

Page Denied

Next 3 Page(s) In Document Denied

Č E S K O S L O V E N S K Á A K A D E M I E V Ě D

ČESKOSLOVENSKÁ
MIKROBIOLOGIE

ROČNÍK

1

ČÍSLO

1



ČS. MIKROBIOL.

PRAHA, ÚNOR 1956 - STR. 1—48

ČESKOSLOVENSKÁ MIKROBIOLOGIE

Vedoucí redaktor: Akademik IVAN MÁLEK

Členové redakční rady:

KAREL BERAN, LADISLAV BORECKÝ, MIKULÁŠ BURGER, JOSEF DYR, EVA HLAVÁČKOVÁ, CTIRAD JOHN, JÁN KAROLČEK, JIŘÍ MACURA, redakční tajemník, JIŘÍ MÁLEK, JAN NEČÁSEK, člen korespondent SAV PAVOL NEMEC, KAREL RAŠKA, JAROMÍR SEIFERT, JAROSLAV ŠTERZL,

O B S A H

I. Málek: Rozvoj československé mikrobiologie	1
J. Šterzl: Dlouhodobá imunita. I. Útlum tvorby protilátek při každodenní imunitě	7
J. Johanovský: Stav nevnímavosti v průběhu experimentální stafylokokové infekce. I.	16
M. Burger a K. Beran: O transglukosidační činnosti enzymatického preparátu <i>Aspergillus niger</i>	26
J. Chaloupka: Proteolytické enzymy aktinomycety <i>Streptomyces griseus</i> . II. Vliv povahy a koncentrace dusíku na sekreci proteasy	32
J. Szántó: Titrace viru chřipky v tkaninových kulturách	41
Krátká sdělení	47
Zprávy	48

Vychází šestkrát ročně

*

Roční předplatné 30 Kčs

*

Jednotlivé číslo 5 Kčs

Československá
M I K R O B I O L O G I E

ročník 1. (1956) — č. 1

Rozvoj československé mikrobiologie

Akademik IVAN MÁLEK

Tímto prvním číslem začínáme vydávat nový náš biologický časopis „Československá mikrobiologie“, který bude otiskovat práce ze všech úseků mikrobiologie, pokud mají obecnější zaměření i význam. Časopis má být současně ideovým organizátorem a podněcovatelem vědeckého života ve všech úsecích mikrobiologie. Skutečnost, že můžeme začít vydávat samostatný časopis mikrobiologický, je odrazem toho velkého rozvoje, kterého jsme v posledních letech svědky na poli biologických věd a zvláště i v mikrobiologii. Ukázal to už náš časopis „Československá biologie“, kde v poslední době asi polovina uveřejňovaných prací byla mikrobiologická. Svědkem tohoto rozvoje je především řada konferencí, které byly uskutečněny v jednotlivých úsecích mikrobiologických, jako byly konference půdní, technické mikrobiologie, konference virologická, imunologická, dále i pravidelné pracovní semináře, jaké se pořádají na příklad na poli mikrobiologie zemědělské nebo technické. Vše to ukazuje, že už byla vytvořena řada dobře zorganizovaných vědeckých středisek, která zabezpečují bohatou vědeckou tvorbu, jejíž výsledky mají být náplní tohoto nového časopisu. Je pochopitelné, že tento velký rozvoj potřebuje své forum, avšak nejen takové, které by prostě přijímalo a uveřejňovalo práce, ale doslova kolbiště, na kterém by se nové směry i myšlenky mohly nejen uplatňovat, ale i vybojovávat své vědecké boje, bez jakých věda nemůže jít kupředu. Při té příležitosti je jistě užitečné přehlédnout, z jakých zdrojů se naše mikrobiologie začala rozvíjet, jaké jsou její kořeny, v jakých směrech došla nejdále a jaké důležité úkoly zůstala dlužna.

Nejdříve několik poznámek k historii naší mikrobiologie, abychom si připomněli, o jaké *tradice* jsme se mohli a můžeme v dnešním jejím rozvoji opírat. Na prvý pohled by se mohlo zdát, že není možno mluvit o tradicích naší mikrobiologie, vždyť z minulosti předmnichovské republiky jsme převzali naši mikrobiologii tak nepatrně rozvinutou, že i počet mikrobiologů všech zaměření nepřevyšoval příliš číslo deset, a o nějakých význačných školách mikrobiologických z hlubší minulosti stěží může být řeč. Avšak tento neutěšený stav minulosti zrcadlí pouze naprosto nedostatečný zájem, který byl v minulosti za rakouské monarchie i za předmnichovské republiky věnován vědě vůbec a tím spíše vědě tak mladé jako byla mikrobiologie, ale není výrazem nezájmu o mikrobiologii u nás mezi pracovníky přírodních a lékařských věd nebo vědecké neschopnosti na tomto úseku. Podíváme-li se blíže, můžeme totiž konstatovat, že téměř ve všech úsecích mikrobiologie jsme měli význačné zástupce ať už pracující doma, ať za hranicemi, kteří nezáústávali pozadu za vývojem mikrobiologie a přinášeli původní přínos světové vědě.

Tak v úseku mikrobiologie půdní J. Stoklasa od samého začátku si nejen uvědomoval důležitou roli půdních mikroorganismů a prosazoval jejich praktické užití, ale dokonce se Straňákem byl jedním z prvních vůbec, kteří s kladným výsledkem použili azotobaktera k zvyšování výnosů plodin. Na poli kvasné a technické mikro-

biologie je třeba se zmínit zvláště o K. Kruisovi, který jako jeden z prvních studoval bakteriální jádra a věnoval se mikrofotografickému sledování buněk v ultrafialovém světle. Je třeba se zde zmínit o snaze V. Jonáše hlouběji a nově se podívat na základní otázky biologie kvasinek. I v úseku antibiotik můžeme z historie naší mikrobiologie vyzvednout domácí tradice: I. Honl společně s Bukovským již v 90. letech jako jedni z prvních se zabývali účinkem bakterie *Ps. pyocyanea* na jiné bakterie a pokusili se antibiotický preparát, z něho připravený, zavést i do léčebné praxe. Stejně tak je třeba se zmínit o práci F. Patočky, který sledoval antibiotický účinek kokovitého mikroorganismu v době, kdy otázky antibiosy byly na samém počátku. Podobně i na úseku obecné mikrobiologie reagovali naši pracovníci velmi pohotově na nové otázky a řešili je původním způsobem (Němec, Růžička, Šulc, Peklo, Mencl). Stejně tak byly časné řešeny v 30. letech otázky proměnlivosti (Patočka, Málek), otázky bakteriálních polysacharidů a jejich význam (Málek), otázky o zákonitostech průtokových kultur (Málek). I na objev bakteriofága reagoval u nás zvláště J. Kabelík pohotově původní prací.

V lékařské mikrobiologii pak je třeba vyzvednout zásluhy Hlavovy a zvláště Prowazekovy při řešení otázek skvrnitého tyfu. I ve veterinární mikrobiologii máme u nás dosažené původní výsledky (Klobouk, Lukeš a j.), stejně tak v parazitologii (Lambl, Drbohlav, Jírovec, Rašín a j.). Společným znakem těchto prací, které jsme uvedli jako příklad, je, že dovedly řešit velmi pohotově důležité teoretické i praktické otázky mikrobiologické a že při nich nepouštěly se zřetele i zájmy praxe. Tyto rysy z historie naší mikrobiologie jsou jistě cenným ukazatelem i pro mikrobiologii dnešní.

Druhým základem rozvoje každého vědního úseku je zajisté jeho *ideologické zaměření*. Po té stránce ukazuje již uvedený výčet našich mikrobiologů v minulosti a jejich práce, že byla v naší mikrobiologii snaha vyrovnávat se s pokrokovými myšlenkami ve vědě světové. V náplni práce se to zvláště projevilo tím, že naše mikrobiologie neodmítala nikdy možnosti proměnlivosti mikrobů a měla tím blíže k pokrokové tradici pasteuovské než ke ztrnulé škole žáků Kochových. Avšak rozhodujícím činitelem pro zaměření naší dnešní mikrobiologie byl 6. sjezd čs. mikrobiologů v roce 1950, pořádaný s úkolem vyjasnit, co přináší mičurinské zaměření mikrobiologii, jaké jí dává úkoly. Ten ukázal, proč toto zaměření je pro naši mikrobiologii nutné, jak se mičurinské zaměření promítá na úkoly mikrobiologie a vytkl i směr nejzákladnějších úkolů.

Avšak 6. sjezd mikrobiologický byl závažný i proto, že dal jedinečnou možnost přehlédnout naše síly v mikrobiologii a tím i vytvořit plán, jak odstranit nedostatky. Sjezd ukázal, že ještě v roce 1950 je naše mikrobiologie ve většině svých úseků naprosto nevyvinutá. Jakž takž byla zabezpečena jen mikrobiologie lékařská, a to převážně ve směru diagnostickém a výrobním, avšak její složky badatelské, virologie, imunologie, parazitologie, ale i výzkum antibiotik a výzkum tuberkulózy byly naprosto nezajištěny. A ještě horší to bylo s jinými odvětvími mikrobiologie, s půdní mikrobiologií, technickou a nejhůře se základním, teoretickým výzkumem.

Jaký byl stav pracovišť mikrobiologických v té době? Byl jich jen nevelký počet a výzkumná práce na nich byla málo zabezpečena a rozvinuta. Především to byla mikrobiologicko-epidemiologická složka Státního zdravotnického ústavu, která ovšem v té době byla nadmíru zatížena běžnou rutinní prací, starostí o své pobočky atd. Dalšími pracovišti byly mikrobiologické ústavy na vysokých školách, především na lékařské fakultě v Praze, v Bratislavě, v Hradci Králové, méně již v Brně, Plzni a pro obory kvasné mikrobiologie na Vysokém učení chemickém v Praze. Pro otázky obecné mikrobiologie zcela málo rozvinutá byla pracoviště na přírodovědeckých fakultách v Praze a Brně. Na výrobních pracovištích ve Stát-

ním zdravotnickém ústavu i ve výrobním veterinárním závodě v Ivanovicích byly při velkých výrobních úkolech jen zcela malé možnosti vědecké práce. Vědecká práce ve veterinární mikrobiologii nebyla na tom o nic lépe: určité možnosti vědecké práce byly na Vysoké škole veterinární v Brně, málo zbývalo pro vědeckou práci v Praze i Bratislavě. K tomu všechna pracoviště vysokoškolská byla velmi přetížena úkoly vyučovacími, nedostatečně vybavena pracovními silami i pracovními možnostmi. Pro výzkum kvasný byly sice některé specialisované ústavy jako pivovarský, ale i zde výzkumné práce bylo velmi málo. Proto prvním krokem muselo být jistě vybudování potřebných pracovišť a jejich zabezpečení vědeckými pracovníky.

Přitom úkolem bylo vybudovat pracoviště nejen taková, která by zabezpečovala řešení všech konkrétních, bezprostředně naléhavých úkolů, ale vybudovat současně i dostatečně silnou teoretickou základnu pro řešení otázek základních, dlouhodobých. Dnes můžeme říci, že toto budování bylo v podstatě již skončeno a dává nám tedy možnost přehlédnout, jak vypadá nyní síť pracovišť a jaké úkoly jednotlivá pracoviště převzala.

V úseku lékařské mikrobiologie především byla dobudována síť pracovišť, která umožňuje široký a dostatečně hluboký výzkum mikrobiologicko-epidemiologický. Dosavadní pobočky SZÚ staly se základem hygienicko-epidemiologických stanic, vybudovaných ve všech krajích a doplňovaných, kde třeba, ještě hustší sítí okresních stanic. Tyto stanice od běžných rutinních diagnostických a epidemiologických prací přecházejí k diagnostice složitější, jako některých nemocí virových, parazitárních a některé z nich dokonce jsou schopny řešit i úkoly výzkumné. Tím byla vytvořena široká základna, která dostala i vedoucího činitele v Ústavu epidemiologie a mikrobiologie ministerstva zdravotnictví v Praze, vybudovaném na základě příslušného oddělení Státního zdravotnického ústavu, a v Oblastním ústavu epidemiologicko-mikrobiologickém v Bratislavě. Pražský Ústav epidemiologie a mikrobiologie při svém přebudování získal možnosti řešit daleko hlouběji širší okruh výzkumných otázek; přešel od nemocí enterálních, jež původně v programu jeho práce převažovaly, k řešení otázek streptokokových nákaz, které rozpracoval i ve směru řešení některých základních otázek, jako je otázka spálových toxinů a j. Svě zkušenosti s bakteriofágy rozšířil i o práci s bakteriofágy stafylokokovými, přešel i na výzkum rickettsios, zvláště Q horečky. Víc než dříve se rozvinul výzkum otázek parazitárních, zvláště toxoplasmosy, podílel se na řešení komplexního výzkumu našich přírodních ohnisek nákaz a zvláště i rozvinul šíře výzkum virologický (otázky encefalitidy, chřipky, v poslední době i poliomyelitidy a hepatitidy). Oblastní ústav epidemiologie a mikrobiologie v Bratislavě se pak podílel významnou měrou při řešení přírodních ohnisek nákaz encefalitidy i jiných nemocí na Slovensku.

Jako další závažné pracoviště pro zdravotnickou mikrobiologii vznikl Výzkumný ústav imunologický. Jeho zřízení vyvolal ten stav, že závod Biogena při své výrobní povaze nemohl zabezpečovat dostatečně hluboký výzkum a proto vzniklo vážné nebezpečí zaostávání v tak důležitém úseku, jako je výroba sér a očkovacích látek a řešení otázek obrany organismu. Výzkumný ústav imunologický se hned po svém zřízení dal cestou fyziologické imunologie, jak její důležitost vyzvedlo pavlovovské zasedání v Sovětském svazu, ale současně se snažil pozvednout naši výrobu zaváděním nových způsobů očisty očkovacích látek, sér (gamaglobulin), i péčí o výrobu účinnějších očkovacích antigenů (hloubková kultivace bakterinů a j.). Závažnou měrou se podílel na řešení otázek o účinku léčebného spánku na průběh infekcí i na studiu patogenesy některých nákaz. Ústav takto ukázal plně význam i potřebu výzkumné práce imunologické při řešení naléhavých problémů výroby sér a očkovacích látek a je možno předpokládat, že dnes již bude účelné spojit výzkumnou

složku těsněji s výrobními úkoly dosavadního závodu Biogena a vytvořit tak jednotný výzkumný ústav sér a očkovacích látek s přidruženou výrobou.

Dalším významným ústavem na poli lékařské mikrobiologie je zajisté Výzkumný ústav antibiotik. Již při zavádění výroby penicilinu vytvořila se při závodě dosti početná výzkumná jednotka, která opět při zachování plného spojení s výrobou potřebovala určité osamostatnění od výroby již zaběhané tak, aby mohla řešit úkoly zavádění nových antibiotik do výroby i zlepšování výroby antibiotik dosavadních. Tento ústav se velkou měrou podílí na velkém růstu produktivity výroby tohoto antibiotika, zasloužil se o vytvoření předpokladů pro vybudování další výroby, vypracoval postup pro zavedení streptomycinu, aureomycinu i pracuje na antibiotikách ostatních. Zvláště ve své složce chemické a technologické dosáhl významných úspěchů a vynikající úrovně. I v úseku mikrobiologického výzkumu tuberkulózy nastalo podstatné zlepšení tím, že do té doby malá laboratoř v SZÚ přešla jako závažná složka do nově vzniklého Ústavu tuberkulózy a mohla tím ve větším rozsahu a intenzivněji rozpracovávat své tradiční již výzkumné téma, přípravu očkování proti tuberkulóze. To mu dalo možnost rozpracovávat původním způsobem nový typ očkovací látky použitím myšího kmene Wellsova. I pracoviště na lékařských fakultách dostala do jisté míry nové možnosti práce, tak zvláště Ústav lékařské mikrobiologie a imunologie v Praze mohl do značné hloubky rozpracovat otázky virových nákaz (obrna vepřů, encefalitida), rickettsií (Q horečka) i nákaz bakteriálních (především anthroozoonos: brucelózy, listeriózy) vedle jiných již tradičních otázek. Podobně se rozvinula práce i na lékařských fakultách v Brně, kde se rovněž dostaly otázky virologické do popředí, na VLA v Hradci Králové (tularemie a j.), v Bratislavě (laboratoř leptospirozy na hygienické katedře). Rozrostl se do jisté míry i výzkum veterinární, i když ne zdaleka v té míře jako výzkum zdravotnický. Především tam vzrostl počet výroben očkovacích látek a sér, prohloubila se tradiční již práce na veterinární fakultě v Brně, byl vytvořen základ mikrobiologické práce na veterinární fakultě v Košicích a zvláště se rozvinula práce na brucelózách i jiných nákazách v Bratislavě (Nižňanský).

Na poli zemědělské mikrobiologie byly odstraněny překážky, které v minulosti brzdily její rozvoj, vybudováním oddělení v nově zorganizovaném Výzkumném ústavu rostlinné výroby ČSAZV, kde se rozpracovávají některé otázky vazačů dusíku, volně žijících i symbiotických, bakterií fosfátových i alumosilikátových, studují se změny v mikroflóře v souvislosti s osevními postupy při travoplní soustavě i činnost bakterií při kompostování. Bylo vybudováno mikrobiologické pracoviště na Vysoké škole zemědělské v Brně (V. Káš), které se soustřeďuje hlavně na studium vzájemných vztahů mezi půdními mikroorganismy navzájem i mezi nimi a rostlinami; bylo založeno pracoviště půdní mikrobiologie ve Výzkumném ústavu travoplní soustavy ČSAZV v Pohořelicích, které rovněž studuje změnu mikroflóry při osevních postupech i její vztah k rhizosféře. V poslední době se začínají vytvářet střediska práce na poli půdní mikrobiologie i na Slovensku (SAV). Rozšířil se i rozsah práce na agronomické fakultě Vysoké školy zemědělské v Praze (otázky silážování a pod.) a byla tam založena i Laboratoř mikrobiologie ČSAZV (prof. A. Kroulík) řešící hlavně mikrobiologické otázky spojené s využitím kalů z výkrmů a silážování. Ještě je třeba, aby tento mikrobiologický úsek byl co nejrychleji zabezpečen i daleko větší a modernější možností výroby bakteriálních očkovacích látek (azotobaktera, rhizobií, fosforových bakterií aj.), než to dovoluje dosavadní pracoviště ve Strančicích a jak to odpovídá zkušenostem, které byly s takovými preparáty získány v Sovětském svazu.

Na úseku kvasné a technické mikrobiologie byly vytvořeny předpoklady pro širší i hlubší výzkumnou práci, především novým zorganizováním pracoviště na katedře

kvasné chemie a technologie Vysoké školy chemické v Praze, vybudováním mikrobiologické katedry při chemické fakultě v Bratislavě i konečně Výzkumnými ústavu kvasného průmyslu, pivovarského a jinými. Z otázek, které byly až dosud řešeny, to bylo především kvasné zužitkování odpadních vod, některé otázky spojené s aceton-butanolovým kvašením, pokusy o kontinuální lihové kvašení a pod. Cenným přínosem byly i některé závodní laboratoře, tak zvláště laboratoř u závodu J. Fučíka v Kaznějově, která řešila otázky využitkování odpadních vod při výrobě kyseliny citronové. Je zde vytvořena jistě dostatečná základna pro to, aby naše kvasné výroby se mohly opírat o výsledky vědeckého výzkumu.

V Brně bylo vytvořeno pracoviště pro využití mikrobiologie při naftové prospekci, které se zapracovalo do studia mikrobů, jež se vyskytují v půdě ve spojení s existencí naftových ložisek.

Kromě této široké základny mikrobiologického výzkumu, spojeného svou problematikou více nebo méně s konkrétními otázkami, byla však vytvořena i soustava pracovišť *pro výzkum základní*. Zásadou zde bylo, aby pracoviště takového výzkumu určená, převzala řešení nejzávažnějších teoretických otázek, avšak nepouštěla při tom se zřetele nejdůležitější otázky praxe. Proto od samého začátku bylo třeba, aby se co nejtěsněji spojovala ve své práci se širokou soustavou pracovišť, která souvisí těsněji s praxí, aby se nedostala do izolace, ale řešila otázky nejdůležitější, nejzávažnější tak, aby se mohla stát oporou celého výzkumu spojeného bezprostředně s praxí. Proto prvním úkolem této soustavy základního výzkumu bylo vypracování dobrých základů metodických, které by pomohly naší mikrobiologii i v tomto úseku dohnat to, v čem jsme se opozdili za vědou zahraniční. Z toho, co jsem nyní uvedl, je nyní dostatečně jasno, že tento výzkum byl veden od začátku k tomu, aby se netvořil nějaký umělý předěl výzkumu základního a aplikovaného, ale naopak, aby se rozvíjela a prohlubovala co nejtěsnější komplexní spolupráce. Většina tohoto výzkumu je soustředěna pochopitelně na pracovištích Akademie. Vedle toho však některé základnější otázky přejímají pracoviště na vysokých školách; tak zvláště mikrobiologická katedra na biologické fakultě v Praze řeší některé otázky základnějšího rázu na úseku půdní mikrobiologie (Seifert, Drobník a j.) i na úseku mikrobiologie kvasné (Stárka). Na poli Akademie byla zorganizována pevná základna především vybudováním mikrobiologického oddělení Biologického ústavu Československé akademie věd. Zde byly vytvořeny tyto laboratoře: laboratoř mikrobiologie půdní (Macura), která studuje některé fyziologické otázky vazačů dusíku, zvláště azotobaktera, ať již vzhledem k využití v praxi, ať už v jeho vztahu k rostlinám a jejich výživě. Dále laboratoř antibiotická, jež rozpracovává metody pro nejúčelnější a nejúčinnější hledání nových antibiotických organismů z půdy tak, aby na jedné straně bylo možno i samostatně obohacovat soubor u nás vyráběných antibiotik i aby byly odkrývány zákonitosti vzniku antibiotické schopnosti v přírodě (Ševčík). Laboratoř mikrobiologie technické, která si dala za svůj základní úkol rozpracovávání progresivních průtokových metod, odkrývání jejich zákonitostí zvláště ve spojení s využíváním energetického zdroje (Málek, Řičica, Beran, Burger a j.). Zvláště významným přínosem této laboratoře bylo teoretické i praktické propracování otázek využití amylolytických enzymů plísňových pro výrobu lihu i otázek přeměny škrobu s tím spojené. S úkoly této skupiny souvisí práce sbírek technických mikroorganismů, která soustřeďuje mikroorganismy ze skupiny bakterií, kvasinek, aktinomycet i plísní a při tom řeší i některé otázky výzkumné, jako je otázka biosyntesy C vitamínu (Färber), otázky ochrany důležitých materiálů proti plísním (Zánová) a j.; laboratoř obecné biologie a biochemie mikroorganismů, která se soustřeďuje na otázky mikrobiální proteosyntesy, proteolytických enzymů, sporulace, dělení bakterií (Málek, Chaloupka).

Pro otázky lékařské mikrobiologie byly vytvořeny laboratoře dvě, jednak menší pro otázky proměnlivosti, která se dosud zabývá převážně mykobakteriemi tuberkulózy a jeho přeměnou v neacidoresistentní formy, jednak rozsáhlá laboratoř imunologická, která se zaměřením fyziologické imunologie, navazující na tradice mečnickovské, rozpracovává obecné otázky obrany organismu jako otázky tvorby protilátek, reaktivity organismu při některých infekcích (na příklad stafylokokových), v ontogeneze, při různých režimech výživy (Šterzl, Johanovský, Trnka a j.). Velmi závažným přínosem této skupiny bylo odkrytí zvláštních nukleoproteinů, které vznikají v buňkách mesenchymu při imunisaci (Šterzl, Hrubešová) a které mají ráz prekursorů protilátek.

Dalším velkým pracovištěm pro základní výzkum je Virologický ústav ČSAV v Bratislavě se svými dvěma dosud tradičními otázkami, výzkumem chřipky (Blaškovič) a zánětů mozku; tento ústav byl organisátorem prvních komplexních výzkumů přírodních ohnisek nákaz, v nichž jsme zaujali závažné místo hned po boku vědy sovětské. Ústav vytvořil plně předpoklady pro to, aby otázky virologické mohly být řešeny co nejkompexněji se všech pohledů a za použití všech nejmodernějších metodik. V poslední době zahajuje ústav práci i na otázkách jiných neurotropních virů (obrny a j.).

Konečně při základním výzkumu mikrobiologickém je třeba se zmínit o některých pracích biochemické laboratoře Chemického ústavu Československé akademie věd, kde byly přineseny závažné výsledky v otázkách vlivu některých antibiotik (chloramfenikol) na metabolismus mikroorganismů, jež vrhají nové světlo na mechanismus jejich účinku na mikroorganismy.

Z tohoto letného přehledu je jasno, že mikrobiologie má dnes u nás vybudovanu členitou soustavu výzkumných pracovišť, která jsou schopna řešit všechny nejdůležitější otázky, které od nás požaduje náš život, i mohou dohnat to, v čem jsme zaostali za vědou zahraniční. Tato pracoviště mají již většinou dostatečné počty vědeckých pracovníků, z nichž již řada dosáhla hodností kandidátů věd, jsou vyzbrojeni novodobou pracovní metodikou a mnozí mají jasné pokrokové zaměření práce. Dávají tak záruku toho, že naše mikrobiologie se může dále rozvíjet ještě úspěšněji. Prohlubuje se spojení naší mikrobiologie s mikrobiologií zahraniční, sovětskou, lidových demokracií i v zemích západních. Řada prací našich mikrobiologů již mohla se ctí ukázat úroveň naší vědy na mezinárodních sjezdech. Přesto zůstávají ještě mnohé nedostatky. Tak především některé velmi důležité otázky, které ukládá mičurinské zaměření naší mikrobiologii i náš život, jsou propracovávány nedostatečně: na prvním místě je to studium řízené proměnlivosti a selekce, ať již u mikrobů důležitých pro lékařství, ať pro kvasný průmysl s cílem získat účinnější kmeny pro přípravu očkovacích látek nebo ve výrobě. Dále není dostatečně široko zabezpečen dosud výzkum nových antibiotik. Studium imunochemické nevěnuje pozornost otázkám antigenů. Je třeba ještě důsledněji rozvinout mikrobiologickou vědeckou pomoc kvasným výrobám. Dalším nedostatkem je, že spolupráce jednotlivých pracovišť na společných otázkách není často dosti důsledná a upřímná, takže se ještě velmi mnoho sil ztrácí nežádoucí duplicitou. Nedostatečně je zabezpečen převod laboratorních výsledků do poloprovozu a výroby: kromě výzkumu antibiotického není dosud zařízení pro čtvrtprovozy a poloprovozy. A konečně přes značná zlepšení se nedostatečně využívá metodik biochemických a v samém začátku je používání isotopů v mikrobiologickém výzkumu. Avšak naše mikrobiologie má dnes již všechny předpoklady, aby odstranila i tyto své nedostatky a ve všech úsecích dosáhla nejlepší úrovně, jaká odpovídá zájmu a podpoře, kterou dnes u nás má. Bylo-li úkolem naší mikrobiologie v prvé naší pětiletce vybudovat uvedenou soustavu pracovišť, musí být nyní její ctizádostí dospět ve všech nezbytných úsecích práce nejlepší světové úrovně.

Československá
M I K R O B I O L O G I E
ročník 1. (1956) — č. 1

Dlouhodobá imunisace. I.

Útlum tvorby protilátek při každodenní imunisaci

JAROSLAV ŠTERZL

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 12. 10. 1955

Při opakovaném každodenním vpravení antigenu dochází nejprve k podstatnému zvýšení tvorby protilátek; pokračuje-li vpravování antigenu, titer protilátek se snižuje. Tvorbu protilátek nelze prokázat přímo ani ve slezinné tkáni (Šterzl 1954). Tento jev je velmi podobný „imunologickému útlumu“ Zdrodovského (1950, 1954), „imunologické neodpovědi“ (Dixon a Maurer 1955b) i Feltonově „imunologické paralýze“ (1942, 1949). To především v tom, že na další vpravení antigenu organismus nereaguje tvorbou protilátek.

Je samozřejmé, že stav organismu, v kterém nereaguje na další antigenní podnět, nebude bezvýznamný pro skutečnou obranyschopnost organismu. Proto hlavní záměr naší práce o dlouhodobé imunisaci je zjistit, zda postupné snižování tvorby protilátek znamená skutečný útlum, t. j. snížení obranných schopností organismu, nebo zda v průběhu opakovaného vpravení antigenu dochází k adaptaci, menším reakcím na cizorodé antigenní podněty, provázenou dobrou obranyschopností vůči aktivní infekci.

Postavení takové otázky již samo vyžaduje pozorně sledovat změny ve snadno zjistitelných projevech imunity, jako je tvorba protilátek, reakce teplotní a leukocytární, složení peritoneálního exsudátu, dynamika infekce, intenzita vylučování.

V tomto sdělení sledujeme změny titru protilátek po každodenní imunisaci. I při této problematice vyvstává několik samostatných otázek: jak rychle po vpravování antigenu dochází k útlumu u různých druhů zvířat, jak závisí vznik útlumu na množství vpravovaného antigenu a na způsobu (místě) jeho vpravování, zda snižování aglutinujících protilátek není spojeno s růstem titru protilátek inkompletních, a zda je možno vysvětlit nastupující útlum po dlouhodobé každodenní imunisaci — podobně jako imunologickou paralýsu — přebytkem a přetrváváním vpraveného antigenu v tkáních (Stark 1954, 1955, Dixon, Maurer a Weigle 1955).

Materiál a metody

Imunisovali jsme dlouhodobě 4 skupiny krys, 4 skupiny králíků a jednu skupinu morčat.

Tři skupiny krys (30—30—10 zvířat) jsme imunisovali každý den intraperitoneálním vpichem 1 ml bakteriální suspence *Salmonella paratyphi* B, inaktivované teplem 1 hod. při 70°C, v 1 ml 5 . 10⁷ mikrobů. Jednu skupinu krys (15) jsme imunisovali každý den 1 ml (2 . 10⁹ mikrobů) subkutánně na hřbetě.

Imunisovali jsme každodenně intravenózně dvě skupiny králíků (5—3) dávkou 1 ml (5 . 10⁷ mikrobů). Druhou skupinu (králíky č. 706, 707, 708) jsme imunisovali po pěti měsících dále každodenně dávkou 2 . 10⁹ mikrobů. Třetí a čtvrtou skupinu (12 a 10 zvířat) jsme imunisovali ihned dávkou 2 . 10⁹. Z prvních skupin uhynuli v prvních dnech po imunisaci čtyři, z druhé skupiny tři králíci.

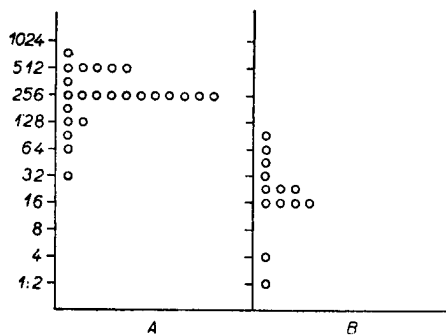
Pro orientační srovnání jsme sledovali titer protilátek u morčat, každodenně imunisovaných intraperitoneální dávkou $5 \cdot 10^7$ mikrobů.

Titr aglutinačních protilátek jsme zjišťovali při uložení do chladnice na 2 až 4°C; hodnotili jsme jej po 2, 4 a 6 dnech. Titr inkompletních protilátek jsme stanovili blokujícím testem a antiglobulinovým testem. Blokující test jsme připravili smísením 0,5 ml naředěného zkoušeného sera s 0,5 ml aglutinačního sera proti *S. paratyphi* B přidaného v mezním ředění (na příklad titer aglut. sera 1 : 500 — v pokuse bylo v konečném rozředění 1 : 300). Přidali jsme 1 ml aglutinační suspence a uložili při 2—4°C. Odčítali jsme jako u normální aglutinace.

Antiglobulinový Coombsův test jsme dělali u negativních ředění po zhodnocení normálních aglutinací. Většinu antiglobulinových testů jsme připravili tak, že jsme serum (0,5 ml) smíchali s bakterijním (0,5 ml) antigenem a po uložení 2 hodiny při 37°C odstředili (4000 obr. min. — 20 min.), serum oddělili a antigen třikrát promyli fyziologickým roztokem. Antigen jsme naposledy rozředili v 0,2 ml fyziologického roztoku a k němu přidali 0,2 ml naředěného antiglobulinového sera. Serum proti králíčimu globulinu jsme připravili intraperitoneálně imunisací křečků, proti krysímu globulinu intravenózně imunisací králíků. Titr antiglobulinových ser jsme zjišťovali hemaglutinací, precipitací; konečné rozředění antiglobulinového sera (v jakém ředění přidáváno k promyté aglutinační suspenci) je v jednotlivých tabulkách. Ke každé zkoušce jsme přidali kontroly, které ověřovaly spolehlivost reakce (zda nenastává spontánní aglutinace během promývání a centrifugace).

Výsledky

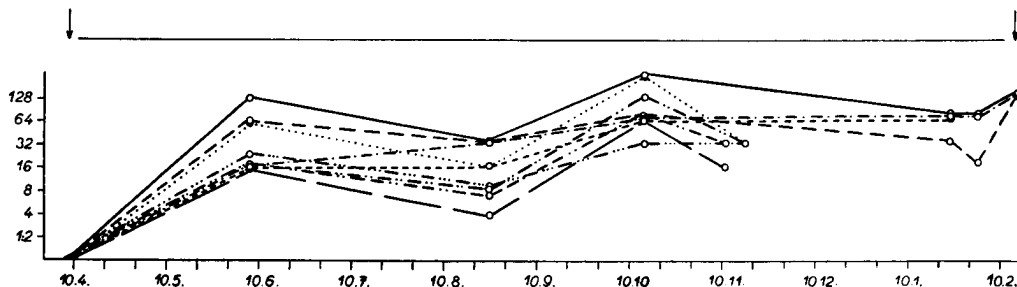
Sledováním titru u 3 skupin krys imunisovaných intraperitoneálně jsme zjistili (obr. 1), že při opakovaném vpravování imunisační suspence i u těchto zvířat klesá titer protilátek.



Obr. 1. Titry protilátek u skupiny krys imunisovaných každodenně intraperitoneální dávkou 1 ml ($5 \cdot 10^7$ mikrobů). Počátek imunisace 7. 12.
A) Aglutinační titer po 10 dnech imunisace (17. 12.).
B) Titr protilátek po 3 měsících po počátku imunisace.

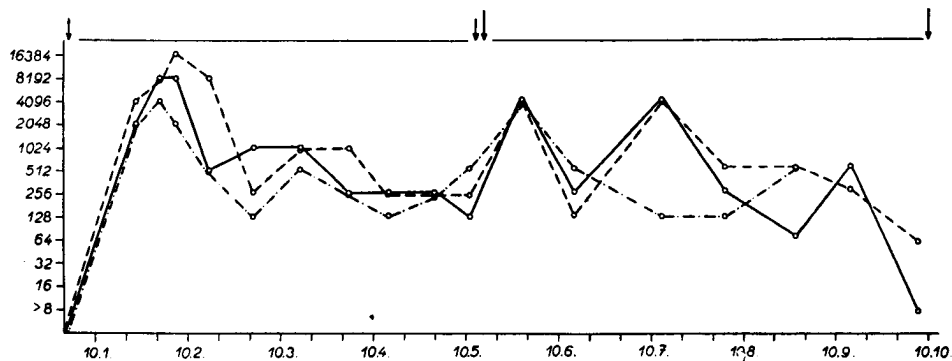
Avšak i po dlouhodobém podávání antigenu se udržuje stále na hladině 1 : 8, 1 : 16 až 1 : 32. U poslední skupiny intraperitoneálně imunisovaných krys se po pěti měsících každodenní imunisace snížil titer v průměru 1 : 32. Inkompletní protilátky stanovené v negativních aglutinacích s antiglobulinovým serem ředěným 1 : 20 (precipitační hodnota 1 : 10 000) byly zcela negativní.

Krasy imunisované subkutánně i při vpravování velkých dávek ($2 \cdot 10^9$) téměř v průběhu celého roku každodenně neukazují význačnější pokles titru protilátek (obr. 2). Rovněž jsme nemohli prokázat ani protilátky inkompletní při takto dlouhodobé subkutánní imunisaci ve zvýšeném titru vůči protilátkám kompletním (tab. 1).



Obr. 2. Titry protilátek skupiny krys, imunisovaných každodenně subkutánní dávkou 1 ml ($2 \cdot 10^9$ mikrobů). Snížení počtu zvířat v průběhu imunisace je v důsledku sledování dynamiky infekce v různých fázích imunisace.

Intraperitoneální imunisace morčat dávkou $5 \cdot 10^7$ mikrobů měla stejnou dynamiku jako u skupiny krys: nejvyšší hladiny protilátek jsme dosáhli po 1 měsíci (1 : 256—512), poté se protilátky postupně snižují, titer dosahuje průměru 1 : 32 a dlouho beze změny přetrvává.

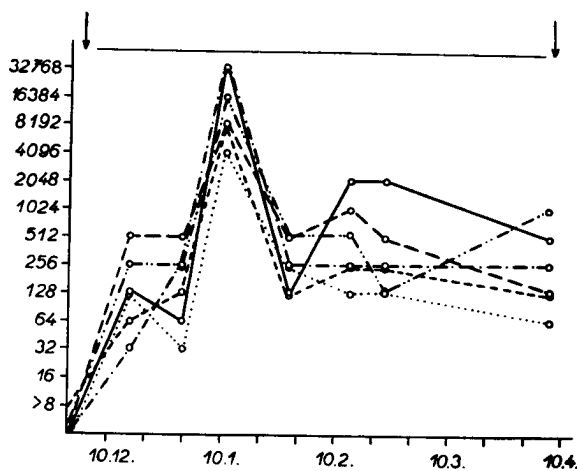


Obr. 3. Titry protilátek u králíků č. 706, 707, 708, každodenně imunisovaných intravenosně od 3. I. 1 ml antigenu ($5 \cdot 10^7$ mikrobů). Od 16. 5. zvětšeno množství každodenní dávky 40krát v 1 ml ($2 \cdot 10^9$ mikrobů).

Tab. 1. Antiglobulinový test u krys každodenně subkutánně imunisovaných 1 ml antigenu ($2 \cdot 10^9$ mikrobů), odběr 16. 2.

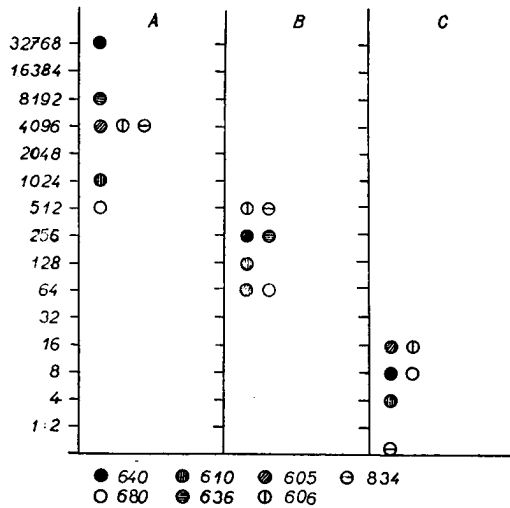
Krysa	Aglutinační titer	Provedení testu	Antiglobulinové serum a ředění	Výsledky
ČH	1 : 128	po odečtení aglutinace	králíčí serum proti	1 : 512
PZN	1 : 128	antiglobulinový test	krys. glob. precipitace	negativní
PPN	1 : 128	udělán v negativních ředěních	1 : 10.000 ředěno 1 : 20	1 : 256

Útlum tvorby protilátek u králíků po každodenním vpravování dávky $5 \cdot 10^7$ mikrobů intravenosně nastupuje v průběhu druhého měsíce (obr. 3). Když jsme nyní v době poklesu titru protilátek zvýšili množství injikovaného antigenu 40krát (na $2 \cdot 10^9$ mikrobů v ml), ukázalo se, že na tento podnět reagují všechna zvířata opět podstatným zvýšením tvorby protilátek. Teprve po každodenní imunisaci touto



Obr. 4. Titry protilátek králíků č. 64, 54, 79, 811, 280, 58, každodenně intravenosně od 2. 12. očkovaných 1 ml, ($2 \cdot 10^9$ mikrobů).

zvětšenou dávkou antigenu další 3 měsíce dochází opět k útlumu tvorby protilátek.



Obr. 5. Skupina králíků č. 640, 680, 610, 636, 605, 606, 834, imunizovaných každodenně 1 ml antigenu ($2 \cdot 10^7$ mikrobů) od 27. 5.

A Aglutinační hodnoty 27. 6.
 B Titr protilátek 11. 7.
 C Titr protilátek 17. 8.

U dalších skupin králíků jsme přistoupili ihned k intravenósnímu injikování dávky $2 \cdot 10^9$ mikrobů. I zde po fázi významného zvýšení tvorby protilátek v průběhu prvního měsíce dochází k rychlému snižování titru aglutinujících protilátek (obr. 4, 5), aniž se mění hladina inkompletních protilátek (tab. 2, 3); sledováno antiglobulinovým a blokujícím testem. U poslední skupiny králíků, kde se významně snížil titer protilátek po každodenní imunizaci, jsme v době největšího snížení vpravili dávku 2 ml živé bakteriální suspence ($4 \cdot 10^9$ mikrobů) intrakardiálně. Tato dávka, která svojí intenzitou mnohonásobně překonává každodenní imunizační podnět, vede k nové tvorbě protilátek (obr. 6). Zvýšení hladiny protilátek není způsobeno jejich nespecifickým vyplavením, protože po 24 hodinách se titer protilátek nezvýšil.

Tab. 2. Antiglobulinový test u králíků každodenně imunizovaných intravenósně od 2. 12. 1 ml ($2 \cdot 10^9$ mikrobů)

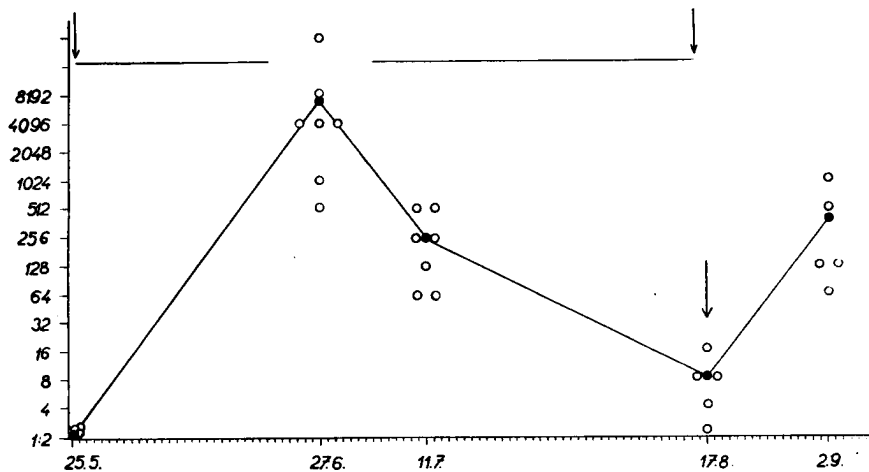
Králík číslo	Odběr krve	Agglutinační titer	Provedení testu	Antiglobulinové serum a ředění	Výsledky
58	23. 2.	1 : 256	po smíchání sera a antigenu, inkubace 2 hod. 37°C, promývání a centrifugace	k promytému antigenu (0,2 ml) přidáno 0,2 ml sera křečků ředěného 1 : 10 (hemaglutinační titer proti králičím krvinkám 1 : 1.280, precipitace 1 : 1.000).	1 : 256
79	23. 2.	1 : 256			1 : 4.096
54	23. 2.	1 : 512			1 : 256
64	23. 2.	1 : 2.048			1 : 2.048
280	23. 2.	1 : 128			1 : 128
58	7. 4.	1 : 128	po smíchání sera a antigenu, inkubace 2 hod. 37°C, promývání a centrifugace	k promytému antigenu (0,2 ml) přidáno 0,2 ml sera křečků ředěného 1 : 10 (hemaglutinační titer proti králičím krvinkám 1 : 1.280, precipitace 1 : 1.000).	1 : 512
79	7. 4.	1 : 256			×
54	7. 4.	1 : 128			1 : 512
64	7. 4.	1 : 512			1 : 32
280	7. 4.	1 : 1.024			1 : 256
811	7. 4.	1 : 64			1 : 128

Blokující test u těchto králíků při odběru 28. 1., 23. 2., 7. 4. Přidáno králičí serum proti *S. paratyphi* B, titer 1 : 256, tak, že v testu bylo v konečném rozředění 1 : 100. U žádné z provedených zkoušek nebyla zjištěna zábrana aglutinace.

Tab. 3. Antiglobulinový test u králíků každodenně imunisovaných intravenosně dávkou 1 ml antigenu ($2 \cdot 10^9$ mikrobů) od 27. 5.

Králík číslo	Odběr krve	Aglut. titr	Provedení testu	Antiglobul. serum a ředění	Výsledky
606	27. 6.	1 : 4.096	2 hod. inkubace 37 °C, promytí 24 hod. v thermostatu	Stejně jako v tab. 2 přidáno v ředění 1 : 10	1 : 1.024
834	27. 6.	1 : 4.096			1 : 1.024
635	27. 6.	1 : 8.192			1 : 1.024
610	27. 6.	1 : 1.024			1 : 512

Neuvádíme výsledky antiglobulinového testu z odběru 7. 8., protože aglutinovala všechna ředění, i kontroly. Blokující test provedený při odběru 27. 6. a 7. 8. neměl v žádném ředění zábranu aglutinace.



Obr. 6. Časový průběh útlumu u skupiny králíků, každodenně imunisovaných od 27. 5. do 17. 8. 1 ml ($2 \cdot 10^9$ mikrobů). 18. 8. vpravena infekční dávka 2 ml živé suspence ($4 \cdot 10^9$ mikrobů) intraarteriálně. Titry protilátek stanoveny po 14 dnech.

Diskuse

Ze všech výsledků jednoznačně vyplývá, že opakované dlouhodobé vpravování antigenu vede přes fázi zvýšené tvorby protilátek k postupnému snižování a u některých skupin k útlumu jejich tvorby.

Srovnáme-li rychlost a intenzitu vzniku útlumu mezi jednotlivými druhy zvířat, potom u králíků nastupuje rychleji než u krys a morčat. Předpokládáme, že vznik útlumu je závislý na citlivosti zvířete vůči antigenu, tedy i na rychlosti a intenzitě tvorby protilátek. Všechny tyto tři faktory jsou u králíků nepoměrně větší než u krys a morčat, které reagují na podávaný antigen pomalu (prvé protilátky se v seru objevují za 5 až 8 dní), hladina protilátek dosažená u těchto zvířat je nízká (největší titry 1 : 512). S tím je spojen i pomalejší vznik útlumu (vzhledem k váze) na mnohem větší dávky antigenu než u králíků.

Kladli jsme si otázku, jaký význam má způsob (místo) vpravení antigenu při každodenní imunisaci pro vytvoření útlumu tvorby protilátek. Při subkutánní imunisaci nenastával útlum tak rychle a účinně, jako při imunisaci peritoneální a intravenosní (obr. 2). Rychlý vznik útlumu při intravenosní imunisaci je popsán

i v práci Říhové (1955), který se podobně jako Doroškevičová (1954) snaží vyhnout vzniku útlumu tvorby protilátek imunisací subkutánní. Podstatu rozdílného vzniku útlumu při různém vpravení antigenu posuzujeme i zde jako výsledek nestejné reakce organismu na vpravení antigenu různým způsobem. Při subkutánní imunisaci je tvorba protilátek podstatně snížena proti imunisaci intravenosní (De Gaetani, Terranova a De Gregorio 1955). I zde se jeví tedy v přímé závislosti intenzita podnětu k tvorbě protilátek s jejím následujícím útlumem.

Neprokázali jsme, že snížené titry aglutinujících protilátek by provázelo zvýšení protilátek inkompletních. To ani v tom případě, když jsme dlouhodobě imunisovali subkutánně, což se pokládá za zvlášť vhodný způsob vytváření inkompletních protilátek (Treffers a spol. 1947, Schmidt 1954). Uzavíráme proto, že nelze jednoduše usuzovat z dříve popsaných zpráv inkompletních protilátek jako protilátek hyperimunních (Diamond 1947) na jejich nutné objevení se při každodenní dlouhodobé imunisaci. Zvláštní pozornost si zaslouží průkaz inkompletních protilátek Coombsovou metodou. Stává se ojediněle, že při použití bakterijských antigenů během centrifugačního procesu a promývání dojde ke spontánní aglutinaci. Potom je přesnost odečtení buď pochybná anebo nemožná. Uvědomili jsme si, jak mnohostranné je nebezpečí odečítání Coombsova testu s bakterijským antigenem: některé aglutinace s přidaným antiglobulinovým serem nedosahují hodnoty původních aglutinací a některé je naopak mnohonásobně převyšují (tab. 1, 2, 3). Zde může jít na jedné straně o známý brzdicí vliv přidaného sera (přehled viz Hummel 1955), na druhé straně o možnost spontánní aglutinace. Vidíme proto, ověřili-li se zjištění (Foz a Garriga 1954), že je přímý vztah mezi titrem protilátek inkompletních a vazbou komplementu, jako vhodné sledovat inkompletní protilátky ve vztahu k aglutinaci reakcí vazby komplementu. Původní Coombsův test s bakterijským antigenem bude snad možno zpřesnit i kombinací s koloidním konglutinačním testem, přidáváním antiglobulinového sera k bakterijské suspensi stabilizované dextrans, želatinou atd. (Hummel 1955). Tuto otázku sledujeme v dalších pokusech.

Je pochopitelné, že nezjištění inkompletních protilátek nevyklučuje jiné změny v charakteristice sera dlouho imunizovaných zvířat. Naopak z prací, v kterých byla sledována molekulová váha a elektroforetická pohyblivost, se ukazují výrazné změny po opakované imunisaci (literatura Kabat 1953); v poslední době bylo možno zjistit změny protilátek i chromatograficky (Porter a Humphrey 1955). Je pochopitelné, že chceme-li zodpovědět, jaký je stav imunity při dlouhodobém vpravování antigenu, je třeba sledovat ochranný účinek ser každodenně imunizovaných zvířat. Výsledky sdělíme v další práci.

V prvním období každodenní imunisace jsme dosáhli u zvířat vysokých titrů, které nelze srovnat s jednorázovou imunisací. Zdrovskij (1953) předpokládá, že jde o jev sumace ve smyslu nervově reflexních podráždění. Posuzujeme zvýšení titru protilátek jako sumaci, nikoli však podráždění, ale především kvanta vpravovaného antigenu. K tomuto závěru nás opravňují pozorování s mikrointervalovou imunisací (Šterzl a Králík 1956) i výsledky Holubovy (1956), který nenalezl rozdíly v tvorbě protilátek při jednorázovém vpravení nebo když rozdělil stejnou antigenní dávku do 14 každodenních imunisací. Naopak Carlinfanti (1951) zjistil, že rozdělení stejného množství antigenu (toxinu) na několik injekcí vpravených v průběhu 10 až 21 dní zvyšuje tvorbu protilátek.

Pokračování každodenní imunisace vedlo k postupnému snižování protilátek v seru (nikoliv jednorázovému, ale přes vlny opětného zvýšení titru), až konečně nedocházelo k odpovědi na každodenně vpravovaný antigen. Je třeba srovnat tento jev imunologického útlumu se stavy již popsanými, kdy nové podráždění antigenem nevede k tvorbě protilátek.

Ve svých pokusech srovnává Zdrovovskij (1950, 1954) stav imunologického útlumu s neurofysiologickými stavy podráždění a útlumu, avšak blíže nezjišťuje, zda jde o útlum nervových mechanismů nebo funkce buněk mesenchymální tkáně tvořící protilátky.

Felton (1949) vysvětloval „imunologickou paralysu“ jako pevnou vazbu antigenu na buňky; Morgan (1953) však ukázal, že nejde o změnu retikuloendothelu ve smyslu nespecifické blokády, protože paralysa je typově specifická. To prokazují i poslední práce Feltona, Kauffmana a j. (1955). Imunologickou paralysu vysvětlují dnes souhlasně Stark (1955), Dixon, Maurer a Weigle (1955) jako dlouhodobé přetrvávání nemetabolisovatelného pneumokokového polysacharidu v organismu (Kaplan a Coons 1950). Tento antigen přetrvávající v tkáních strhuje vytvořené protilátky do vazby, protilátky jsou rychle metabolisovány a vylučovány z organismu. Je nutno tedy pohlížet na „imunologickou paralysu“, která vzniká vpravením velkého množství pneumokokového polysacharidu, jako na specifický jev, který by nebyl možný v případě, byl-li by vpravován snadno metabolisovatelný antigen.

Přesto však bylo možno potlačit tvorbu protilátek opakovaným vpravením i velkých dávek heterologního serového proteinu, jehož doba přetrvávání v organismu je normálně krátká (Dixon a Maurer 1955a). Je krajně významné, že se těmto autorům (Dixon a Maurer 1955b) podařilo vyvolat dlouhodobý útlum nikoli jen tehdy, když imunisovali velkými dávkami mláďata, ale i u dospělých zvířat, když jim vpravili antigen po ozáření X paprsky. Tím se ukazuje souvislost se studiem vzniku „sblížení“ (Hašek 1953, 1955), „aktivní tolerance“ (Brent, Billingham a Medawar 1953), pozorované jak vůči blízkým antigenům krvinkovým, tak vůči bakteriím (Buxton 1954), virům (Simonsen 1955), i serovému albuminu (Dixon a Maurer 1955, Cinader 1955), byl-li antigen vpraven mláďatům v období, kdy ještě přirozeně netvoří protilátky. Závěr pokusů Dixonových a Maurerových je ten, že vyvolaná „imunologická neodpověď“ není výsledkem neutralisace protilátek, jakmile jsou vytvářeny, tak jako je tomu v případě imunologické paralysy vyvolané pneumokokovým polysacharidem. Ke stejnému závěru došel Johnson a spolupracovníci (1955), kteří po vpravení velkých dávek albuminu rovněž neusuzují na vyvázání vytvářejících se protilátek, ale na přímou zábranu tvorby protilátek obsazením všech funkčních míst antigenem.

Srovnajme s těmito pracemi své výsledky, vytvoření útlumu tvorby protilátek u dospělých zvířat po dlouhodobém vpravování antigenu. Ani v našem případě nelze předpokládat nespecifickou blokádu mesenchymu pod vlivem velkých dávek nebo „vyčerpání“ schopnosti tvorby protilátek. Vpravení nespecifického antigenu v době imunologického útlumu vede k normální tvorbě protilátek proti tomuto druhově odlišnému antigenu. Jaký má význam množství specifického antigenu uloženého po dlouhodobé imunisaci v tkáni, dokazují výrazné naše pokusy: v době již snížené tvorby protilátek se zvýšilo množství antigenu 40krát. Tato dávka byla znovu podnětem k další tvorbě protilátek (obr. 3). V dalším pokuse, při úplném útlumu, zvýšením dávky tak, že jsme vpravili velkou dávku aktivní infekce (obr. 6), se znovu tímto podnětem vyvolala novotvorba protilátek. Z těchto pokusů je jasné patrné, že zvýšení množství antigenu vpravovaného do organismu nemá za následek zvýšené vyvázání volných protilátek ze sera, jejich další snížení, ale naopak vede k nové reakci organismu.

Vyvozujeme proto z těchto pokusů, že opakovaným podrážděním určité intensity (dané množstvím vpraveného antigenu), lze dosáhnout přizpůsobení, jehož výsledkem je snížení reakce na tuto intenzitu podnětu. Zvýšíme-li podnět (zvětšením množství vpravovaného antigenu), dochází k opětné tvorbě protilátek. Můžeme usuzovat, že jde o skutečnou tvorbu a nikoliv vyplavení vytvořených protilátek nespecifickou anamnestickou reakcí, protože při té stoupá množství protilátek již v průběhu prvních hodin. Sera odebraná 24 hodin po vpravení infekční dávky však neměla zvýšené titry protilátek; jejich množství se naopak zvětšuje v průběhu 14 dní po injekci antigenu.

Velmi podobného výsledku, vyvolání tvorby protilátek po mimořádném zvýšení množství injikovaného antigenu, jsme dosáhli u králíčích mláďat. Králíčí mláďata při intraperitoneálním vpravení imunisační dávky 1 ml ($5 \cdot 10^7$ mikrobů, dostatečné pro dospělá zvířata) nereagují tvorbou protilátek. Teprve zvýšením imunisační dávky více než 10 000krát (přepočteno i na váhu) lze dosáhnout tvorby protilátek i u mláďat (Šterzl a Trnka 1956).

Posuzujeme jev, útlum tvorby protilátek při každodenním dlouhodobém vpravo-

vání antigenu dospělým zvířatům, jako výsledek adaptační schopnosti organismu k opakovaným podrážděním. Je samozřejmé, že nemůžeme z tvorby protilátek usuzovat, který článek složitých vztahů tkáňového metabolismu a jeho řídicích vlivů je pro popsanou adaptaci hlavní. K této otázce budeme moci přispět sledováním dalších fyziologických reakcí v průběhu dlouhodobého vpravování antigenu, reakce leukocytární a teplotové, jak je předmětem dalšího sdělení.

Souhrn

Každodenní vpravování imunizačních dávek vede u laboratorních zvířat (králíků, krys a morčat) po fázi zvýšené tvorby protilátek k postupnému útlumu jejich tvorby. Nezjistili jsme současně zvýšení titru inkompletních protilátek. Vytvořený imunizační útlum můžeme překonat vpravením větší antigenní dávky.

Rychlost útlumu tvorby protilátek je závislá na druhu experimentálního zvířete a místu injekce antigenu.

Uzavíráme, že podstatou útlumu je vytvoření adaptace v průběhu imunisace vůči určité intenzitě antigenního podráždění.

Za technickou spolupráci děkujeme L. Trískové a D. Žaloudkové.

L i t e r a t u r a

- Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B.: „Actively acquired tolerance“ of foreign cells. *Nature* 172 : 603, 1953.
- Buxton, A.: *Antibody production in avian and young chicks*. *J. Gen. Microbiol.* 10 : 398, 1954.
- Carlinfanti, E.: *Antitoxin response to repeated (daily) doses of diphtheria toxoid*. *J. Immunol.* 66 : 311, 1951.
- Cinader, B., Dubert, J. M.: *Acquired immune tolerance to human albumin and the response to subsequent injections of diazo human albumin*. III. *Congres Intern. Biochim., Brusel 1955.* (Resumés str. 130.)
- Diamond, L. K.: *Erythroblastosis foetalis or haemolytic disease of the newborn*. *Proc. Roy. Soc. Med.* 40 : 546, 1947.
- Dixon, F. J., Maurer, P. H., Weigle, W. O.: *Immunologic activity of pneumococcal polysaccharide fixed in the tissues of the mouse*. *J. Immunol.* 74 : 188, 1955.
- Dixon, F. J., Maurer, P. H.: *Effectes of large infusions of heterologous serum proteins on the serum protein metabolism of rabbits*. *J. Exp. Med.* 101 : 233, 1955a.
- Dixon, F. J., Maurer, P. H.: *Immunologic unresponsiveness induced by protein antigens*. *J. Exp. Med.* 101 : 245, 1955b.
- Doroškevič, A. A.: *Vozniknovenije immunologičeskich reakcij pri vozdejstviji uslovnovo razdražitelja*. *Žurn. vyš. nerv. dejat.* 4, 108, 1954.
- Felton, L. D., Ottinger, B.: *Pneumococcus polysaccharide as a paralyzing agent on the mechanism of immunity in white mice*. *J. Bact.* 43 : 94, 1942.
- Felton, L. D.: *The significance of antigen in animal tissues*. *J. Immunol.* 61 : 107, 1949.
- Felton, L. D., Kauffmann, G., Prescott, B., Ottinger, B.: *Studies on the mechanism of the immunological paralysis induced in mice by pneumococcal polysaccharides*. *J. Immunol.* 74 : 17, 1955a.
- Felton, L. D., Prescott, B., Kauffmann, G., Ottinger, B.: *Pneumococcal antigenic polysaccharide substances from animal tissues*. *J. Immunol.* 74 : 205, 1955b.
- Foz, A., Garriga, S.: *Relation entre la fixation du complément et les „anticorps incomplets“ (test de Coombs) dans la brucellose humaine*. *Rev. Immunol.* 18 : 288, 1954.
- De Gaetani, G. F., Terranova, T., De Gregorio, P.: *Sulla produzione degli anticorpi secondo la via d'introduzione dell'antigene*. *Riv. Instit. Sieroterap. Ital.* 30 : 1, 1955.
- Hašek, M., Hraba, T.: *Vegetativní hybridisace živočichů spojením krevních oběhů v embryonálním vývoji*. *Čs. biologie* 2 : 265, 1953.
- Hašek, M., Hraba, T.: *Immunological effects of experimental embryonal parabiosis*. *Nature* 175 : 764, 1955.
- Johnson, A. G., Watson, D. W., Cromartie, W. J.: *Effect of massive antigen dosage on antigen retention and antibody response in rabbits*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 88 : 421, 1955.
- Holub, M.: *Imunologické a histologické projevy při imunisaci s lipidními adjuvanciemi*. *Čs. mikrobiologie* 1956. (V tisku).
- Hummel, K.: *Die inkompletten Antikörper in der Immunobiologie*. Stuttgart 1955.
- Kabat, E. A.: *The unity and diversity of antibodies. The nature and significance of the antibody response*. New York 1953 (str. 102).

- Kaplan, M. H., Coons, A. H. Deane, H. W.: *Localization of antigens in tissue cells. III. Cellular distribution of pneumococcal polysaccharides types II and III in the mouse.* J. Exp. Med. 91 : 15, 1950.
- Morgan, P., Watson, D. W., Cromartie, W. J.: *Type specificity of immunological paralysis induced in mice pneumococcal type II polysaccharide.* J. Bact. 65 : 224, 1953.
- Porter, R. R., Humphrey, J. H.: *The change of antibody character during immunisation as judged by partition chromatography.* III. Congres Intern. Biochim., Brusel 1955, (Resumés str. 126.)
- Řiha, I.: *Příspěvek k otázce podmíněné reflexní tvorby protilátek.* Čs. biologie 4 : 269, 1955.
- Schmidt, H.: *Natur und Verhalten von unvollständigen Antikörpern in allgemeinen.* Schweiz. Zschr. Pathol. Bakter. 17 : 400, 1954.
- Simonsen, M.: *Induced tolerance to heterologous cells and induced susceptibility to virus.* Nature, 175 : 763, 1955.
- Stark, O. K.: *A study of immunological paralysis induced by type I pneumococcal polysaccharide.* Bact. Proc. 64, 1954.
- Stark, O. K.: *Studies on pneumococcal polysaccharide. I. Biosynthesis of C¹⁴ labeled type I pneumococcal polysaccharide.* J. Immunol. 74 : 126, 1955. — *II. Mechanism involved in production of „immunological paralysis“ by type I pneumococcal polysaccharide.* J. Immunol. 74 : 130, 1955.
- Šterzl, J.: *Obranné pochody v organismu. Mesenchymální tkáň při infekci a imunitaci.* Praha 1954.
- Šterzl, J., Trnka, Z.: *Časný vznik protilátek u mláďat po imunitaci nadměrnými dávkami antigenu.* Čs. mikrobiologie 1 1956. (V tisku).
- Šterzl, J., Králík, O.: *Metodika mikrointervalové imunitace.* Čs. mikrobiologie 1, 1956. (V tisku).
- Treffers, H. P., Heidelberger, M., Freundt, J.: *Antiproteins in horse sera. III. Antibodies to rabbit serum albumin and their reaction with antigen.* J. Exp. Med. 86 : 83, 1947.
- Zdrodovskij, P. F.: *Problema reaktivnosti v učení ob infekci i imunitete.* Moskva 1950.
- Zdrodovskij, P. F.: *Materialy k fiziologii processov infekcij i imuniteta.* Vestnik AMN, č. 3, 3, 1953.
- Zdrodovskij, P. F.: *Voprosy infekcionoj patologiji i immunologii.* Moskva 1954.

Длительная иммунизация

I. Торможение образования антител при ежедневной иммунизации

Я. Штерцль

Резюме

Ежедневное введение иммунизирующих доз антигена вызывает у лабораторных животных (кроликов, крыс, морских свинок) сначала фазу повышенного образования антител, а после нее — постепенное угнетение их образования. В то же время мы не наблюдали повышения титра неполных антител. С создающимся при иммунизации торможением можно бороться, вводя более значительные дозы антигена.

Явление торможения образования антител расценивается нами с точки зрения вида лабораторного животного и места впрыскивания антигена.

В заключение мы утверждаем, что в основе торможения лежит создающаяся в ходе иммунизации адаптация по отношению к определенной степени интенсивности антигенного раздражения.

Long-term Immunisation I.

The Inhibition of Antibody Formation in Daily Immunisation

J. Šterzl

Summary

The daily administration of immunisation doses in laboratory animals (rabbits, rats and guinea-pigs) leads, after a phase of increased formation of antibodies, to gradual depression of their formation. A simultaneous increase in the titre of incomplete antibodies was not found. The immunisational depression can be overcome by the administration of a larger dose of the antigen.

The depression of antibody formation is evaluated with reference to the species of experimental animal and the site of injection of the antigen.

It is concluded that the basis of depression is the development of adaptation, in the course of immunisation, to a certain intensity of antigenic excitation.

Československá
M I K R O B I O L O G I E
ročník 1. (1956) — č. 1

Stav nevnímavosti v průběhu experimentální stafylokokové infekce. I.

JIRÍ JOHANOVSKÝ

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 10. 10. 1955

Otázka různých forem a možností obrany a odolnosti organismu vůči infekci je stále otevřená, ukazuje se však stále jasněji, že obranyschopnost organismu nelze redukovat na klasické mechanismy antitoxické a fagocytární. Zajímavým úsekem tohoto komplexního problému jsou změny odolnosti k infekci, nastupující ve velmi krátké době po různých zásazích do organismu, jako je vstříknutí bílkovinných látek, vakcin nebo vystavení mikrobní infekci. Zatím nelze bezpečně učinit závěry o jejich skutečných mechanismech, i když většina autorů předpokládá, že jde o zvýšení nespecifických obranných prostředků organismu, především aktivity mesenchymální tkáně (Phillipson 1937, Bordet 1939). Podrobněji promluvíme o těchto otázkách v diskusní části tohoto i dalšího sdělení.

V souhrnu těchto otázek má zvláštní místo zjev t. zv. depresivní imunity (Morgenroth a j. 1920, 1921, Krylov 1947 a j.), t. j. odolnosti nastupující po stříknutí malé dávky infekce. Tento zjev nás zajímal proto, že jsme v dřívější práci viděli v průběhu mikrobiálních intoxikací rychlé a specifické změny vnímavosti k danému toxinu, nevysvětlitelné vznikem antitoxických mechanismů (Johanovský 1956). Proto jsme přistoupili k pokusu o rozbor zvýšené odolnosti, nastupující u králíků krátce po intravenosním vstříknutí stafylokokové infekce.

Materiál a metody

Princip provedení všech pokusů byl v podstatě stejný: infikovali jsme intravenosně pokusná zvířata přibližně $\frac{1}{10}$ DLM stafylokokové kultury a za 20 hod. jsme pokusným i kontrolním králíkům vstříkli intravenosně smrtelnou infekční dávku. U všech zvířat jsme sledovali hladinu leukocytů a počet mikrobů v krvi; ve většině pokusů jsme nechali zvířata dožít a sledovali počet a dobu úmrtí, v části pokusů jsme zvířata v různou dobu usmrcovali a určovali počet mikrobů v orgánech. Prvou infekci nazýváme v dalším textu přípravnou nebo předběžnou, pro druhou infekci za 20 hod. používáme výrazu vlastní infekce nebo reinfekce.

K pokusům jsme použili různých kmenů stafylokoků. Ve většině pokusů jsme pracovali s kmenem Wood, poskytnutým Výzkumným ústavem imunologickým, a to ve dvou kulturách. Jednak s kmenem opětovaně při řadě pokusů pasážovaných v naší laboratoři na zvířatech (Wood A), jednak s kmenem udržovaným na běžných kultivačních půdách (Wood B). Wood B představoval avirulentní variantu, která usmrcovala králíka jen v dávkách vyšších než 2 miliardy mikrobů, zatím co akutně letální dávka kmene Wood A byla přibližně 100 milionů mikrobů na kg váhy. Obě kultury tvořily toxin v titru kolísajícím mezi 1 : 2 560 až 1 : 10 240. Rozdíl jejich vlastností, jako tvorbu hyaluronidasy, leukocidinu atd. jsme blíže neanalysovali.

V části pokusů jsme použili několika kmenů čerstvě izolovaných z různého patologického materiálu, vesměs tvořících koag ulásu a toxin v titru 1 : 1280 až 1 : 5 120. V jednom pokuse jsme užili běžného laboratorního kmene *Escherichia coli*.

Pracovali jsme většinou s králíky o přibližné váze 2,5 kg, v části pokusů s mladými králíky o váze 1 až 1,5 kg, pocházejícími z téhož vrhu. Jeden doplňkový pokus jsme provedli na morčátech váhy

přibližně 350 g. Zvířata jsme infikovali suspenzí stafylokoků kultivovaných 4 až 6 hodin na krevním agaru, smytých a standardisovaných densimetricky na fotokolorimetru Lumetron při fialovém filtru.

Množství mikrobů v jednotlivých pokusech jsme vzhledem k možnosti kolísání virulence určovali vždy podle průběžně prováděného stanovení smrtelné dávky. Přípravnou infekci jsme dávali zpravidla v množství $\frac{1}{10}$ smrtelné dávky stafylokoků vždy 20 až 24 hodin před vlastní infekcí.

Počet mikrobů v krvi infikovaných zvířat jsme zjišťovali takto: 1 ml odebrané krve jsme smísili s 2 ml sterilní destilované vody, z toho naočkovali 3krát po $\frac{1}{2}$ ml na krevní agary a z počtu vyrostlých kolonií vyčíslili obsah mikrobů v 1 ml krve.

Počet mikrobů v orgánech jsme zjišťovali kvantitativně tak, že jsme ihned po usmrcení zvířete odebrali sterilně část orgánu a dali ji zmrazit. Po rozmrazení jsme oddělili malou část orgánu, odvážili ji sterilně na torsních vážkách, rozetřeli v třetí misce a smísili ji v 5 ml fyziologického roztoku. Z této suspence jsme připravili několik ředění (1 : 5, 1 : 25 atd.) a stanovili počet mikrobů, jak uvedeno výše. Výsledky jsou uvedeny po přepočtu na 1 mg váhy orgánu. Při opakovaném zpracování téhož vzorku kolísaly výsledky přibližně o 10 %.

Ke kultivaci jsme použili krevního agaru v modifikaci podle O'Meara a Mc Sweena (1936). Pro lepší možnost určení hemolysy jsme používali buď králičích nebo propaných ovčích krvinek. Pro každý pokus bylo užito pūd vždy z jedné várky a čerstvě připravených. V pokuse s *E. coli* jsme kultivovali mikroba na Endově pūdě.

Počet leukocytů v krvi a diferenciální bílý obraz jsme určovali běžným způsobem.

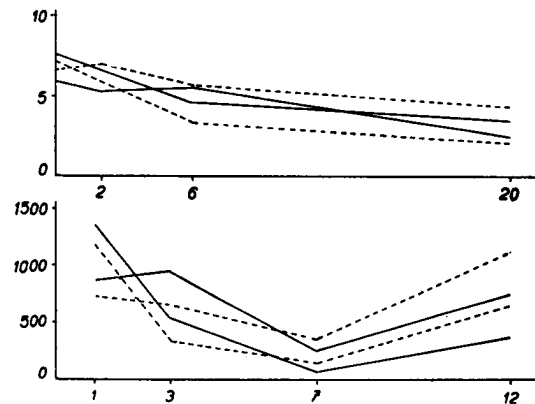
Ve většině pokusů jsme zjišťovali teplotu rektálním měřením teploměrem několikrát za den; výsledky byly kolísavé a proto je nehodnotíme a neuvádíme. Spíše se nám osvědčil pokles rektální teploty o 1—2° jako spolehlivá předpověď smrti daného zvířete během několika následujících hodin.

Výsledky

Intravenosní infekce subletální dávkou (přibližně $\frac{1}{10}$ DLM) stafylokokové kultury Wood A mění výrazně reaktivitu pokusných zvířat vůči smrtelné dávce infekce vstříknuté o 24 hodin později. Pokusná zvířata přežívají podstatně delší dobu, případně i trvale, zatím co kontroly hynou většinou přibližně za dobu 24 hodin (tabulka 1). Při tom počet mikrobů a leukocytů v krvi je u obou skupin zvířat v podstatě stejný (obr. 1, 2). I v orgánech se nalézají v době usmrcení jak u pokusných, tak i kontrolních zvířat zhruba stejný počet mikrobů (tabulka 2).

Určité rozdíly v počtu leukocytů a mikrobů v krvi i orgánech jsme našli u části pokusných zvířat ve srovnání s kontrolami za 20 hod. po vstříknutí infekce. V těchto případech jsme totiž zjistili o něco větší počet mikrobů v krvi a orgánech a snížený počet leukocytů u kontrolních zvířat. V jednom pokusu jsme tento obraz získali i při usmrcení zvířat za 8 hodin po silné dávce infekce.

Domníváme se, že tyto nálezy je možno vyložit tak, že šlo o zvířata ve špatném, někdy agonálním stavu nedlouho před smrtí, na rozdíl od pokusných zvířat připravených předběžnou infekcí, která přežívala několiknásobně déle a která odběr vzorků v době 20 hodin po infekci zastihl v celkově dobrém stavu. Tento předpoklad jsme potvrdili dvěma kontrolními pokusy. V prvním jsme zvířata reinfikovali malou dávkou stafylokokové infekce, neschopnou vyvolat vážnější poškození nebo dokonce



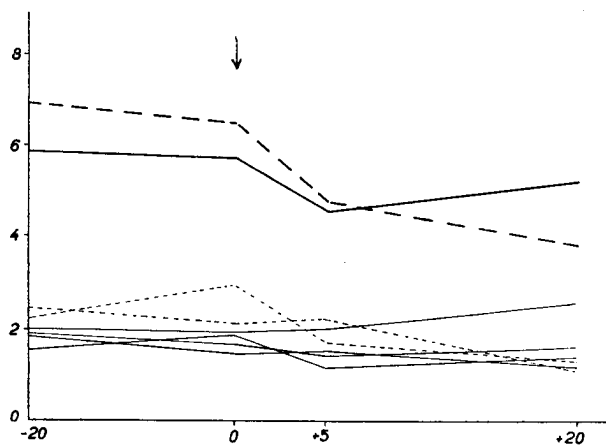
Obr. 1. Počet leukocytů a mikrobů v krvi u králiků kontrolních a připravených předběžnou infekcí kmenem Wood A 10-milionů mikrobů. Vlastní infekce za 24 hodin dávkou 100 mil. mikrobů kmene Wood A. Na ose x čas v hodinách, na ose y počet leukocytů (nahore) a počet mikrobů v 1 ml krve (dole). Pokusná zvířata plně, kontroly čárkované.

Tab. 1. Přehled pokusů se změněnou vnímavostí po malé dávce virulentní stafylokokové kultury Wood A. *) = mladí králíci váhy 1—1,5 kg, značka ž = trvale přežívá.

Přípravná infekce	Vlastní infekce	Doba života v hod.			
		pokusní králíci		kontroly	
10 mil	100 mil*)	65		30,	38
5 mil	50 mil*)	72,	204	20.	24
10 mil	100 mil*)	48,	96, 144	24,	24
40 mil	500 mil	96,	216, ž, ž	40,	72
20 mil	200 mil	120,	ž, ž, ž	72,	120
Morčata 100 mil	3 miliardy	72,	120, 144, ž	24,	48, 48, 72

Tab. 2. Počet mikrobů v krvi a orgánech u králíků s předběžnou infekcí malou dávkou virulentní kultury. Předběžná infekce 5 mil., vlastní infekce 50 mil. stafylokoků Wood A. Zvířata usmrcena po 4 hod. pokusu.

	Kontroly		Pokusná zvířata		
Mikrobů v 1 ml krve					
1 hod.	126	95	160	155	112
2 hod.	73	105	102	54	67
4 hod.	22	51	46	32	27
Mikrobů v 1 mg orgánu					
játra	93	84	133	88	55
plice	8	11	9	25	9
slezina	35	70	60	75	71
nadledvinky	5	3	3	3	5



Obr. 2. Průběh leukocytární hladiny při infekci králíků připravených předběžnou infekcí kmenem Wood A 20 milionů mikrobů. Na ose x čas vzhledem k době infekce v hodinách, na ose y počet bílých krvinek v tisících. Pokusná zvířata plné čáry, kontroly čárkované, silné čáry průměr celkového počtu bílých krvinek, slabé čáry hodnoty neutrofilních leukocytů u jednotlivých zvířat.

smrt zvířat (tabulka 3). V druhém pokusu jsme infikovali nesmrtící dávkou *E. coli* (tabulka 4).

V obou případech byly průběh leukocytární hladiny i změny počtu mikrobů v krvi a orgánech shodné u pokusných i kontrolních zvířat. Potvrdilo se, že po přípravné infekci nenastávají změny schopnosti eliminovat vstříknuté mikroby z orgá-

Tab. 3. Počet mikrobů v krvi a orgánech u králíků s předběžnou infekcí malou dávkou virulentní kultury. Předběžná infekce 5 mil., vlastní infekce 10 mil. stafylokoků, kmen Wood A. Zvířata usmrcena po 12 hodinách pokusu.

	Kontroly			Pokusná zvířata		
Mikrobů v 1 ml krve						
1 hod.	165	144	32	75	115	54
2 hod.	—	41	34	103	63	14
4 hod.	26	39	43	—	38	16
6 hod.	12	8	12	2	7	11
12 hod.	0	6	2	0	4	0
Mikrobů v 1 mg orgánu						
játra	0,6	0,55	—	0,28	0,6	0,15
plice	0,18	0,11	—	0,5	0,15	0,37
slezina	0,4	0,65	—	0,3	0,72	0,55
nadledvinky	0,17	0	—	0,25	0,16	0,1

Tab. 4. Počet mikrobů (*E. coli*) u králíků připravených předběžnou infekcí virulentním kmenem Wood A v dávce 10 mil. Zvířata usmrcena za 20 hodin po infekci 0,5 ml šestnáctihodinové bujonové kultury *E. coli*.

	Kontroly		Pokusná zvířata		
Mikrobů v 1 ml krve					
1 hod.	103	161	136	214	174
2 hod.	54	41	24	71	46
6 hod.	8	4	7	2	13
20 hod.	10	10	12	8	23
Počet mikrobů v 100 mg orgánu					
játra	5,3	32	10,6	24	24,3
slezina	29	54,3	8,3	21	34,3

nismu a že tedy rozdíly zjištěné v některých z předešlých pokusů je nutno přičíst celkovému agonálnímu zhroucení organismu a s tím spojenému pomnožení mikrobů.

V další práci jsme provedli řadu pokusů s různými kmeny stafylokoků, abychom zjistili jednak případnou specifitu těchto reakcí, jednak jejich relativní rozšířenost a platnost. Výsledky těchto pokusů udává v přehledu tabulka 5.

Z tabulky vyplývá několik závěrů: 1. Byla znovu několikrát potvrzena skutečnost, že po intravenózní stafylokokové infekci nastává zvýšení odolnosti vůči stafylokokové reinfekci, aniž by docházelo ke změnám schopnosti očišťovat vnitřní prostředí od mikrobů. Ukázalo se, že tento jev nastává i při použití různých kmenů pro předběžnou a vlastní infekci. 2. V některých pokusech se ukázalo, že zvýšená odolnost pokusných zvířat je spojena — na rozdíl od předchozích výsledků — s intenzivnější a rychlejší očišťováním krve od mikrobů. Tento zjev nastává zejména tam, kde k přípravné infekci bylo použito relativně větší dávky méně virulentní kultury.

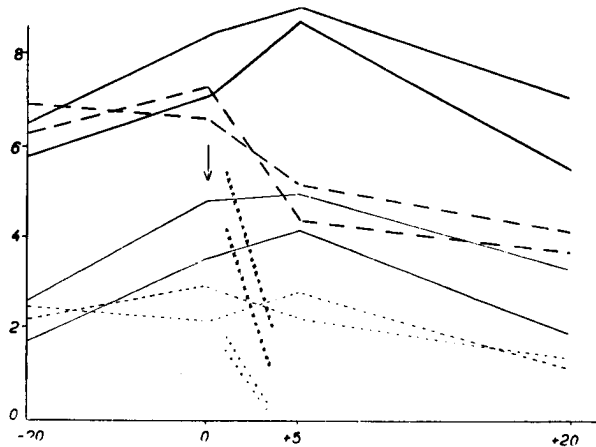
Na základě těchto zjištění jsme přistoupili k pokusům, kde jsme pro přípravnou infekci použili málo virulentní kultury Wood B. Výsledky ukazuje obr. 3 a tabulka 6 a 7. Jak je patrné, vznikají po přípravné infekci relativně velkou dávkou nevirulentní kultury v organismu změny, které se při následné infekci virulentním kmenem pro-

Tab. 5. Přehled pokusů o vnitrodruhové specifitě ochrany vyvolané předběžnou infekcí stafylokokové kultury. Nejsou vyčísleny doby smrti v případě exitu při odběru krve a hodnoty bakteriémie při zvýšeném preagonálním pomnožení mikrobů.

Přípravná infekce		Počet zvířat	Vlastní infekce		Doba smrti v hodinách				Průměrné procento počtu mikrobů v krvi proti kontrolám		
kmen	dávka		kmen	dávka	pokusná		kontroly		1 hod.	5 hod.	20 hod.
15	5 mil	2	15	120 mil	120	žije	26	40	83 %	142 %	—
15	5 mil	2	130	160 mil	72	144	30		126 %	116 %	—
15	3 mil	3	10	240 mil	24	72 120	20	36 48	78 %	121 %	119 %
130	20 mil	2	15	120 mil	32	120	16		97 %	117 %	—
130	20 mil	2	15	120 mil	—		—		114 %	92 %	111 %
Wood B	100 mil	1	15	120 mil	—		—		16 %	—	—
Wood B	100 mil	2	15	120 mil	24	40	16		41 %	46 %	—
9	100 mil	2	130	160 mil	40	72	30		23 %	13 %	—
10	50 mil	2	15	80 mil	72	120	40	48	53 %	41 %	57 %
10	50 mil	2	130	160 mil	72	96	30		65 %	68 %	—

jeví proti kontrolám zvýšenou leukocytární hladinou, zvýšenou očišťou krve od mikrobů a nevelkým prodloužením doby života nebo zvětšením procenta přeživších zvířat.

Obr. 3. Průběh leukocytární hladiny a bakteriémie při infekci králíků připravených předběžnou nevirulentní infekcí kmenem Wood B v dávce 200 mil. mikrobů. Na ose *x* čas vzhledem k době infekce v hodinách, na ose *y* počet bílých krvinek v tisících a ve stovkách počet mikrobů v 1 ml krve. Plné čáry pokusná zvířata, čárkované kontroly, silné čáry: celkový počet bílých krvinek, slabé čáry počet neutrofilních leukocytů. Velké tečky označují počet mikrobů v krvi kontrol, slabé tečky v krvi pokusných zvířat.



V dalších dvou pokusech celkem na 10 králících jsme zjistili, že po přípravné infekci nevirulentním kmenem v malé dávce (odpovídající dávčám virulentních kmenů použitých v předchozích pokusech) nevzniká ani zvýšená odolnost vůči reinfekci, ani změna očišty krve.

Tab. 6. Průběh intravenosní stafylokokové infekce u králíků po předběžném vstříknutí větší dávky nevirulentní stafylokokové kultury. Přípravná infekce 200 mil Wood B, vlastní infekce 300 mil. Wood A.

	Kontroly				Pokusní králíci			
Počet mikrobů v 1 ml krve								
1,5 hod.	559	1100	58	210	49	32	10	125
3 hod.	75	198	10	29	12	4	2	—
20 hod.	588	129	750	39	135	400	1	—
Počet leukocytů v krvi								
— 24 hod.	6000	5100	6450	10800	4500	9450	4700	7400
v době infekce	8200	7800	5100	8900	4900	7800	5650	6300
+ 4 hod.	3350	5100	3200	5650	6300	6300	5700	—
+ 20 hod.	4100	4400	2450	4200	6400	7200	7800	—
Doba smrti	2 dny	žije	3 dny	žije	žije	5 dní	žije	—

Tab. 7. Přehled pokusů se změněnou vnímavostí po velké dávce nevirulentní stafylokokové kultury Wood B.

Přípravná infekce Wood B	Vlastní infekce Wood A	Doba života ve dnech					
		pokusní králíci			kontroly		
100 mil	300 mil	žije	žije	žije	4	žije	
200 mil	300 mil	4	žije	žije	2	3	žije žije
200 mil	500 mil	3	6		2	3	
200 mil	400 mil	1	2	2	1	1,5	

Pokusili jsme se dále sledovat pomocí bakteriemiie za 20 hod. po vstříknutí mikrobů kvantitativní poměry při předběžné infekci různě virulentními kmeny. Výsledky nejsou zcela rovnoměrné, individuální reaktivita jednotlivých králíků ztěžuje možnost hodnocení. Přesto lze však celkově říci, že přibližně, bez ohledu na množství vstříknutých mikrobů, se udržují v organismu více kmeny virulentnější (tabulka 8).

Tab. 8. Počet mikrobů v 1 ml krve u jednotlivých zvířat 20 hodin po intravenosní přípravné infekci různě virulentními kmeny stafylokoků.

Kmen	Počet zvířat	Dávka	DLM v mil.	Počet mikrobů v krvi			
Wood B	4	20 mil	2000	5	8	12	13
Wood B	3	100 mil	2000	6	17	23	
15	4	5 mil	80	8	22	27	54
130	4	20 mil	160	12	31	44	102

Nakonec jsme se několika pokusy se shodným výsledkem přesvědčili, že velká dávka stafylokokové vakciny působí podobně jako velká dávka živé, málo virulentní infekce, zatím co vakcína v malé dávce nevyvolá účinek odpovídající působení živé virulentní kultury (tabulka 9).

Tab. 9. Změny vnímavosti k stafylokokové infekci po stafylokokové vakcině v malé a velké dávce, aplikované intravenosně 24 hodin před infekcí. Infekce králíků kmenem Wood A v dávce 300 mil., morčata v dávce 3 miliardy.

Počet mikrobů v 1 ml krve	Kontroly				Vakcína Wood A 50 mil.			Vakcína Wood B 500 mil.		
1 hod.	348	288			373	227	371	120	77	89
3 hod.	107	95			154	89	110	24	11	26
20 hod.	129	143			97	48	227	81	1	36
Doba smrti v hodinách	40	40			40	52	40	72	144	96
Morčata — doba smrti v hodinách	20	40	40	72	40	40	40	72	96	120

Diskuse

Uvedené výsledky je možno shrnout takto: při intravenosní stafylokokové infekci zvířat, kterým byla 24 hodin předem vstříknuta nevelká dávka (přibližně $1/10$ DLM) intravenosní infekce, dochází ke změnám průběhu onemocnění. Tato zvířata projevují zvýšenou odolnost, přežívají déle nebo i trvale při rychle nastávající smrti kontrol infikovaných stejnou dávkou. Přitom se zdá, že se uplatňují dva typy reakcí: v jedněch případech je nevelký stupeň zvýšení odolnosti provázen zvýšením počtu leukocytů v krvi a urychleným očišťováním krve od vstříknutých mikrobů. Druhý možný výsledek předběžné infekce je ten, že při relativní odolnosti probíhá stafylokoková infekce bez změn leukocytární hladiny a bez změn počtu mikrobů v krvi a orgánech oproti kontrolám.

K hodnocení stupně zvýšení odolnosti je třeba uvést, že je dobře známo, že i při normální imunisaci vzniká protistafylokoková imunita poměrně špatně, zřídka přesahuje odolnost vůči několika DLM a zpravidla se projeví jen prodloužením doby

života proti kontrolám (Ramon a j. 1936, Forssman 1938, Schmidt 1940). Ve svých pokusech jsme nadto použili prakticky téměř vždy většího množství mikrobu než odpovídá minimální smrtelné dávce, proto dosažené rozdíly v době života pokládáme za průkazné.

Prvý typ reakce, zvýšení odolnosti spojené s leukocytosou a zvýšenou očištěnou krve od mikrobu, odpovídá známým skutečnostem o vlivu nespecifických podnětů (mléka, krve, sera, extraktů mikrobu, nukleových kyselin a j.) na antiinfekční odolnost, shrnovaným zpravidla pod pojem „proteinová“ nebo „popudová“ terapie a pod. (Petersen 1923, Jelin 1926, Phillipson 1937, Bieling 1944, Zilber 1948).

Druhý typ reakce má na první pohled protichůdné vlastnosti typu prvního. Leukocytární hladina probíhá obdobně jako u kontrolních zvířat, není rozdílu v rychlosti vylučování mikrobu z krve a v jejich množství v orgánech. Přitom zvýšení odolnosti je poměrně větší než u prvního typu reakce. Mezi oběma typy reakcí je určitá závislost vzhledem k množství vstříknutých mikrobu: první typ vzniká jen po větších dávkách stafylokoků, druhý typ vzniká i po malých dávkách dostatečně virulentních mikrobu.

První typ reakce lze vyvolat i příslušnou vakcinou, druhý typ nikoliv. Pokud jde o skutečnou intenzitu obou podnětů, nelze infekci „malou dávkou virulentních mikrobu“ pokládat za slabší: sledování bakteriémie ukázalo, že virulentních mikrobu přetrvává v organismu více, i když jich bylo vstříknuto původně mnohem menší množství.

Sledování leukocytární hladiny v krvi a počtu mikrobu v krvi a orgánech nedává jistě obraz o všech reakcích a změnách, které nastávají u infikovaných králíků. Nesledovali jsme na příklad změny leukocytární v dřeni kostní, funkční aktivitu a morfologické změny RES, vylučování mikrobu ledvinami a pod. a pochopitelně ani celkové humorálně nervové regulační mechanismy. Přesto však se domníváme, že můžeme stanovit určité závěry, a to především proto, že v obou sledovaných indikátorech se ukázaly nápadné a výrazné rozdíly mezi oběma typy reakcí.

Průběh bakteriémie při intravenózní infekci je od prvních prací s infekcí pneumokokovou (Wright 1927) dobře znám. Po prvotním poklesu dochází k druhotné bakteriémické vlně buď slabé a dočasné u imunních zvířat nebo málo virulentních mikrobu, nebo silné a progresivně se zvyšující až k smrti při virulentní letální infekci. Tyto nálezy byly mnohokrát opakovány a potvrzeny, u stafylokokové infekce na příklad Forssmanem (1937). Burnet (1929), Cowan (1939) a j. ukázali, že intenzita a rychlost očištění krve od stafylokoků po intravenózní infekci je větší u imunizovaných zvířat než u kontrol, a to přibližně v takovém stupni, jaký jsme pozorovali u prvního typu reakce.

Pokud jde o druhý typ reakce, domníváme se, že shodný průběh bakteriémie, získaný v 11 pokusech na 59 králících i stejné počty mikrobu v orgánech, zjištěné ve 4 pokusech na 22 zvířatech, jsou dostatečně průkazné. Objasnění je třeba snad jen u výkladu hodnot, získaných za 20 hod. po infekci, zvláště i proto, že jednotlivé práce uvádějí (Rake 1936), že tato druhotná bakteriémická vlna má značný význam pro určení osudu infekce, na příklad pneumokokové. Ukázali jsme, že jsme pozorovali zvýšení počtu mikrobu v krvi a orgánech u kontrolních králíků proti pokusným tehdy, šlo-li o zvířata ve velmi špatném až agonálním stavu, hynoucí o několik málo hodin později. Jestliže bylo k infekci použito dávky malé a nebo málo patogenního heterologního mikroba, nedošlo k letálnímu poškození organismu a proto ani k změně počtu mikrobu u kontrolních a pokusných zvířat. Domníváme se, že závěr toho je jasný: zvýšený počet mikrobu za 20 hodin po infekci je důsledkem, nikoliv příčinou rozdílu v odolnosti části zvířat.

Ferina a Messina (1954) vstříkovali krysám stafylokoky intravenózně 48 hodin

po předběžné infekci nevelkou dávkou, zvířata usmrcovali za 2 hodiny a zjišťovali, že baktericidní schopnost tkání a orgánů je proti kontrolním zvířatům nezvýšena, spíše snížena. Podobně Teague a Mc Williams (1937) našli, že po intravenosním vstříknutí tyfové vakcíny vzniká odolnost proti intravenosní tyfové infekci po 24 hodinách. Přitom nenalezli rozdílu v baktericidní schopnosti krve in vitro, ve vylučování mikrobů z krve, ani v leukocytární hladině v prvních hodinách pokusu; stejně jako my pak našli zvýšenou bakteriemi u kontrolních zvířat v pozdějších hodinách pokusu nedlouho před jejich smrtí.

Z našich výsledků vyplývá jako nová skutečnost zjištění, že po nevelké virulentní stafylokokové intravenosní infekci vzniká za určitých podmínek odolnost vůči smrtelné dávce téže infekce, nespojená s antimikrobními obrannými reakcemi, přesněji řečeno: vzniká nevnímavost ke stafylokokové infekci, probíhající v organismu se stejným počtem mikrobů, který dostačuje k prudkému letálnímu účinku u kontrolních zvířat. Ukázali jsme, že tato reakce nastává poměrně často, a to i vůči heterologním kmenům patogenních stafylokoků a odlišili jsme ji od reakce typu „popudové terapie“, ke které dochází po vstříknutí většího množství málo virulentních mikrobů nebo i stafylokokové vakcíny. V následujícím sdělení se pokusíme zodpovědět některé další otázky o mechanismech a podstatě tohoto jevu.

Souhrn

1. Sledovali jsme leukocytární hladinu a počet mikrobů v krvi a orgánech při stafylokokové infekci u králíků, infikovaných 24 hodin předem malou dávkou stafylokokové kultury.

2. Za těchto podmínek vzniká zvýšení odolnosti pokusných zvířat k smrtelné stafylokokové infekci. V některých případech se po přípravné infekci větší dávkou nevirulentních mikrobů uplatňuje mechanismus leukocytární mobilisace a zvýšení očisty krve od mikrobů.

3. V druhé části případů po případné infekci malou dávkou virulentních stafylokoků probíhá při vlastní infekci leukocytární hladina u pokusných a kontrolních zvířat stejně, krev i orgány ukazují stejné množství mikrobů. Vzniklá odolnost nemá, pokud lze soudit, charakter antimikrobní obranné reakce. Další rozbor jevu je předmětem následujícího sdělení.

Za technickou spolupráci děkuji M. Buriánové a J. Krtičkové.

Literatura

- Bieling, R.: *Die biologische Infektionsabwehr des menschlichen Körpers*. Wien 1944.
Bordet, J.: *Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses*. Paris 1939.
Burnet, F. M.: *The exotoxins of Staphylococcus pyogenes aureus*. J. Path. Bact. 32 : 717, 1929.
Cowan, S. T.: *Staphylococcal infection in rabbits, antibacterial and non-specific immunity*. J. Path. Bact. 48 : 545, 1939.
Ferina, F., Messina, L.: *Infezione stafilococcica sperimentale e reinfezione*. Giorn. Batt. Immunol. 47 : 108, 1954.
Forssman, J.: *Verbreitung der Staphylokokken in Kaninchen nach intravenösen Injektionen von Staphylokokken*. Zschr. Immunitätsforsch. 91 : 165, 1937.
Forssman, J.: *Studies in Staphylococci XIII*. Acta path. micr. Scand. 15 : 396, 1938.
Jelin, W.: *Studien über den Mechanismus der natürlichen Immunität. IV*. Cbl. Bakter. 98 : 411, 1926.
Johanovský, J.: *Reaktivita organismu při infekci a intoxikaci*. Rozpravy akademie 1956, v tisku.
Krylov, V. N.: *Depressionnyj immunitet (po Morgenrothu) v eksperimente*. ŽMEI 2, 1947.
O'Meara, R. A. Q., Mac Sween, J. C.: *The failure of staphylococcus to grow from small inocula in routine laboratory media*. J. Path. Bact. 43 : 473, 1936.
Morgenroth, J., Biberstein, H., Schnitzer, R.: *Die Depressionsimmunität. Studien über Superinfektion mit Streptokokken*. D. med. Wochenschr. 40 : 337, 1920.
Morgenroth, J., Abraham, L.: *Depressionsimmunität bei intravenöser Superinfektion mit Streptokokken*. Zschr. Hyg. Infkr. 94 : 163, 1921.

- Petersen, W. F.: *Proteintherapie und unspezifische Leistungssteigerung*. Berlin 1923.
Philipson, J.: *Experimental studies on enhanced resistance to infection following some non specific measures*. Acta path. micr. Scand., suppl. 32, 1937.
Rake, G.: *Pathogenesis of pneumococcus infection in mice*. J. exp. Med. 63 : 191, 1936.
Ramon, G., Richou, R., Djourichitch, M.: *Sur le mécanisme de l'immunité conférée par l'anatozine staphylococcique à l'égard de l'infection par le staphylocoque virulent*. Rev. immun. 1 : 482, 1936.
Schmidt, H.: *Grundlagen der spezifischen Therapie*. 1940.
Teague, O., Mc Williams, H.: J. Immunol 2 : 185, 1917, cit. J. Philipson, 1937.
Wright, H. D.: *Experimental pneumococcal septicaemia and antipneumococcal immunity*. J. Path. Bact. 30 : 185, 1927.
Ziiber, A. A.: *Osnovy immuniteta*. Moskva 1948.

Состояние невосприимчивости
в течение экспериментальной стафилококковой инфекции. I

Ю. Иогановский

Резюме

Мы исследовали уровень лейкоцитов и количество микробов в крови и органах кроликов, зараженных за 24 часа до стафилококковой инфекции небольшой дозой культуры стафилококков.

При таких условиях создается повышенная устойчивость подопытных животных к смертельной стафилококковой инфекции. В некоторых случаях после предварительной инфекции большой дозой неvirulentных микробов приводится в действие механизм мобилизации лейкоцитов и усиливается очистка крови от микробов.

В других случаях после предварительной инфекции незначительной дозой virulentных стафилококков уровень лейкоцитов при собственной стафилококковой инфекции бывает у контрольных и у подопытных животных одинаковым, в крови и в органах наблюдается одинаковое количество микробов. Создающаяся таким образом устойчивость не носит, видимо, характера защитной антимикробной реакции. Дальнейшие исследования этого явления составляют предмет самостоятельного сообщения.

The Phenomenon of Resistance in the Course of Experimental Staphylococcal Infection I.

J. Johanskyj

Summary

The leucocyte level and the number of bacteria in the blood and organs was followed during staphylococcal infection in rabbits which had been infected 24 hours previously with small doses of staphylococcal cultures.

Under these conditions the experimental animals showed an increased resistance to the lethal effect of staphylococcal infection. In some cases, after a preparatory infection with a larger dose of non-virulent organisms, the mechanism of leucocytic mobilisation come into action with increased clearing of the blood of bacteria.

In other cases, after a preparatory infection with a small dose of virulent staphylococci, the level of leucocytes in the experimental animals and controls remained the same after the infection itself and the blood and organs showed the same number of bacteria. The resistance developed, did not have, as far as can be judged, the character of an antibacterial defence reaction. A further analysis of the phenomenon is the subject of a further communication.

Československá
MIKROBIOLOGIE
ročník 1. (1956) — č. 1

O transglukosidační činnosti enzymatického preparátu plísně
Aspergillus niger

MIKULÁŠ BURGER a KAREL BERAN

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 28. 9. 1955

Inkubujeme-li kultivační kapalinu nebo extrakt kultury *Aspergillus niger* s maltosou, dochází vedle hydrolysy maltosy k tvorbě některých oligosacharidů (Pan a j., 1950, 1951). Jsou charakteristické tím, že obsahují 1,6-glukopyranosové vazby (panosa, isomaltosa). Mimo to vzniká obvykle ještě stopa maltotriosy (Burger, Beran 1956 a, b).

Je ještě málo faktů k dispozici, aby bylo možno říci, jakým mechanismem tyto produkty vznikají. Objasnění tohoto mechanismu má význam pro provozní použití uvedených preparátů, poněvadž tyto oligosacharidy vznikají i při hydrolyse škrobu v provozu. Vyřešení tohoto problému má též význam pro poznání některých základních otázek souvisejících s interakcí substrátu s enzymem při hydrolyse poly- a oligosacharidů.

Dnes už víme, že tvorba těchto oligosacharidů probíhá transglukosidací, t. j. přenesením glukosového zbytku z maltosy, resp. škrobu na příslušný akceptor (maltosu, glukosu, případně jiné; Pan, Nicholson a Kolachov 1952). Je zajímavé, že řada oligosacharidů mimo maltosu v pokusech Pana a spolupracovníků nesloužila jako substrát pro tvorbu isomaltosy, resp. vyšších oligosacharidů s 1,6-glukopyranosovou vazbou (Pan, Nicholson, Kolachov 1952).

Je úkolem této práce zjistit, zda se z některých látek po krátkodobé i dlouhodobé inkubaci s preparátem *A. niger* tvoří redukující oligosacharidy s 1,6-glukopyranosovou vazbou.

Pokusná část

Metodika

Použití enzymatické preparáty. K pokusům jsme použili enzymatického preparátu z kultury plísně *Aspergillus niger*. Přípravu kultur na otrubách a extrakci enzymů z těchto kultur jsme popsali již dříve (Burger a Beran 1956a). Charakteristickou vlastností tohoto preparátu je, že obsahuje velmi vysokou maltásovou aktivitu.

Pracovní postup. Jednotlivé substráty jsme inkubovali enzymatickým preparátem 75 minut a 18 hodin při 30°C. Celkový objem inkubované směsi činil 1 ml a obsahoval: 3 % substrátu v konečné koncentraci, 0,3 ml roztoku enzymu, acetátový pufr o konečné koncentraci $6,5 \cdot 10^{-2}$ M a pH 4,5, případně i glukosu o konečné koncentraci 0,3 %. Glukosu jsme k substrátům přidávali jako možný akceptor. Aby nedošlo k nárůstu během inkubace, přidali jsme k inkubované směsi několik kapek toluenu. Enzymatickou činnost jsme zastavili ponořením zkumavky do vroucí vodní lázně na 5 minut. Ze vzorků jsme nakapali 20 μ l na chromatografický papír Whatman č. 1.

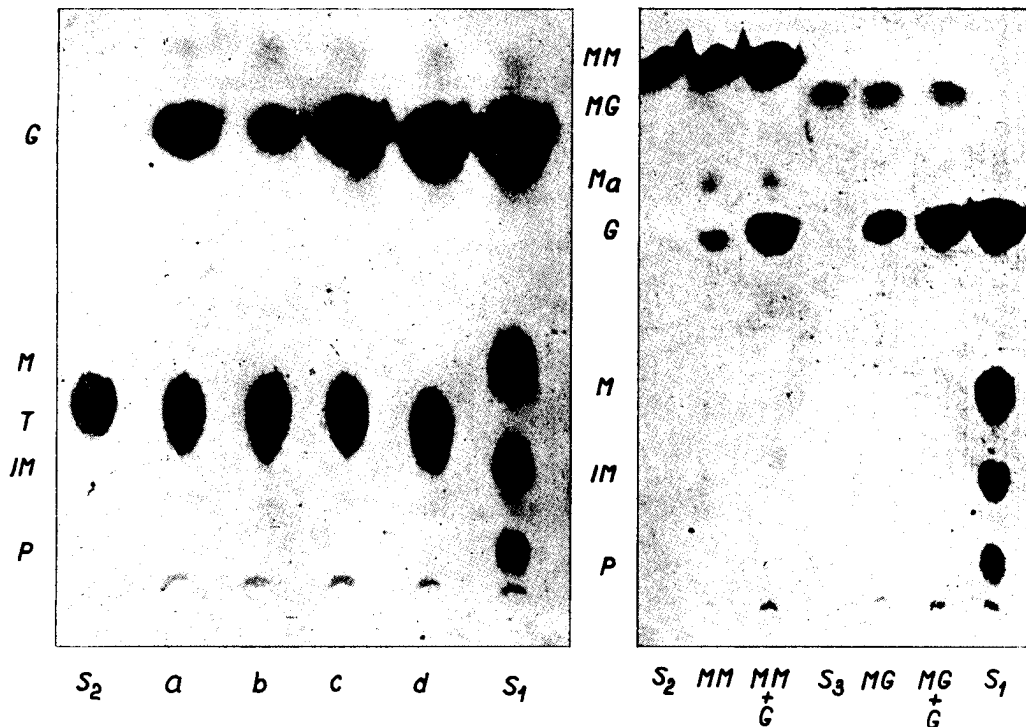
Analytické metody. Vzniklé produkty inkubace jsme zjišťovali chromatografickou metodou podle Greena a Stonea (1952), kterou jsme upravili. Jako standardu jsme použili vzorku maltosy po inkubaci s enzymatickým preparátem *A. niger*, jehož složení cukrů je nám známé (Burger a Beran 1956b). V obrázcích je označován S_1 .

Výsledky

Účinek enzymatického preparátu na různé oligosacharidy

Na obr. 1 je uvedena chromatografická analýza produktů vzniklých po 75minutové inkubaci enzymatického preparátu s maltosou, sacharosou, laktosou, rafinosou, a cellobiosou. Během této doby nastala hydrolyza uvedených substrátů do rozličného stupně. U rafinosy je vidět, že odštěpování fruktosy probíhá intenzivněji než hydrolyza melibiosy. Skvrna rafinosy a sacharosy vzniká na papíře zřejmě po hydrolyse těchto cukrů během vyvolávání chromatogramu. U maltosy je zřetelná tvorba panosy, isomaltosy, u cellobiosy je taktéž zřetelná tvorba isomaltosy a dalšího produktu, který se na papíře umísťuje mezi maltotriosu a panosu. U ostatních oligosacharidů se netvořil žádný redukcující cukr. Jelikož laktosa se umísťuje použitým postupem vyvíjení chromatogramu stejně jako isomaltosa, můžeme o tomto oligosacharidu říci, že netvoří vyšší redukcující oligosacharidy.

Obr. 2 ukazuje stav po 18 hodinách inkubace. Maltosa a cellobiosa jsou již prakticky úplně hydrolyzovány. Panosa a neidentifikovaný oligosacharid vzniklý z cellobiosy jsou taktéž odbourány a zbývá jen isomaltosa.



Obr. 3. Účinek enzymatického preparátu *A. niger* na trehalosu.

Obr. 4. Účinek enzymatického preparátu *A. niger* na methylmannosu a methylglukosu.

Obr. 3. S₂ = vzorek trehalosy, a = trehalosa s glukosou po 75 minutách inkubace, b = trehalosa po 75 minutách inkubace, c = trehalosa s glukosou po 18 hodinách inkubace, d = trehalosa po 18 hodinách inkubace, G = glukosa, M = maltosa, T = trehalosa, IM = isomaltosa, P = panosa.

Obr. 4. S₂ = vzorek methylmannosy, MM = methylmannosa, MM + G = methylmannosa s glukosou, S₃ = vzorek methylglukosy, MG = methylglukosa, MG + G = methylglukosa s glukosou, Ma = mannosa, G = glukosa, M = maltosa, IM = isomaltosa, P = panosa.

Ani po této době neskýtá rafinosa, resp. melibiosa, laktosa a sacharosa redukující oligosacharidy s 1,6-glukopyranosovou vazbou podobné těm, které vznikly z maltosy.

Chromatogram dále ukazuje, že z maltosy a cellobiosy vznikly stopy oligosacharidů, které jsou na papíře umístěny mezi maltosou, resp. cellobiosou a isomaltosou. Jsou to pravděpodobně oligosacharidy s jinou než 1,4, resp. s 1,6-glukopyranosovou vazbou, jež bude nutno ještě stanovit.

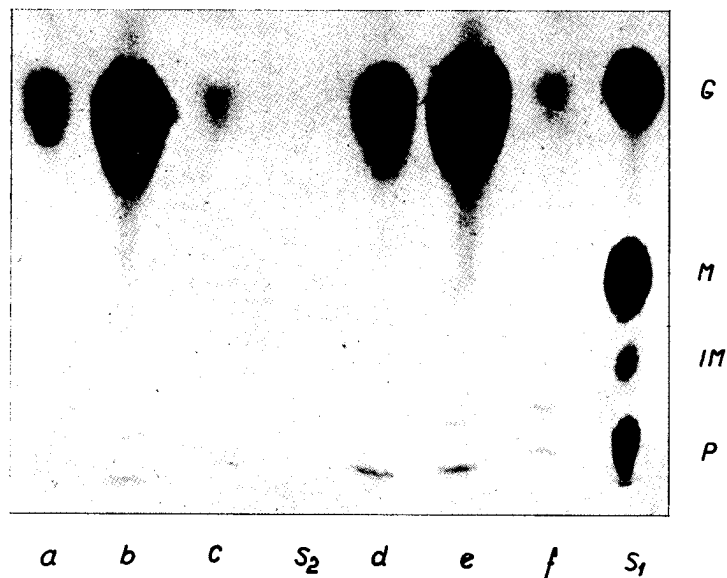
Pokud jde o rafinosu, laktosu a sacharosu, potvrzují naše nálezy výsledky Pana a spolupracovníků (Pan, Nicholson a Kolachov 1952), kteří taktéž nenalezli redukující oligosacharidy po inkubaci kultivační tekutiny *A. niger* s výše uvedenými cukry. Pokud jde o cellobiosu, rozchází se naše výsledky s nálezy uvedených autorů, kteří nenašli žádný oligosacharid po inkubaci cellobiosy s kultivační tekutinou *A. niger* (Pan, Nicholson a Kolachov 1952).

Na obr. 3 jsou uvedeny výsledky po inkubaci trehalosy (α -D-glukopyranosyl- α -D-glukopyranosa) s enzymatickým preparátem *A. niger*.

Též u tohoto oligosacharidu nedošlo k tvorbě nového produktu mimo glukosu. Jak je patrné z obrázku, trehalosa dává skvrnu mezi maltosou a isomaltosou. Jako neredukující oligosacharid vyredukovala stříbro po předběžné hydrolyse na papíře během vyvolávání chromatogramu. Obr. 3 ukazuje, že i po 18 hodinách byla trehalosa hydrolysována jen z malé části. Stopy fruktosy a pentos na chromatogramu pocházejí z enzymatického preparátu.

Účinek enzymatického preparátu na některé heterosacharidy

Další pokusy se týkaly účinku enzymatického preparátu *A. niger* na methyl- α -D-glukosu, methyl- α -D-mannosu a glukosu-1-fosfát. Výsledky jsou uvedeny v obr. 4 a 5.



Obr. 5. Účinek enzymatického preparátu *A. niger* na glukosa-1-fosfát. a = glukosa-1-fosfát po 75 minutách inkubace, b = glukosa-1-fosfát s glukosou po 75 minutách inkubace, c = enzymatický preparát po 75 minutách inkubace, S₂ = vzorek glukosa-1-fosfátu, d = glukosa-1-fosfát po 18 hodinách inkubace, e = glukosa-1-fosfát s glukosou po 18 hodinách inkubace, f = enzymatický preparát po 18 hodinách inkubace.

Jak obr. 4 ukazuje, jsou výsledky obdobné těm, jež jsou uvedeny v předešlých pokusech. Během 18 hodin došlo k hydrolyse methyl-glukosy. K tvorbě oligosacharidů však ani po této době nedošlo. Obr. 4 ukazuje též, že methyl-mannosa byla hydrolysována jen ve stopovém množství.

Stejné výsledky jsme obdrželi i při inkubaci glukosa-1-fosfátu s enzymatickým preparátem (obr. 5). Ani po 18 hodinách nedošlo k tvorbě nového produktu kromě glukosy. Ani hydrolysa glukosy-1-fosfátu nebyla za našich pokusných podmínek úplná.

Účinek enzymatického preparátu na glukosu

V předcházejících pokusech jsme sledovali přenos glukosového radikálu z holonebo z heterosidů na uhlohydrátový akceptor.

V dalších pokusech jsme chtěli zjistit, zda dochází k syntese uvedených oligosacharidů též přímo z glukosy. Protože jsme předpokládali, že případná syntesa zde bude probíhat jako zvrát hydrolytické reakce, upravili jsme pokusné podmínky tak, aby syntetická reakce mohla proběhnout co nejdále. Proto jsme snížili aktivní koncentraci vody přidáním nadměrného množství glukosy, resp. přidáním glycerinu k reakční směsi. Konečná koncentrace glukosy činila: 5, 10, 30, 40, 50 a 60 %. Glukosa tedy byla v reakční směsi substrátem, akceptorem a mimo to v nadměrných koncentracích odnímala ze směsi vodu. Jinak byly podmínky inkubace stejné jako v předešlých pokusech.

Na rozdíl od předešlých pokusů jsme v tomto případě nanášeli na chromatografický papír po 10 μ l vzorku. Výsledky po 18 hodinách inkubace jsou uvedeny na obr. 6 a 7.

Obr. 6 ukazuje, že za našich pokusných podmínek došlo k syntese dvou oligosacharidů z glukosy, a to maltosy a isomaltosy. Je nutno si všimnout, že na rozdíl od maltosy, která se utvořila jen při vyšších koncentracích glukosy (od 30%), isomaltosa se utvořila již při 5 a 10% glukosy ve směsi.

Chromatogram po 150 minutách inkubace poskytoval obdobný obraz jako po 18 hodinách s tím rozdílem, že množství utvořených produktů bylo menší.

Na obr. 7 jsou uvedeny, vedle inkubovaných směsí, kontroly roztoků glukosy ve stejných koncentracích jako v inkubovaných směsích. Obr. 7 dokazuje tedy, že vzniklé oligosacharidy se utvořily enzymatickou syntesou a nebyly přítomny ve vzorcích glukosy jako nečistoty.

Diskuse

V našich předešlých pracích uvádíme několik skutečností, které dokazují, že tvorba isomaltosy a panosy při inkubaci maltosy enzymatickým preparátem *A. niger* není výsledkem činnosti zvláštní transglukosidázy, nýbrž že vznik uvedených oligosacharidů z maltosy katalysuje maltáza (Burger a Beran 1954, 1956b). O maltáze je však známo, že hydrolysuje také řadu substrátů, u kterých jsme zde nezjistili tvorbu oligosacharidů (Summer a Myrbäck 1950) — (na př. methylglukosa a trehalosa). Vzniká otázka, proč u těchto substrátů nedošlo za našich pokusných podmínek k tvorbě uvedených oligosacharidů. Je známo, a na našich chromatogramech je to též výstižně předvedeno, že uvedené substráty jsou ve srovnání s maltosou mnohem pomaleji hydrolysovány maltásou. Z toho vyplývá, že afinita maltázy vůči na př. trehalose a methylglukose je ve srovnání s afinitou vůči maltose mnohem menší. Totéž zjistíme, porovnáme-li afinitu maltázy vůči uvedeným substrátům a vůči vodě. Transglukosidační produkty katalysované maltásou mohou však vzniknout jen v případě, že v systému je přítomen akceptor mající dostatečně

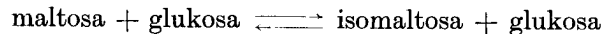
větší afinitu k maltáse než voda. Je zřejmé, že trehalosa a methylglukosa tuto afinitu nemají. Ani glukosa nemohla být v našich pokusech akceptorem, jelikož její koncentrace byla v roztoku nízká.

Zajímavá je tvorba isomaltosy z cellobiosy, protože je možno z tohoto faktu předpokládat, že se v tomto příkladě isomaltosa tvoří obdobným, případně stejným mechanismem jako z maltosy. Nemáme však další pokusy k dispozici, abychom mohli tuto domněnku potvrdit.

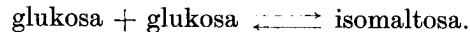
Pokud jde o sacharosu, je zřejmé, že hydrolysa proběhla pomocí invertázy (β -fruktosidázy) a nemohly zde tedy vzniknout redukující oligosacharidy, které vznikají při hydrolyse maltosy (Bealing a Bacon 1953).

Je nutno zdůraznit, že námi použitou metodou (čtyřnásobné vyvíjení chromatogramu) nelze bezpečně odkrýt oligosacharidy mající v molekule více než čtyři, resp. pět glukosových zbytků. Proto tvorbu vyšších sacharidů v našich pokusech nelze vyloučit.

Pokusy, kde jsme inkubovali různé množství glukosy, dokázaly, že námi studované enzymatické preparáty mohou resyntetisovat isomaltosu z glukosy a je-li koncentrace vody snížena na dostatečnou mez, probíhá také resyntesa maltosy. Tvorba isomaltosy neprobíhala sekundárně z maltosy, o čemž svědčí skutečnost, že při nižší koncentraci glukosy (od 5 %) se utvořila pouze isomaltosa, ale žádná maltosa. Z toho vyplývá, že enzymatický preparát *A. niger* katalysuje syntesu isomaltosy nejen cestou transglukosidační:



ale též na základě rovnice:



Výpočty nám ukázaly, že tyto reakce jsou termodynamicky možné, bereme-li v úvahu, že isomaltosa resp. maltosa se utvořila v množství více než tisíckrát menším, než byla koncentrace glukosy.

Souhrn

Sledovali jsme tvorbu redukujících oligosacharidů majících 1,6-glukopyranosovou vazbu (isomaltosa a panosa) při inkubaci enzymatického extraktu plísně *A. niger* s roztoky různých oligosacharidů a různé koncentrované glukosy. Dospěli jsme k těmto závěrům:

1. Na maltose se tvoří jak isomaltosa tak i panosa ve značném množství. Při delší inkubaci se hromadí jen isomaltosa.
2. Na cellobiose se tvoří isomaltosa a neznámý oligosacharid, který leží mezi maltotriosou a panosou.
3. Výše uvedené oligosacharidy se netvoří za našich pokusných podmínek při inkubaci preparátu s roztoky: trehalosy, rafinosy, laktosy, sacharosy, methylmannosy, methylglukosy a glukosa-1-fosfátu.
4. Při inkubaci koncentrovanějších roztoků glukosy je resyntetisována isomaltosa (od 5% glukosy) a maltosa (od 30% glukosy).
5. Naše výsledky dokazují, že tvorba redukujících oligosacharidů s 1,6-glukopyranosovými vazbami může probíhat vedle transglukosidačních reakcí z oligosacharidů též resyntesou z glukosy.

(Obrazové přílohy I, II)

Akademiku I. Málkovi děkujeme za zájem a připomínky při provádění této práce. Za pečlivou technickou spolupráci děkujeme E. Masnerové.

Literatura

- Bealing, F. Y., Bacon, I. S. D.: *The action of mould enzymes on sucrose*. Biochem J. 53 : 277, 1953.
- Burger, M., Beran, K.: *K otázce mechanismu hydrolysy dextransů plísňovými enzymatickými preparáty*. Chem. listy 48 : 1395, 1954.
- Burger, M., Beran, K.: *O mechanismu účinku maltázy plísně Aspergillus niger I. Vliv teploty na aktivaci hydrolysy škrobu plísňovými enzymatickými preparáty*. Chem. listy 50 : 133, 1956a.
- Burger, M., Beran, K.: *O mechanismu účinku maltázy plísně Aspergillus niger II. Transglukosidační reakce*. Chem. listy 50, 1956b (V tisku).
- Green, S. R., Stone, I.: *Fermentability of Wort trisaccharide a factor in variable attenuations*. Wallerstein Lab. Comm. 51 : 347, 1952.
- Pan, S. C., Andreasen, A. A., Kolachov, P.: *Enzymic conversion of maltose into unfermentable carbohydrate*. Science 112 : 115, 1950.
- Pan, S. C., Nicholson, L. W., Kolachov, P.: *Isolation of a crystalline trisaccharide from unfermentable carbohydrate produced*. J. Am. Chem. Soc. 73 : 2547, 1951.
- Pan, S. C., Nicholson, L. W., Kolachov, P.: *Enzymic synthesis of oligosaccharides — a transglucosidation*. Arch. Biochem. Biophys. 42 : 406, 1952.
- Summer, J. B., Myrbäck, K.: *The enzymes*. New York 1950.

О трансглюкозидационной деятельности энзиматического препарата плесени *Aspergillus niger*

М. Бургер и К. Беран

Резюме

Мы исследовали образование восстанавливающих олигосахаридов, обладающих 1,6-глюкопиранозовой связью (изомальтоза и паноза), при инкубации энзиматического экстракта плесени *A. niger* с растворами различных олигосахаридов и различных концентраций глюкозы. Было установлено, что:

На мальтозе образуются в значительном количестве как изомальтоза, так и паноза. При более длительной инкубации накапливается только изомальтоза.

На целлобиозе образуются изомальтоза и неизвестный олигосахарид, расположенный в хроматограмме между мальтотриозой и панозой.

Вышеназванные олигосахариды не образуются при инкубации препарата с растворами трегалозы, рафинозы, лактозы, сахарозы, метил-маннозы, метил-глюкозы и глюкоза-1-фосфата.

При инкубации в более концентрированных растворах глюкозы ресинтезируется изомальтоза (начиная с 5% глюкозы) и мальтоза (начиная с 30%).

Результаты наших исследований показывают, что образование восстанавливающих олигосахаридов с 1,6-глюкопиранозовыми связями может, — кроме реакций трансглюкозидации из олигосахаридов, — протекать и в виде ресинтезирования из глюкозы.

On the Transglucosidational Activity of an Enzymatic Preparations of the Fungus *Aspergillus niger*

M. Burger and K. Beran

Summary

A study was made of the formation of reducing oligosaccharides containing a 1,6-glucopyranose link (isomaltose and panose) on incubation of enzymatic extract of the fungus *Aspergillus niger* with solutions of various oligosaccharides and various concentrations of glucose. The findings were as follows:

Both isomaltose and panose are formed on maltose in striking amounts. With longer incubation only isomaltose accumulates.

On cellobiose isomaltose is formed, together with an unknown oligosaccharide which lies on the chromatogram between maltotriose and panose.

The above-mentioned oligosaccharides are not formed on incubating the preparation with solutions of trehalose, raffinose, lactose, saccharose, methyl-mannose, methyl-glucose and glucose-1-phosphate.

On incubating in more concentrated solutions of glucose, isomaltose and maltose are resynthesized. (from 5% and 30% glucose respectively).

These results show that the formation of reducing oligosaccharides with a 1,6-glucopyranose link may also take place, in addition to transglucosidational reactions from oligosaccharides, by resynthesis from glucose.

Československá
M I K R O B I O L O G I E

ročník 1. (1956) — č. 1

Proteolytické enzymy aktinomycety *Streptomyces griseus*. II.

Vliv povahy a koncentrace dusíku na sekreci proteasy

JIRÍ CHALOUPKA

Československá akademie věd, Biologický ústav, mikrobiologické oddělení, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 19. 9. 1955

Dlouhou dobu nebyla jasná otázka, zda proteasy mikroorganismů jsou vylučovány do prostředí v důsledku aktivních životních pochodů nebo zda pasivně difundují z autolysujících buněk. Dnes se zdá, že alespoň ve většině případů vylučují proteasy ještě mladé, množící se buňky (Virtanen a Tarnanen 1932, Birch-Hirschfeld 1940, Gorini a Lanzavecchia 1954). Není však dosud vyřešena otázka o významu mimobuněčných proteas anaerobních klostridií, aktivovaných cysteinem, o nichž Maschmann (1938) soudí, že difundují do prostředí v důsledku autolysy na rozdíl od kolagenas, které jsou vylučovány v průběhu množení kultury.

Velmi složitou je otázka vlivu složení živného prostředí, především povahy a obsahu dusíku na sekreci proteas. Zdá se, že v tomto ohledu neexistuje nějaká obecně platná zákonitost a že jednotlivé skupiny mikroorganismů nebo i jednotlivé druhy reagují různě. Sporulující bakterie tvoří proteasy, především v přítomnosti vysokých koncentrací dusíku v půdě (Hoogerheide a Langhery 1951, Imšeneckij a Kasatkina 1954), anerobní klostridie vyžadují dokonce nenaštěpenou bílkovinu (Mantejfel 1941), na peptidech k produkci nedochází. Plísně vylučují proteasy pouze na organicky vázaném dusíku, aktinomycety i na dusičnanech a amonných solích (Dion 1950).

Velmi nejasná je otázka vlivu koncentrace dusíku v živném prostředí (respektive jeho poměru k uhlíku) na tvorbu proteas. Vysoká koncentrace dusíku, která je podle některých autorů nezbytná pro tvorbu proteasy, nemusí být vždy vhodná. Güntelberg (1954) si povšiml, že *Bacillus subtilis* tvoří se stoupající koncentrací dusíku více proteasy jen do určité hranice. Potom však hladina enzymu klesá, i když se množství bakterií nadále zvyšuje. Na obdobný zjev narazil i Dion (1950), který zjistil, že za určitou koncentrací dusíku v mediu se počíná množství proteasy vylučované plísní *Gliocladium roseum* snižovat. Nesledoval však nárůst kultury a tak jeho nález není možno hodnotit. Je zajímavé, že aktivita proteasy v buňkách je do značné míry nezávislá na obsahu dusíku v prostředí i v buňkách. Platí to jak pro proteolytické, tak i pro neproteolytické mikroorganismy (Virtanen a Winkler 1949, Virtanen a Kokkola 1950).

Stejně nejasná je i úloha cukerné složky živné půdy při tvorbě a sekreci proteas mikroorganismy. Přítomnost větších koncentrací uhlohydrátů brzdí podle některých autorů (Hoogerheide a Langhery 1951) tvorbu proteasy sporulujícími bacily. Podle jiných (Chopra 1945) nebrzdí přítomnost cukrů vlastní tvorbu enzymu, pouze brání jeho sekreci do prostředí a působí jeho hromadění v buňkách. U některých mikro-

organismů, na příklad u *Bacillus liquefaciens* (Fukumoto a Yamamoto 1952) a u plísní (Dion 1950) je naopak přítomnost cukerné složky nutná pro produkci proteasy.

V této práci jsme studovali podmínky, především vliv dusíkaté výživy, za nichž dochází k sekreci enzymu do prostředí. Proteasa nám sloužila jako model, na kterém jsme řešili otázky vztahu mezi organismem a vnějším prostředím, v daném případě mezi přítomností resp. nepřítomností specifického substrátu a vylučováním enzymu.

Pokusná část

Metodika

Kultura. Pracovali jsme s průmyslovým kmenem *Streptomyces griseus*. Při práci jsme vycházeli z konserv (5. generace) uchovávaných na šikmém bramborovém agaru při 5 °C.

Živé půdy. Aktinomycetu jsme kultivovali na Waksmanově půdě B (dále WB), obsahující pepton a glukosu, jejichž poměr jsme v jednotlivých pokusech měnili.

Jako zdroje dusíku jsme používali též fosforečnanu amonného, želatiny a hydrolyzáty želatiny. Při přípravě hydrolyzáty želatiny jsme postupovali takto: 50 g želatiny jsme rozpustili za stálého míchání v 450 ml horké destilované vody. Po rozpuštění jsme upravili pH 1 N-HCl na 1,1 a přidali roztok 15 mg pepsinu (VÚFB). Směs jsme uložili na 18 hodin do termostatu při 37°C. Potom jsme pH upravili 6 N-NaOH na 7,6, přidali roztok 15 mg krystal. trypsinu (VÚFB) a uložili na 6 hodin do termostatu při 37°C. Část takto připraveného enzymatického hydrolyzáty jsme dále vařili s kyselinou sírovou (300 ml hydrolyzáty + 60 ml 10 N-H₂SO₄) 24 hodiny pod zpětným chladičem. Ionty SO₄²⁻ jsme odstranili přidáním ekvivalentního množství Ba (OH)₂ · 8 H₂O. Roztok jsme nepatrně okyselili kyselinou sírovou, abychom odstranili zbytek eventuálních přítomných iontů Ba²⁺.

Analytické metody. Proteolytickou aktivitu jsme stanovili Ansonovou metodou na kaseinovém substrátě (Anson 1938) v úpravě popsané v předchozí práci (Chaloupka 1955a). V kultivační tekutině se nám nepodařilo prokázat přítomnost enzymogenu (Chaloupka 1955b).

Sušinu jsme stanovili v 5,0 ml kultivační tekutiny. Mýcel jsme po odstředění propláchli vodou a sušili 48 hodin při 105°C. V některých pokusech jsme místo sušiny stanovili obsah mikrobiálních bílkovin podle Sticklelanda (1951).

pH v kultivační tekutině jsme průběžně sledovali bromthymolovou modří a kresolovou červení s použitím komparátoru.

Barvení preparátů. Preparáty jsme barvili podle Grama v Novyho modifikaci.

Pracovní postup. Živé půdy, připravené obměnou jednotlivých složek Waksmanovy půdy (WB), jsme rozlili po 100 ml do 500 ml varných baněk Sial. Sterilovali jsme dvakrát 115°C. Baňky jsme očkovali jednak sporovým inokulem, jednak vegetativním inokulem 48 hodin starým, vyrostlým na půdě WB na třepačce. Baňky jsme po naočkování inkubovali na třepačce (96 kmitů/min., délka kyvu 9,8 cm) při 26 až 27°C. Vývoj kultury byl při použití vegetativního inokula poněkud rychlejší a výsledky vyrovnanější. Proto jsme ve většině pokusů používali především tohoto způsobu očkování. Každý den jsme sterilně odebírali 6 až 7 ml živného prostředí. V 5,0 ml jsme stanovili obsah sušiny (nebo bílkovinu); 2,0 ml svrchní tekutiny jsme zředili borátovým pufrům o pH 8,3 a stanovili proteolytickou aktivitu. Ve zbytku svrchní tekutiny jsme stanovili pH a ze zbytku kultivační tekutiny jsme připravili preparát.

Naměřené hodnoty proteolytické aktivity jsou průměrem ze čtyř stanovení, hodnoty sušiny, bílkovin a pH jsou průměrem ze dvou vzorků. Výsledky představují typické hodnoty z řady reprodukováných pokusů.

Výsledky

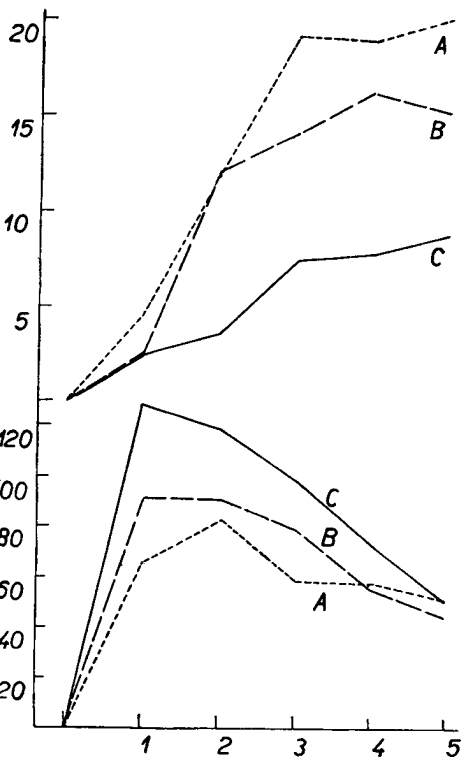
První pokusy jsme konali na peptonových půdách s koncentrací peptonu od 0,2 % do 2,0 %. Ve všech pokusech jsme zjistili nejvyšší proteolytickou aktivitu na prostředích s nízkým obsahem dusíku; na prostředích s 2 % peptonu byla vždy nejnižší, i když nárůst byl na těchto největší. Výsledky jednoho typického pokusu jsou zachyceny na obr. 1. Nízká aktivita na půdách s vysokou koncentrací peptonu může být způsobena těmito dvěma důvody: a) pepton obsahuje inhibitor proteasy, který podstatně snižuje její aktivitu na půdách bohatých peptonem; b) na půdách s nízkou koncentrací dusíku dochází k většímu vylučování proteasy.

Tabulka 1

% peptonu	Aktivita
H ₂ O	59,5
0,5	62,0
1,0	61,0
2,0	58,0

První možnost (a) jsme vyloučili pokusem, při němž jsme smísili roztok přečištěného enzymu se stejným objemem vody, 1%, 2% a 4% vodným roztokem peptonu. Po 10 min. stání při pokojové teplotě jsme stanovili aktivitu. Z tabulky 1 je zřejmé, že k inhibici proteasy roztokem peptonu nedošlo.

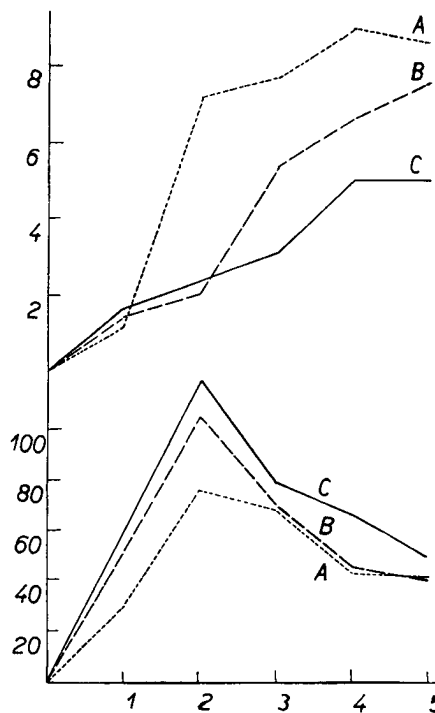
Zjišťovali jsme dále, zda by bylo možno zvýšenou sekreci enzymu na prostředích s nízkým obsahem dusíku vysvětlit jako Galeovu kompenzační reakci vzhledem k nepříznivému pH (Gale a Epps 1942, Gale 1952). Při kultivaci aktinomycety na prostředí s 1,5 % glukosy a 0,2 až 0,5 % peptonu dochází totiž



Obr. 1. Vliv koncentrace peptonu na vylučování proteasy.

% peptonu: A = 0,5, B = 1,0, C = 2,0; koncentrace glukosy = 1,5 %.

Osa x = dny kultivace. — Osa y = sušina v mg/10 ml kultivační tekutiny (dolní část), proteolytická aktivita v a. 10⁻² mekv tyrosinu na 1,0 ml kultivační tekutiny (horní část).



Obr. 2. Vliv koncentrace hydrolyzátu želatiny na vylučování proteasy.

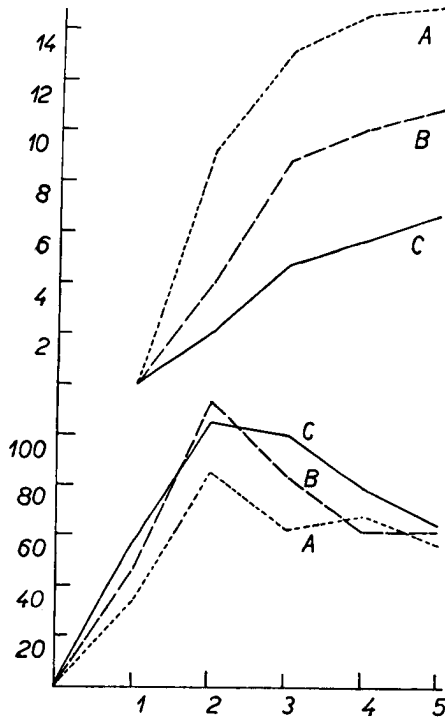
% hydrolyzátu: A = 0,5, B = 1,0, C = 2,0; koncentrace glukosy = 1,5 %.

k dosti značnému poklesu pH — i pod 6,0. Protože optimální pH proteasy je při alkalickém pH (7,5 až 8,6), je její aktivita v prostředí nižší než při optimálním pH. Některé mikroorganismy vyrovnávají podle Galea a spolupracovníků toto snížení

enzymatické aktivity větší produkcí enzymů. Ověřovali jsme si proto tuto možnost i v našem případě a vyjádřili jsme v tabulce 2 proteolytickou aktivitu z pokusu zachyceného na grafu 1, jak v „absolutní“ hodnotě, t. j. při jejím optimálním pH, tak i v její „aktuální“ hodnotě, t. j. v aktivitě, kterou enzym při naměřeném pH kulturační tekutiny skutečně má.

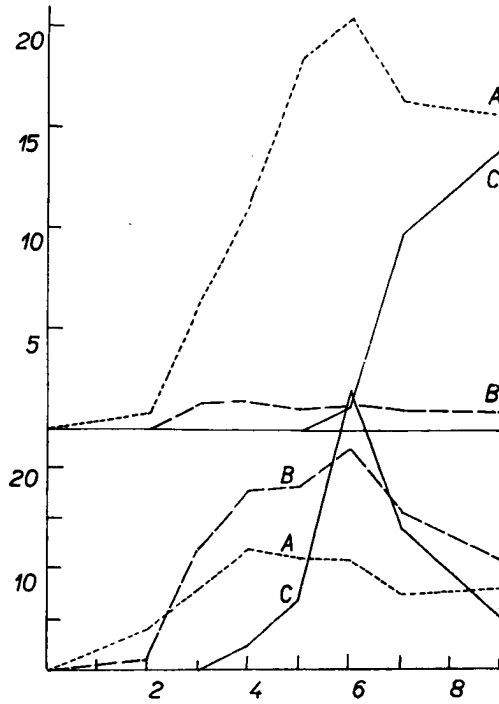
Tabulka 2

Dny	peptonu					
	0,5		1,0		2,0	
	akt. a.	abs. a.	akt. a.	abs. a.	akt. a.	abs. a.
1	31,5	34,3	22,9	26,1	22,5	22,5
2	81,9	116,5	88,3	118,5	30,6	33,5
3	171,9	191,0	132,8	132,8	72,8	72,8
4	184,3	184,3	154,0	154,0	74,1	74,1
5	200,0	200,0	144,5	144,5	87,0	87,0



Obr. 3. Vliv koncentrace želatiny na vylučování proteasy.

% želatiny: A = 0,5, B = 1,0, C = 2,0; koncentrace glukosy = 1,5 %. — Osa x = dny kultivace. — Osa y = mg bílkovin/10 ml kulturační tekutiny (dolní část), proteolytická aktivita v a. 10⁻³ mekv tyrosinu/1 ml kulturační tekutiny (horní část).



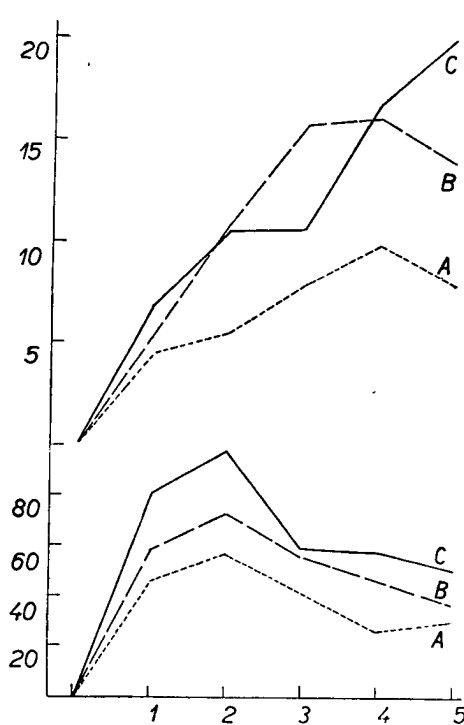
Obr. 4. Vliv koncentrace (NH₄)₂HPO₄ na vylučování proteasy.

% fosforečnanu amonného: A = 0,15, B = 0,6, C = 1,5. — % glukosy = 1,5.

— Osa x = dny kultivace. — Osa y = mg bílkovin/10 ml kulturační tekutiny (dolní část), proteolytická aktivita v a. 10⁻³ mekv tyrosinu/1 ml kulturační tekutiny (horní část).

Z tabulky 2 je patrné, že zvýšené vylučování proteasy na prostředí s nízkým obsahem peptonu není možno vyložit jako důsledek kompenzační reakce na pH. I „aktuální“ proteolytická aktivita byla nejvyšší na půdách chudých dusíkem.

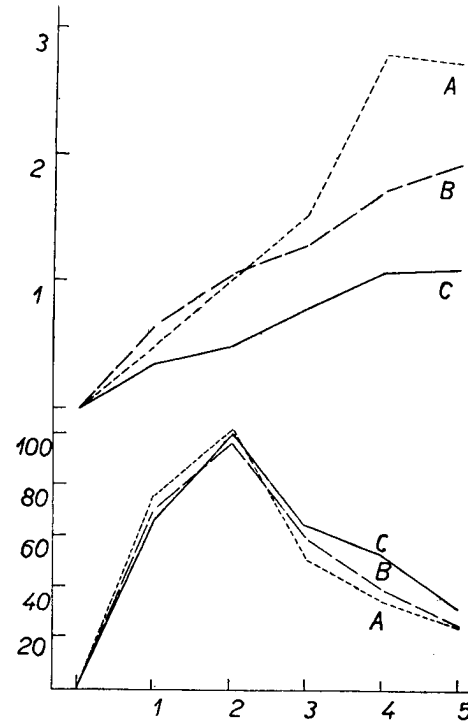
V další části práce jsme si chtěli ověřit, zda zjištěná závislost platí i při použití jiných zdrojů dusíku. Použili jsme postupně enzymatického hydrolyzátu želatiny, želatiny (obsahující 0,025 % hydrolyzátu želatiny jako startovní zdroj dusíku) i anorganicky vázaného dusíku — $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Ve všech pokusech vylučovala aktinomyceta do prostředí nejvíce proteasy na půdách s nízkou koncentrací dusíku, jak vyplývá z obr. 2, 3 a 4. Poměrně nejnižší sekrece proteasy jsme dosáhli na prostředí s želatinou a hydrolyzátem želatiny, kde došlo rovněž v průběhu kultivace k dosti značné submersní sporulaci, na rozdíl od peptonových půd, na nichž došlo k rozpadu mycelu a autolyse už po třetím dnu kultivace.



Obr. 5. Vliv koncentrace glukosy na vylučování proteasy.

% glukosy: A = 0,5 B = 1,0, C = 2,0; koncentrace peptonu = 1 %. Proteolytická aktivita v a. 10^{-3} mekv.

Osa x = dny kultivace. — Osa y = sušina v mg/10 ml kultivační tekutiny (dolní část). proteolytická aktivita tyrosinu/1,0 ml kultivační tekutiny (horní část).



Obr. 6. Vliv různě dlouhých štěpů želatiny na sekreci proteasy.

A = krátké štěpy, B = dlouhé štěpy, C = bílkovina. Proteolytická aktivita v a. 10^{-2} mekv.

Chtěli jsme zjistit, zda mohou být v těchto pokusech naměřené nižší hodnoty proteolytické aktivity skresleny přítomností želatiny jako substrátu konkurujícího s kaseinem o povrch enzymu. Smísili jsme proto roztok přečištěné proteasy jednak

s vodou (10 ml + 10 ml), jednak s roztokem 2 % želatiny a stanovili proteázovou aktivitu po 15 min., po 3 hodinách a po 48 hodinách uchovávání při 27°. Výsledky zachycuje tabulka 3, z níž je zřejmé, že k této inhibici proteolytické aktivity může

Tabulka 3

Čas	Aktivita H ₂ O	Želatina
15 min.	19,0	13,5
3 hod.	17,8	15,5
48 hod.	13,8	15,7

docházet pouze v počátečním období inkubace. Nízkou aktivitu na půdách s želatinou, resp. enzymatickým hydrolysátem želatiny není tedy možno vysvětlit v tomto smyslu.

Další naše pokusy měly zjistit, zda k sekreci proteázy dochází v důsledku nedostatku dusíku v půdě nebo v důsledku vyčerpání jakéhokoliv zdroje živin, jehož

koncentrace se stala kritickou. Tato druhá eventualita byla dosti pravděpodobná, protože k nejintenzivnějšímu vylučování enzymu dochází v některých případech až ke konci kultivace, kdy se mycel už nemnoží, ale autolysuje (Chaloupka 1955b). Měnili jsme proto koncentraci glukosy stejným způsobem jako v předchozích pokusech dusík. Výsledek jednoho pokusu je znázorněn na obr. 5. Celkový obraz v těchto pokusech byl opačný než v předchozích. Nejvyšší sekrece proteázy nastala v prostředí s nejvyšší koncentrací glukosy, kde byl i největší nárůst. Ještě zřetelněji je to patrné z tabulky 4, v níž jsme srovnali výsledky několika pokusů.

Jsou v ní uvedeny hodnoty maximální aktivity vztažené na 1 mg maximální sušiny resp. mikrobiálních bílkovin, abychom získali obraz o vztahu mezi velikostí sekrece a nárůstem kultury.

Tabulka 4

P = pepton, HŽ = hydrolysát želatiny, Ž = želatina, G = glukosa, B = bílkoviny, S = sušina.

%	P/B	P/S	HŽ/S	Ž/S	G/S	G/S
0,2	4,40					
0,5	2,19	2,40	1,17	1,75	1,76	0,57
1,0	1,73	1,72	0,72	0,96	2,25	1,18
2,0	1,18	0,68	0,42	0,65	1,88	1,45

Pokusy je proto nutno hodnotit v tom smyslu, že na prostředí s nízkým obsahem zdroje dusíku dochází ke specifické reakci organismu, projevující se zvýšeným vylučováním proteázy.

V poslední části práce jsme přistoupili ke zjišťování vlivu povahy zdroje dusíku (bílkovina, delší peptidy, kratší peptidy a aminokyseliny) na růst a sekreci proteázy. Chtěli jsme získat odpověď na otázku, zda nižší produkce enzymu na půdách se želatinou, resp. hydrolysátem želatiny než na půdách s peptonem byla způsobena délkou peptidického řetězce nebo specifickým aminokyselinovým složením želatiny. Připravili jsme proto WB půdu, obsahující 1 % želatiny, 1 % enzymatického hydrolysátu želatiny a 1% kyselého hydrolysátu želatiny. O enzymatickém hydrolysátu želatiny (B) a želatině (C) jsme zjistili již před tím, že obsahují delší periodické řetězce než v kyselém hydrolysátu želatiny. Ke všem půdám jsme přidali 0, 025% enzymatického hydrolysátu želatiny, aby aktinomyceta měla i na prostředí s bílkovinou asimilovatelný startovní zdroj dusíku. Výsledky jsou zachyceny na obr. 6.

V průběhu kultivace došlo k největší sekreci proteázy na půdě s krátkými pepti-

dickými štěpy a aminokyselinami, k menší na půdě s delšími štěpy a k nejmenší na prostředí s bílkovinou. Tato závislost se opakovaně potvrdila. Nárůst kultury a průběh pH byl ve všech případech přibližně týž, jen na prostředí se želatinou byl poněkud pomalejší pokles sušiny.

Naprosto odlišný byl však mikroskopický obraz. Na prostředí se želatinou došlo v průběhu kultivace již druhý den k mohutné submersní sporulaci, na prostředí s enzymatickým hydrolyzátem želatiny byla sporulace menší a na půdě s kyselým hydrolyzátem nedošlo ke sporulaci vůbec, pouze k fragmentaci a autolyse mycelu (obr. 7, 8, 9, 10).

Diskuse

Sekrece proteázy aktinomycetou *Streptomyces griseus* je podle našich experimentálních výsledků podmíněna nebo ovlivněna především těmito dvěma faktory: Prvým je nedostatek dusíku v půdě; druhá skupina faktorů je méně vyhraněna. Můžeme však říci, že za určitých podmínek faktory, které urychlují nebo vyvolávají autolysu, zvyšují sekreci enzymu.

Nedostatek dusíku nebo nesprávný poměr $C > N$ se projevuje vylučováním velkého množství proteázy, jejíž hladina v kultivační tekutině převyšuje hladinu enzymu na půdách bohatých dusíkem nejen relativně (t. j. vzhledem k množství sušiny), ale ve většině případů i absolutně. Tato závislost platí pro všechny zdroje dusíku námi studované: pepton, želatinu, enzymatický hydrolyzáte želatiny a fosforečnan amonný. Vylučování probíhá na půdách chudých dusíkem i za kyselého pH a při růstu kultury, na bohatých půdách především v období autolysy mycelu a za alkalického pH. Zvýšená sekrece enzymu na půdách s nízkou koncentrací dusíku by mohla být vyvolána především těmito důvody:

a) pH kultivační tekutiny s nízkým obsahem dusíku je při kultivaci nízké, avšak optimální pH enzymu je na alkalické straně. Může proto jít o kompenzační reakci, podobnou té, kterou objevil Gale (1952).

b) Sekrece je způsobena urychlením autolysy v důsledku vyčerpání jednoho (jakéhokoliv) zdroje živin.

c) Použitá dusíkatá živina může obsahovat inhibitor proteázy, který snižuje její aktivitu. Nízká aktivita na prostředích s vysokou koncentrací dusíku by tedy byla způsobena inhibicí enzymu, ne jeho malou sekrecí.

d) Vysoká aktivita proteázy na prostředích chudých dusíkem je vyvolána zvýšeným vylučováním enzymu. Je důsledkem přizpůsobivé reakce organismu, který reaguje na snížení přítoku dusíkatých živin zvýšenou sekrecí příslušného enzymu.

První možnost (a) se nepotvrdila. I když vyjádříme proteolytickou aktivitu v její „aktuální“ hodnotě, dostaneme prakticky tutéž závislost mezi koncentrací dusíkatého zdroje a hladinou enzymu, jako při jejím vyjádření v „absolutní“ hodnotě. Rovněž druhá eventualita (b) nemůže mít rozhodující význam (obr. 5). Při kultivaci na prostředí s různou koncentrací glukosy byla nejvyšší produkce proteázy na půdě s nejvyšším obsahem cukru, kde byl i největší nárůst — výsledek tedy naprosto opačný než na půdách s různou koncentrací dusíku. Třetí možnost jsme vyloučili pokusem, zachyceným v tabulce 1. Přítomnost inhibitoru se nepodařilo prokázat.

Jako nejpravděpodobnější tedy zůstává možnost čtvrtá (d), že totiž zvýšená produkce proteázy je specifickou reakcí organismu na nízkou koncentrací dusíkatého zdroje. Tato schopnost může mít velký význam pro mikroorganismy jako jsou sporulující bacily a aktinomycety, které se účinně účastní rozkladu bílkovinných zbytků a přírodě. Sekrece proteázy za nedostatku aminokyselin a peptidů může mít za následek odbourání eventuálně přítomných odpadních bílkovin a zvýšení přítoku asimilovatelných dusíkatých živin. To umožní další růst a množení těchto mikroorganismů.

Sekreci proteasy aktinomycetou *S. griseus* mohou způsobit nebo zvýšit i látky nebo podmínky, které urychlují autolysu. Vysvítá to z pokusů, při nichž jsme sledovali vliv různé dlouhých štěpů želatiny na vylučování enzymu. Opětovaně jsme dostávali překvapivé výsledky, že totiž nejmenší sekrece enzymu nastala v přítomnosti bílkoviny a největší v přítomnosti aminokyselin a krátkých peptidů. Nejnižší hladina enzymu v prostředí byla doprovázena submersní sporulací, nejvyšší autolysou mycelu.

Studium vztahů mezi submersní sporulací, autolysou a produkcí proteasy vyžaduje ještě dalšího zkoumání, protože zatím není možno říci, zda se autolysou pouze uvolňuje z buněk enzym již dříve v nich vytvořený, nebo zda při autolyse dochází ke zvýšené syntese proteasy.

Souhrn

1. Při kultivaci aktinomycety *Streptomyces griseus* v prostředí s různým obsahem dusíku vylučuje aktinomyceta více proteasy v prostředí s nízkou koncentrací dusíku než na půdách dusíkem bohatých.

2. Tato sekrece je pravděpodobně specifickou odpovědí mikroorganismu na snížení obsahu dusíkatých živin bez ohledu na to, zda jsou přítomny ve formě bílkoviny, peptidů, nebo amonných solí.

3. Snížení koncentrace cukrů v prostředí má za následek snížení sekrece proteasy.

4. Vylučování proteasy je závislé i na zdroji dusíku. Nejnižší je na půdě s bílkovinou, vyšší na delších peptidech a nejvyšší na krátkých peptidech a aminokyselinách.

5. Nízká sekrece enzymů na bílkovinách je doprovázena mohutnou submersní sporulací aktinomycety, vysoká sekrece na krátkých peptidech a aminokyselinách fragmentací a autolysou mycelu.

Za technickou spolupráci děkujeme O. Cívínové.

(Obrazové přílohy III, IV)

Literatura

- Anson, M. L.: *Estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin*. J. Gen. Physiol. 22 : 79 1938.
- Birch - Hirschfeld, L.: Zbl. Bakter. Parasitenk. I. Abt., Orig. 145 : 476. 1940. C. A. 35, 490⁴.
- Dion, W. M.: *The proteolytic enzymes of microorganisms. II. Factors affecting the production of proteases in submerged culture*. Can. J. Research 28C; 586, 1950.
- Fukumoto, J., Yamamoto, T.: *Mechanism of protease production by bacteria and crystallisation of bacterial protease*. Symp. Enzyme Chem. (Japan) 7, 8, 1952. C. A. 46, 8160 f.
- Gale, E. F.: *The chemical activities of bacteria*. New York 1952.
- Gale, E. F.: Epps, J.: Biochem. J. 36: 609, 1942. Cituje Gale 1952.
- Gorini, L., Lanzavecchia, G.: *Recherches sur le mécanisme de production d'une protéinase bactérienne. II Mise en évidence d'un zymogène précurseur de la protéinase de Coccus P.* Biochem. Biophys. Acta 15 : 399, 1954.
- Güntelberg, A. V.: *Method for the production of the plackalbumin-forming protinase from Bacillus subtilis*. Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg. Sér. Chim. 29 : 27, 1954.
- Hoogerheide, J. C., Langhery, J. C.: *Enzymes*. U. S. Patent 2, 549, 465, Apr. 17, 1951. C. A. 5238 h.
- Chaloupka, J.: *Proteolytické enzymy aktinomycety Streptomyces griseus*. Čs. biologie 4 : 206. 1955a.
- Chaloupka, J.: *Tvorba a vylučování proteasy aktinomycetou Streptomyces griseus*. Disertační práce. Praha, 1955b.
- Chopra, N. N.: *Carbohydrates and microbial proteinases*. Proc. Ind. Acad. Sci. 22B : 323, 1945. C. A. 40, 3497³.
- Imšeneckij, A. A., Kasatkina, J. D.: *Aktivnost gidrolitičeskich fermentov i izmenčivost Bac. mesentericus*. Mikrobiologija 23 : 649, 1954.
- Mantejfel, A. Ja.: *Autolysis of acetobutyl bacteria*. Mikrobiologija 10 : 273. 1941. C. A. 37, 2409⁹.
- Maschmann, E.: *Über Bakterienproteinasen. III. Die Proteasen des B. perfringens*. Biochem. Zschr. 295 : 351, 1938.

- Stickland, L. H.: *The determination of small quantities of bacteria by means of biuret reaction*. J. Gen. Microbiol. 5 : 698, 1951.
- Virtanen, A. J., Kokkola, U.: *Influence of nitrogen nutrition on the excretion of protease by gelatine — liquefying bacteria*. Acta Chem. Scand. 4 : 64, 1950.
- Virtanen, A. J., Tarnanen, J.: *Die Sekretion und Thermostabilität der Bakterienproteasen*. Zschr. Physiol. Chem. 204 : 247, 1932.
- Virtanen, A. J., Winkler, U.: *Effect of decrease in the protein content of cells on the proteolytic enzymes system*. Acta Chem. Scand. 3 : 272, 1949.
- Waksman, S. A.: *The actinomycetes*. Waltham 1950.

Протеолитические энзимы актиномицета *Streptomyces griseus* II

Влияние характера и концентрации азота на выделение протеазы

Ю. Халопка

Резюме

При культивации *Streptomyces griseus* в среде с различным содержанием азота актиномицет выделяет больше протеазы в среде с низким содержанием азота, чем в среде, богатой азотом.

Выделение протеазы является, вероятно, специфическим ответом микроорганизма на снижение содержания азотистых питательных веществ, — независимо от того, присутствуют ли они в виде белков, пептидов или аммониевых солей.

Снижение концентрации сахаров в среде вызывает снижение секреции протеазы.

Выделение протеазы зависит и от формы, в какой присутствует азот: оно бывает меньше всего в белковой среде, повышается в среде с длинными молекулами пептидов, а еще больше повышается в среде с короткими пептидами и аминокислотами.

Незначительная секреция энзимов в белковых средах сопровождается интенсивной глубокой споруляцией актиномицета, тогда как значительная секреция их на коротких пептидах и аминокислотах — фрагментацией и автолизом мицелия.

Proteolytic Enzymes of Actinomyces *Streptomyces griseus*. II.

The Influence of the Nature and Concentration of Nitrogen on the Secretion of Protease

J. Chaloupka

Summary

When culturing actinomyces *Streptomyces griseus* in environments with a varying content of nitrogen, actinomyces secretes more protease in an environment with a low concentration of nitrogen than on media rich in nitrogen.

This secretion is probably the specific response of the microorganism to a decrease in the content of nitrogen nutrients, regardless of whether they are present in the form of protein, peptides or ammonium salts.

A decrease in the concentration of sugars in the environment results in a decrease in the secretion of protease.

The secretion of protease also depends on the form of nitrogen. It is lowest on a protein medium, higher on the longer peptides and greatest on the higher peptides and the amino acids.

Low secretion of enzymes on proteins is accompanied by submerged sporulation of *Streptomyces*, high secretion on the short peptides and the amino acids is accompanied by fragmentation and with autolysis of the mycelium.

Československá
M I K R O B I O L O G I E
ročník 1. (1956) — č. 1

Titracia vírusu chrípky v tkanivových kultúrach

JÁN SZÁNTÓ

Československá akadémia vied, Virologický ústav, Bratislava

Došlo 30. 7. 1955

Množenie vírusu chrípky v tkanivových kultúrach môžeme dokázať buď titráciou infekčného materiálu z kultúr na vyvíjajúcich sa kuracích embryách alebo vnímavých zvieratách, alebo hemaglutinačnou skúškou. Pri hemaglutinačnej skúške používame vírus vyluhovaný z tkaniva, alantoickú či amnionickú tekutinu alebo výživnú tekutinu z kultúr a pridaním červených krviniek zistujeme hemaglutináciu. Posledný spôsob nie je náročný a môže slúžiť ako jednoduchá kontrola rozmnožovania vírusu. Pre určenie titru vírusu v tkanivových kultúrach sme volili spomínanú hemaglutinačnú skúšku. Výsledky podávame v tejto práci.

Pokusná časť

Materiál. V pokusoch sme použili vírus chrípky typu A, kmeň PR8, adaptovaný na alantois kuracieho embrya. Tkanivové kultúry z chorionalantoických blán 10 až 16dňových kuracích embryí sme zakladali do Erlenmeyerových baniek a otáčavých skúmaviek.

Suspendované tkanivové kultúry v Erlenmeyerových bankách. Vybraté chorionalantoické blany sme prepláchlí niekoľkokrát vymeneným fyziologickým roztokom a rozstrihali na drobné kúsky. Do jednej Erlenmeyerovej banky obsahu 25 až 30 ml sme pridali 3 až 5 kvapiek asi 50 % suspenzie tkaniva. Výživná tekutina sa skladala z 3 dielov Hankovho roztoku a 1 dielu konského séra. Na jednu Erlenmeyerovu banku sme pridali 3 ml výživnej zmesi.

Z infikovanej alantoickej tekutiny sme spravili desaťnásobné riedenia Hankovým roztokom a z každého riedenia sme pridali 0,1 ml suspenzie vírusu na jednu banku. V každom riedení sme používali štyri banky. Kultúry sa inkubovali 4 až 6 dní pri 35° C.

Tkanivové kultúry v otáčavých skúmavkách. Do skúmavky sme pridali 3 až 5 kvapiek kohútej plazmy. Plazmu sme rozotrelí po vnútornej stene spodnej tretiny skúmavky a pridali sme asi 30 kúskov rozstrihanej chorionalantoickej blany. Tekuté prostredie sa skladalo z 1,5 ml Geyovho roztoku. Vírus sme pridali v množstve 0,1 ml na jednu skúmavku z každého riedenia infikovanej alantoickej tekutiny. Alantoická tekutina sa riedila Geyovým roztokom. V každom riedení sme použili štyri skúmavky. Kultúry sa vložili do otáčavého bubna a inkubovali sa 72 hod. pri 36° C.

Titracia vírusu na kuracích embryách. Infikovanú alantoickú tekutinu, ktorú sme používali pri pokusoch s tkanivovými kultúrami, sme titrovali aj na vajčiekach. V každom riedení sme použili štyri vajčeka. Vírus sme očkovali intraalantoicky v množstve 0,1 ml z každého riedenia infikovanej alantoickej tekutiny. Vajčeka sa inkubovali 48 hod. pri 35,5° C.

Dôkaz rozmnoženia vírusu. K 0,5 ml tekutiny z kultúr alebo alantoickej tekutiny sme pridali 0,5 ml 0,5 % kohútich krviniek. Infekčný titer vírusu chrípky sme vypočítali podľa Reed-Muencha (cit. Blaškovič a i. 1954) akumulárnym výpočtom.

Výsledky

**Titracia vírusu chrípky v suspendovaných tkanivových kultúrach
v Erlenmeyerových bankách**

Vírus chrípky sme titrovali v suspendovaných tkanivových kultúrach a súčasne na vajčiekach. V každom riedení sme použili štyri kultúry, resp. štyri vajčeka. Kul-

túry sme založili z chorionalantoických blán 10 a 11dňových kuracích embryí. Vírus chrípky sme pridali v množstve 0,1 ml z každého riedenia infikovanej alantoickej tekutiny. To isté množstvo vírusu sme očkovali aj na kuracie embryá. Kultúry sa inkubovali 5 dní a vajíčka 48 hod. Infekčný titer vírusu zistený pomocou tkanivových kultúr bol v jednom pokuse $10^{-5,50}$ a v druhom $10^{-4,50}$. Titráciou infekčnej alantoickej tekutiny na kuracích embryách sa zistil infekčný titer vírusu $10^{-7,0}$ a $10^{-6,45}$ (tab. 1).

Tab. 1. Infekčné titry vírusu chrípky pri titrácii v suspendovaných tkanivových kulturach a na vyvíjajúcich sa kuracích embryách

	I. pokus	II. pokus
Vek chorionalant. bl. v tk. kult.	10dňové	11dňové
Vek kuracích embr. pri titrácii	10dňové	11dňové
Množstvo inokula	0,1 ml	0,1 ml
Doba inkubácie očkovaných kur. embr.	48 hod.	48 hod.
Doba inkubácie tk. kult. s vírusom	5 dní	5 dní
Infekčný titer na kur. embryách	$10^{-7,0}$	$10^{-6,45}$
Infekčný titer v tk. kulturach	$10^{-5,50}$	$10^{-4,50}$

V tkanivových kulturach sme zistili infekčný titer vírusu o niečo nižší ako pri titrácii na vajíčkach. Hemaglutinácia v tekutine z kultúr je dobre vyznačená a výsledky sa dajú dobre odčítať. Počet vajíčok a tkanivových kultúr, v ktorých sa zistili hemaglutiníny, udáva tabuľka 2.

Tab. 2. V čitateli sa udáva počet pozitívnych výsledkov z očkovaných prípadov. V menovateli sa udáva počet očkovaných prípadov v každom riedení

Riedenie vírusu	K. e.	Tk. k.
10^{-1}	3/4	4/4
10^{-2}	3/4	4/4
20^{-3}	4/4	4/4
10^{-4}	3/4	4/4
10^{-5}	3/4	0/4
10^{-6}	3/4	0/4
10^{-7}	3/4	0/4
10^{-8}	1/4	0/4
10^{-9}	0/4	0/4
Infekčný titer	$10^{-6,45}$	$10^{-4,50}$

Aj keď je infekčný titer vírusu nižší pri titrácii v suspendovaných tkanivových kulturach ako pri titrácii na vajíčkach, má táto metóda niektoré výhody. Technika zakladania suspendovaných tkanivových kultúr je jednoduchá a inkubácia s vírusom chrípky infikovaných kultúr v Erlenmeyerových bankách nevyžaduje špeciálne inkubátory. Pri titrácii vírusu v tkanivových kulturach sa spotrebuje málo materiálu. Z troch až päť chorionalantioických blán založíme 32 kultúr, čo závisí od veľkosti týchto blán.

Titrácia vírusu chrípky v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách

Na porovnanie výsledkov titrácie vírusu chrípky v suspendovaných tkanivových kultúrach sme robili titráciu v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách. Výsledky titrácie vírusu v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách a na vajíčkach vidíme na tabuľke 3.

Tab. 3. Infekčné titre vírusu chrípky pri titrácii v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách a na vyvíjajúcich sa kuracích embryách

	I. pokus	II. pokus
Vek chorionalant. bl. v tk. kult.	13dňové	10dňové
Vek kuracích embr. pri titrácii	12dňové	10dňové
Množstvo inokula	0,1 ml	0,1 ml
Doba inkubácie očkovaných kur. embr.	48 hod.	48 hod.
Doba inkubácie tk. kult. s vírusom	72 hod.	72 hod.
Infekčný titer na kur. embryách	$10^{-8,89}$	$10^{-8,16}$
Infekčný titer v tk. kultúrach	$10^{-6,20}$	$10^{-6,33}$

Na titráciu vírusu chrípky v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách sme používali chorionalantoické blany z 10 až 16dňových kuracích embryí. Chorionalantoické blany z takto starých kuracích embryí sú vhodné na titráciu vírusu v kultúrach.

Pri titrácii vírusu chrípky v otáčavých skúmavkách mal vírus vyššie infekčné titre ako v suspendovaných tkanivových kultúrach. Aby sme zistili presné rozdiely medzi infekčnými titrami v otáčavých skúmavkách a v suspendovaných kultúrach, titrovali sme súčasne tú istú alantoickú tekutinu v oboch druhoch tkanivových kultúr. V otáčavých skúmavkách mal vírus infekčný titer $10^{-6,60}$ a v suspendovaných kultúrach $10^{-5,50}$. V inom pokuse bol infekčný titer vírusu pri titrácii podľa prvej metódy $10^{-7,0}$, podľa druhej metódy $10^{-5,50}$.

Avšak rozdiel medzi infekčnými titrami v otáčavých skúmavkách a na vajíčkach bol veľmi menlivý. Zistili sme rôzne infekčné titre vírusu v otáčavých skúmavkách aj pri titrácii tej istej alantoickej tekutiny. Rozdiely medzi infekčnými titrami na vajíčkach a v suspendovaných tkanivových kultúrach sa menili podľa výšky infekčných titrov na vajíčkach. Infekčné titre v suspendovaných kultúrach sa menili podľa určitých pravidelných podmienok. Pri titrácii tej istej alantoickej tekutiny, v suspendovaných tkanivových kultúrach vychádzali vždy tie isté hodnoty infekčných titrov. Rozdiely medzi infekčnými titrami v otáčavých skúmavkách a na vajíčkach sú práve preto také menlivé, že infekčné titre vychádzajú vždy rôzne tak pri titrácii vírusu na vajíčkach, ako aj v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách.

Celkove boli infekčné titre vírusu chrípky vždy vyššie v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách ako v suspendovaných tkanivových kultúrach. Hranica medzi posledným riedením, ktoré dávalo hemaglutináciu a riedením, ktoré nedávalo hemaglutináciu, nebola taká ostrá v otáčavých skúmavkách ako v tkanivových kultúrach v Erlenmeyerových bankách.

Diskusia

Rozmnožovanie vírusu chrípky v tkanivových kultúrach môžeme dokázať jednoduchým spôsobom pomocou hemaglutinačnej skúšky, ktorú robíme z tekutej fázy

kultúr. Prvý raz použil Weller a Enders (1948) túto metódu na dôkaz rozmnožovania vírusu chrípky a epidemickej parotitídy v tkanivových kultúrach. U vírusu chrípky môžeme zistiť hemaglutiníny v tkanivových kultúrach z chorionalantoických blán a tkanív z celého kuracieho embrya. Hodnoty hemaglutinačných titrov sú nízke u obidvoch druhov tkanív v porovnaní s hodnotami hemaglutinačných titrov, ktoré dosahuje ten istý vírus v alantoickej tekutine (Szántó 1955). V tkanivových kultúrach z chorionalantoických blán sú vyššie hemaglutinačné titre ako v tkanivových kultúrach z tkanív celého kuracieho embrya (Szántó).

Hemaglutinačnú schopnosť tekutej fázy tkanivových kultúr infikovaných vírusom chrípky možno použiť na titráciu tohto vírusu v tkanivových kultúrach. Pri titrácii vírusu chrípky v suspendovaných tkanivových kultúrach má virus nižší infekčný titer ako pri titrácii na kuracích embryách. Tieto výsledky potvrdzujú aj pokusy Gajduseka (1953), ktorý dosiahol nižšie hodnoty infekčných titrov pri titrácii vírusov chrípky v suspendovaných tkanivových kultúrach ako na vajíčkach. Wunder a spol. (1954) robili titráciu vírusu chrípky v tkanivových kultúrach, ktoré pozostávali z jedného kúska chorionalantoickej blany. Z jednej chorionalantoickej blany založili 16 kultúr do skúmaviek, ktoré sa neotáčali. Vírus mal nižší infekčný titer pri titrácii v tkanivových kultúrach ako na kuracích embryách.

Rozmnožovanie vírusu chrípky v suspendovaných tkanivových kultúrach závisí od množstva tkaniva. Pri malom počte buniek sa vírus nerozmnožuje. Keď je príliš mnoho tkaniva, vírus sa tiež zle rozmnožuje (Magill a Francis 1936). Womack a Kass (1953) zistili, že rozmnožovanie vírusu chrípky v suspendovaných tkanivových kultúrach závisí od množstva tkaniva a ve kosti inokula. Burr a spol. (1954) nedosiahli rozmnoženie vírusu chrípky, keď použili vlhké tkanivo váhy 10 mg. V kultúrach, obsahujúcich tkanivo vlhkej chorionalantoickej blany váhy 100—250 mg sa vírus rozmnožuje v približne rovnakej miere.

Po naočkovaní vírusu chrípky do alantoického vaku kuracieho embrya sa tento rozmnožuje v entodermálnych bunkách alantoickej blany. V tkanivových kultúrach sa môže vírus chrípky rozmnožovať v bunkách všetkých troch zárodočných listov chorionalantoickej blany. (Henle 1953.) Tamm a Tyrrell (1954) zistili, že alantoický a chorionový povrch chorionalantoickej blany adsorbuje a produkuje rovnaké množstvo vírusu chrípky.

Titrácia vírusu chrípky v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách je citlivejšia ako titrácia vírusu v suspendovaných tkanivových kultúrach, ale menej citlivá ako titrácia na kuracích embryách. Menšia citlivosť môže byť spôsobená tenkou vrstvou plazmy, ktorá bráni vniknutiu vírusových častíc do buniek, hlavne keď sa pridá vírus v malom množstve ku kultúram. Tenká vrstva plazmy môže zabrániť rovnomernému vniknutiu častíc vírusu poliomyelitídy do buniek tkanivových kultúr (Klőne 1954).

Na titráciu vírusu chrípky v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách sme použili chorionalantoické blany z 10 až 16dňových kuracích embryí. Zistili sme, že tkanivové kultúry z takto starých chorionalantoických blán sú vhodné na titráciu vírusu chrípky. Tieto pozorovania potvrdzujú aj výsledky pokusov Fultona a Armigata (cit. podľa Burra a spol. 1954), ktorí zistili, že chorionalantoické blany z 9 až 16dňových kuracích embryí vytvárajú rovnaké množstvo vírusu. Burr a spol. (1954) považujú za najvhodnejšie blany z 9dňových kuracích embryí, v ktorých sa vytvára najviacej vírusu chrípky; postupujúcim vekom chorionalantoických blán klesá množstvo produkovaného vírusu.

Najväčšia výhoda titrácie vírusu chrípky v tkanivových kultúrach spočíva hlavne v úspore materiálu. Z niekoľkých chorionalantoických blán môžeme založiť veľký počet tkanivových kultúr. Technika zakladania suspendovaných tkanivových

kultúr do Erlenmeyerových baniek je jednoduchá. Zakladanie kultúr do otáčavých skúmaviek je zložitejšia. Kultúry v Erlenmeyerových bankách môžeme inkubovať v obyčajnom termostate a nepotrebujeme špeciálne liahne, ako je to pri titracii vírusu chrípky na vajíčkach. Nevýhodou titrácie vírusu chrípky v tkanivových kultúrach je menšia citlivosť tejto metódy, takže infekčné titre sú nižšie pri titracii vírusu v tkanivových kultúrach ako pri titracii na vajíčkach.

Pokusy sme robili s laboratórnym kmeňom PR8 vírusu chrípky. Pokusy bude treba rozšíriť aj na čerstvo izolované chrípkové kmene, čím stúpne praktický význam týchto pokusov. Výsledky tejto práce prispievajú k poznaniu biologických vlastností vírusu chrípky a k skúmaniu vzťahu k vírusu a bunky na modeli kmeňa PR8.

Súhrn

V práci podávame výsledky z titrácie vírusu chrípky v tkanivových kultúrach. Rozmnoženie vírusu chrípky v tkanivových kultúrach sme zistili dôkazom hemaglutinínov v tekutom prostredí kultúr.

Vírus chrípky má nižší infekčný titer pri titracii v suspendovaných tkanivových kultúrach ako pri titracii na vyvíjajúcich sa kuracích embryách. Vyššie hodnoty sme dosiahli v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách, ale infekčné titre boli nižšie ako pri titracii vírusu na kuracích embryách.

Na titraciu vírusu chrípky v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách sme použili chorionalantoické blany z 10 až 16dňových kuracích embryí.

Výhodou titrácie vírusu chrípky v tkanivových kultúrach je úspora materiálu.

Literatúra

- Burr, M. M., Campbell, M. E., Morgan, J. F., Nagler, F. P.: *Studies on the propagation of influenza and mumps viruses in tissue culture with chemically-defined media.* Canad. J. Microbiol. 1 : 158, 1954.
- Fulton, F., Armitage, P.: Cit. podľa Burr, M. M. a spol. Canad. J. Microbiol. 1 : 158, 1954.
- Gajdusek, D. C.: *Suspended cell tissue cultures for study virus growth kinetics.* Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) 83 : 621, 1953.
- Henle, W.: *Multiplication of influenza virus in the entodermal cells of the allantois of the chick embryo.* Cit. Smith, K. M., Lauffer M. A.: *Advances in virus research.* New York 1953 (str. 141).
- Klöne, W.: *Der Nachweis des Poliomyelitis Virus in Stuhlproben mittels der Gewebekultur.* Z. Hyg. Infektkr. 140 : 58, 1954.
- Magill, T. P., Francis, T.: *Studies with human influenza virus cultivated in artificial medium.* J. Exp. Med. 63 : 803, 1936.
- Reed, L. J., Muench, H.: Cit. podľa Blaškovič, D. a spol.: *Laboratórne metódy vo virológii.* Bratislava 1954.
- Szántó, J.: *Dlhodobá kultivácia vírusu chrípky v tkanivových kultúrach v otáčavých skúmavkách.* Biológia: 10 : 584, 1955.
- Tamm, I., Tyrrell, D. A. J.: *Influenza virus multiplication in the chorionallantoic membrane in vitro: kinetic aspects of inhibition by 5,6-Dichloro-L-D-ribofuranosyl-benzimidazole.* J. Exp. Med. 100 : 541, 1954.
- Weller, T. H., Enders, J. F.: *Production of hemagglutinin by mumps and influenza A viruses in suspended cell tissue cultures.* Proc. Soc. Exp. Med. (N. Y.) 69 : 124, 1948.
- Womack, C. R., Kass, E. H.: *Influenza virus in allantoic sac tissue culture. Quantitative studies on nucleic acid content during growth and in the presence of cortisone.* J. Immunol. 71 : 152, 1953.
- Wunder, Ch. C., Brandon, F. B., Brinton, Ch. C.: *Assay of influenza virus infectivity with chicken embryonic membranes.* Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) 86 : 561, 1954.

Титрация вируса гриппа в тканевых культурах

Я. Санто

Резюме

Даются результаты титрации вируса гриппа в тканевых культурах. Степень размножения вируса гриппа в тканевых культурах мы определяли путем доказательства наличия гемагглютининов в жидкой среде культур.

Вирус гриппа отличается более низким инфекционным титром при титрации в тканевых культурах во взвеси, чем при титрации на развивающихся куриных зародышах. Сравнительно более высокие показатели мы получали при тканевых культурах во вращающихся пробирках, но инфекционные титры все же бывали ниже, чем при титрации вируса на куриных зародышах.

Для титрации вируса гриппа в тканевых культурах во вращающихся пробирках мы пользовались хорионаллантоисной оболочкой 1—16-дневных зародышей.

Преимуществом титрации вируса гриппа в тканевых культурах является экономия материала.

Titration of the Influenza Virus in Tissue Cultures

J. Szántó

Summary

The results of titration of the influenza virus in tissue cultures are given in the communication. Proliferation of the influenza virus in tissue cultures was ascertained by the demonstration of haemagglutinins in the fluid environment of the cultures.

The influenza virus has a lower infection titre on titration in suspended tissue cultures than on titration in developing chick embryos. Higher values were obtained in tissue cultures in roller-tubes but the infection titres were lower than on titration of the virus in chick embryos.

For titration of the influenza virus in the tissue cultures in roller-tubes, chorio-allantoic membranes from 10—16-day-old chick embryos were used.

The advantage of titration of the influenza virus in tissue cultures is the saving of material.

K r á t k á s d ě l e n í

Štěpení asparaginu enzymatickým komplexem půd

JAROSLAV DROBNÍK

Biologická fakulta Karlovy university, oddělení půdní mikrobiologie, Praha

Došlo 28. 10. 1955

Vypracovali jsme metodiku stanovení enzymatického štěpení asparaginu v půdě, abychom mohli sledovat pochody rozkladu bílkovinných (a příbuzných) látek i příslušná společenstva mikroorganismů po enzymologické stránce. K 5 g půdy přidáváme 0,75 ml toluenu a po 15 min. roztok asparaginu (33 mg/ml). Inkubujeme 48 hod. při 42 °C. Uvolněný NH₃ stanovíme modifikovanou Conwayovou difusní metodou. pH půdy měníme jednak pufrem (Drobník 1955), jednak přidáním suspence 1 n Ca(OH)₂ (0,05 až 1,0 ml), nebo 3 m H₃PO₄ (0,02 až 1,0 ml). Tento druhý způsob, využívající přirozené ústojivosti půdy i asparaginu, je výhodnější. Metodika stanovení je rychlá a jednoduchá. Při 3 paralelních stanoveních je v běžné polní půdě průkazná již 5% odchylka.

Vlastnosti enzymu. Za uvedených podmínek se aktivními půdami dosáhne až 50% rozštěpení asparaginu. Sterilizace půdy (1,5 atm po 20 min.) takřka úplně štěpení zastaví. Kromě deamidace asparaginu probíhají i jiné reakce, z nichž je nejpravděpodobnější dekarboxylace kyseliny asparagové, jak o tom svědčí přítomnost alaninu ve štěpných produktech. Není vyloučeno, že podrobnější výzkum ukáže i jiné reakce. Nejvhodnější koncentrace substrátu je 33 mg/ml. Tepelné optimum leží kolem 50 °C. Při 25° a 65° je aktivita poloviční. Optimální pH je 6,5 až 7,0. Štěpení je zastaveno při pH < 5,0 a je poloviční při pH 5,3 a 9,3.

Podmínky tvorby enzymu. Rozkládají-li se v půdě organické látky bohaté dusíkem (kasein, pepton, vojtěška), stoupá rychlost štěpení asparaginu touto půdou. Naopak, při rozkladu látek uhlíkatých (na příklad glukosu), nebo po přidání minerálních solí do půdy (NO₃, PO₄) aktivita klesá. Půdy dobře hnojené s dobrou zásobou dusíku mají obecně aktivitu vyšší než půdy chudší. Tyto předběžně zjištěné vlastnosti dynamiky tvorby enzymatického komplexu dávají předpoklady využití enzymatického štěpení asparaginu ke studiu přeměny látek v půdě a společenstev půdních mikroorganismů. Zároveň jsou důkazem naší tese (Drobník 1955, Drobník a Seifert 1955), že aktivita jednotlivých specifických enzymů nevystihuje celkovou biologickou aktivitu půdy, ale informuje nás o její kvalitativní stránce. Ve studiu tohoto enzymatického komplexu pokračujeme.

L i t e r a t u r a

Drobník, J.: *Štěpení škrobu enzymatickým komplexem půd.* Čs. biologie 4 : 19, 1955.

Drobník, J., Seifert, J.: *Vztah enzymatické inverze sacharosu v půdě k některým půdně mikrobiologickým testům.* Čs. biologie, 4 : 30, 1955.

Расщепление аспарагина энзиматическим комплексом почвы

Резюме

Почвенные ферменты расщепляют аспарагин на аммиак и аспарагиновую кислоту, которая в свою очередь превращается энзимами в аланин. Чтобы определить активность фермента, мы выдерживаем образец почвы с толуэном и аспарагином и определяем количество возникающего аммиака по диффузному методу Conway-я. В работе приводятся данные о характерных моментах ферментного комплекса. Мы предполагаем, что метод энзиматического расщепления аспарагина даст много ценного в вопросе превращений азотистых веществ почвы.

Über die Spaltung des Asparagins durch den Enzymekomplex der Böden

Zusammenfassung

Es wird eine Spaltung des Asparagins durch Bodenzymen festgestellt. Die Aktivität des Enzyms wird durch die Menge des Ammoniaks bestimmt, das in der mit Toluol behandelten und Asparagin enthaltenden Bodenprobe gebildet wird. Zur Bestimmung wurde die Conwaysche Diffusionsmethode modifiziert. Bei der Spaltung des Asparagins wird der wahrscheinliche Eingriff des Enzymekomplexes vermutet, da die bei der Reaktion entstehende Asparaginsäure durch andere Enzyme in Alanin verwandelt wird. Die charakteristischen Eigenschaften des Enzymekomplexes werden kurz beschrieben. Es ist anzunehmen, dass die enzymatische Spaltung des Asparagins für das Studium der Zersetzung stickstoffreicher organischer Substanzen im Boden von wertvoller Bedeutung sein wird.

Z p r á v y

Ke konferenci o anthroozoonosách

Problematice anthroozoonos bude věnován letošní sjezd (květen 1956, Praha) mikrobiologické a epidemiologické sekce Čs. lék. společnosti J. E. Purkyně. Vzrůstající frekvence řady zoonos u člověka a profesionální charakter těchto onemocnění jsou jedním z hlavních důvodů, proč výzkum anthroozoonos byl zařazen jako samostatný úkol do státního výzkumného plánu. Vedle praktických důvodů (vázaných velmi úzce se snahou o zvýšení živočišné produkce) je to však i zájem teoretický, který vede lékaře a veterinární mikrobiology k prohloubenému studiu těchto infekcí. Lze zde totiž sledovat i řadu obecně mikrobiologických zákonitostí, jejichž úspěšné řešení je předpokladem pro stanovení úspěšné léčebné taktiky i zabezpečení prevence: adaptace mikroorganismu na endocelulární parasitismus a odtud vyplývající možnost variability, chronicita až inaparentnost infekce, jak se s nimi setkáváme u brucelosis, anebo listerióze či toxoplasmové infekce matek, vedoucí k těžkému poškození plodu.

Sjezd věnovaný problematice anthroozoonos bude zaměřen především na člověka jako příležitostný a poslední článek infekčního okruhu, na procesy imunitní přestavby organismu po setkání s infektem (význam alergisace!), na možnosti přesné diagnostiky klinicky málo zřetelných forem lidské choroby, na možnosti racionální léčby i specifické prolyaxe chronických onemocnění, při nichž se výrazně uplatňuje dlouhodobá protekce mikroorganismu buňkami mesenchymálního systému.

Květnový sjezd o anthroozoonosách má přinést původní výtěžky výzkumu v těchto úsecích studia infekcí: anthrax, onemocnění vyvolávaná pasteurelami (s výjimkou tularemie), brucelosis, listerióza, otázky atypických pyogenních korynebakterií, Q-horečka, problematika některých viros (ortnithosis, lyssa), z parazitologické problematiky toxoplasmosis, onemocnění vyvolané *Pneumocystis carinii* a některé leptospirosy. Problematiky těchto zoonos, u nichž je jasně patrný přírodně ohniskový charakter ve smyslu učení akademika Pavlovského, se sjezd nehodlá dotýkat.

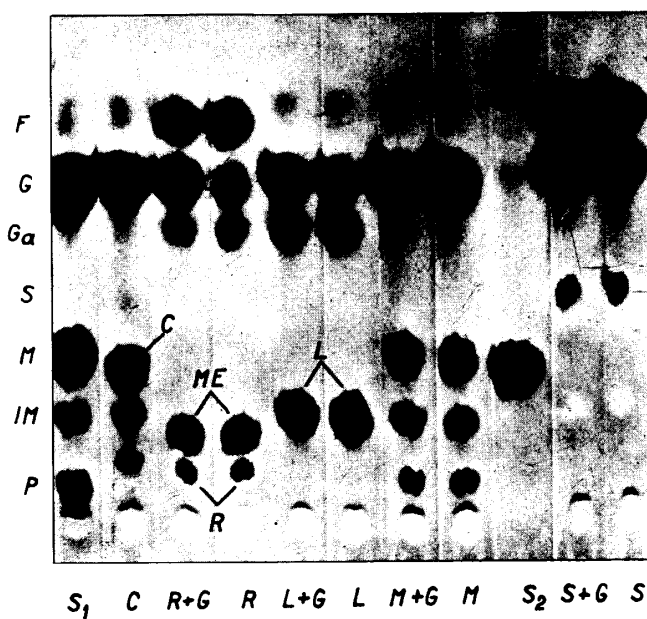
Dr Ctírad John

Konference na tema „anthroozoonosy“ se koná v Praze ve dnech 17.—19. května 1956. Přihlášky k účasti na konferenci a souhrny připravovaných referátů zašlete do konce února na adresu Mikrobiologická a epidemiologická sekce společnosti J.E.P. Praha XII., Šrobárova 48 (Ústav epidemiologie a mikrobiologie).

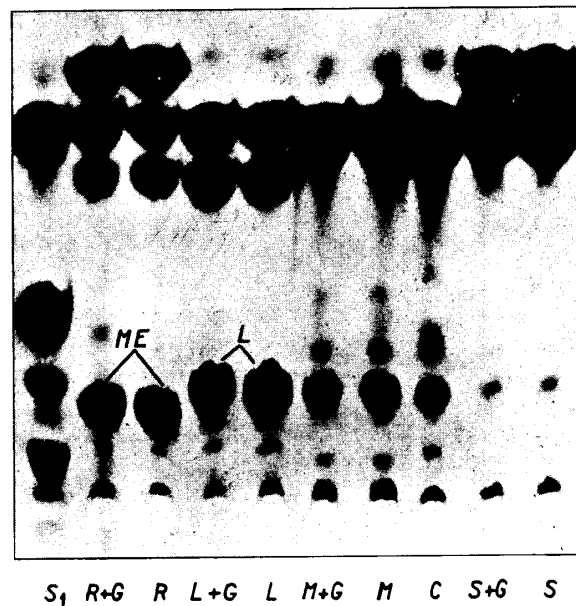
Vydává Biologický ústav Československé akademie věd v Nakladatelství Čs. akademie věd, Vodičkova 40, Praha II. Adresa redakce: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha XIX. Administrace: Nakladatelství Čs. akademie věd, Vodičkova 40, Praha II, tel. 246241. Účet Státní banky československé č 38-161-0087, číslo směrovací 0152-1. Tisknou a expedují: Pražské tiskárny, n. p., provozovna 04, Praha XIII, Sámova 12. Vyšlo dne 20. února 1956. - A-02075

M. Burger a K. Beran: O transglukosidační činnosti enzymatického preparátu plísně *Aspergillus niger*

Příl. I.



Obr. 1. Doba inkubace 75 minut.



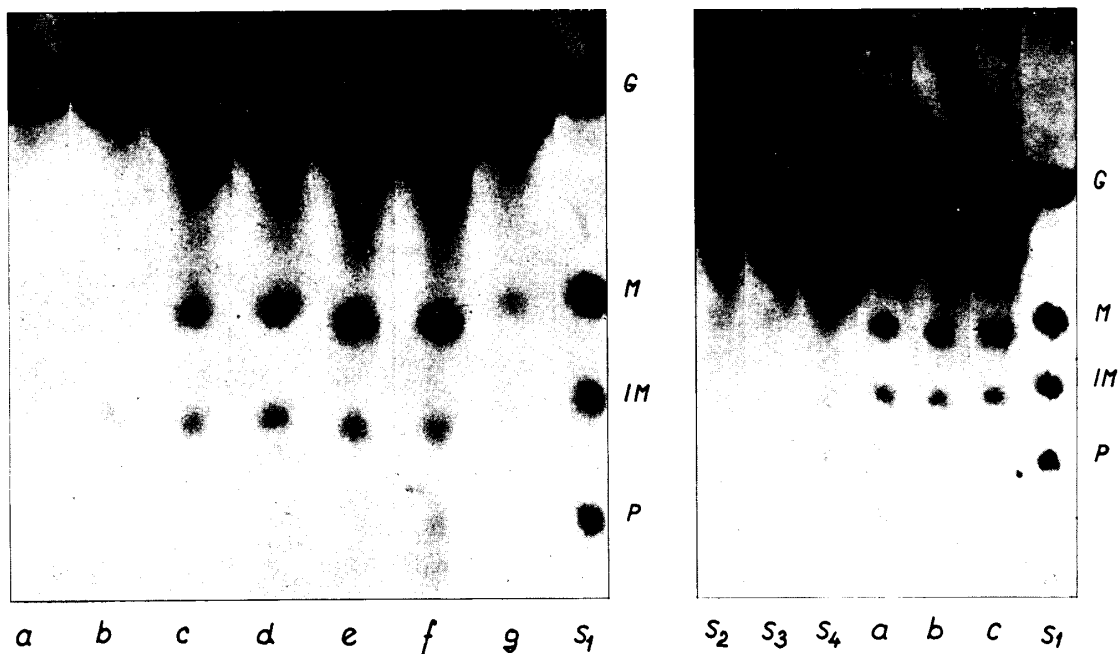
Obr. 2. Doba inkubace 18 hodin.

Účinek enzymatického preparátu *A. niger* na některé oligosacharidy

Inkubované cukry: C = cellobiosa, R = rafinosa, R-G = rafinosa s glukosou, L = laktosa, L-G = laktosa s glukosou, M = maltosa, M-G = maltosa s glukosou, S = sacharosa, S-G = sacharosa s glukosou, S₂ = vzorek cellobiosy. Složení cukrů v inkubovaných směsích: F = fruktosa, G = glukosa, Ga = galaktosa, M = maltosa, IM = isomaltosa, M₃ = maltotriosa, P = panosa.

M. Burger a K. Beran: O transglukosidační činnosti enzymatického preparátu plísně *Aspergillus niger*

Přil. II.



Obr. 6.

Obr. 7.

Účinek enzymatického preparátu *A. niger* na glukosu.

G = glukosa, M = maltosa, IM = isomaltosa, P = sacharosa. (Doba inkubace 18 hodin)

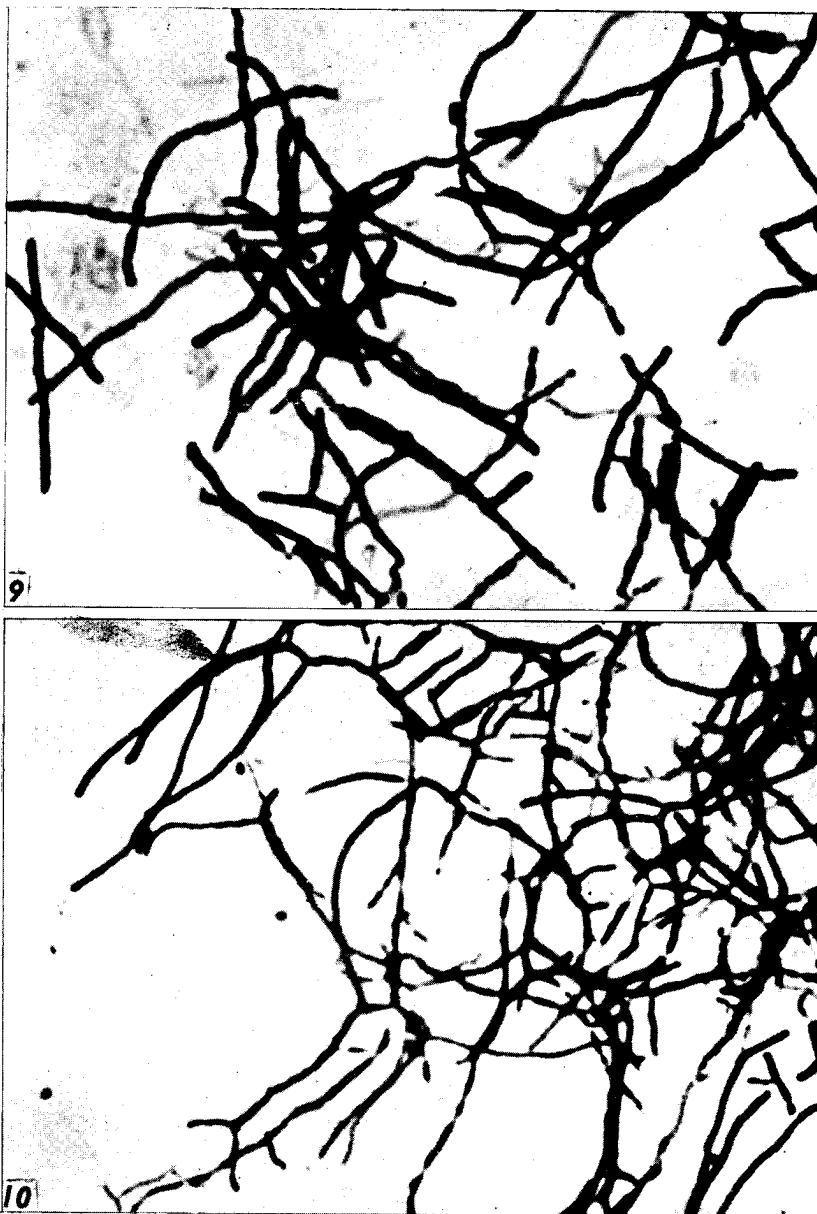
Obr. 6. a, b, c, d, e, f = 5, 10, 30, 40, 50 a 60 % glukosy, g = 15 % glukosy a 50 % glycerinu.

Obr. 7. S₂ S₃ S₄ = 40, 50 a 60% roztok glukosy neinkubovaný, a, b, c = 40, 50 a 60% roztok glukosy inkubovaný s enzymatickým preparátem.



Obr. 7. Submersní sporulace aktinomycety *Streptomyces griseus*. Preparát z 5denní kultury, vyrostlé na půdě s 1 % želatiny a 1,5 % glukosy. Barveno podle Grama. Zvětšeno 2000krát.

Obr. 8. Mycel z 5denní kultury *Streptomyces griseus*, vyrostlé na půdě s 1 % dlouhých štěpů a 1,5 % glukosy. Barveno podle Grama. Zvětšeno 2000krát. Foto J. Fiala.



Obr. 9. Mycel z 5denní kultury *Streptomyces griseus*, vyrostlé na půdě s 1 % krátkých štěpů želatiny a 1,5 % glukosy. Barveno podle Grama. Zvětšeno 2000krát.

Obr. 10. Mycel ze 4denní kultury *Streptomyces griseus*, vyrostlé na půdě s 1 % peptonu a 1,5 % glukosy. Barveno podle Grama. Zvětšeno 1500krát. Foto J. Fiala.

NAKLADATELSTVÍ ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE VĚD

upozorňuje čtenáře na práce z biologických oborů, které vyšly v roce 1955 v Rozpravách ČSAV
a Pracích Brněnské základny ČSAV:

Rozpravy ČSAV, řada MPV ročník 65 - 1955

- Sešit 1. Jaroslav Pelikán: *Poznámky k bionomii populací některých našich drobných ssavců*. 12 Kčs
- Sešit 3. Miroslav Servít: *Nové lišejníky*. 10 Kčs.
- Sešit 8. Václav Kazda: *Přispěvek k ekologii krytonosce řepkového*. 10 Kčs.
- Sešit 9. Jaroslav Kramář: *Komáři rodu Aedes v ČSR*. 14 Kčs.

Práce Brněnské základny ČSAV ročník XXVII - 1955

- Sešit 1. J. Pelikán: *Studie o stanovištních hraboše polního (Microtus arvalis Pall)*.
J. Kratochvíl a B. Rosický: *Hraboš severní (Microtus oeconomus), relikt zvířeny z doby ledové v ČSR*. 18 Kčs.
- Sešit 3. Jos. Podpěra: *Bryum generis monographiae prodromus*. 13,30 Kčs.
- Sešit 5. R. Dostál: *O korelační morfogenesi na příkladě lnu (Linum usitatissimum)*. 16 Kčs.
- Sešit 9. Octavianus Farský: *O žíru puchýřníka lékařského — Lytta vesicatoria L. — na Gabčíkovsku*.
14,50 Kčs.
- Sešit 10. Fr. Tenora - Vlast. Baruš: *Helmúthofauna myši a hrabošů státní přírodní rezervace v Lednici a okolí*.
Věra Holíšová a Mil. Kočíš: *K poznání endoparasitických červů myšovitých hlodavců na Moravě*.
Fr. Balát: *Přispěvek k poznání všenek rodu Brúelia I*. 16 Kčs.

Rozpravy ČSAV a Práce Brněnské základny si můžete objednat, i jednotlivé sešity, v administraci
Nakladatelství Československé akademie věd, Praha II, Vodičkova 40. Dostanete je také v prodejné
NČSAV v Praze II, Václavské nám. 34.

NAKLADATELSTVÍ ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE VĚD

upozorňuje čtenáře na tyto práce z oboru biologie:

F. Herčík: PROBLÉM BAKTERIOFÁGA

Cílem této práce bylo zjistit, jaké jsou morfologické vztahy mezi bakterií a fágem a jakým způsobem probíhá tvorba bakteriofága. Autor se svými spolupracovníky konal pokusy s elektro-
novým mikroskopem po dobu čtyř let a tato publikace je výsledkem jejich studií o tvorbě fága. Nejcennějším přínosem této studie jsou některé závěry povahy obecné biologické, o nichž se autor zmiňuje v závěrečné kapitole, při čemž je uvádí do vztahu s pracovními výsledky jiných badatelů o fágu, zvláště badatelů sovětských. V závěrečné kapitole autor také ukazuje, jak pozorování pracovníků jeho kolektivu přispěla k pochopení skutečné podstaty bakteriofága. Kniha je doplněna množstvím mikroskopických snímků, na nichž autor demonstruje svůj výklad, a věcným i jmenným rejstříkem.

Str. 112, obr. 6, příl. 40, brož. Kčs 30,—.

I. I. Mečnikov: OTÁZKY IMUNITY

Tato publikace shrnuje nejvýznamnější práce ruského badatele I. I. Mečnikova, který jako tvůrce fagocytární teorie má velký význam v dějinách moderní biologie i medicíny. Studie v knize zařazené ukazují, jak Mečnikov rozvíjel svou teorii, bránil ji proti námitkám jiných vědců a doplňoval ji na základě nových výzkumů. Vydavatelé vybrali především ty práce, které přinášely nový experimentální materiál. K nim byl přiřazen i obsáhlý přehled fagocytární teorie, „Učení o fagocytose a jeho experimentální základy“ z roku 1913, poslední přehledný výklad Mečnikovem psaný.

V protikladu k Mečnikově teorii fagocytární se vyvíjela z počátku teorie humorální, podle které nevnímavost proti nemoci je vázána na antitoxické vlastnosti sera. Ukázalo se, že v obranných procesech organismu se účastní obě složky, humorální i fagocytární, a že se obě teorie navzájem doplňují. Mečnikov výzkum humorálních faktorů nepodceňoval a řada jeho prací se obírá problematikou toxinů a antitoxinů. Také ty jsou v knize zastoupeny. Důležitým příspěvkem ke studiu vakcinace proti infekčním nemocem jsou jeho drobnější práce o očkování proti břišnímu tyfu. Stat o imunitě a vnímavosti proti střešní choleře po prvé ukázala, jaký význam pro imunitu má normální flora organismu. Proto také tyto práce najde čtenář ve výboru.

Práce v knize otištěné jsou seřazeny chronologicky a podávají dobrý obraz o vývoji a výsledcích Mečnikovovy práce v imunologii. V závěru je zařazena stat L. A. Zilbera, Fagocytární teorie I. I. Mečnikova, která pomůže čtenáři, aby si tento obraz ucelil; ukazuje zároveň, kterým směrem šel další vývoj fagocytární teorie a imunologie vůbec. Knihu doplňují pečlivě vypracované poznámky. Připojen je jmenný rejstřík. Text je provázen větším počtem vyobrazení.

Publikace je určena vědeckým pracovníkům v experimentální biologii, lékařům, studujícím medicínu i širšímu kruhu zájemců o lékařskou a biologickou problematiku, neboť některé stati jsou psány formou přístupnou i laikovi s dostatečným všeobecným vzděláním.

Str. 460, XVIII obr. příloh, váz. Kčs 98,—.

N. A. Krasilnikov: AKTINOMYCETY — ANTAGONISTÉ A ANTIBIOTICKÉ LÁTKY

Úkolem této knihy je seznámit čtenáře se základy vědy o antibiotikách a jejich producentech — aktinomycetách — a zároveň sestavit v přístupné formě metody, které by pomohly vést výzkum a získat nové antibiotické látky. Autor má v tomto pojednání na zřeteli jen ty druhy a kmeny, které tvoří antibiotické látky, proto nepodává obecné poznatky o antagonistických projevech aktinomycet. Kniha je systematicky rozdělena na tři hlavní části. V první pojednává autor o metodách studia aktinomycet, v druhé se zabývá antibiotiky, zvláště streptomycinem a v třetí pojednává o praktickém využití antibiotik hlavně v lékařství. Kniha je doplněna bohatým seznamem odborné literatury.

Stran 300, obr. 15, brož. 32,40 Kčs.

*Tyto knihy obdržíte ve všech prodejnách n. p. KNIHA anebo přímo v prodejně
Nakladatelství Československé akademie věd, Praha II, Václavské náměstí 34*