

Aleksandar Godić¹

Vpliv tumorske mase na učinek zdravljenja z virusom newcastleske bolezni

The Influence of Tumor Mass on the Effect of Therapy with Newcastle Disease Virus

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: karcinom Erlichov tumor, Newcastle bolezni virus, miši, preživetje

Virus newcastleske bolezni je pokazal zaviralni vpliv na tumorsko rast v različnih eksperimentalnih pogojih. V nalogi proučujemo učinek vsakodnevne aplikacije divjega seva virusa newcastleske bolezni in učinek izhodiščne mase tumorja na zdravljenje z njim pri miših z intraperitonealno presajenim Ehrlichovim ascitesnim tumorjem.

Uporabili smo 117 miši seva CBA/H. Razdelili smo jih v tri skupine: pri prvi smo začeli s terapijo 1 teden, pri drugi 2 tedna in pri tretji 3 tedne po presaditvi tumorja. Mišim v poskusnih skupinah smo intraperitonealno vbrizgali divji sev virusa newcastleske bolezni, v kontrolnih pa fiziološko raztopino. Zdravljenje smo izvajali vsak dan do konca poskusa. Merili smo trajanje preživetja, število tumorskih zasevkov (makroskopsko in mikroskopsko), pojavnost ascitesa in tumorja na mestu vbrizganja Ehrlichovega ascitesnega tumorja.

Poskusne skupine so imele daljše preživetje v primerjavi s kontrolnimi, razlika je bila značilna le v drugi skupini. Število tumorskih zasevkov je bilo sorazmerno s trajanjem preživetja. Poskusne skupine so imele manjšo pojavnost ascitesa. Razlika v pojavnosti podkožnega tumorja ni bila značilna.

Izhodiščna tumorska masa ni značilno vplivala na učinek zdravljenja z divjim sevom virusa newcastleske bolezni. Potrdili smo manjšo pojavnost ascitesa v tretji skupini in rastočo pojavnost tumorja na mestu vbrizgavanja Ehrlichovega ascitesnega tumorja od prve proti tretji skupini.

Vsakodnevna aplikacija divjega seva virusa newcastleske bolezni pri intraperitonealno vbrizganem Ehrlichovim ascitesnim tumorjem je pokazala ugoden učinek na preživetje živali in pojav ascitesa, ne pa na število tumorskih zasevkov. Izhodiščna tumorska masa ni imela značilnega vpliva na zdravljenje z divjim sevom virusa newcastleske bolezni.

ABSTRACT

KEY WORDS: carcinoma Erlich tumor, Newcastle disease virus, mice, survival rate

Newcastle disease virus (NDV) has been shown to have an inhibitory influence on tumor growth in various experimental conditions. We studied the effect of daily application of a wild strain of NDV (NDV w.s.) and the effect of tumor mass on therapy with NDV w.s. in mice with intraperitoneally transplanted Ehrlich ascites tumor (i.p. EAT).

117 mice of CBA/H strain were used. They were divided into three groups: in the first one, therapy was started 1 week after tumor transplantation, in the second 2 weeks and in the third 3 weeks after tumor transplantation. The mice in experimental groups were treated

¹ Asist. mag. Aleksandar Godić, dr. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

ted with i.p. NDV w.s., and those in control groups with i.p. physiological saline. The virus was applied daily until the end of the experiment. The length of survival, number of metastases (macro and microscopically) and frequency of ascites and tumor in the region of EAT transplantation were measured.

The length of survival in experimental groups was prolonged, but the prolongation was significant only in the second group. The number of metastases was proportional to the length of survival. The frequency of ascites in experimental groups was lower.

Tumor mass at the beginning of therapy had no significant effect on virus therapy. Only a lower frequency of ascites in the third group and an increasing frequency of tumors in the region of i.p. EAT injection from the first to the third group were found. The daily application of NDV w.s. in mice with i.p. EAT was shown to prolong survival of the animals; it also lowered the frequency of ascites, but had no effect on the number of metastases. Initial tumor mass had no significant influence on therapy with NDV w.s.

UVOD

Nazadovanje tumorjev pri človeku ob prebolelih naravnih virusnih infekcijah so kliniki opazovali že na prelomu 19. stoletja. V 50-ih letih prejšnjega stoletja so se pojavili prvi opisi zaviralnega vpliva virusov na rast in razvoj eksperimentalnih tumorjev (1). Takšne učinke virusov so nekateri imenovali virusna onkolozi, drugi tumorska ksenogenizacija in tretji virusno tumorsko zaviranje (VTZ). Danes lahko VTZ proučujemo na tumorskih modelih *in vitro* in *in vivo*. Da bi dobili kar najbolj zanesljive podatke o delovanju virusov na tumorsko rast, je treba testirati čim več različnih živalskih tumorskih modelov s čim bolj raznolikimi virusi.

Kljub temu, da obstajajo številni zadržki pri prenašanju spoznanj, dobljenih na tumorskih modelih, na človeške maligne novotvorbe, pa tudi številni moralni zadržki glede poskusov na živalih, so ravno tumorski modeli omogočili boljše dosežke v zdravljenju humanih malignih novotvorb (2, 3).

EHRlichov ASCITESNI TUMOR

Splošne značilnosti

Ehrlichov ascitesni tumor (EAT) je tumor miši. Večina avtorjev se strinja, da je to karcinom dojke. Tumor obstaja v dveh oblikah, ascitesni in solidni.

Ascitesni tumor označuje tumorsko celično suspenzijo, ki nastane po presaditvi tumorskih celic v telesno votlino, kjer se tumorske celice množijo in povzročajo eksudacijo. Razen

v trebušni votlini, kjer tumor običajno gojimo, raste v tekoči obliki tudi v pleuralni in drugih seroznih votlinah, zaradi česa ime tumorja ne ustreza popolnoma in je izzvalo mnoge razprave.

Ascitesni tumor presajen v podkožje ali drugo solidno tkivo raste kot solidni tumor, iz te oblike pa ga lahko prevedemo nazaj v ascitesno, tako da ga zdrobimo in presadimo v trebušno votlino (4).

Prednosti tumorja v ascitesni obliki so možnost točnega odmerjanja tumorskega presadka, tumor je lahko dosegljiv, je homogen, študiramo ga lahko s preprosto citološko metodo in podatke o razvoju je možno količinsko obdelati (5).

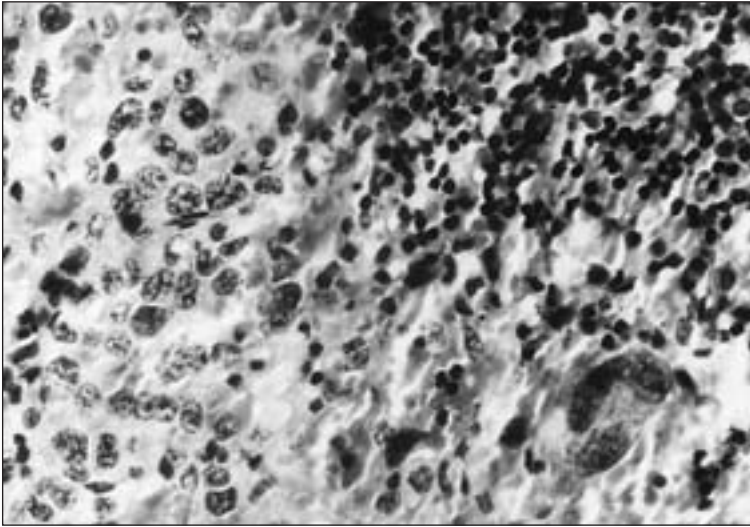
Morfologija

Ascitesna oblika

Tumorske celice so okrogle z jasno izraženo celično membrano. Citoplazma je vakuolizirana in zrnata, na periferiji je bolj izražena kot ob jedru. Jedro je sorazmerno veliko, okroglo, ovalno ali lobulirano in hiperkromno. Ob jedrni membrani so dobro izražene gruče kromatina. V jedru je običajno več eozinofilnih nukleolov (dva do štiri). Pogoste so mitoze (5, 6).

Solidna oblika

Posamezne tumorske celice v podkožnem tumorju običajno obdaja nežno retikulumsko mrežje, lahko pa tudi manjka. Vezivna stro-ma je pičla, žilje je redko. Histološko tumor



Slika 1. Zasevanje Ehrlichovega ascitesnega tumorja (EAT) v bezgavki. Limfatično tkivo (v desnem zgornjem kvadrantu) je deloma ohranjeno. Tumorske celice kažejo močno polimorfijo jeder in grob jedrni kromatin. Orig. povečava 130 \times .

ni diferenciran in ga ne moremo uvrstiti niti med karcinome niti med sarkome. V ostalem se celice solidne tumorske oblike ne razlikujejo od onih v ascitesni (slika 1). Tumor kaže izrazito infiltrativno aktivnost v okolna tkiva in organe.

Zasevanje Ehrlichovega ascitesnega tumorja

V poskusih, kjer je bil EAT intraperitonealno presajen (i.p. EAT), večina avtorjev opisuje zasevanje v pljuča, ledvica, nadledvično žlezo, diafragmo, bezgavke in trebušno slinavko. Zasevki pa so redki v jetrih, vranici, možganih in srcu.

VIRUS NEWCASTLESKE BOLEZNI

Virus newcastleske bolezn (NDV) spada v družino paramiksovirusov. So pleomorfni, obdani z maščobno ovojnico, v katero so vgrajeni glikoproteini, ki so nosilci bioloških lastnosti virusa. Hemaglutinin in nevraminidaza imata vlogo pri vezavi na celice gostitelja in sproščanje virusa iz njih, F-glikoprotein pa omogoča zlitje več celic med sabo (sincicij celic) in tako širjenje okužbe brez sproščanja virusa in celo v prisotnosti protiteles proti virusom. Znotraj virusa je vijačna nukleokapsida. Genom virusa je linearna molekula RNA. Virusi se raz-

množujejo v citoplazmi, sestavljajo pa se z brstenjem iz plazemske membrane. NDV je patogen za domače in divje ptice in povzroča pnevmoencefalitis. Okužba pri človeku je redka. Pojavlja se pri zaposlenih na perutninskih farmah in v laboratorijih, poteka pa kot konjunktivitis in kot okužba zgornjih dihal, le redko v obliki generalizirane okužbe (7-9).

DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA VIRUSNO TUMORSKO ZAVIRANJE

Vpliv tumorske mase

Z večanjem tumorske mase pada učinek VTZ. Takšen odnos je našel Svet-Moldavsky (11) na več sarkomih in hepatomu, ki jih je *in vitro* okužil z virusom vakcinije in virusom limfogranuloma ingvinala. Podobno povezanost med tumorsko maso in VTI so našli še Cassel in Garrett (12) na EAT z na tumor adaptiranim NDV (73-T) ter Zänker in sod. (13) z atenuiranim sevom HP-1 virusa avipoksa pri človeku.

Vpliv vrste virusa

Virusi, ki kažejo VTZ, spadajo skoraj v vse družine virusov. Na tumor (v katerem virus preizkušamo) imajo prilagojeni virusi boljši

zaviralni učinek. Jakost VTZ se razlikuje tudi glede na invazivnost virusa (sev virusa) in na mehanizem VTZ.

Vpliv odmerka virusa

Odmerek virusa je sorazmeren z učinkom VTZ, po drugi strani pa se z večanjem odmerka pojavijo neugodni stranski učinki, ki skrajšujejo čas preživetja poskusnih živali (limfocitopenija, zvišana telesna temperatura idr.).

Režim aplikacije virusov

Zaviralni učinek je tem boljši, čim prej po presaditvi tumorskih celic se začne z virusnim zdravljenjem. Večina avtorjev uporablja enkratno aplikacijo virusa, nekateri pa več aplikacij. Režimi se razlikujejo od avtorja do avtorja. V splošnem velja, da se z večanjem števila virusnih aplikacij večja učinek VTZ.

NAMEN NALOGE

V literaturi lahko zasledimo vrsto podatkov o zaviralnem vplivu NDV na EAT (1, 14–17). Rezultatov z divjim sevom NDV (NDV d.s.) je malo, ni opisan učinek tumorske mase na učinek zdravljenja z neprilagojenim oz. divjim sevom NDV. Vpliv režima aplikacije ni sistematično obdelan. Večina objavljenih raziskav črpa podatke na žrtvovanih in ne na spontano poginulih živalih.

Z nalogo smo želeli ugotoviti:

- vpliv vsakodnevne aplikacije z NDV d.s. na preživetje živali z i.p. EAT,
- vpliv tumorske mase pri i.p. EAT na efekt terapije z NDV d.s.

MATERIALI IN METODE

Poskusne živali

Za izvedbo poskusa smo uporabili 117 sokravnih miši seva CBA/H, lastne vzreje, samce. Živali so bile stare 2–4 mesece in so bile podobne teže (30–35 g). Hranili smo jih z briketirano hrano vrste Knapka, pile so vodovodno vodo. Svetlobni režim je bil naraven.

Tumor

V poskusu smo uporabili ascitesno obliko EAT. Ascitesni tumor smo dobili od živali, ki smo ji 14 dni pred začetkom poskusa intraperitonealno presadili EAT. Odvzete tumorske celice v obliki hemoragične ascitenske tekočine smo razredčili v sterilni fiziološki raztopini. Število tumorskih celic smo določili s štetjem s hemocitometrom. Predhodno smo tumorske celice obarvali z 1 % tripanskim modrilom, tako da smo iz štetja izločili morebitne nekrotične celice.

Podatki o virusu

V poskusu smo uporabili NDV d.s., ki je bil osamljen v eni od epidemij kokošje kuge. Virus je bil razmnožen v horioalantoični votlini kurjih embrijev, ki so izhajali od kokoši, ki niso bile cepljene z NDV. Aspirirana horioalantoična tekočina je bila centrifugirana 20 minut pri 3000 obratih pri 4°C. Po razmnožitvi je bila opravljena titracija in določena EID₅₀ (iz angl. *egg infective dose*). Originalni titer virusa je bil $1 \times 10^{-7.5}$ EID₅₀. Originalno raztopino smo za terapevtsko aplikacijo razredčili s Hanksovo raztopino v razmerju 1 : 15. Do aplikacije smo virus hranili pri temperaturi -70°C in ga pred uporabo odtajali v mrzli vodi.

Statistične metode

Razlike v preživetju živali med poskusno in kontrolno skupino ter med skupinami 1, 2 in 3 smo testirali z računalniškim paketom SOLO (BMPD), ki vsebuje Log-rang, Cox-Mantelov in Wilcoxonov test.

Načrt poskusa

Poskusne živali smo razdelili v tri skupine, ki smo jih med sabo razdelili v poskusno in kontrolno skupino. Skupine so bile med sabo ločene v kletkah. Vsem živalim smo v desni ingvinalni predel istočasno intraperitonealno presadili $17,6 \times 10^3$ celic EAT, razredčenih v 0,5 ml fiziološke raztopine. NDV smo pričeli aplicirati 7. dan po presaditvi tumorja v prvi skupini, v drugi in tretji pa s sedemdesetdnevno oz. s štirinajstdnevno zamikom od pričetka zdravljenja v prvi skupini. Različno velike tumorske mase smo tako dobili s podaljševanjem časovnih presledkov med

Tabela 1. Razdelitev miši po kletkah. Vsem smo isti dan intraperitonealno presadili Ehrlichov ascitesni tumor (EAT). Volumen aplikacijskega sredstva je pri vseh znašal 0,2 ml.

skupina	P – poskusna; K – kontrolna	število živali	sredstvo aplikacije	pričetek z aplikacijo po i.p. EAT
1	P	20	NDV d.s.	7. dan
	K	20	fiziološka r.	
2	P	20	NDV d.s.	14. dan
	K	19	fiziološka r.	
3	P	19	NDV d.s.	21. dan
	K	19	fiziološka r.	

presaditvijo tumorskih celic in pričetkom aplikacije virusa. Istočasno z aplikacijo virusa v poskusnih skupinah smo začeli aplicirati fiziološko raztopino živalim v kontrolnih skupinah. Enkratni aplikacijski volumen tako virusne kot fiziološke raztopine je znašal 0,2 ml. Aplikacijo smo izvajali vsakodnevno ob isti uri, intraperitonealno v desni ingvinalni predel, vse do konca poskusa (tabela 1).

Živali so spontano poginjale do 102. dneva poskusa, ko smo preživele živali žrtvovali v komori s CO₂-atmosfero. Živali smo obducirali in beležili bolezenske spremembe, ki so bile opazne do ravni 4 × lupne povečave. Pregledali smo vse organe razen možganov. Beležili smo tudi prisotnost ascitesa in podkožnega tumorja.

Organe smo fiksirali v 10 % pufranem formalinu. Za histološko preiskavo smo odvzeli tkiva, v katerih smo domnevali, da gre za tumorsko rast, z namenom, da slednjo potrdimo.

Pri preživelih oz. žrtvovanih živalih, ki niso kazale vidnih znakov tumorske rasti, smo histološko obdelali naslednje organe: mezenterij s črevesjem, jetra, organe male medenice z maščevjem, testise, ledvici z nadledvičnicama, trebušno slinavko, pljuča in srce.

Merilo učinkovitosti VTZ smo ocenjevali z dolžino preživetja poskusnih živali in z obsegom tumorske rašče in zasevanja. Po-

javljanje ascitesa in podkožnega tumorja pri i.p. EAT lahko upoštevamo kot kazalca obsega tumorske rasti.

REZULTATI

Vpliv zdravljenja z virusom newcastleske bolezni na živali z intraperitonealno presajenim Ehrlichovim ascitesnim tumorjem smo testirali s primerjanjem poskusne in kontrolne skupine po skupinah 1, 2 in 3. Analizirali smo dolžino preživetja, št. tumorskih vložkov ter pojavnost ascitesa in podkožnega tumorja na mestu injiciranja EAT.

Dolžina preživetja

Skupina 1

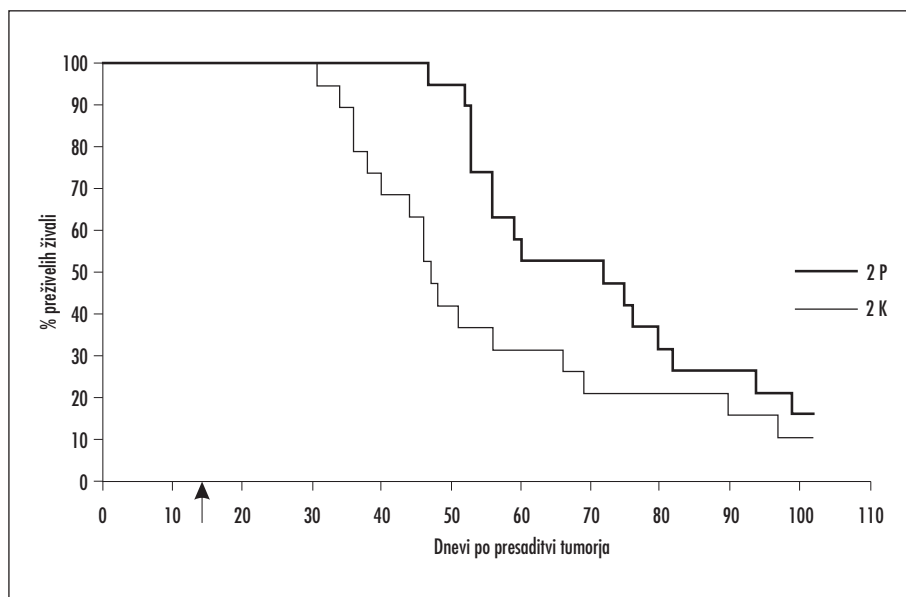
Primerjava kumulativnih krivulj preživetja poskusne in kontrolne skupine kaže podaljšano preživetje poskusnih živali (povprečen čas preživetja pri poskusni skupini je bil 71,1 dni, pri kontrolni pa 60,6 dni), čeprav razlika testirana s testom Log-rang ni statistično značilna (tabela 2).

Skupina 2

Pri poskusni skupini je bil povprečen čas preživetja bistveno daljši (72,3 dni) kot pri

Tabela 2. Povprečen čas preživetja miši v kontrolnih in poskusnih skupinah in statistična primerjava dolžine preživetja. P – poskusne skupine, K – kontrolne skupine.

skupina	P	K	p (Wilcoxon)	p (Log-rang)
1	71,1	60,6	0,2287	0,2067
2	72,3	56,8	0,0085	0,0810
3	75,7	65,9	0,1972	0,2658



Slika 2. Vpliv zdravljenja z divjim sevom virusa newcastleske bolezni (NDV d.s.) na trajanje preživetja živali. Začetek zdravljenja 14. dan po intraperitonealno presajenim Ehrlichovim ascitesnim tumorjem (i.p. EAT) (puščica).

kontrolni (56,8 dni). Razlika v preživetju, če ju primerjamo s testom Log-rang, statistično ni značilna, medtem ko primerjava z Wilcoxonovim testom pokaže statistično značilno razliko v dolžini preživetja ($p=0,0085$) (slika 2, tabela 2).

Skupina 3

Pri poskusni skupini je bil povprečen čas preživetja daljši kot pri kontrolni (75,7 dni,

65,9 dni), čeprav razlika, testirana s testom Log-rang, statistično ni značilna (tabela 2).

Število tumorskih zasevkov

Primerjava števila tumorskih zasevkov med kontrolnimi in poskusnimi skupinami pokaže, da je bilo več tumorskih zasevkov v poskusnih skupinah. Največja razlika je v drugi skupini. Razlike so sorazmerne z dolžino preživetja živali znotraj skupin (tabela 3).

Tabela 3. Prikaz števila tumorskih zasevkov po skupinah in organih. P – poskusne skupine, K – kontrolne skupine.

Organ zasevanja	1P	1K	2P	2K	3P	3K
Pljuča	2	6	4	0	6	3
Medpljučje	1	0	0	0	2	3
Trebušna prepona	8	9	9	8	5	10
Jetra	3	3	7	2	7	2
Ledvica	7	2	7	7	3	8
Nadledvična žleza	2	2	0	1	1	3
Trebušna slinavka	5	6	10	9	8	9
Vranica	1	2	1	2	3	4
Mezenterij	12	15	16	13	11	10
Črevo	1	2	0	2	3	0
Mala medenica	11	6	8	9	7	2
Trebušna stena	5	3	8	4	4	5
Skupaj	58	56	70	57	60	59

Pogostnost pojave ascitesa

Primerjava pogostnosti razvoja ascitesa med poskusno in kontrolno skupino pokaže, da se je ascites pogosteje razvil in kontrolnih skupinah (tabela 4).

Tabela 4. Pogostnost pojavljanja ascitesa in podkožnega tumorja po skupinah. P – poskusne skupine, K – kontrolne skupine, s.c. EAT – pojav podkožnega tumorja na mestu intraperitonealne presaditve Ehrlichovega ascitesnega tumorja (i.p. EAT).

Skupina	1P	1K	2P	2K	3P	3K
Ascites	8	14	8	10	4	8
s.c. EAT	5	6	9	6	10	7

Pogostnost pojava podkožnega tumorja na mestu intraperitonealne presaditve Ehrlichovega ascitesnega tumorja

Podkožni tumor na mestu presaditve i.p. EAT se je v prvi skupini pojavil s skoraj isto pogostnostjo v obeh skupinah, v skupinah 2 in 3 pa je bil pogostejši v poskusni skupini (tabela 4).

Vpliv tumorske mase intraperitonealno presajenega Ehrlichovega ascitesnega tumorja na učinek zdravljenja z divjim sevom virusa newcastleske bolezni

Različno velike tumorske mase smo dobili s podaljševanjem časovnih presledkov med presaditvijo tumorskih celic in pričetkom aplikacije virusa. Za oceno vpliva tumorske mase na učinek zdravljenja z NDV d.s. smo med seboj primerjali poskusne skupine glede na dolžino preživetja, število zasevkov in pogostnost pojavljanja ascitesa ter podkožnega tumorja na mestu i.p. EAT.

Preživetje živali

Povprečni čas preživetja je bil najkrajši pri prvi poskusni skupini (71 dni), nekoliko daljši pri drugi (72,3 dni), najdaljši pa pri tretji (75,7 dni) (tabela 2). Razlika statistično ni značilna, če primerjamo med sabo prvo in drugo skupino, prvo in tretjo skupino ter drugo in tretjo skupino.

Število tumorskih zasevkov

Če primerjamo poskusne skupine med sabo, najdemo največ tumorskih zasevkov v drugi skupini, sledita tretja in prva skupina s praktično enakim številom (tabela 3).

Pogostnost pojava ascitesa

Ascites se je pojavil enako pogosto v prvi in drugi poskusni skupini, 50% redkeje pa v tretji skupini (tabela 4).

Pogostnost pojava podkožnega tumorja na mestu presaditve intraperitonealne presaditve Ehrlichovega ascitesnega tumorja

Podkožni tumor se je pojavil s podobno pojavnostjo v drugi in tretji skupini, 50% redkeje pa v prvi skupini (tabela 4).

RAZPRAVLJANJE

Prvi, ki je poročal o VTZ NDV, je bil Moore s sod. (15). Poročal je o dvakrat daljšem času preživetja pri poskusnih živalih, ko so jim inokulirali virus neposredno po presaditvi tumorja. Tudi drugi raziskovalci poročajo o ugodnem terapevtskem učinku virusa na maligni tumor (15–19). Pri aplikaciji virusa NDV d.s. dvakrat tedensko so našli signifikantno podaljšano preživetje pri i.p. EAT in zaviranje zasevanja EAT, ki je bil presajen podkožno (17). Naš poskus z vsakodnevno aplikacijo NDV je pokazal podaljšano preživetje živali, ki pa je bilo statistično značilno le v skupini, pri kateri smo z zdravljenjem pričeli 14. dan po presaditvi EAT. Upoštevati pa moramo, da smo presadili 4-krat večje število tumorskih celic, tako da rezultati obeh poskusov niso povsem primerljivi. Za presaditev večjega števila tumorskih celic smo se odločili, da bi se izognili neuspehim primerom presaditve EAT, ki se dogajajo pri zelo majhnem številu presajenih celic (6).

Pri opazovanju vpliva NDV na čas preživetja smo ugotovili daljše preživetje pri vseh poskusnih skupinah, čeprav razlika v dolžini preživetja, v primerjavi z dolžino preživetja pri kontrolnih skupinah, ni bila statistično značilna pri nobeni skupini, razen v skupini, pri kateri smo zdravljenje pričeli 14. dan po presaditvi tumorja.

Razlaga za podaljšano preživetje je anti-neoplastično delovanje NDV, ki se odvija preko dveh glavnih mehanizmov:

1. indukcija sinteze dejavnika tumorske nekroze alfa (TNF- α), ki ga producirajo makrofagi/limfociti in povečana občutljivost neoplastičnih celic za citolizo s TNF- α ,
2. indukcija sinteze interferona, ki preko imunskega sistema (limfociti T, celice ubijalke, makrofagi) zaviralno deluje na neoplastično tvorbo ali pa neposredno zavira rast tumorskih celic (20–24).

V splošnem velja, da z večanjem tumorske mase pada učinek VTZ (11–13). Preseneča nas, da v našem primeru nismo našli podobne zakonitosti. V enakem tumorskem modelu, kot smo ga uporabili v našem poskusu, so drugi avtorji našli podobno soodvisnost (12), vendar je treba omeniti, da so uporabili tumorsko prilagojen sev NDV, ki je kazal bistveno večji učinek VTZ. Prilagojen virus se namreč razmnožuje v tumorskih celicah in zato po okužbi raste titer virusa, pri divjem sevu pa to ni potrjeno. Naše rezultate si lahko razlagamo z naslednjima možnostima: ali je NDV d.s. zelo blago terapevtsko sredstvo ali pa je EAT zelo agresivni tumor. V prid slednji govorijo naše najdbe o obsežnem zasevanju in infiltracijski aktivnosti EAT. Znano je, da obstaja več vrst EAT z različnim biološkim obnašanjem.

V poskusu smo našli blago naraščajočo pojavnost podkožnega tumorja na mestu injiciranja i.p. EAT pri poskusnih skupinah od prve proti tretji, po drugi strani pa nekateri

avtorji navajajo znižano incidenco pri poskusnih skupinah v primerjavi s kontrolnimi. Čulo in sod. poročajo o večji incidenci solidnih tumorjev na mestu inokulacije tumorja pri živalih, ki imajo povečan imunski potencial, oz. se ne pojavlja pri živalih, ki imajo manjši imunski potencial (25). Ta podatek bi govoril v prid zmanjšanja imunskega potenciala z NDV, čeprav nekateri avtorji poročajo o ojačenem imunskem odzivu na presajen tumor (26–29). Incidenca pojavljanja s.c. EAT na mestu presaditve tumorskih celic v peritonealno votlino, bi lahko bila povezana s samo presaditvijo tumorskih celic; tumorske celice, ki so bile sicer presajene v trebušno votlino bi lahko prodrle po inicirnem kanalu nazaj v podkožje in se tu razvile v tumorsko raščo (30).

ZAKLJUČKI

Na osnovi rezultatov našega poskusa lahko zaključimo:

1. Vsakodnevno zdravljenje z NDV d.s. v danih poskusnih pogojih podaljša preživetje živali. Podaljšanje je statistično značilno, če začnemo z zdravljenjem 14. dan po presaditvi i.p. EAT. Zdravljenje tudi zmanjša pojavnost ascitesa, nima pa vpliva na število tumorskih zasevkov. Zaključimo lahko, da virus ne zavira razvoja tumorja, pač pa zaviralno deluje na mehanizem, ki je pomemben za pogin živali.
2. Tumorska masa i.p. EAT ob začetku zdravljenja z NDV d.s. nima značilnega vpliva na njegovo učinkovitost.

LITERATURA

1. Moore AE. The oncolytic viruses. *Progr Exp Tumor Res* 1960; 1: 411–39.
2. Weiss L. *Principles of metastasis*. New York: Acad Pr; 1985. p. 134–59.
3. Kallman RF. *Rodent Tumor Models in Experimental Cancer Therapy*. New York: Pergamon Press, 1987: 12–6.
4. Anon. *Transplantable and transmissible tumors of animals*. Armed forces institute of pathology. Washington DC: 1959; F 40. p. 317–42.
5. Baillif RN. The solid phase of the Ehrlich ascites tumor in mice. *Cancer Res* 1954; 14: 554–8.
6. Cerar A. *Patomorfološka analiza vzroka smrti pri miši po presaditvi Ehrlichovega ascitesnega tumorja v trebušno votlino*. [Magistrska naloga]. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja; 1979.
7. Aleksander DJ, Allan WH. Newcastle disease. The nature of the virus strains. *Bull Off int Epiz* 1973; 79: 15–26.
8. Jevez E, Melnick JL, Adelberg EA. *Review of medical microbiology*. 15th ed. Los Altos: Lange Med Pub; 1982. p. 430.
9. Apostolov K, Waterson AP. Serological differentiation of avirulent strains of Newcastle disease. *Vet Rec* 1978; 10: 103–5.
10. Hartveit F. The immediate cause of death in mice with Ehrlich ascites carcinoma. *Acta Path Microbiol Scand* 1965; 65: 359–65.

11. Svet-Moldavsky GJ. Quantitative relationships in viral oncolysis and the possibility of artificial heterogenization of tumors. *Nature* 1964; 202: 303-5.
12. Cassel WA, Garrett RE. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent. *Cancer* 1965; 18: 863-8.
13. Zänker KS, Mayr A, Lange J, Sievert JR, Blumel G. Manipulation with avipox virus on the opposing subpopulation of T cells in cancer patients. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1985; 26: 282.
14. Csatory LK. Viruses in the treatment of cancer. *Lancet* 1971; 2: 825.
15. Moore AE, Diamond LC, Mackay HH, Sabachewsky L. Influence of hemagglutinating viruses on tumor cell suspensions: II. Newcastle disease virus and Ehrlich carcinoma. *Proc Soc Exp Biol* 1952; 81: 498-501.
16. Prince AM, Ginsberg HS. Immunohistochemical studies on the interaction between Ehrlich ascites tumor cells and Newcastle disease virus. *J Exp Med* 1957; 105: 177-87.
17. Cerar A. *Vpliv nekaterih virusov na in vivo rast malignega tumorja miši*. [Doktorska disertacija]. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani; 1990.
18. Flanagan AD, Love R, Tesar W. Propagation of Newcastle disease virus in Ehrlich ascites cells in vitro and in vivo. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955; 90: 82-8.
19. Lorence RM, Rood PA, Kelley KW. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent: induction of Tumor necrosis factor- α and augmentation of its cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 1305-6.
20. Koren S. Nekaj dejstev in ugibanj o delovanju interferona na viruse, normalne in rakave celice. *Med Razgl* 1981; 20: 205-13.
21. Koren S. Protitumorsko delovanje interferonov na celični in molekularni ravni. *Zdrav Vestn* 1985; 54: 71-5.
22. Koren S. Stopnjevano proticelično in protitumorsko učinkovanje kombinacij mišjih interferonov alfa, beta in gama. *Zdrav Vestn* 1987; 56: 231-5.
23. Koren S. Interferoni in imunski odziv. *Zdrav Vestn* 1990; 59: 465-7.
24. Baron S, Tyring SK, Fleischmann WR et al. The Interferons. Mechanism of Action and Clinical Application. *JAMA* 1991; 266: 1375-83.
25. Čulo F, Allegretti N, Marušič M. Ascitic versus solid growth of Ehrlich ascites tumor influenced by immunological factors. *Oncology* 1978; 35: 15-21.
26. von Hoegen P, Weber E, Schirmacher V. Modification of tumor cells by a low dose of Newcastle disease virus. Augmentation of the tumor-specific T cell response in the absence of an antiviral response. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1159-66.
27. von Hoegen P, Zawatzky R, Schirmacher V. Modification of tumor cells by a low dose of Newcastle disease virus. *Cell Immunol* 1990; 126: 80-90.
28. Schirmacher V, Ahlert T, Heicapell R, Appelhans B, von Hoegen P. Successful application of non-oncogenic viruses for antimetastatic cancer immunotherapy. *Cancer Res* 1986; 5: 19-49.
29. Heicapell R, Schirmacher V, von Hoegen P, Ahlert T, Appelhans B. Prevention of metastatic spread by postoperative immunotherapy with virally modified autologous tumor cells. I. parameters for optimal therapeutic effects. *Int J Cancer* 1966; 37: 569-77.
30. Košak R, Milanec T. *Ocena vpliva mesta aplikacije virusa Newcastleske bolezni na razvoj Ehrlichovega ascitesnega tumorja*. [Prešernova naloga]. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani; 1992.

Prispelo 1. 8. 2001