

ACȚIUNEA VIRUSURILOR GRIPALE ASUPRA CARACTERELOR ANTIGENICE ALE CELULEI ASCITICE EHRlich

I. László, I. Demeter, Iuliana Both

Avînd în vedere că între anii 1950—1970 o serie de lucrări experimentale și unele observații clinice asupra regresiei spontane a unor tumori maligne a ridicat problema dacă organismul poate reacționa împotriva celulelor neoplazice prin mecanisme imunologice, ne-am propus studierea acestei ipoteze pe șoareci albi (tulpina Swiss) cu carcinom ascitic Ehrlich.

Se consideră că organismul gazdă poate declanșa un răspuns imun care să ducă la regresia sau chiar distrugerea tumorii. Aceste procese de recunoaștere imunologică sînt posibile datorită existenței unor structuri antigenice deosebite, prezente la celulele neoplazice amplasate pe membrana de suprafață a celulei tumorale, care ar putea iniția un răspuns imun adecvat, care în final duce la respingerea in vivo a celulei. Dacă antigenele de suprafață sînt slab imunogene, răspunsul imun nu va putea limita dezvoltarea procesului canceros.

Cu privire la încercările de a modifica antigenitatea suprafeței celulelor tumorale, menționăm că în anul 1966 am tratat celule de melanom de hamster cu antigen gripal (Grippe Virus A₂ — Behringwerke), reușind să demonstrăm aderarea antigenului la membrana celulară. În aceste cercetări preliminare în care hamsterii au fost inoculați prealabil cu celule de melanom cuplate cu antigen gripal și inactivate prin formol, apoi după 3 săptămîni au fost inoculați subcutanat cu celule vii de melanom, dezvoltarea tumorilor a fost mai lentă decît la animalele neimunizate.

Chiricuță și colab. (1) au studiat posibilitatea mării antigenității carcinomului Ehrlich prin virusul Cocksackie B₂, ajungînd la concluzia că imunizarea prealabilă a animalelor cu celule tumorale cultivate in vitro în asociere cu virusul Cocksackie B₂, scade mortalitatea animalelor față de lotul martor.

Häkkinen și colab. (2), după imunizarea șoarecilor cu antigene preparate din supernatantul celulelor Ehrlich infectate cu virus gripal, respectiv cu virusul stomatitei veziculare, aceștia devin mai rezistenți la inoculări cu celule ascitice Ehrlich, decît animalele neimunizate.

Ipoteza noastră de lucru —, bazată pe observațiile sus-amintite (László și colab., 1966) prin care s-a arătat că virusul gripal întărește proprietatea imunogenă a celulelor canceroase, dacă acest antigen se leagă de membrana celulară — sprijinită pe datele din literatura de specialitate, parțial similare, ne-a permis efectuarea unor imunizări împotriva cancerului experimental.

Material și metodă

1. În experiențele de imunizare în total au fost folosiți 121 de șoareci albi (tulpina Swiss) obținuți de la Biobaza I.M.F. Tirgu Mureș, împărțiți în 7 serii. Alte 30 de animale au fost folosite pentru studierea preliminară a caracterelor morfologice și de patogenitate ale celulelor Ehrlich. Pentru inocularea șoarecilor s-a folosit 0,2 ml suspensie de cel. Ehrlich (50 milioane cel./ml).

2. Antigene folosite pentru imunizare.

Celulele ascitice Ehrlich recoltate după 7—10 zile de la inocularea șoarecilor, au fost spălate cu tampon SST și din suspensie de celule (cca 5 mil. celule/ml) cite 2 ml au fost introduși pentru cultivare în 18 ml mediu de creștere (mediul $M_{199} + 10\%$ ser de cal + 10% ser de vițel + 50 ug kanamicină). Suspensiei astfel obținute i s-a adăugat 0,5 ml antigen gripal A (England/42/72) sau antigen gripal B (Hong Kong) 8(73) nediluat obținute de la Institutul I. Cantacuzino, București. După 48 ore de cultivare la 37°C, celulele Ehrlich au fost centrifugate, spălate cu tampon SST și tratate cu formol neutru 1/4000 timp de 24 h la +4°C. Excesul de formol s-a îndepărtat prin spălarea celulelor cu sol. tampon, după care s-au resuspendat în tampon, și au fost conservate cu tiomersal 1/10000.

În seriile în care la suspensia de celule s-a mai adăugat și adjuvant Freund, prepararea antigenului s-a făcut după metodele uzuale.

Seriile de animale și modul de vaccinare sînt redate în tabelul nr. 1 împreună cu rezultatele obținute.

3. Cercetări in vitro pentru evidențierea răspunsului imun celular.

De la animalele din loturile imunizate (cu cel. Ehrlich cu virus gripal și formolizate — Ag AE + VGA — cu celule Ehrlich cu virus gripal și adjuvant Freund + Ag AE + VGA + adj.F — cu celule Ehrlich și adjuvant Freund — Ag AE + adj.F — cu cel. Ehrlich — AE —) precum și de la cele din lotul netratat, s-a recoltat splina în scopul preparării suspensiilor de celule splenice (500 000 cel./ml) și a examinărilor histopatologice.

Din fiecare suspensie de celule splenice s-a repartizat cite 0,5 ml în tuburi, peste care s-a adăugat cite 1 ml cel. Ehrlich (5 ml celule/ml) suspendate în SST și cite 0,5 ml alexinp dil. 1/40. Tuburile au fost menținute la temperatura laboratorului (20°C) și apoi la 37°C, cite 30 min., o serie fiind ținută 12 ore la +4°C.

După acest timp din sedimentul suspensiilor celulare au fost efectuate froțiuni colorate după metoda Giemsa și examinate la microscop.

4. Cercetări histopatologice.

Fragmente din ficatul recoltat de la animalele din loturile imunizate după fixare în sol. Dubosq-Brazil și includere în parafină s-au efectuat secțiuni, colorate cu hematoxilina-eozină care au fost examinate la microscop, urmărindu-se nu numai alterările țesutului hepatic, dar și apariția celulelor Ehrlich în parenchim.

Rezultate

1. Rezultatele supraviețuirii și apariția ascitei la animalele imunizate și ulterior inoculate cu celule ascitice Ehrlich sînt prezentate în tabelul nr. 1.

Tabelul nr. 1

IMUNIZARE				Inoculare de celule A.E. 0,25 ml ip.															
Nr. lot	Nr. animale	Substanța folosită pentru imunizare	Cantitatea adm.	Calea de adm.	Nr. anim. inoc.	Supraviețuirea și apariția ascitei în ziua													
						1-a		7-a		15-a		21-a		27-a		30-a		35-a	
						Sv.	A.	Sv.	A.	Sv.	A.	Sv.	A.	Sv.	A.	Sv.	A.	Sv.	A.
1.	40	AE+VGA	3×0,2 ml	sc.	27	27	—	23	11	21	14	15	10	10	7	7	5	2	—
2.	20	AE+VGA+adj.F	3×0,2 ml	sc.	18	18	—	16	—	15	2	15	2	11	3	9	—	4	—
3.	20	AE+VGB+adj.F	2×0,2 ml	sc.	14	14	—	13	—	13	1	11	2	9	2	6	2	5	1
4.	20	AE+adj.F	2×0,2 ml	sc.	16	16	—	14	1	13	7	9	7	5	5	4	4	—	—
5.	20	AE+VGB	1 ml	ip.	14	14	—	13	—	13	7	12	7	10	6	8	6	3	1
6.	20	AE	1 ml	ip.	12	12	—	10	—	10	8	9	8	5	5	5	5	1	1
7.	20	Control	—	—	20	20	—	18	—	15	17	11	11	7	7	2	2	1	—

Putem constata că supraviețuirea șoarecilor în lotul vaccinat cu „AE+VGA+adj.” și la cel vaccinat cu „AE+VGB+adj.” poate fi observată și după 35 zile de la inocularea cu celulele vii, dar există o supraviețuire mai mare față de martori și la loturile în care vaccinarea s-a efectuat cu celule Ehrlich + virus gripal fără adjuvant.

2. Figura nr. 1, care prezintă evoluția cazurilor cu ascită, confirmă cele menționate anterior.

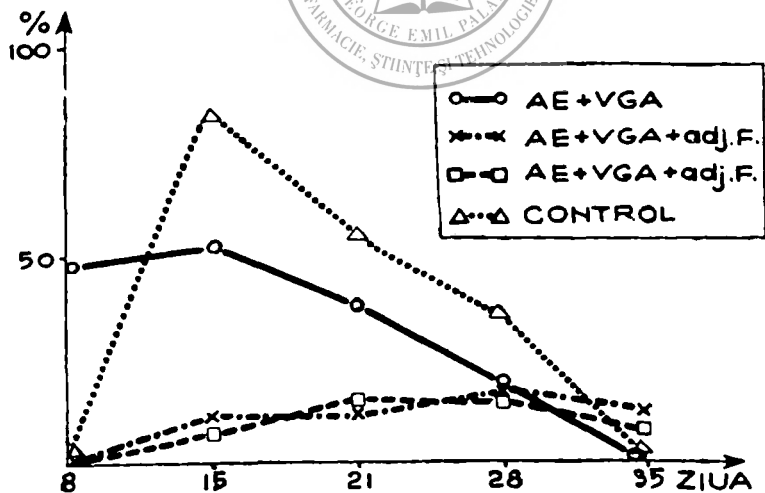
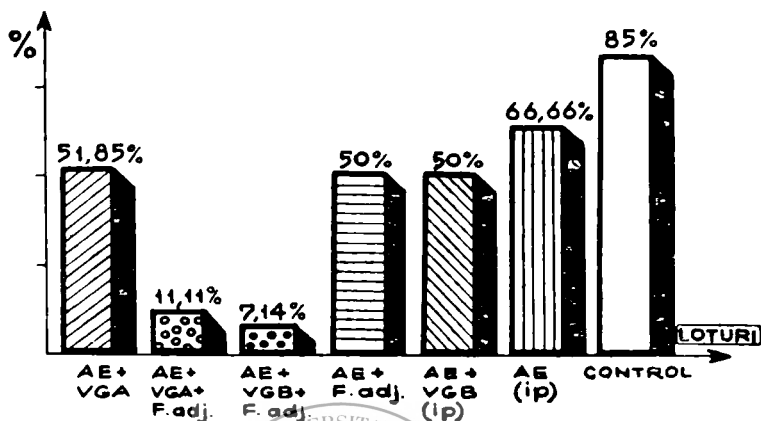


Fig. nr. 1

În figura nr. 2 prezentăm frecvența ascitei la diferite loturi de șoa-reci imunizați în ziua a 15-a după inocularea lor cu celule Ehrlich vii.

Este evident că față de incidența mare a cazurilor ascitice la lotul martor (85%), la cele imunizate cu celulele cuplate cu virusuri gripale



și adjuvant (AE+VGA+adj. și AE+VGB+adj.), apariția ascitei este doar de 11,11%, respectiv 7,14%, ceea ce subliniază creșterea antigenității suprafeței celulare sub influența virusurilor gripale.

4. Rezultatele cercetărilor *in vitro* pentru evidențierea răspunsului imun celular.

Tabelul nr. 2

Nr. crt.	Antigen folosit pentru imunizare	Prezența și intensitatea aderării limfocitelor obținute din splina animalelor imunizate la celulele Ehrlich în prezența alexinei
1.	AE+VGA sau VHB	++ sau +++
2.	AE inactivat	± sau negativ
3.	Martor (fără imunizare)	negativ
4.	AE neinactivat	+
5.	AE+VGA sau VGB+adj.	++
6.	AE+adjuvant	±

Observații : ± : foarte rar aderări; + : 1-2 limfocite;
 ++ : 3-4 limfocite în jurul celulelor;
 +++ : peste 4 limfocite aderate la celule Ehrlich

În această serie de cercetări a fost urmărită *aderarea* — respectiv acumularea — celulelor splenice, obținute de la animalele în prealabil imunizate cu celule ascitice. Constatările sînt cuprinse în tabelul nr. 2.

După cum reiese din datele acestui tabel, acumularea/aderarea celulelor splenice la celulele Ehrlich este mai marcată la seriile care provin de la animalele imunizate cu celule Ehrlich+virus gripal, decît la celelalte serii, ceea ce subliniază faptul, că mixovirusurile pot întări antigenitatea celulelor tumorale, — în cazul nostru mobilizînd limfocitele din splină împotriva celulelor ascitice Ehrlich.

Discutarea rezultatelor și concluzii

Din rezultatele cercetărilor noastre reiese că celulele ascitice Ehrlich, în prezența virusurilor gripale pot cîștiga caractere antigenice apreciable, ceea ce poate fi dovedit prin:

— prelungirea perioadei de supraviețuire a animalelor imunizate cu celule Ehrlich cultivate cu virusurile gripale și inactivate ulterior prin formol (AE+VGA; AE+VGB — cu adjuvant);

— frecvența mai scăzută a ascitei la animalele imunizate cu celule AE+VGA+adjuvant (11,11%) și AE+VGB+adjuvant (7,14%), față de martori (85%);

— aderarea mai pronunțată la celule Ehrlich a limfocitelor, provenite din splina animalelor imunizate cu celule Ehrlich+virusuri gripale;

— absența alterărilor hepatice la loturile de animale imunizate în prealabil cu celule Ehrlich+virusul gripal, și inoculate ulterior cu celulele ascitice, față de martorii neimunizați, la care s-a pus în evidență degenerarea hidropică a celulelor hepatice și infiltrații perivasculare sau în parenchim cu celule mononucleare, histiocyte și fibroblaști.

Se pare că virusul gripal produce modificări la nivelul compoziției chimice a membranei celulare imprimînd caractere antigenice apreciable celulelor.

Cu privire la limfocitele care au prezentat proprietăți de aderare la celulele Ehrlich în prezența alexinei, acestea fac parte din celulele uci-gașe anticorp dependente (celule K). În unele cazuri aderarea se manifestă prin formarea unor punți citoplasmice între celulele splenice și cele ascitice.

În concluzie, putem afirma pe baza celor discutate mai sus, că in vitro este posibilă modelarea antigenității suprafeței celulelor canceroase cu ajutorul mixovirusurilor.

Bibliografie

1. Chiricuță I., Mureșian T., Todoruțiu C., Rișca R., Mulea R.: *Oncol. și Radiol.* (1971), 10, 9; 2. Häkkinen J., Halonen P.: *J. Nat. Cancer Inst.* (1971), 46, 1161.

Sosit la redacție: 16 iulie 1982

I. László, I. Demeter, Iuliana Both

ACTION OF INFLUENZA VIRUSES ON THE ANTIGEN FEATURES OF THE EHRLICH ASCITIC CELLS

The influenza viruses cultivated in the Ehrlich ascitic cells can ensure them considerable antigen characters. The increase of the antigenity is shown through the prolongation of the survival period of mice immunized with Ehrlich cells cultivated with influenza viruses and then inactivated with formol, as compared with the animals of the control group. At the same time a decrease of the appearance of ascites can be observed in the immunized animals (7.14 — 11.11%) in comparison with the control group (85%) and a more distinct adherence to the Ehrlich cells of the lymphocytes derived from the spleen of the animals immunized with Ehrlich's cells and influenza viruses.
