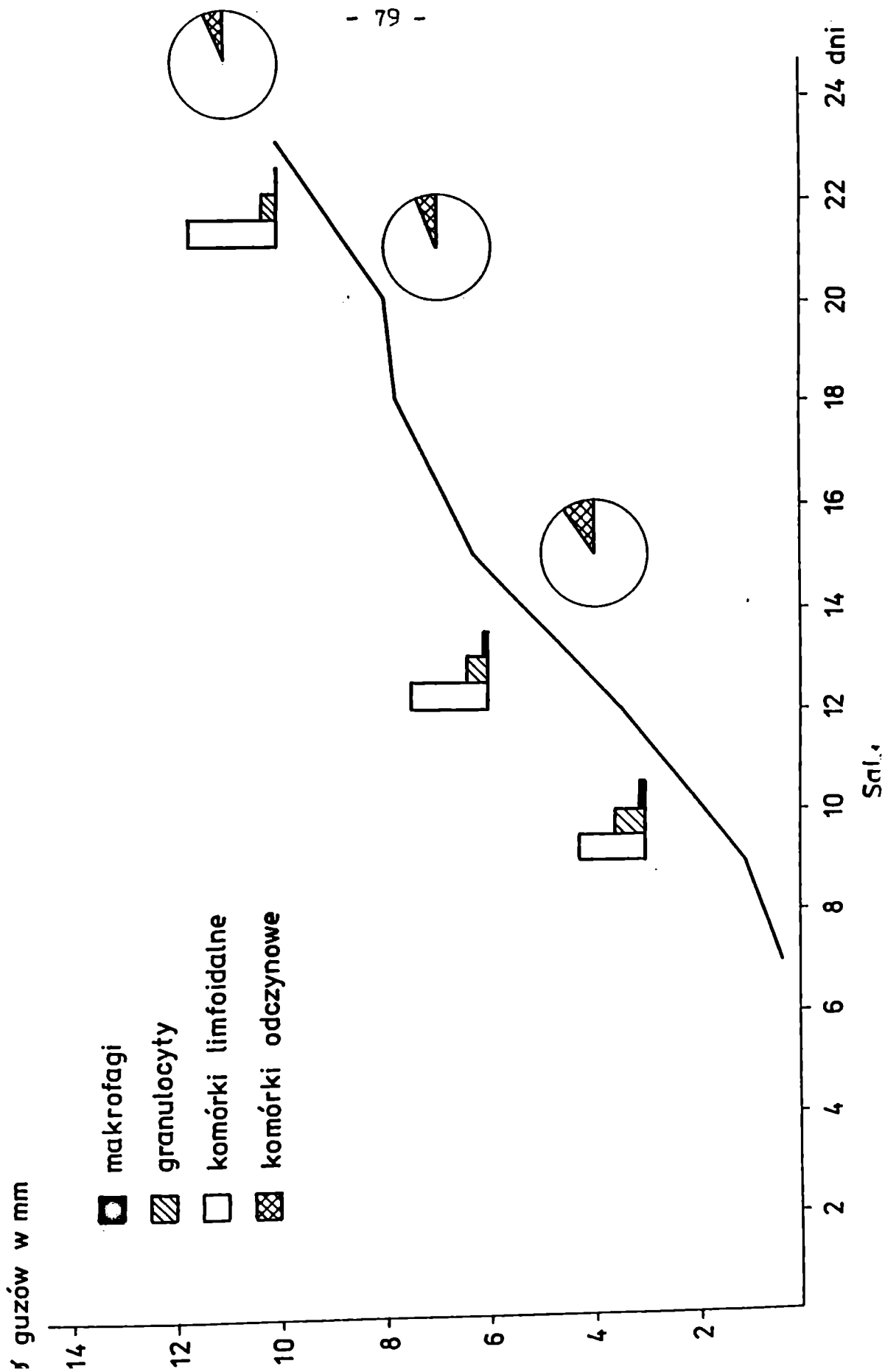
Komórki	Guz	średnica guzów w mm /wartości średnie/		
		3-5	6-8	10-12
Komórki limfo- idalne	SaL ₁	65,71 ± 5,60	76,80 ± 2,30	84,70 ± 11,50
	LLC	13,70 ± 2,80	16,2 ± 8,0	14,0 ± 4,4
	MCA-Sa	66,10 ± 5,60	70,50 ± 6,30	88,00 ± 5,60
Granulo- cyty	SaL ₁	28,60 ± 5,70	20,50 ± 3,80	14,10 ± 10,40
	LLC	81,00 ± 4,10	78,60 ± 8,60	79,20 ± 5,30
	MCA-Sa	29,40 ± 4,50	26,60 ± 7,10	10,35 ± 4,50
Makro- fagi	SaL ₁	5,60 ± 2,60	3,00 ± 3,40	1,10 ± 2,00
	LLC	5,20 ± 2,80	5,10 ± 2,20	6,30 ± 2,80
	MCA-Sa	4,40 ± 2,10	2,90 ± 2,40	1,60 ± 2,20

Tabela 20.

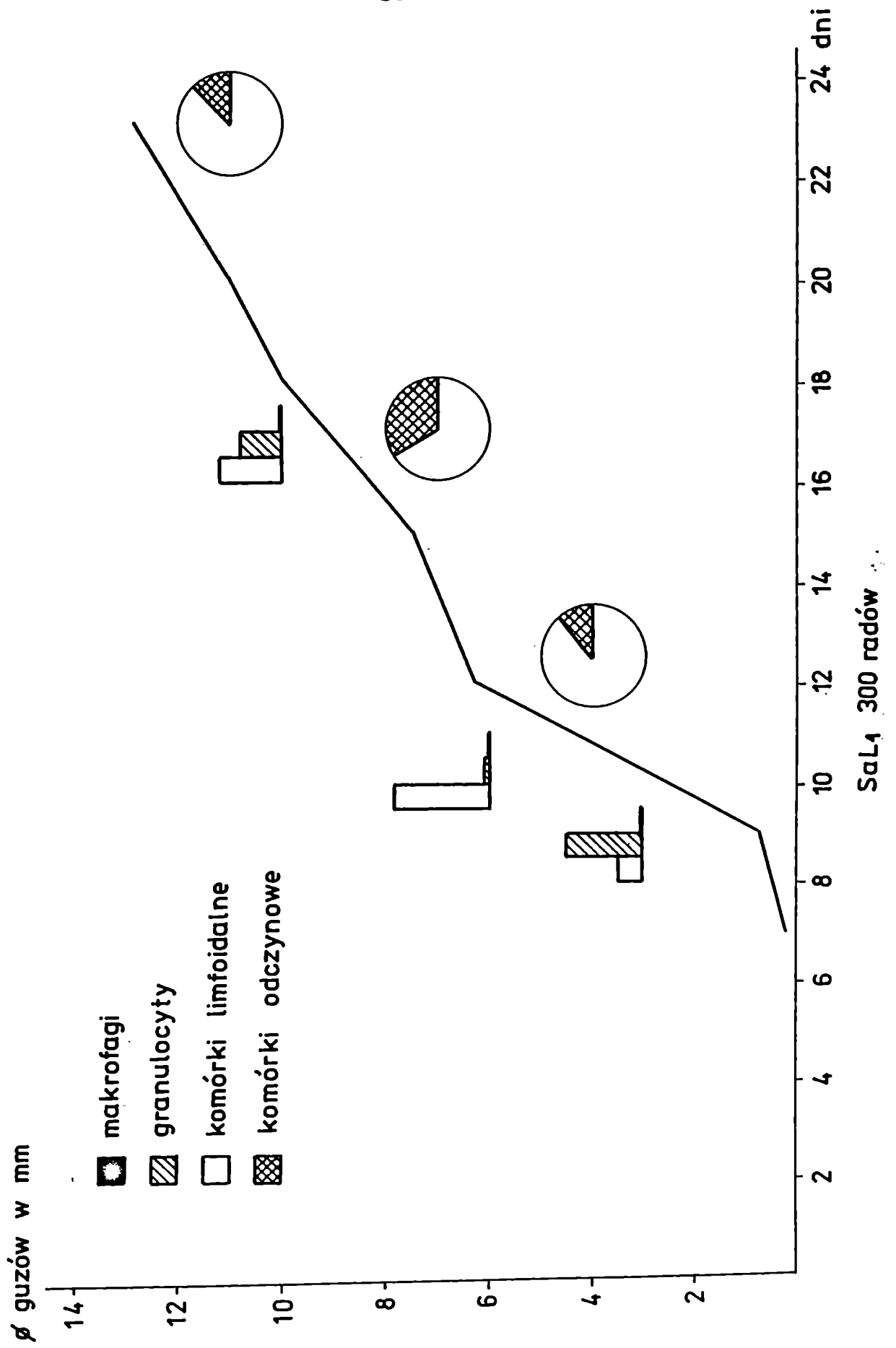
Porównanie składu nacieków z komórek odczynowych u zwierząt napromienionych dawką 300 radów i następnie obciążonych guzami SaL₁, LLC, MCA-Sa.

Komórki	Guz	średnica guzów w mm /wartości średnie/		
		3-5	6-8	10-12
Komórki limfo- idalne	SaL ₁	23,50 ± 11,00	96,50 ± 2,60	56,70 ± 12,70
	LLC	24,90 ± 11,60	31,65 ± 9,9	48,60 ± 10,60
	MCA-Sa	48,40 ± 10,13	83,70 ± 3,60	62,80 ± 3,80
Granulo- cyty	SaL ₁	74,50 ± 11,90	2,85 ± 2,70	42,30 ± 12,70
	LLC	73,90 ± 10,70	67,70 ± 9,60	50,70 ± 10,50
	MCA-Sa	50,70 ± 8,10	15,20 ± 5,10	36,80 ± 3,60
Makro- fagi	SaL ₁	1,90 ± 2,10	0,60 ± 0,80	0,90 ± 0,90
	LLC	0,60 ± 0,80	0,90 ± 1,80	0,60 ± 1,30
	MCA-Sa	0,80 ± 1,10	0,50 ± 0,70	0,20 ± 0,40

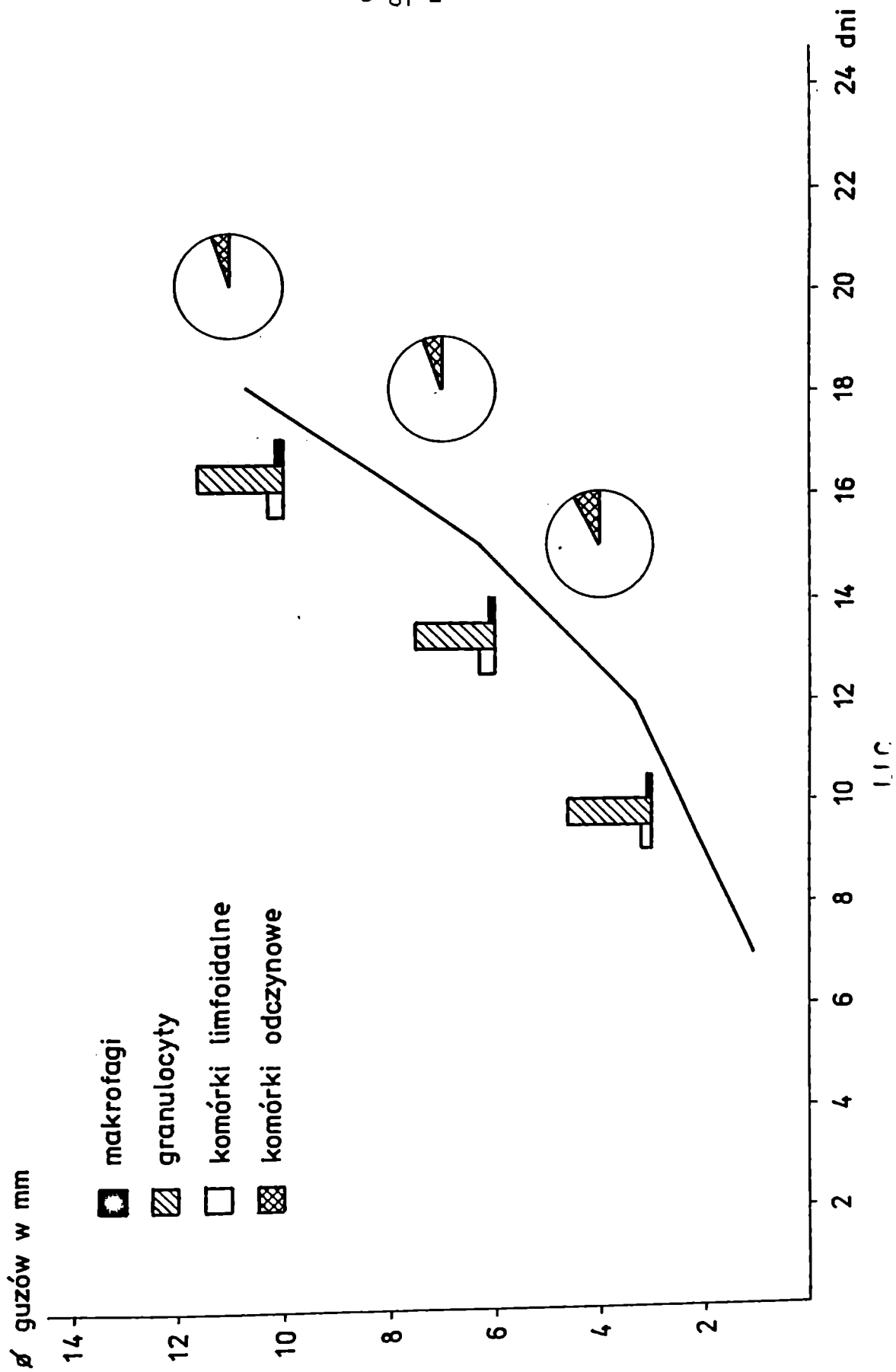
ryc. 44



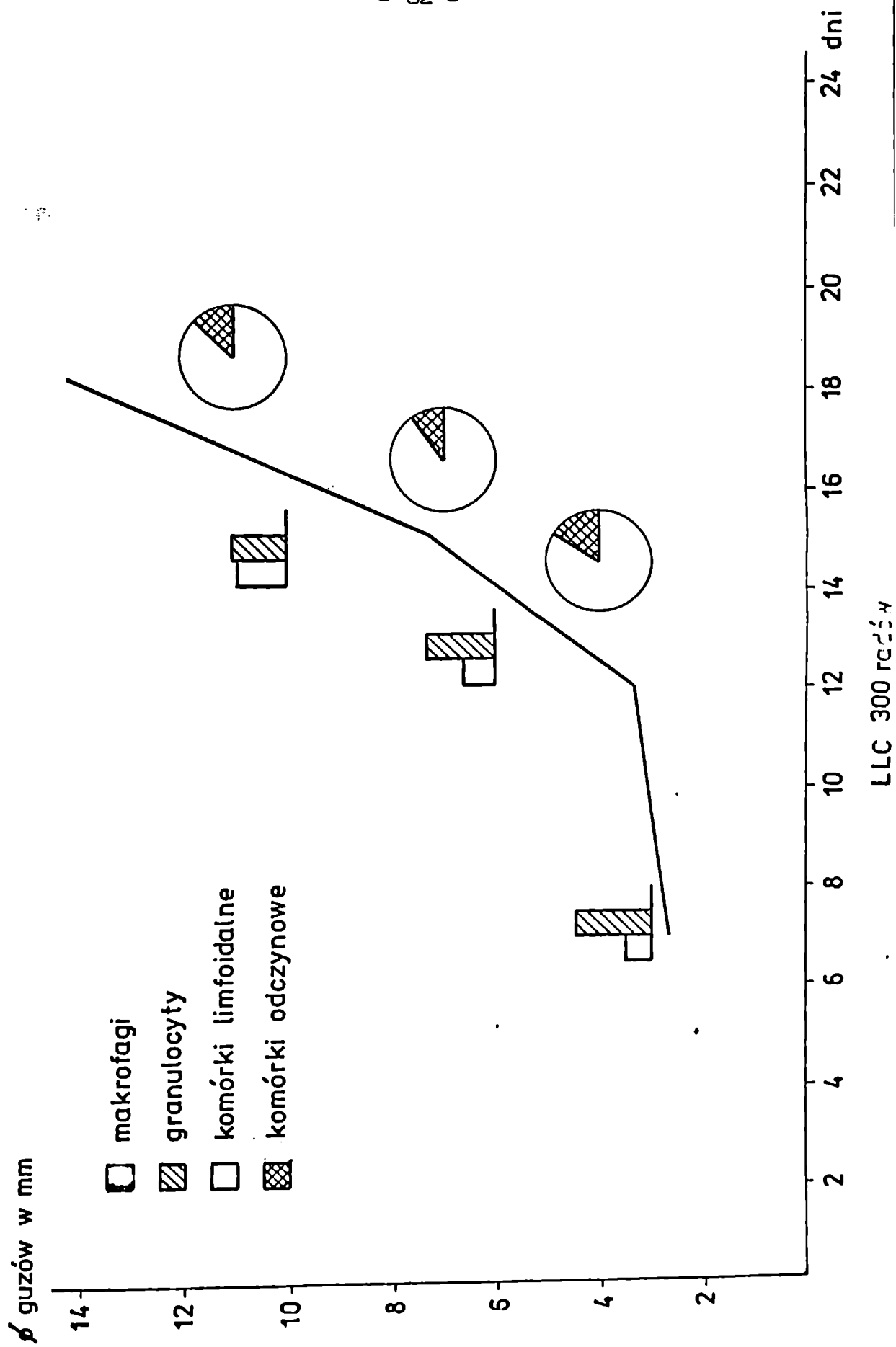
Ryc. 23



Ryc. 24

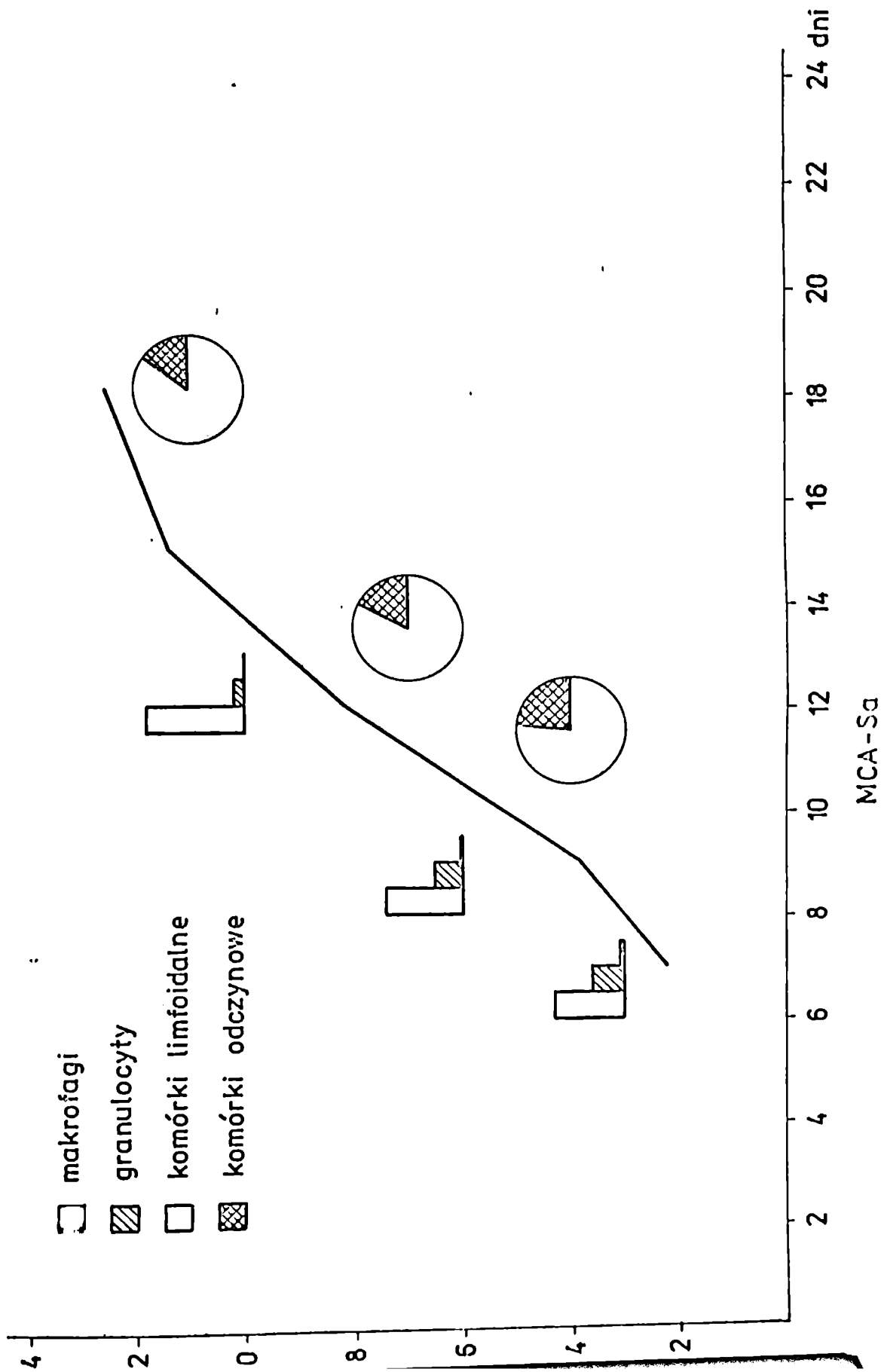


Ryc . 25



Ryc. 25

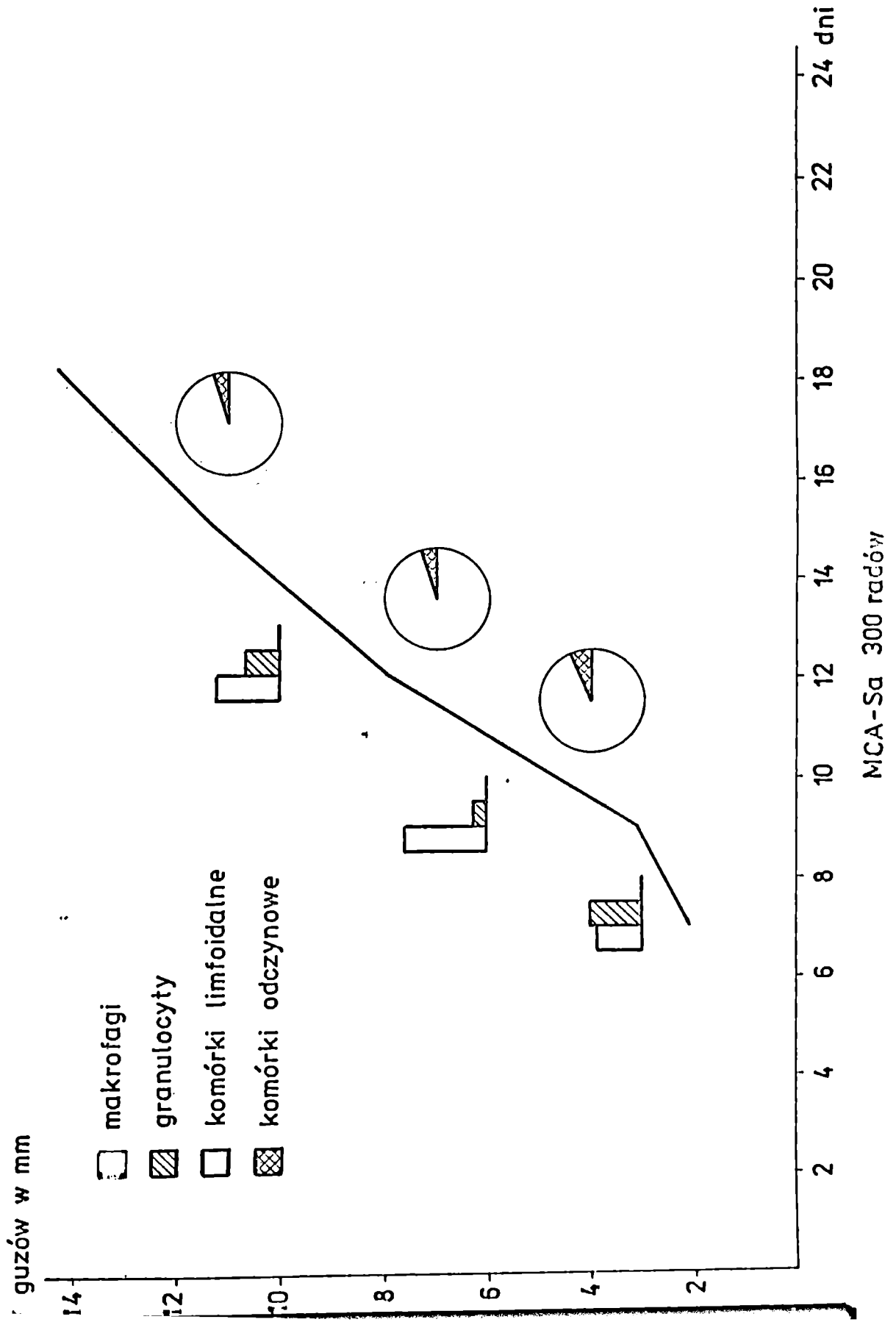
guzów w mm



- makrofagi
- ▨ granulocyty
- ▤ komórki limfoidalne
- ▩ komórki odczynowe

MCA-Sa

Ryc. 27



STRESZCZENIE

Przeprowadzono badania dotyczące liczby i składu nacieku z komórek odczynowych w trzech typach przeszczepialnych nowotworów tj. mięsaku płuc SaL₁ u myszy szczepu Balb/c, raku płuc Lewis LLC i mięsaku indukowanym metylocholan-trenem MCA-Sa u myszy szczepu C₅₇Bl.

Stwierdzono znaczne różnice w obfitości i składzie nacieku z komórek odczynowych zależne od typu nowotworu, fazy wzrostu guza, stanu odporności ogólnej gospodarza guza. Wykazano, iż zmiana reaktywności gospodarza guza przez napromienienie dawką 300 radów na całe ciało powodowało stan immunosupresji wiążący się z licznymi odchyleniami dotyczącymi liczby i składu jakościowego nacieku z komórek odczynowych w obrębie badanych guzów przeszczepialnych w kolejnych fazach ich wzrostu. Oceniając szybkość wzrostu guzów SaL₁ i LLC w zwykłych warunkach doświadczalnych i po uprzedniej immunosupresji gospodarza guza wykazano, że tempo wzrostu guzów w początkowym okresie jest podobne i ulega przyspieszeniu w końcowym okresie obserwacji w grupach zwierząt poddanych napromienieniu. Natomiast wzrost guzów MCA-Sa zarówno w zwykłych warunkach doświadczalnych jak też w warunkach immunosupresji nie ulegał zasadniczym zmianom w ciągu całej obserwacji. We wszystkich badanych guzach liczba komórek odczynowych zmniejszała się w miarę powiększania się masy guza. Immunosupresja gospodarza guza spowodowała różne zachowanie się komórek odczynowych tj. zmniejszenie się liczby komórek odczynowych w obrębie

guza MCA-Sa, a zwiększenie liczby komórek odczynowych w obrębie guzów SaL₁ i LLC.

Analiza cytologiczna nacieków z komórek odczynowych wykazała znaczne różnice ich składu w poszczególnych guzach przeszczepialnych. I tak stwierdzono, iż w obrębie guzów SaL₁ i MCA-Sa najliczniejszą pulę nacieku odczynowego stanowiły komórki limfoidalne. Drugą co do liczebności pulę komórek odczynowych stanowiły granulocyty, a najmniej liczne były makrofagi.

W trakcie wzrostu guzów SaL₁ i MCA-Sa zaobserwowano stałe zwiększanie się liczby komórek limfoidalnych. Liczba granulocytów i makrofagów zmniejszała się proporcjonalnie w kolejnych fazach wzrostu guzów.

W obrębie guza LLC najliczniejszą pulę komórek nacieku odczynowego stanowiły granulocyty. Drugą co do liczebności pulą były komórki limfoidalne, a najmniej liczne makrofagi.

Skład nacieku odczynowego był podobny w kolejnych fazach wzrostu guzów LLC.

W warunkach immunosupresji gospodarza guza skład komórkowy nacieku zmieniał się w następujący sposób.

W obrębie guzów SaL₁ i MCA-Sa stwierdzono zwiększenie się liczby granulocytów i proporcjonalne zmniejszenie liczby komórek limfoidalnych i makrofagów. W trakcie wzrostu guzów SaL₁ i MCA-Sa obserwowano niecharakterystyczne zmiany wzajemnych proporcji komórek nacieku odczynowego. Stwierdzono również zmiany w składzie nacieku odczynowego w obrębie guza LLC. W obrębie tego guza w składzie na-

cieku odczynowego obserwowano w zakresie trwania eksperymentu zwiększenie liczby komórek limfoidalnych i proporcjonalne zmniejszenie liczby granulocytów i makrofagów.

Na podstawie powyższych obserwacji można stwierdzić, że zmiany dotyczące tempa wzrostu badanych guzów nowotworowych oraz związku z liczbą i składem komórek odczynowych w obrębie guzów są wypadkową wielu różnych czynników odnoszących się zarówno do biologii samego guza jak również stanu ogólnego immunologicznego gospodarza guza.

PISMIENNICTWO

1. Adams D.O., Snyderman R. Guest editorial: Do macrophages destroy nascent tumors? *J.Natl.Cancer Inst.*, 1979,62: 1341.
2. Alexander P., Eccles S.A., Gauci C.L. The significance of macrophages in human and experimental tumors. *Ann. N.Y.Acad.Sci.*, 1976,276:124.
3. Ando K., Peters L.J., Hunter N., Jinnouchi K., Matsumoto T. Inhibition of artificial and spontaneous lung metastases by preirradiation of abdomen. II. Target organ and mechanisms. *Br.J.Cancer*, 1983,47:73.
4. Auerbach R. Host factors influencing the growth and spread of tumors. *Biological Responses in Cancer*. Plenum Publishing Corporation, 1982,1:249.
5. Baldwin R.W., Byers V.S., Hannant D., Jones J.A., Pimm M.V., Price M.R. Cellular interactions modulating host resistance to tumours. *Cancer Res.*, 1982,80:338.
6. Baldwin R.W., Klein G.. Sapporo Cancer Seminar: Escape of tumor cells from immune controls. *Cancer Res.*, 1982,42: 1608.
7. Balm F.A.J., Drexhage H.A., von Blombreg M., Weltevreden E.F., Veldhuizen R.W., Mullink R., Snow G.B. Mononuclear phagocyte function in head and neck cancer. Chemotactic responsiveness of blood monocytes in correlation between histologic grade of the tumor and infiltration of these cells into the tumor area. *Cancer*, 1984,53:1010.
8. Bellelli L., Sezzi M.L., Tirabassi A., Ippoliti F. Immunogenicity of Lewis lung carcinoma in C₅₇Bl/6 mice. I. Tumor-associated antigen/s/ in peripheral blood, thymus

- and spleen of tumor-bearing mice. *Tumori*, 1982,68:373.
9. Bellgrau D., Zoller M. Cytotoxic T lymphocyte responses to spontaneous tumors: Immunogenicity dependent on the recognition of processed tumor antigens. *J.Immunol.*, 1983,130:2005.
 10. Bhan A.K., Perry L.L., Cantor H., Mc Cluskey R.T., Benacerraf B., Green M.I. The role of T cell sets in the rejection of a methylchlantherene-induced sarcoma in syngeneic mice. *Am.J.Pathol.*, 1981,102:20.
 11. Bhan A.K., Des Marais C.L. Immunohistologic characterization of major histocompatibility antigens and inflammatory cellular infiltrate in human breast cancer. *J.Natl. Cancer Inst.*, 1983,71:507.
 12. Bostrom S.G., Hart W.R. Carcinomas in the cervix with intense stromal eosinophilia. *Cancer*, 1981,47:2887.
 13. Brown R., Wolman M. Differentiation of macrophages from Lewis lung carcinoma tumour cells in tissue sections by their alfa-naphthyl butyrate esterase activity. *Histochem. J.*, 1981,13:975.
 14. Burns G.F., Good M.F., Riglar C., Bartlett P.F., Crapper R.M., Mackay J.R. Activated lymphocyte killer cells derived from melanoma tissue or peripheral blood. *Clin.Exp.Immunol.*, 1984,57:487.
 15. Cameron D.J., O'Brien P. Cytotoxicity of cancer patients macrophages for tumor cells. *Cancer*, 1982,50:498.
 16. Cameron D.J., Stromberg B.V. The ability of macrophages from head and neck cancer patients to kill tumor cells. Effect of prostaglandin inhibitors on cytotoxicity. *Cancer*, 1984,54:2403.

17. Clark R.A., Klebanoff S.F. Studies on the mechanisms of antibody-dependent polymorphonuclear leukocyte-mediated cytotoxicity. *J.Immunol.*, 1977,119:1413.
18. Dvorak H.F., Dickersin G.R., Dvorak A.M., Manseau E.J., Pyne K. Human breast carcinoma: Fibrin deposits and desmoplasia. Inflammatory cell type and distribution microvasculature and infarction. *J.Natl. Cancer Inst.*, 1981,67:335.
19. Eremin O., Coombs R.R., Ashby J. Lymphocyte infiltrating human breast cancers lack K-cell activity and show low levels of NK-cell activity. *Br.J.Cancer*, 1981,44:166.
20. Evans R. The effect of azathioprine on host infiltration and growth of a murine fibrosarcoma. *Int.J.Cancer*, 1977, 20:120.
21. Evans R. Failure to relate the anti-tumour action of cyclophosphamide with the immunogenicity of two murine fibrosarcomas. *Int.J.Cancer*, 1978,21:611.
22. Evans R. Host cells in transplanted murine tumors and their possible relevance to tumor growth. *J.Reticulo-endothelial.Soc.* 1979,26:427.
23. Evans R. Further observations on the effect of cyclophosphamide on intratumor and peripheral leukocyte levels. *Am.J.Pathol.*, 1980,99:667.
24. Evans C.H. Lymphotoxin-an immunologic hormone with anticarcinogenic and antitumor activity. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1982,12:181.
25. Evans R., Madison L.D., Eidlen D.M. Cyclophosphamide-induced changes in the cellular composition of a methyl-chlathrene-induced tumor and their relation to bone

- marrow and blood leukocyte levels. *Cancer Res.*, 1980, 40:395.
26. Farbiszewski R. Hormono-podobne czynniki tkankowe transformujące wzrost komórek. *Post.Biochem.*, 1984,30:9.
 27. Farram E., Nelson D.S. Mouse mast-cells as anti-tumor effector cells. *Cancer*, 1981,47:525.
 28. Fidler I.J., Poste G. Macrophage-mediated destruction of malignant tumor cells and new strategies for the therapy of metastatic disease. *Springer Semin. Immunopathol.*, 1982,5:161.
 29. Furukawa T., Watanabe S., Kodama T., Sato Y., Shimosato T., Suemasu K. T-zone histiocytes in adenocarcinoma of the lung in relation to postoperative prognosis. *Cancer*, 1985,56:2651.
 30. Gorelik E., Segal S., Feldman M. On the mechanism of tumor concomitant immunity. *Int.J.Cancer*, 1981,27:847.
 31. Haskill J.S., Becker S., Fowler W., Walton I. Mononuclear cell infiltration in ovarian cancer. *Br.J.Cancer*, 1982,45:728.
 32. Haskill J.S., Key M., Radov L.A., Parthenais E., Korn J.H., Fett J.W., Yamamura Y., De Lusto F., Vesley J., Gant G. The importance of antibody and macrophages in spontaneous and drug-induced regression of the T 1699 mammary adenocarcinoma. *J.Reticuloendothelial.Soc.*, 1979,26:417.
 33. Haskill J.S., Proctor J.W., Yamamura Y. Host responses within solid tumors. I. Monocytic effector cells within rat sarcomas. *J.Natl.Cancer Inst.*, 1975,54:124.

34. Haskill J.S., Yamamura Y., Radov L. Host responses within solid tumors. Non thymus derived specific cytotoxic cells within a murine mammary adenocarcinoma. *Int.J.Cancer*, 1975,16:789.
35. Herberman R.B. Possible role of natural killer cells in host resistance against tumors and other disease. *Clin.Immunol.Allerg.*, 1983,3:479
36. Herberman R.B. Overview on NK cells and possible mechanisms for their cytotoxic activity. *Adv.Exp. Med.Biol.*, 1982,146:337.
37. Hiratsuka H., Imamura M., Ishii Y., Kohama G.I., Kikuchi K. Immunohistologic detection of lymphocyte subpopulations infiltrating in human oral cancer with special reference to its clinical significance. *Cancer*, 1984,53:2456.
38. Holden H., Haskill J.S., Kirchner H., Herberman R.B. Two functionally distinct anti-tumor effector cells isolated from primary murine sarcoma virus-induced tumours. *J.Immunol.*,1976,117:440.
39. Hurley D.J., Waisbren B.A., Guttman R.M., Sigesmund K.A. Human lymphocyte tumor cell interaction. A scanning electron microscope study. *JAMA*, 1979,241:2631.
40. Husby G., Hoagland F.M., Strickland R.G., Williams R.C. Tissue T and B cell infiltration of primary and metastatic cancer. *J.Clin.Invest.*, 1976,57:1471.
41. Inglot A.D. Kilka uwag z kontroli wzrostu i różnicowania komórek przez hormono-podobne czynniki tkankowe. *Post.Biochem.*, 1984,50:5.

42. Ioachimi H.L., Dorsett B.H., Paluch E. The immune response at the tumor site in lung carcinoma. *Cancer*, 1976,38:2296.
43. Ishii Y., Matsuura A., Takami T., Uede T., Ibayashi Y., Imamura M., Kikuchi K., Kikuchi Y. Lymphoid cell subpopulations infiltrating into autologous rat tumors undergoing rejection. *Cancer Res.*, 1984,44:4053.
44. Israel L., Samak R., Edelstein R., Amouroux J., Battesti J.P., de Saint Florent O. In vivo nonspecific macrophage chemotaxis in cancer patients and its correlation with extent of disease, regional lymph node status and disease-free survival. *Cancer Res.*, 1982,42:2489.
45. Jacqumier J., Robert-Vague D., Torrente M., Lieutaud R. The distribution of epithelial and lymphoplasmatic immunoglobulins in infiltrating carcinomas with a lymphoid stroma and medullary carcinomas of the breast. *Arch.Anat. Cytol.Path.*, 1983,31:296.
46. James K., Cullen R.T., Howie S., Merriman J., Milne I., Moore K. Tumor-associated immunoglobulins and host cell infiltration. *Cancer Immunol.Immunother.*, 1981,10:99.
47. Janik P. Kinetyka i mechanizmy zmian w populacji komórkowej w zatrzymanym wzroście lub zanikających w następstwie odczynów immunologicznych organizmu. *Post.Biol.Kom.*1977, 4:405.
48. Janik P. Rola mikrośrodowiska tkankowego w odporności na proces nowotworowy. *Pol.Tyg.Lek.*, 1983,XXXVIII:705.
49. Janik M., Lipski S. Komórki cytotoksyczne typu NK-charakterystyka i rola w odporności przeciwnowotworowej. *Post.Hig.Med.Dośw.*, 1982,36:95.

50. Jaszcz W., Chłap Z., Rzepecki W., Garlicki A., Matzke E., Dąbroś E. Badania nad składem nacieków z komórek odczynowych w nowotworach przeszczepialnych u myszy. *Fol. Med.Cracoviens.*, 1984,XXV:319.
51. Jessup J.M., Kahan B.D., Pellis N.R. Mechanisms of immunosuppression in tumor-bearing mice: a multifactorial analysis. *Cancer*, 1982,49:1158.
52. Jodczyk K.J. Występowanie komórek tucznych w podścielisku przewlekłych wrzodów i raków ściany żołądka. *Ann.Acad.Med.Bialostoc.*, 1972,23.
53. Jong E.C., Klebanoff S.J. Eosinophil - mediated mammalian tumor cell cytotoxicity: role of the peroxidase system. *J.Immunol.*, 1980,124:1949.
54. Katano J., Torisu M. Neutrophil-mediated tumor cell destruction in cancer ascites. *Cancer*, 1982,50:62.
55. Kelly J.W., Sagebiel R.W., Blois M.S. Regression in malignant melanoma. *Cancer*, 1985,56:2287.
56. Klein G. Lymphocyte-mediated lysis of tumor cells in vitro antigen-restricted clonal and unrestricted polyclonal effects. *Springer Semin. Immunopathol.* 1982,5:147.
57. Klein E., Becker S., Svedmyr E., Jondal M., Vanky F. Tumor infiltrating lymphocytes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1980,36:207.
58. Koyama S., Fukao K., Fujimoto S. The generation of interleukin 2 dependent suppressor T-cells from patients with systemic metastasis of gastric carcinoma and the phenotypic characterization of the cells defined by monoclonal antibodies. *Cancer*, 1985,56:2457.

59. Lasser A. The mononuclear phagocytic system: A review. *Human Pathol.*, 1983,14:108.
60. Lawler E.M., Prehn R.T. Influence of immune status of host on immunogenicity of tumors induced with two doses of methylocholanthrene. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1982,13:194.
61. Lescano E.F. Mast cells in human tumors. *Cancer*, 1958, 11:1110.
62. Lipińska R., Szymańska D., Kłosińska-Kita E., Roszkowski W. Nacieki makrofagów w raku płuc. *Immunol.Pol.*, 1982,VII: 273.
63. Lowe D., Jorizzo J., Hutt M.R.S. Tumor-associated eosinophilia: a review. *J.Clin.Pathol.*, 1981,34:1343.
64. Mauriac L., Wafflart J., Trojani M., Durand M. Les cancers du sein inflammatoires:correlation entre anatomopathologie et dosage des recepteurs steoridiens. *Bull.Cancer*,1983, 70:160.
65. Mayo J.G. Biologic characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor. *Cancer Chemther.Rep.*, 1972, 3:325.
66. Mc Cabe R.P., Oneson R., Evans C.H. Mechanism of natural delayed-type hypersensitivity reactions to tumor cells in nonimmunized syngeneic guinea pigs. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1984,17:76.
67. Mendiondo O., Suit H., Phil D., Fixler H. Lysozyme levels and macrophage content of tumor tissue in C3H mice bearing fibrosarcoma transplants treated by radiation and *Corynebacterium parvum*. *Int.J.Radiat.Oncology Biol.Phys.*, 1978, 4:829.

68. Merkiel K. Granulocyty wielojądrzaste jako komórki efektorowe w reakcji cytotoksycznej przeciwko komórkom nowotworowym. *Nowotwory*, 1982, XXXII:97.
69. Minassian A.A., Kadagidze Z.G. Suppressor cells in melanoma and lung cancer: correlation with the clinical stage. *Neoplasma*, 1983,30:153.
70. Nelson D.S., Kearney R. Macrophages and lymphoid tissues in mice with concomitant tumor immunity. *Br.J.Cancer*, 1976,34:221.
71. Neuwelt E.A., Kikuchi K., Hill S., Lipsky P., Frenkel E.J. Immune responses in patients with brain tumors. *Cancer*, 1983,51:248.
72. Noirot C., Leynadier F., Luce H., Abuaf N., Bernard F., Dry J. Hypereosinophilie au cours des cancers et des cirrhoses: interet du compte absolu des eosinophiles. *Sem.Hop.*, 1982,58:133.
73. Pastrnak A., Jansa F. Local eosinophilia in stroma of tumors related to prognosis. *Neoplasma*, 1984,31:323.
74. Pierard G.E., Pierard-Franchimont C., Letot B., Chrisophe J. Epitheliomas spinocellulaires infiltrés par des polynucleaires eosinophiles. *Ann.Pathol.*, 1985,5:325.
75. Pitot H.C. The natural history of neoplastic development: The relation of experimental models to human cancer. *Cancer*, 1982,49:1206.
76. Radov L.A., Haskill J.S., Korn J. Host immune potentiation of drug responses to a murine mammary adenocarcinoma. *Int.J.Cancer*, 1976,17:775.

77. Ravikumara T., Steele G., Rodrick M., Ross D., Wilson R., Lahey S., Wright D., Munroe A., King V. Effect of tumor growth on interleukins and circulating immune complexes. Mechanisms of immune unresponsiveness. *Cancer*, 1984,53:1373.
78. Russel S., Doe W.F., Hoskins R.G., Cochrane C.G. Inflammatory cells in solid murine neoplasms. I. Tumour disaggregation and inditification of constituent inflammatory cells. *Int.J.Cancer*, 1976,18:322.
79. Ryden S., Bergquist L., Hafstrom L., Strand S.E. Reticuloendothelial function in normal and tumor-bearing rats. *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.*,1983,19:965.
80. Rygaard J., Povlsen C.O. The nude mouse vs the hypothesis of immunological surveillance. *Transplant.Rev.*, 1976, 28:43.
81. Sato T., Takusagawa K., Asoo N., Ariji F., Shida K., Kumano N., Konno K. Ultrastructure of the Lewis lung carcinoma. *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.*, 1982,18:369.
82. Schneiberg K., Górski T. Napromienienie energią jonizującą i wyłuszczenie grasicy jako czynniki wspomagające kancerogenezę chemiczną w skórze myszy. *Nowotwory*, 1967,XVII:325.
83. Shimokawara I., Imamura M., Yamanaka N., Ishii Y., Kikuchi K. Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance. An immunoperoxidase study with anti-human T-and B-cell sera. *Cancer*. 1982,49:1456.
84. Skotnicki A.B. Wpływ immunomodulatorów na produkcję interleukiny, 2.Rozprawa habilitacyjna. Akademia Medyczna w Krakowie, 1985.

85. Skurzak H. Odporność komórkowa u chorych na czerniaka złośliwego. *Przeg.Derm.*, 1985, LXXII:341.
86. Smolak K. Odpowiedź immunologiczna a rokowanie u chorych na raka sutka. I. Charakterystyka odczynów tkankowych w podścielisku guza pierwotnego i w okolicznych węzłach chłonnych. *Nowotwory*, 1983, XXXIII:21.
87. Smolak K. Odpowiedź immunologiczna a rokowanie u chorych na raka sutka. II. Wartości rokownicze morfologicznych i czynnościowych wykładników odpowiedzi komórkowej. *Nowotwory*, 1984, XXXIV:21.
88. Steffen J.K. Kilka uwag o mechanizmach wzajemnego oddziaływania pomiędzy nowotworem a układem odpornościowym gospodarza. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellońskiego*, DCXLVI, 1981, F/N.
89. Steplewski Z., Herlyn D., Maul G., Koprowski H. Hypothesis: Macrophages as effector cells for human tumor destruction mediated by monoclonal antibody. *Hybridoma*, 1983, 2:1.
90. Stewart C.C. Local proliferation of mononuclear phagocytes in tumors. *J.Reticuloendothel.Soc.*, 1983, 34:23.
91. Svennevig J.L., Andersson T.R. Cells bearing Fc receptors in human malignant solid tumors. *Br.J.Cancer*, 1982, 45:201.
92. Svennevig J.L., Lunde O.C., Holter J. In situ analysis of the inflammatory cell infiltrates in colon carcinomas and in the normal colon wall. *Pathol.Microbiol.Scand.Sect.A.Pathol.* 1982, 90:131.
93. Svennevig J.L., Lovik M., Svaar H. Isolation and characterization of lymphocytes and macrophages from solid,

- malignant human tumour. *Int.J.Cancer*, 1979,23:626.
94. Svennevig J.L., Svaar H. Content and distribution of macrophages lymphocytes in solid malignant human tumours. *Int.J.Cancer*, 1979,24:754.
95. Toivanen A., Granberg J., Nordman E. Lymphocyte subpopulations in patients with breast cancer after postoperative radiotherapy. *Cancer*, 1984,54:2919.
96. Totterman T.H., Hayry P., Saksela E., Timonen T., Eklund B. Cytological and functional analysis of inflammatory infiltrates in human malignant tumors. II. Functional investigations of the infiltrating inflammatory cells. *Eur.J.Immunol.*, 1978,8:872.
97. Vaage J., Gandbhir L. Local cellular responses associated with dormancy and regression of a syngeneic C57H mammary adenocarcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1978,4:263.
98. Vaage J., Pepin K.G., Plasma cell infiltrate of the primary tumor as a source of early systemic protection against metastases in mice. *J.Natl.Cancer Inst.*, 1985, 71:147.
99. Vandeputte M., Eysen H., Sobis H., De Somer F. Induction of polyoma tumors in athymic nude mice. *Int.J.Cancer*, 1974,14:445.
100. Vose B.M., Moore M. Suppressor cell activity of lymphocytes infiltrating human lung and breast tumors. *Int.J.Cancer*, 1979,24:579.
101. Vose B.M., Vanky F., Fopp M., Klein E. In vitro generation of cytotoxicity against autologous human tumour biopsy cells. *Int.J.Cancer*, 1978,21:588.

102. Vose B.M., Vanky F., Argov S., Klein E. Natural cytotoxicity in man: activity of lymph node and tumor-infiltrating lymphocytes. *Eur.J.Immunol.*, 1977,7:753.
103. Weinberg R.A. Alteration of the genomes of tumor cells. *Cancer*, 1983,52:1971.
104. Wood G.W., Gollahon K.A. T-lymphocytes and macrophages in primary murine fibrosarcomas at different stages in their progression. *Cancer Res.*, 1978, 38:1857.
105. Wood G.W., Gollahon K.A. Detection and quantitation of macrophage infiltration into primary human tumors with the use of cell surface-markers. *J.Natl.Cancer Inst.*, 1977,59:1081.
106. Żeromski J. Odporność miejscowa /in situ/ w ludzkich nowotworach złośliwych. *Immunol.Pol.*,1983,VII:145.
107. Żeromski J., Rewers A. Znaczenie badań immunomorfologicznych w ocenie nowotworów. *Przeg.Derm.*, 1985,LXXII: 343.