

KRZYSZTOF A. SOBIECH, ELŻBIETA SOBIECH*, JANUSZ A. MADEJ**

Zmiany w obrazie elektroforetycznym białek surowicy krwi myszy z przeszczepialnymi białaczkami*)

Zakład Biochemii Akademii Wychowania Fizycznego, ul. Witelona 25, 51-617 Wrocław

* Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Rodakowskiego 6, 51-637 Wrocław

** Katedra Anatomii Patologicznej i Weterynarii Sądowej Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Białaczki przeszczepialne wywołują w organizmie gospodarza zespół reakcji immunologicznych, rozwijających się w następstwie różnic antygenowych między komórkami nowotworowymi a komórkami gospodarza (4, 8, 12). W odpowiedzi immunologicznej na antygeny nowotworowe, oprócz odporności komórkowej, bierze także udział odporność humoralna (9). W odporności tej przeciwciała wykazują zdolność interferencji z odpornością komórkową, odpowiedzialną za powstanie odporności przeszczepialnej w stosunku do nowotworu (8).

W niniejszej pracy stanowiącej kontynuację wcześniejszych badań własnych (6, 7, 10) nad patomechanizmem naturalnych i doświadczalnych białaczek u zwierząt przedstawiono zachowanie się frakcji białkowych w surowicy krwi myszy z przeszczepialnymi białaczkami: L 1210 (ara-C), L 1210/CH₂G, chłoniaka AKSL-4 oraz plazmocytoza ADJPC-5.

Materiał i metody

Do badań użyto myszy pochodzących z Ośrodka Hodowli Zwierząt Wsobnych przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, szczepu BDF₁ samców 8 tygodniowych, którym zaszczerpiono dootrzewnowo 10⁴ komórek białaczki limfatycznej zawieszonych w 0,2 cm³ PBS.

Do badań użyto następujących komórek białczkowych:

- białaczki limfatycznej L 1210 standard;
 - białaczki limfatycznej L 1210/ara-C, tj. komórki uzyskane od myszy linii odpornej na immunosupresor ara-C (1-beta-D-arabino-furanozylocytozyna) (11);
 - białaczki limfatycznej L 1210/CH₂G, tj. komórki uzyskane od myszy linii odpornej na immunosupresor CH₂G (metylogliksalo-bisguanylechydrazon) (11).
- Ponadto myszom szczepu AKR, samcom 8 tyg., zaszczerpiono dootrzewnowo 10⁴ komórek chłoniaka (Lymphoma AKSL-4), a myszom szczepu BALB/c (samce

8 tyg.) zaszczerpiono dootrzewnowo 10⁴ komórek plazmocytoza ADJPC-5.

Myszy wszystkich grup doświadczalnych zabijano przez wykrwawienie po 5 i 11 dobach od chwili zaszczerpienia nowotworów. U myszy dokonywano weryfikacji histopatologicznej narządów bezpośrednio po ich zglądzeniu.

Białko całkowite w surowicy krwi oznaczono metodą Bradforda (2), natomiast jego frakcje metodą elektroforetycznego rozdzielania przy użyciu bibuły Whatman 1 oraz 6 mM buforu weronałowo-medynałowego o pH 8,6. Rozdział białek na żelu agarowym wykonano według metody Wieme (3), natomiast immunoelektroforezę przeprowadzono metodą Scheideggera w modyfikacji Hirschfelda (3). Surowice odpornościowa otrzymano po immunizacji królików frakcją gammaglobulinową mysia. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu testu t-Studenta.

Wyniki i omówienie

Badaniem histopatologicznym stwierdzono, że u myszy którym zaszczerpiono białaczkę limfatyczną L 1210/ara-C, L 1210/CH₂G oraz chłoniaka AKSL-4 występuje w 5 dniu doświadczenia wyraźna kolonizacja węzłów chłonnych i śledziony przez komórki limfoidalne oraz paraimfocyty.

Proces kolonizacji zdecydowanie nasilał się w 11 dniu po przeszczerpieniu nowotworów. U myszy szczepu BALB/c, którym zaszczerpiono plazmocytoza ADJPC-5 obserwowano w analogicznym czasie tj. w 5 i 11 dniu doświadczenia naciek plazmocytoz i plazmoplastów.

Badania elektroforetyczne białek surowicy wykazały u myszy z białaczką L 1210 istotny wzrost poziomu alfa-globulin w 11 dniu doświadczenia (tab. 1). U myszy z białaczką L 1210/CH₂G stwierdzono obniżenie poziomu albumin, zaś w grupie myszy z białaczką L 1210/ara-C spadła ilość gamma-globulin. Obie te zmiany obserwowano tylko w 11 dniu

*) Praca wykonana w ramach problemu MR-2/17.

Tab. 1. Poziom białka całkowitego (g/cm³) oraz jego frakcji elektroforetycznych (1) w surowicy krwi myszy z białaczką L 1210 (x ± s)

Zawartość białka i jego frakcji	Grupa kontrolna	L 1210 ara-C		L 1210/CH ₂ G	
		1	2	1	2
Białko całkowite	58,52 ± 4,31	58,16 ± 7,72	57,42 ± 6,96	57,10 ± 5,21	54,63 ± 4,83
Albuminy	0,54 ± 0,06	0,56 ± 0,08	0,53 ± 0,07	0,55 ± 0,07	0,49 ± 0,05 *
Globuliny α	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,19 ± 0,03 *	0,16 ± 0,02	0,21 ± 0,02 **
β	0,22 ± 0,04	0,20 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,21 ± 0,04
γ	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01 **	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01

Objaśnienia: 1 — 5 dzień eksperymentu, 2 — 11 dzień eksperymentu, * — różnice statystycznie istotne w odniesieniu do kontroli przy P ≤ 0,05, ** — różnice statystycznie istotne w odniesieniu do kontroli przy P ≤ 0,01.

Tab. 2. Poziom białka całkowitego (g/dcm³) oraz jego frakcji elektroforetycznych (1) w surowicy krwi myszy z chłoniakiem ARSL-4 i plazmocytozom ADJPC-5 (x ± s)

Zawartość białka i jego frakcji	Grupa kontrolna	Chłoniak AKSL-4		Grupa kontrolna	Plazmocytozom ADJPC-5	
		1	2		1	2
Białko całkowite	58,83 ± 6,38	57,91 ± 5,41	56,27 ± 6,42	57,42 ± 5,65	58,62 ± 6,42	56,21 ± 5,33
Albuminy	0,58 ± 0,03	0,56 ± 0,03	0,51 ± 0,03	0,62 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,52 ± 0,03 **
Globuliny	α	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,03 *
	β	0,21 ± 0,03	0,23 ± 0,04	0,26 ± 0,04 *	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,03 *
	γ	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01

Objaśnienia: jak w tab. 1.

doświadczenia. Ilość białka całkowitego, jak i poziom beta-globulin nie uległ zmianie u myszy z białaczkami L 1210 w porównaniu z myszami kontrolnymi szczepu BDF₁.

W tab. 2 przedstawiono zmiany badanych parametrów w plazmocytozom i lymphoma u myszy. Wyniki te porównano z danymi uzyskanymi dla zwierząt kontrolnych, tzn. odpowiednio szczepu AKR i BALB/c. U myszy z lymphoma AKSL-4 stwierdzono tylko wzrost beta-globulin w 11 dniu doświadczenia. Poziom białka w tej białaczce, podobnie jak i w plazmocytozom, nie zmienił się w sposób istotny. Natomiast u myszy z plazmocytozom ADJPC-5 stwierdzono obniżenie poziomu albumin i alfa-globulin w 11 dniu doświadczenia oraz wzrost beta-globulin w 5 i 11 dniu eksperymentu. Na podkreślenie zasługuje wysoce istotny wzrost gammaglobulin w 11 dniu doświadczenia. Ze względu na dużą zawartość frakcji gamma-globulinowej w surowicy tych myszy przeprowadzono ich rozdział na żelu agarowym. Jak wynika z ryc. 1 u myszy białaczkowych wykazano obecność frakcji szybciej wędrującej od gamma-globulin, podczas gdy u myszy kontrolnych, używając tego nośnika, nie obserwowano tego białka, charakterystycznego dla plazmocytozom.

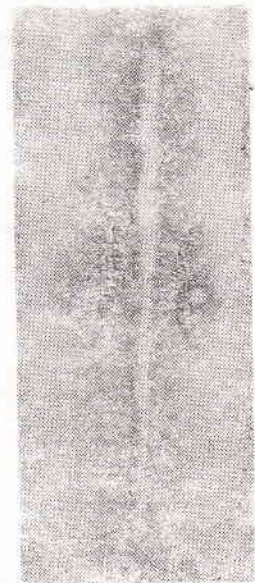
Na ryc. 2 przedstawiono immunoelektroforegram surowicy myszy kontrolnych oraz z plazmocytozom. W rowku umieszczono króliczą surowicę anty-IgG myszy. Ze względu na duże stężenie frakcji dodatkowej, surowice kontrolne, jak i białaczkowe rozcieńczano 10-krotnie roztworem soli fizjologicznej. Jak wynika z ryciny białko występujące dodatkowo w surowicy białaczkowej daje silną reakcję manifestującą się łukiem precypitacyjnym o dużym natężeniu.

W wyniku procesu białaczkowego w surowicy ludzi dochodzi do istotnych zmian stężenia białek. Obserwowano obniżenie poziomu gamma-globulin w przewlekłej białaczce limfatycznej u pacjentów, u których stwierdzono współistnienie złośliwych nowotworów narządowych (5). Jednocześnie inni autorzy stwierdzili wzrost poziomu IgG w surowicy chorych na raka szyjki macicy, natomiast obniżenie w przypadku raka jelita grubego (8, 12).

Z wcześniej wykonanych badań własnych (6) wynika, że myszy szczepów wysokobiałaczkowych, tj. AKR i BALB/Mo otrzymujących *per os* witaminę E (alfa-tokoferol) przez okres 16 tygodni dochodzi po 8 tyg. do obniżenia poziomu frakcji alfa₁- i beta₁-globulinowej oraz



Ryc. 1. Elektroforeza na żelu agarowym. Z lewej surowica kontrolna, a z prawej surowica myszy z plazmocytozom ADJPC-5



Ryc. 2. Immunoelektroforegram surowicy myszy kontrolnej i z plazmocytozom ADJPC-5. W lewej studzience surowica kontrolna, a w prawej myszy białaczkowej. W rowku umieszczono króliczą surowicę anty-gammaglobulinom mysim

wych, tj. AKR i BALB/Mo otrzymujących *per os* witaminę E (alfa-tokoferol) przez okres 16 tygodni dochodzi po 8 tyg. do obniżenia poziomu frakcji alfa₁- i beta₁-globulinowej oraz

wzrostu beta₂- i gamma-globulinowej. Natomiast po 16 tyg. doświadczenia obserwowano u tych myszy spadek poziomu wszystkich frakcji, za wyjątkiem alfa₂-globulin. Wykonane obserwacje pozwolą na stwierdzenie, że witamina B₁₂ wzmacnia na początku choroby nowotworowej odporność humorową, czego wyrazem była hipergammaglobulinemia. Podobne wyniki uzyskano u myszy szczepów wysokobiałkowych, tj. AKR i BALB/Mo zatrutowanych niskimi dawkami octanu ołowiu i octanu kadmu (6).

W prezentowanych badaniach stwierdzono u myszy z różnymi przeszczepialnymi białaczkami zmiany statystycznie istotne w zawartości białek surowicy. Zmiany te obserwowano głównie w 11 dniu doświadczenia, zaś w mniejszym stopniu w 5 dniu po inokulacji komórek nowotworowych. Za wyjątkiem plazmocytoma ADJPC-5 nie obserwowano zmian ilościowych w zakresie białka całkowitego, a także zmian frakcji gamma-globulinowej. Fakt ten można tłumaczyć bardzo szybkim przebiegiem przeszczepialnych białaczek, co wynika z dużej ilości komórek nowotworowych podawanych myszom w toku doświadczenia.

Zdaniem Astaldiego i Lisiewicza (1) obecność komórek nowotworowych w organizmie prowadzi do osłabienia reakcji obronnej całego układu immunologicznego i to zarówno w zakresie syntezy immunoglobulin, jak i odporności komórkowej wobec antygenów białaczkowych. Wykazano bowiem, że u osób z nowotworami, mających jeszcze prawidłowy stan układu limfocytarnego, a zatem zachowaną zdolność produkcji przeciwciał nowotworowych, rzadziej stwierdza się rozplam procesy nowotworowe niż u chorych, u których brak jest tych przeciwciał (5).

Plómiennictwo

1. Astaldi G., Lisiewicz J.: Casa Editrice Idelson, Naples 2, 48, 1971.
2. Bradford M. M.: *Analyt. Biochem.* 72, 248, 1976.
3. Hirschfeld J.: *Science Tools* 7, 18, 1960.
4. Leduc E. H., Avrameas S., Bouletille M.: *J. exp. Med.* 10, 127, 1968.
5. Lisiewicz J., Astaldi C.: *Tumori* 62, 651, 1976.
6. Madej J. A.: *Badania nad wpływem wybranych czynników egzogennych w patomechanizmie białaczek limfatycznych u myszy*. Praca hab., AR Wrocław, 1982.
7. Madej J. A.: *Medycyna Wet.* 40, 540, 1984.
8. Malkian A., Schwab J.: *Science* 153, 880, 1968.
9. Nairn R. C., Matthews N., Pihl E. A. V., Rolland J. M.: *Nairn R. C.: Br. J. Cancer* 31, 620, 1975.
10. Sobiech K. A., Słowińska R., Madej J. A., Mazurkiewicz M.: *Folia Histochem. in press* 1985.
11. Strządala L., Opolski A., Radzikowski C., Mihich E.: *Cancer Res.* 49, 4934, 1981.
12. Umanue E. R., Askonas B. A.: *Immunology* 15, 287, 1968.
13. Wieme R. J.: *Clinica chim. Acta* 4, 317, 1959.

Adres autora: doc. dr hab. Krzysztof A. Sobiech, ul. Norwida 19/4, 50-374 Wrocław

Собех К. А., Собех Э., Мадей Я. А. — Изменения электрофоретической картины белков сыворотки крови мышей с трансплантируемыми лейкозами

Определили уровень сырого белка в сыворотке крови и его фракций у мышей с трансплантируемыми лейкозами: L 1210/ara-C, L 1210/CH₃G, лимфомы

AKSL-4 и плазмцитомы ADJPC-5. Животных убили на 5 и 11 день опыта и проводили гистопатологическую оценку их внутренних органов. На 5 день опыта отметили отчетливую колонизацию органов мыши опухолевыми клетками, явно интенсифицирующуюся на 11 день после трансплантации лейкозов. За исключением плазмцитомы ADJPC-5 не отмечали количественных изменений по сырому белку. Отметили зато статистически существенные изменения содержания фракций белков сыворотки, главным образом, на 11 день опыта, в меньшей же степени — на 5 день после инокуляции опухолевых клеток.

Sobiech K. A., Sobiech E., Madej J. A. — Alterations in the electrophoretic picture of serum proteins in mice with transplanted leukaemias

The level of total protein in the serum and its fractions were determined in mice with the following transplanted leukaemias: L 1210/ara-C, L 1210/CH₃G, lymphadenoma AKSL-4, and plasmocytoma ADJPC-5. The animals were bled on the 5th and 11th day of the experiment and their internal organs were examined histopathologically. A marked colonization by neoplastic cells was found on the 5th day and the changes were distinctly pronounced on the 11th day. Apart from plasmocytoma ADJPC-5 no quantitative alterations as regards the total protein were recorded. However, significant statistically changes in the content of protein fractions were found mainly on the 11-th day of the experiment, and to lesser extent on the 5th day since neoplastic cells inoculation.

KASIM A. A., AL-SHAWRA Y. R.: Częstość występowania Eimeria w kale bydła w Arabii Saudyjskiej. (Prevalence of Eimeria in faeces of cattle in Saudi Arabia). *Vet. Parasitol.* 17, 95—99, 1984/85 (2).

W kale pochodzącym od 250 sztuk bydła z 5 rejonów Arabii Saudyjskiej wykazano obecność Eimeria auburnensis, E. bovis, E. cylindrica, E. ellipsoidalis, E. subspaherica, E. wyomingiensis i E. zuerni. Aż 34,1% próbek kału zawierało oocysty kokcydiów. Zараżenia mieszane spowodowane przez 2—4 gatunki Eimeria stwierdzono w 15,7% próbek kału. Najczęściej zarażenia wywoływała E. zuerni i E. bovis. Najwyższe nasilenie inwazji notowano u bydła w rejonach usytuowanych na wschodzie kraju.

G.

ROWLANDS G. J.: Różnice tygodniowe w składzie krwi krów i ich wpływ na interpretację testów profilów metabolicznych. (Week-to-week variation in blood composition of dairy cows and its effect on interpretations of metabolic profile tests). *Br. vet. J.* 140, 550—557, 1984 (6).

Badania przeprowadzono na 16 krowach mlecznych w okresie listopad — kwiecień w odstępach tygodniowych przez 22 tygodnie (10 krów) w pierwszym roku badań i na 6 krowach przez okres 23 tygodni w drugim roku obserwacji. W badaniach określono wartości hematokrytu, poziomu azotu mocznikowego w surowicy, białko całkowite, zawartość nieorganicznego fosforu, wapnia, magnezu, sodu, potasu, miedzi i żelaza. Poziom hemoglobiny i stężenie magnezu nie różniły się zamiennie w badanych okresach czasu. Wyraźne różnice dotyczyły natomiast poziomu potasu, sodu i wapnia w surowicy. Za wyjątkiem tych trzech składników i najprawdopodobniej poziomu surowiczego albuminu, obserwowane wahania mieściły się w granicach normy i nie wpływały na sposób interpretacji profilów metabolicznych. W przypadku poziomu glukozy we krwi autor sugeruje obniżenie zakresu referencyjnego z $\pm 2,0$ do $\pm 1,78$.

G.