

STUDII ASUPRA PROCESULUI DE METASTAZARE.
II. CERCETĂRI PRELIMINARE PRIVIND ACŢIUNEA TRIPSINEI,
A PROTEINELOR, A POLIVINILPIROLIDONEI
ASUPRA CELULELOR TUMORII ASCITICE DE ŞOARECE

dr. F. Gyergyay, dr. Eva Gyergyay-Malatsinszky, dr. L. Vincze

Capacitatea de a invada şi de a forma metastaze reprezintă însuşirea principală a tumorilor maligne. Prin procesul de invadare ţesutul tumoral intră în contact cu mediile lichide ale organismului. Pentru a putea fi vehiculate de aceste lichide este necesar ca celulele tumorale să fie separate în elemente izolate sau în grupuri mici. Realizarea acestor condiţii presupune o adezivitate intercelulară scăzută.

Pe de altă parte, fixarea embolusului tumoral presupune o adezivitate a celulelor faţă de endoteliul vascular, astfel încît chiar şi localizarea emboliei depinde de gradul acestei adezivităţi. Agregarea şi creşterea adezivităţii celulare sînt fenomene care determină fixarea celulelor tumorale în capilare şi arteriole (Coman, 1953; Weiss, 1960; Zeidman, 1961). În toate aceste fenomene particularităţile suprafeţei celulare joacă un rol esenţial. Electronmicroscopia şi imunofluorescenţa au evidenţiat în mod clar, că în jurul celulelor şi între acestea se formează un strat proteic dens, de natura fibrinei (Hinamoto şi colab., 1960; Hymes şi colab., 1967).

Pentru a studia importanţa particularităţilor suprafeţei celulare în procesul de metastazare am realizat experienţele pe care le prezentăm în cele ce urmează.

Material şi metodă

Am utilizat ca material de experienţă o tumoare hiperînploidă ascitică Ehrlich (EAT), menţinută în şoareci adulţi masculi Albino-Rosso. În ziua a 8-a a creşterii tumorale s-a colectat de la mai mulţi şoareci lichid ascitic, care a fost centrifugat în condiţii sterile, iar supernatantul a fost reţinut pentru utilizare ulterioară. Sedimentul celular a fost resuspendat şi centrifugat de două ori în soluţie salină tamponată (SST), apoi a fost împărţit în două părţi egale. Prima

parte a fost resuspendată în SST, a doua a fost tratată cu soluție de tripsină (NBC, 1—300) 2,5‰ la 32 °C, amestecînd 10 minute cu agitatorul magnetic. În continuare celulele astfel tratate au fost spălate cu SST și resuspendate în una dintre următoarele soluții, fiind amestecate timp de 30 minute la temperatura camerei:

1. Soluția salină tamponată (SST),
2. Supernatantul lichidului ascitic (conținut proteic 4,35 g/100),
3. Ser inactivat de vițel (conținut proteic 7,60 g/100),
4. Polivinilpirolidona (BDH) 3,5% (PVP),
5. Dextran 6%, cu greutate moleculară 70.000 (Macrodex 6%. Pharmacia. Uppsala).

Apoi celulele au fost spălate încă o dată cu SST și resuspendate tot în SST la volumul inițial.

Din fiecare lot de celule s-a determinat cu ajutorul celei Bürker numărul total de celule precum și numărul celulelor neviabile, colorate cu soluția nigrozina 0,5% în ser fiziologic.

Utilizînd hîrtie de filtru cantitativă s-a cîntărit greutatea masei celulare uscate.

În preparate colorate cu aceto-orceină s-au studiat caracterele morfologice ale celulelor și s-au numărat 1000 de celule, notîndu-se formele în diviziune.

Din fiecare suspensie de celule s-au administrat cite 0,05 ml (1,3—1,5. 10⁶ celule) în vena cozii la cite 10 șoareci. Șoarecii au fost sacrificați la 7, 14 și 21 de zile de la administrare. Fragmente din plămîni, ficat și rinichi au fost incluse în parafină și colorate cu hematoxilină-eozină.

Pentru proba biologică a viabilității s-a administrat intraperitoneal cite 0,3 ml de lichid tumoral (7,8—9,0. 10⁶ celule) la cite trei șoareci.

Rezultate

Rezultatele sînt cuprinse în tabelele 1—4.

Tabelul nr. 1

Modificarea greutății uscate a celulelor din tumoarea ascitică Ehrlich (în %)

Tratament	SST	Supernatant	Ser vițel	PVP 3,5‰	Dextran 6‰
Celule spălate	100	109.1	174.8	122.7	109.7
Celule tripsinizate	79.6 (100)	97.3 (123.6)	88.6 (111.2)	83.3 (107.1)	102.4 (128.5)

Tabelul nr. 2

Procentul celulelor neviabile (colorate cu nigrozina) din tumoarea ascitică Ehrlich

Tratament	SST	Supernatant	Ser vițel	PVP 3,5‰	Dextran 6‰
Celule spălate	18,2	14,4	22,2	17,2	13,0
Celule tripsinizate	11,1	15,1	17,8	11,1	11,5

Tabelul nr. 3

Indicele mitotic din tumoarea ascitică Ehrlich (în %)o

Tratament	SST	Supernatant	Ser vișel	PVP 3,5 %	Dextran 6 %
Celule spălate	2	4	4	14	22
Celule tripsinizate	6	12	9	86 c-mitoză	124 c-mitoză

Tabelul nr. 4

Incidența tumorilor pulmonare după injecția intravenoasă a 1,3—1,5.10⁶ celule viabile de tumoare ascitică Ehrlich

Tratament	SST	Supernatant	Ser vișel	PVP 3,5 %	Dextran 6 %
Celule spălate	5/10	4/10	1/10	0/10	2.10
Celule tripsinizate	2/10	4/10	3/10	3/10	5/10

Tripsinizarea reduce greutatea uscată a celulelor tumorale în medie cu 20,4 %. Supernatantul, serul, P.V.P. și dextranul determină creșterea greutății celulelor, atât la cele spălate cu SST, cât și la cele tripsinizate.

Tripsinizarea reduce numărul celulelor neviabile, probabil digerind o parte din ele.

După tripsinizare, precum și după tratament cu supernatant sau ser, celulele astfel tratate nu prezintă modificări morfologice față de celulele care au fost doar spălate. Celulele tripsinizate și tratate cu supernatant, ser, PVP și dextran prezintă mai frecvent aglomerări de celule. Celulele tripsinizate și tratate cu PVP sau dextran prezintă frecvent picnoză nucleară asemănătoare mitozelor colchicinice, iar numărul diviziunilor normale este de asemenea mai crescut, în special la tumoarea netripsinizată și tratată cu PVP sau dextran.

Inocularea intraperitoneală a determinat o dezvoltare obișnuită a tumoarei ascitice la toate animalele.

Injecția intravenoasă a celulelor spălate sau tratate cu supernatant a determinat formarea tumorilor în plămâni, pe când administrarea celulelor tratate cu ser, PVP sau dextran nu a fost urmată de apariția unor astfel de tumori în plămâni șoarecilor. Tripsinizarea a redus numărul tumorilor, dar după tratamentul cu supernatant incidența a fost identică ca și la folosirea celulelor netripsinizate. După tripsinizare, tratamentul cu ser și cu produși macromoleculari a determinat creșterea incidenței tumorilor pulmonare.

Discuții

După tripsinizare celulele nu aderă de suprafața sticlei, probabil din cauza urmelor de tripsină rămase pe suprafața celulară, iar serul restabilește adezivitatea celulelor de suprafață (Easty și colab., 1960; Heb și Chu, 1960; Rappaport.

1960). Weiss (1960) a presupus că stratul proteic este adsorbit pe suprafața celulelor. Tot acest autor a demonstrat că celulele sarcomului ascitic 37, pierd 20 % din greutatea lor uscată dacă sunt incubate cu tripsină și această pierdere de greutate se datorește îndepărtării straturilor externe proteice. Rezultate similare au fost obținute și de noi, reușind în plus să arătăm că, tratamentul cu soluții proteice și macromoleculare determină creșterea greutateii uscate a celulelor.

Vincze și colab. (1966) au demonstrat că, după administrare de fibrinogen crește numărul celulelor fixate în filtrul capilar după inoculare intravenoasă, iar tratamentul prealabil cu heparină reduce numărul acestor celule. Todoruțiu și colab. (1967, a, b) au reușit să favorizeze apariția metastazelor, amestecând celulele tumorale tripsinizate Walker, cu sînge proaspăt și utilizînd apoi pentru inocularea intravenoasă serul sanguin separat după rețracția, chiagulului. Mai recent, Chiricuță și colab. (1969, a, b) și Todoruțiu și Rîșcă (1969) au demonstrat că celulele Walker tratate cu substanțe tensioactive dau mult mai frecvent metastaze pulmonare, decît cele netratate. În cercetările noastre, tripsinizarea a redus în mod evident incidența tumorilor, dar supernatantul, cît și tratamentul cu ser, PVP sau dextran au determinat apariția mai frecventă a tumorilor pulmonare.

Dextranul administrat intravenos determină creșterea incidenței tumorilor hepatice în caz de administrare intraportală a tumorii, dar nu a metastazelor pulmonare. la iepuri Fisher și Fisher, 1968; Wood și colab., 1967). În experiențele noastre dextranul nu a fost administrat separat, celulele fiind tratate in vitro cu dextran și apoi spălate înainte de injectarea tumorii. Și în acest caz, după tripsinizarea prealabilă tratarea celulelor cu dextran, dar și cu PVP sau cu ser a dus la creșterea incidenței tumorilor pulmonare. Dimpotrivă în cazul celulelor netripsinizate tratamentul cu ser, PVP sau dextran a împiedicat formarea focarelor tumorale.

Cercetările de mai sus arată că particularitățile suprafeței celulare joacă un rol important în fixarea celulelor tumorale la nivelul filtrelor capilare și consecutiv în formarea focarelor tumorale secundare.

Sosit la redacție: 15 ianuarie 1970.

Bibliografie

1. ABERCROMBIE M., AMBROSE E. J.: Cancer Res. (1962), 22, 525; 2. ANDERSON M. R., GREEN H. N.: Brit J. Cancer (1967), 21, 27; 3. CHIRICUȚĂ I., TODORUȚIU C., MUSTEA I., RIȘCĂ R.: II. Sesiune șt., Inst. Oncologic Cluj, 1969, 475; 4. CHIRICUȚĂ I., TODORUȚIU C., RIȘCĂ R.: II. Sesiune șt., Inst. Oncologic Cluj, 1969, 477; 5. COMAN D. R.: Cancer Res. (1963), 13, 397; 6. EASTY D. M., AMBROSE E. J.: Exper. Cell Res. (1960), 19, 539; 7. FISHER B., FISHER E. R.: Cancer Res. (1966), 26, 1586; 8. HEBB C. R., CHU M-Y. W.: Exper. Cell Res. (1960), 20, 453; 9. HINAMOTO R., BERNECKY J., JURANDOWSKI J., PRESSMAN D.: Cancer Res. (1960), 20, 592; 10. HYMES W. F., GILBERT J. B., MENGOLI H. F., WATNE A. L.: Nature (1967), 213, 507, 108; 11. RAPPAPORT C.: Exper. Cell Res. (1960), 20, 465; 12. TODORUȚIU C., GALATĂR N., MULEA R.: I. Sesiune șt., Inst. Oncologic Cluj, 1967; 13. TODORUȚIU C., RIȘCĂ R., CHIRICUȚĂ I.: I. Sesiune șt., Inst. Oncologic Cluj, 1967; 14. TODORUȚIU C., RIȘCĂ R.: II. Sesiune șt., Inst. Oncologic Cluj, 1969, 481; 15. VINCZE L., PUPP A., KELEMEN M.: Simpozion. Trombozele arteriale și venoase, Tîrgu Mureș, 1966; 16. WEISS L.: Intern. Review of Cytology (1960), 9, 187; 17. WOOD S. Jr., BAKER R. R., JOHNSON J. H.: Cancer (1967), 20, 281; 18. ZEIDMAN I.: Cancer Res. (1961), 21, 38.