

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500018-6

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD
ACADEMIA SCIENTIARUM BOHEMOSLOVENICA

FOLIA BIOLOGICA

TOMUS II
FASCICULUS 5



Fol. biol. (Praha) Tom. 2 - Fasc. 5 Praha 31. 11. 1956

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500018-6

F O L I A B I O L O G I C A (P R A H A)

Международное издание журналов Československá biologie и Československá mikrobiologie

Редакционная коллегия:

Академик И. Малек (главный редактор), В. Вршанский, М. Гаšek, чл.-корр. ЧСАН Ф. Герчик, академик О. Ировец, Ю. Мацура, академик С. Праг, Б. Росицкий (секр. ред. коллегии), Л. Черный, Я. Штерцль.

Переводы на русский язык: доц. д-р Широ́ва, на английский язык: д-р Ридесова, на немецкий язык: д-р Файгель

Издается Биологическим институтом Чехословацкой Академии наук в Издательстве ЧСАН. Выходит 6 раз в год. Подписная цена на 1 год Kčс 60.—, цена одного номера Kčс 10.—. Адрес редакции: Биологический институт ЧСАН, На цвицишти 2, Прага XIX. Заказы: Артия, Смечки 30, Прага II, Чехословакия.

F O L I A B I O L O G I C A (P R A H A)

International Edition of the Journals Československá biologie and Československá mikrobiologie

Editorial Board:

Academician I. Málek (Chief Editor), L. Černý, M. Hašek, Corresponding Member of the Czechoslovak Academy of Science F. Herčík, Academician O. Jirovec, J. Macura, Academician S. Prát, B. Rosický (Editorial Secretary), J. Šterzl, V. Vršanský.

Translations into Russian: Dr Schierová, into English: Dr Ridesová, into German: Dr Feigel.

Issued by Biologický ústav Československé akademie věd at Nakladatelství Čs. akademie věd. Yearly subscription (6 numbers) Kčs 60. Single number Kčs 10. Address: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha XIX. Orders: Artia, Smečky 30, Praha II, Czechoslovakia.

F O L I A B I O L O G I C A (P R A H A)

Internationale Ausgabe der Zeitschriften Československá biologie und Československá mikrobiologie

Redaktionsrat:

Akademienmitglied I. Málek (leitender Redakteur), L. Černý, M. Hašek, korresp. Mitgl. d. Čs. Akademie d. Wiss. F. Herčík, Akademienmitglied O. Jirovec, J. Macura, Akademienmitglied S. Prát, B. Rosický (Redaktions-Sekretär), J. Šterzl, V. Vršanský.

Die Übersetzungen besorgt Doz. Dr A. Schierová für die russischen, Dr A. Ridesová für die englischen und Dr T. Feigel für die deutschen Artikel.

Herausgeber: Biologický ústav Československé akademie věd durch Vermittlung des Nakladatelství Čs. akademie věd. 6 Lieferungen jährlich. Abonnementpreis 60 Kčs, Preis der Einzelnummer 10 Kčs. Anschrift der Redaktion: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha XIX. Zu beziehen durch: Artia, Smečky 30, Praha II, Československo.



Бюст И. И. Мечникова, работа его жены Ольги Николаевны Мечниковой

F O L I A B I O L O G I C A

Том II. (1956) — Fasc. 5

Научное наследие И. И. Мечникова и вопросы
иммунитета эмбрионов

Б. П. ТОКИН

К 40-летию со дня смерти Ильи Ильича Мечникова

В ясный день отчетливо видны далекие горы. Нельзя оценить их величие и красоту, если окажешься лишь в одном из ущелий. Так и творчество гигантов мысли, их подлинная роль в истории науки лучше оценивается не современниками, а «на расстоянии времени», когда проясняется прежняя научная погода и многое ранее непонятное, чем возвышался талант над другими, делается более доступным научным потомкам.

Чем более отдаляется от нас время жизни Ильи Ильича Мечникова, тем более возвышается фигура великого натуралиста.

Нельзя без волнения вспоминать историю его творчества, страстную борьбу вокруг его идей. И дело не только в завистниках и пошлых околонуучных людях, во все времена мешавших науке. Были и глубокие идейные основания для борьбы между талантами и гениями прошлого столетия.

Вирхов не понял своего современника гениального Пастера: он отрицательно относился ко всякой теории, которая видела причину заболеваний не в клетках и тканях, а в «постороннем» для организма начале. Пастер не мог оценить Вирхова и до конца понять общебиологические идеи Мечникова.

Кох со своими учениками третирует Мечникова, называя его фагоцитарную теорию «восточной сказкой».

Мечников в своей борьбе, особенно со сторонниками гуморальных теорий иммунитета, нередко также впадал в крайности. И гениям, и талантам свойственны увлечения и односторонность и даже фанатизм в отстаивании своих взглядов. А Мечников был к тому же ярко эмоциональным человеком.

Тем более приходится удивляться, что Мечников, особенно к концу жизни, сумел возвыситься над всеми спорящими сторонами, правильно оценил огромный вклад в науку не только своих научных друзей, но и «врагов». Особенно трогательна его последняя книга «Основатели современной медицины» (1915), в которой он наряду с Пастером ставит и имена Коха и Листера, боровшихся против Мечникова.

Чем это объяснить? Только личными качествами Мечникова как доброго человека? Нет.

Творчество Мечникова разнообразно, оно кажется даже «пестрым». Вместе с А. Ковалевским он основал эволюционную эмбриологию и сделал много открытий в этой области знаний. Мечников создал не потерявшую значения и в наше время теорию происхождения многоклеточных. Работы его по вопросам старения организмов, несмотря на ошибочность исходных гипотез, еще недостаточно оценены нами. Многие сделал Мечников для зоологии и эволюционной теории.

Заслуги Мечникова в области микробиологии и иммунологии столь велики, что в широких кругах врачей он нередко считается медиком. И, однако, в творчестве Мечникова самым главным было не его блестящие исследования в частных вопросах эмбриологии, зоологии и микробиологии, а созданный им *историко-биологический метод в патологии, сравнительный, эволюционный подход к изучению болезней и явлений иммунитета*. Именно этим И. И. Мечников возвысился над другими течениями научной мысли в области патологии конца прошлого и начала нашего столетий.

До конца жизни остававшийся биологом, называвший себя «зоологом, заблудившимся в медицине», Мечников, благодаря своему методу, после многолетних упорных исследований развития животных организмов, начиная с амебы и кончая человеком, открыл «целобные силы» самих организмов, понял биологическую роль фагоцитарных реакций и явлений воспаления, создал свою теорию иммунитета, глубже, чем кто либо из его современников, понял взаимоотношение биологии и медицины и совершил бессмертный подвиг, явившись вместе с Пастером, Павловым и другими великими биологами и медиками разных стран основоположителем современной медицины.

К сожалению, многие деятели медицины и в наше время изолируют медицину от биологии и не выполняют научных заветов Мечникова, который в своих «Лекциях о сравнительной патологии воспаления» (1892) писал: «Если явления нападения и защиты составляют предметы зоологического исследования, то и столь близкие им явления инфекции и сопротивления ей входят в ту же область исследования . . .

. . . Таким образом должна возникнуть отрасль общей зоологии, т. е. *сравнительная патология животных*, которая будет во многих отношениях отличаться от ныне существующей «сравнительной патологии» (курсив наш. Б. Т.).

Величие Мечникова в обосновании фагоцитарной теории заключается в том, что он, как биолог, явления «сопротивления организма болезням» рассмотрел эволюционно и доказал, что в ходе эволюции иммунологические свойства возникли не обособленно от других процессов жизни и совершенствования организмов, а на базе более общих их функций. Фагоцитарные свойства возникли на базе внутриклеточного пищеварения.

Фагоцитарную способность мезодермальных клеток высших животных и человека Мечников рассматривал как пищеварительный акт — «остаток пищеварительного процесса паренхимеллы».

Следуя научным заветам Мечникова, наша лаборатория разрабатывает новую проблему — *иммунитет эмбрионов*. Обоснование ее и изложение обнаруженных новых фактов дано в наших работах (Токин 1955а). В этой статье мы можем сообщить лишь об основных идеях и привести некоторые иллюстрации.

Проблема иммунитета эмбрионов уже в настоящее время включает большой комплекс новых, совершенно неразработанных наукой, вопросов об иммунологических свойствах клеточных и неклеточных образований на разных стадиях развития различных животных. На каких стадиях развития животных и человека возникают фагоцитарные реакции? Когда в ходе эмбрионального развития создается возможность воспалительных процессов и каковы особенности их на разных стадиях онтогенеза? Имеет ли место выработка антибиотических субстанций клеточными и неклеточными образованиями на различных стадиях эмбрионального развития? Каково иммунологическое значение различных возникающих и изменяющихся в ходе эмбрионального развития жидкостей: жидкости полости бластодермического пузырька (бластоцисты) млекопитающих, амниотической и аллантаидной жидкостей, жидкости бластоцели и гастроцели и т. д.

Вероятно, многие иммунологические свойства зародышей различных животных еще неизвестны науке. В связи с утилитарными задачами ветеринарии и медицины, разработка вопросов иммунитета проводилась в прошлом и нашем столетиях преимущественно на млекопитающих и отчасти на птицах. Иммунология, особенно иммунохимия нашего века имеет много превосходных достижений. Вспомним современные представления о системе «антиген-антитело». Однако, многие вопросы «целебных сил» млекопитающих приобрели бы большую ясность, если бы в широком биологическом аспекте разрабатывались закономерности возникновения и смены иммунологических состояний в ходе индивидуального развития организмов.

Как это все более подтверждается современными экспериментальными исследованиями, антигенная реактивность появляется в яркой форме и становится важнейшим фактором иммунитета лишь на определенных стадиях развития млекопитающих и птиц (Аветикян 1952 и Зильбер 1948). Абсолютному большинству животных как раз этот вид реактивности организма или совершенно не свойственен или свойственен в такой степени, что не может иметь серьезного иммунологического значения.

В ходе исторического развития организмов, те или иные иммунологические свойства возникали не как нечто исключительно предназначенное для защиты, не в порядке «дуэли» между «хозяином» и «паразитом», а на базе более общих функций, как сторона более общих явлений жизни, прежде всего обмена веществ.

Как мы уже говорили, И. Мечников доказал, что фагоцитарные свойства возникли на базе процессов внутриклеточного пищеварения.

Те же соображения применимы и к индивидуальному развитию организмов. Экспериментальные исследования нашей лаборатории все более убеждают нас в том, что возникновение и смена в ходе индивидуального развития организмов тех или иных иммунологических свойств (фагоцитарные реакции, воспалительные процессы, выработка антибиотических субстанций, появление возможности выработки антител у птиц и млекопитающих) являются не обособленными процессами, а необходимыми факторами эмбрионального и постэмбрионального развития, без которых не осуществлялись бы те или иные формообразовательные процессы.

И во взрослых организмах трудно (если не невозможно) найти какие-либо структуры и функции, имеющие лишь одно единственное значение. Например, лейкоциты человека могут играть не только иммунологическую роль. Также и воспалительные процессы, в той или иной форме сопровождающие разнообразнейшие явления в больном и здоровом организмах, играют далеко не только защитную (против микроорганизмов) роль. Мультифункциональна роль желез с внутренней секрецией и т. д.

Вопросы иммунитета эмбрионов должны быть связаны с проблемами целостности организма. И «до-нервные зародыши», и организмы без нервной системы или с весьма примитивной нервной системой (простейшие, губки, кишечнополостные) характеризуются той или иной степенью интеграции. Разным этапам эмбрионального развития организма соответствует особое состояние целостности, и возникновение и смену тех или иных иммунологических свойств клеток и тканей совершенно невозможно рассматривать как что-то обособленное от эмбрионального развития, как что-то специально предназначенное для борьбы с микроорганизмами, как что-то специально предназначенное для будущей борьбы взрослого организма с его «врагами». Смена в ходе развития организма различных иммунологических состояний неразрывно связана с самим развитием организма. При этом не обязательно, конечно, чтобы, положим, возникающие фагоцитарные реакции имели иммунологическое значение именно на данном

этапе развития зародыша. Возникнув на основе общих закономерностей эмбрионального развития, эти потенциальные иммунологические свойства могут играть в данный момент только формообразовательную роль.

Эмбриологов в одинаковой мере интересуют эти вопросы соотношения (в ходе эмбрионального развития) иммунологических свойств и формообразовательных процессов и вопросы, которые, на первый взгляд, находятся лишь в компетенции микробиологов и ученых ветеринаров: каким образом зародыши различных животных на разных стадиях своего развития защищаются от огромного числа потенциальных врагов, почти всегда их окружающих?

Многие моллюски и черви, все рыбы и ряд других животных откладывают яйца в водную среду, в которой может находиться большое количество бактерий, грибов, простейших. Известно, что насекомые в естественной обстановке нормально развиваются и живут в невероятно инфицированной среде. Вспомним тех насекомых, личинки которых могут развиваться в разлагающихся трунах. Каковы их защитные силы?

Может быть, микроорганизмы не только не вредят развитию некоторых животных, но являются необходимым условием их нормального развития.

Встает много иммуно-эмбриологических вопросов, одинаково интересных для микробиологов и эмбриологов. Исследования в области иммунитета эмбрионов перспективны и для практики ветеринарии и медицины, они помогут углубить наши знания об антителах, о фагоцитарных и воспалительных реакциях, об антибиотических свойствах клеточных и неклеточных образований и, может быть, помогут изыскивать антибиотики животного происхождения как лекарственные средства. Дадим некоторые иллюстрации исследований, проводимых кафедрой эмбриологии Ленинградского Университета.

1. На каких стадиях развития возникают фагоцитарные реакции и явления воспаления?

Эти вопросы изучаются на амфибиях, птицах и млекопитающих. Дондуа (1955) почти на 200 куриных зародышах (2, 4, 7, 10, 14, 17—18 суток развития) провел тщательное исследование поведения мезенхимы и соединительной ткани при введении целлоидиновой иглопочки, покрытой тушью или инфузорной землей. Двухсуточному зародышу инфузорная земля вводилась сбоку от нервной трубки, четырехсуточному инородное тело вводилось в почку задней конечности, а на последующих стадиях — под кожу в область голени или бедра. Кроме того на стадиях 4—5, 7, 14—15 суток инкубации производились инъекции туши и микроорганизмов в кровяное русло. Техника опытов описана в работах Дондуа.

Основные результаты этих исследований таковы. Уже на второй, третий и четвертый дни эмбрионального развития удалось обнаружить интенсивные фагоцитарные реакции мезенхимными клетками, первичными лимфоцитами и эндотелиальными клетками сосудов печени, желточного мешка, почек, сердца. Обнаружено явление, названное «групповым фагоцитозом», в случае фагоцитоза крупных инородных частиц, с которыми фигурально выражаясь, не «справляется» одна клетка — фагоцит. Особый интерес приобретает кажущаяся нам совершенно правильной трактовка А. К. Дондуа процессов воспаления на различных этапах эмбрионального развития. Как-то принято считать, что «типичное» воспаление может иметь место в тканях взрослых организмов и должно обязательно представлять очень сложный комплекс разнообразных явлений, связанных с наличием сосудов и нервной системы. Результаты многочисленных исследований возможности воспалительных процессов у эмбрионов патофизиологи обычно трактуют, как «нетипичное воспаление».

Встает очень важный принципиальный вопрос. Если воспаление взрослых млекопитающих считать каким то «эталонном», а все остальное определять как «не типическое», то этим под сомнение ставится как раз самое ценное, что дал Мечников в своих сравнительных исследованиях воспаления в эволюционном разрезе. Можно ли при таких взглядах говорить о воспалении, скажем, у дафний?

В задачу иммуно-эмбриологических исследований должно входить изучение своеобразия воспаления на разных стадиях развития. Это, несомненно, со временем позволит более глубоко понять и процессы воспаления в тканях взрослого организма. Дондуа показывает, как возникают явления воспаления; он обнаружил образование мезенхиматозной капсулы, изолирующей инородное тело от тканей зародыша. Это явление, в котором участвуют комплексы клеток, имеющее основу в фагоцитарных свойствах клеток, несомненно может быть названо воспалительной реакцией. Это — прообраз будущих процессов воспаления, все более усложняющихся по ходу эмбрионального развития по мере того, как происходит дифференциация клеток, тканей и развитие органов.

На 6—8-ые сутки обнаруживается и сосудистая реакция с выселением лейкоцитов. Любопытно, что формирующаяся мезенхиматозная капсула постепенно дегенерирует и образуется вторичная — фибробластическая капсула. По мере дальнейшей дифференциации клеточных элементов и появления все более специализированных форм, приобретает все новое и новое содержание явление воспаления.

Дондуа доказал, что «защитный фагоцитоз» возникает на базе «физиологического фагоцитоза».

В настоящее время проводятся аналогичные исследования на млекопитающих и проблема начинает разрабатываться в плане сравнительной эмбриологии. В этом мы видим дальнейшее развитие подходов И. И. Мечникова к изучению явлений воспаления.

2. Иммунологическое значение оболочек яиц животных

В научно-лабораторном обиходе кажется само собой разумеющимся защитное значение оболочек яиц животных. Однако, большинство исследователей склонно рассматривать оболочки яиц лишь как механические барьеры, препятствующие проникновению бактерий, грибов, простейших. В связи с проблемой иммунитета зародышей в нашей лаборатории уделяется большое внимание оболочкам яиц.

Особенно обширные исследования проводятся Коротковой (1952, 1953, 1956) на яйцах птиц. Ею, Гирфановой (1949) и другими обнаружен ряд интересных явлений.

1. Подтверждены (и значительно расширены) данные других авторов о бактерицидных свойствах белковой оболочки яйца курицы и яиц других птиц.

2. Доказаны энергичные протистоцидные и фунгицидные свойства белковой оболочки. Некоторые микроорганизмы практически моментально погибают при контакте с «белком» (например, *Sarcina lutea*).

3. Антибиотические свойства натурального белка далеко не совпадают со свойствами «лизоцима», различным способом получаемого из белка: различен спектр антимикробного действия, мощность антибиотических свойств, различна динамика изменений антимикробных свойств «лизоцима» и «белка» в ходе инкубации и т. д.

Короткова и Токин считают, что требуется радикальный пересмотр понятия «лизоцим».

4. Изучено изменение протистоцидных, фунгицидных и бактерицидных свойств белка в ходе эмбрионального развития. Остановимся на бактерицидных свойствах. Изучено действие белка на *Bac. subtilis*, *Bac. megatherium*, *Bac. mesentericus*, *B. prodigiosum*, *B. fluorescens*, *Micrococcus lysodeikticus* и *Sarcina lutea*.

Оказалось, антибиотические свойства по ходу развития меняются по разному в зависимости от объекта. Так, в отношении *Sarcina lutea*, *Bac. mesentericus* и *Bac. subtilis* активность белка сохраняется относительно постоянной в течение первых семи дней развития зародыша, а активность белка в отношении *B. prodigiosum*, *B. fluorescens* и *Bac. megatherium* постепенно снижается и сходит на нет к 6—7 дням инкубации. Эти и другие данные убеждают Короткову в невозможности сведения антибиотических свойств белковой оболочки к какому-либо одному веществу или агенту, например, к «лизоциму».

5. Короткова изучила динамику бактерицидных и фунгицидных свойств амниотической жидкости куриного зародыша. В недавнее время Гашковой и Покорной (1955), Рагозиной и другими установлен очень интересный для эмбриологии факт: с 12 дня инкубации белок начинает поступать по серозно-амниотическому ходу, в связи с чем резко меняются физико-химические свойства амниотической жидкости. На поздних стадиях развития белок заглатывается куриным зародышем. В исследованиях Коротковой оправдалось ее предположение о том, что (в соответствии с обнаруженными Гашковой, Рагозиной и другими фактами) антибиотические свойства амниотической жидкости к 12—13 дням инкубации должны усиливаться. Действительно, *Micrococcus lysodeikticus*, *Sarcina lutea*, *Bac. mesentericus*, *Act. albus* и *Act. griseus* погибают в амниотической жидкости 14—16 дней инкубации во много раз быстрее, чем в амниотической жидкости 8 и 11 дней развития зародыша. Выходит, что белок сохраняет свои антибиотические свойства и тогда, когда он заглатывается куриным зародышем и, по мнению Коротковой, является фактором пассивной иммунизации.

6. По данным Коротковой, белок свежего неинкубированного яйца сильно тормозит развитие спор *Aspergillus niger* и *Penicillium glaucum*, но не убивает их. Подкорлуповая оболочка, наоборот, не обладает фунгистатическим действием. Как выяснено Коротковой и Князевой, *A. niger* выделяет вещества, токсичные для куриного зародыша. Проведены с положительным результатом разведывательные опыты на белковой оболочке яиц и других птиц. В интересах углубления проблемы иммунитета зародышей и следуя заветам И. И. Мечникова, изучение иммунологического и формообразовательного значения оболочек яиц необходимо все более переводить на рельсы сравнительной эмбриологии.

3. Антибиотические свойства яиц млекопитающих

Токин и Филатова (1953 б, в, г) обнаружили антимикробные свойства яиц млекопитающих на всех стадиях развития до их имплантации в стенку матки. Опытами на 85 зародышах кролика доказано, что жидкость полости бластоцисты кролика обладает выраженными бактерицидными свойствами. Ставились опыты *in vitro* (ширицем отсасывалась жидкость полости бластоцисты и исследовались ее бактерицидные свойства) и *in vivo*: на 7—8 день после *coitus*, шприцем вводилось в полость бластоцисты 0,05 мл бактериальной эмульсии и делались затем высевы на питательную среду.

Токин и Филатова (1953а) убедились в том, что амниотическая и аллантоидная жидкости морских свинок и кроличьих обладают ясно выраженными бактерицидными свойствами.

4. Формообразовательные процессы и иммунологические реакции

Для эмбриологии особо важно исследование соотношения формообразовательных процессов и иммунологических реакций.

Уже Мечников и отчасти Ковалевский придавали большое формообразовательное значение иммунологическим реакциям. Мы не имеем возможности в этой статье подробно излагать многие их работы. Мечников показал, например, что фагоцитарные реакции играют большую роль в процессах метаморфоза амфибий. Ковалевский обнаружил значение фагоцитарных реакций в явлениях метаморфоза мух.

Если сама логика развития исследований в какой либо области знаний приводит к необходимости создания новых гипотез, то соответствующие идеи, как говорят, начинают «носиться в воздухе». Повидимому, необходимость связи между иммунологией и эмбриологией достаточно созрела, если в последние годы ряд исследователей в разных странах формулируют в том или ином виде родственные задачи. Достаточно напомнить о работах Weiss (1947), Tylor (1939, 1948), Жукова-Вережникова (1944) и Вязова (1953), об исследованиях Гашека (1955) по вопросам иммунологического сближения при вегетативной гибридизации.

Приведем иллюстрации из работ нашей лаборатории.

Токин (1955б) убедился в правоте авторов, утверждавших, что и в процессе овогенеза у гидр во временном яичнике разыгрываются фагоцитарные реакции. Одни клетки фагоцитируют другие. Есть основания считать, что формирование яйца гидры не имело бы места без фагоцитарных реакций.

Кузьмина (1955) и другие в нашей лаборатории проводят исследования о значении фагоцитарных реакций и процессов воспаления в ходе нормальной регенерации.

Зыбина в нашей лаборатории, основываясь на указанных выше работах Токина и Филатовой (1953б, в) об антибиотических свойствах яиц млекопитающих и жидкости полости бластоцисты, провела морфологические наблюдения над имплантацией бластоцист (крысы) в стенку матки. Как известно, имеется большое количество превосходных гистологических работ по этому вопросу, однако и до сих пор остается много неясного в явлениях имплантации.

Зыбина убедилась, во первых, в том, что в процессах имплантации имеют большое значение фагоцитарные реакции, а во вторых, в том, что те же антибиотические свойства яиц, которые можно рассматривать как потенциально иммунологические, совершенно необходимы для процессов формообразования: выделяющиеся зародышем антибиотические вещества, наряду с другими факторами, обеспечивают лизис эпителия и имплантацию зародыша.

5. Европейский гнилец и *B. pluton*

Приведем еще один пример научно-исследовательских поисков в новом направлении. Ветеринария и медицина не могут не интересоваться эмбриологической проблемой иммунитета зародышей. Так уже цитированная работа Коротковой представляет интерес для птицеводства.

Эмбриолог Приезжева (1955) в нашей лаборатории заинтересовалась вопросом: почему бактериальное заболевание пчелы—европейский гнилец—приурочено к определенным стадиям личиночного развития, а именно к 3-му и 4-му дням? Чем обеспечивается резистентность тканей личинок 1 и 2 дней, а также 5 и 6 дней развития?

При инъекции возбудителя болезни — *B. pluton*—в ткани двухдневных личинок происходит быстрое уничтожение бактериальных клеток. Это не наблюдается

у 3-х и 4-х дневных личинок. Доказана различная фагоцитарная активность тканей личинок разного возраста.

6. Явления совместимости и несовместимости тканей

Явления т. н. «совместимости» и «несовместимости» тканей, регистрируемые в различных опытах трансплантации, пересадки тканей и органов, совершенно закономерно связываются исследователями (например, Гашек) с иммунологическими свойствами тканей и организмов. Для объяснения этих явлений логично привлекаются понятия антиген-антитело, доказывається, что реакции *несовместимости* тканей основаны на чужеродности их в смысле иммунологическом. Наша лаборатория не занималась экспериментально этими вопросами и может лишь благожелательно завидовать очень интересным данным других авторов.

Как уже говорилось, антигенная реактивность в ходе эволюции в ярко выраженной форме появляется лишь у птиц и млекопитающих, и у этих то именно животных констатируется несовместимость тканей не только при гетеро-, но и при гомотрансплантациях. С другой стороны у животных, стоящих на более низких ступенях эволюционной лестницы (кишечнополостные, например, и даже позвоночные, например, амфибии), как известно, превосходно удаются пересадки и сращивания. Но у этих животных отсутствует или выражена лишь в ничтожной степени способность выработки антител.

И у млекопитающих и птиц на разных стадиях развития отсутствует антигенная реактивность. Этот факт заставляет предположить, что на разных стадиях развития птиц и млекопитающих нет иммунологических препятствий для срастания «чужеродных» тканей. В этой связи выдающийся интерес представляют превосходные исследования Гашека (1955), разработавшего оригинальный способ эмбрионального парабиоза у птиц: срачивается аллантохорион зародышей (у кур и фазанов на 8—12-й день инкубации, у индеек и уток на 12—15 день). Осуществлен парабиоз между курами разных пород и между разными видами птиц.

Мы можем лишь всецело присоединиться ко взглядам Гашека на вопросы иммунологического сближения. Все детали работ Гашека представляют исключительный интерес для нас, занятых проблемой иммунитета эмбрионов.

Так, доказано, что при межвидовых парабиозах частичное сближение наблюдается как против партнера, так и других индивидов того же вида. У кур, развивавшихся в эмбриональном парабиозе с индейкой, образование иммунных агглютининов после иммунизации эритроцитами индейки значительно снижается.

Биологические исследования Гашека и его коллег с использованием разнообразных, в том числе иммунологических методов, несомненно заинтересуют широкие круги биологов разных специальностей.

Этих примеров достаточно, чтобы создать некоторое представление о направлении работ в области иммунитета эмбрионов. Мы следуем заветам Мечникова. Логика исследований привела Мечникова от эмбриологии к иммунологии и медицине. По многим причинам Мечников, к сожалению, не возвратился к эмбриологии, к явлениям иммунитета у зародышей.

Мы позволим себе закончить нашу краткую статью выражением надежды что в разработке научного наследия И. И. Мечникова в вопросах иммунитета эмбрионов, необходимой в интересах эмбриологии, микробиологии, иммунологии и других специальных ветвей биологических, медицинских и ветеринарных знаний, — наше направление работы встретит не только неизбежный, сопутствующий всякой новой проблеме скептицизм, но и одобрение тех, кто

считает, что иммунология должна быть тесно связана с эмбриологией и эволюционной теорией.

Залогом успешной разработки новой проблемы является исторический метод Ильи Ильича Мечникова.

Резюме

1. На основе исторического метода И. И. Мечникова необходимо в интересах эмбриологии разрабатывать новую проблему — иммунитет зародышей. Каковы «целительные силы» эмбрионов различных животных? На каких стадиях развития животных и человека возникают фагоцитарные реакции и создается возможность явлений воспаления? На каких стадиях развития зародышей возникает антигенная реактивность? Каковы антибиотические свойства тканей зародышей?

2. Как в ходе эволюции организмов различные иммунологические свойства возникали и развивались на базе более общих функций (например, фагоцитарные реакции возникли на базе внутриклеточного пищеварения), так и в онтогенезе — возникновение и смена различных защитных свойств не могут быть явлениями, обособленными от процессов эмбрионального развития. Вопросы иммунитета эмбрионов не могут разрешаться односторонне «иммунологически», а лишь в связи с процессами формообразования.

3. Дондуа доказал, что уже на 2—3-ий день развития куриного зародыша имеют место фагоцитарные реакции. Обнаружено явление «группового фагоцитоза» крупных инородных частиц, формирование мезенхиматозной капсулы вокруг инородных тел. Дондуа дает описание последовательных морфологических картин, экспериментально вызванных явлений воспаления на разных стадиях развития зародыша. «Защитный фагоцитоз» возникает на базе «физиологического фагоцитоза».

4. Исследованиями Коротковой и другими об иммунологическом значении оболочек яиц животных выявлен ряд новых интересных фактов.

Бактерицидные, протистоцидные и фунгицидные свойства белковой оболочки куриного яйца не совпадают с таковыми свойствами «лизосоима».

В ходе развития зародыша антибиотические свойства белковой оболочки изменяются.

В полном соответствии с данными Гашковой, Покорной, Рагозиной и др., установивших, что с 12 дня инкубации белок смешивается с амниотической жидкостью и заглатывается зародышем, — Короткова обнаружила усиление к этому времени и антибиотических свойств амниотической жидкости.

5. Токин и Филатова убедились в бактерицидных свойствах яиц млекопитающих до их имплантации в стенку матки, а также в бактерицидных свойствах жидкости полости бластоцисты.

6. Зыбина на основании своих гистологических исследований утверждает, что те же антибиотические свойства яиц и бластоцисты имеют формообразовательное значение, обуславливая, наряду с другими факторами, лизис эпителия матки. Ею же изучены фагоцитарные реакции, разыгрывающиеся в ходе процессов имплантации.

7. Токин подтвердил данные прежних авторов о значении фагоцитарных реакций в процессах овогенеза у гидр.

8. Исследования Гашека и других авторов по экспериментальному парабиозу эмбрионов птиц представляют большой общеприкладной интерес и интерес в связи с проблемой иммунитета зародышей.

Л и т е р а т у р а

- А в е т и к я н, Б. Г.: Иммунологические реакции у беспозвоночных и холоднокровных позвоночных. Доктор. диссерт. Эреван 1952.
- В я з о в, О. Е.: Некоторые данные по изучению антигенных свойств эмбриональных тканей. Булл. эксп. биол. и мед. 8, 1953.
- Г а ш е к, М.: Вопросы вегетативной гибридизации и пересадки ткани у теплокровных животных. Журнал общей биологии 16, (5), 1955.
- Г а ш к о в а, В., П о к о р н а я, З.: Питание зародыша через рот. Fol. biol. (Praha) 1 : 113, 1955.
- Г и р ф а н о в а, Х. Н.: Об изменениях бактерицидных свойств натурального белка и лизоцима куриного яйца в ходе инкубации. ДАН СССР, 68, (6), 1949.
- Д о н д у а, А. К.: Фагоцитарная и воспалительная реакции на разных этапах онтогенеза. Эксперименты на курином зародыше. ДАН СССР, 104, (6), 1955.
- Ж у к о в - В е р е ж н и к о в, Н. Н.: И. И. Мечников и биологические основы иммунологии. Усп. совр. биол. 18, (1), 1944.
- З и л ь б е р, Л. А.: Основы иммунитета. Москва 1948.
- К о р о т к о в а, Г. П., П р и е з ж е в а, Л. С.: Вопросы иммунитета эмбрионов. Вестник ЛГУ, 7, 1952.
- К о р о т к о в а, Г. П.: О токсических свойствах «белка» и «лизоцима» куриного яйца. ДАН СССР, 92, (1), 1953.
- К о р о т к о в а, Г. П.: Антибиотические свойства белковой оболочки куриного зародыша как фактор иммунитета. Вестник ЛГУ 3, 1956.
- К у з ь м и н а, Г. Е.: Воспаление во взрослых сегментах, зоне роста и регенерата. ДАН СССР 100, (4), 1955.
- П р и е з ж е в а, Л. С.: Роль пчелиных маток в распространении европейского гнильца. Пчеловодство, (11), 1955.
- Т о к и н, Б. П.: Иммунитет зародышей. Ленинград 1955а.
- Т о к и н, И. Б.: Неясные вопросы овогенеза Hydra oligactis. ДАН СССР 102, (1), 1955б.
- Т о к и н, Б. П., Ф и л а т о в а, А. Г.: Новые данные для суждения о значении амниотической жидкости млекопитающих. ДАН СССР, 91, (3), 1953а.
- Т о к и н, Б. П., Ф и л а т о в а, А. Г.: О бактерицидных свойствах яиц кролика. ДАН СССР, 91, (4), 1953б.
- Т о к и н, Б. П., Ф и л а т о в а, А. Г.: О жидкости полости бластоцисты. ДАН СССР, 90, 5, 1953в.
- Т о к и н, Б. П., Ф и л а т о в а, А. Г.: Яйцо кролика и бактерии (Материалы к проблеме иммунитета эмбрионов). ДАН СССР, 90, (6), 1953г.
- Н а š e k, М., Н г а б а, Т.: The Significance of Phylogenetic Kingship in Immunological Approximation during Embryogenesis. Fol. biol. (Praha) 1 : 1, 1955.
- T y l o r, A.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 25 : 317, 1939.
- T y l o r, A.: Fertilization and Immunity. Physiol. Rev. 28 : 2, 1948.
- W e i s s, P., W a n g, H.: Growth Response of the Liver of Embryonic Chick Host to the Incorporation in the area vasculosa of Liver and Other Organ Fragments. Anat. Rec. Suppl. 79 : 62, 1941.
- W e i s s, P.: The Problem of Specificity in Growth and Development. J. Biol. Med. 19 : 9, 1947.

The Heritage of I. I. Mechnikoff and Questions of Embryonal Immunity

B. P. TOKIN

Summary

1. In the interests of embryology it is necessary, on the basis of Mechnikoff's historic method, to elaborate the new problem of embryonal immunity. What are the "healing powers" of the embryos of various animals? At what stages in the development of animals and man do phagocytic reactions develop and the possibility of inflammatory reactions arise? At what stages of embryonic development does antigenic reactivity develop? What are the antibiotic properties of embryonic tissues?

2. Just as various immunological characteristics developed during the evolution of organisms, on the basis of common functions (e. g. the development of phagocytic reactions on the basis of intracellular digestion), so also in ontogenesis the development and alternation of the various defence mechanisms cannot be isolated from the processes of embryonic development. Questions of the immunity of embryos cannot be resolved only from the aspect of immunology but must be related to the processes of the development of the organism.

3. Dondua demonstrated that phagocytic reactions appear as early as on the second and third day of development of the chick embryo. The phenomenon of "group phagocytosis" of large foreign particles by the formation of a capsule of mesenchyma round the foreign bodies was discovered. Dondua describes the progressive sequence of experimentally induced inflammatory manifestations at different stages of embryonic development. "Defence phagocytosis" develops on the basis of "physiological phagocytosis".

4. The research work carried out by Korotkova and others on the immunological significance of egg white brought to light a number of interesting new facts. The bactericidal, protistocidal and fungicide properties of egg white are not identical with these properties in "lysozyme".

During development of the embryo, the antibiotic properties of the egg white change. In complete agreement with the data of those authors, who established that on the 12th day of incubation the white became mixed with the amniotic fluid and was absorbed by the embryo, Korotkova found that by about this day there was an increase in the antibiotic properties of the amniotic fluid.

5. Tokin and Filatova tested the bactericidal properties of mammal ova up to the time of their becoming embedded in the wall of the maternal uterus and also verified the bactericidal properties of the fluid of the blastocystic cavity.

6. Zybina affirms on the basis of histological observations that the same antibiotic properties of eggs and blastocysts are of significance for the development of the organism and that, together with other factors, they are responsible for lysis of the maternal epithelium. She has also investigated phagocytic reactions which take place during the process of implantation.

7. Tokin confirmed the data of earlier authors on the significance of phagocytic reactions in ontogenic processes in Hydra.

FOLIA BIOLOGICA

Tom II. (1956) — Fasc. 5

Иммунологическое сближение у овечьей тройни, естественных эмбриональных парабионтов

Т. ГРАБА, М. ГАШЕК и Б. ЧУМЛИВСКИЙ

Биологический институт ЧСАН, экспериментальная биология и генетика, Прага,
и Исследовательский институт животноводства, Угриневесь

Поступило в редакцию 25 VI 1956

Еще до того, как было осуществлено экспериментальное иммунологическое сближение с помощью эмбрионального парабиоза и интра-эмбриональных выпрыскиваний (Гашек 1953, Billingham, Brent, Medawar 1953), было уже известно наличие естественных процессов подобной адаптации у двузиготических близнецов домашних животных, у которых в течение внутриматочного развития возникло соединение кровообращения. Наличие плацентарных сосудистых анастомозов между зародышами телят установили Keller и Tandler (1916) и Lillie (1917). Бляхер (1923) остроумно назвал это состояние естественным эмбриональным парабиозом. Owen (1945) путем серологического анализа группы крови у телят-близнецов открыл, что у двуяичных близнецов встречаются кровяные химеры антигенных типов эритроцитов обоих партнеров, возникающие путем взаимной трансплантации примордиальных кроветворных клеток через кровяное русло. Так как обычно клетки гомотрансплантатов у теплокровных разрушаются в результате иммунной трансплантационной реакции у реципиента, то в этом случае трансплантационная иммунная реакция против чужеродных, антигенно несходных клеток необходимо должна подавляться. Anderson с сотр. (1951) и Billingham с сотр. (1952) показали, что у генетически различных телят-близнецов кожный трансплантат от партнера приживается.

У овец наличие плацентарных анастомозов изучалось не так систематично, как у крупного рогатого скота. Lillie (1917) полагал, что они встречаются чрезвычайно редко. Он пришел к такому заключению, прежде всего исходя из собственных наблюдений 4 пар близнецов, но главным образом, вероятно, потому, что не было известно ни одного случая т. н. фримартинизма (freemartinismus) у овец. Rotermund (1929) нашел хориальные сосудистые анастомозы у 1 из 11 пар исследовавшихся им разнополых ягнят-близнецов. Петской (1953—1955) в последнее время основательно изучал частоту случаев сосудистых анастомозов между зародышами крупного рогатого скота, овец и коз. Он называет это явление гемохориальным типом эмбрионального парабиоза — в отличие от контактного типа, где наблюдается сращение хорионов, но не создается соустье между сосудами. Из 189 пар ягнят он нашел 8,6% случаев, где соединение кровообращения двух парабионтов было несомненным. В отличие от анастомозов у зародышей крупного рогатого скота, часто очень крупных (т. н. магистральная форма), у овец анастомозы большей частью имели вид капиллярной сети (т. н. диффузная форма). Stormont (1953) искал у овец случаи кровяной химеры, которые отвечали бы химере у телят, и нашел такой случай у 1 из 26 пар близнецов.

Табл. 1. Пересадка кожи у овечьих близнецов-двойни

№ животного	Возраст и вес в момент операции	Продолжительность выживания гомотрансплантата в днях		Близнецы были в оболочке	Примечание
		от матки	от партнера		
23 ♂ 23 ♀	30 6,5 6,8	> 10 < 18 < 10	> 10 < 18 < 10	общей	
36 ♂ 36 ♀	30 7,4 8,0	> 10 < 18 < 10	> 10 < 18 < 10	общей	
11 ♂ 11 ♀	45 8,2 8,5	< 8 < 8	> 8 < 17 < 17	отдельной	
101 ♂ A 101 ♂ B	58 13,5 13,9	< 8 < 8	> 8 < 17 < 17	отдельной	автотрансплантат не прижился автотрансплантат не прижился
45 ♀ 045 ♀	44 10,4 10,6	> 9 < 18 < 18	> 9 < 18 < 18	общей	автотрансплантат не прижился
69 ♂	19 6,5	> 9 < 18	> 9 < 18	отдельной	ягненок 69 ♀ погиб на 9-ый день после операции
77 ♀ 077 ♀	23 6,2	> 9 < 18 < 9	> 9 < 18 < 18	общей	
74 ♀ 074 ♀	25 8,6	> 9 < 18 < 9	9 < 9 18	общей	
71 ♂ 71 ♀	27 9,0 8,0	< 9 < 9	> 9 < 9 < 18		

Lampkin (1953) производил взаимную пересадку кожи между партнерами из 2 пар ягнят-близнецов, однако все трансплантаты погибали в течение 7—14 дней. Мы в своей работе исследовали с помощью кожных трансплантатов частоту случаев иммунологического сближения на более многочисленном материале (9 пар ягнят-близнецов и одна тройня).

Методика

Кожу для пересадки мы брали из уха подопытного животного, во-первых, по техническим причинам: кожа здесь тоньше, чем на других частях тела, — а во-вторых, потому, что при различных типах шерсти удобнее проследить судьбу трансплантата. Выбриту ю кожу мы опрыскивали 1% раствором прокаина, потом скальпелем срезали тонкую полоску кожи и из нее ножницами вырезали отдельные трансплантаты размерами приблизительно в 0,5 : 1,0 см. Мы пересаживали трансплантаты на спинки (по сторонам позвоночника и несколько ниже лопаток). Для каждого трансплантата приготавлилось ложе, приблизительно отвечающее ему по размерам. Срезывая кожу для приготовления ложа, мы пользовались теми же методами, как и приготавливая трансплантаты из кожи уха. Каждому животному пересаживалось 3 трансплантата: собственный, от матери и от его близнеца; у тройни делались 4 пересадки: собственной кожи, от матери и от остальных двух партнеров.

Плаценты всех близнецов фиксировались в формоле. Если бывало найдено сращение хорионов, место сращения проявлялось путем проводки через спирт в бензол.

Результаты

Ни у одного из 9 пар близнецов мы не наблюдали иммунологического сближения по отношению к коже партнера. 5 пар близнецов из этих 9 было разнополых, 4 — одинакового пола. Гомотрансплантаты как от матки, так и от второго из близнецов во всех случаях выживали меньше 18 дней. Из контрольных автотрансплантатов 3 не принялись. У 3 пар не было сращений хориона, у 6 пар наблюдались сращения, но отчетливо заметные соустья сосудов в них найдены не были.

У исследовавшейся нами тройни все 3 ягненка находились в общей оболочке. В сращениях хорионов двух из них были отчетливо заметны сосудистые анастомозы, так что здесь имелся гемохориальный тип эмбрионального парабриоза. В переходной области к хорион у третьего ягненка соустья сосудов найдены не были, так что здесь был представлен контактный тип эмбрионального парабриоза. В тройне было 2 овечки и один барашек. У одной из овечек наблюдалось взаимное иммунологическое сближение с барашком: кожные гомотрансплантаты от сближенного партнера сохраняются у них в хорошем состоянии до дня написания настоящей статьи, т. е. в течение 110 дней. Все остальные гомотрансплантаты — как у обоих сближенных животных, так и у третьего из близнецов — подверглись деструкции не позже 18-го дня, как у остальных подопытных

Табл. 2. Пересадка кожи у тройни

№ животного	Возраст и вес во время операции		Выживание трансплантатов			
			от матки	от 06 ♀	от 6 ♀	от 6 ♂
06 ♀	37	6,7	—	+	—	—
6 ♀		8,5	—	—	+	+
6 ♂		7,6	—	—	+	+

+ трансплантат жил во время написания статьи.

— трансплантат разрушается не позднее 18-го дня.

° трансплантат на 18-й день в сравнительно хорошем состоянии. На 27-й день рубец.

животных. Только у барашка из тройни гомотрансплантат от матки на 18-ый день был еще в сравнительно хорошем состоянии, но на 27-й день от него оставался уже только рубец. Автотрансплантаты прижили у всех троих ягнят из тройни.

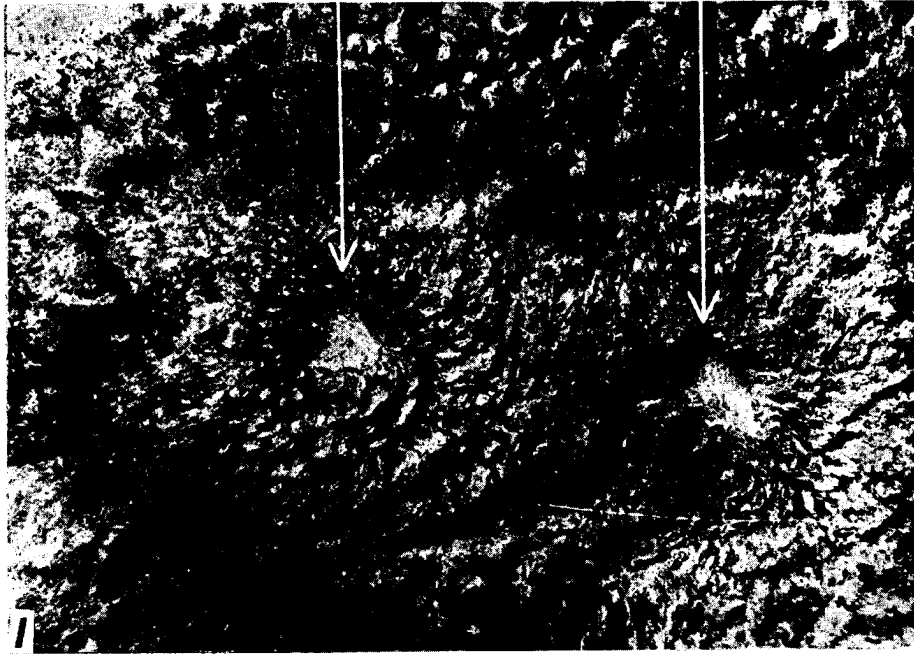


Рис. 1. Приживление авто- и гомотрансплантатов у одного из ягнят тройни.

Дискуссия

Anderson с сотр. (1951) пытались использовать пересадку кожи для диагностики однояичности или двуяичности у близнецов рогатого скота, но ввиду значительной частоты случаев иммунологического сближения между двуяичными близнецами это оказалось невозможным. Lampkin (1953) на основе своих данных предполагал, что этот критерий можно будет использовать у ягнят-близнецов. Lampkin осуществил взаимную гомотрансплантацию кожи только у двух пар ягнят-близнецов. У двуяичных телят-близнецов наблюдается устойчивое приживление кожного трансплантата от партнера приблизительно в 90% всех случаев (Billingham с сотр. 1952). Так как Lampkin не наблюдал устойчивого приживления трансплантата от партнера ни у одного из своих ягнят-близнецов, то ему при сравнении с условиями у крупного рогатого скота казалось, что его материала достаточно для заключения, что иммунологическое сближение у овечьих близнецов, вероятно, не существует. Действительно, у овец плацентарные анастомозы встречаются гораздо реже, чем у крупного рогатого скота. При этом у крупного рогатого скота преобладают случаи беременности одним плодом, а если уж бывает двойня, то в 85% случаев (Петской 1955а) здесь создается взаимная гемохориальная связь. Напротив, у овец многоплодие встречается часто, а гемохориальное соединение между зародышами — только в 8,6% случаев. Шмидт (1955) отмечает, что у жвачных одноплодие не

сопровождается приспособлением, которое предшествует возникновению сосудистых анастомозов; и напротив, сравнительно высокое многоплодие уже связано с этим явлением приспособления. Исходя из исследований хориона,

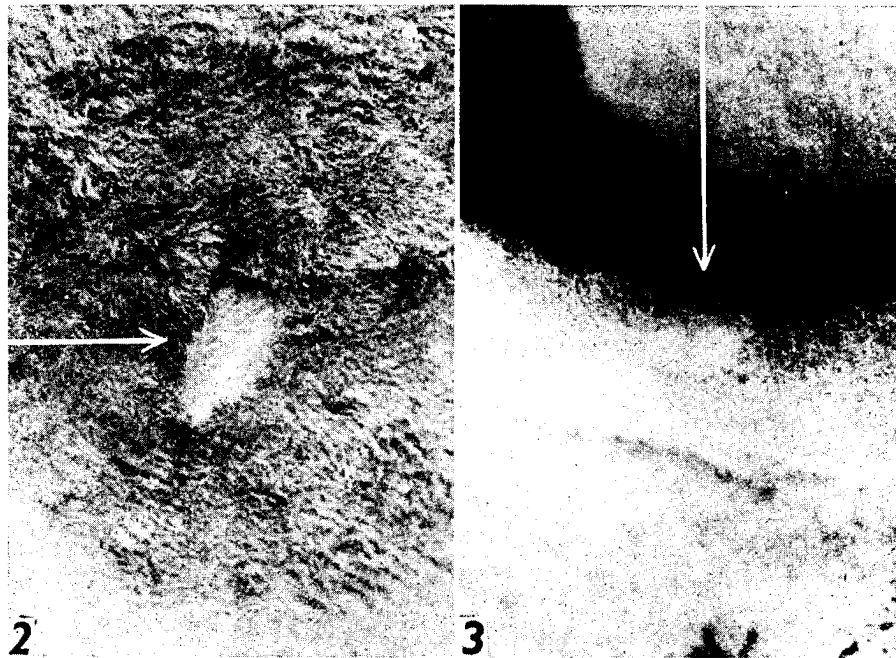


Рис. 2, 3. Структура принявшегося кожного гомотрансплантата с ушной раковины in situ (2) и с приподнятой кожной складкой (3).

можно поэтому предположить, что случаи иммунологического сближения между двумя двуяичными зародышами у овцы встречаются сравнительно редко. Это подтверждается уж и наличием кровяной химеры, которую нашли Stormont с сотр. (1953) у 1 из 26 изучавшихся ими пар ягнят-близнецов. Среди своего материала мы нашли случай сближения у ягнят от одного многоплодного помета. Мы исследовали в общем 10 случаев многоплодия овцы. Ввиду того, что найденные нами сближенные особи были разного пола и что в других случаях мы не наблюдали выживания кожного гомотрансплантата от второго из партнеров-близнецов, мы можем сделать предположение, что в этой группе не было однояичных близнецов. Открытие Stormont-а и наш материал показывают, что частота случаев иммунологического сближения у овец приблизительно отвечает частоте случаев сосудистых анастомозов между хорионами овечьих близнецов, т. е. лежит приблизительно в пределах от 5 до 10%. Поэтому у овец невозможно пользоваться пересадкой кожи для распознавания однояичных и двуяичных близнецов.

У человека также была найдена кровяная химера (Dunslord с сотр. 1953), но здесь она, как кажется является еще большей редкостью, чем у овец. Однако что касается частоты случаев иммунологического сближения у двуяичных близнецов человека, то из открытия Dunslord-а невозможно делать заключения. Например, у куриных эмбриональных парабионтов не должна обязательно существовать доказуемая химера крови, и тем не менее может наблюдаться

иммунологическое сближение между партнерами (Гашек, Граба 1955). Данные относительно иммунологического сближения у человека можно поэтому получить только с помощью пересадки кожи. Но у человеческих близнецов этот опыт не производился в таких размерах, чтобы можно было делать какие-нибудь окончательные выводы (Rogers, Allen 1955). Этому вопросу следовало бы посвящать больше внимания, так как вполне возможно, что у близнецов человека можно пользоваться пересадкой кожи для распознавания одно- или двуяичности.

Другой вопрос, на который следует обратить внимание, это — в какой степени в процессе развития парабиотических зародышей осуществляется расшатывание наследственности, ведущее к усилению изменчивости. Петской (1955а, б) показывает, что у крупного рогатого скота повышенная изменчивость проявляется, — наряду с появлением некоторых нежелательных качеств (уродства, бесплодие), — и случаями повышения производительности не только у самих парабионтов, но и у их потомков. Петской установил, что парабионты отличаются повышенной скоростью роста в сравнении с телятами-неблизнецами. Это открытие отвечает данным исследований эмбриональных парабионтов у птиц (Гашек 1953, 1955). Что касается влияния парабиоза на образование пола парабионтов крупного рогатого скота, то, как кажется, естественный эмбриональный парабиоз между зародышами разного пола обычно приводит к фримартинизму у самки. Stormont нашел химеру у близнецов разного пола. Овечка из этой пары оказалась бесплодной. Вскрытие показало, что причиной здесь является фримартинизм. Stormont высчитал, что частота случаев бесплодных овец приблизительно отвечает предполагаемому количеству овец-фримартинов, происходящих их разнополовых пар близнецов, у которых возникли сосудистые анастомозы. Однако у куриных эмбриональных парабионтов мы не встречали ни одного случая бесплодия. И женщина, у которой была найдена химера крови, не была бесплодной, хотя второй из близнецов был мальчик.

Резюме

Мы исследовали 9 пар овечьих близнецов и одну тройню. Состояние взаимного сближения по отношению к каждому трансплантату партнера мы нашли у двух разнополовых ягнят из тройни. Состояния сближения по отношению к каждому трансплантату третьего ягненка не наблюдалось. У третьего ягненка из тройни и у всех 9 пар близнецов трансплантат от партнера разрушался через такой же период времени, как и трансплантат от матери. На хорионах 6 пар близнецов и у тройни находились сращения, но только между хорионами двух ягнят из тройни образовались отчетливо заметные соустья сосудов.

Л и т е р а т у р а

- Б л я х е р, Л. Я.: Парабиоз. Большая медицинская энциклопедия 23, 1923.
Г а ш е к, М.: Вегетативная гибридизация животных путем соединения кровообращения в течение эмбрионального развития. Чсл. Биология 2 : 267, 1953.
Г а ш е к, М.: Вопросы вегетативной гибридизации и пересадки ткани у теплокровных животных. Журн. общ. биол. 16 : 405, 1955.
П е т с к о й, П. Г.: Понятие и типы эмбрионального парабиоза. ДАН СССР 89 : 1123, 1953а.
П е т с к о й, П. Г.: Условия внутриутробного развития *Bos taurus*, вызывающие явление фримартинизма. ДАН СССР 90 : 693, 1953б.
П е т с к о й, П. Г.: Эмбриональные парабиозы у коз и овец. Труды Киров. с.-х. инст. 9, (21), 1953в.
П е т с к о й, П. Г.: Эмбриональные парабиозы и многоплодие сельскохозяйственных животных. Тр. инст. морф. жив. им. А. Н. Северцева 14 : 44, 1955а.

- Петской, П. Г.: Взаимоотношения плодов при многоплодной беременности и значение этих взаимоотношений в изменении морфологических свойств организма. Тезисы докладов совещания эмбриологов в Ленинграде, 1955б.
- Шмидт, Г. А.: О времени и способе образования эмбриональных парабリオзов у коровы и овцы. Тр. Инст. морф. жив. им. А. Н. Северцова 14 : 207, 1955.
- Anderson, D., Billingham, R. E., Lampkin, G. H., Medawar, P. B.: Heredity 5 : 379, 1951.
- Billingham, R. E., Lampkin, G. H., Medawar, P. B., Williams, H.: Tolerance to Homografts, Twin Diagnosis and the Free-martin Condition in Cattle, Heredity 6 : 201, 1952.
- Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B.: Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. Nature 172 : 602, 1953.
- Dunsford, I., Bowley, C. C., Hutchinson, A. M., Thompson, J. S., Sanger, R., Race, P. R.: A Human Blood-group Chimera. Brit. Med. J. 11 : 81, 1953.
- Hašek, M.: Vegetativní hybridizace živočichů spojením krevních oběhů v embryonálním vývoji. Čs. biologie 2 : 265, 1953.
- Hašek, M., Hraha, T.: Immunological Effects of Experimental Embryonal Parabiosis. Nature 175 : 763, 1955.
- Keller, K., Tandler, I.: Über das Verhalten der Eihäute bei der Zwillingsträchtigkeit des Rindes. Wien tierärztl. Monatschr. 3, 1916.
- Lampkin, G. H.: Intolerance of Dizygotic Twin Lambs to Skin Homografts. Nature 171 : 975, 1953.
- Lillie, F.: The Free-martin: A Study of the Action of Sex Hormones in the Foetal Life of Cattle. J. Exp. Zool. 23, 1917.
- Owen, R. D.: Immunogenetic Consequences of Vascular Anastomosis Between Bovine Twins. Science 102 : 400, 1945.
- Rotermund, H.: Tierärztl. Hochsch. Hannover, 1929 (Cit. Stormont.)
- Rogers, B. O., Allen, G.: Intolerance of Dizygotic Human Twins to Reciprocal Skin Homografts. Science 122 : 158, 1955.
- Stormont, C., Weir, W. C., Lane, L. L.: Erythrocyte Mosaicism in a Pair of Sheep Twins. Science 118 : 695, 1953.

Immunological Approximation of Sheep Triplets, Natural Embryonic Parabionts

T. HRABA, M. HAŠEK and B. ČUMLIVSKÝ

Summary

Prior to the attainment of experimental immunological approximation by embryonic parabiosis (Hašek 1953) and by intra-embryonal injection (Billingham, Brent, Medawar 1953), the natural occurrence of this process of adaptation in cattle dizygotic twins, in which blood-circulation had become associated during intrauterine development (Owen 1945), was already known. In sheep twins, on the hand, chorial anastomoses are relatively rare. They were found by Petskoj in 8.6% of cases. As compared with the anastomoses in cattle embryos, where they are often of a considerable size (magistral form), the anastomoses in sheep have the appearance of a capillary network (i. e. diffuse form). Stormont (1953) while attempting to determine whether blood chimerae analogous to the chimera in the calf, occur in sheep, found this to be the case in one pair out of 26 twins. Lampkin (1953) transplanted skin grafts between four sheep twins, but all however, were, destroyed during 7—14 days. In this investigation the occurrence of immunological approximation was determined on more numerous material using skin grafts.

In none of the nine pairs of sheep twins was immunological approximation of one twin found to the skin of the other. The survival of skin homotransplants from

the mother as well as from the twin was in all cases shorter than 18 days. Three of the control autotransplants did not heal. The choria of three pairs were independent of each other, in six pairs the choria were grown together, without, however, any apparent blood-vessel anastomosis being found.

In the case of the triplets observed, all three lambs were inside common membranes. There was an evident blood-vessel anastomosis in the connected choria of two of the lambs. Two of the lambs are of female sex, the third is male. Mutual immunological approximation was found between one of the female lambs and the male: skin homotransplants of the tolerant triplet survived in good condition to the time of publication i.e. 110 days. All other homotransplants in the approximated animals as well as in the remaining triplet were destroyed by the 18th day as in the other experimental animals, with the exception of the approximated male-lamb. Here the skin graft from the mother was still in a relatively good condition on the 18th day, but only a scar was left of it by the 27th day. Autotransplants healed well in all the triplets.

Anderson et al. (1951) intended to use skin grafts for the diagnosis of zygosity in cattle twins. It was not, however, possible on account of frequent immunological tolerance between dizygotic twins. Lampkin (1953) assumed on the basis of his own results, that it might be possible to make use of skin grafts in the case of sheep twins. His assertion, that immunological approximation in sheep dizygotic twins is highly improbable has been shown, however, to be premature. Lampkin grafted skin in two pairs of sheep twins only. In cattle dizygotic twins permanent survival of the skin graft is present in about 90% of animals (Billingham et al. 1952). As Lampkin did not observe permanent healing of the partner's skin graft in any of the twins, it seemed to him, in comparison with cattle, that his material was sufficient to vouchsafe the conclusion that immunological approximation is probably not present in sheep twins. In our material approximation was found in animals from a single multiple litter. As the approximated individuals were of a different sex and as the survival of the skin graft from the other twin was in no other case observed, it is possible to assume that there were no mono-ovular twins in the group. The finding of Stormont as well as our data indicate that the frequency of immunological approximation in sheep corresponds approximately to the occurrence of blood-vessel anastomoses between the choria of sheep twins, i. e. 5—10%. It is not, therefore, possible to make use of skin grafting for the determination of mono and biovular twins in sheep.

The blood chimera has also been found in man (Dunsford et al. 1954), but it seems that it is still more rare than in sheep. As far as the frequency of immunological approximation in human biovular twins is concerned, it is not possible to draw conclusions from Dunsford's data. In chicken embryonal parabionts, for example, a blood chimera need not exist even when immunological tolerance between partners is present (Hašek, Hrabá 1955). Information about immunological tolerance in man may be gained only from skin grafts. These have not been carried out, however, on human twins in a sufficient number of cases to enable definite conclusions to be drawn (Rogers, Allen 1955). Greater attention should be paid to this question, as it is possible, that in human twins skin grafts might be utilised for the diagnosis of zygosity.

F O L I A B I O L O G I C A

Tom. II. (1956) — Fasc. 5.

К вопросу механизма деструкции гомотрансплантатов

I. Сравнительное гистологическое изучение авто-, гомо- и гетеротрансплантатов

И. ХУТНАЯ

Биологический институт ЧСАН, экспериментальная биология и генетика, Прага

Поступило в редакцию 15 VI 1956

Как теперь уже хорошо известно, деструкция гомотрансплантатов наступает в результате иммунизации реципиентов трансплантатами (Соколов 1923, 1924, Medawar 1943, 1945) и в самом широком понимании представляет, таким образом, один из типов защитных реакций организма, — в этом случае имеющих целью удалить чужеродные ткани. Как показали классические работы Мечникова, первоначальной защитной реакцией, — механизм которой на высших ступенях развития животных неустанно усложняется, — является клеточный фагоцитоз, захватывание и обезвреживание чужеродных тел.

При том типе реакции иммунитета, который осуществляется при гомотрансплантатах, не было доказано наличие циркулирующих в крови антител и не удавалось осуществить пассивную передачу иммунитета с сывороткой. Однако удалось устранить реакцию трансплантационного иммунитета путем иммунологического сближения (Гашек 1953, 1954, Billingham, Brent, Medawar 1953, 1955) и создать пассивный иммунитет путем пересадки лимфатического узла (Mitchison 1954). Тем не менее подробности механизма деструкции гомотрансплантатов до настоящего времени не выяснены.

В работах по микроскопическому изучению деструкции гомотрансплантатов описывается участие в ней локальной реакции, характеризующейся клеточной инфильтрацией и нарушением кровоснабжения трансплантата (Loeb 1930, Medawar 1945, 1953, Dempster 1951, Darcy 1952, Conway с сотр. 1952, 1953a, 1953b, Scotthorne 1953a, 1953b, Monroe 1953, Billingham с сотр. 1954, 1955, Woodruff 1955). Что касается клеточной инфильтрации, внимание исследователей сосредотачивается на вопросе роли лимфоцитов и плазматических клеток, присутствие которых при разрушении гомотрансплантатов считается характерным. Одним из очень вероятных объяснений их роли является гипотеза, что посредством этих клеток, специфически видоизмененных под действием антигенов из клеток трансплантата, антитела приводятся в соприкосновение с пересаженной тканью.

Medawar-у (1948) не удалось доказать наличия цитотоксического действия лимфоцитов на гомологичные клетки эпидермы в тканевых культурах из тканей иммунизированных животных. Medawar констатирует далее, что и интенсивность воспалительной реакции, и клеточная инфильтрация бывает неодинакова у различных животных. Интенсивная круглоклеточная инфильтрация, сопровождающая разрушение гомотрансплантатов у кроликов, по его мнению, может быть серологической особенностью этого вида (Medawar 1953). Исследования гомотрансплантатов с помощью техники диффузионных камер (Algire 1943)

показали, что мышьяная гомологичная ткань выживает, если в камеру не могут проникать клетки хозяина (Algite с сотр. 1954, Prehn с сотр. 1954). Это условие соблюдается так, что стенки камеры образует фильтр с порами определенных размеров, делающий возможным диффузионное питание клеток в камерах и в то же время отделяющий их от клеток и тканей хозяина. При последних исследованиях гомотрансплантатов с помощью этой техники (Weaver с сотр. 1955), — когда решался вопрос, потому-ли клетки в диффузионной камере выживают, что фильтр представляет собой барьер для антител, или же потому, что фильтр препятствует соприкосновению между клетками культуры и клетками хозяина, — эти авторы пришли к выводу, что «иммунизированные» клетки, вызывающие смерть клеток в диффузионной камере, и в то же время погибающие сами, — это лимфоциты.

В настоящей работе, являющейся нашим первым вкладом в дело изучения механизмов разрушения гомотрансплантатов, мы приступили к решению этого вопроса на основе сравнительного гистологического изучения авто-, гомо- и гетеротрансплантатов у крыс, мышей и цыплят, а в особенности характера клеточной инфильтрации при отпадении гомо- и гетеротрансплантатов.

Материал и методы

Для опытов мы пользовались мышами, крысами и цыплятами. Пересадки производились в нескольких сериях. В I серии 30 крысам в возрасте 3 месяцев пересаживалась кожа 2-месячных крыс. Во II серии 20 3-месячным крысам пересаживалась кожа 18-дневных крысиных зародышей или 1-дневных крысят. В III серии 20 крысам в возрасте 3 месяцев и 6 недель делались повторные гомотрансплантации с интервалом в 6 недель после первой операции. В IV серии у 10 крысят в возрасте 6 недель производились комбинированные авто- и гомотрансплантации, в V серии — взаимные гомотрансплантации у 20 двухмесячных крыс, в VI серии — взаимные гомотрансплантации у 14 двухнедельных цыплят. В VII серии производились гетеротрансплантации, причем реципиентами здесь было 20 крыс, а донорами — 5 трехмесячных мышей.

При всех пересадках мышам и крысам применялись одни и те же приемы. За день до операции шерсть на спинке у доноров и у реципиентов осторожно сбривалась. Перед пересадкой операционное поле дезинфицировалось Рифеном и спиртом и покрывалось тонким слоем коллодия с примесью касторового масла и камфоры (Саппон, Longmire 1952). Когда он засыхал, мы вырезали для пересадки тонкими, острыми ножницами четырехугольнички (0,7 : 1 см) кожи — по всей ее толщине, вплоть до сосудистой фасции в глубине. После этого мы на раны на левой стороне спинки прикладывали автотрансплантаты, а на правой стороне — гомо- или гетеротрансплантаты таких же размеров, как и дефект в коже, слегка прижимали их ко дну раны стерильным тампоном, а потом покрывали тонким слоем коллодия. Когда он засыхал, операционное поле покрывалось пропитанной вазелином марлей, которая фиксировалась лейкопластырем и несколькими оборотами гипсовой повязки шириной в 2—3,5 см, смотря по размерам животного. При комбинированных авто- и гомотрансплантатах мы пересаживали полоски кожи в 0,4 : 1 см, помещая или автотрансплантат между 2 гомотрансплантатами, или гомотрансплантат между 2 автотрансплантатами. У цыплят мы прикрывали трансплантат только коллодием, без повязки. Первый осмотр гомотрансплантатов производился через 8 дней после операции, а осмотр гетеротрансплантатов — через 6 дней после операции: после осмотра снова налагались марля с вазелином и гипсовая повязка. Для гистологической обработки трансплантаты с куском окружающей кожи вырезались у большинства подопытных животных через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 и 16 дней после операции. Материал фиксировался в 10% нейтр. формоле и заливался в парафин. Срезы окрашивались гематоксилин-эозином.

Результаты

Изучение автотрансплантатов

Серия I и II. Через 24 часа после пересадки между трансплантатом и окружающей тканью можно наблюдать небольшой экссудат и клеточную инфильтрацию, состоящую по большей части из нейтрофильных гранулоцитов, далее

из лимфоцитов, моноцитов, эритроцитов и полибластов. Реакция того же характера наблюдается и с нижней стороны автотрансплантатов. В *subcutis* в ложе трансплантата находятся гиперемические, расширенные сосуды. На третий день после пересадки реакция вокруг автотрансплантата уменьшается, среди клеток возрастает количество полибластов и фибробластов. Ткань автотрансплантата не отличается от окружающей кожи. Клетки эпидермы хорошо окрашиваются, и фибробласты, и коллагенные фибриллы дермы сохраняют нормальный вид, в трансплантате нет инфильтрации, а внизу заметны уже разрезы сосудов, свидетельствующие о начинающейся васкуляризации. На 4—5-ый день воспалительная инфильтрация по краям и с нижней стороны автотрансплантата уже совсем проходит, автотрансплантаты уже хорошо васкуляризированы, в их нижних слоях заметны в поперечном разрезе наполненные кровяными тельцами сосуды, в дерме при продольном разрезе хорошо заметны вертикально идущие сосуды, а под эпидермой — поперечные и продольные разрезы петель капилляров. В течение следующих дней морфологическая картина автотрансплантатов не меняется (рис. 1), в эпидерме можно наблюдать митотическое деление, количество сосудов в разрезах увеличивается. Приживление автотрансплантатов устойчиво.

Изучение гомотрансплантатов

Серия I и II. Макроскопическое разрушение гомотрансплантатов этих серий протекало между 9-м и 14-м днями после операции. Через 24 часа после пересадки макроскопическая картина отвечает тому, что было описано у автотрансплантатов: небольшой экссудат и клеточная инфильтрация, которая проходит на 3—4-ый день. Препараты гомотрансплантатов из кожи 18-дневных крысиных эмбрионов и 1-дневных крысят, благодаря своей тонкой структуре, особенно прозрачны. Еще через 24 часа после пересадки в этих гомотрансплантатах можно наблюдать отрезанные от кровяного русла гиперемические сосуды с расширенными просветами (рис. 2). На 4—5-ый день гомотрансплантаты васкуляризируются, о чем свидетельствуют просветы сосудов в поперечных разрезах — в нижних слоях, в продольных — в дерме и в поперечных и продольных — непосредственно под эпидермой (разрезы петель капилляров). В эпидермальных клетках можно наблюдать митоз, фибробласты; фибриллы в дерме хорошо окрашиваются. Еще на 6—7-ой день (рис. 3) гомотрансплантаты сохраняют безупречный вид. Особенно хорошо заметна прекрасная васкуляризация гомотрансплантатов эмбриональной кожи. Начиная с 9—10-го дня в гомотрансплантатах простым глазом заметны мелкие точечные кровоизлияния (петехии), а в течение следующих дней засыхание, потемнение и сморщивание их поверхности, приводящее наконец к образованию тонкого или толстого струпа, отваливающегося только в период полного восстановления эпидермы реципиента в месте пересадки (на 12—16-ый день). Микроскопически, начиная с 8—9—10-го дня, в гомотрансплантатах наблюдается небольшая, но уже хорошо заметная клеточная инфильтрация, причем большинство клеток здесь составляют лимфоциты (рис. 4), а далее моноцитоподобные клетки и клетки с большим пространством интенсивно базофильной плазмы и с круглым, несколько эксцентрически расположенным ядром, которые можно считать переходными формами лимфоцитов и плазматических клеток (Darcy 1952). Некоторые лимфоциты оказываются между клетками эпидермы, где можно наблюдать первые признаки дегенерации, выражающиеся слабой базофильностью цитоплазмы клеток эпидермы. Некоторые из этих клеток вакуолизируются. На 9—12-ый день эта круглоклеточная инфильтрация становится гораздо выразительнее и бросается в глаза (рис. 5). Одновременно наблюдается сильное расширение и даже закупорка значительно

гиперемических капилляров и мелких сосудов и небольшой отек, отесняющий друг от друга фибриллы дермы (кориума). Главным образом под эпидермой наблюдаются мелкие и обширные геморрагии (рис. 6), выглядящие макроскопически как упомянутые точечные кровоизлияния. Цитоплазма клеток эпидермы в гомотрансплантате все более утрачивает базофильность и становится эозинофильной, количество вакуолизированных клеток эпидермы увеличивается, как и количество инфильтрирующих лимфоцитов и остальных типов круглых клеток инфильтрата. Инфильтрация разрастается и захватывает всю площадь гомотрансплантата. Кровоподтеки сильно увеличиваются. Фибробласты гомотрансплантата сильно дегенерируют и окрашиваются очень слабо, от некоторых остаются только тени. Коллагенные фибриллы тоже окрашиваются очень слабо и совершенно перекрываются множеством инфильтрирующих клеток. Кроме дегенерирующих клеток гомотрансплантата наблюдаются лимфоциты и остальные типы круглоклеточной инфильтрации с пикнотическими ядрами, а далее множество более или менее интенсивно окрашивающихся базофильных шаров, возникающих в результате их распада. В этот период мы находили в инфильтрате также типичные плазматические клетки, но их количество бывало невелико. В круглоклеточном инфильтрате возрастает количество гранулоцитов, — большей частью нейтрофильных, — тучных клеток и полибластов, которые иногда фагоцитируют материал от распада клеток, но в наших препаратах фагоцитоз был выражен очень слабо. Наблюдается некроз эпидермы и остальных тканей гомотрансплантата (рис. 7). Одновременно в ложе под гомотрансплантатом наблюдается интенсивная реакция, характеризующаяся активизацией клеточных элементов рыхлой соединительной ткани, какая наблюдалась нами при заживлении раны (Хутная 1954). Здесь встречаются лимфоциты, моноциты, полибласты, переходные формы между ними, амитоз полибластов, многочисленные случаи митоза фибробластов, пролиферация фибробластов с нежными фибриллами. Итак, одновременно с тем, как разрушается и погибает ткань гомотрансплантата, со дна раны вырастает грануляционная ткань и происходит перестройка гомотрансплантата. Этот процесс продолжается 4—5 дней. Пролиферация фибробластов с фибриллами распространяется по направлению к верхней поверхности гомотрансплантата, где на границе некротической ткани наблюдается заметная гранулоцитарная инфильтрация. Так же, как и при заживлении раны, на поверхности дифференцирующейся грануляционной ткани, заменяющей гомотрансплантат, находится вначале один слой клеток эпидермы, а далее толстый слой базофильного эпителия, по своей значительной толщине выразительно отличающийся от эпидермы окружающей кожи.

Описанная нами картина в главных чертах одинакова у гомотрансплантатов эмбриональной и взрослой кожи. Разрушение гомотрансплантата наступает между 10-м и 16-м днями после операции. Однако следует различать некоторые подробности в ходе деструкции и перестройки гомотрансплантатов обоих типов. Мы видели, что в препаратах взрослой кожи круглоклеточная инфильтрация сосредоточивается в первоначальных стадиях под эпидермой, в слое дермы, вокруг волосных фолликулов и жировых железок. Струп, образованный некротизированной тканью и распадающимися клетками круглоклеточного инфильтрата, у этого типа гомотрансплантатов бывает больше; отделяются и некротическая эпидерма, и верхние слои дермы до уровня волосных фолликулов, в результате чего происходит интенсивная контракция коллагенных фибрилл реципиента, наблюдающаяся при заживлении ран, так что после полного восстановления эпидермы и слущивания струпа размеры рубца бывают гораздо меньше первоначальных размеров гомотрансплантата. У гомотрансплантатов зародышевой кожи круглоклеточная инфильтрация сосредоточивается вначале

под эпидермой, остальной гомотрансплантат, кроме эпидермы, кажется целым, отделяется только некротическая эпидерма в форме очень тонкого струпа, что при макроскопическом наблюдении легко может ускользнуть от внимания. Размеры площади, покрытой восстановленным эпителием, остаются почти такими же, как размеры трансплантата, что могло бы вести к ошибочному заключению об устойчивости приживления эмбриональных гомотрансплантатов.

Повторные гомотрансплантаты

Серия III. При вторичных пересадках трансплантаты от того же донора отнадали между 7-м и 10-м днями. Микроскопическая картина этого типа отвечает тому, что было нами описано у первичных трансплантатов, причем не было заметной разницы ни в интенсивности, ни в качественном составе круглоклеточной инфильтрации.

Комбинированные авто- и гомотрансплантаты

Серия IV. Особенно наглядно бывало сходство первичного приживления и различие дальнейших судеб (по течению 8—9-го дня) у комбинированных трансплантатов. В тесном соседстве здесь можно наблюдать одновременную васкуляризацию обоих типов, а на 8—9-ый день разницу между ними: в автотрансплантате инфильтрации нет, в его сосудах не заметно никаких изменений, тогда как сосуды гомотрансплантата сильно расширены, наблюдаются мелкие кровоизлияния и интенсивная инфильтрация гомотрансплантата вышеописанными типами клеток. Необходимо отметить, что инфильтрация и сосудистые изменения ограничиваются областью гомотрансплантата, хотя на границе обоих типов тканей наблюдаются нечеткие переходы капилляров из одного трансплантата в другой.

Гомотрансплантация у мышей

Серия V. Деструкция здесь протекала между 9-м и 14-м днем после пересадки. Результаты микроскопического исследования авто- и гомотрансплантатов у мышей отвечают картине, описанной у серий I и II. И здесь начало разрушения гомотрансплантата характеризуется сильной круглоклеточной инфильтрацией с большим количеством лимфоцитов.

Гомотрансплантация у 2-недельных цыплят

Серия VI. И здесь мы в течение приживления и деструкции гомотрансплантата находили ту же картину, какая была описана выше. В круглоклеточном инфильтрате, — и здесь весьма значительном, — мы среди лимфоцитов и клеток переходного типа чаще находили плазматические клетки. Бросались в глаза также обширные геморрагии в начале процесса деструкции.

Гетеротрансплантаты

Серия VII. При наших опытах гетеротрансплантаты слущивались на 7—10-ый день. Через 24 часа после пересадки микроскопические исследования вскрывают по краям и снизу гетеротрансплантата выразительный экссудат и заметную инфильтрацию. Большинство клеток инфильтрата составляют здесь нейтро-

фильные гранулоциты, далее здесь встречаются эозинофилы, лимфоциты, переходные формы и полибласты. Через 24 часа после пересадки инфильтрация этого типа распространялась уже по всему гетеротрансплантату, причем у некоторых опытных животных она бывала умеренной, а у других — очень сильной (рис. 8). В течение следующих дней инфильтрация гетеротрансплантата, состоящая по большей части из гранулоцитов, сохраняется; о наличии васкуляризации трансплантата на 4—5-ый день свидетельствуют разрезы сосудов на препаратах. Мы не наблюдали здесь митоза в клетках эпидермы. Дегенеративные изменения эпидермы наступали в наших опытах очень рано, наблюдались уже на 4—5-ый день и проявлялись, — так же, как и при гомотрансплантатах, — утратой базофильности цитоплазмы клетками эпидермы и их вакуолизацией. Среди клеток эпидермы мы уже на 5—6-ой день встречали лейкоциты. В инфильтрате возрастает количество лимфоцитов, клеток переходного типа и плазматических клеток. На 6—7-ой день обширные геморрагии покрывают всю площадь гетеротрансплантата (рис. 9). Многие из инфильтрирующих клеток распадаются в мелкую зернистость. Эпидерма и остальные ткани гетеротрансплантата некротизируются. В ложе под гетеротрансплантатом протекает такая же реакция рыхлой соединительной ткани, какая была описана у гомотрансплантата. На 8—10-ый день некротизированный гетеротрансплантат выталкивается в результате бурной реакции ткани реципиента, на его место со дна раны надвигается грануляционная ткань, с краев раны восстанавливается эпидерма реципиента, надвигающаяся под ткань бывшего гетеротрансплантата (рис. 10). На 9—10-ый день струп отпадает и на его месте остается рубец, покрытый высоким, значительно базофильным эпителием.

Дискуссия

Мы описали характер первичного приживания авто-, гомо- и гетеротрансплантатов и морфологическую картину деструкции гомо- и гетеротрансплантатов. У гомотрансплантатов мы при подробных микроскопических исследованиях отмечали вначале умеренную круглоклеточную инфильтрацию, представленную, главным образом, лимфоцитами и становящуюся в течение дальнейшего развития все более выразительной. У мышей, крыс и цыплят она обычно сопровождается разрушением гомотрансплантата. Одновременно с усилением круглоклеточной инфильтрации мы наблюдали в гомотрансплантатах гиперемические и даже закупоренные сосуды с мелкими или обширными точечными кровоизлияниями, морфологически характеризующие прекращение кровообращения в гомотрансплантате. Мы считаем важным появление в эпидерме дегенеративных изменений в связи с круглоклеточной инфильтрацией и распад самих клеток инфильтрата, наблюдающийся в соседстве с дегенерирующими клетками гомотрансплантата. Отсюда можно сделать вывод о специфической роли лимфоцитов в смысле гипотезы о подвозе антител этими клетками. По нашему мнению, поскольку вообще допустимо предполагать наличие специфической роли инфильтрирующих клеток, следует говорить о клеточной инфильтрации *in toto*, имея в виду кроме лимфоцитов, наиболее многочисленных в этих случаях, также клетки переходного типа и плазматические клетки, представляющие, вероятно, функциональные состояния одного и того же типа клеток. Darcy (1952) исследовал круглоклеточную инфильтрацию в гомотрансплантатах у кроликов и назвал переходные типы клеток «незрелыми» плазматическими клетками, причем большую часть клеток круглоклеточного инфильтрата с морфологической точки зрения можно было производить от лимфоцитов, а меньшую часть — от ретикулярных клеток. Итак, можно сделать вывод, что плазматические клетки в гомо-

трансплантатах бывают преимущественно лимфоцитарного происхождения. Деятельность гранулоцитарных лейкоцитов, которые — по нашим наблюдениям — принимают участие в реакции только позднее, направлена здесь, главным образом, на отделение некротической, разрушенной предшествовавшими типами клеток ткани. Несмотря на то, что в препаратах Darcy (1952) в гомотрансплантатах у кроликов всегда наблюдалась лейкоцитарная инфильтрация, этот автор выступает против мнения о специфической роли лимфоцитов, точнее, — их решающей роли в процессе деструкции гомотрансплантатов. По его мнению, лимфоциты своими ферментами могут способствовать разрушению протеинов трансплантата. Исходя из работ Trowell-a (1952) о чувствительности лимфоцитов к недостатку кислорода, Darcy считает наиболее простым объяснением происхождения разрушенных лимфоцитов в гомотрансплантате кислородное голодание ткани в результате прекращения в ней кровообращения. Что касается плазматических клеток, Darcy отрицает их значение для деструкции гомотрансплантатов еще решительнее, чем в случае лимфоцитов, хотя и не говорит прямо, что плазматические клетки не могут выделять в гомотрансплантат антитела: «Резорбционная теория функции плазматических клеток лучше объясняет полученные результаты, чем теория выделения антител», утверждает Darcy, ссылаясь на работы Dubois-Ferrier (1951), который подчеркивает, что главной функцией плазматических клеток является резорбция и нейтрализация чужеродных протеинов. Однако Kidd (1950) и Ellis с сотр. (1952) доказали наличие цитотоксического действия, инкубируя злокачественные клетки с клетками лимфатического узла мыши, предварительно иммунизированной той же опухолью. Лимфоциты неиммунизированных мышей не обладали этим действием. Напротив, Medawar (1948) не находил цитотоксических антител против опухолевых клеток эпидермы в лимфатических тканях иммунизированных кроликов. Billingham и Sparrow (1954) нашли, что типичная местная реакция, протекающая в дерме при разрушении гомотрансплантата, осуществляется также в дифференцирующейся грануляционной ткани реципиента, если для пересадки применяется эпидермальный гомотрансплантат, причем и здесь характерны круглоклеточная реакция и застой крови в сосудах, с поверхностными эрозиями их эндотелия. Mitchison-у (1954) удалась передача мышам пассивного иммунитета к лимфосаркоме путем пересадки лимфатических узлов, но не удавалось передача с помощью сыворотки или перетонеального экссудата. Burnet (1949) полагает, что механизм деструкции гомотрансплантатов подобен сверхчувствительности к туберкулину. По его словам, при соприкосновении трансплантата с клетками хозяина может произойти местное выделение этих фармакологически активных веществ, вызывающих некроз при вполне развернутых туберкулиновых реакциях. Billingham (1954) в своем исследовании, посвященном доказательству наличия цитологической активности в сыворотке и различных препаратах из тканей иммунных животных, присоединяется ко взгляду, что, кроме агента характера циркулирующих антител, здесь могут действовать на клетки и вещества в связанном состоянии, — быть может, сами антитела, контакт которых с антигеном вызывает выделение неспецифических активных фармакологических веществ, являющихся причиной некроза гомотрансплантата.

По мнению Eichwald-a (1953) возможно также, что для деструкции гомотрансплантата необходимо несколько типов антител, которые могут действовать различно: одни посредством воспалительной реакции или васкуляризации, другие — действуя прямо на клетки трансплантата. Что касается роли васкуляризации, опыты Medawar-a (1948) с выживанием не васкуляризованных гомотрансплантатов в передней камере глаза специфически иммунизированных кроликов говорят о большом значении этого фактора. С другой стороны Merwin и Hill

(1954) показали, что невакуляризованные гомотрансплантаты в подкожной ткани разрушаются, если они были пересажены специфически иммунизированному реципиенту. В связи с вопросом механизма деструкции гомотрансплантатов особенно интересны исследования гомотрансплантатов в диффузионных камерах. Algire (1954) и Prehn (1954) приводят, что возможно поддерживать жизнь нормальных и злокачественных гомологичных клеток с помощью адекватного питания в брюшной полости мышей, если камеры с пористой пленкой отделяют их от клеток и тканей хозяина. Было установлено, что в этих условиях гомологичные клетки могут выживать и в иммунизированном хозяине, но никогда не способны сами вызвать иммунитет (Prehn 1954). Что касается значения лимфоцитарной реакции для деструкции гомотрансплантатов, данные Weaver-a (1955) свидетельствуют в пользу этого предположения, к чему можем присоединиться и мы на основе полученных нами результатов. В работе Weaver-a снова было отмечено, что гомотрансплантаты (кружочки эпидермы) выживают в диффузионных камерах с непроницаемыми для клеток стенками даже в теле предварительно иммунизированных гомологичных хозяев. Однако гомотрансплантаты не выживают в гетероголичных хозяевах, в особенности если они были иммунизированы, что исследователи приводят в доказательство того, что камеры проницаемы для антител. Напротив, гомотрансплантаты в проницаемых для клеток камерах погибают в гомологичных хозяевах через 2 недели (а в иммунизированных — раньше 2 недель), при явлениях лимфоцитарной инвазии. Если в клетконепроницаемых диффузионных камерах культивировались изолированные по отношению к хозяину клетки эпидермы (авторы пользовались близкородственными штаммами) совместно с клетками селезенки из мыши, предварительно иммунизированной против клеток тканевой культуры, то клетки эпидермы в камере погибали в течение недели. По мнению авторов, если лимфоциты приходят в соприкосновение с клетками, против которых они были иммунизированы, то освобождаются «диффузные» вещества, и оба типа клеток погибают.

Что касается нарушения кровообращения в гомотрансплантате, которое, по Taylor-y (1955), следует считать начальным моментом деструкции гомотрансплантата, то полученные нами результаты не подтверждают предположения, что нарушение кровоснабжения могло бы служить непосредственной неспецифической причиной разрушения гомотрансплантата. Из нашего описания можно видеть, что дегенеративные изменения в эпидерме начинаются в связи с лимфоцитарной инфильтрацией или раньше, или одновременно с появлением в трансплантате точечных кровоизлияний и очень выразительно проявляются на следующий день после нарушения циркуляции. Scotthorne (1953) наблюдал дегенерацию эпидермы через 24 часа после нарушения кровообращения и справедливо рассуждает, что нет причины, почему бы гомотрансплантат и без циркуляции не мог в течение известного времени получать питание путем диффузии подобно тому, как до васкуляризации (первые 3 дня после пересадки). При своих гистохимических исследованиях Scotthorne (1953) нашел, что в дегенерирующих клетках эпидермы исчезает рибонуклеиновая кислота, но все еще присутствует гликоген.

Мнение Conway-я (1952), что сеть сосудов гомотрансплантата недостаточна, можно, исходя из наблюдений многочисленных разрезов сосудов в препаратах, также отвергнуть. Scotthorne (1953) исследовал васкуляризацию авто- и гомотрансплантатов макроскопически, при местном наполнении сосудов бромфеноловым синим, и микроскопически, на препаратах из животных, кровяное русло которых наполнялось раствором туши, и не находил разницы в быстроте и размерах васкуляризации между авто- и гомотрансплантатами у кроликов. Исследования васкуляризации гомотрансплантатов *in vivo* в прозрачных камерах

(Conway с сотр. 1951, 1952, 1953а, 1953б) нужно принимать с осторожностью, так как авторы сами признают, что уже через несколько дней помехой отделимости наблюдения в этих камерах является большое количество межклеточной жидкости (Conway 1951). В связи с этим вопросом интересны замечания Algire (1953), что трансплантаты, взятые из растущей ткани, — как опухоли или эмбриональные органы, — в процессе васкуляризации не пассивны, их сосуды разрушены не вполне, — напротив, в их эндотелии наблюдается пролиферация, и возникает связь с сосудами хозяина, так что ревакуляризация небольших имплантатов возможна в течение 24 часов.

Точная локализация круглоклеточного инфильтрата и прекращения кровообращения в нашей серии комбинированных авто- и гомотрансплантатов, где на стыке тканей капилляры переходили из одного трансплантата в другой, — исключает возможность наличия неспецифической реакции, сопровождающей только деструкцию тканей.

У гетеротрансплантатов реакция на чужеродную ткань проявляется и морфологически гораздо раньше, — уже через 24 часа после пересадки, — в виде более значительного экссудата и более или менее интенсивной клеточной инфильтрации, в которой первоначально преобладают гранулоциты. Дегенеративные изменения в эпидерме гомотрансплантатов появляются очень рано. В течение дальнейшего развития клеточная реакция в гомотрансплантате становится качественно более разнообразной, как было нами описано, и гомотрансплантат (судя по многочисленным разрезам сосудов и обширным геморрагиям, хорошо васкуляризованный) выталкивается в виде некротической ткани при признаках бурной реакции окружающих тканей реципиента. Так как было возможно доказать наличие преципитинов и дитоксинов против человеческой кожи у кроликов, иммунизированных взвесью этой гетерологичной ткани (Eichwald 1953), и так как, по данным Weaver-a (1955), в диффузионных камерах, непроницаемых для клеток, в теле гетерологичных реципиентов быстро наступает смерть клеток культуры, то в случаях гетеротрансплантатов можно, — помимо резкой реакции, проявившейся при наших опытах в форме быстрой клеточной инфильтрации, — предполагать и существование более значительного непосредственного действия антител на клетки гетеротрансплантата.

Резюме

1. Мы описали характер первичного приживания авто-, гомо- и гетеротрансплантатов и морфологическую картину деструкции гомо- и гетеротрансплантатов.

2. Наблюдалась характерная интенсивная круглоклеточная инфильтрация с преобладанием лимфоцитарных клеток, постоянно сопровождающая деструкцию гомотрансплантатов у мышей, крыс и цыплят.

3. При комбинированных авто- и гомотрансплантатах эта инфильтрация, а также нарушения кровообращения строго органичиваются областью гомотрансплантата.

4. В связи с круглоклеточной инфильтрацией наблюдались дегенеративные изменения в клетках эпидермы и в фибробластах гомотрансплантата — одновременно с дегенерацией и распадом инфильтрирующих клеток.

5. У гетеротрансплантатов были отмечены: быстрая реакция в форме умеренной или сильной лейкоцитарной инфильтрации уже через 24 часа после пере-

садки, быстро наступающие дегенеративные изменения эпидермы и выталкивание гетаротрансплантата в результате бурной реакции ложа в тканях реципиента.

(Табл. XXXIII, XXXIV, XXXV, XXXVI)

Л и т е р а т у р а

- Г а ш е к, М.: Парабизоз птиц во время эмбрионального развития. Чсл. Биология 2 : 29, 1953.
- Г а ш е к, М.: Проявления вегетативного сближения в адаптации высших животных на чужеродные антигены. Чсл. Биология 3 : 344, 1954.
- Л о п а ш о в, В. Г., С т р о е в а, О. Г.: Развитие иммунологических реакций и проблема несовместимости тканей при пересадках. Усп. совр. биол. 30 : 234, 1950.
- М е ч н и к о в, И. И.: Вопросы иммунитета. Москва 1951.
- С о к о л о в, Н. В.: Пересадка органов в связи с реакцией иммунитета. Казан. мед. журн. 19 : 3, 1923.
- С о к о л о в, Н. В.: Пересадка органов с точки зрения иммунологии. Труды XVI с. русс. хир. 196, 1924.
- Х у т н а я, И.: Заживление экспериментальных ран. 2. Трансформация клеток при заживлении раны. Чсл. Биология 3 : 168, 1954.
- А l g i r e, G. H.: An Adaptation of the Transparent Chamber Technique to the Mice. J. Nat. Cancer Inst. 4 : 1, 1943.
- А l g i r e, G. H.: Tissue Transplantation Conference. J. Nat. Cancer Inst. 14 : 687, 1953.
- А l g i r e, G. H., W e a v e r, J. M., P r e h n, R. T.: Growth of Cells in vivo in Diffusion Chambers. I. Survival of Homografts in Immunised Mice. J. Nat. Cancer Inst. 15 : 493, 1954.
- В i l l i n g h a m, R. E., B r e n t, L., M e d a w a r, P. B.: Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. Nature 172 : 603, 1953.
- В i l l i n g h a m, R. E., S p a r r o w, E. M.: Studies in the Nature of Immunity to Homologous Grafted Skin, with Special Reference to the Use of Pure Epidermal Graft. Nat. J. Exp. Biol. 31 : 16, 1954.
- В i l l i n g h a m, R. E., S p a r r o w, E. M.: The Effect of Prior intravenous Injection of Dissociated Epidermal Cells and Blood on the Survival of Skin Homografts in Rabbits. J. Embr. Exp. Morph. 3 : 265, 1955.
- В u r n e t, F. M., F e n n e r, F.: The Production of Antibodies. Melbourne 1949.
- С a n n o n, J., L o n g m i r e, W.: Studies of Successful Skin Homografts in the Chicken. Ann. Surg. 135 : 60, 1952.
- С o n w a y, H., J o s l i n, D., S t a r k, R.: Observation on the Development of Circulation in Skin Grafts. I. Technique of Adaptation of the Transparent Chamber Technique to Study of the Circulation in Skin Graft. Plastic Rec. Surg. 8 : 194, 1951.
- С o n w a y, H., J o s l i n, D., S t a r k, R.: Observation of Circulation on Skin Grafts. III. Morphologic Changes Observed in Homologous Skin Grafts. Plastic Rec. Surg. 9 : 557, 1952.
- С o n w a y, H., S t a r k, R., J o s l i n, D.: Observation on the Development of Circulation in Skin Grafts. Plastic Rec. Surg. 11 : 74, 1953a.
- С o n w a y, H., S t a r k, R., J o s l i n, D.: Observation on the Development of Circulation on Skin Grafts. VI. Effect of Hyaluronic Acid and Homologous Skin Filtrate on Homologous Skin Grafts. Plastic Rec. Surg. 12 : 1, 1953b.
- Д а r c y, D. A.: A Study of the Plasma Cell and Lymphocyte Reaction in Rabbit Tissue Homografts. Phil. Trans. Royal. Soc., London 236 : 463, 1952.
- Д e m p s t e r, W. J.: Problems Involved in the Homotransplantation of Tissues, with Particular Reference to Skin. Brit. Med. J. 1041, 1951.
- Д u b o i s - F e r r i e r e, H.: Actualités hématologiques 1 : 43, 1951. (Cit. Darcy.)
- Е i c h w a l d, E. J.: Acquired Immunity to the Graft. J. Nat. Cancer Inst. 14 : 705, 1953.
- Е l l i s, J. T., K i d d, J. G.: Inhibition of Brown-Pearce Cancer Cells by Suspensions of Lymph Nodes and Spleen from Immune Hosts. Cancer Research 12 : 259, 1952.
- Г i b s o n, T., M e d a w a r, P. B.: The Fate of Skin Homografts in Man. J. Anat. Lond. 77 : 229, 1943.
- Н а š e k, М.: Parabiosa ptáků v embryonálním vývoji. Čs. biologie 2 : 25, 1953.
- Н а š e k, М.: Projevy vegetativního sblíživání v adaptaci vyššího živočicha na cizorodé antigeny. Čs. biologie 3 : 327, 1954.
- С h u t n á, J.: Hojení experimentálních ran. II. Transformace buněk při hojení ran. Čs. biologie 3 : 158, 1954.

- Kidd, J. G., Toolan, H. W.: The Association of Lymphocytes with Cancer Cells Undergoing Distinctive Necrobiosis in Resistant and Immune Hosts. *Am. J. Path.* 26 : 672, 1950.
- Loeb, L.: Transplantation and Individuality. *Physiol. Rev.* 10 : 547, 1930.
- Medawar, P. B.: Notes on the Problem of Skin Homografts. *Bull. War. Med.* 4 : 1, 1943.
- Medawar, P. B.: A Second Study of the Behaviour and Fate of Skin Homografts in Rabbits. *J. Anat. London* 79 : 157, 1945.
- Medawar, P. B.: Immunity to Homologous Grafted Skin. III. The Fate of Skin Homografts Transplanted to the Brain, to Subcutaneous Tissue and to the Anterior Chamber of the Eye. *Brit. J. Exp. Path.* 29 : 58, 1948a.
- Medawar, P. B.: Tests by Tissue Culture Methods on the Nature of Immunity to Transplanted Skin. *Quart. J. Micr. Sci.* 89 : 239, 1948b.
- Medawar, P. B.: Tissue Transplantation Conference. *J. Nat. Cancer Inst.* 14 : 717, 1953.
- Merwin, R. M., Hill, E. L.: The Role of Vascularisation in the Survival of Subcutaneous Homografts in Mice. *Cancer Res.* 12 : 282, 1952.
- Merwin, R. M., Hill, E. L.: Fate of Vascularised and Non Vascularised Subcutaneous Homografts in Mice. *J. Nat. Cancer Inst.* 14 : 819, 1954.
- Mitchison, N. I.: Passive Transfer of Transplantation Immunity. *Proc. Royal Soc., ser. B* 142 : 72, 1954.
- Monroe, L. W., Andersson, I., Hass, I.: A Study of the Problem of Homografting by Means of Parabiosis in Rabbits. *Plast. Rec. Surg.* 11 : 15, 1953.
- Prehn, R. T., Weaver, J. M., Algire, G. H.: The Diffusion Chamber Technique Applied to a Study of the Nature of Homograft Resistance. *J. Nat. Cancer Inst.* 15 : 509, 1954.
- Scottthorne, R. J., McGregor, V. A.: The Vascularisation of Autografts and Homografts of Rabbit Skin. *J. Anat.* 4 : 379, 1953a.
- Scottthorne, R. J.: Histochemical Studies of Autografts and Homografts of Human Skin. *J. Anat.* 87 : 22, 1953b.
- Taylor, C. V., Lehrfeld, J.: Definition of Survival Tissue of Homografts. *N. Y. Acad. Sci.* 59 : 227, 1955.
- Trowel, C. A.: The Culture of Lymph. Nodes in vitro. *Exp. Cell. Res.* 3 : 79, 1952.
- Weaver, J. W., Algire, G. H., Prehn, R. S.: The Growth of Cell in vivo in Diffusion Chambers. III. The Role of Cell in the Destruction of Homografts in Mice. *J. Nat. Cancer Inst.* 15 : 1737, 1955.
- Woodruff, M. E., Simpson, L. O.: Induction of Tolerance to Skin Homografts in Rats by Injection of Cells from the Prospective Donor after Birth. *Brit. J. Exp. Path.* 36 : 494, 1955.

On Questions of the Mechanism of Destruction of Homotransplants

Comparative histological studies of auto-, homo- and heterotransplants

J. CHUTNÁ

Summary

A histological study of auto-, homo- and heterotransplants in mice, rats and chickens was undertaken with the aim of determining the characteristics of cellular infiltration during the healing of homo- and heterotransplants. In homotransplants, first of all slight round cell infiltration represented mainly by lymphocytes was observed, which subsequently increases in intensity and becomes very marked. This round-cell infiltration regularly accompanies the destruction of homotransplants in mice, rats and chickens. Concomittantly with the development of the round-cell infiltration thrombosed blood-vessels were observed in homotransplants together with minute as well as more extensive haemorrhages. The appearance of degenerative changes in the epidermis in connection with round-cell infiltration and the disintegration of the infiltrating cells themselves may be considered as important, since from this the specific role of the round-cell infiltration and primarily that of the lymphocytes can be assumed in accordance with the hypothesis on the transport of

antibodies by these cells. Granular leucocytes, which do not participate until later, according to our observations, in local reactions during the healing of homotransplants, are concentrated primarily on desquamating necrotic tissue. In combined transplants, where skin grafts were transplanted in such a way, that the autotransplant is placed between two homotransplants or vice versa, the lymphocyte infiltration and circulatory disturbance were localised to the region of the homotransplant. In the border region capillary branches transgress from auto- to homotransplants and vice versa. The heterotransplant reaction to a foreign tissue is also morphologically expressed much sooner (already 24 hrs after transplantation) and is characterised by marked exudation and cellular infiltration with a preponderance of granulocytes which is of different intensity according to the species studied. Degenerative changes in the epidermis of heterotransplants were already observed 4—5 days after transplantation. Cellular infiltration in heterotransplants becomes qualitatively still more polymorphocellular — in addition to granulocytes there is an increase in lymphocytes and the heterotransplant which is already well vascularised on the 3rd—4th day according to observations, contains extensive haemorrhages by the 6th—8th day and as necrotic tissue it is replaced by surrounding tissue of the host in the presence of an intensive reaction. Questions of the mechanism of destruction of homo- and heterotransplants are discussed.

F O L I A B I O L O G I C A

Tom. II. (1956) — Fasc. 5

Иммунологическое сближение у крыс по отношению к мышинной опухоли Crocker-a в эмбриогенезе и постэмбриогенезе

Я. ГРОЗДАНОВИЧ

Биологический институт ЧСАН, экспериментальная биология и генетика, Прага

Поступило в редакцию 16 VI 1956

Описанные до сих пор положительные результаты иммунологического сближения у теплокровных животных были получены путем введения реципиенту специфического антигена или в течение эмбриогенеза (Гашек 1953, 1954, 1956, Billingham, Brent и Medawar 1953, Simonsen 1955, Bolag 1955, Koprowski 1955), или же в течение постэмбриогенеза (Cinader и Dubert 1955, Гашек 1955, 1956, Woodruff и Simpson 1955).

Процесс иммунологического сближения, в особенности степень сближения, имеет свою количественную сторону, которая зависит прежде всего от степени таксономического родства донора и реципиента, а также от количества вводимого антигена (Граба с сотр. 1956). Для определения глубины сближения эти авторы пользовались попеременно, главным образом, тремя способами: 1. иммунологическими тестами, 2) пересадкой кожи, 3) пересадкой опухолевой ткани. Пересадка опухолей занимает важное место среди способов проверки влияния иммунологического сближения на иммунитет по отношению к трансплантатам. Агрессивный характер роста пересаженной опухолевой ткани позволяет иногда более точную оценку количественной разницы в степени трансплантационного иммунитета в тех случаях, когда сближение не велико, т. е. главным образом, при межвидовом сближении.

Simonsen (1955) и Bolag (1955) добивались неполного сближения по отношению к гетерогенным опухолям, вводя антиген реципиентам в течение их зародышевой жизни. Однако возможность сближения с гетерогенной тканью путем введения антигена в течение постэмбриогенеза до сих пор не исследовалась. Поэтому мы попытались вызвать у крысы межвидовое иммунологическое сближение с мышинными антигенами как в эмбриогенезе, так и в постэмбриогенезе, и испытать степень этого сближения путем пересадки гетерологической (мышинной) опухоли. При этом в параллельном опыте мы сравнивали результаты гетеротрансплантации опухолевой ткани со способностью сближавшихся животных к образованию иммунных агглютининов.

Материал и методика

Материал. Для опытов мы пользовались собственными выводками белых крыс белых мышей и опухолью Crocker-a из пассажей тоже на белых мышах.

Приготовление и способ введения антигена. Мы вынимали стерильно печень, селезенку и почки белых мышей, разрезали их ножницами на маленькие кусочки, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе, взвешивали прямо в заранее взвешенной кюветке, прибавляли на 1 единицу веса ткани 2 единицы стерильного физиологического раствора и снова гомогенизировали. Гомогенизированная масса содержала группы клеток, отдельные клетки, элементы крови и клеточные фрагменты.

Способ введения взвеси зародышам. Мы производили лапаротомию по средней линии у беременных крыс весом в 190—240 г и приподымали сначала один угол матки, который клали на стерильную марлю, смоченную в теплом физиологическом растворе. Впрыскивания взвеси тканей делались тонкой иглой, которую мы вводили под острым углом под кожу по направлению от хвоста к шее зародыша. Количество впрыскиваемой взвеси колебалось от 0,01 до 0,08 мл в зависимости от возраста зародыша. После укола угол матки вкладывался снова в брюшную полость и таким же образом производились уколы в зародыши во втором углу матки. Наконец рана зашивалась послойно силоновой и шелковой нитью. Эта операция производилась за 1—4 дня до помета. У небольшой части крыс наблюдались аборт или же некоторые зародыши рождались мертвыми, — повидимому, в результате затягивавшихся родов.

Постэмбрионально мы впрыскивали взвесь новорожденным крыскам под кожу на спине в количестве 0,1 мл.

Пересадка опухоли. Мы пересаживали плоские кусочки опухоли Crocker-a из пассажей на белых мышках, размерами в 2 : 2 мм, подопытным и контрольным крысам, как только они достигали веса в 50—60 г. Через 10 дней после пересадки измерялись поперечные и продольные размеры опухоли и вычислялась ее площадь. У части животных опухоль оставлялась для наблюдения над ее регрессией.

Опыт иммунизации. У некоторых подопытных и контрольных крыс весом в 50—60 г мы вместо пересадки опухоли производили иммунизацию тремя внутрибрюшинными уколами по 0,5 мл цитратной мышинной крови, — с 2-дневными промежутками между уколами. Кровь бралась путем интракардиальных пункций. Мы определяли в сыворотке этих животных титр иммунных агглютининов против мышинных эритроцитов. (У части этих животных мы еще до иммунизации определяли присутствие естественных агглютининов против мышинных эритроцитов.)

Результаты

Результаты гетеротрансплантации опухоли крысам, сближавшимся путем интраэмбриональных или постэмбриональных уколов, приводятся на табл. 1. (Оценка сигнификантности производилась с помощью «t»-теста.) Результаты двух опытов иммунизации приводятся на табл. 2.

Дискуссия и резюме

Мы добивались у крыс иммунологического сближения по отношению к мышинным антигенам путем введения гомогенизированных мышинных тканей как

Табл. 1.

Группа животных	Количество животных	Вводимое количество в мл	Средние размеры опухоли в мм ²
A ⁺ Внутризародышевые впрыскивания	16	0,01—0,08	232,7
B ⁺⁺ Постэмбриональные впрыскивания	18	0,1	131,4
C ⁺⁺⁺ Контрольные животные	18	—	73,5

+P < 0,001

++P < 0,05 > 0,01

+S = ± 133

++S = ± 110

+++S = ± 53,8

В каждой группе приводятся результаты двух серий опытов.

Табл. 2.

Группа животных	№ животного	Титр агглютининов	
		естественных	иммунных
А Внутризародышевые впрыскивания	1	0	2
	2	0	4
	3		2
	4		64
	5	0	2
	6		2
	7		2
	8		8
	9		8
	10	0	16
В Постэмбриональные впрыскивания	1	0	4
	2	0	4
	3		8
	4		2
	5	0	16
	6		64
С Контрольные животные	1	0	64
	2	0	64
	3	0	64
	4		16
	5		64
	6		16
	7		16
	8	0	32
	9	0	32
	10		32
	11		64
	12		32
	13	0	32
	14	0	32

в зародышевый период, так и новорожденным крысятам. Иммунологическое сближение проявлялось, во-первых, в том, что мышинная опухоль Crocker-a, пересаженная сближавшимся животным, достигала более значительных размеров, чем в контрольном материале, а во-вторых, в ослаблении способности к образованию иммунных агглютининов против мышинных эритроцитов.

В отличие от результатов внутризародышевого сближения у крыс, которые приводит Bolag (1955), мы не наблюдали столь значительной разницы в росте опухоли между сближавшимися и контрольными животными.

Итак, иммунологического сближения по отношению к гетерологичным мышинным антигенам можно у крыс добиться не только в течение эмбриогенеза, но и в ранний период постэмбриогенеза. Однако в обоих случаях достигалось только неполное сближение. Это проявлялось и в том, что через 10 дней после пересадки и у сближавшихся животных наступала регрессия опухоли, и в том, что способность к образованию иммунных агглютининов оказывалась только ослабленной, но ни в одном случае не терялась.

Л и т е р а т у р а

- Г а ш е к, М.: Вегетативная гибридизация животных путем соединения кровообращения в течение эмбриального развития. Чсл. Биология 2 : 267, 1953.
- Г а ш е к, М.: Проявления вегетативного сближения в адаптации высших животных на чужеродные антигены. Чсл. Биология 3 : 344, 1954.
- B i l l i n g h a m, R. E., B r e n t, L., M e d a w a r, P. B.: Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. Nature 172 : 603, 1953.
- B o l a g, W.: Heterologe Transplantation von Tumoren bei Vorbehandlung der Empfängertiere mit Gewebe der Spendertiere während der Embryonalzeit. Experientia 11 : 227, 1955.
- C i n a d e r, B., D u b e r t, J. M.: Acquired Immune Tolerance to Human Albumin and the Response to Subsequent Injections of Diazo Human Albumin. Brit. J. Exp. Pathol. 36 : 515, 1955.
- H a š e k, M.: Vegetativní hybridizace živočichů spojením jejich krevních oběhů v embryonálním vývoji. Čs. biologie 2 : 265, 1953.
- H a š e k, M.: Projevy vegetativního sblížování v adaptaci vyššího živočicha na cizorodé antigeny. Čs. biologie 3 : 327, 1954.
- H a š e k, M.: Problém překonání neslučivosti tkání při homoplastických přenosech. Čas. lék. čes. 94 : 41, 1955.
- H a š e k, M.: Vliv intraembryonálních injekcí cizodruhové krve na tvorbu protilátek. II. Sledování reaktivity u kachen, hus a perliček. Čs. biologie 5 : 5, 1956.
- H a š e k, M.: The Influence of Intra-embryonal Injections of Foreign Blood on the Formation of Antibodies. II. Fol. biol. (Praha) 2 : 48, 1956.
- H r a b a, T.: Imunologické chování embryonálních parabiontů mezi krůtou a slepicí. I. Čs. biologie 5 : 91, 1956.
- H r a b a, T.: Immunological Behaviour of Embryonal Parabionts between Turkey and Hen. Fol. biol. (Praha) 2 : 165, 1956.
- K o p r o w s k i, H.: Actively Acquired Tolerance to a Mouse Tumor. Nature 175 : 1087, 1955.
- S i m m o n s e n, M.: Artificial Production of Immunological Tolerance. Nature 175 : 763, 1955.
- W o o d r u f f, M. F., S i m p s o n, L. O.: Induction of Tolerance to Skin Homografts in Rats by Injection of Cells from the Prospective Donor Soon After Birth. Brit. J. Exp. Pathol. 36 : 494, 1955.

Immunological Tolerance of Rats against Crocker's Tumour during Embryogenesis and Postembryogenesis

J. GROZDANOVICH

Summary

Immunological tolerance of rats against heterogenous cellular antigens was attained by administering homogenates of mice liver, spleen and kidney during embryogenesis as well as in newborn rats. White rats and white mice of our own breed and Crocker's tumour passaged on white mice were used. Subcutaneous injection of tissue homogenates into rat embryos 4—1 days before birth and into newborn rats, resulted in immunological tolerance, which was manifested by the larger size of mice Crocker's tumour in tolerant animals after transplantation as compared with control material and by a decrease in the ability to produce immune agglutinins against mouse erythrocytes. (Immunological tolerance was evaluated at a time, when rats reached 50—60 g. weight.)

In comparison with intra-embryonal tolerance in rats described by Bolag (1955) we did not observe such significant differences in the growth of tumours in tolerant and control animals. It is possible to attain immunological tolerance in rats against heterogenous mouse cellular antigens not only during embryogenesis, but also during early postembryogenesis. In both cases, however only incomplete tolerance developed which manifested itself by a regression of the tumours 10 days after transplantation even in tolerant animals as well as by the fact, that the ability to produce immune agglutinins was only reduced, but never completely abolished.

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 5

Исследования реактивности крысы после внутрizarодышевых впрыскиваний чужеродных кровяных телец

А. ПУЗА и И. МОЛЬНАР

Кафедра биологических наук медицинского факультета университета им. Коменского, Кошицы

Поступило в редакцию 19 VI 1956

Гашек (1953а, б, 1954), пользуясь разработанным им методом экспериментального эмбрионального парабиоза у птиц, установил, что в течение постэмбриональной жизни парабионты в изосерологических условиях не образуют друг против друга антител.

Такое же, но не полное подавление способности к образованию антител у межвидовых парабионтов описали Гашек (1955), Гашек и Граба (1955), Френцль с сотр. (1955). Замечательно открытие Грабы (1956), который добивался путем межвидового парабиоза (курица-индейка) полного подавления реакции иммунитета против кровяных телец индейки у курицы.

Дело идет здесь об экспериментальном угнетении в течение постэмбриогенеза иммунной реакции на введение чужеродного клеточного антигена, действию которого данная особь подвергалась в течение эмбриогенеза. Это явление изменения реактивности организма Гашек (1956б) назвал *иммунологическим сближением*. В отличие от иммунной реакции, при иммунологическом сближении играет роль таксономическое родство сближаемых особей.

Подобное явление изменения реактивности описали и Billingham с сотр. (1953), которым удавалось в рамках межвидовых отношений добиться с помощью внутрizarодышевых инъекций взвеси клеток приживления кожных гомотрансплантатов у мышей. У птиц те же авторы описали изменения реактивности, вызванные внутрizarодышевыми инъекциями гомологичной крови.

В своей работе мы изучали два вопроса: 1. возможность вызвать с помощью внутрizarодышевых инъекций кровяных телец кролика иммунологическое сближение крысы с кроликом; 2. продолжительность сохранения вызванного таким образом сближения.

Методика

Внутрizarодышевые инъекции. Лапаротомия беременной крысы производилась под эфирным наркозом. Мы вынимали сначала правый, потом левый угол матки и против источника света определяли на глаз количество и положение зародышей. Тонкой туберкулиновой иглой мы прокалывали стенку угла матки и околоплодные оболочки и вводили каждому зародышу подкожно в переднюю междулопатковую область по 0,15—0,2 мл 40% взвеси дважды промытых кроличьих кровяных телец (эритроцитов + лейкоцитов). После репозиции углов матки операционная рана зашивалась двумя слоями непрерывным швом.

Послеоперационный уход. После операции крыса помещалась в отдельную чистую клетку, выстланную сухими стружками. К подстилке прибавлялась вата для устройства гнезда. После операции крысе давали молоко, а через 6 часов — нормальную сухую пищу. О послеоперационном течении беременности велась запись. В течение 6 дней крыса сама у себя грызала швы, а если нет, то мы устраняли их на 7—9-ый день после операции.

Иммунизация производилась в 2 сериях. Перед иммунизацией мы определяли в сыворотке крыс титр естественных гетероагглютининов (против кровяных телец кролика). В серии А иммунизация производилась 4—6 дозами по 0,5 мл 40% взвеси дважды промытых кровяных телец, интраперитонеально. Титр агглютининов определялся на 4-ый день после последнего укола. В серии В мы иммунизировали тремя дозами той же взвеси, как и в серии А. Первую и вторую дозу в серии В мы вводили с однодневным интервалом в количестве 0,5 мл, а третью — на 7-ой день после второй в количестве 0,8 мл. Титр агглютининов определялся на 10-ый день после последнего укола. Реиммунизация производилась теми же приемами, как и иммунизация в серии В.

Агглютинация. Кровь бралась с помощью пункции сердца. Крысинная сыворотка инактивировалась в течение 30 мин. при 52—56° Ц. Приготавлился ряд разведений (всегда вдвое реже). Кровяные тельца кролика мы прибавляли в таком количестве, чтобы их окончательная концентрация в отдельных разведениях была 0,5%. Агглютинация проходила при 37° Ц и определялась через 15 и 120 мин. За титр принималось то разведение, при котором через 120 мин. агглютинация была заметна макроскопически (агглютинация на 1 крестик).

Сравнивались средние титры у опытных и контрольных крыс и производилась статистическая оценка их разности с помощью t-теста.

Результаты

Мы исследовали возможность вызвать иммунологическое сближение с помощью внутризародышевых впрыскиваний кроличьих кровяных телец у 24 беременных крыс (альбиносы весом в 160—250 г). Клеточный антиген был впрыснут 188 зародышам за 1—5 дней до помета. Родилось 25 живых крысят. Из них опыт производился с 18 крысятами, остальные были матками задушены или съедены. Результаты опыта приводятся на табл. 1.

Сближавшихся крысят мы разделили на 2 серии по способу иммунизации и по количеству введенного интраэмбрионально антигена.

В серии А (12 крысят) мы вводили интраэмбрионально по 0,2 мл 40% взвеси клеточного антигена, а в серии В (6 крысят) — по 0,15 мл того же антигена. Кровяные тельца, применявшиеся для внутризародышевых уколов и для иммунизации в постэмбриогенезе, были от разных доноров, но во всех случаях донором был взрослый кролик. В качестве контроля к обеим сериям было отобрано 12 крысят того же племени и приблизительно того же веса. Перед иммунизацией мы исследовали сыворотку подопытных и контрольных крысят на присутствие естественных гетероагглютининов. Ни в одном случае не были найдены естественные агглютинины против кроличьих кровяных телец.

У подопытных крысят мы в обеих сериях нашли сигнификантное понижение титра иммунных агглютининов: в серии А $P > 0,01$, в серии В $P > 0,001$. Сравнительно высокие титры были отмечены у крысят № 29, 31, 32 и 49. Мы предполагаем, что дело здесь в несовершенстве внутризародышевого введения взвеси клеточного антигена. На эту возможность обратили внимание и Billingham с сотр. (1953).

Длительность сохранения состояния иммунологического сближения мы исследовали путем реиммунизации сближавшихся крыс обеих серий. Крысы серии А реиммунизировались при весе больше 150 г, т. е. после того, как они достигли половой зрелости, а в серии В — при весе около 150 г, т. е. в период полового созревания. В серии А нам не удавалось при сравнении средних титров у опытной и контрольной групп наблюдать статистически значимую разницу ($P > 0,5$, т. е. невозможно было уже отметить состояние иммунологического сближения). В серии В мы установили, что состояние иммунологического сближения еще отчасти сохраняется, хотя титр бывал выше, чем при первой иммунизации, так как при сравнении титров агглютининов после реиммунизации мы еще находили статистически значимую разницу: $P > 0,001$.

Табл. 1. Титр агглютининов у крыс с измененной реактивностью, иммунизированных кровяными тельцами кролика.

Серия	№ крысы	Внутрирод. вымывания в мл	Титр естественных агглютининов	Вес крысы до иммунизации в граммах	Титр агглютининов	Значимость разницы	Титр агглютининов перед реиммунизацией	Вес крысы перед реиммунизацией в граммах	Титр агглютининов после реиммунизации	Значимость разницы после реиммунизации
А	23	0,2	0	60	64	$t = 2,79$ $P > 0,01$	—	—	—	$t = 0,39$ $P > 0,5$
	24	0,2	0	80	16		0	200	64	
	25	0,2	0	80	4		—	210	32	
	26	0,2	0	90	4		—	—	—	
	29	0,2	0	60	128		2	220	32	
	30	0,2	0	70	8		—	—	—	
	31	0,2	0	70	256		8	—	—	
	32	0,2	0	50	256		8	160	—	
	33	0,2	0	70	4		—	—	—	
	34	0,2	0	80	4		2	190	16	
	35	0,2	0	70	16		8	180	64	
	36	0,2	0	100	4		2	230	64	
	17	контроль	0	40	128		4	140	64	
	20	„	0	40	64		4	150	32	
	39	„	0	40	512		8	—	—	
	40	„	0	40	236		4	200	32	
	41	„	0	50	256		8	170	32	
42	„	0	40	512	—	—	—			
43	„	0	40	32	—	—	—			
В	44	0,15	0	40	32	$t = 3,99$ $P > 0,001$	0	140	256	$t = 4,25$ $P > 0,001$
	45	0,15	0	40	8		0	150	16	
	47	0,15	0	40	32		4	130	16	
	48	0,15	0	50	16		4	150	16	
	49	0,15	0	50	128		8	130	126	
	51	0,15	0	40	32		16	130	512	
	76	контроль	0	50	128		32	130	—	
	78	„	0	40	256		—	—	—	
	80	„	0	50	128		16	150	1024	
	82	„	0	50	128		16	150	512	
	83	„	0	50	256		32	180	1024	

Дискуссия

Полученные нами результаты отвечают данным Гашка (1955), который, — как и мы, — у межвидовых парабионтов (утка — курица) нашел значительное нарушение способности к образованию агглютининов. Мы подтверждаем также правильность наблюдения (Гашек и Граба 1955), что угнетение образования иммунных агглютининов в условиях межвидового сближения наступает не только после иммунизации кровяными тельцами того же донора (между прочим, партнера из парабиоза), но и после иммунизации тельцами других особей, принадлежащих к тому же биологическому виду, как и донор, кровяные тельца которого использовались для внутривидовых инъекций.

Аналогичные результаты получили после внутривидовых инъекций крови другого вида (курица — индейка) Simonsen (1955) и Гашек (1956a). Напротив, Simonsen-у (1955) и Граба с сотр. (1956), при той же методике, но, конечно, при другой комбинации (напр., у Simonsen-а курица — гусь), не удавалось вызвать сближения. Однако Граба (1956) добился у кур-парабионтов с индейками полного подавления реактивности. Это открытие — единственный своего рода случай в области гетеросерологических отношений, когда удалось полностью подавить реактивность. Из приведенных фактов очевидно, что существуют видовые различия в эффективности иммунологического сближения.

Woodruff и Simpson (1955) нашли аналогичные изменения реактивности у крыс в ранних стадиях постэмбриогенеза после введения клеточек из гомогенизированных органов. Им удалось настолько сблизить два племени крыс, что кожные гомотрансплантаты, пересаженные в адаптационный период, приживали нормально.

Bolag (1955) сближал крыс с мышами при помощи внутривидовых инъекций крысам гомогенизированных органов мышей. Если в течение постэмбриогенеза он пересаживал этим крысам мышиную саркому Crocker-a, то она росла гораздо экспансивнее, чем в контроле, хотя время выживания опухолей (речь идет о межвидовой комбинации мышь — крыса) оставалось неизменным. Повидимому, здесь имело место частичное подавление реактивности.

Нас интересовала проблема иммунологического сближения млекопитающих в рамках гетеросерологических отношений. Крыса представлялась нам удобным объектом для опытов, во-первых, ввиду ее сравнительно высокой устойчивости по отношению к инфекции и непродолжительности ее периода беременности (эти преимущества крысы как лабораторного животного отмечает и Nicholas — 1925), а во вторых, и потому, что явление иммунологического сближения до сих пор не исследовалось в той комбинации, которой пользовались мы: крыса — кролик. Кроме того иммунологическое сближение у млекопитающих не исследовалось до сих пор с помощью серологических тестов.

Полученные нами при реиммунизации сближавшихся крыс результаты показывают, что состояние изменившейся реактивности (иммунологического сближения) сохраняется, — в условиях нашего опыта, — вплоть до периода полового созревания (т. е. до 150 г веса).

Резюме

Мы исследовали возможность создать у крыс иммунологическое сближение по отношению к кровяным тельцам кролика. С помощью метода внутривидовых инъекций нам удавалось умерить реактивность крысы в период постэмбриогенеза — в смысле понижения способности к образованию агглютининов против кроличьих кровяных телец. Титр у сближавшихся крыс бывает

ниже в сравнении с контролем, причем разница оказывается статистически значимой. Естественные агглютинины против кроличьих кровяных телец при наших опытах у крыс найдены не были. Вызывавшееся нами иммунологическое сближение у крыс, при описанных нами методических приемах, сохраняется до периода полового созревания.

Л и т е р а т у р а

- Гаšek, M.: Парабиоз птиц во время эмбрионального развития. Чсл. Биология 2 : 29, 1953a.
- Гаšek, M.: Вегетативная гибридизация животных путем соединения кровообращения в течение эмбрионального развития. Чсл. Биология 2 : 267, 1953b.
- Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B.: Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. Nature 172 : 603, 1953.
- Bolag, W.: Heterologe Transplantation von Tumoren bei Vorbehandlung der Empfängertiere mit Gewebe der Spendertiere während der Embryonalzeit. Experientia 11 : 227, 1955.
- Frenzl, B., Гаšek, M., Hašková, V., Hraha, T.: Imunologické vztahy u embryonálních parabios mezi kachnou a slepicí. I. Čs. biologie 4 : 1, 1955.
- Гаšek, M.: Parabiosa ptáků v embryonálním vývoji. Čs. biologie 2 : 25, 1953a.
- Гаšek, M.: Vegetativní hybridisace živočichů spojením jejich krevních oběhů v embryonálním vývoji. Čs. biologie 2 : 265, 1953b.
- Гаšek, M.: Vegetativní hybridisace u živočichů. Praha 1954.
- Гаšek, M., Hraha, T., Benešová, H., Hlaváčková, H.: Imunologické vztahy u embryonálních parabiontů mezi kachnou a slepicí. II. Čs. biologie 4 : 135, 1955.
- Гаšek, M., Hraha, T.: Immunological Effects of Experimental Embryonal Parabiosis. Nature 175 : 763, 1955.
- Гаšek, M.: Vliv intraembryonálních injekcí cizodruhové krve na tvorbu protilátek. II. Sledování reaktivity u kachen, hus a perliček. Čs. biologie 5 : 5, 1956a.
- Гаšek, M.: The Influence of Intra-embryonal Injections of Foreign Blood on the Formation of Antibodies. II. Fol. biol. (Praha) 2 : 48, 1956a.
- Гаšek, M.: Otázky imunologického sblížení. ČLČ 95 : 505, 1956b.
- Hraha, T., Hašková, V., Lengerová, A., Vojtišková, M.: Vliv intraembryonálních injekcí cizodruhové krve na tvorbu protilátek. I. Sledování reaktivity u slepic. Čs. biologie 5 : 1, 1956.
- Hraha, T., Hašková, V., Lengerová, A., Vojtišková, M.: The Influence of Intraembryonal Injections of Foreign Blood on the Formation of Antibodies. I. Fol. biol. (Praha) 2 : 43, 1956.
- Hraha, T.: Imunologické chování embryonálních parabiontů mezi krůtou a slepicí. I. Čs. biologie 5 : 91, 1956.
- Hraha, T.: Immunological Behaviour of Embryonal Parabionts between Turkey and Hen. Fol. biol. (Praha) 2 : 165, 1956.
- Nicholas, J. S.: Notes on the Application of Experimental Methods upon Mammalian Embryos. Anat. Rec. 31 : 385, 1925.
- Simonsen, M.: Artificial Production of Immunological Tolerance. Nature 175 : 763, 1955.
- Woodruff, M. F., Simpson, L. O.: Induction of Tolerance to Skin Homografts in Rats by Injection of Cells from the Prospective Donor Soon after Birth. Brit. J. Exp. Pathol. 36 : 494, 1955.

The Reactivity of Rats after Intra-embryonal Injection of Foreign Blood Cells

A. PUZA and J. MOLNÁR

Summary

Changed reactivity in the sense of a disturbance of the ability to produce antibodies has been described after experimental embryonal parabioses and intra-embryonal injection of foreign blood during postembryogenesis in experimental animals. The possibility of evoking a similar change in the reactivity (immunological tolerance) of rats against rabbit blood cells was investigated. Amounts of 0.15 — 0.2 ml of 40% suspension of rabbit blood cells were injected into rat embryos 1 — 5 days before birth. During postembryogenesis, the presence of natural heteroagglutinins in the serum of young rats previously injected intra-embryonally was investigated on reaching body weight 40—100 gm. These animals were then immunised and the titre of immune heteroagglutinins was determined. Natural agglutinins in rats against rabbit erythrocytes were not found in our experiments. In young rats intra-embryonally injected a change of reactivity was found during postembryogenesis. The titre of immune agglutinins in rats with changed reactivity is lower in comparison with the controls. This difference is statistically significant.

A relatively high titre was observed in four of the experimental rats where it was assumed that an incomplete intra-embryonal injection of rabbit blood cells had been performed, which led to such an insignificant change in reactivity during postembryogenesis, that it was not possible, under our experimental conditions, to prove its existence.

Our results corroborate the findings of Hašek and other authors about the possibility of evoking changes in the reactivity—immunological tolerance—by means of intra-embryonal administration of a foreign cell antigen.

It was found that the immunological tolerance acquired under our experimental conditions lasts to sexual maturity.

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 5

The Influence of Protein Deficiency and Excess in the Diet
on Immunity Response

Z. TRNKA

Institute of Biology of the Czechoslovak Academy of Science, Department of Microbiology, Praha

Received June 29, 1956

Because of its practical and theoretical importance the influence of the composition and amount of food received on defence mechanisms of the organism is often discussed. It has been clearly demonstrated in a number of experimental works that a diet deficient in calories and vitamins lowers the ability of the organism to withstand bacterial infections. After the demonstration of the protein character of antibodies, the importance of protein metabolism for the defence of the organism became evident. A number of studies analysed the effect of the amount, composition and quality of proteins in food both on antibody formation itself and also on other defence mechanism. The majority of authors studying this problem demonstrated a significant decrease in antibody formation and a general decrease in natural and acquired resistance to infections and intoxication in experimental animals fed on a low protein diet (e. g. Cannon, Chase and Wissler 1943, Cannon 1945, Berry, Davis and Spies 1945, Wissler, Woolridge and Steffee 1946, Forni 1952, Vershilova 1954, Klimentova 1954 and others). Other authors, however, especially in earlier work (e. g. Zilva 1919, Lange and Simmons 1923) or in work on clinical material difficult to analyse (e. g. Bieler, Echer, and Spies 1947) could not demonstrate a significant fall in antibody formation or general resistance to infection in organisms deficient in proteins. Guggenheim and Buechler (1946 and 1948) conclude from their experiments that humoral defence mechanisms are more sensitive to protein deficiency than cellular mechanisms. Robertson and Doyle (1936—1937) found that rats fed on a diet with animal proteins were considerably more resistant to bacterial infections than rats fed with plant proteins.

It can be concluded from the above that long-term feeding with low protein diets causes decreased antibody formation. The few clinical experiments carried out on cachectic patients with various diseases (Bieler, Echer and Spies 1947, Balch 1950) indicate, on the contrary, normal serological characteristics and even increased antibody reactions to antigenic stimuli.

Hitherto, however only the effect of protein deficiency has been studied. The influence of high, excessive protein diets has been completely neglected. In this country Poupa and his team is studying the influence of low protein, and high protein diets on various physiological functions. He demonstrated (Poupa 1954) that rats, especially during the phase of most rapid growth, grow best when fed on a diet containing a medium amount of protein. Lát and Faltová (1954) showed that regulation of protein intake is relatively fine as far as quantity is concerned and corresponds to the so-called protein optimum in agreement with the optimum protein concentration for growth as found by Poupa. Faltová, Poupa and Servít (1955) ascertained

Table 1. Composition of the Diets

Diet	Per 1.000 g.										% of total volume		
	Casein	Wheat Starch	Wheat Groats	Dried Milk	Lucerne	Codliver Oil	Margarine	CaCO ₃	NaCl	Dried Yeast	Protein	Carbohydrate	Fat
L ₁₅	240.0	500.0	60.0	3.0	30.0	7.0	88.0	16.5	5.5	50.0	23.2	48.1	8.8
L ₁₆	490.0	250.0	60.0	3.0	30.0	7.0	88.0	16.5	5.5	50.0	42.9	27.1	8.9
L ₁₉	35.0	705.0	60.0	3.0	30.0	7.0	88.0	16.5	5.5	50.0	6.7	65.3	8.7

that both excess and deficient dietary protein increases seizure susceptibility to electrical and sound stimuli in mice in comparison with animals fed on a diet containing medium amounts of proteins, optimal for growth. Lát and Faltová (1955) found the same optimal protein concentration for the power of differentiation of the CNS. A high protein diet causes an increase in inhibition, a low protein diet an increase in excitation.

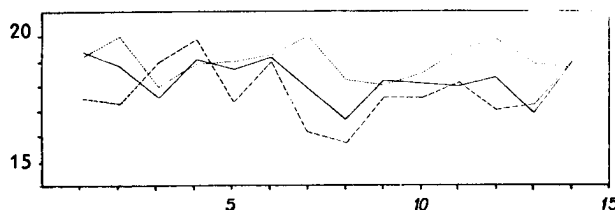
In this paper changes in some immunological reactions of rats are studied when the latter are fed on short-term or long-term diets containing a low, optimal for growth and high concentration of proteins.

Material and Methods

Experiments were carried out on two groups of 90 growing male Wistar rats (bred at the farm of the Czechoslovak Academy of Science) aged three months and weighing on the average 240–250 g. From the time of weaning up to the beginning of the experiment the animals were given a standard Larsen diet. The rats were divided into three equal groups and kept six in one cage. Individual groups were fed on three different, practically isocaloric, diets of constant composition and differing only in the proportion of proteins (casein) and carbohydrates (wheat starch). Thus the final percentage of proteins in the three diets was 6.7, 23.2 and 42.9 respectively. (Diets described by Poupa were used v. table 1.) Animals had free access to food and water. Food and water were changed regularly at the same time every day in order to disturb the animals as little as possible. Throughout the experimental period food consumption

Fig. 1. Short-Term Administration of Diets. Intake in the various groups. *y*: Average intake in g. per rat. *x*: time in weeks.

L₁₅ (23.2 % proteins) full line,
L₁₆ (42.9 % proteins) interrupted line,
L₁₉ (6.7 % proteins) dotted line.



was measured daily (figs. 1 and 2). Intake was approximately the same in all groups so that caloric intake may be considered equal in individual rats of all groups. It follows that inequalities in growth and other differences are due to the different compositions of the diets. Rats were weighed regularly once a week (fig. 3 and 4).

One month (in short-term) and 4 months (in long-term experiments) after the beginning of the experiment, blood was taken from all rats from the tail vein, after cutting off the end of the tail, for the determination of complement levels and for carrying out control agglutinations before immunisation. All control agglutinations were negative in all dilutions. In addition, total proteins were determined in the same blood using the refractometric method. Average values for serum proteins in short-term experiments were 7.00% for the medium protein group, 5.98 % for high protein group and 5.59 % for the low protein group. The decrease in total serum proteins in rats fed on the low protein diet is in agreement with the findings in the literature (Krebs 1946, Bieler, Echer and Spies 1947, Metcoff, Favour and Stare 1945 and others). Average values for total serum

proteins in long-term (8 months) experiments were 5.85% for rats on the low protein diet, i. e. a value in agreement with the reports in the literature and our own experiments. For the high protein group the value was 6.91% for the medium protein group 7.04%, i. e. practically the same for both groups. One month after the beginning of the experiments half the number of rats fed on the different diets was immunised i.p. at intervals of two days with 6 doses of *Salmonella paratyphi B* inactivated by heat

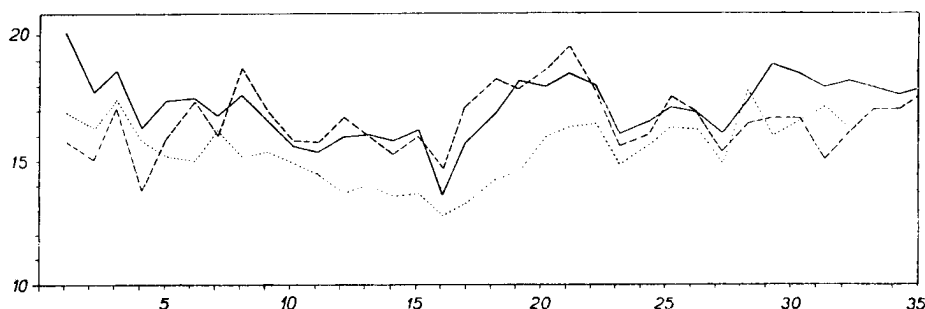


Fig. 2. Long-term Administration of Diets. Daily intake of diets in g. (y) per week per rat. x : weeks of the experiment. L_{15} , L_{16} and L_{19} (as in fig. 1).

(5×10^6 microorganisms per immunising dose). After the end of immunisation blood was taken from the tail vein on the 4th, 7th, 10th, 14th, 21st, 28th and 35th day and agglutinating antibodies were determined. On the 4th month after the beginning of the experiment, rats were infected in 9 groups and bacteraemia and the survival rate were determined.

In the long-term experiment, at the end of the 7th month, half the number of rats was immunised in the same way as before and on the 5th, 7th, 10th, 14th, 21st, 28th, 35th, 42nd and 49th day after immunisation agglutinating antibodies were again determined. After that infection experiments were made in 12 groups and bacteraemia and the survival rate were determined.

Titration of complement was carried out in the usual way using commercial haemolytic amboceptor. Only for greater precision, dilution of the complement was in decreasing series per 0.03 ml. of the serum under investigation which was diluted 1 : 10. Intensity of haemolysis was determined in the supernatant fluid after centrifugation using a colorimeter and a green filter of wave length $530 m\mu$. Results were expressed as a percentage of haemolysis using a curve obtained from a % diluted haemolytic series of the haemolytic system used in a given experiment.

Agglutinating antibodies were determined using the cold agglutination test in a refrigerator (+ 2 to 4° C). Readings were taken after 2,4 and 6 days.

Salm. paratyphi B suspended in 0.2 % agar was used for infection. The DJ. 100 was determined

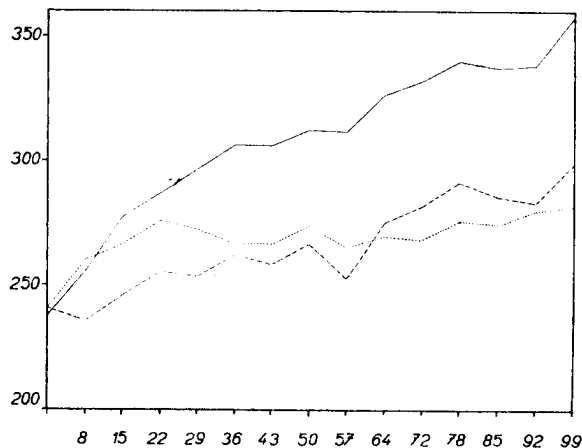


Fig. 3. Short-Term Administration of Diets. Growth curves. y : average weights in g., x : days after the beginning of the experiment. Statistical evaluation on the 99th day (Student's t-test shows differences between L_{15} and L_{16} and L_{19} are significant ($P < 1\%$)) but between L_{16} and L_{19} insignificant ($P < 10\%$). L_{15} , L_{16} , L_{19} (as in fig. 1).

per 100 g. normal rat (5×10^8 microorganisms per 100 g.). Administration was intraperitoneal. Experimental immunised and non-immunised rats were used in groups in which infecting doses were changed as necessary. Bacteraemia, indicating transfer of bacteria from the peritoneal cavity into the blood was determined together with the rate at which blood was cleansed. Blood in amounts of 0.4 ml. was taken from the tail vein 1, 3 and 6 hours after infection into 0.1 ml. 5% sodium citrate. Dilutions were 1:50,

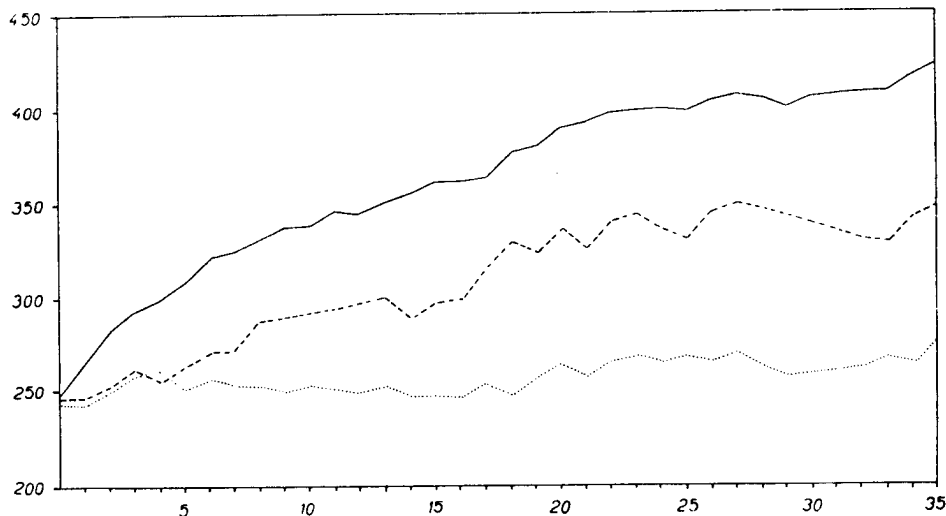


Fig. 4. Long-term Administration of Diets. Growth curves. y : average weights in g. x : weeks after the beginning of the experiment. Differences between all three groups (Student's t -test) significant to $P < 1/100$, L_{15} , L_{16} , L_{19} (as in fig. 1).

1:500 and 1:5000. Culturing was carried out on End's medium. The number of microorganisms was determined from the average of 4 cultures. Numbers of microorganisms given in the table are calculated for 1 ml. blood. Survival of rats was observed for 7 days.

Spontaneous deaths of rats during the short-term diet experiments were insignificant. Only 1 rat in each group died. During the long-term experiments a large number of deaths was registered in the low protein group. On the 2nd and 4th month one rat died in this group in the fifth and sixth months two rats died and in the seventh and eighth months three rats died, so that altogether only 18 rats out of 30 survived. The cause of death was spontaneous infections, mostly of the upper respiratory tract. On the other hand no rats died in the medium and high protein diet groups.

Results

As is evident from fig. 5, the largest amount of complement was present after one month on the experimental diets in rats fed on the medium protein diet, the amount was less in animals on the high protein diet and least on the low protein diet. Using 50% haemolysis, the difference between the medium and low protein groups is slightly significant. Significance is high on 80% haemolysis. The difference between both these groups and the high protein group is not significant.

After four months on the experimental diets the level of complement was very low in the low protein groups (fig. 6). Differences between this group and the medium and high protein group are highly significant on 50% and 80% haemolysis. Complement levels were nearly identical in the medium and high protein groups. Differences are on the border-line of significance with 50% haemolysis and are not significant with 80% haemolysis.

The level of agglutinating antibodies in the short-term experiment (fig. 7) shows that immunisation gives rise to titres significantly higher in the medium protein group than in both the other groups. The difference between the low and high protein groups is not significant.

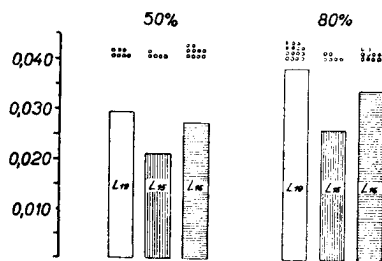


Fig. 5.

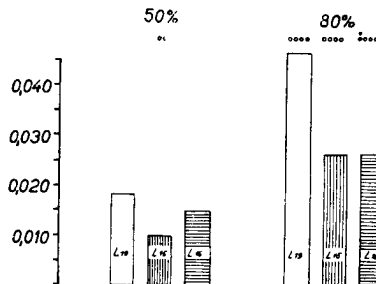


Fig. 6.

Fig. 5. Short-term Administration of Diets. Amount of complement (average from 30 rats) in absolute amounts of serum necessary for 50% and 80% haemolysis. Circles indicate number of cases in which even the highest amount of serum used (0.045 ml.) did not cause the tested % haemolysis. For the figure in such cases the next highest amount of serum was taken (0.05 ml.). Wilcoxon's β test was used for statistical evaluation.

50% haemolysis: L_{19} white columns 0.029; L_{15} perpendicularly shaded columns 0.021; L_{16} horizontally shaded columns 0.027. 80% haemolysis: L_{19} 0.038; L_{15} 0.026; L_{16} 0.034.

Fig. 6. Long-term Administration of Diets. Amount of complement (average from 30 rats) in absolute amounts of serum necessary for 50% and 80% haemolysis. Circles indicate number of cases in which even the highest amount of serum used (0.045 ml.) did not cause the tested % haemolysis. For the figure in such cases the next highest amount of serum was taken (0.05 ml.). Statistical evaluation by the Cochran-Cox approximation of the Student t-test for the difference of the two averages.

50% haemolysis: L_{19} (white columns) 0.018; L_{15} (perpendicularly shaded columns) 0.010; L_{16} (horizontally shaded columns) 0.014. 80% haemolysis: L_{19} 0.046; L_{15} 0.026; L_{16} 0.026.

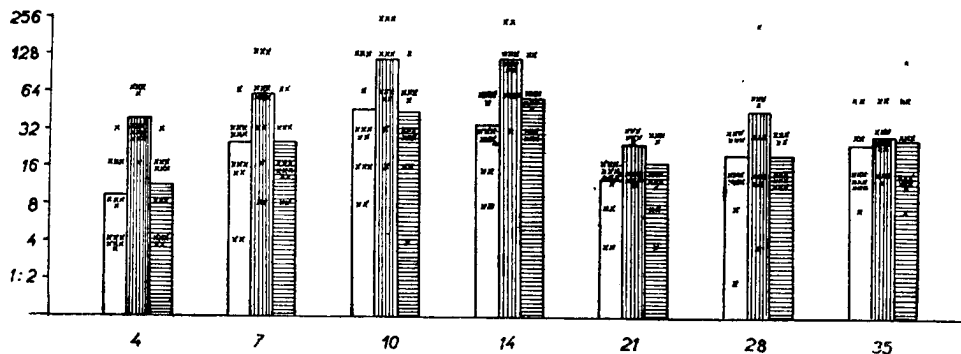


Fig. 7. Short-term Administration of Diets. Agglutinating antibody formation. y : Average titres of agglutinating antibodies of individual groups. x : days of blood collection after completion of immunisation. Statistical evaluation by Wilcoxon's β -test. Up to the 21st day differences between L_{15} and L_{16} are not significant, and up to the 28th day the same holds good for L_{19} and L_{15} . Differences between L_{16} and L_{19} are insignificant throughout. Numbers indicate numerical values of titre averages.

L_{19} (white columns):	9.3	—	24.5	—	48.0	—	61.7	—	116.8	—	125.7	—	24.0	—	49.9	—	32.0
L_{15} (perp. shaded columns):	4.0	—	61.7	—	43.0	—	59.7	—	17.8	—	21.1	—	30.8	—		—	
L_{16} (horizon. shaded columns):	11.4	—	24.5	—	43.0	—	59.7	—	17.8	—	21.1	—	30.8	—		—	

Table 2. Survival of Infection. Rows indicate successive groups taken into experiment. Statistical evaluation: Wilcoxon's β -test

Short-term Administration of Diets

Group	No. of rats	Dose	Deaths in hours after infection							No. of survivors	
			6	24	48	72	96	128	144		168
L ₁₅ (23.2% protein) immunised	3	7 DL 100		1	1	1					0
	3	7 DL 100		1	1						1
	4	7 DL 100		2							2
	4	7 DL 100									4
L ₁₆ (42.9% protein) immunised	3	7 DL 100						2			1
	3	7 DL 100		1	1						1
	4	7 DL 100									4
	4	7 DL 100									4
L ₁₉ (6.7% protein) immunised	3	7 DL 100				3					0
	3	7 DL 100				3					0
	4	7 DL 100	1	3							0
	4	7 DL 100	1	2							1
L ₁₅ (23.2% protein) non-immunised	3	1 DL 100		3							0
	3	$\frac{3}{4}$ DL 100		2	1						0
	3	$\frac{2}{3}$ DL 100		1							2
	2	$\frac{2}{3}$ DL 100									2
	3	$\frac{2}{3}$ DL 100		1							2
L ₁₆ (42.9% protein) non-immunised	3	1 DL 100	1	2							0
	3	$\frac{3}{4}$ DL 100		2							1
	3	$\frac{2}{3}$ DL 100		1							2
	2	$\frac{2}{3}$ DL 100				1					1
	4	$\frac{2}{3}$ DL 100		2	1						1
L ₁₉ (6.7% protein) non-immunised	3	1 DL 100	1	2							0
	3	$\frac{3}{4}$ DL 100		3							0
	3	$\frac{2}{3}$ DL 100		3							0
	2	$\frac{2}{3}$ DL 100								1	1
	3	$\frac{2}{3}$ DL 100		3						1	0

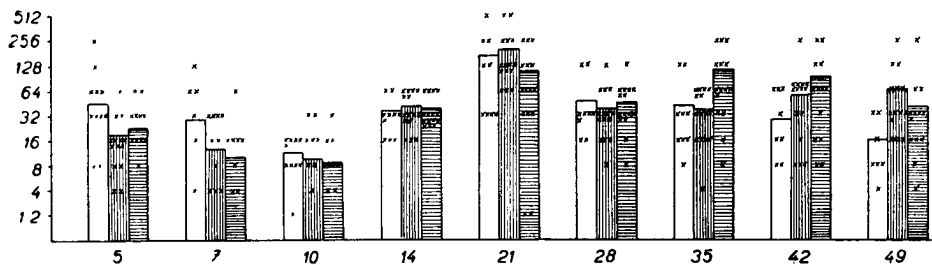


Fig. 8. Long-term Administration of Diets. Agglutinating antibody formation. x: days after immunisation when blood was taken. Crosses indicate titres of individual rats. Wiccxons β -test used. Numbers give exact values of individual averages.

L₁₉ (white columns): 46.1 - 28.0 - 10.4 - 33.6 - 156.4 - 49.7 - 45.3 - 30.2 - 15.4
 L₁₅ (perp. shaded columns) 17.6 - 12.0 - 8.8 - 41.6 - 192.0 - 40.0 - 38.6 - 58.1 - 61.8
 L₁₆ (horizon. shaded columns) 21.8 - 9.6 - 8.0 - 40.5 - 100.5 - 48.5 - 104.0 - 79.4 - 46.4

In the long-term experiment the levels of agglutinating antibodies show no striking difference in the individual groups (fig. 8). The non-significance of the difference is confirmed by statistical analysis. Differences are significant at the $P < 5\%$ level only between the low and medium protein group on the 5th day and between the medium and high protein group on the 21st and 35th day. The survival rates (tab. 2) show that animals fed on a low protein diet for short periods had a decreased resistance to infection. This decrease, as manifested by a greater and more rapid death rate, is highly significant in immunised rats (Wilcoxon β -test) while it is only on the border-line of significance in non-immunised rats. There was no difference in the resistance of the medium and high protein groups. In the long term experiments (table 3) there were no differences between the three groups. There was, however, a significant difference between immunised and non-immunised rats in both experiments.

Table 3. Survival of Infection. Rows indicate successive groups taken into experiment. Statistical evaluation: Wilcoxon's β -test.

Long-term Administration of Diets

Group	No. of rats	Dose	Deaths in hours after infection										No. of survivors	
			3	6	9	12	15	18	21	24	48	72		
L ₁₅ (23.2% prot.) immunised	2	1 DL 100												2
	2	3 DL 100						1						1
	3	4 DL 100												3
	2	10 DL 100									2			0
	3	10 DL 100					1	1	1		1			0
	3	8 DL 100					1	1		1				0
L ₁₆ (42.9% prot.) immunised	2	1 DL 100												2
	2	3 DL 100												2
	2	4 DL 100												2
	3	10 DL 100							1					2
	3	10 DL 100				1	1				1			0
	2	8 DL 100						1		1				0
L ₁₉ (6.7% prot.) immunised	2	1 DL 100										1		1
	2	2 DL 100												2
	2	3 DL 100												2
	2	10 DL 100				1		1						0
L ₁₅ (23.2% prot.) non-immunised	2	1 DL 100				1				1				0
	2	1/2 DL 100												2
	3	3/4 DL 100												3
	2	1 DL 100									1			1
	3	1 DL 100				1	1							1
	3	1 DL 100				2	1							0
L ₁₆ (42.9% prot.) non-immunised	2	1 DL 100			1					1				0
	2	1/2 DL 100					1							1
	2	3/4 DL 100												2
	3	1 DL 100							2		1			0
	3	1 DL 100								1				2
	3	1 DL 100							1		1			1
L ₁₉ (6.7% prot.) non-immunised	2	1 DL 100				1		1						0
	2	1/2 DL 100												2
	2	3/4 DL 100												2
	2	1 DL 100				1								1

Table 4. Bacteraemia 1, 3 and 6 hours after infection in immunised and non-immunised rats of different dietary groups. Figures give the average number of microorganismu per 1 ml. of blood. Statistical evaluation: Wilcoxon's β -test.

Short-term Administration of Diets

	% Protein	1 hour	3 hours	6 hours
Immunised	L ₁₅ (23.2% prot.)	3,053	53	912
	L ₁₆ (42.9% prot.)	2,471	147	80
	L ₁₉ (6.7% prot.)	14,192	31,512	162
Non-immunised	L ₁₅ (23.2% prot.)	247,719	419,678	88,988
	L ₁₆ (42.9% prot.)	234,660	719,517	75,961
	L ₁₉ (6.7% prot.)	545,342	202,812	65,729

Table 5. Bacteraemia 1, 3 and 6 hours after infection in immunised and non-immunised rats of different dietary groups. Figures give the number of microorganisms per 1 ml. of blood. Statistical evaluation: Wilcoxon's β -test.

Long-term Administration of Diet

	% Protein	1 hour	3 hours	6 hours
Immunised	L ₁₅ (23.2% prot.)	12,546	734	167
	L ₁₆ (42.9% prot.)	2,971	1,220	1,500
	L ₁₉ (6.7% prot.)	2,009	1,025	487
Non-immunised	L ₁₅ (23.2% prot.)	157,995	117,970	92,490
	L ₁₆ (42.9% prot.)	201,880	138,835	100,633
	L ₁₉ (6.7% prot.)	132,208	132,575	21,250

Table 4 gives differences in the number of bacteria in the blood 1, 3 and 6 hours after infection in the short-term experiment. In agreement with Šterzl (1954) who demonstrated that transfer of bacteria from the peritoneal cavity into the blood stream and disappearance of bacteria from blood differs considerably in immunised and non-immunised rats, the present results show the same picture. Differences are statistically significant using Wilcoxon's β -test. Differences between the three dietary groups in both short-term and long-term experiments (tab. 5) are not significant.

Discussion

It has been possible to demonstrate in agreement with the majority of the reports in the literature that complement levels, antibody formation and natural and acquired resistance to *Salmonella paratyphi B* infection are all decreased in protein deficient rats. When evaluating results in protein deficient animals it is always necessary to take into consideration the total amount of protein in the diet and the species of animal used. In the present experiments the author tried to preserve the necessary minimum of proteins in order not to kill the animals by a simple protein deficiency. A protein content of 6–7% was chosen, as one of 9%, according to Guggenheim and Buechler (1948), already prevents the appearance of considerable differences in bacteriocidal and phagocyte activity in comparison with normally fed rats (18 % protein). It is therefore evident that in comparison with experiments using very low protein diets (Guggenhaimer and Buechler 1948, 3%, Cannon, Chase and Wissler 1943, 1%, Cannon, Wissler, Woolridge and Bendit 1944, 2%, Wissler, Woolridge, Steffee, Cannon 1946, 0.9% and 1.9%) the diet used here did not cause such extensive decreases in antibody formation and resistance. The animals in the experiments quoted were on the border-line of existence. It is a drawback of most work in this field concerning the effect of the diet on the organism that usually neither growth nor weight curves are given and in most cases it is not stated how far animals died spontaneously. This would indicate whether animals were affected as a whole by the diet, which, in our opinion, is very important for comparison of results from different work. Another disadvantage of some work is the use of diets that differ only little from each other (Schneider, Webster 1945, Forni 1952, Berry, Davis and Spies 1945) so that results depending on a large number of factors can hardly elucidate the basic effect of individual components of the diet and again make a comparison of different work impossible. The time for

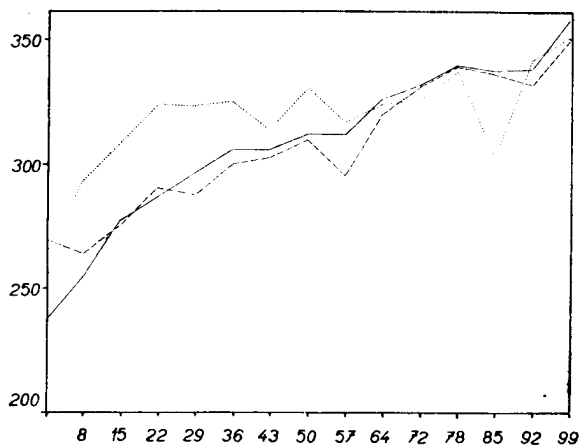


Fig. 9. Short-term Administration of Diets. Relation between specific antibody formation and growth rate. Average growth curve of the medium protein group (full line). Averages from the 5 heaviest rats from the low protein group (dotted line) and from the high protein group (interrupted line): y : weight in g. x : days from the beginning of the experiment.

which a diet is given is also discussed insufficiently. In the majority of experiments diets were administered for 1, 2 and 3 months, rarely for longer periods. The experiments of Metcoff, Darling, Scanlon and Stare (1948) showed that a short-term protein deficiency (10 days) and further continuation of this diet did not cause suspension of antibody formation although there was a total decrease in serum proteins and therefore also in γ -globulin. This work and the work of Bieler, Echer and Spies (1947) demonstrate that the level of specific antibodies is not directly dependent on the total amount of serum proteins present.

The results in rats fed on the high protein diet for a short period are interesting. In those rats antibody formation is significantly decreased but resistance to infection is the same as in the medium protein group. In contrast, survival is low in the low protein group. Optimal production of specific antibodies occurs, in agreement with Poupa, on the so-called protein optimum in the diet. This tendency is also evident in the complement levels, although it is not statistically significant. The total amount of proteins in the blood serum is probably of importance in this case. The protein optimum is most obvious in its effect on growth. That is why it was attempted to correlate optimum growth and specific antibody formation in the short term experiments. In the first place, average growth curves of rats on the medium protein diet were compared with curves of the five heaviest rats of the low and high protein groups (fig. 9). No differences were evident between these artificially formed groups. It appears that there are no considerable differences within individual groups when average agglutinating titres of all groups are compared with averages of those titres in the five heaviest rats of each group (fig. 10). This indicates that immunological characteristics of individual groups are not due to growth rates.

How can decreased antibody formation be explained in the high and low

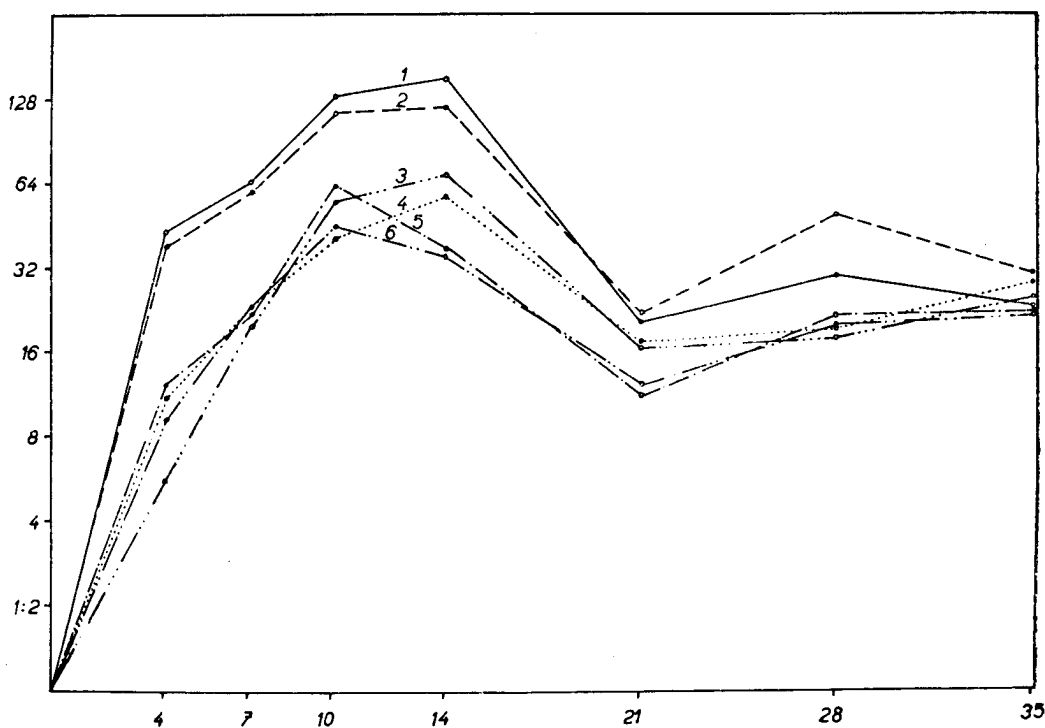


Fig. 10. Short-term Administration of Diets. Average agglutinating titres compared with agglutinating titres of the 5 heaviest rats in each group (y). x: days when blood was taken after the end of immunisation.

- Curves: 1 - L₁₅ (23.2% proteins) average from the 5 heaviest rats
 2 - L₁₅ (23.2% proteins) average from 30 rats
 3 - L₁₆ (42.9% proteins) average from the 5 heaviest rats
 4 - L₁₆ (42.9% proteins) average from 30 rats
 5 - L₁₉ (6.7% proteins) average from the 5 heaviest rats
 6 - L₁₉ (6.7% proteins) average from 30 rats

protein short-term groups? The experiments of Wissler, Wooldrige and Steffee (1946) and Wissler, Wooldrige, Steffee and Cannon (1946) demonstrate that short-term feeding of rats with a high protein diet or a diet containing large amounts of amino-acids several days before immunisation causes considerable increase in antibody formation in rats previously fed on a low protein diet. This indicates that the mechanism of antibody formation is not affected, and leads to the conclusion that the decreased formation of antibodies is due to exhaustion of protein reserves or to insufficient supply of amino acids in the diet. This is the most usual explanation of this phenomenon. The fact, however, ascertained from our experiments, that a high protein diet also causes a decrease in antibody formation, rules out such an explanation. Rats on a high protein diet evidently become adapted very rapidly to the diet given as can be seen from the complement levels and all other reactions. At the end of the long-term experiment there was no difference, excepting only weight, from the medium protein group. Changed reactivity after short-term administration of the diet may be explained by the animal adapting itself to the stress of the unusual composition of the diet. This is evidently connected with ready usable protein reserves depending on an optimal protein concentration in the diet. Similar results were obtained by Hruza (1955) who studied the breakdown of liver proteins after the short and long-term administration of diets containing high or low concentrations of proteins and also Lat (1955) who studied higher nervous activity in rats fed a high protein diet for long periods.

During the long-term experiment the became differentiated. Animals on the high and medium protein diets remained normal in appearance; this was not the case with animals on the low protein diet. Their fur become sparse and in places was completely absent. They rapidly succumbed to spontaneous infections. We are probably justified in assuming (as more than one third of the animals died) that those that survived were more resistant and became better adapted to dietary conditions. These individuals, although the level of their total serum proteins was considerably decreased, reacted in the same way to infection as animals from the other two groups. Normal specific antibody formation in rats fed on a low protein diet for long periods may be compared with the results of Bieler, Echer and Spies (1947) and Balch (1950).

In conclusion it is necessary to point out that differences in resistance between the three groups were not large and that often statistical evaluation is necessary to demonstrate their significance. On the other hand differences between immunised and non-immunised rats were immense both as far as bacteraemia and lethal doses are concerned. This difference cannot be bridged by dietary means.

Summary

The short-term administration of a high medium and low protein diet gave rise only to immunological differences within the two basic groups of immunised and non-immunised animals.

After 8 months on those diets no differences in specific antibody formation, and natural and acquired resistance to *Salm. paratyphi B* could be observed. Differences obtained in short-term experiments disappeared in the long-term experiment. The diets remained without effect on the basic differences between immunised and non-immunised rats in both experiments.

In the short-term experiment rats fed a low protein diet had a significantly decreased complement level, agglutinating antibody titre and decreased acquired and natural resistance to *Salm. paratyphi B* infection in comparison with rats on an optimum, medium protein diet.

After 4 months on the low protein diet the amount of complement was decreased in comparison with the medium and high protein diet groups.

In the short-term experiment when rats fed on a high protein diet are compared with rats on the medium protein diet the titre of agglutinating antibodies of the former after immunisation is significantly decreased but natural and acquired resistance to infection is not changed.

Specific agglutinin formation is optimal on the medium protein diet which is also optimal for growth and corresponds to the so-called protein optimum.

In the low protein group there was decreased survival due to spontaneous infections so that there was a natural selection of more resistant individuals.

Statistical evaluation was carried out by F. Zitek, Mathematical Inst. of the Czechoslovak Academy of Sciences. With the technical assistance of B. Hofmanová and D. Johanovská.

Literature

- Balch, H. H.: Relation of Nutritional Deficiency in Man to Antibody Production. *J. Immunol.* 64 : 397, 1950.
- Berry, L. J., Davis, J., Spies, T. D.: The Relationship between Diet and the Mechanism for Defense against Bacterial Infections in Rats. *J. Lab. Clin. Med.* 30 : 684, 1945.
- Bieler, M. M., Echer, E. E., Spies, T. D.: Serum Proteins in Hypoproteinemia Due to Nutritional Deficiency. *J. Lab. Clin. Med.* 32 : 130, 1947.
- Cannon, P. R.: Antibodies and the Protein Reserves. *J. Immunol.* 44 : 107, 1942.
- Cannon, P. R., Chase, W. E., Wissler, R. W.: The Relationship of the Protein Reserves to Antibody Production. I. The Effects of a Low Protein Diet and of Plasmaphoresis Upon the Formation of Agglutinins. *J. Immunol.* 47 : 133, 1943.
- Cannon, P. R., Wissler, R. W., Woolridge, R. L., Bendit, E. P.: The Relationship of Protein Deficiency to Surgical Infection. *Am. Surg.* 120 : 514, 1944.
- Cannon, P. R.: The Relationship of Protein Metabolism to Antibody Production and Resistance to Infection. *Advances in Protein Chemistry*, New York 2, 1945.
- Falťová, E., Poupa, O., Servít, Z.: Vliv vzájemného poměru glycidů a bílkovin v potravě na křečovou pohotovost u myši. *Fysiol. čas.* 4 : 10, 1955.
- Forni, P. V.: Azoto protidico, accrescimento e resistenza antiinfettiva e antitossi differica. *Medicina Sperimentale* 23, 1952.
- Guggenheim, K., Buechler, E.: Nutrition and Resistance to Infection. Bactericidal Properties and Phagocytic Activity of Peritoneal Fluid of Rats in Various States of Nutritional Deficiency. *J. Immunol.* 54 : 349, 1946.
- Guggenheim, K., Buechler, E.: The Effect of Quantitative and Qualitative Protein on the Bactericidal Properties and Phagocytic Activity of the Peritoneal Fluid Rats. *J. Immunol.* 58 : 133, 1948.
- Hrůza, Z.: O zásobách bílkovin v organismu. Disertační kandidátská práce, Praha 1955.
- Krebs, E. G.: Depression of Gamma Globulin in Hypoproteinemia Due to Malnutrition. *J. Lab. Clin. Med.* 31 : 85, 1946.
- Lát, J., Falťová, E.: O činnosti potravního centra. I. Regulace přijímání vody a pevné potravy. II. Regulace přijímání bílkovin, elektrolytů a vody. *Fysiol. čas.* 3 : 132, 1954.
- Lát, J., Falťová, E.: Vliv výživy na vyšší nervovou činnost. I. Vliv různého podílu živočišných bílkovin na vyšší nervovou činnost krys. *Fysiol. čas.* 4 : 171, 1955.
- Metcoff, J., Favour, C. B., Stare, F. J.: Plasma Protein and Hemoglobin in the Protein Deficient Rat. *J. Clin. Investigation* 24 : 82, 1945.
- Metcoff, J., Darling, D. B., Scanlon, M. H., Stare, J. F.: Nutritional Status and Infection Response. I. Electrophoretic, Circulating Plasma Protein, Hematologic, Hematopoietic and Immunologic Response to *Salm. typhi murium*. Infection in the Protein Deficient Rat. *J. Lab. Clin. Med.* 33 : 1, 1948, 47—67.
- Poupa, O.: O některých účincích potravy nad jejich fyziologickým optimumem. Referát na plenárním zasedání ČSAV, Praha, duben 1954.
- Robertson, E. C., Doyle, M. E.: Higher Resistance of Rats Fed Casein than Those Fed Vegetable Protein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 35 : 374, 1936—37.
- Schneider, A. A.: Nutrition and Resistance to Infection. The Strategic Situation. *Vitamin and Hormones* 4 : 35, 1936.
- Schneider, H. A., Webster, L. T.: Nutrition of the Host and Natural Resistance to Infection. II. The Effect of Diet on the Response of Several Genotypes of *Mus musculus* to *Sal. enteritidis* Infection. *J. Exp. Med.* 81 : 359, 1945.

- Šterzl, J.: Imunitní změny u dlouhodobě imunizovaných zvířat. Referát na pracovní imunologické konferenci v Liblicích 1954.
- Šterzl, J.: Průkaz a biologické vlastnosti tkáňového prekursoru serových protilátek. Čs. biologie 4 : 321, 1955.
- Šterzl, J.: The Demonstration and Biological Properties of the Tissue Precursor of Serum Antibodies. Fol. biol. (Praha) 1 : 193, 1955.
- Wissler, R. W., Woolridge, R. L., Steffee, C. H., Cannon, P. R.: The Relationship of the Protein Reserve of Protein Repletion Upon the Production of Antibody in Hypoproteinemia Adult White Rats. J. Immunol. 1952, 267, 1946.
- Wissler, R. W., Woolridge, R. L., Steffee, C. H.: Influence of Amino Acid Feeding Upon Antibody Production in Protein Depleted Rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 62 : 199, 1946.
- Wissler, R. W., Woolridge, R. L., Steffee, C. H., Cannon, P. R.: The Relationship of the Protein Reserves to Antibody Production. II. The Influence of Protein Repletion Upon the Production of Antibody in Hypoproteinemic Adult White Rats. J. Immunol. 52 : 267, 1946.
- Watson, M.: Studies on the Influence of Diet on the Resistance to Infections. II. The Effect of Various Diets on the Resistance of Mice to Bacterial Infection. J. Hyg. 37 : 420, 1937.
- Вершилова, П. А.: Влияние белковой недостаточности в пищевом режиме на бруцеллезную инфекцию у белых крыс. Труды АМН СССР. Вопросы инфекционной патологии и иммунологии. Москва 1954.
- Климентова, А. А.: Влияние недостаточности белка в питании на естественную устойчивость крыс к инфекции *B. enteritidis* Gärtneri. Труды АМН СССР. Вопросы инфекционной патологии и иммунологии. Москва 1954.

Влияние недостатка и избытка белков в пище на иммунную реакцию

З. ТРНА

Резюме

Мы содержали 3 группы крыс на различной диете, практически изокалорической и отличающейся для каждой группы животных только относительным содержанием белков и глицидов. Доля белков в отдельных типах диеты составляла 6,7%, 23,5% и 42,9%. Воды и пищи давалось вдоволь. Ежедневно отмечалось количество съеденной пищи. По количеству съеданной пищи между отдельными диетами не было сколько-нибудь значительной разницы. С точки зрения роста крысы образовали 3 группы, отвечавшие обычным данным литературы. Итак, можно сделать вывод, что различия в росте и др. различия у лабораторных крыс являются результатом различий в составе рациона. Исследовались: 1) влияние кратковременного кормления указанной пищей (на 2-ой и 3-й месяц исследовалось образование специфических антител, а в течение 4-го месяца производилось опытное заражение) и 2) влияние длительного содержания на диете (через 8 месяцев исследовалось образование специфических антител, а на 9-ый месяц производился опыт заражения).

При кратковременном опыте сказалось влияние различного содержания белков в пище. В сравнении с группой крыс со средним содержанием белков в рационе — понижение титра агглютинирующих антител после иммунизации у групп с низкобелковым и высокобелковым рационом оказывалось статистически значимым. Группа крыс, питавшаяся низкобелковой пищей, обладала также более низкой приобретенной и естественной устойчивостью по отношению к *S. paratyphi B* (в сравнении с группой со средним количеством белков в пище). Крысы, получавшие усиленное белковое питание, в отношении естественного

и приобретенного иммунитета к инфекции *S. paratyphi B* не отличались от крыс, которых кормили пищей со средним содержанием белков. Было установлено, что оптимальное образование специфических агглютининов наблюдается при диете со средним содержанием белков, которая является также условием оптимального роста. Концентрация белков в этой диете отвечает т. н. белковому оптимуму. Путем индивидуального анализа подопытного материала не удавалось доказать наличия связи между успешностью роста, — с одной стороны, — и образованием специфических антител и естественной или приобретенной устойчивостью к инфекции, — с другой стороны. Понижение способности к образованию специфических антител у организмов, питающихся низкобелковой или высокобелковой пищей, обусловлено физиологической регуляцией протеиновых резервов в организме. Наши опыты с пищей, богатой белками, показали, что понижение образования антител невозможно объяснить одним лишь истощением белковых запасов в организме, как это делает большинство исследований по этим вопросам. Однако различия, возникающие под влиянием неодинакового процента белков в пище, у использованной нами инфекционной модели не оказывали влияния на основное биологическое различие между иммунизированными и неиммунизированными организмами, разница между которыми выражается числами более высокого порядка, чем разница, обусловленная диетой.

После длительного применения указанных видов диеты не наблюдалось статистически значимой разницы ни в способности к образованию специфических антител после иммунизации, ни в степени естественной или приобретенной устойчивости по отношению к инфекции *S. paratyphi B*. Таким образом, долговременная диета не только не углубляла различий, создававшихся в результате краткосрочной диеты, но, напротив, стирала их. Тем не менее в группе крыс, получавших бедную белком пищу, в течение длительного опыта наблюдалась значительная смертность от случайных инфекций (из 30 крыс погибло 12, тогда как в остальных группах за все время опыта не пала ни одна крыса), так что в этой группе практически осуществился естественный отбор наиболее устойчивых особей. Результаты долгосрочного опыта мы объясняем приспособлением подопытных животных к получаемой пище.

F O L I A B I O L O G I C A

Tom. II. (1956) — Fasc. 5.

Effect of Chlortetracycline on the Activity of α -amylase

M. BURGER, J. ROKOS and P. PROCHÁZKA

Institute of Biology of the Czechoslovak Academy of Science, Department of Microbiology, Praha

Received June 27, 1956

On fermentation of chlortetracycline by *Actinomyces aureofaciens* the fermentation medium usually contains a source of starch (Van Dyck, De Sommer 1952) which splits up into lower derivatives. The extent of starch hydrolysis and the possibility of using the sugars produced depend on the activity of amylolytic enzymes.

It might be expected that with the accumulation of chlortetracycline in the fermentation medium, particularly at higher concentrations of this antibiotic, the activity of enzymes hydrolysing starch would be altered (Arora and Krishna Murti 1952). Even though starchy raw materials (soya bean meal etc.), contained in the fermentation medium, probably have more functions than being the mere source of carbon, the process must be conducted, for economic reasons, so as to make the best use of the starch itself.

In order to study the effect of chlortetracycline on amylolytic enzymes, an enzyme preparation was used from the mould *Aspergillus oryzae*: this is known, under the experimental conditions in question, to hydrolyse starch exclusively by the action of α -amylase (Burger and Beran 1956). Higher concentrations of chlortetracycline were observed to have a strong inhibitory effect on this enzyme during the dextrination of starch.

The purpose of the present work was to study the conditions under which inhibition occurs and to try to find a method of preventing it, and, on the basis of the information so obtained, to study the activity of amylase during the fermentation of chlortetracycline by the strain of *Actinomyces aureofaciens* used commercially.

Material and Methods

Analytical methods. The activity of α -amylase was determined using the author's modification of the Wohlgemuth method (Belozersky and Proskuryakof 1951). Visual comparison of the starch iodine complex with the standard solution was replaced by determination on a Pulfrich colorimeter. The red filter S 66, through which the iodine starch complex showed the highest absorption, proved to be the best from among the set of standard filters available. The time taken for the dextrination of starch, required for the calculation of the Wohlgemuth amylolytic units, was determined by the extrapolation of the final transmission values. The activity of α -amylase is expressed both in units (Belozersky and Proskuryakof 1951) and in percentage transmission in relation to the standard solution.

Chemicals used. Soluble starch p. a. (Lachema), chlortetracycline with 50% biological activity (Lederle Lab.) and the other chemicals analytically pure.

Method. The enzyme preparation of *A. oryzae*, which under the given experimental conditions (Burger and Beran 1956), causes dextrination of starch exclusively by the action of α -amylase, was used for the experiments. A suspension of this preparation in physiological saline was filtered and the filtrate was dialysed for 24 hours at room temperature against a 400 times larger volume of redistilled water, changed three times. The amount of enzyme used was chosen so that dextrination was complete

in about 45 minutes. The final concentration of starch was 1%. If not stated otherwise, the reaction of the mixture was maintained at pH 5.6 by 0.1 M acetate buffer. Incubation took place at 30° C in a water bath. The concentrations of antibiotic given are in relation to the final amounts of biologically active chlortetracycline. The pH of the reaction solution was checked after each experiment by an electron pH meter with a glass electrode.

Results

The Effect of pH and Buffers on the Inhibition of Starch Dextrination

It was found that higher concentrations of chlortetracycline have an inhibiting effect on the activity of α -amylase of the mould *A. oryzae*. The concentration of chlortetracycline at which inhibition appears varies between 8×10^{-4} M and 1.2×10^{-3} M (fig. 1—3).

Inhibition depends on the kind of buffer used and on the pH of the solution. In an acetate buffer at pH 6.0 (fig. 2), chlortetracycline causes inhibition at concentrations higher than 1.2×10^{-3} M. In a phosphate buffer of the same pH, chlortetracycline causes inhibition at a concentration as low as 8×10^{-4} M. In a phosphate buffer at pH 7.0 and with the same concentration of antibiotic, inhibition is greater (fig. 1 and 3).

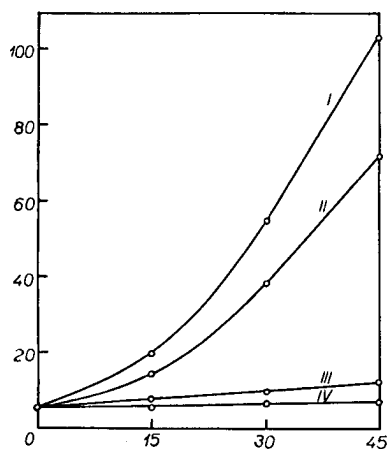


Fig. 1. Effect of Concentrations of Chlortetracycline on Inhibition of *A. oryzae* α -amylase in a Phosphate Buffer of pH 6.0. x : time in mins., y : transmission in %, pH of solution 6.0, buffered by phosphate at final concentration of 0.01 M. I: control, II: 400 μ g., III: 600 μ g., IV: 800 μ g. and 1000 μ g. chlortetracycline in 1 ml.

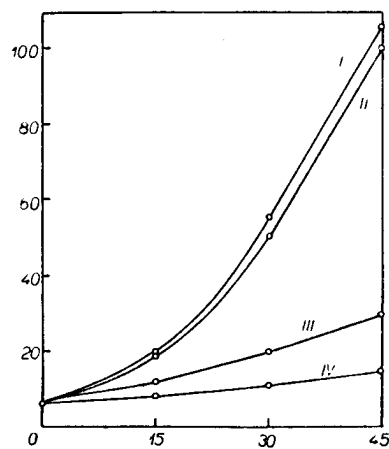


Fig. 2. Effect of Concentrations of Chlortetracycline on Inhibition of *A. oryzae* α -amylase in an Acetate Buffer of pH 6.0. x : time in mins., y : transmission in %, pH of solution 6.0, buffered by acetate at final concentration of 0.1 M. I: control and 400 μ g., II: 600 μ g., III: 800 μ g., IV: 1000 μ g. chlortetracycline in 1 ml.

The inhibiting effect of chlortetracycline on starch dextrination is present in an acetate buffer from pH 4.8 upwards (fig. 4).

The Influence of Ca^{++} on the Inhibitory Effect of Chlortetracycline

It is well-known that Ca^{++} acts as a stabiliser for α -amylases. We have proved, however, that under our experimental conditions, the inhibition of α -amylase is not

caused by the removal of Ca^{++} from the solution by chlortetracycline. Even a large excess of Ca^{++} (tab. 1) did not cause any substantial changes in the inhibiting effect of chlortetracycline. The results and the fact that a dialysed enzyme solution was used in all experiments, prove that the inhibitory effect of chlortetracycline is not caused by the removal of a low molecular stabiliser.

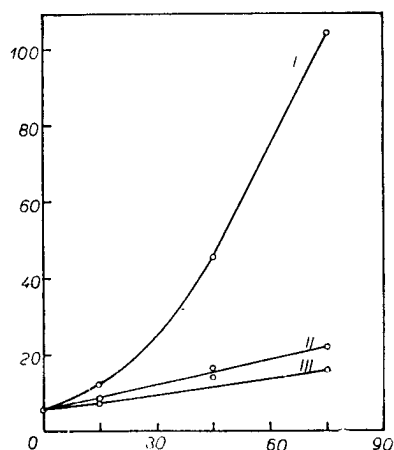


Fig. 3. Effect of Concentrations of Chlortetracycline on Inhibition of *A. oryzae* α -amylase in a Phosphate Buffer of pH 7.0. x : time in mins., y : transmission in %, pH of solution 7.0, buffered by phosphate at final concentration of 0.01 M. I: control, II: 400 $\mu\text{g.}$, III: 600 $\mu\text{g.}$, 800 $\mu\text{g.}$ and 1000 $\mu\text{g.}$ chlortetracycline in 1 ml.

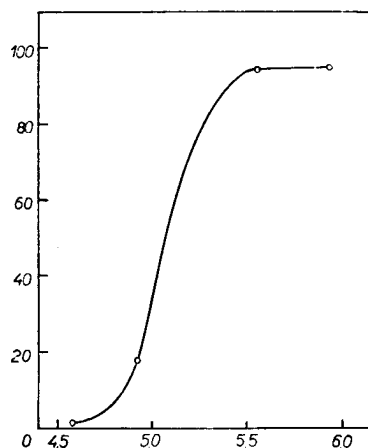


Fig. 4. Effect of pH on Inhibition of *A. oryzae* α -amylase by Chlortetracycline. x : pH, y : % inhibition of *A. oryzae* α -amylase by chlortetracycline. Buffered by acetate at final concentration of 0.1 M. Final concentration of chlortetracycline $2 \times 10^{-3}\text{M}$.

The Effect of some Organic Acids on the Inhibitory Effect of Chlortetracycline

Previous experiments had already shown (fig. 1 and 2) that the inhibition of α -amylase, caused by chlortetracycline, depends on the kind of anions present. If the anions of some organic acids, e. g. of citric or oxalic acid in concentrations of 2×10^{-2} M are present, inhibition disappears completely. The anions of phthalic, benzoic, fumaric and tartaric acids partially reduced inhibition; lactic and propionic

Table 1. Effect of Ca^{++} on Inhibition of α -amylase by Chlortetracycline buffered by acetate, pH 5.6, at final concentration 0.1 M

Experiment No.	Final Concentration		α -amylase units
	of Chlortetracycline	of CaCl_2	
1	1.8×10^{-3} M	1.8×10^{-2} M	0.84
2	1.8×10^{-3} M	6×10^{-3} M	0.74
3	1.8×10^{-3} M	—	0.45
4	—	1.8×10^{-2} M	3.30
5	—	6×10^{-3} M	3.50
6	—	—	3.50

Table 2. Effect of some Organic Acids on Inhibition of α -amylase by Chlortetracycline buffered by acetate pH 5.6, final concentration 0.1 M. Final concentration of sodium salts of acids 2×10^{-2} M, of chlortetracycline 2×10^{-3} M

Sodium salt of added acid	α -amylase units			
	Addition of			
	0	Acid	Chlortetra- cycline	Chlortetra- cycline and acid
Oxalic	3.79	3.83	0.28	3.68
Citric	3.82	3.69	0.25	3.28
Phthalic	3.83	3.83	0.26	2.71
Fumaric	3.83	3.83	0.28	1.54
Benzoic	3.83	3.83	0.26	1.47
Tartaric	3.79	3.67	0.28	1.44
Propionic	3.83	3.75	0.23	0.27
Lactic	3.83	3.83	0.23	0.23

acids in acetate buffer had no effect whatsoever on inhibition caused by chlortetracycline (tab. 2). These findings provided a starting point for resolving other problems, particularly as to whether inhibition of the activity of α -amylase by chlortetracycline is reversible or irreversible.

The addition of citrate (acetate buffer) or acetate (phosphate buffer) to a reaction mixture in which α -amylase has previously been inhibited by chlortetracycline, removes the inhibition (fig. 5 and 6). The rate of starch dextrination after the addition of these acids is the same as when chlortetracycline is not present. The

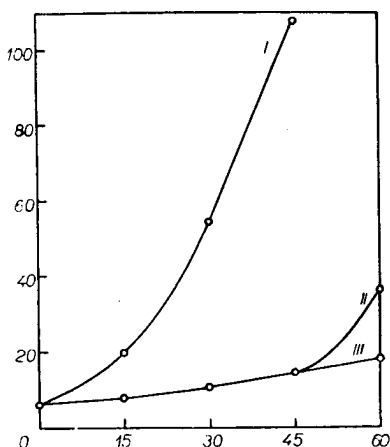


Fig. 5. Effect of Subsequent Addition of Citrate on *A. oryzae* α -amylase Inhibited by Chlortetracycline. x : time in mins., y : transmission in %. pH of solution 6.0, buffered by acetate at final concentration of 0.1 M. I: control, II: 1000 μ g. chlortetracycline in 1 ml. in the 45th minute. 1 ml. of Na-citrate (final concentration 2×10^{-2} M), has been added. III: 1000 μ g. chlortetracycline in 1 ml. in the 45th minute, 1 ml. of H_2O has been added.

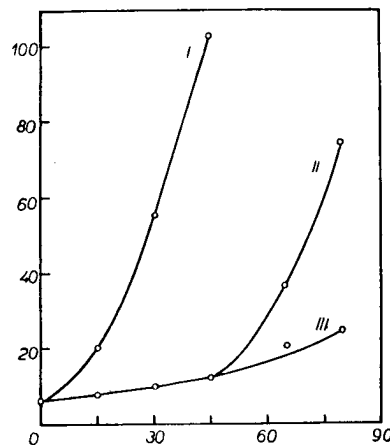


Fig. 6. Effect of Subsequent Addition of Acetate on *A. oryzae* α -amylase Inhibited by Chlortetracycline. x : time in mins., y : transmission in %, pH of solution 6.0, buffered by phosphate at final concentration of 0.01 M. I: control, II: 600 μ g. chlortetracycline in 1 ml., in 45th min. 1 ml. Na-acetate (final concentration 2×10^{-2} M) has been added, III: 600 μ g. chlortetracycline in 1 ml. in 45th min. 1 ml. of H_2O has been added.

removal of inhibition is thus complete. The results given here prove that inhibition of α -amylase by chlortetracycline is reversible.

Discussion

In addition to studies on the bacteriostatic or bactericidal effect of antibiotics, a number of papers have been published dealing with the question of the action of antibiotics on separate enzyme systems both in vivo and in vitro (Agarwala et al. 1952, Arora et al. 1954, 1955a, b, Brody et al. 1954, Ghatak et al. 1953, Iyer et al. 1953, Jacobson et al. 1954, Loomis 1950, Saz et al. 1954, Zimmerman et al. 1953). It is a characteristic feature of these papers that far higher concentrations of antibiotics were used than those at which their bacteriostatic and bactericidal properties are already displayed. This very fact would suggest that in these cases the effect of antibiotics on the enzyme system is non-specific and it is doubtful whether the results obtained can be used to explain changes in enzymatic processes at concentrations of the antibiotic which affect the multiplication of the microorganisms. We also used high concentrations of chlortetracycline when studying its effect on the activity of α -amylase in starch dextrination. The concentrations used, however, are of importance in the fermentation of *Actinomyces aureofaciens*, where the high concentration of the antibiotic can affect some enzyme systems.

Our experiments prove that higher concentrations of chlortetracycline inhibit dextrination by α -amylase of *A. oryzae*. It is important that this inhibition can easily be removed by some organic acids, which alone, however, do not affect the activity of the enzyme in question. This provides the possibility of studying how α -amylase of *Actinomyces aureofaciens* is affected during fermentation with the production of chlortetracycline and, in case of inhibition, of measuring the α -amylase content.

Van Meter and Oleson (1951) assume that chlortetracycline inhibits some reactions in Krebs's cycle, since citric acid removed inhibition by chlortetracycline in studies on the respiration of rat liver homogenates. The fact that citric and other acids removed the inhibitory effect of chlortetracycline on the amyolytic enzyme system in our experiments too, suggests that chlortetracycline may affect other systems connected with liver respiration.

In some cases lower concentrations of antibiotics stimulate enzyme activity while higher concentrations inhibit it (Smith et al. 1949). This may also apply for the action of chlortetracycline on α -amylase. Arora et al. (1952) found that with lower concentrations than those used in our experiments there is activation of the amyolytic systems of malt and moulds. It must be stressed, however, that these authors observed the activity of the amyolytic system from the point of view of increasing the reduction rate, and did not exclude the effect of other enzymes, particularly maltase.

Summary

The inhibitory effect of chlortetracycline in concentrations of 8×10^{-4} M and higher on the dextrination activity of α -amylase of the mould *Aspergillus oryzae* was demonstrated and the effect of pH, Ca^{++} and some organic acids on this inhibition was studied.

Inhibition of α -amylase by chlortetracycline can be removed by citrate, oxalate and other anions of organic acids. The inhibition of α -amylase is reversible.

Literature

- Agarwala, S. C., Krishna Murti, C. R., Shrivastava, D. L.: Studies on Enzyme Inhibition in Relation to Drug Action. I. Effect of Certain Antibiotics on Urease. J. Sci. Industr. Res. 11B : 165, 1952.
- Arora, K. L., Krishna Murti, C. R.: Studies on Enzyme Inhibition in Relation to Drug Action. III. Action of Certain Antibiotics on Amylases. J. Sci. Industr. Res. 11B : 383, 1952.
- Arora, K. L., Krishna Murti, C. R.: Enzyme Inhibition Studies in Relation to Drug Action. VI. Action of Certain Antibacterial Agents on the Succinic Oxidase System. J. Sci. Industr. Res. 13A : 482, 1954.
- Arora, K. L., Krishna Murti, C. R.: Studies on Enzyme Inhibition in Relation to Drug Action: VII. Action of Certain Antibacterial Agents on Tryptophanase. J. Sci. Industr. Res. 14C : 6, 1955a.
- Arora, K. L., Krishna Murti, C. R.: Enzyme Inhibition Studies in Relation to Drug Action: VIII. Action of Certain Antibacterial Agents on the Tricarboxylic Acid Cycle of *Vibrio Cholerae*. J. Sci. Industr. Res. 14C : 66, 1955b.
- Brody, T. M., Hursitz, R., Bain, J. A.: Magnesium and the Effect of the Tetracycline Antibiotics on Oxidative Processes in Mitochondria. Antibiot. Chemother. 4 : 864, 1954.
- Burger, M., Beran, K.: O mechanismu účinku maltázy plísně *Aspergillus niger*. I. Vliv teploty na aktivaci hydrolysy škrobu plišňovými enzymatickými preparáty. Chem. listy 50 : 133, 1956.
- Van Dyck, P., De Sommer, P.: Production and Extraction Methods of Aureomycin. Antibiot. Chemother. 2 : 184, 1952.
- Ghatak, S., Krishna Murti, C. R.: Enzyme Inhibition Studies in Relation to Drug Action: IV. Action of Certain Antibiotics on Alkaline Phosphatase. J. Sci. Industr. Res. 12 12B : 160, 1953.
- Iyer, S. N., Arora, K. L., Krishna Murti, C. R.: Studies on Enzyme Inhibition in Relation to Drug Action: V. Effect of Certain Antibiotics on Liver Arginase. J. Sci. Industr. Res. 12B : 536, 1953.
- Jacobson, K. P., Deodata de Azevedo, M.: Action of Antibiotics on a Peptidase and on Urease. Compt. Rend. Soc. Biol. 148 : 199, 1954.
- Loomis, W. F.: On the Mechanism of Action of Aureomycin. Science 111 : 474, 1950.
- Van Meter, J. C., Oleson, J. J.: Effect of Aureomycin on the Respiration of Normal Rat Liver Homogenates. Science 113 : 273, 1951.
- Saz, A. K., Slie, R. B.: Reversal of Aureomycin Inhibition of Bacterial Cell-free Nitro Reductase by Manganese. J. Biol. Chem. 210 : 407, 1954.
- Smith, G. N., Worrel, C. S., Swanson, A. L.: Inhibition of Bacterial Esterases by Chloramphenicol (Chloromycetin). J. Bact. 58 : 803, 1949.
- Zimmermann, H. J., Humoller, F. L.: Effect of Aureomycin on Choline Oxidase and Other Enzyme Systems of Rat Liver. Am. J. Physiol. 175 : 468, 1953.
- Белозерский, А. Н., Проскуряков, Н. И.: Практическое руководство по биохимии растений. Москва 1951.

Влияние хлортетрациклина на активность α -амилазы

М. БУРГЕР, И. РОКОС и П. ПРОХАЗКА

Резюме

При выработке хлортетрациклина с помощью штамма *Actinomyces aureofaciens* ферментационная среда содержит обычно источник крахмала, который расщепляется в течение ферментации. Задачей настоящей работы было установить влияет ли накопление, а в особенности значительные концентрации хлортетрациклина в ферментационной среде на деятельность энзимов, вызывающих гидролиз крахмала. Мы установили наличие сильного подавляющего действия хлортетрациклина на α -амилазу *Aspergillus oryzae* при декстринации

крахмала, — при концентрациях, имеющих значение для ферментации антибиотика. Поэтому мы изучали условия, при которых наступает подавление, и способ, как его избежать, — чтобы на основании полученных данных проследить деятельность α -амилазы при образовании хлортетрациклина производственным штаммом *A. aureofaciens*.

Для опытов мы пользовались энзиматическим препаратом *A. oryzae*, который в условиях нашего опыта осахаривает крахмал исключительно с помощью α -амилазы.

Активность α -амилазы определялась нами по методу Wohlgemuth-а в нашем видоизменении; сравнение комплекса иод-крахмал со стандартным раствором производилось с помощью колориметра Pulfrich-а.

Мы доказали наличие подавляющего действия хлортетрациклина на активность осахаривания под влиянием α -амилазы плесени *A. oryzae* при концентрации в $8 \cdot 10^{-4}$ М и выше и исследовали влияние pH, Ca^{2+} и некоторых органических кислот на это подавляющее действие.

Подавления деятельности α -амилазы хлортетрациклином можно избежать с помощью цитрата, анионов шавелевой и других органических кислот. Угнетение активности α -амилазы — явление обратимое.

Краткие сообщения

Brief Reports

Kurze Mitteilungen

Transmissible Lysis of Cells of *Escherichia coli* Induced by X-ray Radiation

F. HERČÍK

Institute of Biophysics, Czechoslovak Academy of Science, Brno

Received April 27, 1956

Bacteria of *Escherichia coli* which are given suitable doses of supersonic treatment, lyse, and are at the same time converted into a quantity of uniform globules measuring 200–300 Å in diameter (Hradečná 1956a). An ultrafiltrate of cells lysed in this way induces lysis in healthy cells of the same strain. This lysis can be transmitted (Hradečná 1956b).

The present work aimed at ascertaining whether X-ray radiation can induce similar lysis and whether this also can be transmitted. To date, over 68 experiments have been carried out and the preliminary results are given in the present report.

A Chaoul tube was used to carry out the irradiation (56 kV, 3 mA, 0.15 mm Cu, dose-rate 111 r. m⁻¹). The radiation dose was measured by the compensation method, using a Taylor-Stoneburner chamber (Herčík 1948). Three strains of *Escherichia coli* were taken for irradiation, most experiments being carried out with the strain *E. coli* B, which was obtained from the Institute of Biophysics of Geneva University through the kindness of Dr. Kellenberger. This strain is not lysogenic. Cultures of varying ages (1–24 hours, but most frequently three hours old) were irradiated in test-tubes under strictly sterile conditions. A suspension of bacteria with a concentration of 10⁷/ml. broth was used. The density of the bacteria was measured turbidimetrically. After irradiation, the bacteria were filtered through a collodion filter with pores averaging 620 mμ and 5 ml. of the filtrate was added to a 24-hour-old suspension of non-irradiated bacteria in broth. Non-irradiated, filtered bacteria, 5 ml. of which was also added to a 24-hour-old suspension of non-irradiated bacteria, acted as controls. In both cases the concentration of the bacteria was about 10⁸/ml.

Of the total number of 68 experiments, 22 were positive, indicating that after the addition of the filtrate complete clearing of the culture had occurred, either during the first passage or in one of the subsequent passages. A filtrate from the cleared culture again contained the lytic factor. Up to nine passages were made. Titration carried out in the third passage showed that the lytic factor was present in the titre of 10³–10⁷. A filtrate from the control, non-irradiated bacteria did not induce lysis. In the electron microscope preparations from the lysate showed lysed cells with typical uniform globules with a diameter of about 300 Å. The experiments made so far indicate that in order to induce lysis by X-ray irradiation, a definite optimal dose is needed. Measured in air, this ranges from 75–300 r. It is quite simple to calculate that in a bacterium with a volume of 0.5 μ³, the dose of 300 r. produces about 600 ionisations. An average of 4 · 10⁻³ ionisations falls to one globule, i. e. every 250th globule is ionized. The frequency of the whole phenomenon varies and it evidently depends on the physiological state of the bacterium, on the optimal dose and on other factors which are still not known.

In summing up it may be said that X-ray irradiation induces lysis in non-lysogenic bacteria of *E. coli* B and that this lysis can be transmitted.

L i t e r a t u r e

- H e r č í k, F.: Analýsa vlnového činitele s hlediska kvantově biologického. Spisy lóck. fak. MU, 12, čís. 3, 1948.
- H e r č í k, F.: Problém bakteriofága. Praha 1953.
- H r a d e ě n á, Z.: Rozpad bakterií v uniformní globuly pod vlivem ultrazvuku. Čs. biologie 5 : 117, 1956a.
- H r a d e ě n á, Z.: Lasa bakterii Escherichia coli vyvolaná filtrátem ozvučených bakterií. Čs. biologie 5 : 241, 1956b.

И. Хутная: К вопросу механизма деструкции гомотрансплантатов.

Табл. XXXIII.

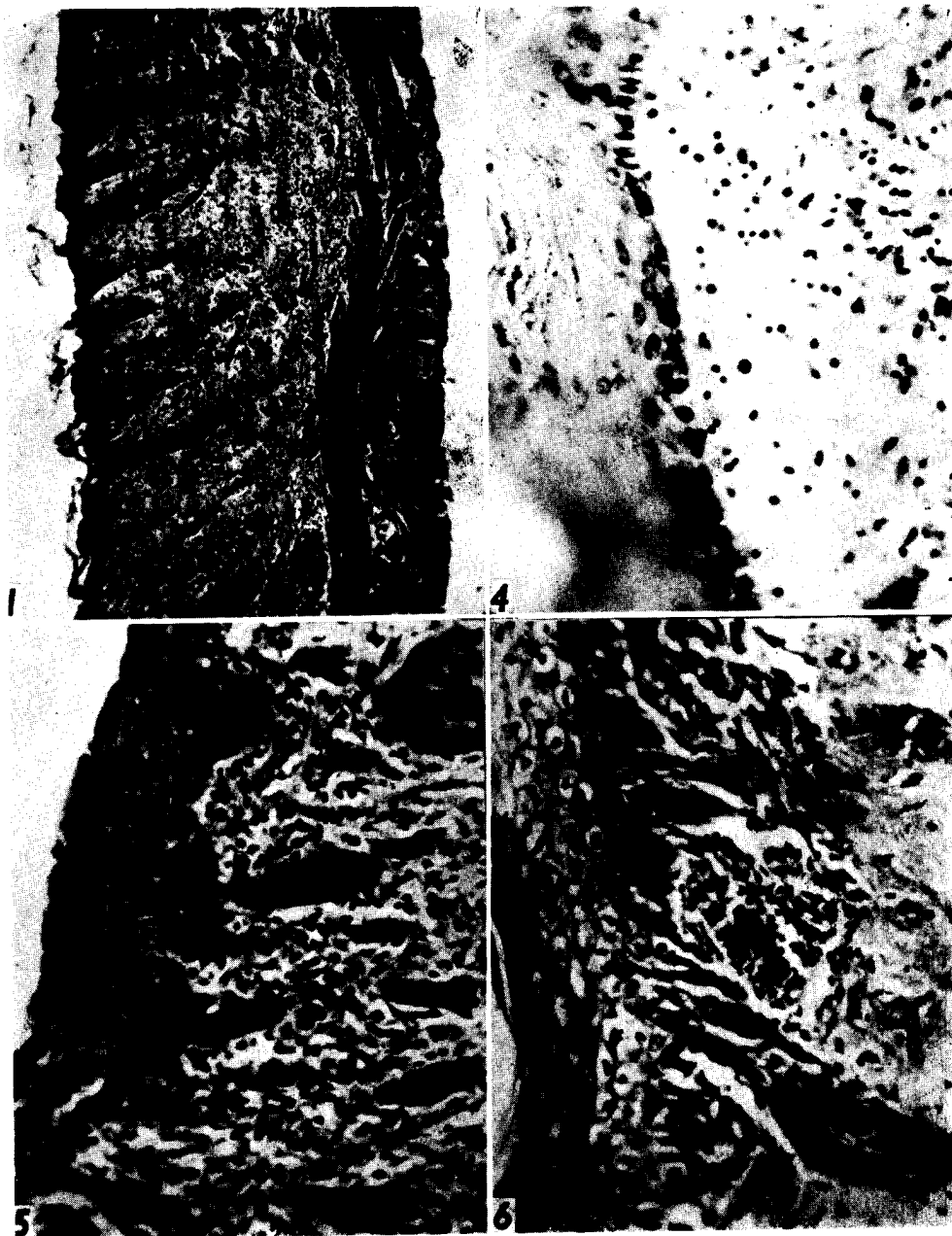


Рис. 1. Автотрансплантат через 14 дней после пересадки. Увеличение в 40 раз.

Рис. 4. Гомотрансплантат через 9 дней после операции. Увеличение в 225 раз.

Рис. 5. и 6. Гомотрансплантат через 10 дней после операции. Увеличение в 225 раз.
(Парафиновые срезы, окраска гематоксилин-эозином.)

И. Хурина: К вопросу механизма деструкции гомотрансплантатов.

Табл. XXXIV.

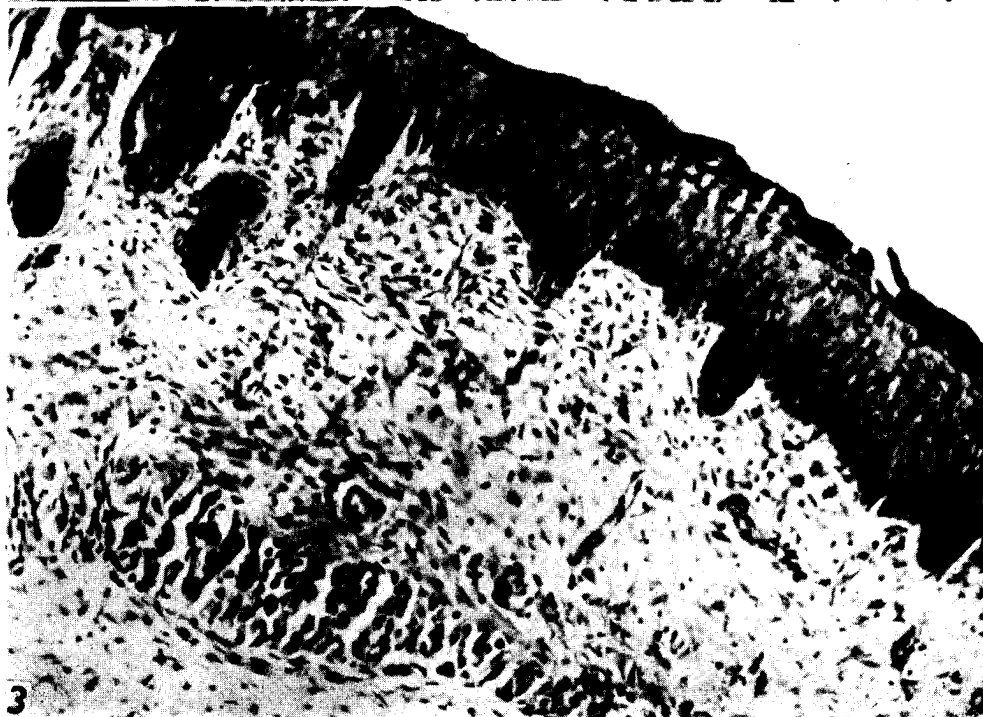
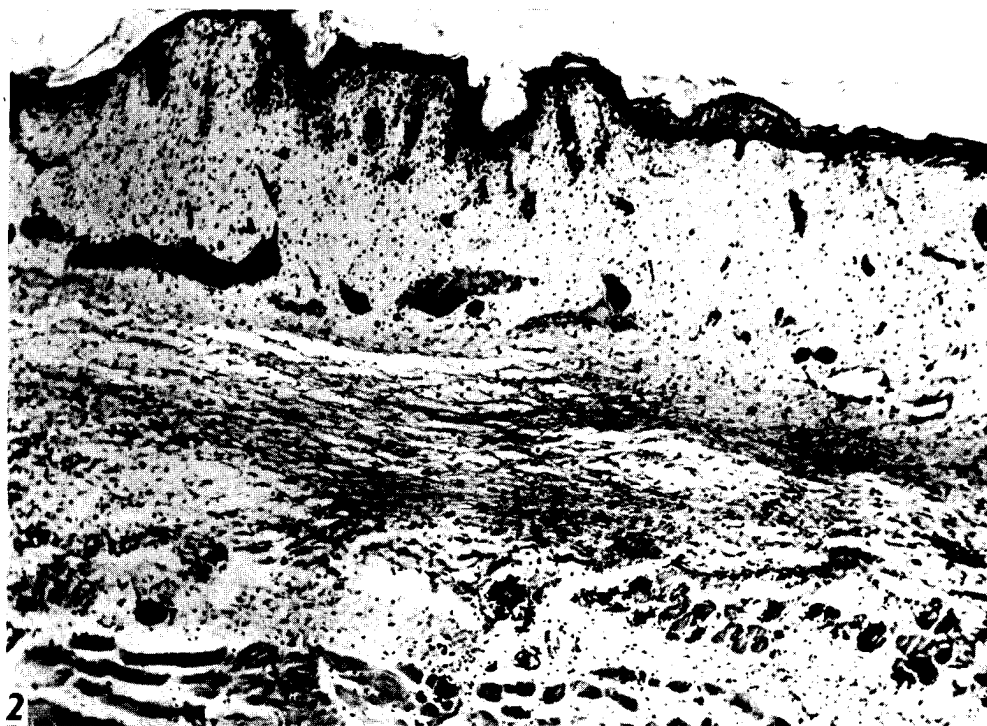


Рис. 2. Гомотрансплантат через 24 часа после операции, Увеличение в 90 раз.
Рис. 3. Гомотрансплантат через 7 дней после операции, Увеличение в 225 раз.
(Парафиновые срезы, окраска гематоксилин-эозином.)

И. Хутная: К вопросу механизма деструкции гомотрансплантатов.

Табл. XXXV.

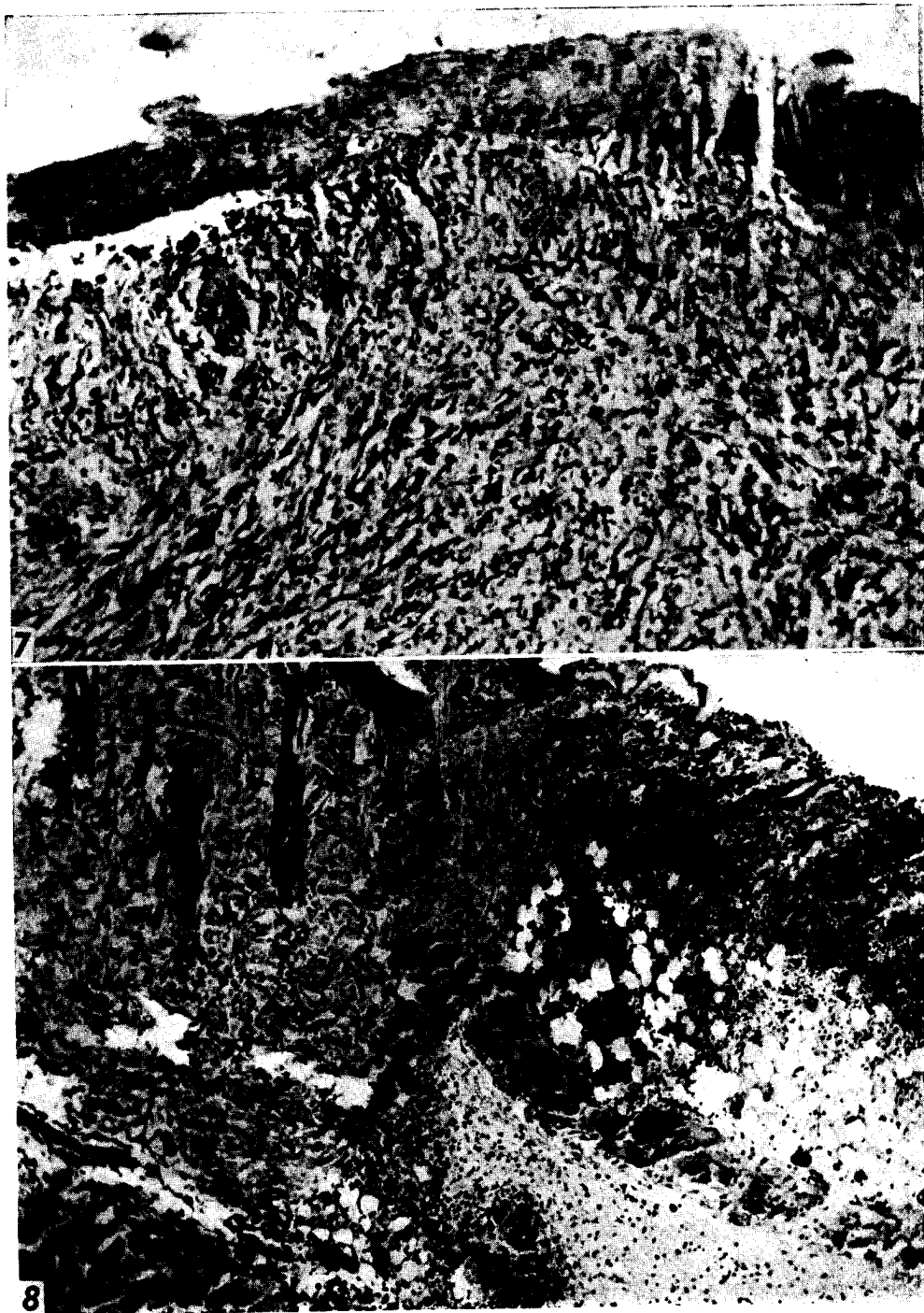


Рис. 7. Гомотрансплантат через 14 дней после операции. Увеличение в 210 раз.
Рис. 8. Гетеротрансплантат через 2 дня после операции. Увеличение в 90 раз.
(Парафиновые срезы, окраска гематоксилин-эозином.)

И. Хутная: К вопросу механизма деструкции гомотрансплантатов.

Табл. XXXVII.

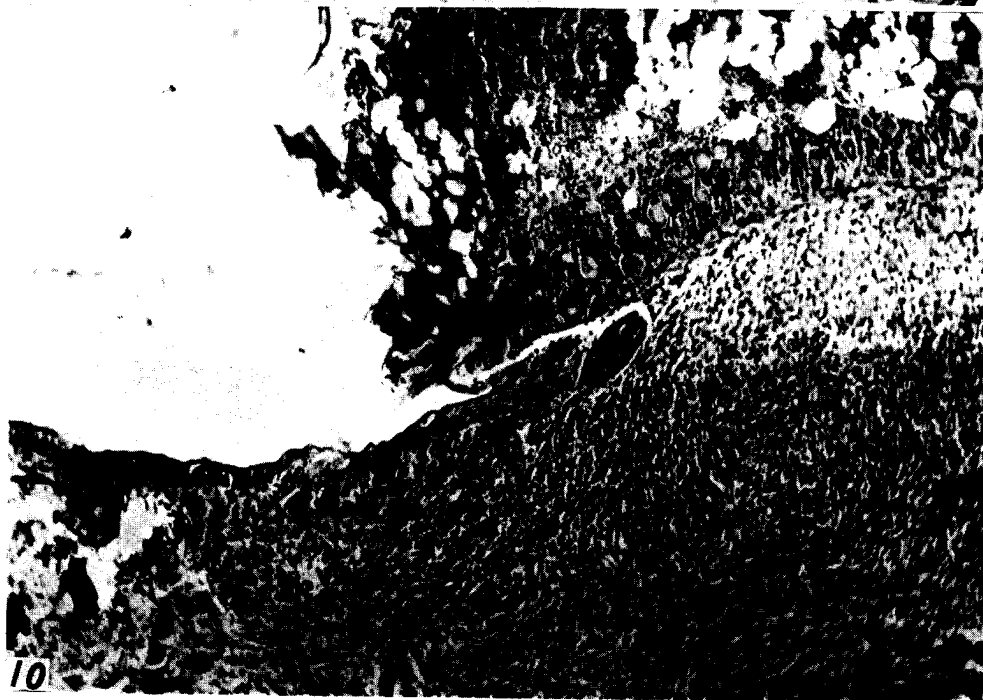
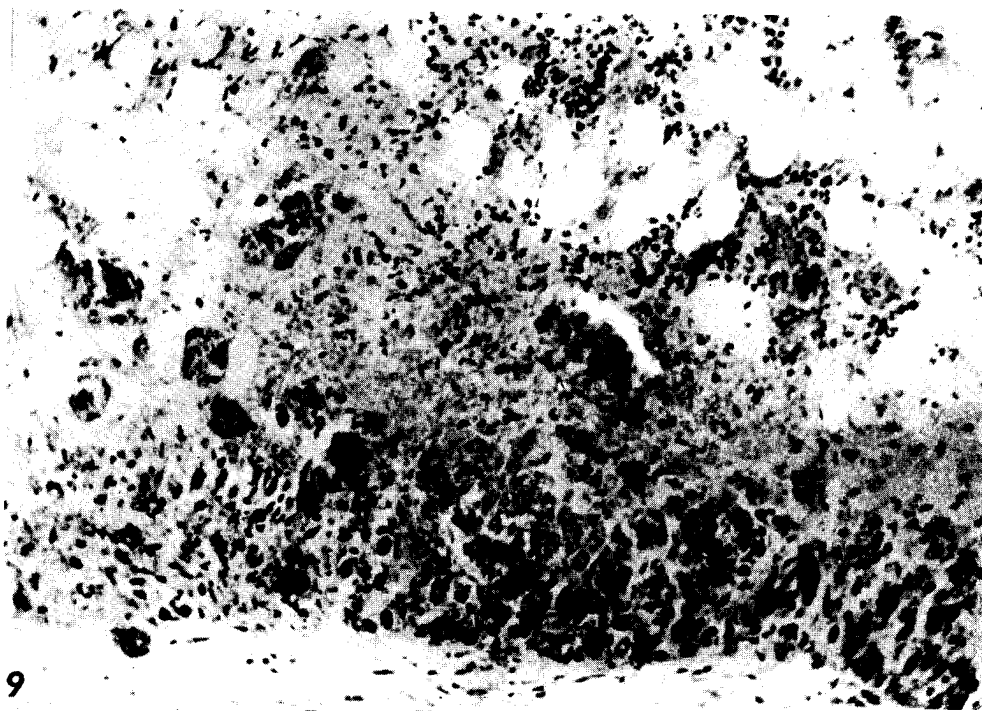


Рис. 9. Гетеротрансплантат через 6 дней после операции. Увеличение в 210 раз.

Рис. 10. Гетеротрансплантат через 8 дней после операции. Увеличение в 90 раз.
(Парафиновые срезы, окраска гематоксилин-эозином.)

СО Д Е Р Ж А Н И Е

C O N T E N T S

I N H A L T

Токин, Б. П.: Научное наследие И. И. Мечникова и вопросы иммунитета эмбрионов. (Tokin, B. P.: The Heritage of I. I. Mechnikoff and Questions of Embryonal Immunity)	261
Граба, Т., Гашек, М и Чумливский, Б.: Иммунологическое сближение у овечьей тройни, естественных эмбриональных парабионтов. (Hraba, T., Hašek, M., Čumlivský, B.: Immunological Approximation of Sheep Triplets, Natural Embryonic Parabionts).	276
Хутная, И.: К вопросу механизма деструкции гомотрансплантатов. I. Сравнительное гистологическое изучение авто-, гомо- и гетеротрансплантатов. (Chutná, J.: On Questions of the Mechanism of Destruction of Homotransplants. I. Comparative Histological Studies of Auto-, Homo- and Heterotransplants)	284
Грозданович, Я.: Иммунологическое сближение у крыс по отношению к мышинной опухоли Crocker-a в эмбриогенезе и постэмбриогенезе. (Grozdanovič, J.: Immunological Tolerance of Rats against Crocker's Tumour during Embryogenesis and Post-embryogenesis)	296
Пуза, А. и Мольнар, И.: Исследования реактивности крысы после внутризародышевых впрыскиваний чужеродных кровяных телец. (Puza, A., Molnár, J.: The Reactivity of Rats after Intra-embryonal Injection of Foreign Blood Cells)	300
Trnka, Z.: The Influence of Protein Deficiency and Excess in the Diet on Immunity Responce. (Трнка, З.: Влияние недостатка и избытка белков в пище на иммунную реакцию)	306
Burger, M., Rokos, J. and Procházka, P.: Effect of Chlortetracycline on the Activity of α -amylase. (Бургер, М., Рокос, И. и Прохазка, П.: Влияние хлортетрациклина на активность α -амилазы)	320
Brief Reports	327