Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD
ACADEMIA SCIENTIARUM BOHEMOSLOVENICA

FOLIA BIOLOGICA

TOMUS II
FASCICULUS 1

NAKLADATELSTVÍ ČSAV

Fol. biol. (Praha) Tom. 2 - Fasc. 1 Praha 20. 3. 1956

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

FOLIA BIOLOGICA (PRAHA)

Международное издание журналов Československá biologie и Československá mikrobiologie

Редакционная коллегия:

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

Переводы на русский язык: доц. д-р Широва, на английский язык: д-р Ридесова, на немецкий язык: д-р Файгль

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

FOLIA BIOLOGICA (PRAHA)

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. Jírovec, 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.

FOLIA BIOLOGICA (PRAHA)

Internationale Ausgabe der Zeitschriften Československá biologie und Československá mikrobiologie

Redaktionsrat:

Akademiemitglied I. Málek (leitender Redakteur), L. Černý, M. Hašek, korresp. Mitgl. d. Čs. Akademie d. Wiss. F. Herčík, Akademiemitglied O. Jírovec, J. Macura, Akademiemitglied 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 A. 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.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc 1

On the Problem of the Microstructure of Living Matter

F. HERČÍK
Institute of Biophysics, Czechoslovak Academy of Science, Brno

Received September 7, 1955

The Significance of Uniform Particles in Phage Formation

One of the most interesting phenomena which may be observed in the development of bacteriophage is the appearance of uniform particles. These particles were observed by Wyckoff (1948), Herčík and Hradečná (1952), Levinthal and Fischer (1952) and more recently by Raettig (1954), who terms them "lysomes". Authors who have hitherto observed these uniform particles do not show any connection between them and the formation of bacteriophage. A detailed electron microscopic examination, however, soon shows that these particles are the precursors of processes leading to the formation of bacteriophage (Herčík 1953). Already some time before these particles had been demonstrated by electron microscopy, Kriss (1947—1948) advanced the hypothesis that phage develops by the aggregation of particles of equal size.

As has already been stated, this aggregation can be observed by electron microscopic examination. At the same time it is possible to ascertain certain circumstances, the validity of which is probably general and which concern the *microstructure of living matter*. Before a bacterium is induced to lyse it appears through the electron microscope as a smooth formation, without any trace of granularity or fibrosity. Through the influence of bacteriophage the body of the bacterium suddenly changes into particles with a diameter of 20—25 mμ. The change of the body of the bacterium into inform particles is sudden (Latarjet 1952). Bacteriophage develops from the considerable amount of these particles in the way described in a previous communication and which will not be dealt with again here. The present aim is to study one feature of these changes—what happens to the particles. Immediately the particles form a circle (the first stage in the formation of bacteriophage) *they lose their individuality;* they usually cease to be spherical particles and merge into a ring, which forms a coherent whole. A kind of leap in the existence of these particles takes place and they pass over into an entirely new phase of their existence. At the same time that they lose their spherical shape and their individuality, a new property appears in these particles, in the coherent substance of the rings. This property is *growth*. The ring expands, becomes thicker, and inside the ring a central projection is formed. It may be said that at the moment when the particles merge into a single whole, a new function of this joint unit, i. e. growth, begins to make its appearance.

The increase in circumference and the growth of the central projection are not, however, caused by the addition of further spherical particles, but the ring evidently increases in size by taking up micromolecular units from the environment, which are not discernible by electron microscopy and with present possibilities could not

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

possibly be discernible. From this it must be assumed that maturing bacteriophage has its own metabolism, that it takes substances from the environment and increases in volume at the expense of these substances. This circumstance has been reliably demonstrated by the biochemical studies of other authors, in particular Cohen (1948).

What conclusions may be drawn from these observations? As already mentioned, the bacterium does not have a globular structure and it cannot therefore be said that the body of the bacterium is formed of particles beforehand. Only when the bacterium is induced to lyse, when the absorbed bacteriophage changes its metabolism, does a large number of spherical particles appear. This means that before the formation of bacteriophage the structure of the body of the bacterium disintegrates, so to speak, into small, clearly defined blocks. This has also been demonstrated in biochemical studies (Cohen). The firm structure of the bacterium, indistinguishable by electron microscopy, changes into small bricks—uniform particles—and these particles integrate back again into bacteriophage. First of all there is disintegration to a lower level of structural complexity, followed by integration into the body of the bacteriophage, which is a structurally more complex formation.

In as far we have up to now (in unpublished experiments) studied the development of bacteriophage in Shigella dysenteriae and Staphylococcus aureus (Rosenberg), it may be assumed that the metamorphosis of the bacterial cell into uniform particles is evidently a general feature of bacteriophagy. Everywhere it was observed that after the action of bacteriophage, the bacterium changed into these uniform particles and often, as ascertained by Raettig (1954) and Herčík and Hradečná (1952), the whole process stops at the phase of uniform particles and there is no formation of bacteriophage (Guélin 1948).

From what has been said above it clearly follows that the microstructure of the bacterial cell forms a *continuity*. There is no morphological distinction between spherical or linear macromolecules, but the entire structure is very closely bound into one coherent whole. The same also applies, however, to bacteriophage, from the moment of its formation. Here, too, bacteriophage forms a higher type of structural unit.

It would, of course, be a mistake to imagine that every type of cell disintegration or the disintegration of living matter in general is connected with the appearance of similar uniform blocks. Cytolysis, which occurs in cells through the agency of disinfectant substances, osmotic shock, the action of antibiotics, etc. did not show disintegration of the particles when examined by electron microscopy, but granular particles of unequal size could be seen. For the time being, therefore, it is possible to speak of disintegration of the particles only in connection with the development and formation of bacteriophage, as one of the stages through which the bacterial cell must pass before bacteriophage is formed.

Laufberger's Conception of the Cellular Grid

Laufberger studied cytometry of cells in relation to the reaction of the environment, from 1928—1934. He found that the size of cells changes and that these changes are dependent on the pH environment. Laufberger worked with the mammalian liver cell, which is formed of a stroma not soluble in water and of a complex of proteins soluble in water. The stroma is composed of protein, arranged in a structure which disintegrates when the cell is broken up.

"Destruction of the cell by a change in pH occurs in two fundamentally different ways, the one being coarse, or non-specific and the other extremely delicate, or specific. The stroma proteins maintain the cell at the isoelectric point at minimal volume by positive and negative charges. If there is a shift from the isoelectric point

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

to the alkali maximum, which is at about pH 10, the cell always disintegrates through non-specific alkalization. A shift to the acid maximum (at about pH 2) does not destroy the cell, since the ion structure of the buffer solution counteracts the disintegrating forces."

In the case of disintegration of the cell by a slight change in pH, the situation is quite different. Laufberger carried out experiments by suspending liver cells in a small flask of buffer solution close to the isoelectric point (e. g. 6), at which the cells are completely resistant. He then dripped buffer solution with a slightly different pH into the suspension. After a certain number of drops, over a third of the cells disintegrated. Cytolysis, known as "immediate cytolysis", was therefore caused by an extremely small change in pH. In consistent investigations on these processes, the author found that the "cytolytic figures" given by the number of drops needed to bring about disintegration are characteristic for the unit under investigation. If the isolated liver cells are percolated with water, however, cytolysis does not occur. Cytolysis returns, however, if the percolated cells are left together with alkali in a thermostat. In this way the ability of cells from horse B to lyse can be transferred to cells from horse A. From this it was deduced that cells contain substances, known as lysotopes, which carry the ability of specific immediate cytolysis.

Laufberger explained the mechanism of the observed phenomena as follows: The cell is held together by an electrostatic field formed from all the protein molecules. If there is a one-sided charge as, for example, with pH 10, then the cell disintegrates according to the law of Coulomb. This does not, however, explain sufficiently the phenomenon of immediate cytolysis. Here it must be assumed that the electrostatic field round every molecule of protein or groups of protein is the same everywhere. This electric field, which is evenly distributed all round the cell, was termed by Laufberger the "symmetrical cell grid". For the maintenance of this symmetrical grid special substances are needed—the lysotopes already mentioned above.

The circumstance that the molecules of protein in the cell form an electrostatic field around themselves does not of necessity mean that there is a cell grid, i. e. that all the micro-fields are the same. A symmetrical grid could exist only if the molecules of the stroma were uniform, i. e. if the cell stroma were composed of one type of protein. With a large number of molecules arranged according to such a law, the structure of the grid would be more complex. But grids of this type are evidently very stable and are not capable of the immediate cytolysis described by Laufberger. "Symmetrisation" of the grid is therefore essential for understanding immediate cytolysis. Laufberger knew that the existence of lysotopes in the cell does not serve to maintain the structure of the cell, but that the lysotopes are the apparatus responsible for the specific "vibration" of the whole cell (Laufberger 1954).

Present Theories on the Structure of Living Matter

If the latest observations on the subject of the microstructure of living matter are studied, it is seen that Laufberger's theories have in many respects been confirmed. There is, for example, the study of the monomolecular layers of the spherical molecules of protein (Polson and Wyckoff 1947), that on decreasing the area in which these spherical molecules are distributed, the individual molecules lose their individuality, become firmly pressed into one another and even lose the capability of hydration. Abderhalden (1944) goes even further and declares that in protoplasm we are not dealing with particles of protein, phosphates, mineral substances, etc. beside one another, but that all these components form a very delicately regulated system, necessary for metabolism. Frey-Wyssling (1949) declares that plasma is a reticular and, at the same time, a corpuscular system. According to Frey-Wyssling

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

(1955), there is no doubt that protoplasm in the state of a gel must have continuity of structure. This does not exclude the basic granular structure in which the individual granules are connected in the form of a chain (beaded chains) and form microfibriles. These beaded chains are an important unit, since the macromolecules are arranged in them in a definite manner. Disturbance of the sequence of the macromolecules, e. g. by grinding in a blendor, leads to the death of the protoplasm by liquefaction. Brettschneider (1951) also demonstrates, on the basis of electron microscopic studies, that in plasma there are molecules, distributed in the form of a network, in which the individual leptones are grouped together in a network with hexagonal spaces. In this way the network achieves exceptional elasticity, which means that the protoplasm behaves physically as a fluid and is therefore, to a certain extent, governed by the laws of capillarity. Moreover, all the elastic and thixotrophic properties of plasma show that plasma is not composed of kinetically independent molecules.

Laufberger's explanation of a cell grid on the basis of non-acid electric charges and of a basic group of trivalent amino acids, is undoubtedly correct. Netter (1951) points out that these groups follow each other periodically and form a certain charge formula for the whole molecule. Because complete equalisation of these charges occurs only rarely, a certain electric vector must be involved. For spheroproteins a di-polar impulse of 200—1,200 . 10^{18} e. s. u. cm. was found.

Present conceptions, therefore, tend to demonstrate that macromolecules in living matter are bound firmly and, at the same time, elastically. The question naturally arises as to what it is that connects and binds these molecules, what forces are involved. On this point the most recent authors express themselves, on the whole, somewhat uncertainly. There is no doubt that on the one hand we are dealing with inter-atomic forces and, more particularly, with intermolecular forces. Of the intermolecular forces which may be active in joining two molecules, the hydrogen bonds are important. Bresler and Talmud (1954), however, point out that the significance of hydrogen bridges should not be over-estimated in relation to electrostatic and van der Waals forces.

Plasma, of course, is not an entirely homogenous formation, but contains granules which have recently been assumed by Medvedev (1954) and Sapota (1949) to be metabolically active. The residue of plasma in which these granules are found is, according to Medvedev, the "metabolic stock for the granules". Schachman et al. (1952) made an ultra-centrifugation analysis of extracts from bacteria and found even distribution of the macromolecular components. The most homogenous of the particles had a molecular weight of 1,000,000.

To return to the conditions which develop during phagolysis: It has been said that bacteria which have been induced to lyse, change in structure. The original, structurally indistinguishable substance is re-formed into a large quantity of particles. This disaggregation is an extremely important phenomenon. Bresler (1949) shows that "the reactions of the spherical proteins—the disintegration of the particles and the joining of one with the other into more complex particles—are actually one of the most important of the more complex processes which take place in living nature". There is no doubt that the reactions, which are visible by electron microscopy in the case of the uniform particles, may be classified as a more complex stage of similar aggregations and disaggregations.

If the conception of the cell grid is used, the whole phenomenon of disaggregation and aggregation may be understood, in the light of present biochemical studies (v. Kozloff 1953), that after inducement by the phage, the whole metabolic activity of the induced cell changes and focuses on the formation of bacteriophage. The nucleosides are reorganised and the phage evidently provides the necessary

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

complex of enzymes (Cohen 1953), in as far as the cell of the induced bacterium is not able to do so itself. During this reconstruction specific material is formed, from which phage develops. At the same time, structural separation of these structural blocks occurs (Herčík 1953, p. 92). It is most likely that this separation, which is connected with the formation of uniform particles, is made possible by the disarrangement of the original cell grid in the form of specific cytolysis, as described by Laufberger. This would indicate that 1) the process of chemical reconstruction and 2) the physicochemical process which leads to the change in structure take place at the same time.

As far as bacteriophage is concerned, a study of this by electron microscopy demonstrates, as it were, how the grid originates: isolated macromolecules merge completely and lose their individual character and form a new unit, which is first a ring and then bacteriophage. Only in the first stages of formation of the ring is it possible to discern these macromolecules, as they are flattened and pressed together and then merge completely. The forces responsible for this merging must be considerable, when we take into account how tiny these macromolecules are (diameter 250 Å) and how elastic.

The question then arises as to whether it is possible to carry out disaggregation of the phage into uniform molecules. For this, certain symmetrising substances would be required, such as capillary-active substances (Bresler 1949). We were successful by means of the action of these substances on the body of the phage (Herčík 1952) in bringing about disintegration of the phage into spherical droplets, which, however, still held together. There was no complete disintegration of the bacteriophage therefore, but the globular structure, which had completely disappeared through the action of the capillary-active substances, re-appeared. The flagellum, however, did not disintegrate but retained the linear arrangement of its spherical molecules without any merging worthy of mention, at all events in the case of bacteriophage T_2, which acts on Escherichia coli.

It is well-known from the literature that bacteriophage is not a very stable unit. If air is driven through a suspension of bacteriophage, there is an increase in the titre, which means that the bacteriophage has disintegrated into smaller lytic units (Steinmann 1946). It was likewise found (Kalmanson and Bronfenbrenner 1939) that the phage, which represents the normal lytic unit, can easily be dissociated into units of much lower molecular weight. It is, of course, necessary to make a detailed study of the physico-chemistry of this disaggregation, since it will probably be shown that the body of the phage actually does form a grid composed of spherical molecules and that it is possible to break up this grid by means of precisely defined procedures. In explaining the formation of bacteriophage, there is no longer any doubt that the conception of Laufberger's cell grid is of great heuristic value. This conception was formulated in the 1930's and is today an extremely progressive conception for a general understanding of the structure of living matter. It is all the more important, therefore, that Laufberger's conception of a cell grid should be supported by the latest research work on the chemistry and physico-chemistry of proteins and that it should be extended as much as possible and studied on the greatest possible number of objects, not only from the present cytometric aspect, but also from the morphological aspect. In this field, electron microscopy opens up a broad avenue of exploration, in particular the electron microscopic examination of cellular disintegration, in which it would be possible to observe directly disaggregation of the cell. Work on this subject has already been planned.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Summary

The conception of Laufberger's cell grid can be used successfully to explain the macromolecular processes which take place during the formation of bacteriophage and which can be observed by electron microscopy.

Literature

Abderhalden, A. (1944), quoted by Schussnig: Handbuch der Protophytenkunde. Jena 1953.
Bateman, J. B.: Large Molecules — Their Physicochemical Properties and Their Architectural and Functional Significance in Living Matter. Höber: Physical Chemistry of Cells and Tissues. London 1947.
Bretschneider, L. H.: Die elektronenoptische Feinstruktur von organischen Kolloiden und dem Grundplasma. Proc. K. Nederl. Akad. Wet., Ser. C. 54, 1951. Quoted by Schussnig
Cohen, S. S.: The Synthesis of Bacterial Viruses. I. The Synthesis of Nucleic Acid and Protein in Escherichia coli B Infected with T_2r + Bacteriophage. J. Biol. Chem., 174 : 281, 1948.
Cohen, S. S.: The Synthesis of Bacterial Viruses. II. The Origin of the Phosphorus Found in the Desoxyribonucleic Acids of the T_2 and T_4 Bacteriophages. J. Biol. Chem., 174 : 295, 1948.
Cohen, S. S.: Studies on Controlling Mechanism in the Metabolism of Virus-Infected Bacteria. Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology. 18 : 221, 1953.
Fano, Ugo: Principles of Radiological Physics. In A. Hollaender: Radiation Biology. New York 1954.
Frey-Wyssling, A.: Physicochemical Behaviour of Cytoplasm. Research 2, 1949. Quoted by Schussnig.
Frey-Wyssling, A.: Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. Protoplasmatologia 2, Wien 1955.
Guélin, A.: Lyse bactérienne par un filtrat bactériophagique sans multiplication des corpuscules. Ann. Inst. Pasteur 75 : 472, 1948.
Herčík, F.: Vliv povrchově aktivních látek na tvorbu bakteriofága. Čs. biologie 1 : 154, 1952. Герчик, Ф.: Влияние поверхностно-активных веществ на образование бактериофага. Чсл. Биология 1 : 167, 1952.
Herčík, F.: Problém bakteriofága. Praha 1953.
Herčík, F., Hradečná, Z.: Fágová bakteriolysa bez tvorby fága. Čs. biologie 1 : 85, 1952. Герчик, Ф. и Градечная, З.: Бактериофаговый лизис без образования бактериофага. Чсл. Биология 1 : 159, 1952.
Kalmanson, G. M., Bronfenbrenner, J.: Studies on the Purification of Bacteriophage. J. Gen. Physiol. 23 : 203, 1939.
Kozloff, L. M.: Origin and Fate of Bacteriophage Material. Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology 18 : 209, 1953.
Latarjet, R.: The Multiplication of Bacterial Viruses Studied by Radiobiological Methods. The Nature of Virus Multiplication. Oxford 1952.
Laufberger, V.: O buněčné mřížce. Biol. listy 19 : 16, 1954.
Laufberger, V.: Rozbití buňky. I. Spisy lék. fak. MU 12 : 69, 1933.
Laufberger, V.: Rozbití buňky. II. Spisy lék. fak. MU 13 : 43, 1934.
Levinthal, C., Fischer, H.: The Structural Development of a Bacterial Virus. Biochem. Biophys. Acta 9 : 419, 1952.
Netter, H.: Biologische Physikochemie. Postdam 1951.
Polson, A., Wyckoff, R. W. G.: Quoted by Schussnig (v. 1, p. 223).
Raettig, H.: Die morphologische Wechselwirkung zwischen Phagen und Bacterien und die Lysome als neues Formelement. Zbl. Bakter. 161 : 260, 1954.
Schachman, H. K., Pardee, A. B., Stanier, R. Y.: Studies on the Macromolecular Organisation of Microbial Cells. Arch. Biochem. 38 : 245, 1952.
Steinmann, J.: Le bactériophage, sa nature et son emploi thérapeutique. Basilej 1946.
Wyckoff, R. W. G.: The Electron Microscopy of Developing Bacteriophage. I. Plaques on Solid Media. Biochem. Biophys. Acta 2 : 27, 1948.
Wyckoff, R. W. G.: The Electron Microscopy of Developing Bacteriphage. II. Growth of T_4 in Liquid Culture. Biochem. Biophys. Acta 2 : 246, 1948.
Бреслер, С. Е.: О строении глобулярных белков и их взаимодействии с внешней средой. Биохимия 14 : 180, 1949.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Бреслер, С. Е., Талмуд, Д. Л.: Краткие замечания по поводу статьи Пасынского и Велицера: К вопросу о теории структуры белковой молекулы. Усп. совр. биол. 37 : 200, 1954.
Крисс, А. Е.: О природе бактериофага. V. Гипотеза о строении бактериофага. Микробиология 17 : 340, 1948.
Медведев, Ж. А.: Биохимические закономерности роста, старения и обновления клеточных форм живой растении. Усп. совр. биол. 35:338, 1953.
Сапота, В. С.: Структурные белки клетки. Вестн. Ленинград. университета 7, 53, 1949.

К вопросу микроструктуры живого вещества

Ф. ГЕРЧИК

Резюме

При фаголизисе наблюдается стадия однородных шариков, которые представляют один из этапов процесса образования бактериофага (Герчик 1953). Перед индукцией бактериолиза бактерия под электронным микроскопом представляется, как совершенно гладкое образование без признаков зернистости или волокнистости. Под действием бактериофага происходит внезапное превращение тела бактерии в шарики диаметром в 20—25 mμ. В дальнейших стадиях шарики сливаются и постепенно превращаются в тело бантериофага. Одновременно с этим они теряют свою индивидуальность и свою шарообразную форму и приобретают новое качество, которого они до того не имели: слошная масса кольца, возникающего из сливающихся шаров, начинает увеличиваться, внутри кольца образуется центральный отросток, — одним словом, наблюдается рост.

Итак, можно сказать, что микроструктура бактериофага является непосредственным продолжением микроструктуры бактериальной клетки. Здесь не заметно дифференциации на сферические частицы или макромолекулы, — напротив, вся структура бактерии представляет неразрывное целое. После индукции бактериолиза наблюдается закономерная дезинтеграция этого целого на шаровидные образования.

Остается вопрос, как объяснить внутреннюю структуру этого целого, — как в случае бактериальной клетки, так и в случае бактериофага. Лауфбергер в 1928—1934 гг. на основании своих наблюдений высказал предположение, что клетка удерживается, благодаря электростатическому полю, образуемому всеми молекулами белков. Это однородное по всей клетке электрическое поле Лауфбергер назвал симметрической клеточной сеткой («решеткой»). В некоторых случаях бывает возможно путем повышения pH разрушить эту сетку, и тогда клетка разлетается в результате немедленного цитолиза. Эта концепция клеточной сетки Лауфбергера отвечает новейшим данным литературы. Весьма вероятно, что решающее значение в клеточной сетке имеет не только электростатическое поле, но и внутриатомные и внутримолекулярные силы.

Но это отнюдь не меняет факта, что представление Лауфбергера относительно клеточной сетки можно с успехом применить для объяснения макромолекулярных процессов, которые осуществляются в процессе образования бактериофага и которые можно наблюдать с помощью электронного микроскопа.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 1

К проблеме фильтрующихся форм бактерий

Д. БЛАШКОВИЧ, В. БЫСТРИЦКИЙ, Б. СТЫК, и В. КОВАРОВА
при техническом сотрудничестве Я. РАУСА и И. ГЛАВАЧОВОЙ
Вирусологический институт ЧСАН, Братислава

Поступило в редакцию 3 XI 1955

Изучение условий возникновения и особенностей фильтрующихся форм бактерий должно производиться в связи с обстоятельствами, сопровождающими их возникновение. Мы говорили о них в своем обобщающем реферате (Блашкович и Быстрицкий 1955а). Собранный до сих пор опыт показал, что в природе фильтрующиеся формы бактерий появляются тогда, когда бактерии долго живут в организме и долго находятся под влиянием очень сложных и трудно определимых условий среды живого организма. В условиях опыта, главным образом при выращивании в искусственных питательных средах, они возникают в результате влияний, которые называют неблагоприятными. Сюда относится действие антибиотиков, солей лития, иммунной сыворотки, бактериофага, механического разрушения, перемежающегося замораживания и размораживания культуры или длительного выращивания в одной и той же питательной среде, содержащей стареющие и уже распадающиеся микробы, и т. п. При оценке некоторых факторов, которые признаются решающими для возникновения фильтрующихся форм бактерий in vitro, не следует забывать, что такие же условия могут создаваться и в организме, способствуя также их возникновению (состояние иммунитета, действие бактериофага, антибиотиков и т. п.). Напоминая об этом, мы не отождествляем, конечно, сравнительно упрощенные условия in vitro с условиями, с которыми микробы сталкиваются в живом организме или в природе вообще.

Настоящая сводка трех отдельных трудов представляет разработку той части проблемы, в которой на основе полученных до сих пор данных исследовались внешние условия, необходимые для возникновения фильтрующихся форм бактерий, и выяснялось, какие морфологические изменения происходят в клетке бактерии под действием пенициллина и других факторов. В качестве модели мы избрали палочку Пфейфера, — паразита и сапрофита человека, — склонность которой к образованию L-форм была уже нами описана и с которой у нас уже имелся опыт экспериментально-патогенетической работы (Блашкович 1942).

I.

В первую очередь мы хотели проверить, представляют ли фильтрующиеся формы бактерий обязательную стадию их онтогенеза (Калина 1951). В этом случае мы должны были бы их найти в ходе размножения бактерий при условиях, которые ничем не препятствуют развитию этого процесса.

Материал и методы

1. *Выбор штаммов.* Мы производили опыты с 3 штаммами палочки Пфейфера, изолированными в случаях воспаления оболочек головного мозга у детей: Н 11, Н 23 и Н 25. Два из них вели себя в эксперименте как b-тип. Путем пассажей на молодых кроликах, весом в 480—880 г, вирулентность и токсичность штамма Н 23 повысились настолько, что 0,2 мл крови заражен-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

ного им кролика в течение 24 час. убивали животное весом в 700 г при картине геморрагической септикемии. Кроме того мы работали с 6 штаммами, изолированными из дыхательных путей.

2. *Питательная среда.* Кроме лабораторных животных, в теле которых палочка Пфейфера размножалась очень сильно, мы использовали в качестве питательной среды амниотическую и аллантоисную полости 9—12-дневных куриных зародышей, в которых мы культивировали палочку в 10 последовательных пассажах.

Зараженные жидкости мы фильтровали через фильтр Berkefeld-а L-3 или же L-5. Следующей питательной средой был бульон из печени с прибавлением 3,3% или 8,3% гемолизированной кроличьей крови. Эти культуры мы фильтровали через фильтр Seitz-а и исследовали фильтраты на присутствие фильтрующихся форм.

Результаты исследований

1. *Попытка получения фильтрующихся форм из инфекционного материала павших кроликов.*

Органы кролика, погибшего после прививки палочки Пфейфера, а именно кровь, части легких, печени и селезенки с большим содержанием микробов, растирались в ступке с физиологическим раствором 1 : 8. Отстоявшийся экстракт фильтровался через фильтр Seitz-а. Фильтрат был обозначен литерой А.

Из экстракта было получено еще 2 фильтрата: первый (В) — это была часть жидкости над осадком после центрифугирования при 1500 об/мин в течение 15 мин., второй (С) — остаток надосадочной жидкости, отстаивавшейся в течение 24 час. при 4° С. Экстракты В и С также фильтровались через фильтр Seitz-а.

Все 3 образца фильтратов были свободны от бактерий. Фильтрат А был посеян на поверхность 10% кровяного агара. После того как фильтрат просачивался в среду, на ее поверхность наносились микроколонии желтого стафилококка. Среда заклеивалась для закрытия доступа воздуха. 15-дневная инкубация при 37,°С не приносила роста колоний. Они не появлялись даже тогда, когда поверхность среды вокруг стафилококка соскабливалась и наносилась на свежий 10% кровяной агар с колониями стафилококка.

Молодой кролик, которому 0,15 мл фильтрата А было введено в мозг, а 0,9 мл внутривенно, страдал поносом и погиб через 8 дней. Кроме энтерита в его органах не было найдено никаких изменений. Палочка Пфейфера не выросла. В легких была найдена Escherichia coli.

Тот же фильтрат (А) был привит в амнион пяти 12-дневных куриных зародышей по 0,2 мл в каждый. Первый пассаж оказался стерильным, остальные были загрязнены микробами атмосферы.

По 0,5 мл фильтратов В и С было перенесено в жидкую среду (бульон из печени с прибавлением 3,5% крови). Даже после 13-дневной инкубации в жидкой среде в ней не наблюдалось никаких микробов.

2. *Попытка получения фильтрующихся форм палочки Пфейфера путем пассажей на куриных зародышах.*

1 менингеальный штамм палочки Пфейфера и 2 штамма из дыхательных путей были привиты в аллантоис 9—12-дневных куриных зародышей. Во всех случаях бактерии сильно разрослись.

Каждый штамм прошел не менее 10 таких пассажей. Жидкость от последнего пассажа (около 40 мл) после фильтрации через фильтр Seitz-а засевалась на поверхность 10% кровяного агара и в амниотическую полость 11-дневных куриных зародышей. Через 3 дня их амниотическая жидкость переносилась в амнион свежих зародышей. Так было последовательно произведено 5—6 пассажей. Ни в одном случае не удалось вырастить палочку Пфейфера.

Фильтрат от 10-го пассажа через аллантоисную полость вводился в нос хорькам (по 2 мл) и мышам (по 4 капли). Через 3 дня после прививки животные

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

убивались и из материала слизистой носа, трахеи, а частью и легких приготовлялась эмульсия с физиологическим раствором, которая впрыскивалась новым хорькам или мышам в нос в таких же количествах. 5 последующих пассажей не привело к появлению ни нормальных, ни L-форм палочки Пфейфера. У хорьков в конце концов активировалась Pasteurella.

Из других штаммов палочки Пфейфера, прошедших пассажами через аллантоис куриного зародыша, фильтраты были получены с помощью фильтра Berkefeld-a L-3 или же L-5. Они впрыскивались в аллантоис куриных зародышей. Аллантоисная жидкость переносилась в аллантоисные полости свежих куриных зародышей. Производилось от 2 до 11 пассажей. Ни в одной аллантоисной жидкости, заражавшейся этими фильтратами, палочка Пфейфера не размножани в нормальной, ни в L-форме.

3. *Попытка получения фильтрующихся форм палочки Пфейфера из жидкой среды.*

2 культуры палочки Пфейфера в бульоне из печени с прибавлением 3,3% гемолизированной кроличьей крови фильтровались после 3-дневной инкубации через фильтр Seitz-a. Фильтрат засевался как в свежую среду того же состава, так на 10% кровяной агар со стафилококком. После 9-дневной инкубации обе среды оставались стерильными.

4. *Морфология палочки Пфейфера, выращивавшейся в куриных зародышах.*

Форма палочки Пфайфера, размножавшейся в аллантоисной полости куриного зародыша, изучалась нами с помощью светового и электронного микроскопов. Найденные нами формы ничем не отличались от форм палочки, выращивавшейся на кровяном агаре, о которых говорилось в нашей предшествовавшей работе (Блашкович и Быстрицкий 1955б).

II.

После безуспешных попыток получить фильтрующиеся формы палочки Пфейфера из фильтратов среды, в которой бактерии размножались очень хорошо, мы пытались вызвать образование L-цикла, опираясь на работы Tulasne (1951), Dienes (1947), Паточки и Сухановой (1951), Нермута и Нечаса (1954, 1955). Опыты мы довели до той стадии морфологических изменений, при которой мы убедились в возникновении т. н. L-цикла у палочки Пфайфера под влиянием различных факторов.

Материал и методы

1. *Выбор штаммов.* Мы работали с 2 штаммами палочки Пфейфера менингеального происхождения и с 3 штаммами, изолированными из дыхательных путей. Это были те же штаммы, что и в предыдущем опыте.

2. *Питательная среда.* a) *Плотная среда.* Перечень применявшихся в опыте видов питательной среды приводится без особой спецификации, в расчете на то, что они общеизвестны. Это т. н. шоколадный агар, обогащенный 1% proteose-pepton Difco № 3, 20% стерильной инактивированной лошадиной сыворотки, 10% дрожжевого экстракта и 15% бараньей крови.

Пенициллин, вызывающий L-цикл, мы наносили в желобок (2000 ед/мл) или на поверхность агара (150—375 ед/мл).

Палочку Пфейфера мы выращивали аэробно или полуанаэробно, с культурой S. marcescens или без нее. Техника посевов бывала всегда одна и та же: мы наносили исследуемую культуру штрихами, параллельными с желобком.

b) *Жидкая среда.* Мы пользовались говяжьим бульоном с прибавлением 10% дрожжевого экстракта, 20% лошадиной сыворотки и 20% кроличьей крови. К этой среде мы прибавляли пенициллин (1, 10, 50, или 100 ед/мл), или же гамма-глобулин, полученный из сыворотки кроликов, иммунизированных палочкой Пфейфера.

c) Т. н. *RM-среда* представляла смесь плотной и жидкой среды в пробирке (косой шоколадный агар с жидкой фазой, содержавшей бульон с 10% дрожжевого экстракта и 20% лошадиной сыворотки).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

d) Препараты для светового микроскопа вырезались из плотной среды по методу Dienes и Smith-a (1944) и окрашивались красителем Giemsa, разведенным на 1 : 200, в течение 2 часов.

e) *Гипериммунная сыворотка и гамма-глобулин* приготовлялись путем иммунизации кроликов и крыс инактивированной культурой палочки Пфейфера; гамма-глобулин из гипериммунных кроличьих сывороток—путем преципитации сыворотки при —4° С с 25% спирта и растворения в физиологическом растворе.

Результаты исследований

1. *Образование L-форм палочки Пфейфера в зависимости от продолжительности действия пенициллина.*

При нанесении пенициллина в желобок в питательной среде следует при описании образования L-колоний принимать во внимание фактор времени, играющий свою роль при просачивании антибиотика в питательную среду.

Мы исследовали 5 штаммов палочки Пфейфера. Все они под действием пенициллина образовали L-формы. Частичный анаэробиоз ускоряет образование крупных круглых телец (ККТ), а тем самым и L-колоний (использование S. marcescens, заклейка чашек Петри).

Сжатый обзор L-цикла палочки Пфейфера на шоколадном агаре с пенициллиновым желобком выглядит на оттисках и мазках, окрашенных по Giemsa, следующим образом:

В течение 2 час. после посева культуры палочки Пфейфера на поверхность шоколадного агара колонии не образовались. Форма микробов не менялась.

Через 4 часа после посева штриховкой под лупой местами заметен на штрихах налет микробов. У штамма из верхних дыхательных путей морфологические изменения микробов в скоплениях не наблюдаются, у менингеального штамма заметны выдающиеся из тела бактерии отростки, утолщения и образование круглых телец (таб. I, рис. 1 и 2).

Через 6 час. после посева в лупу по всей поверхности агара заметны мелкие, едва различимые колонии. Несколько десятков или сотен микробов в поле зрения микроскопа образуют микроколонии. Микробы растут в длину, отличаются неправильными, утолщенными частями тела и образуют ККТ. Иногда встречаются отдельные тельца. ККТ бывают однородные, синефиолетового цвета (таб. I, рис. 3 и таб. II, рис. 4).

Через 8 час. после прививки по соседству с желобком с пенициллином находятся мелкие, едва различимые колонии, а подальше от пенициллина они бывают гораздо крупнее. У штамма из верхних дыхательных путей ККТ образуются вблизи желобка в большом количестве только теперь, тогда как у менингеального штамма они уже сформировались, и в некоторых из них начинается вакуолизация.

Через 12 час. после посева наблюдаются колонии переходного типа, а также колонии чистых ККТ в различных стадиях развития, — от однородных до вакуолизированных и сегментированных многочисленными перегородками. Колонии, удаленные от желобка с пенициллином, бывают меньше 0,1 мм (таб. I, рис. 5 и таб. II, рис. 6).

Через 24 часа после посева поблизости от пенициллина находятся одни только L-колонии, состоящие из L-телец, — по большей части вакуолизированных. Бросается в глаза морщинистая поверхность этих колоний в сравнении с гладкими сферическими колониями вдалеке от пенициллина (таб. III, рис. 7).

Через 36 час. после посева вблизи пенициллина находятся, главным образом, распавшиеся L-колонии, распавшиеся ККТ и множество мелкозернистого вещества вокруг колоний. Несколько дальше от желобка, среди нормальных гладких колоний встречаются и мелкие колонии с изборожденной поверхностью.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Через 48 час. после посева рядом с желобком пенициллина наступает распад L-колоний. Большинство ККТ распадается, в других наблюдаются мелкие зернистые образования или кроткие, правильные коккобациллярные тельца, окрашивающиеся краснофиолетовым. Но кроме них вокруг ККТ и остатков L-колоний находится множество бесформенного зернистого вещества и хорошо сформированных палочек и волокон. Мы полагаем, что это микробы, которые возникают из некоторых распадающихся ККТ в питательной среде, где концентрация пенициллина упала настолько, что уже не вызывает образования новых ККТ и L-циклов. Возникающие так микробы не устойчивы по отношению к пенициллину и в присутствии достаточного количества этого антибиотика немедленно переходят в L-циклы (таб. IV, рис. 9).

Вдали от пенициллина наблюдаются т. н. переходные L-колонии (Паточка и Суханова 1951), происхождение которых мы объясняем так, что уже возникшие нормальные колонии постепенно изменяются в L-колонии, начиная с наиболее старых микробов (таб. III, рис. 8).

Через 72 часа после посева на поверхности среды находится 2 вида колоний: нормальные и L-колонии. Колония, взятая с любого места (вблизи или вдалеке от пенициллина) и перенесенная на 10% кровяной агар, дает начало чистой культуре нормальных колоний палочки Пфейфера. Большинство L-колоний находится в состоянии распада. Вдали от желобка расположены вперемежку т. н. переходные колонии и L-колонии.

Через 96 час. после посева картина такая же, как и через 72 часа. Колонии представлены двумя типами: L-колониями и переходными колониями. L-колонии с сотообразной структурой состоят из остатков L-телец с множством мелкозернистого вещества и с мелкими образованиями в форме палочек яркокраснофиолетового цвета (Giemsa). В мазках при увеличении в 1360 раз кроме ККТ находятся мелкие микробы и волокнистые микробы, а также большое количество мелкозернистого вещества (таб. V, рис. 10).

Через 120 и 144 часа после посева картина культуры отличается от предшествующей только тем, что, кроме распадающихся сотообразных остатков L-колоний в ней находятся и молодые нормальные колонии, состоящие из коротких палочек или волокнистых микробов. В скоплениях фиолетового вещества распавшихся колоний выделяются мелкие краснофиолетовые палочки, возникающие в результате т. н. неполного L-цикла (Tulasne 1951).

Этот опыт, — кроме подтверждения того, что полуанаэробная среда с S. marcescens стимулирует влияние пенициллина на возникновение L-цикла, — принес еще одно открытие: у штаммов палочки Пфейфера, образуемых длинными волокнами (многоядерные клетки — Bisset 1951), L-цикл под действием пенициллина наступает раньше, чем у штаммов в форме коротких палочек.

При долговременных наблюдениях над культурами с пенициллином мы убедились, что там, где после посева все микробы переходили в L-формы, через 4—6 дней начинали появляться нормальные колонии палочки Пфейфера. Специально поставленный опыт показал, что палочка Пфейфера, переходя в L-формы, способна разложить пенициллин в своей округе, так что способные к размножению формы палочки Пфейфера размножаются потом в этих местах путем поперечного деления и дают начало новым нормальным колониям.

2. *Образование ККТ палочки Пфейфера на шоколадном агаре, на поверхность которого был накапан пенициллин.*

ККТ образуются равномерно по всей поверхности среды, побрызганной пенициллином. Культуры палочки Пфейфера брались для исследования через 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 48 и 72 часа после посева. Через 6 час. большинство палочек образует уже ККТ, гомогенное содержимое которых интенсивно

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

окрашивается синефиолетовым цветом (таб. II, рис. 4). Изменения бактерий бывали более многочисленными и выразительными при применении 375 ед/мл пенициллина, чем при применении меньших количеств антибиотика (175 ед/мл).

3. *Образование L-колоний и ККТ в старых культурах палочки Пфейфера.*

Мы проследили морфологию аэробной культуры двух штаммов палочки Пфейфера на шоколадном агаре вплоть до 13-го дня культивации. Начиная с 9-го дня, в старых колониях или на их периферии появлялись более темные островки, в которых позднее можно было распознать вторичные колонии, вырастающие на основе первичных. Они не заметны простым глазом. Их можно открыть при разрезе окрашенных блоков. В этих вторичных колониях нами были найдены волокна с ККТ и свободные ККТ. Колонии имели форму переходных L-колоний палочки Пфейфера (таб. V, рис. 11).

4. *Возникновение L-цикла палочки Пфейфера в жидких и смешанных RM-средах.*

Типы жидкой и смешанной RM-среды содержали по 1, 10, 50 или 100 ед/мл пенициллина, или же 20% гамма-глобулина. В них засевалась 0,1 мл взвеси микробов из 48-часовой культуры на кровяном агаре (1 колония на 1 мл физиологического раствора).

Рост в жидких средах контролировался, во-первых, с помощью мазков, а во-вторых, путем пересева на шоколадный агар и разрезания блоков, взятых с мест прививки через 1, 2, 3, 4, 6, 11 и 16 дней после прививки первоначальной жидкости или смешанной среды. Рост проявлялся в виде слабого помутнения. Были получены следующие результаты:

1. Примесь 50 или 100 ед/мл пенициллина к среде препятствовала размножению палочки Пфейфера. Среда с 10 ед/мл до 6-го дня оставалась без признаков роста бактерий, но через 6 дней удавалось вырастить палочку Пфейфера.

2. Образование ККТ в бульонах и RM-среде с пенициллином (1 ед/мл) бывает в сравнении с плотными средами с пенициллином медленнее и менее выразительно. ККТ бывают мельче.

3. Гамма-глобулин (в отличие от плотной среды) в жидких средах и в RM-среде стимулирует развитие L-цикла палочки Пфейфера уже через 24 часа, когда ККТ в жидкой среде с 1 ед/мл пенициллина в общем встречаются редко.

4. RM-среда с гамма-глобулином через 3 дня приводит к дифференциации таких элементов L-цикла, которые после пересева на шоколадный агар дают начало L-колониям.

5. Переходные L-колонии встречаются наряду с нормальными колониями на шоколадном агаре, на который был перенесен материал из среды, содержавшей гамма-глобилин или 1 ед/мл пенициллина, начиная с 6-го дня культивации палочки Пфейфера в этих средах. Таким образом, длительное действие гамма-глобулина или небольших доз пенициллина способно вызвать L-цикл. Прибавление гамма-глобулина в пропорции 1 : 5 к плотным средам не оказывало такого влияния, как в жидких средах.

5. *Рост L-колоний палочки Пфейфера из лиофилизированного материала.*

Менингеальный штамм палочки Пфейфера, который в высушенном состоянии хранился в течение полутора лет при + 4° С, при пересеве на 10% кровяной агар дал во втором пассаже 2 вида колоний: нормальные и едва различимые, серого цвета, с неровной поверхностью и краями и с L-гемолизисом. Это были типичные L-колонии, а именно B-типа, так как через 3 генерации эти колонии вернулись к обычным формам.

Таким образом, мы произвели испытания многочисленных условий при которых образуются L-формы палочки Пфейфера. Полученные нами результаты

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

служат для ориентировки и показывают, в каком направлении итти в поисках биологически активных фильтрующихся форм. Но прежде всего необходимо было проверить вызываемый пенициллином L-цикл с помощью электронного микроскопа.

(Таб. I, II, III, IV, V)

III.

Получив опыт электронной микроскопии палочки Пфейфера (Блашкович и Быстрицкий 1955б), мы сосредоточили свое внимание на L-цикл, вызываемый у нее пенициллином на поверхности плотной среды. Нашей целью было дополнить исследования Кандлера с сотр. (1954), работавшего с Proteus vulgaris, и Tulasne и Brigmann-a (1952) и Dienes (1953), которые для этого вида приводят размеры жизнеспособных фильтрующихся частиц в границах от 170 до 250 mμ. Впрочем в этих случаях речь идет о зафиксированных L-формах, а не о превращении клетки бактерии в L-форму через т. н. ККТ, как это наблюдали в фазовом контрасте Stempen и Hutchinson (1951) и др.

Материал и методы

1. *Выбор штамма.* Менингеальный штамм палочки Пфейфера выращивался на шоколадном агаре, политом раствором пенициллина в концентрации 200 ед/мл. После того, как пенициллин впитывался в среду, на поверхность агара наносилось 0,2 мл 24-часовой культуры палочки Пфейфера (1 колония в 1 мл физиологического раствора).

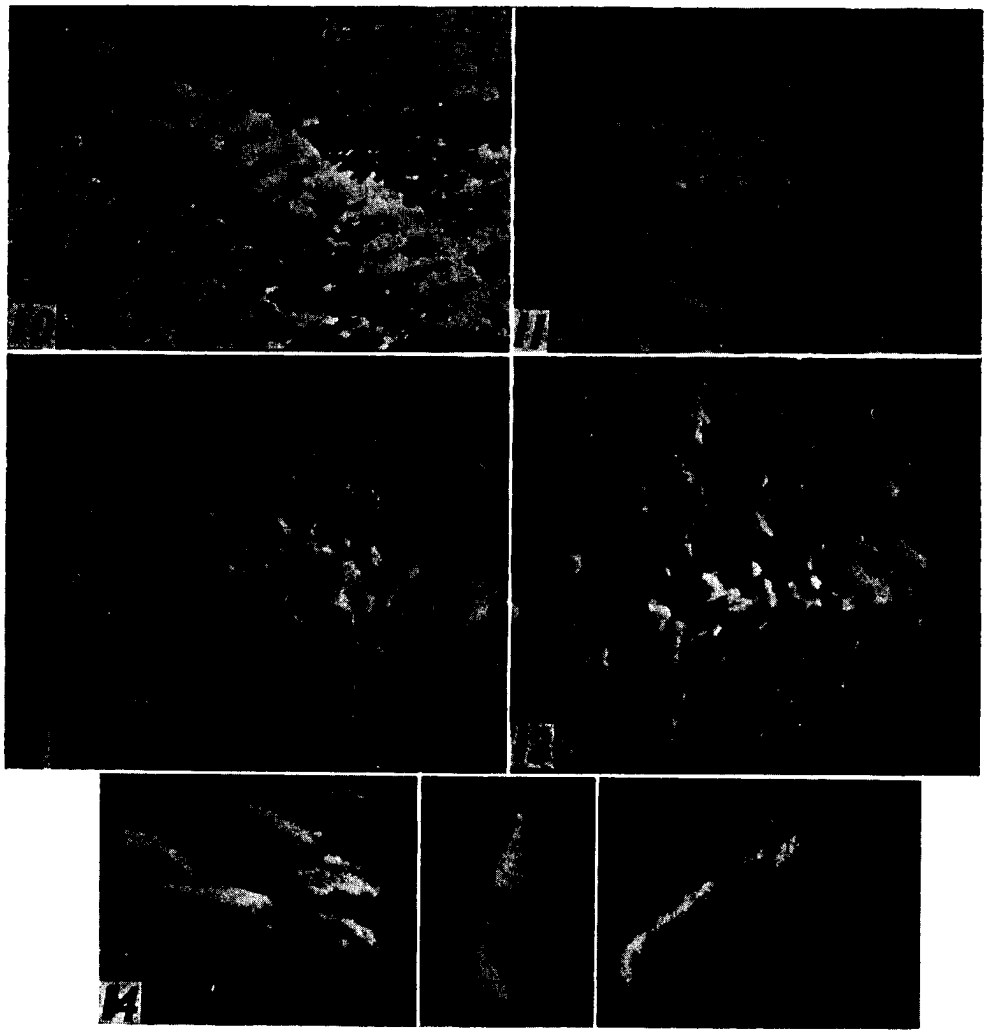
2. *Приготовление препаратов для электронного микроскопа.* Наши усилия были направлены на то, чтобы разработать метод наглядного изображения бактериальных клеток, переходящих в L-цикл, прямо на агаре. С этой целью мы помещали блок, вырезанный из агара, на предметное стеклышко культурой вниз и накапывали на него 3 капли раствора Bouin-a, чтобы колонии или отдельные микроорганизмы отделились от агара. После удаления блока (через 24 часа) препараты фиксировались метиловым спиртом. Часть препаратов мы окрашивали по Giemsa для исследования в световом микроскопе, а вторую часть несколько раз споласкивали дестиллированной водой. Когда препараты просыхали, мы их искоса покрывали хромом (в специальной аппаратуре). Мы брали несколько больше хрома, чем обычно. После этого на препарат наносился слой полистирена (1% раствор в хлороформе). Оттиск, который таким образом превращался, собственно, в негатив («атомная реплика»), мы с помощью полистиреновой пленки снимали в теплой воде. Места с выдавленной поверхностью агара, которые распознаются без труда, мы вырезали ножницами и помещали металлическим слоем вниз на подложные сеточки с коллодиевыми пленками. Вспомогательная полистиреновая пленка растворялась в парах хлороформа или бензена. Препараты изучались с помощью электронного микроскопа марки Siegbahn-Schönander при прямом увеличении в 3000—5000 раз.

Результаты исследований

В 2-часовой культуре мы нашли клетку в начальной стадии образования L-тельца — в форме маленького острого отростка в центре клетки (таб. VI, рис. 1). Правда, в той же культуре встречались и более поздние стадии образования ККТ, так как в посеянной культуре находились клетки различного возраста, т. е. в различной степени реагирующие на действие пенициллина. Рис. 2 на таб. VI представляет несколько более крупный круглый отросток клетки в 6-ом часу инкубации, а рис. 3 на таб. VI — уже сравнительно хорошо развитое ККТ, соединенное с клеткой из 2-часовой культуры. Следующие снимки показывают возникновение ККТ, соединенного с материнской клеткой (6-часовая культура, таб. VI, рис. 4 и таб. VII, рис. 5, 6). В этих тельцах можно различить мелкую зернистость. В 24-часовой культуре ККТ явно еще связаны с остатками клеток (таб. VII, рис. 7). Они отличаются мелкозернистой структурой, но не всегда бывают отчетливо ограничены, что наводит на предположение об их распаде, но только биологический опыт бы мог решить вопрос, приводит ли этот распад к возникновению жизнеспособных мелких телец, или же эти частицы подвергаются автолизу и погибают (таб. VII, рис. 8). Следующий

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8



Таб. VIII а. Палочка Пфейфера. Распад клеток бактерий в зернистость. Рис. 10—13: увеличение в 22.000 раз, рис. 14: увеличение в 15.000 раз.

снимок 24-часовой культуры также изображает остатки бактерии и распадающиеся ККТ (таб. VIII, рис. 9). Среди них видно много мелких частиц, размерами от 100 до 200 mμ. Наблюдая описываемое здесь образование ККТ, мы в 4-часовой культуре видели следующее явление: клетки бактерий — без намека на начинающееся образование L-телец — превращались в гроздья мелких зернышек, приблизительно одинаковых размеров около 100 mμ. Нам случалось наблюдать клетки, сохранявшие первоначальную форму палочки, и однако у них не наблюдалось никакой клеточной оболочки: все их содержимое превратилось в зернистость (таб. VIIIa, рис. 10, 11, 12, 13). Мы пока не можем объяснить этого явления. С помощью описанной нами методики атомных реплик мы приготовили контрольный препарат, исходя из 24-часовой культуры на агаре которая не подвергалась никаким влияниям и которую мы очистили путем

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

центрифугирования в дестиллированной воде. Мазок очищенной взвеси на предметном стеклышке покрывался хромом и снимался полистреном. Снимки атомных реплик таких мазков ясно показывают вполне сохранившуюся бактериальную оболочку (таб. VIII а рис. 14). На основании этого мы судим, что наблюдавшаяся нами зернистость — не артефакт, возникший в связи с методом препаровки. Задачей дальнейших исследований будет проверить, является ли наблюдавшаяся нами зернистость артефактом, или же это распад под действием пенициллина или другой возможной причины.

(Таб. VI, VII, VIII)

Дискуссия

Изучив литературу о биологическом значении фильтрующихся форм бактерий (Блашкович и Быстрицкий 1955а), мы приступили к первой фазе опытов с палочкой Пфейфера для определения условий, при которых возникают фильтрующиеся формы. Прежде всего необходимо было проверить, являются ли фильтрующиеся формы обязательной стадией онтогенеза бактерий (Калина 1951). Поэтому мы стремились получить фильтрующиеся формы в условиях, которые не препятствуют размножению бактерий, — как из лабораторных животных, погибших от острой септикемической инфекции, так и из жидкой среды или из среды развивающегося куриного зародыша (полость аллантоис).

В этих условиях нам не удавалось получить из фильтратов жизнеспособные фильтрующиеся частицы, хотя мы точно следовали методике, описанной Сукневым и Вольферц (1932). Мы знаем, что способные к размножению фильтрующиеся частицы получаются редко (Красильников 1954) и зависят от количества находящихся в засеваемом материале частиц (Klieneberger-Nobel 1951), но, в соответствии с широко поставленными опытами Трнки (1955), мы придерживаемся того взгляда, что возникновение фильтрующихся форм не может быть регулярной стадией в онтогенезе бактерий. Поэтому мы обратились к опытам получения L-форм под действием различных веществ, которые всеми относятся к факторам, влияющим неблагоприятно на процессы жизнедеятельности бактерий, включая и размножение, — так как у L-форм бактерий фильтрующаяся стадия известна.

Мы исследовали влияние на палочку Пфейфера пенициллина и получили результаты, отвечающие тем, которые публиковались до сих пор. Однако мы убедились, что действие пенициллина, просачивающегося сквозь плотную среду, различно в зависимости от того, в какой фазе развития находится сообщество микробов. С очень большой вероятностью мы с помощью метода окрашенных оттисковых препаратов культур палочки Пфейфера различного возраста доказали наличие т. н. неполного L-цикла (Tulasne 1951). А и В-колонии L-форм мы рассматриваем как результат различной длительности действия внешнего фактора (напр., пенициллина). Возможно, что и в природе под действием невполне выясненных причин протекают аналогичные процессы.

Для получения L-форм палочки Пфейфера мы использовали также старые культуры, на базе которых возникают вторичные L-колонии, а также действие специфического гамма-глобулина в жидких и смешанных питательных средах (RM-среда).

В качестве необходимого дополнения к наблюдениям в световом микроскопе мы исследовали возникновение и судьбы L-форм, а в особенности ККТ, и с помощью электронного микроскопа, для чего мы разработали метод атомных оттисков, сохраняющий бактериальные клетки in situ. Мы получили представление о возникновении ККТ, для которого нет необходимости в двух бактериальных клетках, и о составе тела бактерии и ККТ под непрерывным действием

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

пенициллина. При этом мы нашли в теле бактерии и в ККТ крупинки диаметром около 100 mμ, значение которых нам пока неизвестно.

Вышеизложеные исследования должны послужить основанием для работ по вопросам существования и значения фильтрующихся форм палочки Пфейфера.

Резюме

Из литературы предмета мы старались составить себе представление о биологическом значении фильтрующихся форм бактерий. На модели опыта с палочкой Пфейфера мы пытались получить фильтрующиеся её формы или определить условия, при которых они возникают. Мы учитывали результаты биологических опытов и препараты для светового и электронного микроскопов.

В первую очередь мы хотели проверить, являются ли фильтрующиеся формы обязательной стадией онтогенеза бактерий. Мы пытались поэтому получить фильтрующиеся формы палочки Пфейфера из культур менингеальных штаммов (3) и штаммов из дыхательных путей (6). Мы фильтровали через фильтр Seitz-a или Berkefeld-a L-3 и L-5 следующий материал:

а) солевой экстракт органов погибших кроликов, которым был привит менингеальный штамм палочки Пфейфера,

б) культуры штаммов различного происхождения, выращенные в жидких питательных средах и прошедшие не менее, чем 10 пассажами в полости аллантоис куриного зародыша.

Фильтраты засевались на соответственную плотную питательную среду (10% кровяной агар с колониями желтого стафилококка), на жидкую среду (бульон из печени с прибавлением 3,5% крови) и прививались восприимчивым животным (кролик, мышь, хорек) и куриным эмбрионам.

Существование фильтрующихся форм, которые возвратились бы к исходной форме бактерий, не было нами доказано. Не были найдены и фильтрующиеся формы, наличие которых можно было бы отметить с помощью метода «кормилки».

Мы не думаем, что фильтрующиеся формы являются стадией онтогенеза бактерий, размножающихся в благоприятных условиях.

Эти отрицательные результаты направили наше внимание на возникновение L-циклов под действием различных внешних условий.

1. Мы описали действие пенициллина в плотной питательной среде на 5 штаммов палочки Пфейфера, 2 из которых были изолированы в случаях воспаления мозговых оболочек ребенка. Все штаммы образовали ККТ, а у 2 из них путем систематического наблюдения культур в 2-часовых интервалах с большой вероятностью было доказано наличие т. н. неполного L-цикла (Tulasne 1951). Так как пенициллин, прибавляемый к среде в желобок или в отверстие, просачивается в питательную среду постепенно, он оказывает влияние на различные стадии образования колоний, которые, пройдя через стадию переходных L-колоний, через некоторое время приобретают форму типичных L-колоний.

2. Первоначально нормальные колонии палочки Пфейфера, изменившиеся под действием пенициллина в L-колонии, биологически равноценны с устойчивыми или частично стабилизированными A и B-типами L-форм.

3. При L-цикле под влиянием пенициллина палочка Пфейфера разлагает этот антибиотик и тем самым прекращает его антибиотическое действие.

4. L-формы палочки Пфейфера были нами получены в старых культурах на шоколадном агаре, начиная с 9-го дня инкубации. Далее L-формы возникали под влиянием специфического гомологного гамма-глобулина в RM-среде (смесь плотной и жидкой среды). Жидкая среда удобна, как кажется, для получения стабилизованной L-формы, так как вызывающие её образование импульсы действуют в такой среде дольше.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Из лиофилизированных культур палочки Пфейфера также удалось в течение 3 генераций получать L-формы.

Описанные опыты должны способствовать выяснению значения L-цикла у бактерий и решению вопроса, когда в течение этого цикла возникают жизнеспособные фильтрующиеся формы бактерий. Мы хотим так с помощью опыта пролить свет на процессы, протекающие в организме хозяина.

Чтобы проверить данные светового микроскопа при увеличении, позволяющем различать элементарные частицы L-форм бактерий, мы проследили образование ККТ под влиянием пенициллина у палочки Пфейфера и в элктронной микроскопии. Были получены следующие результаты:

Мы наблюдали образование ККТ палочки Пфейфера под действием пенициллина. Из удлиненной палочки вырастает отросток, который увеличивается в объеме и закругляется. Диаметр ККТ бывает около 4—5 микрона. В течение 24 час. исчезают контуры ККТ, которое распадается в зернистость, заметную уже и до этого в содержимом ККТ, или в бесформенную массу.

Кроме образования ККТ мы наблюдали в среде с пенициллином скопления содержимого клетки бактерии в однородную зернистость, утрату клеточной оболочки и рассеяние крупинок в окружающую среду вне клетки. При предшествовавших наблюдениях с помощью электронного микроскопа мы такого распада не наблюдали.

Литература

Блашкович, Д. и Быстрицкий, В.: Морфология палочки Пфейфера (Haemophilus influenzae Pfeiffer) в электронной микроскопии. Fol. biol. (Praha) 1 : 355, 1955б.

Калина, Г. П.: Фильтрующиеся формы бактерий. Труды института микробиологии 1 : 45, Москва 1951.

Красильников, Н. А.: О неклеточных формах у микроорганизмов. Усп. совр. биологии 37 : 22, 1954.

Нермут, М. и Нечас, О.: L-формы бактерий. I. Изменения формы Proteus vulgaris, вызываемые пенициллином. Чсл. Биология 3 : 370, 1954.

Нермут, М. и Нечас, О.: L-формы бактерий. II. Влияние анаэробных условий на изменения формы Proteus vulgaris под действием пенициллина. Fol. biol. (Praha) 1 : 257, 1955.

Сукнев, В. В. и Вольферц, Г. А.: Выявление фильтрующихся форм бактерий с помощью «кормилок» из бактериофаговых фильтратов и сущность феномена бактериофагии. Вестник микробиологии, эпид. и паразит., 11, 1932.

Bisset, K. A.: The Morphology and Cytology of Bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 5 : 1, 1951.

Blaškovič, D. a Bystrický, V.: Biologický význam filtrovatelných foriem baktérií. Čs. biologie 4 : 496, 1955a

Blaškovič, D.: Über experimentelle Möglichkeiten mit dem b-Typus H. influenzae Pfeiffer. Zbl. Bakter. I. Orig. 149 : 202, 1942.

Dienes, L.: Electron Micrographs Made from L-forms of Proteus and Two Human Strains of Pleuropneumonialike Organisms. J. Bact. 66 : 280, 1953.

Dienes, L., Smith, W. E.: The Significance of Pleomorphism in the Strains of Bacteroides. J. Bact. 48 : 25, 1944.

Kandler, G., Kandler, O.: Untersuchungen über die Morphologie und die Vermehrung der Pleuropneumonieähnlichen Organismen und der L-phase der Bakterien. II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen. Arch. Mikrobiol. 21 : 202, 1954.

Klieneberger-Nobel, E.: Filtrable Forms of Bacteria. Bact. Rev. 15 : 77, 1951.

Patočka, F., Suchanová, M.: Bakteriální cyklus t. zv. L-forem mikrobů. Biol. listy 32 : 90, 1951.

Stempen, H., Hutchinson, W. C.: The Formation and Development of Large Bodies in Proteus vulgaris OX-19. I. Bright Phasecontrast Observation of Living Bacteria. J. Bact. 61 : 321, 1951.

Trnka, Z.: Pokusy o získání nebuněčných forem brucelly kultivací na kuřecím zárodku. Kandidátská práce, Praha 1955.

Tulasne, R., Bringmann, G.: Données nouvelles apportées par le microscope électronique sur la morphologie des formes L des bactéries. Rev. Immunologie, 16 (4—5) : 327, 1952.

Tulasne, R.: Les formes L des bactéries. Rev. Immunologie, 15, 223, 1951.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

On the Problem of Filtrable Forms of Bacteria

D. BLAŠKOVIČ, V. BYSTRICKÝ, V. KOVÁROVÁ and B. STYK

Summary

By studying the literature an attempt was made to form an opinion on the biological significance of filtrable forms of bacteria. In a model experiment with Pfeiffer's Haemophilus influenzae an attempt was made to obtain filtrable forms and, if possible, to define the conditions under which these develop. The results were obtained from biological experiments and from preparations studied by photo and electron microscopy.

In the first place confirmation was sought as to whether filtrable forms develop as an essential ontogenetic stage of bacteria. An attempt was therefore made to obtain filtrable forms of Pfeiffer's Haemophilus influenzae, from cultures of meningeal strains (3) and of strains from the respiratory tract (6). The following material was filtered through a Seitz or a Berkefeld filter L 3 and L 5:

a) a saline extract of the organs of dead rabbits which had been inoculated with a meningeal strain of Pfeiffer's Haemophilus influenzae,

b) cultures of strains of varying origin which had been cultured on fluid nutrient media and had been passed through at least ten passages in the allantoic cavity of the chick embryo.

The filtrates were inoculated on to suitable nutrient media (10% blood agar with colonies of Staph. aureus), fluid media (liver broth with the addition of 3.5% blood), on to sensitive animals (rabbits, mice, ferrets) and on to chick embryos.

The presence of filtrable forms which reverted to the original bacterial form were not demonstrated. Nor were filtrable forms which might be demonstrated by the phenomenon of satellitism.

We are not convinced that filtrable forms of bacteria are an ontogenetic stage of bacteria living in conditions favourable to their multiplication.

Following these negative results attention was paid to the formation of the L-cycle through the action of various external influences.

1. The action of penicillin in solid nutrient media on five strains of Pfeiffer's Haemophilus two of which were isolated in children with meningitis is described. All strains formed large round bodies (LRB) and in two strains, the cultures of which were kept under constant observation at two-hourly intervals, a so-called "incomplete" L-cycle was demonstrated with the greatest degree of probability (Tulasne 1951). When penicillin placed in a cannula or in an opening in the nutrient medium is absorbed into the medium gradually, it has an effect on the bacteria at the various stages of development of the colonies. After a time these take on the form of typical colonies of the L-form, via a transitional L-colony.

2. The originally normal colonies of Pfeiffer's Haemophilus which are changed by the action of penicillin into L-colonies, are not equivalent biologically to stable or partially stabilized A and B types of L-forms.

3. The L-cycle of Pfeiffer's Haemophilus produced by the action of penicillin in turn breaks down the antibiotic and thereby destroys its antibiotic properties.

4. L-forms of Pfeiffer's Haemophilus were obtained in old cultures on chocolate agar from the ninth day of cultivation. L-forms also developed by the action of specific homologous gamma globulin in mixed solid and fluid media (RM environ-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

ment). Fluid media are perhaps suitable for obtaining a stabilized L-form if the influences evoking it have prolonged action.

L-forms in three generations were also successfully obtained from lyophilised cultures of Pfeiffer's Haemophilus.

These experiments are intended to assist in understanding the significance of the L-cycle of bacteria and in finding out whether viable filtrable forms of bacteria are produced in the course of this cycle. The experimental conditions are arranged in such a way as to approximate to the processes which take place in the host organism.

In order to confirm the findings obtained by photo microscopy, by the use of the highest magnification permitting the elementary particles of the L-forms of the bacteria to be distinguished, the formation of large round bodies of Pfeiffer's Haemophilus by the action of penicillin was also observed by electron microscopy. The following results were obtained:

Using electron microscopy, the formation of large round bodies (LRB) in Pfeiffer's Haemophilus, produced by the action of penicillin, was observed.

From longer bacilli a process grows out, which increases in size and becomes spherical in shape. The diameter of this large, round body is about 4—5 microns. Within 24 hours the contour of the large round body disappears and it disintegrates into granules which were already previously visible in the contents, or into a formless substance.

In connection with the formation of large round bodies, a grouping of the contents of the bacterial cell into uniform granules, loss of the cell membrane and dispersal of these granules into the medium were observed on media containing penicillin. Such disintegration had not been found in previous observations using electron microscopy.

(Plates I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII)

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 1

The Transfer of Antibody Formation by Means of Nucleoprotein Fractions to Non-immunised Recipients*)

J. ŠTERZL and M. HRUBEŠOVÁ
Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science,
Department of Microbiology, Praha

Received September 9, 1955

The present communication contributes further findings on intermediary processes in the formation of antibodies. The work is based on the following experimental findings (Šterzl 1955): For 24—48 hours after administration of an antigen into the organism, fully formed and immature antibodies cannot be demonstrated in tissue homogenates and extracts of mesenchymal tissues (spleen, bone marrow). If this tissue is transferred to non-immunised animals, antibodies can be demonstrated in the recipient within a very short space of time (as early as after 24 hours). It has been shown that the formation of antibodies in the recipient is not brought about by antigen present in the transferred tissue. It should be noted that antibody formation can be transferred through the tissue of an immunised animal to 5-day-old rabbits, although at that age rabbits do not react to the amount of antigen used for immunisation by the formation of antibodies, even when normal spleen tissue is injected at the same time as the antigen. It was likewise not possible to demonstrate that the formation of antibodies is evoked by the antigen after this has been enzymatically changed in the tissue of the immunised animal. Antibody formation can only be transferred to the same species of animal as the donor from which the transferred tissue was taken. From these findings it was concluded that the evoking of antibody formation in the recipient is bound up with a specific functional change in the mesenchymal tissue of the donor.

The present communication deals with the question as to which cell components are involved in the ability to transfer antibody formation. It further deals with the question as to whether nucleoproteins are actually a stage of antibody formation. This question arose because in earlier experiments we succeeded in demonstrating that antibodies can be isolated from the tissue as nucleoproteins (Šterzl 1954). In the present work, in order to exclude the possibility that the isolated nucleoprotein is a complex of fully-formed antibody and nucleic acid, the nucleoprotein is isolated 24 and 48 hours after immunisation, i. e. at a time when antibodies cannot as yet be demonstrated serologically in the tissues. An attempt is then made to transfer antibody formation to non-immunised recipients by means of the nucleoprotein thus obtained.

Methods

Immunisation of donors: A 1 ml. heat-inactivated suspension of S. paratyphi B (5×10^7 microorganisms per ml.) was administered intravenously to rabbits with an average weight of 2 kgs. The animals were exsanguinated 24 and 48 hours after immunisation and the spleen then removed and immediately prepared in a refrigerator at + 2° C.

*) Gist of paper presented at the Immunology Conference at Liblice, 1. 12. 1954.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Dounce's method (Dounce 1943) was used for isolating the nuclei from spleen cells. The granular fraction was obtained by means of a modification of the method of Schneider and Hogeboom (1950) using 0.25 M saccharose (1 : 4) and fractional centrifugation. The homogenate was first centrifuged in 0.25 M saccharose at 220 g. for 30 minutes; the supernatant was then centrifuged at 700 and 4,000 g. for 15 minutes each. The supernatant obtained by centrifuging at 4,000 g. was centrifuged for 2 × 10 minutes at 5,000 g. The sediment was suspended in 0.14 M NaCl. This granular fraction was observed microscopically. The Janus green test confirmed the presence of mitochondria. The rabbits were injected with the suspension in 0.14 M NaCl.

The nucleoproteins were prepared from a homogenate of splenic cells carefully pressed out of the membranes by extraction with 0.14 M NaCl (Mirsky, Pollister 1947). The spleen was ground up with 2.5 volumes of 0.14 M NaCl for 30 minutes and freed of cell fragments by filtering through silk. The nuclei were centrifuged and the supernatant treated with 5 volumes of 96% alcohol. The precipitate formed was suspended with stirring in 0.14 M NaCl. The insoluble residue was centrifuged. The clear supernatant contained ribonucleoprotein. The process of dissolving in 0.14 M NaCl and precipitating with 2.5 volumes of alcohol was repeated several times (Šorm, Hrubešová 1955). After centrifuging and decanting the supernatant containing ribonucleoprotein, the nuclei were extracted with 1 M NaCl. The viscous solution freed from cellular débris by centrifuging was treated with 6 volumes of distilled water. The fibrous desoxyribonucleoprotein precipitated was dissolved in 1 M NaCl and the process of precipitating and dissolving was repeated several times.

The nuclear, mitochondrial and nucleoprotein fractions thus obtained were transferred to non-immunised rabbits immediately after isolation, i. e. on the same day.

Total nitrogen was determined by the micro-Kjeldahl method, phosphorus by the method of Berenblum and Chain (1938). The presence of purines and pyrimidines was demonstrated by paper chromatography of the hydrolysates (Markham and Smith 1951).

Purine nitrogen was determined by the method of Graff and Maculla (1935). The ultra-violet absorption measurements were made with a Beckmann spectrophotometer, model DU. The ribonucleoprotein solutions, which were discoloured when first obtained, were adapted for spectral measurement by precipitation with acetone (Anson, Mirsky 1929—1930). Desoxyribose was determined by the method of Dishe (1930) and ribose by the orcinol method (Mejbaum 1939). The amino-acid composition of the protein component of the nucleoprotein was determined by paper chromatography of the total hydrolysate (Keil 1954).

The whole process of preparation was also carried out with the tissues of non-immunised animals.

Agglutinating and immature antibodies were determined in the nucleoprotein fractions, the former by storing for six days in a refrigerator, the latter by the Coombs test and the blocking test. The Coombs serum was prepared by the immunisation of Syrian hamsters with rabbit serum. The titre of the Coombs serums was determined by precipitation and haemagglutination.

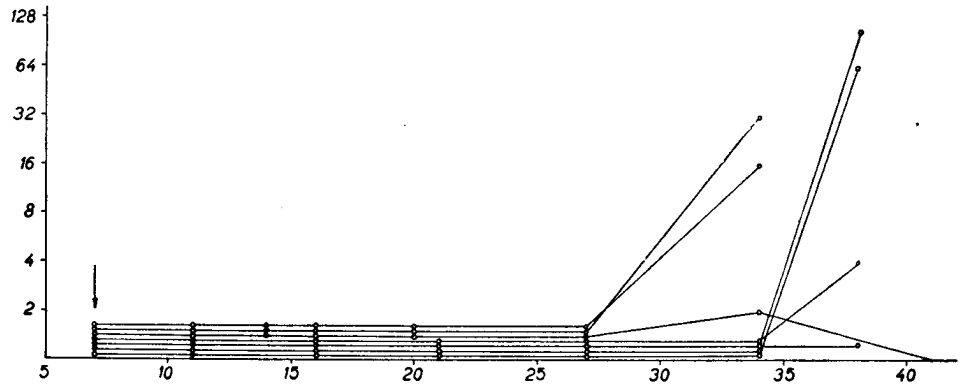


Fig. 1. The injection of 1 ml. of bacterial antigen (S. paratyphi B, 5 × 10^7 micro-organisms) into 7-day-old rabbits from one litter.

Transfer was made to 34 adult rabbits with an average weight of 2 kgs. Blood was collected daily. After excluding the possibility of the participation of the antigen, transfer was made mainly to 5 day old rabbits. In all, 89 young rabbits from 12 litters were used in these experiments. Blood was collected from all the young rabbits by cardiac puncture, on the 3rd, 5th, 7th, 9th, 12th, 16th, 20th, 25th and 30th days after administration. The serum was freed of lactic and lipoid substances by shaking with an equal volume of chloroform and the chloroform was then removed by centrifugation. Agglutinating antibodies were determined by storing in a refrigerator at + 2° C.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Results

In the first place, the fact (already described in an earlier communication) was again confirmed, that immunisation of 5-day-old rabbits with the immunisation dose administered to an adult donor (1 ml. 5×10^7 micro-organisms) does not evoke antibody formation in these young animals for at least one month (fig. 1).

If, in the same period, a mitochondrial fraction or a nuclear fraction, isolated from the tissues of immunised animals, is administered intraperitoneally, agglutinating antibodies can be determined in the serum of young rabbits within a few days after injection (fig. 2). The percentage of positive results with transfer of a nuclear fraction is less than with transfer of a mitochondrial fraction (fig. 3).

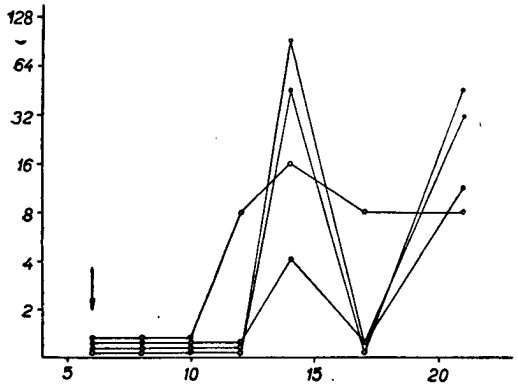


Fig. 2. The intraperitoneal injection of 1 ml. suspension of mitochondrial fraction isolated from the spleen of four rabbits (Nos. 172, 321, 092 and 939), which had all been immunised intravenously 48 hours before with 1 ml. of 2×10^9 micro-organisms of S. paratyphi B. One ml. of suspension of the mitochondrial fraction contains 180.0 γ N.

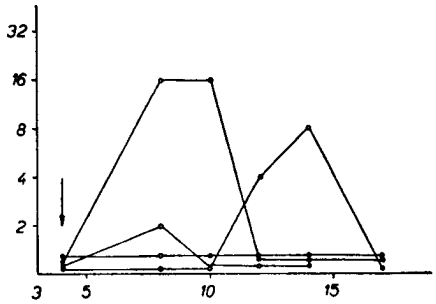


Fig. 3. The administration of 1 ml. suspension of nuclear fraction from the spleen of the same animals as in fig. 2, to 4-day-old rabbits. 1 ml. of the suspension of nuclear fraction contained 1,300 γ N.

In further experiments nucleoprotein fractions were transferred. For ribonucleoprotein solutions, maximum extinction was at 260—270 mμ (fig. 4). The rabbits were injected with the solution in 0.14 M NaCl (1 ml. containing 80—700 γ of total N). In all preparations the test for desoxyribose was negative and for ribose positive. Purine nitrogen comprised 7—8% of total nitrogen. The proportion of nitrogen in relation to phosphorus was relatively high in these preparations (from 3.9 to 7.9), indicating a high content of protein component. The presence of purines and pyrimidines was confirmed chromatographically.

Maximum extinction for the solutions of desoxyribonucleoproteins was at 250 to 260 mμ (fig. 5). The rabbits were injected with the solution in 1 M NaCl (1 ml containtaining 110—300 γ of total nitrogen). The test for desoxyribose in the preparation was positive. The proportion of nitrogen to phosphorus was within the limits of 1.9—3.9. The presence of purines and pyrimidines was again confirmed chromatographically.

Paper chromatography of the total hydrolysate (6N/HCl/16 hrs./105° C) showed that the nucleoproteins isolated from the spleen of an immunised donor have a different amino-acid composition from that of normal serum gamma globulin, in that several amino acids are absent. Work is being continued on this subject. Neither

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

complete nor incomplete antibodies were found in the nucleoprotein fractions by the methods described.

Nucleoprotein fractions transferred to adult rabbits give rise to antibodies as early as after 24 hours (fig. 6). From the recording of antibody values it is evident that the antigen is transferred together with the nucleoprotein fractions. Active immunisation is confirmed primarily by the length of time the level of the antibodies is

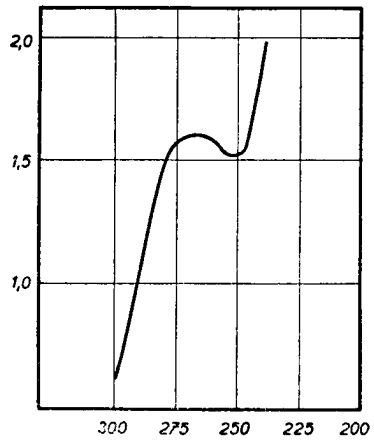


Fig. 4. Ultra-violet spectrum of ribonucleoprotein isolated from the splenic tissue of a rabbit immunised 48 hours previously with 1 ml. suspension of antigen (2×10^9 micro-organisms). 1 ml. of the solution of RNP contained 400.0 γ N, 102.1 γ P, N/P 3.9. x axis: values of wave lengths in mμ. y axis: extinction values.

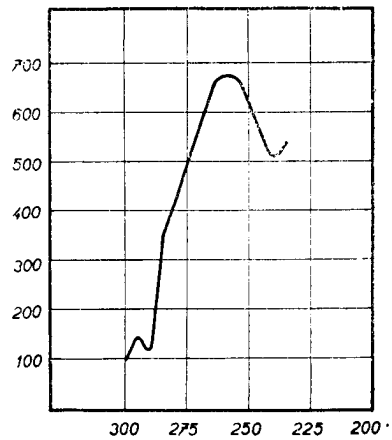


Fig. 5. Ultra-violet spectrum of desoxyribonucleoprotein isolated from the splenic tissue of a rabbit immunised 24 hours previously with 1 ml. suspension of antigen (2×10^9 micro-organisms). 1 ml. of the solution of DNP contained 229.65 γ N, 85.0 γ P, N/P 2.7. x axis: values of wave lengths in mμ. y axis: extinction values . 10^3

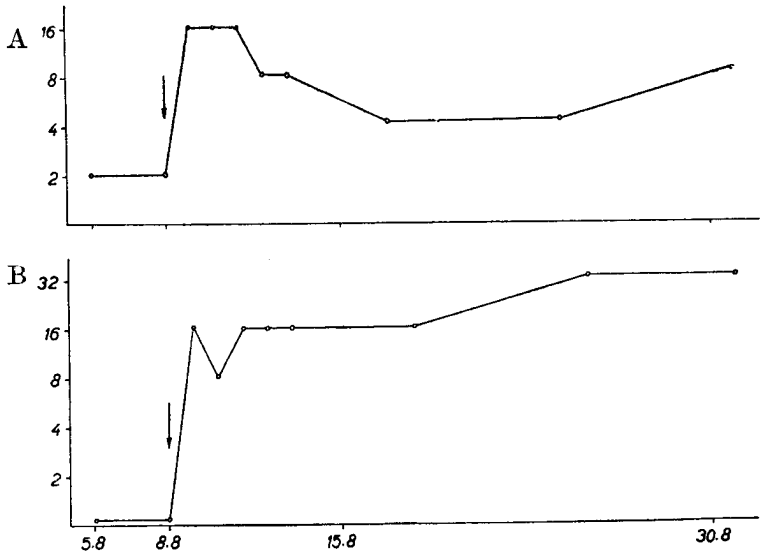


Fig. 6. A. Rabbit No. 42 injected intravenously with 5 ml. solution of ribonucleoprotein isolated from the spleen of rabbit No. 972, immunised 48 hours previously with 1 ml. suspension of antigen (5×10^7 micro-organisms). 1 ml. of the solution of RNP contained 102.18 γ N, 26.2 γ P, N/P 3.9. — B. Rabbit No. 50 injected intravenously with 5 ml. solution of desoxyribonucleoprotein isolated from the spleen of rabbit No. 972, immunised 48 hours previously with 1 ml. suspension of antigen (5×10^7 micro-organisms). 1 ml. of the solution of DNP contained 92.24 γ N, 40.0 γ P, N/P 2.3.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

maintained. From experiments with the transfer of nucleoprotein fractions to adult animals, it is impossible to determine in what measure nucleoprotein fractions participate in the non-specific activation of metabolic processes and how far they speed up the reaction to the transferred antigen.

These difficulties are overcome by transferring nucleoprotein fractions from the tissues of immune and normal animals to 5-day-old animals. Ribo-and desoxyribonucleoprotein isolated from the spleen of normal animals does not give a demonstrable titre of antibodies in the serum of young animals. Transfer of a ribonucleoprotein fraction from the spleen of an animal immunised 24 hours previously has no influence on the formation of antibodies in young animals. Nucleoprotein fractions isolated 48 hours after immunisation (both ribonucleoprotein and desoxyribonucleoprotein) and administered intraperitoneally, evoked the formation of antibodies in young animals (figs. 7, 8 and 9). The titre of antibodies determined in young animals after the transfer of desoxyribonucleoproteins isolated from the tissue of adult animals 24 and 48 hours after immunisation, shows the same relation as described in the transfer of whole cells of immunised tissue (Harris et al. 1954): the longer the contact of the antigen with the tissues of the immunised animals, the more rapid the development of antibodies in the non-immunised recipient.

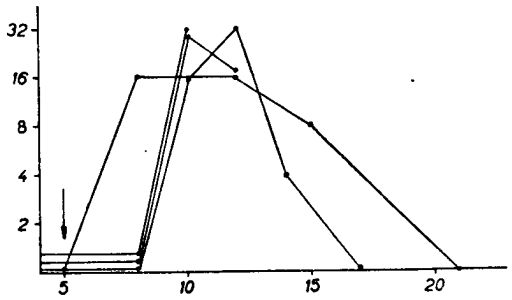


Fig. 7. 5-day-old rabbits each injected with 1 ml. solution of ribonucleoprotein isolated from the spleen of rabbits Nos. 92 and 93, immunised 48 hours previously with 1 ml. antigen (2×10^9 micro-organisms) administered intravenously. 1 ml. of the solution of RNP contained 378.4 γ N, 48.4 γ P, N/P 7.8.

From the results submitted it is evident that the ability to form antibodies can be transferred to young animals (which are not as yet capable of reactiug to an actual antigen by antibody formation), if they are injected with a mitochondrial

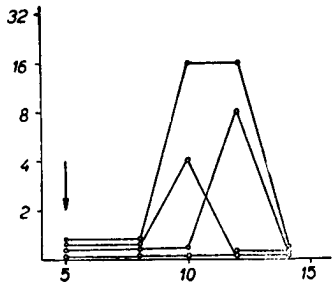


Fig. 8. 5-day-old rabbits injected with 1 ml. solution of desoxyribonucleoprotein isolated from the spleen of rabbit No. 082, immunised 24 hours previously with 1 ml. antigen (2×10^9 micro-organisms). 1 ml. of the solution of DNP contained 229.65 γ N, 85.0 γ P, N/P 2.7.

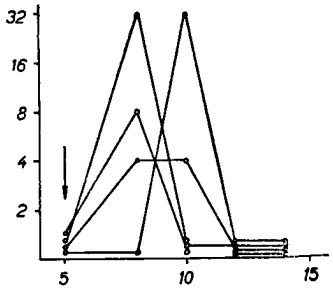


Fig. 9. 5-day-old rabbits injected with a solution of desoxyribonucleoprotein isolated from the spleen of rabbits Nos. 172, 321, 092 and 939, immunised 48 hours previously with 1 ml. suspension of antigen (2×10^9 micro-organisms). 1 ml. of the solution of DNP contained 249.9 γ N, 65.0 γ P, N/P 3.82.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

or nuclear fraction of the mesenchymal tissue of immunised animals. The same effect can be achieved with nucleoprotein fractions of the same tissues (ribonucleoprotein and desoxyribonucleoprotein).

Discussion

By means of fractional centrifugation groups of cellular granules can be obtained, which are more or less the same size in every group. Of course, through the influence of certain other factors (adsorption, mechanical tearing-off, etc.) the particles in the fractions are not distributed in exactly the same way, nor are they homogenous as regards type. The purity of these fractions should be considered from this aspect, particularly in the case of such heterogenous material as splenic tissue. In this connection the question arises as to whether the positive results obtained in the transfer of nuclei (which were not so consistent as in the transfer of the mitochondrial fraction 5,000 g.) are not produced by the presence of other cell particles, or even of whole cells.

In this connection is it necessary to estimate the definability of these nucleoprotein fractions, in particular the ribonucleoprotein fraction. Even though it may be expected that by the preparation process the nucleoproteins are freed from a number of ballast and freely bound protein components, it is not possible from a chemical analysis to define the preparation with complete certitude as a nucleoprotein with a single type of bound protein. For a more accurate determination of the protein component of nucleoproteins immunochemical methods will be used.

It is also necessary to consider whether the nucleoprotein which is transferred does not contain the already formed antibody, which has become bound to the nucleic acid either intracellularly or during the process of isolation. This possibility is excluded by the chronological sequence of the experiment. At the time when the nucleoproteins are isolated from the tissue of the immunised animals, serologically demonstrable antibodies have not yet been formed in the organism. Not even the antibody effectiveness of splenic tissue (isolated 24 and 48 hours after immunisation) could be demonstrated in experimental infection (Šterzl 1955). That the nucleoprotein isolated from the splenic tissue and the serum antibodies are not identical is also indicated by the different qualitative content of the amino acids in the nucleoprotein fraction as compared with serum gamma globulin.

In the first place it is necessary to discuss the conception of the effect of the transferred sub-cellular cell fractions and nucleoprotein complexes. Let us assume that sub-cellular and nucleoprotein fractions are transplanted in intraperitoneal transfer to young animals. In a suitable energo-metabolic environment, the transferred fractions evidently retain their specific character (which originates through the reaction in the immunised animals) and release specific antibody protein into the serum. It is not possible to decide whether, on transfer of an immature antibody, a kind of completion or "purification" of the antibody protein takes place in the recipient (e. g. separation of the nuclear component from the nucleoproteins) or whether there is actual proliferation of the transferred protein molecules, as provisional quantitative findings by Stavitsky (1954) would appear to indicate.

The transfer of antibody formation by isolated fractions can also be explained by their containing a catalysing or equalising mechanism, which has the effect of adjusting specific proteosynthesis in the recipient. This means that it is necessary to ascertain experimentally whether the transferred fractions start a sequence of new biochemical reactions or whether they are a direct structural part of the antibodies demonstrated in the recipient. It is therefore impossible, without experimental confirmation, to exclude the possibility of the influence of the nucleic acid

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

itself, isolated from the tissue of the immunised donor, on metabolic changes in the non-immunised recipient.

It is perfectly clear that the above-mentioned possibilities are not only bound up with the question of antibody formation, but that they are at thesame time basic questions of the origin of proteins in the organism, i. e. of proteosynthesis. They are therefore the subject of further experimental work.

Summary

The work deals with the possibility of transferring antibody formation to non-immunised recipients (5-day-old rabbits) by cellular fractions and nucleoproteins isolated from the splenic tissue of immunised animals. This method excludes the possibility of the action of an antigen transferred with the fraction, on antibody formation in the recipient.

A description is given of the isolation process for both cellular and nucleoprotein fractions and of the chemical characteristics of the nucleoproteins isolated from the spleen.

Antibody formation was found in the serum of young animals following the transfer of nuclear and mitochondrial fractions.

The transfer of antibody formation to young animals was also successfully carried out, both with ribonucleoprotein and also with desoxyribonucleoprotein isolated from the tissue of immunised animals.

In the discussion a possible explanation of the effect of the transferred fractions is mentioned, with reference to the formation of antibodies as a model of proteosynthesis.

Literature

Anson, M. L., Mirsky, A. E.: Protein Coagulation and its Reversal. The Preparation of Insoluble Globulin, Soluble Globulin and Haeme. J. Gen. Physiol. 13 : 469, 1929—1930.

Berenblum, I., Chain, E.: An Improved Method for the Colorimetric Determination of Phosphate. Biochem. J. 32 : 195, 1938.

Dishe, Z.: Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen. Mikrochemie 8 : 4, 1930.

Dounce, A. L.: Enzyme Studies on Isolated Cell Nuclei of Rat Liver. J. Biol. Chem. 147 : 685, 1943.

Graff, S., Maculla, A.: The Composition of the Tissue Proteins. I. The Estimation of Purines in Tissues. J. Biol. Chem. 110 : 71, 1935.

Harris, S., Harris, T. N., Farber, M. B.: Studies on the Transfer of Lymph Node Cells. III. Effect of Variation in the Interval between the Injection of Antigen into the Donor and Collection of its Lymph Node Cells. J. Exp. Med. 110 : 269, 1954.

Keil, B.: O bílkovinách XXVI. Fotometrická analysa bílkovinných hydrolysátů. Chem. listy 48 : 725, 1954.

Markham, R., Smith, J. D.: Chromatographic Studies of Nucleic Acids. Biochem. J. 49 : 401, 1951.

Mejbaum, W.: Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. Z. physiol. Chem. 258 : 117, 1939.

Mirsky, A. E., Pollister, A. W.: Chromosin, a Desoxyribosenucleoprotein Complex of the Cell Nucleus. J. Gen. Physiol. 30 : 117, 1947.

Schneider, W. C., Hogeboom, G. H.: Intracellular Distribution of Enzymes. V. Further Studies on the Distribution of Cytochrome C in Rat Liver Homogenates. J. Biol. Chem. 183 : 123, 1950.

Stavitsky, A. B.: Participation of Popliteal Lymph Node and Spleen in the Production of Diphtheria Antitoxin in the Rabbit. J. Infect. Dis. 94 : 306, 1954.

Šorm, F., Hrubešová, M.: O bílkovinách XXX. Inhibice pankreatických proteás pankreatickou ribonukleovou kyselinou. Chem. listy 49 : 115, 1955.

Šterzl, J.: Obranné pochody. Mesenchymální tkáň při infekci a imunisaci. Praha 1954.

Šterzl, J.: The Demonstration and Biological Properties of the Tissue Precursor of Serum Antibodies. Fol. biol. (Praha) 1 : 193, 1955.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Перенос способности к образованию антител на неиммунизированных реципиентов нуклеопротеидными фракциями

Я. ШТЕРЦЛЬ и М. ГРУБЕШОВА

Резюме

Мы исходим из наблюдения, что через 24—72 часа после иммунизации возможно перенести способность к образованию антител вместе с мезенхимальной тканью иммунизированного животного на неиммунизированного реципиента. Прямое действие антигена, переносимого вместе с пересаживаемой тканью, исключается тем, что мы пересаживаем ткани 5-дневным крольчатам, которые не реагируют еще на вводимый антиген образованием антител. Биологические качества неготовых антител были нами рассмотрены в предыдущей работе (Штерцль 1955).

В настоящей работе мы рассматриваем вопрос, какие клеточные фракции принимают участие в переносе будущих антител и можно-ли осуществить их перенос с нуклеопротеидами, изолированными из клеток мезенхимальной ткани.

Мы переносили, во-первых, ядерную и митохондриальную фракции клеток, а во-вторых, дезоксирибонуклеопротеид и рибонуклеопротеид, изолированные из ткани селезенки. Мы приводим описание приемов изоляции клеточных и нуклеопротеидных фракций и химическую характеристику нуклеопротеидов.

Если одновременно вводились внутрибрюшинно митохондриальная и ядерная фракции, то уже через несколько дней после инъекции можно было в сыворотке крольчат найти агглютинирующие антитела. При переносе митохондриальной фракции процент позитивных результатов бывает выше.

При переносе на взрослых кроликов нуклеопротеидные фракции дают антитела уже через 24 часа. Реакция образования у них антител свидетельствует об активной иммунизации, которая вызывается переносимым с этими фракциями антигеном. Мы исключили влияние антигена путем переноса фракций на 5-дневных крольчат. После переноса нуклеопротеидных фракций (как рибонуклеопротеидов, так и дезоксирибонуклеопротеидов, изолированных из селезенки донора через 48 час. после иммунизации) мы могли доказать присутствие антител в сыворотке реципиента.

В дискуссии приводятся возможные способы объяснения действия переносимых фракций в смысле образования антител, как модели протеосинтеза.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 1

Жизнеспособность клеточных фрагментов дрожжей

IV. Связь между ядром и способностью к росту

О. НЕЧАС

Институт общей биологии медицинского факультета университета в Брно

Поступило в редакцию 19 IX 1955

В предшествовавших работах мы описали (Нечас 1955а, б, с) эволюционные изменения плазматических шаров дрожжей и регенерацию клеток. Настоящая работа посвящена подробному разбору отношения ядра к процессам роста и регенерации клеточных фрагментов.

Одним из наиболее важных нам представляется вопрос, действительно ли развиваются только те плазматические шары, которые содержат ядро, — или способны расти и шары без морфологического ядра. Данные литературы в своем большинстве сходятся на том, что к регенерации способны только ядерные фрагменты клеток (напр., Klebs 1887а, б, Провазек 1907, Lynch 1919, Haberlandt 1919, 1929 и др.). Существует однако целый ряд работ, которые очень убедительно доказывают, что и безъядерные фрагменты способны не только к выживанию в течение продолжительного времени, но и к некоторым восстановительным процессам и даже к росту. Так Acqua (1891) и Palla (1889, 1890, 1906) наблюдали образование морфологической клеточной оболочки у безъядерных частей клеток высших и низших растений. Наиболее важны очень точные опыты Hämmerling-а (1934а, б, 1946) с ацетабулариями. Их безъядерные части не только растут, но и дифференцируются в почти нормальные растеньица. Что здесь имеет место действительно рост, обусловленный синтезом белков, в последнее время доказали Brachet и Chantrenne (1951) с помощью меченого углерода. Опыты О. Б. Лепешинской (1952), в которых она пытается доказать возможность возникновения ядра в безъядерных плазматических шарах из клеток гидры, до сих пор не получили подтверждения.

Методика

Для выявления ядер дрожжей мы пользовались реакцией по Feulgen-у со следующими видоизменениями: фиксация по Carnoy, гидролиз в течение 5—7 мин. в 1/n HCl при 60° C, реагент Schiff-а на 2—3 часа. Окраска железным гематоксилином производилась по классическому методу Гайденгайна. В фазовом контрасте ядра плазматических образований бывают заметны лишь в редких случаях.

Результаты

Зависимость роста плазматических шаров от присутствия ядра. Плазматические шары, возникающие в результате механического растирания клеток, содержат ядра в незначительном числе случаев. Причиной этого является то, что ядра от давления разрушаются раньше, чем плазма (как мы доказали на

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

основании соотношения между общим объемом плазматических шаров и общим количеством ядер — Нечас 1955а), а также то, что протопласт одной клетки (в нашем случае одноядерной) раздавливается на большое количество обломков. В автолизате плазматические шарики содержат ядра гораздо чаще, приблизительно в 60—70% случаев. Это объясняется тем, что все клеточные ядра сохраняются, а протопласт распадается на небольшое количество частей, — а, вероятно, и тем, что в подвергшейся автолизу культуре, которая всегда не моложе нескольких дней, безъядерные шары погибают, благодаря чему возрастает относительное количество плазматических шаров с ядром.

Если сравнить процент способных к росту плазматических шаров из механически гомогенизированной массы и из автолизата, то оказывается, что в первом случае развивается только 0,5% плазматических шаров, тогда как во втором случае — 50—60% (из расчета на приблизительно 2000 плазматических шаров).

	% плазматических шаров с ядрами	% плазматических шаров, способных развиваться
Из гомогенизированной массы	7	0,5
Из автолизата	60—70	50—60

Так как не было возможно одновременно следить за развитием плазматических шаров и наблюдать ядра, мы должны были удовлетвориться изучением препаратов, зафиксированных в различие периоды развития плазматических шаров. После посева плазматических шаров в питательную среду мы брали образцы через каждых полчаса — час. В препаратах, окрашенных по Feulgen-у можно было видеть, во-первых, не развивающиеся плазматические шары с ядром, во-вторых, не развивающиеся безъядерные образования и, наконец, — и это наиболее часто, — развивающиеся образования с ядром. В течение первых 12 час. не было найдено ни одного развивающегося плазматического образования без ядра.

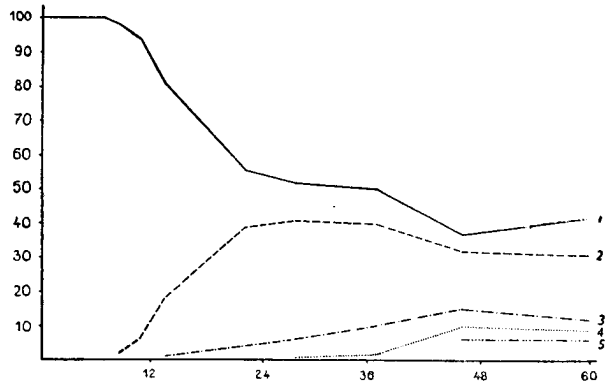


График 1. Ось X — возраст плазматических образований в часах, ось Y — процент образований с определенным количеством ядер. Кривая 1 : 1-ядерные образования, 2: 2-ядерные, 3: 3-ядерные, 4: 4-ядерные, 5: 5-ядерные и многоядерные.

Из приведенных фактов можно сделать косвенный вывод, что в большинстве случаев развиваются те плазматические шары, которые содержат ядро.

Деление ядер в плазматических образованиях. Ядро в плазматических шарах и в плазматических образованиях в начале их развития имеет вид совершенно нормального ядра дрожжевой клетки (рис. 1, 2, 3). Первое деление ядра наблюдается через 6—12 час. после пересева плазматического шара в питательную среду. В 16-часовой культуре насчитывается уже приблизительно половина двухъядерных плазматических образований (график 1, рис. 2). Трехъядерные образования начинают появляться чаще через 24 часа (рис. 3). Однако в этот период происходит уже деление самих образований, что в значительной мере

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

искажает картину деления ядер. Очень часто от плазматических образований отделяются части плазмы, вовсе не содержащие ядра. Часто небольшой изолированный участок плазмы содержит несколько ядер, тогда как другой, крупный, только одно ядро. В неделящихся плазматических образованиях, особенно в шарообразных, количество ядер все время увеличивается и через 48 час. может дойти до 8—10 (рис. 4, 5, 6, 7). Количество ядер не зависит от размеров плазматических образований: некоторые сравнительно небольшие образования бывают прямо набиты ядрами, тогда, как другие очень крупные, содержат всего по нескольку ядер. Как видно, нуклео-плазматическое соотношение не сохраняется.

В первых фазах развития плазматических образований ядра в препаратах, окрашенных по Feulgen-у, имеют нормальный вид. Позднее окрашиваемость ядер по Feulgen-у резко снижается, ядра приобретают значительные размеры, неотчетливые контуры и бледнорозовую окраску. Мы полагаем, что эти явления вызываются сильным набуханием ядра. Этому отвечает и весьма низкая степень вязкости плазмы в этой стадии развития плазматических образований. В плотных же плазматических образованиях ядра приобретают уже внешний вид и окрашиваемость нормальных клеточных ядер. Гематоксилином ядра плазматических образований окрашиваются очень хорошо, — гораздо лучше, чем в нормальных дрожжах. В некоторых случаях нам удавалось с помощью фазового микроскопа наблюдать и ядра in vivo. Их размеры, количество и расположение отвечают данным фиксированных препаратов, окрашенных по Feulgen-у или гематоксилином (рис. 8).

На основании имеющегося у нас материала мы не вправе делать выводы относительно механизма деления ядер в плазматических образованиях. В вопросе деления ядер дрожжей в научной литературе существует значительная неоднородность взглядов (Schussnig 1953). Наблюдая плазматические образования, мы находили такие явления, которые защитники прямого деления ядер у дрожжей считали бы амитозом (рис. 10), и такие явления, которые отвечают митотическим фигурам, отстаиваемым другими авторами. Очень часто ядерный хроматин сгущается в два продолговатых тельца, которые Badian (1937), Subramaniam (1953) и Duraiswami (1953а, б) считают хромосомами, а Levan (1946), Lindegren и Rafallko (1950) и Lietz (1951) — скоплениями хромосом. У некоторых плазматических образований, особенно с очень длиными отростками, можно кроме ядер отчетливо видеть по нескольку Feulgen-позитивных крупинок, свободно лежащих в плазме. Их можно было бы считать блуждающими хромосомами, которые Levan (1946) наблюдал при атипичных митозах дрожжей под действием камфоры и других факторов.

Из графика видно, что частота делений ядер в плазматических образованиях гораздо меньше, чем у дожжевых клеток, у которых бывает приблизительно 3-часовый интервал между делениями (Henneberg 1926). Деление ядер в плазматических образованиях протекает с промежутками в 6—12 час., т. е. в 2—4 раза медленнее. У вторичных дрожжевых клеток, восстанавливающихся из плазматических образований, генерационные периоды или остаются такими же длительными, или постепенно приближаются к норме.

Ядра при регенерации клеток из плазматических образований. Плотные плазматические образования, из которых путем почкования возникают дрожжевые клетки, содержат обычно значительное количество ядер, которые выглядят уже, как ядра нормальных дрожжей. С помощью реакции по Feulgen-у нам несколько раз удавалось зафиксировать непосредственно регенерирующие образования. Первые поколения клеток также бывают обычно многоядерными (рис. 11 А). Иногда в каждой из них бывает даже больше ядер, чем в первоначальном плазматическом образовании (рис. 11 В). В течение дальнейших

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

генераций клеток количество ядер постепенно уменьшается, и, наконец, возникают одноядерные клетки. Однако мы изолировали несколько штаммов восстановившихся клеток дрожжей, у которых многоядерность осталась постоянным признаком.

Дискуссия

Развивающиеся плазматические образования с самого начала содержат форменное ядро. Мы не находили ни одного случая развития плазматического шара без ядра, несмотря на то, что было изучено несколько десятков препаратов с несколькими тысячами объектов. Чем больший процент плазматических шаров содержит ядра, тем большее количество их бывает способно к росту. На основании этих двух фактов можно сделать вывод, что, вероятно, развиваются только те плазматические шары, которые содержат ядро. В одной из своих прежних работ (Нечас 1955c) мы описали распад отдельных частей плазматических образований и гибель отделяющихся от них плазматических шаров. Весьма вероятно, что это — именно такие безъядерные части плазматических образований, не способные долго удержаться и отмирающие. Полученные нами до сих пор результаты свидетельствуют скорее в пользу взгляда, что присутствие ядра необходимо для протеосинтеза и процессов дифференциации, а не в пользу мнения Hämmerling-a (1946), Brachet (1951) и Лепешинской. Но не следует забывать, что все эти авторы работали с совершенно другими объектами и что результаты, полученные для одного объекта, можно лишь с чрезвычайной осторожностью переносить на другие объекты.

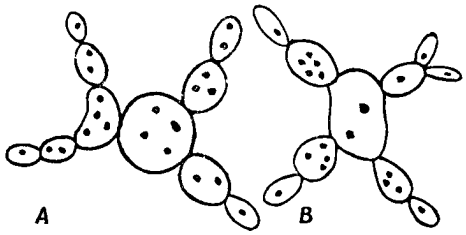


Рис. 11. A: Схема количества и расположения ядер при регенерации плазматического образования. Плазматическое образование с 4 ядрами в центре. Первая генерация многоядерная, в дальнейшем количество ядер уменьшается. — B: Регенерация клеток из плазматического образования. Первое поколение клеток содержит больше ядер, чем плазматическое образование.

В своей последней работе мы высказали предположение, что восстановление процессов метаболизма в плазме, предшествующее морфологической регенерации клеток, протекает уже при возникновении плотных плазмотических образований. Наши новые наблюдения относительно того, что ядра в плотных плазматических образованиях выглядят уже, — в отличие от ядер вакуолизированных плазматических образований, — как нормальные ядра дрожжей, говорят в пользу этого предположения.

Большей частью своих морфологических особеностей клетки, возникающие из плазматических образований, отвечают нормальным клеткам. Вполне понятно поэтому, что в конце концов у них устанавливается и нормальное нуклеоплазматическое соотношение, т. е. в одной клетке одно ядро. Чрезвычайно интересно однако, что многоядерность, развивающаяся в течение роста плазматических образований, становится постоянной особенностью некоторых восстановившихся клеток. Нормальное соотношение между ядром и плазмой здесь не сохраняется: клетки при нормальных общих размерах содержат по нескольку ядер. Подобную наследственность искусственно вызванной многоядерности уже раньше отмечали Герасимов (1902) и van Wisselingh (1909) у Spirogyra.

В заключение следует подчеркнуть, что почти все наши наблюдения относительно ядер были произведены на зафиксированных препаратах, что мы считаем

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

крупным недостатком. Нам не удавалось овладеть методикой наблюдения развития ядер in vivo, а у такого объекта, как дрожжи, это было бы, несомненно, весьма затруднительно. Поэтому все наши доказательства неспособности безъядерных клеточных фрагментов к развитию мы считаем только косвенными доказательствами.

Резюме

1. На основании косвенных доказательств автор приходит к заключению, что к развитию способны только такие плазматические шары дрожжей, которые содержат ядро.

2. Плазматические образования, возникающие в результате разрастания плазматических шаров, содержат по 1—10 ядер. Частота делений ядер в 2 — 4 раза меньше, чем у нормальных клеток. Форма деления ядра в одних случаях отвечает митозу, в других — амитозу. Ядра располагаются в плазме неправильно. Соотношение между ядром и плазмой не сохраняется. Деление плазматических образований вызывается, повидимому, физическими причинами.

3. Первые поколения клеток, возникающих при регенерации из плотных плазматических образований, бывают тоже многоклеточными. В дальнейших поколениях количество ядер постепенно снижается до одного, однако некоторые штаммы восстановившихся клеток дрожжей устойчиво сохраняют многоядерность.

(Таб. IX, X)

Литература

Нечас, О.: Жизнеспособность клеточных фрагментов дрожжей. I. Плазматические шары дрожжей. Fol. biol. (Praha) 1 : 19, 1955. Nečas, O.: Životaschopnost buněčných fragmentů kvasinek. I. Plasmatické koule kvasinek. Čs. biologie 4 : 12, 1955a.

Нечас, О.: Жизнеспособность клеточных фрагментов дрожжей. II. Эволюционные изменения плазматических шаров. Fol. biol. (Praha) 1 : 104, 1955. Nečas, O.: Životaschopnost buněčných fragmentů kvasinek. II. Vývojové změny plasmatických koulí. Čs. biologie 4 : 152, 1955b.

Нечас, О.: Жизнеспособность клеточных фрагментов дрожжей. III. Регенерация клеток из плазматических образований. Fol. biol. 1 : 220, 1955. Nečas, O.: Životaschopnost buněčných fragmentů kvasinek. III. Vývojové změny plasmatických koulí z autolysátu 4 : 287, 1955c. Nečas, O.: Životaschopnost buněčných fragmentů kvasinek. IV. Regenerace buněk z plasmatických útvarů. Čs. biologie 4 : 338, 1955c.

Лепешинская, О. Б.: Происхождение клеток из живого вещества и роль живого вещества в организме. Москва 1945.

Acqua, C.: Contribuzione alla conascenza della cellula vegetale. Malpighia 5 : 1, 1891. Cit. Palla, E., 1906.

Badian, J.: Sur la cytologie des levures. Über die Cytologie der Hefen. Biol. Zbl. 34 : 548, 1937.

Brachet, J., Chantrenne, H.: Protein Synthesis in Nucleated and Non Nucleated Halves of Acetabularia mediteranea Studied with Carbon — 14 Dioxyde. Nature 168 : 950, 1951.

Duraiswami, S., Sreepathi, Rao, Sk., Subramaniam, M. K.: Extra Reproduction of a Chromosome in Yeast. Experientia 9 : 293, 1953a.

Duraiswami, S.: Kariokynesis and Cytokynesis in Diploid Brewery Yeast. Cellule 55 : 381, 1953b.

Gerassimoff, J. J.: Die Abhängigkeit der Grösse der Zelle von der Menge ihrer Kernmasse. Zschr. allg. Physiol. 1 : 220, 1902.

Haberlandt, G.: Zur Physiologie der Zellteilung. Sitz. Ber. Akad. Wiss. Berlin, 26 : 721, 1919.

Haberlandt, G.: Über Regenerationsvorgänge bei Bryopsis und Codium. Sitz. Ber. Akad. Wiss. Berlin 20; 22 : 327, 1929.

Hämmerling, J.: Regenerationsversuche an kernhaltigen und kernlosen Zellteilen Acetabularia Wettsteinii. Biol. Zbl. 54 : 650, 1934a.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Hämmerling, J.: Entwicklungsphysiologische und genetische Grundlagen der Formbildung bei der Schirmalge Acetabularia. Naturwiss. 22 : 829, 1934b.
Hämmerling, J.: Neue Untersuchungen über die physiologischen und genetischen Grundlagen der Formbildung. Naturwiss. 33, 1946.
Henneberg, W.: Handbuch der Gärungsbakteriologie. I. Berlin 1926.
Klebs, G.: Beiträge zur Physiologie der Pflanzenzelle. Ber. deut. Bot. Ges. 5 : 181, 1887.
Klebs, G.: Über den Einfluss des Kernes in der Zelle. Biol. Cbl. 7 : 161, 1887.
Levan, A.: Mitotic Disturbances Induced in Yeast by Chemicals and their Significance for the Interpretation of the Normal Chromosome Conditions of Yeast. Nature 158 : 626, 1946.
Levan, A.: Studies on the Camphor Reaction of Yeast. Hereditas 33 : 457, 1947.
Lietz, K.: Beitrag zur Hefecytologie. Arch. Mikrobiol. 16 : 275, 1951.
Lindegren, C., Rafallko, M.: The Strukture of the Nucleus of Saccharomyces Bayanus. Exp. Cell. Res. 1 : 169, 1950.
Lynch, V.: The Function of the Nucleus of Living Cell. Am. J. Physiol. 48 : 258, 1919.
Palla, E.: Über Zellhautbildung und Wachstum kernlosen Protoplasmas. Ber. deut. Bot. Ges. 7 : 330, 1889.
Palla, E.: Beobachtungen über Zellhautbildung an des Zellkernes beraubten Protoplasten. Flora 73 : 314, 1890.
Palla, E.: Über Zellhautbildung kernloser Plasmateile. Ber. deut. Bot. Ges. 24 : 408, 1906.
Prowazek, S.: Zur Regeneration der Algen. Biol. Cbl. 27 : 737, 1907.
Schussnig, B.: Handbuch der Protophytenkunde. I. Jena 1953.
Subramaniam, M. K.: Abnormal Mitoses in Tetraploid Yeasts. Proc. Ind. Acad. Sci., Sect. B. 37 : 27, 1953.
Wisselingh, van: Zur Physiologie der Spirogyra-Zelle. Beih. bot. Cbl., Abt. 1, 24 : 133, 1909.

The Vitality of Cell Fragments of Yeast

IV. The Relation of the Nucleus to Growth Ability

O. NEČAS

Summary

The author continues from the previous work on the growth and regeneration of cell fragments of yeast. The present communication deals with the ability of the cell fragments to grow—with particular reference to the nucleus—, with division of the nuclei during the growth of the plasmatic formations and with the state of the nuclei during regeneration of the cells. The nuclei were identified by means of Feulgen's reaction and by staining with Heidenhain's haematoxylin. In some cases the nuclei can be observed by contrast phase (fig. 8). The results of all three methods were completely congruent.

Only a small percentage of the plasmatic droplets which develop after destruction of the cells contain a nucleus and the percentage of growing plasmatic droplets is also small. The plasmatic droplets from the autolysate contain a nucleus far more

	% of plasm. droplets with a nucleus	% of plasm. droplets capable of devpt
From the homogenate	7	½
From the autolysate	60—70	50—60

frequently and more of them are also capable of growth. Already from these results it may be assumed that the ability of the cell fragment, i. e. of the plasmatic droplet, to grow, depends on the presence of a nucleus.

A systematic study of preparations with developing plasmatic formations produced the finding that all the plasmatic formations which grow contain a nucleus even only

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

one hour after inoculation of the plasmatic droplets, when the plasmatic formations are beginning to develop (figs. 1 and 2). In other words, not a single developing formation without a nucleus was found. From this the author again deduced that only plasmatic droplets containing a nucleus develop.

During the growth of the plasmatic formations, the number of nuclei contained in them increases (figs. 3—10). The first division of the nuclei occurs after 6—12 hours (v. graph). After 48 hours, formations containing 8—10 nuclei were found. During growth of the plasmatic formations, therefore, growth of the plasma and division of the nuclei occur. The frequency of division of the nuclei, however, is from 2 to 4 times slower than in yeast cells and the nucleoplasma ratio is not maintained in the plasmatic formation, as shown by the author from a number of examples. In the first stage of development of the plasmatic formation, the nuclei are similar to those of normal yeast cells. Later, when the plasmatic formations are intensely vacuolised, the nuclei enlarge, stain more weakly and their contours are indistinct. They are evidently more markedly hydrated (like the plasma). At the time when dense plasmatic formations are being formed from the vacuolised plasmatic formations, the nuclei regain their normal appearance. It is not possible to say definitely whether the nuclei divide by mitosis or by amitosis. Some pictures would seem to indicate amitosis, while others correspond to various mitotic figures.

Formations regenerating into new cells are, as a rule, multinuclear. The first generation of cells which develop in this manner, and which are for the most part morphologically atypical, are also multinuclear. They frequently contain more nuclei than the original plasmatic formation (fig. 11, A and B). In later generations the number of nuclei gradually decreases and mostly mononuclear cells develop. A few yeast strains, however, remained persistently multinuclear (after 7 months' passaging).

In the discussion, the author evaluates the findings and expresses the view that only those fragments of yeast cells which contain a nucleus are capable of growth and further development; this is in agreement with the majority of data in the literature. The author points out, however, that this conclusion is based on a study of fixed material, which is never entirely conclusive. In the discussion it is stated that there are not as yet in the literature sufficient data on the transitional multinuclear stage of regeneration of cell fragments, nor are there sufficient data on the origin of multinuclear cells during regeneration.

(Plates IX, X)

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 1

L-формы бактерий

III. Влияние концентрации пенициллина в среде на развитие L-образований у Proteus vulgaris

М. НЕРМУТ и О. НЕЧАС
Институт общей биологии медицинского факультета университета в Брно

Поступило в редакцию 19 IX 1955

Мы наблюдали развитие крупных круглых телец (ККТ) Proteus vulgaris при различных концентрациях пенициллина в среде, — в аэробных и анаэробных условиях.

Методика опытов в аэробных и анаэробных условиях описана в наших предшествовавших работах (1954, 1955). Мы пользовались следующими концентрациями пенициллина: 2, 6, 10, 20 и 40 тысяч ед./1 мл. Наблюдения с помощью фазового микроскопа производились вплоть до 21-го дня с начала опыта.

Результаты

Развитие ККТ Proteus vulgaris *в аэробных условиях*

2000 ед. Через 2 час. после посева почти 90% палочек превращается в ККТ, которые вскоре вырастают в дольчатые шары. Из этих шаров позднее возникают крупные продолговатые тельца, из которых через 9 час. восстанавливаются вторичные палочки. Подробное описание этого процесса приводится в первой части нашей работы (1954).

6000 ед. Среди многочисленных типичных шаров уже через 2 часа встречаются дольчатые шары, которые в течение дальнейших 2—5 час. постепенно распадаются на неправильные образования. Эта форма распада типична для шаров с самого начала их развития и протекает при анаэробных условиях. В результате распада возникают скопления неправильных круглых образований или зернистые массы, о жизнеспособности которых пока трудно что-нибудь сказать. Регенерация вторичных палочек наступает через 19 час. таким же образом, как было описано при 2000 ед., т. е. из крупных продолговатых телец (КПТ).

10.000 ед. Приблизительно только 70% палочек утолщается в шары (через 2 часа). Остальные палочки остаются без морфологических изменений. Некоторые шары начинают уже распадаться описанным выше способом. Распад преобладает в препаратах приблизительно до 30-го часа, когда в общем заканчивается. Регенерация вторичных палочек наблюдается только через 2 дня, но — не из распавшихся шаров!

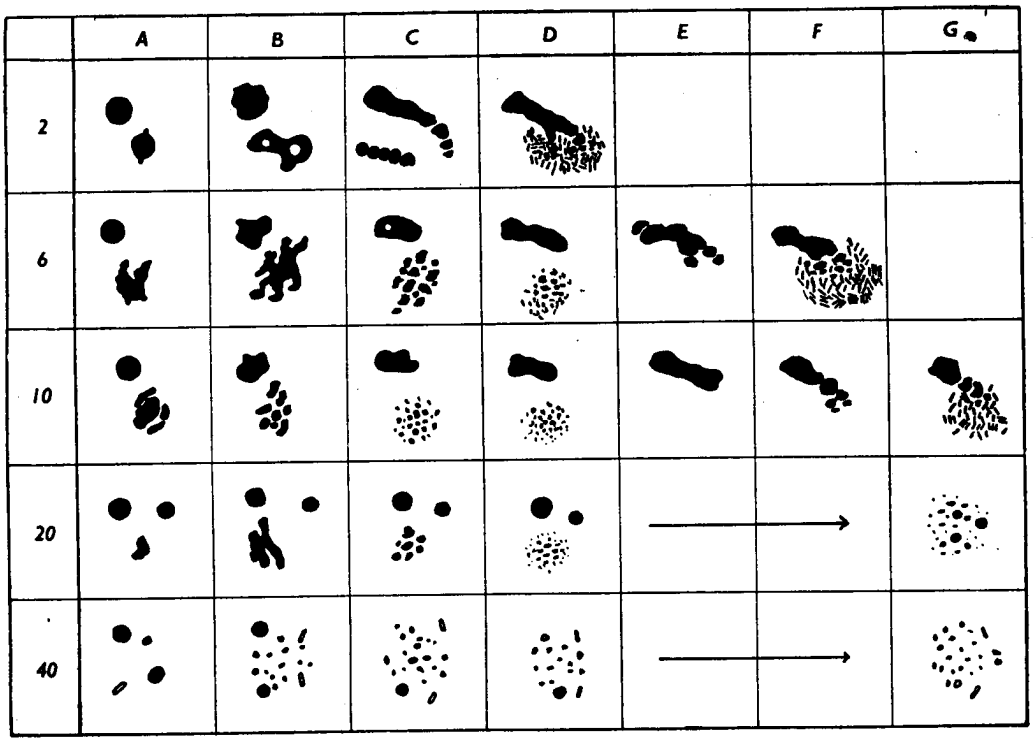
20.000 ед. Количество и размеры ККТ через первые 2 часа бывают еще меньше, чем при 10.000 ед. Дольчатые шары и их распад наблюдаются только через 4 часа. Морфологические проявления бывают вообще весьма бедны: в сущности это распад на мелкие шарики или зернистость, которые потом уже не разви-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

ваются (21 день). Одну культуру мы через 10 дней перенесли в среду без пенициллина (анаэробно!). Через 3 дня мы нашли в ней несколько L-колоний.

40.000 ед. Через 2 часа насчитывается приблизительно 40% шаров. Остальные микробы — это палочки с хорошо заметной зернистостью. Через 4 часа появляется зернистость отдельно от палочек и шаров, которые медленно растут и начинают распадаться. Конечная картина практически та же, что и при *20.000*.



Таб. 1. Схема развития ККТ Proteus vulgaris в аэробных условиях. A — 2 часа, B—4 часа, C — 9 час., D — 20 час., E — 30 час., F — 48 час., G — 72 часа. На вертикали ценициллин в тысячах единиц.

Таб. 1 дает схематическое изображение вышеописанного развития. В каждом поле зарисованы образования, преобладающие в препарате в данный момент или имеющие значение для дальнейшего развития. (Пропорциональность увеличения соблюдается только внутри одного поля и между первыми полями — до 9-го часа.)

Итак, при аэробных условиях не возникают непосредственно L-колонии даже под действием таких высоких концентраций, как 20.000 или 40.000 ед./мл. Характерным признаком этих высоких концентраций является возникновение зернистых масс, которые могут иметь способность к дальнейшему развитию (как по данным литературы, так и судя по отдельным результатам наших опытов). Но вопрос жизнеспособности этой зернистости — это отдельный вопрос, который разрабатывает другая лаборатория. Здесь напомним о результатах произведенных нами ранее опытов, при которых нам удавалось вазвать образование зернистой фазы в бульоне без сыворотки при 20.000 и 40.000 ед./мл.После

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

пересева осадка из этой среды мы получали L-колонии, у которых регенерация палочек не наблюдалась даже после 5 пассажей.

Развитие ККТ в анаэробных условиях.

2000 ед. Через 2 часа в препарате бывает до 95% шаров, из которых развиваются вакуолизированные, гранулированные и гомогенные шары. Первые и последние из них дают около 30-го часа вторичные палочки. Подробное описание этого процесса регенерации было дано во второй части нашей работы (1955).

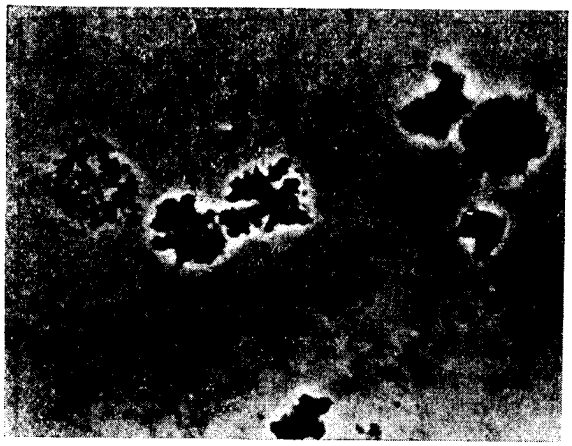


Рис. 1. Начало распада дольчатых шаров. 6000 ед/мл, анаэробно, через 4 часа после посева. Увеличение в 1000 раз.

6000 ед. Через 2 часа бывает около 80% ККТ. Некоторые из них, дольчатые, подвергаются типичному распаду, как в аэробных условиях (рис. 1). Но уже около 9-го часа можно в некоторых шарах (как вакуолизированных, так и в гранулированных и гомогенных) наблюдать довольно крупную зернистость (0,2 —0,4 μ), которая из шаров врастает в среду. Фотографическая фиксация этой стадии не удавалась из-за того, что грануляция располагалась в другой плоскости, чем поверхность шара. Однако неуклонные наблюдения за одним полем зрения убедили нас в том, что это — начало образования L-колонии. В отдельных случаях мы замечали увеличение некоторых зернышек в небольшие шары, но возникновения L-колоний из этих шаров нам не удавалось наблюдать. Через 30 час. в препарате находится уже множество мелких L-колоний, центр которых, отделенный всегда резкой границей от периферии, состоит из большого количества мелких правильных зернышек (рис. 2). На периферии при большом увеличении можно заметить отдельные крупные тельца (рис. 3, 4, 5), — вначале однородные. Позднее они или частично вакуолизируются и регенерируют в новые палочки, или полностью вакуолизируются, постепенно дегенерируют и образуют так типичную сотообразную периферию L-колонии (рис. 6, 7). В наших препаратах большинство колоний в той или иной степени регенерировало, так что вокруг плотного зернистого ядра находилась широкая кайма вторичных палочек.

Таким образом, регенерация вторичных палочек начинается с ККТ на периферии колонии и осуществляется или путем т. н. «центральной фрагментации», описанной в нашей предыдущей работе, или через крупные продолговатые тельца, которые вырастают из ККТ и от которых постепенно отделяются вторичие палочки (рис. 8, 9).

10.000 ед. Развитие ККТ протекает практически так же, как и при 6000 ед., с той лишь разницей, что регенерация вторичных палочек несколько запаздывает, и количество не регенерирующих колоний бывает больше (рис. 5).

20.000 ед. Через 2 часа после посева количество шаров достигает приблизительно 80%, но шары быстро распадаются в неправильные скопления зернистого вещества, не меняющегося сколько-нибудь существенно. Из одного пре-

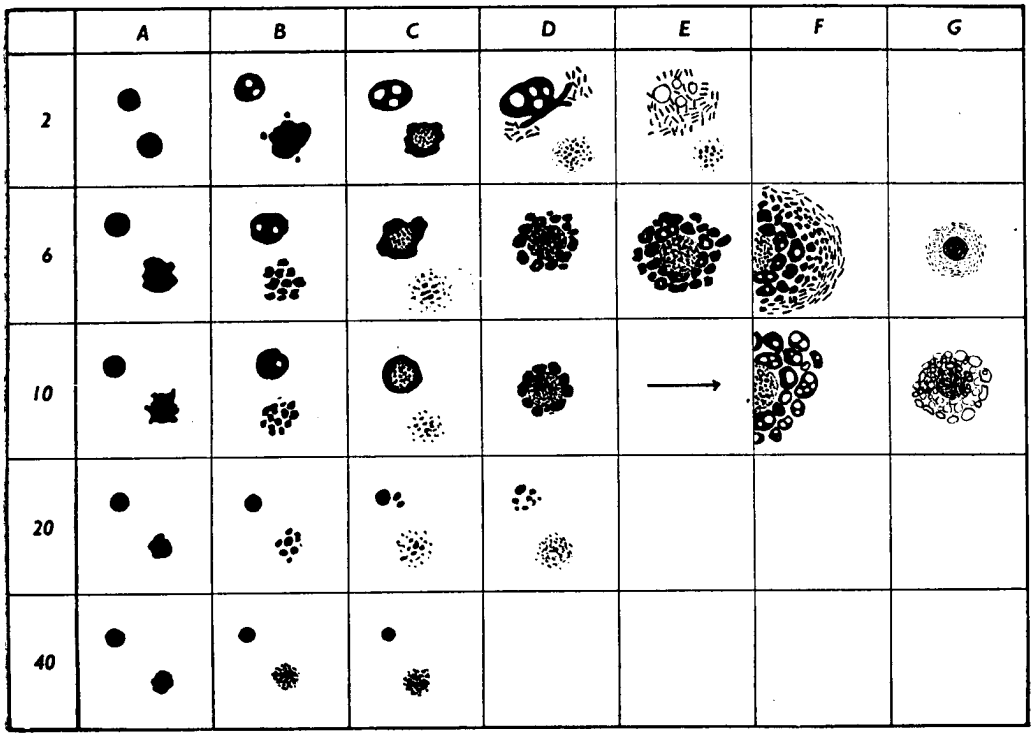
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

парата эта зернистая масса была через 15 дней пересена в среду без пенициллина, но и еще через 5 дней L-колонии в ней не были найдены.

40.000 ед. Сюда относится все, сказанное о 20.000.

Схематическое изображение развития ККТ в анаэробных условиях приводится в таб. 2.



Таб. 2. Схема развития ККТ Proteus vulgaris в анаэробных условиях. A — 2 часа, B — 4 часа, C — 9 час., D — 32 часа, E — 48 час., F — 96 час., G — 21 день. На вертикали пенициллин в тысячах единиц.

Оказалось, таким образом, что анаэробные условия более благоприятны для возникновения L-колоний. Важно также количество пенициллина. L-колонии регулярно возникали только при 6000 или 10.000 ед./мл. Слишком высокие дозы (20 и 40 тысяч ед.) вызывали не прямо образование L-колоний, а только т. н. гранулярную фазу.

Интересно наблюдение, что значительная часть L-колоний а общем легко давала бациллярную форму путем регенерации L-телец на периферии. Итак, L-тельца не являются чисто дегенративным элементом (Keller 1954) и до известной стадии развития сохраняют способность к регенерации (Dienes, Weinberger 1951). Подробно процесс регенерации вторичных палочек на периферии L-колонии не был до сих пор описан. В общих чертах его описывают Dienes и Weinberger (1951).

Резюме

Авторы исследовали развитие L-телец Proteus vulgaris под влиянием пенициллина в концентрации 2.000—40.000 ед./мл, в аэробных и анаэробных условиях.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

L-колонии возникали прямо только под влиянием 6.000 и 10.000 ед. пенициллина в анаэробных условиях. Основой для возикновения L-колоний являются элементарные тельца (гранулярная фаза). Большинство L-колоний (60—70%) снова образует бациллярную форму. Исходным пунктом для этой регенерации являются ККТ на периферии колонии.

Факторы внешней среды, благоприятные для возникновения L-колоний, не благоприятствуют регенерации и наоборот.

Эндогенное возникновение бациллярной формы не наблюдалось.

(Таб. XI, XII)

Литература

Нермут, М. и Нечас, О.: L-формы бактерий. I. Изменения формы Proteus vulgaris, вызываемые пенициллином. Чсл. Биология 3 : 370, 1954. Nermut, M. a Nečas, O.: L-formy bakterií. I. Tvarové změny Proteus vulgaris vyvolané penicilinem. Čs. biologie 3 : 349, 1954.

Нермут, М. и Нечас, О.: L-формы бактерий. II. Влияние анаэробных условий на изменения формы Proteus vulgaris под действием пенициллина. Fol. biol. (Praha) 1 : 257, 1955. Nermut, M. a Nečas, O.: L-formy bakterií. II. Vliv anaerobních podmínek na tvarové změny Proteus vulgaris vyvolané penicilinem. Čs. biologie 4 : 390, 1955.

Пешков, М. А.: О так называемых Л-формах бактерий. Микробиология 23 : 607, 1954.

Dienes, L.: Reproduction of Bacteria from the L-bodies of Streptobacillus moniliformis. Proc. Soc. Biol. Med. 53 : 84, 1943.

Dienes, L.: The Development of Proteus Cultures in the Presence of Penicillin. J. Bact. 57 : 529, 1949.

Dienes, L., Weinberger, A.: The L-forms of Bacteria. Bact. Rev. 15 : 245, 1951.

Kandler, G., Kandler, O.: Untersuchungen über die Morphologie und die Vermehrung der Pleuropneumonieähnlichen Organismen und der L-Phase der Bakterien. I. Archiv Mikrobiol. 21 : 178, 1954.

Keller, R.: The Growth of PPLO of Human Origin: Cultivation in the Developing Chick Embryo in vitro Growth Cycle. J. Bact. 67 : 129, 1954.

Klieneberger-Nobel, E.: Filtrable Forms of Bacteria. Bact. Rev. 15 : 77, 1951.

Tulasne, R.: Les formes L des bactéries. Rev. immunol. 15 : 223, 1951a.

Tulasne, R.: Nouvelles observations sur les formes L des bactéries. Reproduction des formes L. Processus de réversion des formes L en formes normales bactériennes. C. R. Soc. Biol. 145 : 429, 1951b.

L-Forms of Bacteria

III. The Influence of the Concentration of Penicillin in the Medium on the Development of L-Bodies of Proteus vulgaris

M. NERMUT and O. NEČAS

Summary

A study was made of the development of large spherical bodies of Proteus vulgaris on media containing various concentrations of penicillin, under aerobic and anaerobic conditions.

The method used for attaining aerobic and anaerobic conditions has been described in previous communications (1954, 1955). The following concentrations of penicillin were used: 2,000, 6,000, 10,000, 20,000 and 40,000 units/ml. The preparations were observed by phase contrast microscopy up to the 21st day after beginning the experiment.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Results

The development of the large bodies under aerobic conditions is shown in diagram form in tab. 1. Under aerobic conditions L-colonies do not develop even with high doses of penicillin (20,000—40,000 units/ml.). A characteristic feature of these higher concentrations is the appearance of granular masses which are capable of further development (into L-colonies).

The development of the large bodies under anaerobic conditions is described in greater detail, especially, with the concentration of 6,000 units PE/ml. Two hours after inoculation about 80% of the bacilli form typical, large, spherical bodies, some of which are lobular and begin to disintegrate in the typical manner (as under aerobic conditions — fig. 1). After about nine hours, however, in some of these bodies (whether vacuolised, granular or homogenous) fairly large granules (0.2—0.4 μ) may be observed which grow out of the spherical body into the medium. It was not possible to photograph this stage because the granules lay on a different plane from the surface of the spherical body. Careful observation of one visual field, however, convinced us that this is the beginning of the formation of L-colonies. The growth of some granules into small spherical bodies was observed in isolated cases, but we did not succeed in observing the development of L-colonies from these bodies. After 30 hours, an abundance of small L-colonies was found in the preparation, their centre being precisely defined against the periphery and composed of a large quantity of small, regular granules (fig. 2). On the periphery the individual large bodies are easily distinguishable with high magnification (figs. 3, 4 and 5): at first they are homogenous, later they become partly vacuolised and then regenerate into secondary rods or are vacuolised completely and gradually degenerate to form the typical honeycomb periphery of the L-colony (figs. 6 and 7). In our preparations, most of the colonies regenerated again, in a greater or lesser degree, into bacilli, so that round the dense centre of granules there was a broad border of secondary bacilli. The regeneration of secondary bacilli, therefore, comes from the large spherical bodies on the periphery of the colony and takes place either by central fragmentation, as described in the preceding communication, or via the large long bodies which grow from the large spherical bodies and gradually break off secondary bacilli (figs. 8 and 9).

10,000 units: The development of the large spherical bodies takes much the same course as with 6,000 units, only with the difference that regeneration of the secondary bacilli is somewhat delayed and the number of colonies which do not regenerate is larger (fig. 5).

20,000 units: The number of spherical bodies two hours after inoculation reaches about 80%, but the spheres soon disintegrate into clusters of irregular granular matter, which undergoes no substantial change. This granular mass was transferred from one preparation after 15 days on to a penicillin-free medium, but no L-colonies were found even after five days.

40,000 units: as from 20,000.

A diagram of the development of large spherical bodies under anaerobic conditions is given in tab. 2.

It was shown, therefore, that anaerobic conditions are more suitable for the development of L-colonies. The amount of penicillin is also important. It was seen that L-colonies developed only after using 6,000 and 10,000 units PE/ml. Too high doses (20,000 and 40,000 units) did not cause directly the development of L-colonies, but only the granular phase.

It is interesting to find that a considerable proportion of L-colonies produced the bacillary form on the whole easily, by regeneration of the L-bodies on the periphery. It may be seen, therefore, that the L-bodies are not simply a degenerative element

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

(Keller 1954), but that up to a certain stage of development they are still capable of regeneration (Dienes, Weinberger 1951). A detailed description of the regeneration of secondary bacilli from the periphery of the L-colony has not as yet been made. Its main features have been described by Dienes and Weinberger.

Conclusion

The authors studied the development of L-bodies of Proteus caused by penicillin in concentrations of 2,000—40,000 units/ml. under aerobic and anaerobic conditions.

L-colonies developed directly only with 6,000 and 10,000 units of penicillin and under anaerobic conditions. The basic element for the development of L-colonies are the elementary bodies (granular phase). The majority of L-colonies (about 60—70 %) regenerated into the bacillary form. This regeneration came from the large spherical bodies on the periphery of the colony.

The factors of the external environment which are favourable to the development of L-colonies are not favourable to regeneration of bacilli and vice versa.

Endogenous development of the bacillary form was not observed.

(Plates XI, XII)

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 1

The Influence of Intra-embryonal Injections of Foreign Blood on the Formation of Antibodies.

I. Observation of Reactivity in Hens

T. HRABA, V. HAŠKOVÁ, A. LENGEROVÁ and M. VOJTÍŠKOVÁ
Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science,
Department of Experimental Biology and Genetics, Praha

Received October 20, 1955

It has been ascertained that after the intra-embryonal injection of foreign cells, immunological approximation to the cells of the donor is found in the recipient (Billingham, Brent and Medawar 1953, Hašek 1954, Simonsen 1955), as in the case of embryonal parabionts (Hašek 1953, Hašek, Hraba, Benešová and Hlaváčková 1955, Brent 1955). In the present communication the immunological effect of injections of foreign blood into hen embryos was observed. For the injections, the blood of guinea-fowl, turkeys and ducks was used. In recipients aged from two to three months formation of agglutinins was found after immunisation with whole blood from the donor. In some series only one immunisation dose was used (v. Simonsen 1955), in others our own, older immunisation scheme of three doses on alternate days.

Methods

Intra-embryonal Injection into the Allanto-chorionic Veins

The injections were administered to the embryos in the following manner: Eggs which had been incubated for 13 days were transilluminated and a suitable allantoid vein was found, i. e. the large and fixed vein. Its course, the direction of flow and a suitable site for the injection were traced on the shell. The site of injection was cleaned with alcoholic iodine. The shell was drilled with a dental drill with a carborundum burr above the vein as far as the shell membrane, to make four incisions in the form of an oblong about 10 × 4 mms. This part of the shell was then removed with fine forceps and the shell membrane made transparent with a drop of sterile paraffin oil. The injection was given through a fine capillary tube of Jena glass attached by a fine rubber tube to the hypodermic syringe, which was inserted into the vein through the shell membrane in the direction of the blood flow. After removing the capillary tube the opening was closed by a larger oblong cut from another shell and the edges were carefully sealed with paraffin wax.

Immunisation Doses and Tests

All immunising doses contained 0.5 ml. of whole citrated blood which were injected into the wing vein. For agglutination, plasma (one part sodium citrate to nine parts blood), frozen before use for varying lengths of time (minimum one day) at — 15° C was used. In the reactions one drop of a 2.5% suspension of erythrocytes was added to two drops of plasma. The reactions were left at room temperature for 15 minutes and after shaking the results were read off.

For the determination of precipitins the ring reaction was used and the diluted antigen was layered on the immune plasma in narrow test-tubes. The results were read off after being left for 60 minutes at room temperature.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Tab. 1. Titre of Agglutinins and Precipitins against Turkey Blood in First Series of Chicks Injected with Turkey Blood during Embryogenesis

Intra-embryonal injection	Titre of Agglutinins			Titre of Precipitins	
	natural	after immunisation	after provocative dose	after immunisation	after provocative dose
6474	0	128	32	8192	512
7319	4	64	32	4096	1024
7310	0	8	4	4096	1024
6475	2	128	28	1024	512
6478	2	64	32	2048	2048
6485	0	128	28	4096	—
6494	4	64	256	4096	—
Controls					
6486	4	32	64	2048	2048
6487	4	32	32	4096	1024
6477	0	64	32	4096	1024
6430	4	128	256	8192	—

Tab. 2. Titre of Agglutinins against Turkey Blood in Second Series of Chicks Injected with Turkey Blood during Embryogenesis

Time of injection	No. of animals	Agglutinins	Titres
10th day	1	natural	0
		immune	16
12th day	6	natural	8 0 0 2 0 0
		immune	16 8 8 8 2 8
17th day	11	natural	8 0 8 4 0 4 4 1 2 16 1
		immune	17 4 32 64 8 8 32 4 8 32 16
One day after hatching	7	immune	8 4 32 8 4 16 16
Controls	9	natural	4 4 1 — — 8 16 16 —
		immune	16 8 16 4 16 8 32 8 16

Results

A. The Injections of Turkey Blood into Chick Embryos

Two series of intra-embryonal injections were observed. In the first series the tolerance dose was administered intravenously on the 13th day of incubation, in amounts of 0.2 ml. The birds were immunised at three months with three doses of donor blood. In addition, three weeks after completing the immunising series one provocative dose was administered. The results are given in tab. 1.

In the second series the tolerance dose was administered in amounts of 0.15 ml. blood between the 10th day of incubation and the first day after hatching. The birds were immunised at eight weeks with a single dose of turkey blood. The results are given in tab. 2.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

B. The Injection of Guinea Fowl Blood into Chick Embryos

The experimental birds were injected intravenously on the 13th day of incubation with 0.2 ml. blood. In addition, three weeks after completing the immunisation series a single provocative dose was administered. The results are given in tab. 3.

C. The Injection of Duck Blood into Chick Embryos

The experimental birds were injected intravenously on the thirteenth day of incubation with varying amounts of duck blood. Immunisation was carried out at eight weeks with a single dose of duck blood, followed by a provocative dose three weeks later. The results are given in tab. 4.

Tab. 3. Titre of Agglutinins and Precipitins against Guinea-Fowl Blood in Chicks Injected with Guinea-Fowl Blood during Embryogenesis

Intra-embryonal injection	Titre of Agglutinins			Titre of Precipitins	
	natural	after immunisation	after provocative dose	after immunisation	after provocative dose
7306	4	256	128	2048	2048
7308	0	128	128	2048	4096
7313	8	256	—	4096	1024
7312	3	—	128	8192	4096
7311	2	128	128	2048	2048
Controls					
8509	8	256	128	4096	2048
8510	0	128	64	2048	128
8508	0	64	128	8192	8192
7330	2	—	128	8192	4096
8511	2	128	128	4096	4096

Tab. 4. Titre of Agglutinins against Duck Blood Cells in Chicks Injected with Duck Blood during Embryogenesis

Amount of i. v. injection	No. of birds	Agglutinins	Titres
0.2 ml.	5	natural	1 1 2 8 —
		immun. after 1 dose	64 16 16 4 4
		immun. after 2 doses	32 64 32 64 32
0.1 ml.	2	natural	0 2
		immun. after 1 dose	16 16
		immun. after 2 doses	128 64
0.05 ml.	3	natural	0 4 0
		immun. after 1 dose	64 8 16
		immun. after 2 doses	16 32 64
Controls	7	natural	32 4 0 2 2 2 —
		immun. after 1 dose	16 16 128 32 4 32 2
		immun. after 2 doses	128 64 64 — 64 128 32

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

In none of these combinations did we find a decrease in the formation of agglutinins or precipitins against donor blood. Even in chicks injected with turkey blood on the 10th and 12th day of incubation and immunised with a single dose of turkey blood, there was no significant decrease in the titre of immune agglutinins as compared with the controls ($t = 1.545$, $P = > 0.05$).

Discussion

When observing immunological reactivity to foreign antigens in embryonal parabionts between duck and hen, a decrease in the formation of agglutinins was found in ducks (Hašek et al. 1955). No change in immunological reactivity was found in individuals which had been injected intra-embryonally with foreign blood. Similarly, no changes were found after using turkey blood. Using the same combination under similar conditions, Simonsen (1955) was successful in producing at least a decrease in the formation of agglutinins. These findings and our own are challenged by our findings in hen embryonal parabionts with turkey in which, using the same immunisation scheme, in some cases no formation of agglutinins was found and in one case no formation of precipitins. In the remaining parabionts formation of both antibodies was considerably reduced. These findings show that in producing approximation, in addition to the taxonomic relationship of the donor and recipient species and the reactivity of the species acquiring tolerance, a great deal also depends on the quantity of blood cells administered to the embryo.

Summary

No change in the formation of agglutinins and precipitins against the administered antigen was found in hens injected during embryogenesis with turkey, guinea-fowl or duck blood as compared with the controls. In the discussion the results are compared with conditions in embryonal parabionts between these species.

Literature

Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B.: Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. Nature 172 : 602, 1953.

Brent, L.: Some Consequences of Parabiosis in Chick Embryos. Summaries of the Int. Embryol. Conference, Brussels 1955.

Hašek, M.: Vegetativní hybridisace živočichů spojením krevních oběhů v embryonálním vývoji. Čs. biologie 2 : 265, 1953.

Hašek, M.: Projevy vegetativního sbližování v adaptaci vyššího živočicha na cizorodé antigeny. Čs. biologie 3 : 327, 1954. Гашек, М.: Проявление вегетативного сближения в адаптации высших животных на чужеродные антигены. Чсл. Биология 3 : 344, 1954.

Hašek, M., Hraba, T., Benešová, H., Hlaváčková, H.: Imunologické vztahy u embryonálních parabiontů mezi kachnou a slepicí. II. Čs. biologie 4 : 135, 1955.

Simonsen, M.: Artificial Production of Immunological Tolerance. Nature 175 : 763, 1955.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Влияние внутризародышевых впрыскиваний чужеродной крови на образование антител

I. Исследования реактивности у кур

Т. ГРАБА, В. ГАШКОВА, А. ЛЕНГЕРОВА и М. ВОЙТИШКОВА

Резюме

Мы впрыскивали внутривенно куриным зародышам цельную кровь индюшек, цесарок или уток. После выклевывания, в возрасте 2—3 месяцев, мы иммунизировали тех же реципиентов кровью доноров. Иммунизация производилась или однократно, или тремя дозами через день. Ни в одной серии опытов иммунизации мы не наблюдали разницы между титрами агглютининов и преципитинов у подопытных и у контрольных цыплят. В противоположность данным Simonsen-а (1955) нами не была найдена сигнификантная разница титров и у серии кур, которым в течение эмбриогенеза впрыскивалась кровь индюшек, — несмотря на то, что иммунизация производилась нами по той же схеме, какой пользовался этот автор. Напротив, в своей опубликованной ранее работе (Граба 1955) мы отметили сильное угнетение образования антител у кур-эмбриональных парабионтов с индюшкой. Таким образом, кроме таксономического видового родства донора и реципиента и реактивности реципиента, на интенсивность сближения оказывает влияние и количество чужеродных кровяных телец, введенных в зародыш.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 1

The Influence of Intra-embryonal Injections of Foreign Blood on the Formation of Antibodies

II. Observation of Reactivity in Ducks, Geese and Guinea-Fowl

M. HAŠEK
Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science,
Department of Experimental Biology and Genetics, Praha

Received October 20, 1955

In the previous work no change was found in the formation of agglutinins and precipitins against the antigen, in hens injected during embryogenesis with turkey, guinea-fowl or duck blood (Hraba, Hašková, Lengerová and Vojtíšková 1956). In the present communication a study is made of the formation of antibodies in other species of domestic birds, with the aim of ascertaining whether no decrease in the formation of antibodies after the intra-embryonal injection of foreign blood is to be found in these either. Goose blood was injected intravenously into duck embryos, duck blood into goose embryos and hen blood into guinea-fowl embryos. The formation of antibodies against the same foreign antigens which had been injected intra-embryonally was ascertained in the recipients at the age of two to three months.

Methods

The usual method was used for the intravenous injections. For injecting the blood, fine hypodermic needles were used. For immunising, whole citrated blood was injected intravenously (the doses and immunisation process being given in each table separately). For testing, serum frozen before use at — 15° C was used. In the agglutination tests, one drop of 2.5% suspension of erythrocytes was added to two drops of serum. Agglutination was carried out at room temperature and the results read off after 15—60 minutes, after shaking. Precipitins were determined by the ring reaction and the diluted antigen was layered on to the immune serum. These results were read off after 15—60 minutes at room temperature.

Results

A. The Injection of Goose Blood into Duck Embryos

The formation of antibodies was observed in two series of embryonal injections. 0.3 ml. of goose blood was injected intravenously on the 15th day of incubation. The titre of natural agglutinins was ascertained before commencing immunisation. The birds were immunised at eight weeks. In the first series four doses, each of 2 ml. of citrated goose blood were administered on alternate days; in the second series, three doses of 2 ml. were administered on alternate days. The second series was re-immunised three weeks after completing the first immunisation and five doses of 5 ml. of goose blood were administered on alternate days. The results are given in tab. 1.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Tab. 1. Titre of Agglutinins in Ducks Immunised with Goose Blood

1st immunised series Duck No.	Intra—embryonal injection	Titre of agglutinins		Titre after re-immunisation
		natural	immune	
433	0.3 ml.	1	1	
439	0.3 ml.	1	2	
105	control	4	16	
891	,,	0	128	
889	,,	0	32	
2nd immun. series				
274/8	0.3 ml.	0	4	8
279/8	0.3 ml.	0	4	8
502/8	0.3 ml.	1	8	
276/8	0.3 ml.	2	4	
249/8	control	1	128	2048
247/8	,,	1	64	1024
243/8	,,	0	64	

Tab. 2. Titre of Agglutinins in Geese Immunised with Duck Blood

Goose No.	Intra-embr. injection	Titre of Agglutinins	
		Natural	Immune
500	0.3 ml.	0	16
499	0.5 ml.	0	4
380	control	0	32
381	,,	0	4

Tab. 3. Titre of Agglutinins in Guinea-Fowl Immunised with Hen Blood

Guinea-fowl No.	Intra-embr. injection	Titre of Agglutinins	
		Natural	Immune
885	0.2 ml.	0	4
888	0.2 ml.	0	16
5180	control	0	8
8597	,,	0	8

In the re-immunised birds of the second series, the titre of precipitins against goose serum was also determined. No precipitins were found either in the immunised birds or in the controls.

B. The Injection of Duck Blood into Goose Embryos

The tolerance dose was injected intravenously into goose eggs which had been incubated for 15 days. The titre of natural agglutinins was determined before commencing immunisation. Immunisation was carried out in eight-week-old geese, with four doses of 2 ml. of citrated duck blood on alternate days. The results are given in tab. 2.

C. The Injection of Hen Blood into Guinea-Fowl Embryos

Guinea-fowl eggs which had been incubated for 15 days were injected with 0.2 ml. of hen blood. The titre of natural agglutinins was determined before commencing immunisation. The birds were immunised at three months with five doses of 2 ml. of hen blood on alternate days. The results are given in tab. 3.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Discussion

It was found that in species other than the hen it is not often possible to demonstrate immunological approximation to the cells of a donor of another species, after the intravenous injection of the same antigens into the embryos. The degree of approximation in ducks injected with goose blood, however, is relatively high.

In inter-special relationships, in contrast to the isoserological observation of the formation of immune agglutinins in hens, natural heteroagglutinins are found in most cases. In this series a natural heteroagglutinin did not occur either in goose or guinea-fowl; nevertheless, the effect of immunological approximation in them was not ascertained. For the purpose of general approximation we give the results so far obtained with immunological tolerance (tab. 4).

From these results we find the following factors, which influence the effectiveness of immunological approximation produced by the injection of the cells of a homologous or a heterologous donor:

1. Taxonomic relationship of the species of donor and recipient. Immunological approximation to individually different cells of the same species produces a state in

Table 4. Survey of Results with Experimental Immunological Approximation Evoked by the Cells of a Homologous and Heterologous Donor. Approximation was tested either by a skin transplant or by immunisation with blood.

Complete suppression of reactivity	Partial suppression of reactivity	Suppression of reactivity not found
Intra-special: Embryonal parabiosis (Hašek 1953) Intra-embryonal injection (Billingham, Brent, Medawar 1953)	*Inter-special:* Hen — embryonal parabiosis with turkey (Hašek 1954) Hen — embryonal parabiosis with duck (Hašek 1954) Hen — intra-embryonal injection of turkey blood (Simonsen 1955) Hen — embryonal parabiosis with turkey (Hašek, Hraba, Benešová, Hlaváčková 1955)	Hen — embryonal parabiosis with duck (Hašek, Hraba, Benešová, Hlaváčková 1955) Hen — intra-embryonal injection of goose blood (Simonsen 1955) Hen — intra-embryonal injection of beef blood (Hašková, Majer, not published) Hen — intra-embryonal injection of duck blood (Hraba, Hašková, Lengerová, Vojtíšková 1956) Hen — intra-embryonal injection of guinea fowl blood (Hraba, Hašková, Lengerová, Vojtíšková 1956) Hen — intra-embryonal injection of turkey blood (Hraba, Hašková, Lengerová, Vojtíšková 1956)
Inter-special: Hen — embryonal parabiosis with turkey (Hraba 1953)	Duck — embryonal parabiosis with hen (Hašek, Hraba, Benešová, Hlaváčková 1955, Brent 1955) Duck — intra-embryonal injection of goose blood	
	Turkey — intra-embryonal injection of hen blood (Simonsen 1955)	
	Pheasant — embryonal parabiosis with hen (Hašek 1954)	Duck — intra-embryonal injection of hen blood (Hašková, Pokorná, not published)
		Goose — intra-embryonal injection of duck blood
		Guinea fowl — intra-embryonal injection of hen blood

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

which complete suppression of antibody formation or taking of a skin transplant may be found. Even this approximation, however, has its quantitative aspect. In inter-special relationships, complete suppression of the immunity response is not found in most cases, either with transplants or with immunisation. Only in hens, embryonal parabionts with turkey, however, a marked decrease in reactivity to turkey blood cells was found (Hraba 1956). Partial approximation is indicated by the survival of hen skin heterotransplants in a pheasant (21 days, Hašek 1954) and in a duck (40 days, Brent 1955) in which approximation had been produced and also by the finding in some cases of a decrease in antibody formation, which are likewise given in tab. 4. Finally, in a series of further combinations, no approximation effect was found.

2. Special differences exist in the effectiveness of the production of immunological approximation. For example, in ducks, embryonal parabionts with hens, an obvious decrease in antibody formation was found, but in hen embryonal parabionts with ducks this was not found (Hašek, Hraba, Benešová, Hlaváčková 1955). In the same way, in the present work, a marked decrease in antibody formation was found in ducks after intra-embryonal injections of goose blood, but in geese injected with duck blood there was no decrease.

3. From the aspect of producing approximation, embryonal parabiosis is far more effective than a single intra-embryonal injection. For example, there is a significant difference between the degree of approximation in hen parabionts with turkey (Hašek, Hraba, Benešová, Hlaváčková 1955, Hraba 1956) and hens injected intra-embryonally with turkey blood (Simonsen 1955, Hraba, Hašková, Lengerová, Vojtíšková 1956).

4. It is probable that in a number of cases approximation was not found because adaptation to the foreign antigen was so weak that it could no longer be demonstrated in post-embryogenesis. Skin transplants are used for testing 14—30-day-old birds, while immunisation is carried out in birds which are at least six weeks old and frequently even older. Finally, differences in the immunisation method may also be of importance.

Summary

1. A decrease in the formation of immune agglutinins against goose blood cells was found in ducks in which approximation had been produced by the intra-embryonal injection of the same antigen. Precipitins were not found either in the experimental birds or in the controls.

2. In geese which had been injected intra-embryonally with duck blood and in guinea-fowl injected intra-embryonally with hen blood, no decrease was found in the formation of immune agglutinins.

Literature

Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B.: Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. Nature 172 : 602, 1953.

Brent, L.: Some Consequences of Parabiosis in Chick Embryos. Summaries of Int. Embryol. Conference, Brussels 1955.

Hašek, M.: Vegetativní hybridisace živočichů spojením krevních oběhů v embryonálním vývoji. Čs. biologie 2 : 265, 1953.

Hašek, M.: Projevy vegetativního sbližování v adaptaci vyššího živočicha na cizorodé antigeny. Čs. biologie 3 : 327, 1954. Гашек, М.: Проявления вегетативного сближения в адаптации высших животных на чужеродные антигены. Чсл. Биология 3 : 344, 1954.

Hašek, M., Hraba, T., Benešová, H. a Hlaváčková, H.: Imunologické vztahy u embryonálních parabiontů mezi kachnou a slepicí II. Čs. biologie 4 : 135, 1955.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Hraba, T.: Imunologické chování embryonálních parabiontů mezi krůtou a slepicí. I. Čs. biologie, 5 : 89, 1956.
Hraba, T., Hašková, V., Lengerová, A. and Vojtíšková, M.: The Influence of Intra-embryonal Injections of Foreign Blood on the Formation of Antibodies I. Observation of Reactivity in Hens. Fol. biol. (Praha) 2 : 00, 1956.
Simonsen, M.: Artificial Production of Immunological Tolerance. Nature 175 : 763, 1955.

Влияние внутризародышевых впрыскиваний чужеродной крови на образование антител

II. Исследования реактивности у уток, гусей и цесарок

М. ГАШЕК

Резюме

В настоящей работе мы исследовали степень иммунологического сближения у уток, гусей и цесарок. Мы впрыскивали внутривенно гусиную кровь утиным зародышам, утиную кровь гусиным зародышам и куриную кровь зародышам цесарки. В возрасте 2—3 месяцев мы определяли у реципиентов образование антител против тех же чужеродных антигенов, которые впрыскивались внутриэмбрионально. Мы установили факт снижения способности к образованию иммунных агглютининов против гусиных эритроцитов у уток, которые сближались с гусями при помощи внутризародышевых впрыскиваний того же антигена. При неизменных приемах иммунизации титры иммунных агглютининов были у первой серии сближавшихся с гусями уток: 1, 2, — у контрольных: 16, 128, 32; во второй серии у сближавшихся уток: 4, 4, 8, 4, — у контрольных: 128, 64, 64. После реиммунизации титры у сближавшихся уток были 8, 8, у контрольных: 2048, 1024. Преципитины не были найдены ни у сближавшихся, ни у контрольных уток. У гусей, которым в зародышевом состоянии впрыскивалась утиная кровь, и у цесарок, получавших куриную кровь, не было отмечено снижение образования иммунных агглютининов.

Оказывается, что и у других видов, кроме кур, часто невозможно бывает отметить иммунологическое сближение с клетками донора другого вида после внутривенных впрыскиваний этих антигенов зародышу. Весьма высокой оказывается степень сближения у уток, которым впрыскивалась гусиная кровь. В межвидовых отношениях, — в отличие от изосерологических исследований иммунологического сближения у кур, — в большинстве случаев наблюдается наличие естественных гетероагглютининов. В нашей серии опытов ни у одного гуся или цесарки не было отмечено присутствие естественных гетероагглютининов. Тем не менее мы не наблюдали у них явлений иммунологического сближения. На основании прежних наших и приводимых здесь результатов опытов можно сделать следующие обобщения относительно условий эффективности иммунологического сближения путем введения клеток гомологичного или гетерологичного донора (таб. 4):

1. *Таксономическое видовое родство донора и реципиента.* Иммунологическое сближение с индивидуально дифферентрыми клетками того же самого вида вызывает состояние, при котором можно наблюдать полное угнетение образования антител и приживление кожного гомотрансплантата. Однако количественная сторона этого сближения небезразлична. — В межвидовых отношениях в большинстве случаев ни при трансплантации, ни при иммунизации не наблю-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

дается полное угнетение иммунной реакции. Только у кур-эмбриональных парабионтов с индюшкой было отмечено значительное снижение реактивности по отношению к кровяным тельцам индюшки (Граба 1956). О частичном сближении свидетельствует переживание куриных кожных гетеротрансплантатов у фазана-парабионта (21 день — Гашек 1954) и у утки-парабионта (40 дней — Brent 1955), а также некоторые данные относительно снижения образования антител, приводимые в таб. 4. Наконец, в ряде дальнейших комбинаций эффект сближения не наблюдался.

2. *Имеются видовые различия в эффективности искусственно вызываемого иммунологического сближения.* Напр., у уток-эмбриональных парабионтов с курами наблюдалось заметное снижение способности к образованию антител, но у кур-эмбриональных парабионтов с утками оно найдено не было (Гашек, Граба, Бенешова, Главачкова 1955). Равным образом в этой работе было отмечено значительное снижение образования антител у уток в результате внутризародышевых впрыскиваний гусиной крови, но оно не было отмечено у гусей под действием утиной крови.

3. С точки зрения сближения гораздо более эффективным, чем однократная внутризародышевая инъекция, представляется эмбриональный парабиоз. Существует, напр., заметная разница между степенью сближения у кур-парабионтов с индюшкой (Гашек, Граба, Бенешова, Главачкова 1955) и у кур, которым кровь индюшки вводилась интраэмбрионально (Simonsen 1955, Граба, Гашкова, Ленгерова, Войтишкова 1956).

4. В ряде случаев, вероятно, сближение не было замечено, так как адаптация на чужеродный антиген была настолько слабой, что в постэмбриогенезе ее уже невозможно было отметить: тесты трансплантации производятся в возрасте 14—30 дней, а иммунизация — в возрасте 6 недель и больше. Наконец, здесь могут играть роль и различия приемов иммунизации.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

FOLIA BIOLOGICA

Tom.. II. (1956) — Fasc. 1

Suppression of the Formation of Immune Agglutinins in Chicks in which Approximation was Produced on the First Day after Hatching by Means of Injections of Erythrocytes and Leucocytes

M. HAŠEK, T. HRABA and M. ESSLOVÁ
Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science,
Department of Experimental Biology and Genetics, Praha

Received October 8, 1955

It has been shown by us that approximation to a skin transplant cannot be produced by the injection of a suspension of washed blood cells in which there are no white cells present (Hašek, Lengerová, Maternová 1955). Immunological approximation was, however, produced experimentally by the temporary joining of the circulations of chick embryos (embryonal parabiosis), which resulted in inability in post-foetal life to form immune agglutinins against the blood cells of the partner (Hašek 1953) and also by injections of blood administered to the embryo, in which resultant tolerance to skin transplants was found (Billingham, Brent, Medawar 1953, 1955). Tolerance to skin transplants was also found in chick embryonal parabionts (Hašek 1954). These results show the effectiveness of leucocytes in the development of immunological approximation as manifested in the production of tolerance to skin transplants.

The problem under consideration here involves the decision as to whether erythrocytes freed from leucocytes can lead to inability to form immune agglutinins in post-foetal life. The fact that erythrocytes alone are not capable of producing tolerance to skin transplants may be due to the fact that only leucocytes are capable of producing immunological approximation or that only leucocytes have completely corresponding, common antigens with the cells of the skin. Since immunological tolerance can be produced in a large percentage of newly hatched chicks by the injection of foreign cells (Hašek 1955), this form of inoculation was also used in the present experiments.

Methods

The Production of Immunological Approximation

Newly hatched chicks (none of them older than 20 hours) were injected either intravenously (35 chicks) or subcutaneously (40 chicks) with a suspension of blood cells in amounts of 0.5—1.0 ml. The intravenous injections were made into the wing vein, the subcutaneous injections through the thigh musculature, below the skin in the area of the abdomen. As donors, three cocks were used (Nos. 71, 85 and 89). The suspension of erythrocytes from all cocks was prepared in the same way while the preparation of leucocytes was modified in every cock.

Preparation of Erythrocytes

The citrated blood was centrifuged in small glass tubes, which had been sealed by melting, for 15 minutes at 2,000 revolutions/minute. After centrifuging the tubes were cut off about half a centimeter from the level of the sediment and in this way the leucocyte layer was removed together with

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

part of the erythrocytes. The remaining erythrocytes were pipetted into centrifuge tubes, diluted with the same volume of Tyrode solution and re-centrifuged for 15 minutes at 2,000 revs./min. This process was repeated once again. The washed erythrocytes were then suspended in Tyrode solution in the ratio of 1 : 1.

Preparation of Leucocytes

20 ml. of blood were collected from cocks Nos. 89 and 71 (4 ml. sodium citrate to 10 ml. blood). The leucocytes were isolated from the blood of cock No. 89 by centrifuging. The citrated blood was centrifuged in sealed glass tubes for five minutes at 1,500 revs./min. After centrifuging, the leucocytes, which formed a white layer above the erythrocytes, were carefully pipetted off and re-suspended in Tyrode solution in a concentration of 37,960,000/ml. Erythrocytes were present in the proportion of 4,200,000/ml. In the case of cock No. 71, the leucocytes were isolated by the agglutination method (Lee and Osgood 1949).

Extract of phytohaemagglutinin was added to the citrated blood (0.2 ml. of phytohaemagglutinin solution/1 ml. blood, titre 1 : 10). The supernatant fluid was pipetted into glass tubes which were sealed and centrifuged for 2—5 minutes at 1,000—1,500 revs./min. After centrifuging, the supernatant fluid containing the leucocytes was pipetted off from the sedimented residue of erythrocytes into new glass

Tab. 1. Reactivity in First Series of Birds in which Approximation was Produced.

The first immunisation was carried out at the age of eight weeks in doses of 0.5 ml. (the last two doses were reduced to 0.2 — 0.4 ml. because of insufficient donor blood) administered on alternate days. Re-immunisation was carried out at 15 weeks with three doses of 1 ml. administered on alternate days.

Production of Approximation by Leucocytes

Donor	Method	No. of birds	No. of birds and reactions			
			After 1st immun.		After re-immun.	
			Positive	Negative	Positive	Negative
89	i. v.	5	5	0		
	s. c.	5	5*	0		
71	i. v.	6	5	1**		
	s. c.	6	5	1	1	0
Total		22	20	2	1	0

Production of Approximation by Erythrocytes

89	i. v.	5	2	3	3	0
	s. c.	5	5	0		
71	i. v.	3	3	0		
	s. c.	3	2	1	0	1***
Total		16	12	4	3	1

N. B.: * In one case positivity was not absolutely clear. After re-immunisation the reaction was strongly positive.

** On re-immunisation, this bird was immunised with the blood of a different bird from the original donor and formed agglutinins.

*** This bird did not form agglutinins even after the administration of a provocative dose at 18 weeks (0.5 ml.).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Tab. 2. Reactivity in Second Series of Birds in which Approximation was Produced

The donor in this series was cock No. 85. The first immunisation was carried out at eight weeks, with five doses of 0.4 ml. on alternate days. Re-immunisation was carried out at 11 weeks with three doses of 2 ml. on al.ernate days.

	No. of birds	No. of birds and reactions			
		After 1st immun.		After re-immun.	
		Positive	Negative	Positive	Negative
Approximation prod. with injection of erythrocytes	12	11*	1	1	0
Approximation prod. with injection of leucocytes	3	2	1	1	0
Controls	9	8	0	1**	0

* In one case positivity was not absolutely clear (after re-immunisation strong positivity).
** This control bird was immunised only at the time of re-immunisation.

tubes, diluted with the same of Tyrode solution and again centrifuged for five minutes at 1,500 revs./min. The sedimented leucocytes were pipetted off and re-suspended in Tyrode solution in a concentration 36,900,000/ml.; erythrocytes were present in the proportion of 3,800,000/ml.

A mixture of washed erythrocytes and leucocytes, in which the leucocytes were concentrated in the proportion of approx. 1 : 5, was injected from the third donor, cock No. 85.

Testing of Approximation

Approximation was tested by immunising or re-immunising the chicks under observation, between eight and 18 weeks, with citrated blood (citrate 1 : 10) from the original donor. The immunisation methods and doses are given in the tables. The collection of blood from the immunised birds was carried out five to seven days after the last immunisation dose. Agglutination was carried out by the test-tube method, one drop of a once-washed suspension of blood cells in physiological saline being added to two drops of serum or plasma. The results were read off after 15 and 60 minutes. The test-tubes were left at room temperature and were shaken before being read off. In the experimental series given in tab. 3 the titre was ascertained. The absence of agglutination was controlled microscopically.

Results

The results are given in tabs. 1—3. The individuals which acquired approximation and did not form agglutinins constituted 15%. Out of 30 birds which were given an injection of leucocytes on the first day, five did not form agglutinins. Of 36 birds which were given an injection of pure erythrocytes on the first day, six did not form agglutinins. Previous results were also confirmed in that there was no difference in the production of approximation after the intravenous and subcutaneous injection of the antigen in one-day-old chicks. Neither do the results show any striking relationship to the amount of injected material within the limits used. The re-immunisation results show that non-reactivity might disappear more rapidly after injection of the antigens.

Discussion

It follows from the results that pure erythrocytes are also capable of producing immunological approximation. The effectiveness of leucocytes in producing tolerance to a skin transplant is therefore evidently due to the fact that, in contradistinction to erythrocytes, the leucocytes contain completely corresponding, common antigens

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

with the skin cells, which are responsible for the adaptation leading to the formation of immunological tolerance.

This explanation is closely connected with the observation (Medawar 1946) that transplantation immunity to skin can be induced in rabbits by the intradermal injection of foreign, homologous leucocytes, but cannot be produced by the injection of erythrocytes. Our contribution to this question is the observation that leucocytes contain all the antigens which are decisive for transplantation immunity in relation

Tab. 3. Reactivity of Third Series of Birds in which Approximation was Produced

The first immunisation was carried out at 13 weeks with three doses of one ml. on alternate days. A provocative dose of 0.5 ml. was administered at 18 weeks.

a) Approximation produced with erythrocytes:

Donor	Exper. bird	Titre after 1st immunisation	Titre after 1st immunisation	Titre after provoc. dose
	552/5	i. v. 1.0	8	
	542/5	0.6	4	
	562/5	0.6	—	—
89	558/5	0.5	8	
	559/5	0.5	2	
	563/5	0.5	64	8
71	565/5	0.8	64	
89	546/5	s. c. 0.5	128	32
	547/5	0.5	2	2
	548/5	0.5	2	2
	564/5	0.3	4	
71	568/5	0.5	8	
	571/5	0.5	4	

b) Approximation produced with leucocytes:

89	519/5	i. v. 0.5	—	—
71	534/5	0.5	8	
89	502/5	s. c. 0.5	4	
	507/5	0.5	64	
	512/5	0.5	2	2
	520/5	0.5	2	16
71	540/5	0.5	—	—
	541/5	0.5	32	

c) Controls:

576		—	1
585		2	
582		64	8
605		32	
616		32	
618		16	
621		128	
619		64	

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

to epidermal cells. Medawar's observations did not make it clear that leucocytes contain all the decisive antigens of epidermal cells. For producing immunity to a skin graft, only partial correspondence to these antigens would be sufficient. We further extend Medawar's observations by the clear demonstration that antigen correspondence is actually to be found between the leucocytes and the epidermal cells and not perhaps only between the leucocytes and the cells of the subcutaneous connective tissue of mesenchymal origin.

The number of birds which acquired approximation by injection on the first day after hatching, which in earlier work were tested by skin transplants at 14 days, amounted to 40% (Hašek et al. 1955). In these experiments immunological tolerance was ascertained by immunising the chicks under observation at the age of eight to 18 weeks. The number of experimental birds not forming agglutinins is far lower. In our view this might be connected with the quantitative character of the approximation. Immunological approximation obtained by the injection of blood is not nearly so strong as after the joining of the circulations in embryonal parabiosis and the low degree of approximation probably causes a more rapid decrease in the percentage of non-reactive birds in relation to their ages.

Summary

A suspension of erythrocytes or of leucocytes was injected intravenously or subcutaneously into newly hatched chicks. After immunisation with the blood of the donors at eight to 18 weeks, five out of a total of 30 chicks injected with leucocytes and six out of 36 injected with erythrocytes did not form agglutinins. It follows from the results that pure erythrocytes are capable of producing immunological adaptation and six out of 36 injected with erythrocytes did not form agglutinis. It follows from the results that pure erythrocytes are capable of producing immunological adaptation.

Literature

Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B.: Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. Nature 172 : 602, 1953.

Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B.: Acquired Tolerance of Skin Homografts. Ann. New York Acad. Sci. 59 : 3, 277, 1955.

Hašek, M.: Parabiosa ptáků v embryonálním vývoji. Čs. biologie 2 : 25, 1953. Гашек, М.: Парабиоз птиц во время ембрионального развития. Чсл. Биология 2 : 29, 1953.

Hašek, M.: Vegetativní hybridisace živočichů spojením krevních oběhů v embryonálním vývoji. Čs. biologie 2 : 265, 1953.

Hašek, M.: Projevy vegetativního sbližování v adaptaci vyššího živočicha na cizorodé antigeny. Čs. biologie 3 : 327, 1954. Гашек, М.: Проявления вегетативного сближения в адаптации высших животных на чужеродные антигены. Чсл. Биология 3 : 344, 1954.

Hašek, M.: Problém překonání neslučivosti tkání při homoplastických přenosech. Čas. lék. čes. 44 : 41, 1955.

Hašek, M., Lengerová, A., Maternová, E.: Analysa účasti krvinek při pokusném překonání neslučivosti kožních homotransplantátů u teplokrevních. Čs. biologie 4 : 564, 1955. Гашек, М., Ленгерова, А. и Матернова, Э.: Анализ участия кровяных телец при экспериментальном преодолении невсоместимости кожных гомотрансплантатов у теплокровных. Fol. biol. (Praha) 1 : 319, 1955.

Hašek, M., Lengerová, A., Majer, J., Maternová, E.: K úloze buněk ve sbližovacím procesu. Čs. biologie 4 : 627, 1955. Гашек, М., Ленгерова, А., Майер, Я. и Матернова, Э.: К вопросу роли клеток в процессе сближения. Fol. biol. (Praha), 2, 1956.

Lee, J. G., Osgood, E. E.: A Method for Rapid Separation of Leucocytes and Nucleated Erythrocytes from Blood or Marrow with the Aid of Phytohaemagglutinins from Red Beans (Phaseolus vulgaris). Blood 4 : 670, 1949.

Medawar, P. B.: Immunity to Homologous Grafted Skin. II. The Relationship between the Antigens of Blood and Skin. Brit. J. Exp. Pathol. 27 : 15, 1946.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Подавление образования иммунных агглютининов у цыплят, которым на первый день после выклевывания впрыскивались чужеродные эритроциты и лейкоциты

М. ГАШЕК, Т. ГРАБА и М. ЭССЛОВА

Резюме

Иммунологическое сближение, подавляющее у сближаемых организмов способность к иммунитной реакции при трансплантации, было успешно осуществлено в опытах введения чужеродной крови зародышу (Гашек 1953, Billingham, Brent, Medawar 1953, Гашек 1954, Billingham, Brent, Medawar 1955). Однако мы показали, что сближения по отношению к кожному трансплантату невозможно добиться путем внутризародышевых впрыскиваний взвеси промытых эритроцитов, — без лейкоцитов (Гашек, Ленгерова, Матернова 1955). Отсюда очевидно значение лейкоцитов для создания иммунологического сближения и совместимости кожного гомотрансплантата. — В настоящей работе решается вопрос, могут ли впрыскивания эритроцитов без лейкоцитов вызвать неспособность к образованию иммунных агглютининов в течение постэмбрионального периода. Причиной невозможности с помощью одних только эритроцитов создать совместимость кожного трансплантата может быть или то, что только лейкоциты способны вызвать иммунологическое сближение, или же то, что только лейкоциты содержат полностью соответствующие, общие с клетками кожи антигены. Так как с помощью впрыскиваний чужеродных клеток можно добиться иммунологического сближения у значительного процента свежевылупившихся цыплят (Гашек 1955), мы пользовались этим методом и в настоящей работе. Внутривенные впрыскивания были сделаны 35, а подкожные 40 свежевылупившимся цыплятам. Половине цыплят была введена взвесь чистых эритроцитов, а второй половине — взвесь лейкоцитов. Эритроциты приготовлялись путем центрифугирования, после чего отрезалась и отбрасывалась верхняя часть осадка в стеклянной трубочке вместе со слоем лейкоцитов. После повторного центрифугирования промытые эритроциты разводились 1 : 1 раствором Tyrode. Лейкоциты приготовлялись или путем отделения верхней части осадка после центрифугирования цитратной крови, или с помощью фитогемагглютинина, или же, наконец, применялась смесь промытых эритроцитов и лейкоцитов третьего донора в соотношении 5 : 1. Первые два из этих препаратов лейкоцитов бывали всегда загрязнены эритроцитами. Испытания сближения производились в возрасте 8—18 недель путем иммунизации (или реиммунизации) сближавшихся цыплят цитратной кровью от того же донора. Агглютинация производилась по методу пробирок. Отрицательный результат реакции агглютинации контролировался микроскопически. Результаты приводятся в таб. 1—3. После впрыскиваний лейкоцитов иммунные агглютинины не образовались у 5 из 30 цыплят, после впрыскиваний чистых эритроцитов — у 6 цыплят из 36. Результаты опытов реиммунизации показывают, что ареактивность могла бы исчезать быстрее после нагрузки антигенами. Подтвердились также полученные нами ранее данные относительно того, что у однодневных цыплят не бывает разницы в результатах сближения путем внутривенных или подкожных впрыскиваний. Из данных опытов вытекает, что и чистые эритроциты способны вызывать иммунологическое сближение. Поэтому эффективность впрыскиваний лейкоцитов для создания совместимости кожных трансплантатов обусловливается, повидимому, тем, что они — в отличие от эритроцитов — содержат пол-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

ностью соответствующие, общие с клетками кожи антигены. В нашей прежней работе (Гашек с сотр. 1955) количество цыплят, сближавшихся с донором при помощи инъекций на первый же день после выклевания из яйца, у которых мы на 14-ый день жизни производили испытания с помощью кожных трансплантатов, составляло 40% всех сближавшихся особей. При настоящих опытах степень иммунологического сближения исследуемых цыплят определялась с помощью иммунизации в возрасте 8—18 недель. Количество сближенных особей, у которых иммунные агглютинины не образовались, было гораздо ниже. Мы полагаем, что это могло находиться в связи с количественной стороной сближения: вероятно, иммунологическое сближение, получающееся в результате впрыскиваний крови, далеко не так сильно, как сближение под влиянием общности кровообращения при эмбриональном парабиозе, а с возрастом более низкая степень сближения становится, вероятно, причиной более быстрого снижения процента ареактивных животных.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 1

Гомотрансплантация кожи у однодневных цыплят, утят и индюшат

Т. ГРАБА и М. ГАШЕК

Биологический институт ЧСАН, экспериментальная биология и генетика, Прага

Поступило в редакцию 11 X 1955

Уже Danforth (1929) успешно пересаживал цыплятам от цыплят других пород кожу, на которой вырастали перья расцветки донора. Гомотрансплантаты у куриных зародышей сохраняются в течение 3—5 месяцев постэмбриональной жизни (Eastlick 1941). Cannon и Longmire (1952) установили, что у однодневных цыплят принимается и сохраняется в течение более, чем 8 недель 16% кожных гомотрансплантатов, у 3-дневных цыплят 13%, у 4-дневных уже только 1%, а у 2-недельных они не удаются вовсе. Эти авторы приводят, что у цыплят моложе 3 дней устойчивое приживление кожных гомотрансплантатов наблюдалось иногда даже в 10% случаев. Это наблюдение тесно связано с данными иммунологического сближения. Приживление трансплантата у молодых животных обусловлено, повидимому, тем, что они не способны к адаптации по отношению к чужеродным антигенам, — в данном случае к кожным трансплантатам. Прямое доказательство того, что у свежевылупившихся цыплят в значительном проценте случаев может быть достигнуто иммунологическое сближение, было получено путем впрыскиваний крови однодневным цыплятам с последующей успешной пересадкой кожи от того же донора (Гашек 1955).

В настоящей работе мы исследуем вопрос, так же ли ограничена стадия возможности иммунологического сближения и у других видов. Для проверки возможности иммунологического сближения мы пользовались кожными трансплантатами у однодневных цыплят, утят и индюшат.

Методика

Использовалась техника пересадок по Cannon-у и Longmire (1952). Пух на спинке цыпленка удалялся, спинка перед операцией смазывалась раствором коллодия, эластичность которого повышалась путем прибавления камфоры и касторового масла (20 г камфоры, 30 г клещевинного масла, 750 мл эфира, 250 мл этилового спирта и 40 г пироксилина). Смазанная коллодием кожа не рвалась и не страдала при пересадке. Квадратики кожи около 1 см² пересаживались между цыплятами взаимно. В случаях, когда кожей обменивались породы с различным оперением, трансплантат располагался нормально; если же в окраске перьев донора и реципиента не было выразительной разницы, трансплантат поворачивался на 180°. Лоскутки кожи не пришивались, а тщательно укладывались и покрывались для фиксации большим количеством коллодия. Коллодий начинал отваливаться на 7-ой—9-ый день после операции. Контрольные автотрансплантаты в этой серии опытов не делались, но с помощью вышеописанной техники у 1-дневных цыплят трансплантаты приживали в 90—100% случаев. Оценка приживления трансплантата производилась на основании его оперения.

Результаты

Было произведено в общем 184 гомотрансплантации кожи у однодневных цыплят. Приживление и оперение трансплантата наблюдалось у 6 цыплят (3,3%). Из 18 утят оперение кожного трансплантата было получено у 11 (61%). Из

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

10 однодневных индюшат трансплантат оперился только у 1. На таб. 1 показано переживание оперившихся кожных трансплантатов. 4 трансплантата разрушились между 50-м и 80-м днем после операции, один сохранился вплоть до гибели животного в возрасте более 90 дней, а один сохраняется до сих пор (более 150 дней). Только 1 из оперившихся утиных трансплантатов погиб между 50-м и 70-м днем после операции, остальные переживают уже более 150 дней. Единственный приживший и оперившийся гомотрансплантат индюшонка сохраняется уже более 150 дней.

Рис. 1. Оперение и переживание принявшихся кожных гомотрансплантатов у 6 цыплят. Точки — период от операции до начала оперения, чернь — переживание принявшегося и оперившегося гомотрансплантата.

Дискуссия

Возможность вызвать иммунологическое сближение в постэмбриональный период имеет большое практическое значение. Оказывается, что у различных видов теплокровных животных процент новорожденных особей, способных к иммунологическому сближению, бывает весьма неодинаков. В этом отношении большое значение имеют результаты, полученные у утят, у которых в сравнении с цыплятами и индюшатами был отмечен гораздо более высокий процент особей, способных еще к адаптации.

Billingham, Brent и Medawar (1955) установили, что у мышей в момент рождения существует «нулевой период»: введение чужеродных антигенов не вызывает у них ни сближения, ни иммунитета. У кроликов же, вероятно, уже на 22-ой день беременности сближение осуществить невозможно. Необходимо будет накапливать дальнейший материал для определения адаптивной стадии и у других теплокровных животных.

Результаты пересадок на первый день жизни показывают, что количество особей, у которых было достигнуто сближение, сравнительно ниже, чем в результате впрыскивания цельной крови или кровяных телец однодневным цыплятам (Гашек, Граба и Эсслова 1956, Гашек, Ленгерова и Матернова 1955).

Резюме

При осуществлении кожных гомотрансплантаций на первый день после выклевывания мы убедились, что долговременное переживание и даже устойчивое приживление у утят наблюдается гораздо чаще (около 65%), чем у цыплят (3,3%) и у индюшат (1 случай из 10).

Литература

Гашек, М., Ленгерова, А., Матернова, Э.: Анализ участия кровяных телец при экспериментальном преодолении несовместимости кожных гомотрансплантатов у теплокровных. Fol. biol. (Praha), 1 : 319, 1955.

Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B.: Acquired Tolerance of Skin Homografts. Ann. New York Acad. Sci., 59 : 277, 1955.

Cannon, J., Longmire, W.: Studies of Successful Skin Homografts in the Chicken. Ann. Surg., 135 : 60, 1952.

Danforth, C. The Effect of Foreign Skin on Feather Pattern in the Common Fowl (Gallus domesticus). W. Roux' Archiv für Entwicklungsmech. der Organismen, 116, 1929.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Таб. 1.

	Впрыскиваемое количество	Количество животных	Состояние кожных гомотрансплантатов, взятых от доноров кровяных телец			
			На 10-ый день после трансплантации	На 15-ый день после трансплантации	На 18-ый день после трансплантации	На 38-ой день после трансплантации
Внутривенное впрыскивание промытых кровяных телец	0,3 мл	8	7 трансплантатов в хорошем состоянии 1 отмирающий трансплантат	2 трансплантата оперяются 2 трансплантата без реакции 4 трансплантата погибло	4 трансплантата оперяются	4 трансплантата оперяются
Внутривенные впрыскивания разрушенных путем замораживания промытых кровяных телец	0,3 мл	8	8 трансплантатов в хорошем состоянии	8 трансплантатов погибло		
Подкожные впрыскивания промытых кровяных телец	0,4 мл	13	9 трансплантатов в хорошем состоянии 4 трансплантата с сильной воспалительной реакцией	2 трансплантата оперяются 2 трансплантата без реакции 1 трансплантат с сильной воспалительной реакцией	3 трансплантата оперяются 1 трансплантат без реакции 9 трансплантатов погибло	4 трансплантата оперяются
Подкожные впрыскивания разрушенных путем замораживания промытых кровяных телец	0,4 мл	14	9 трансплантатов в хорошем состоянии 3 трансплантата с сильной воспалительной реакцией 2 нарушенных трансплантата	2 трансплантата с сильной воспалительной реакцией 12 трансплантатов погибло	14 трансплантатов погибло	
Контрольные животные (без впрыскиваний кровяных телец на 1-ый день после выклевывания)	—	20	14 трансплантатов в хорошем состоянии 2 трансплантата с сильной воспалительной реакцией 4 нарушенных трансплантата	2 трансплантата с сильной воспалительной реакцией 18 трансплантатов погибло	20 трансплантатов погибло	

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Eastlick, H. L.: Physiol. Zool., 14 : 136, 1941.
Hašek, M.: Problém překonání neslučivosti tkání při homoplastických přenosech. Čas. lék. čes. 44 : 41, 1955.
Hašek, M., Hraba, T., Esslová, M.: Suppression of the Formation of Immune Agglutinins in Chicks in which Tolerance was Produced on the First Day after Hatching by Means of Injections of Erythrocytes and Leukocytes. Fol. biol. (Praha) 2 : 55, 1956.

Skin Homotransplants in Day-old Chicks, Ducks and Turkeys

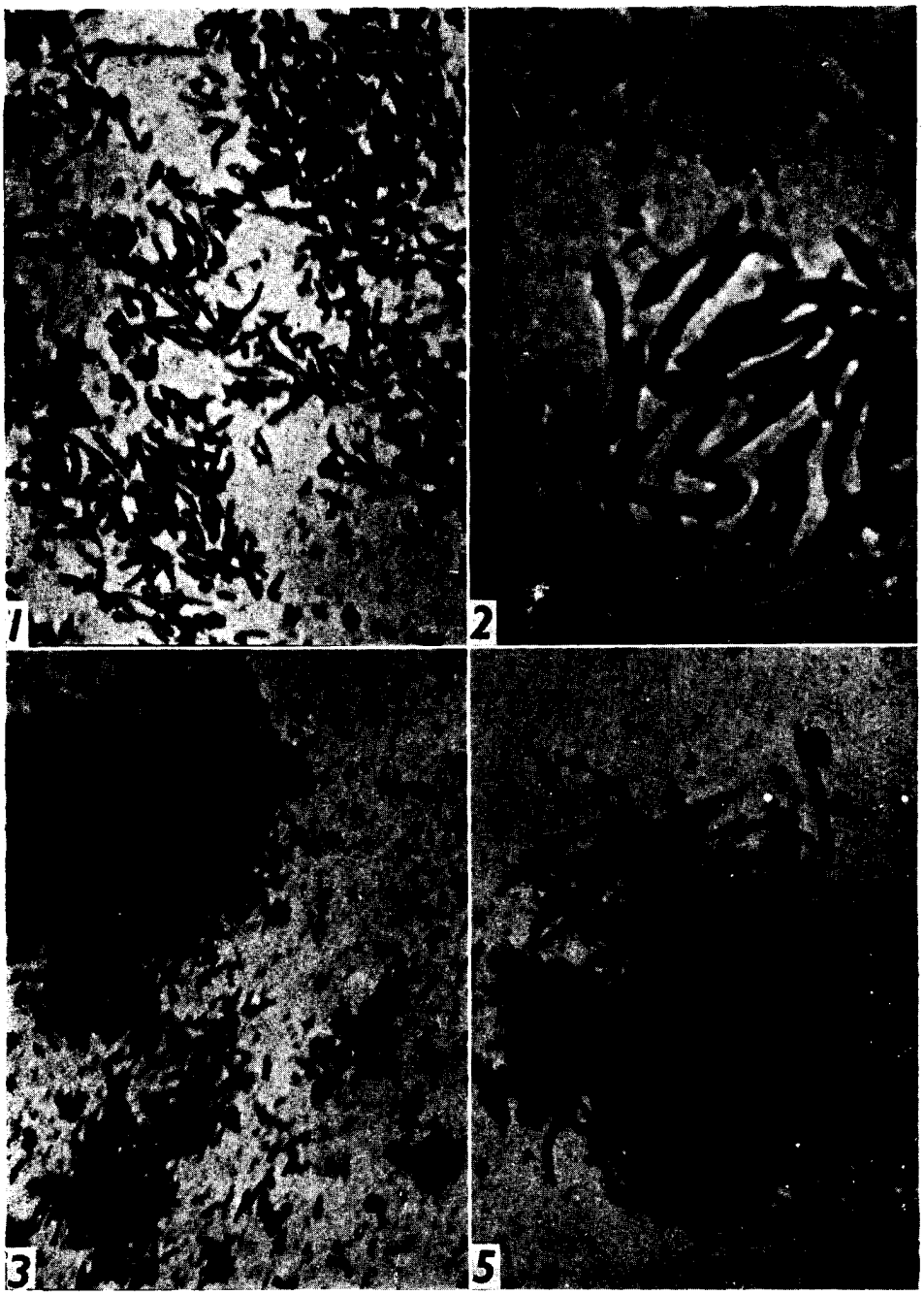
T. HRABA and M. HAŠEK

Summary

In carrying out skin homotransplants on the first day after hatching it was found that long-term survival and permanent taking occurred far more frequently in ducks (65 %) than in hens (3.3 %) or turkeys (one case in ten).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8



Влияние пенициллина на палочку Пфейфера

Рис. 1. В течение 4-часовой инкубации. На удлиненных палочках и волокнах начинают образоватся ККТ. Увеличение в 950 раз.

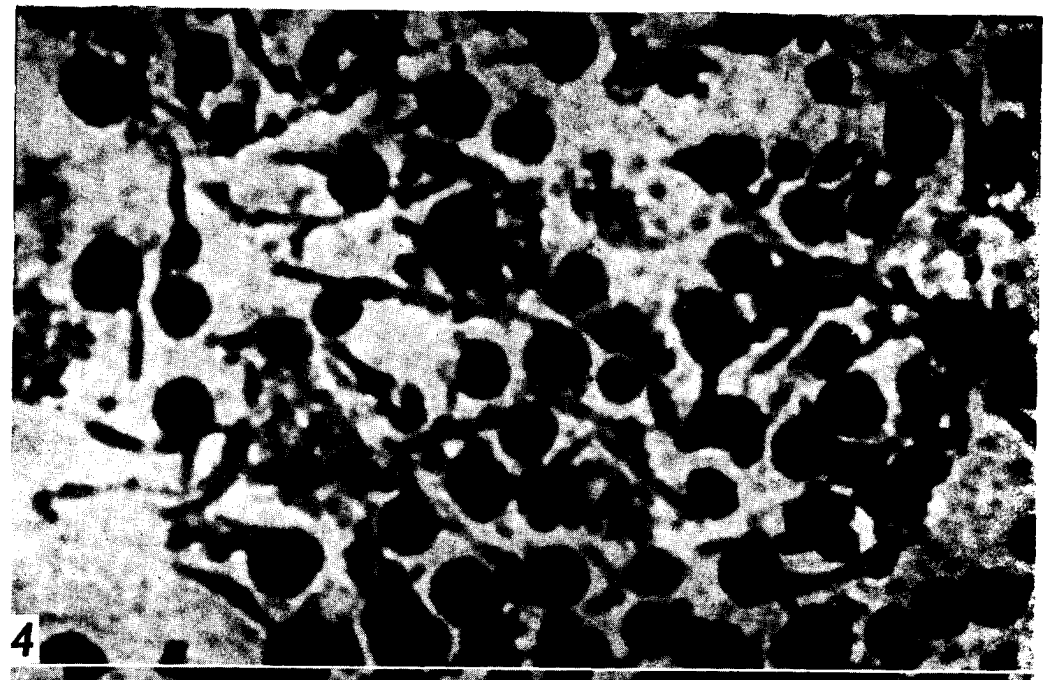
Рис. 2. В течение 4-часовой инкубации. Образование ККТ. Увеличение в 3000 раз.

Рис. 3. В течение 6-часовой инкубации. Превращение нормальной колонии в L-колонию. Образование ККТ. Увеличение в 850 раз.

Рис. 5. В течение 12-часовой инкубации. Образование L-колонии и ККТ в колонии волокнистых палочек. Штамм, который при благоприятных условиях культивации имеет форму кокков. Увеличение в 900 раз.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8



Влияние пенициллина на палочку Пфейфера

Рис. 4. В течение 6-часовой инкубации. Большинство палочек образовало ККТ с гомогенным содержимым. Увеличение в 3000 раз.

Рис. 6. В течение 12-часовой инкубации. ККТ в различных стадиях развития. Однородные тельца и вакуолизированные тельца с грануляцией. Увеличение в 3200 раз.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Влияние пенициллина на палочку Пфейфера

Рис. 7. В течение 24-часовой инкубации. Колония, превратившаяся в L-форму. ККТ в различных стадиях развития. Увеличение в 850 раз.

Рис. 8. В течение 48-часовой инкубации. Вдали от желобка с пенициллином колонии т. н. переходного типа, тогда как ближе к пенициллину находятся L-колонии, а совсем близко от него — распавшиеся L-колонии и остатки распавшихся ККТ. Увеличение в 850 раз.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Рис. 9. 48-часовое действие пенициллина на палочку Пфейфера. Распад ККТ при большом увеличении в 3300 раз.

Снимки 1, 3, 5, 7, 8 и 10 были сделаны с помощью объектива Zeiss Apo 40, 0,95 и окуляра Winkel Zeiss 9, снимки 2, 4, 6 и 9 — с помощью объектива Zeiss Apo 90, 1,30 и окуляра Zeiss Homal IV, 15, снимок 11 — с помощью объектива Zeiss 10, 0,3 и окуляра Winkel Zeiss 9. Микрофотографический аппарат Ultraphot Zeiss, расстояние пластинки от объектива 250 мм. Фотоснимки сделаны д-р мед. Иосифом Шомоди (Somogyi), Гистологический институт университета Коменского, Братислава, за что мы приносим ему свою благодарность.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

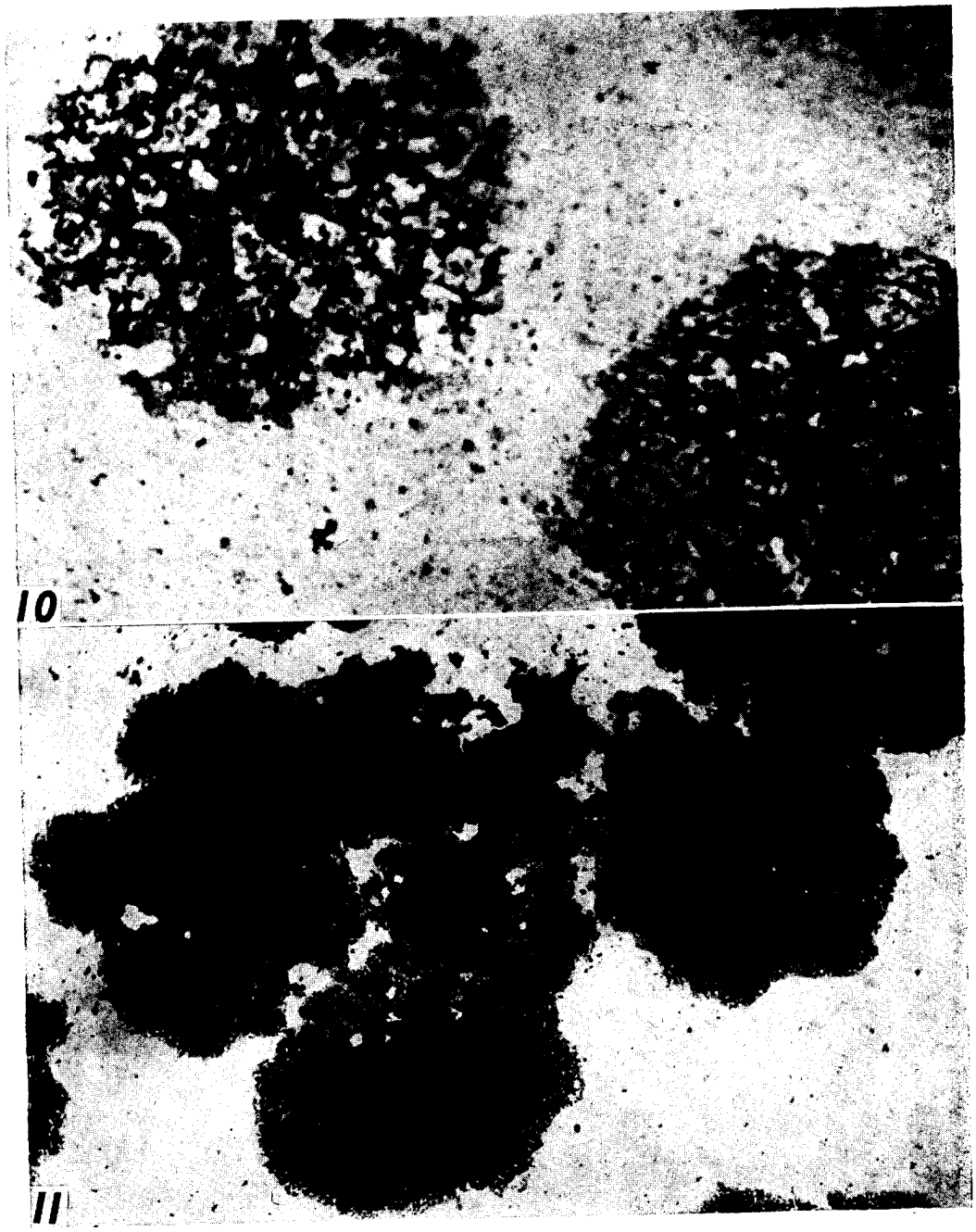


Рис. 10. Действие пенициллина на Палочку Пфейфера при 4-дневной культивации. Распадающиеся L-колонии. Мелкозернистое или коккобациллярное содержимое ККТ изливается в окружающую среду. Увеличение в 850 раз.

Рис. 11. 9-дневная культура палочки Пфейфера на шоколадном агаре. По краям «старых колоний» возникают гнезда вторичных колоний, представляющих переходный тип L-колоний. Наличие ККТ и бактериальных форм. Увеличение в 170 раз.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

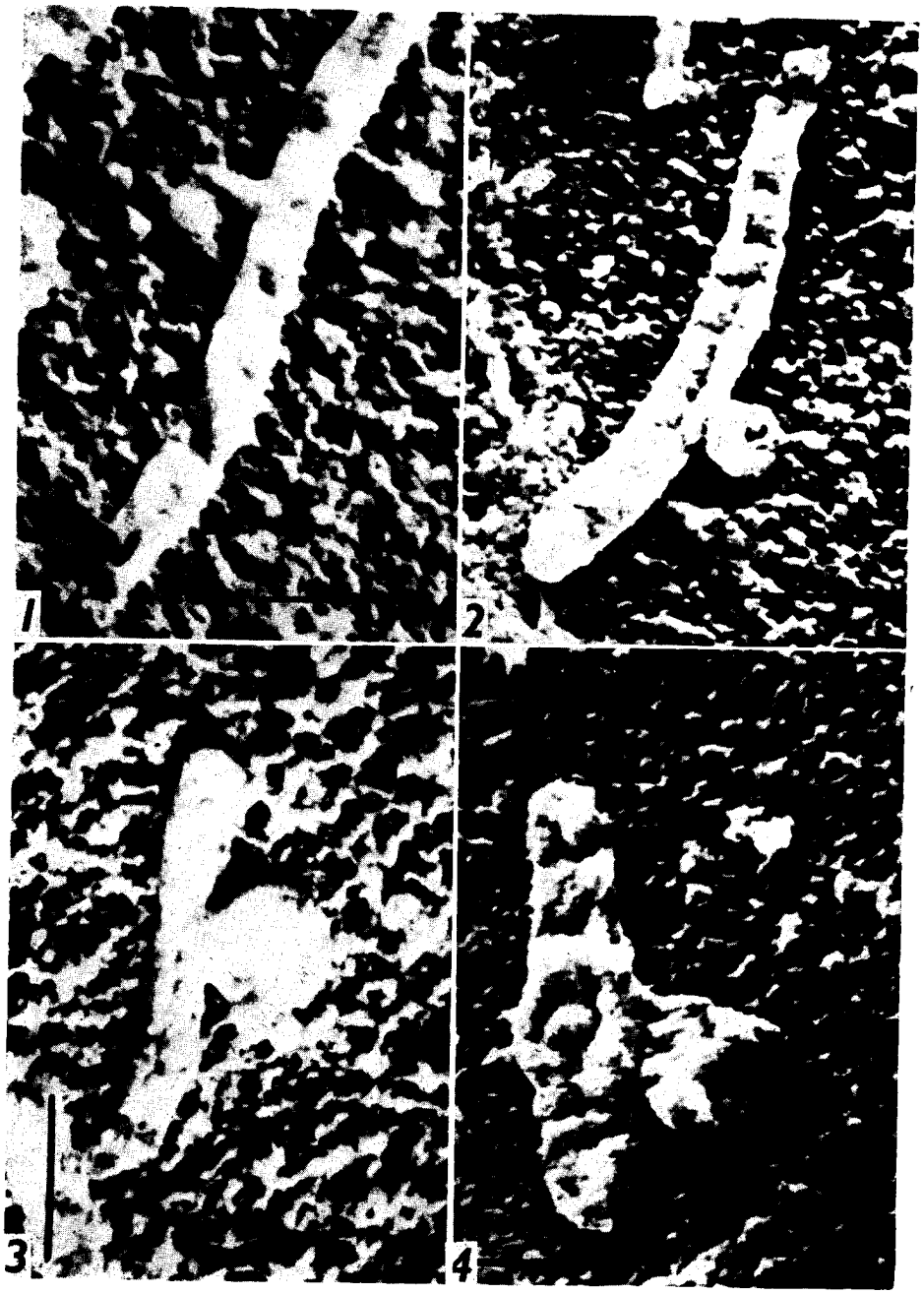
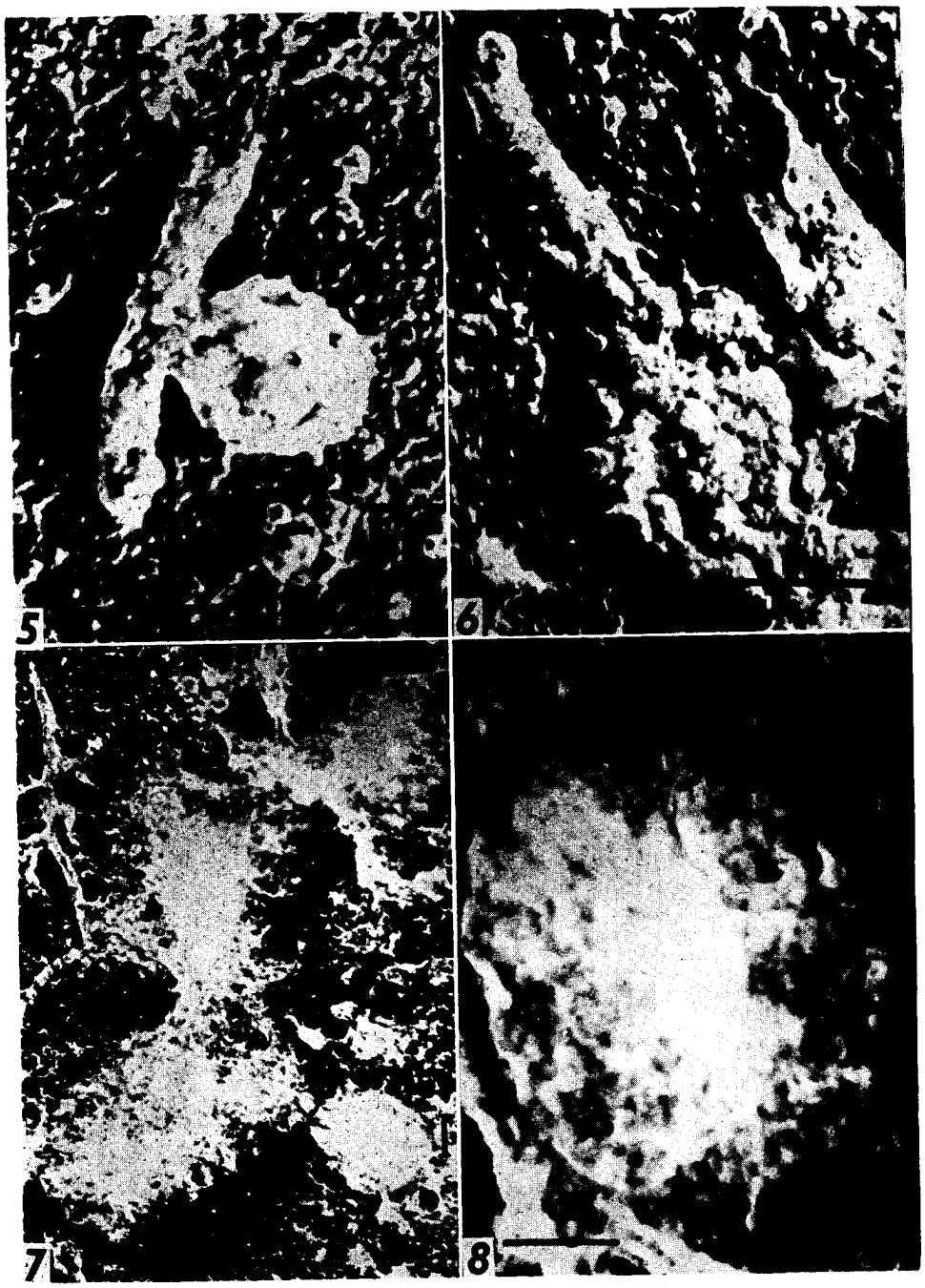


Рис. 1–4. Haemophilus influenzae Pfeiffer. Образование ККТ. Увеличение в 22.000 раз.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8



Палочка Пфейфера. Образование ККТ.
Рис. 5, 6: увеличение в 22.000 раз, рис. 7: увеличение в 5800 раз, рис. 8: увеличение в 15.000 раз.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Рис. 9. Палочка Пфейфера. Образование ККТ. Увеличение в 15.000 раз.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

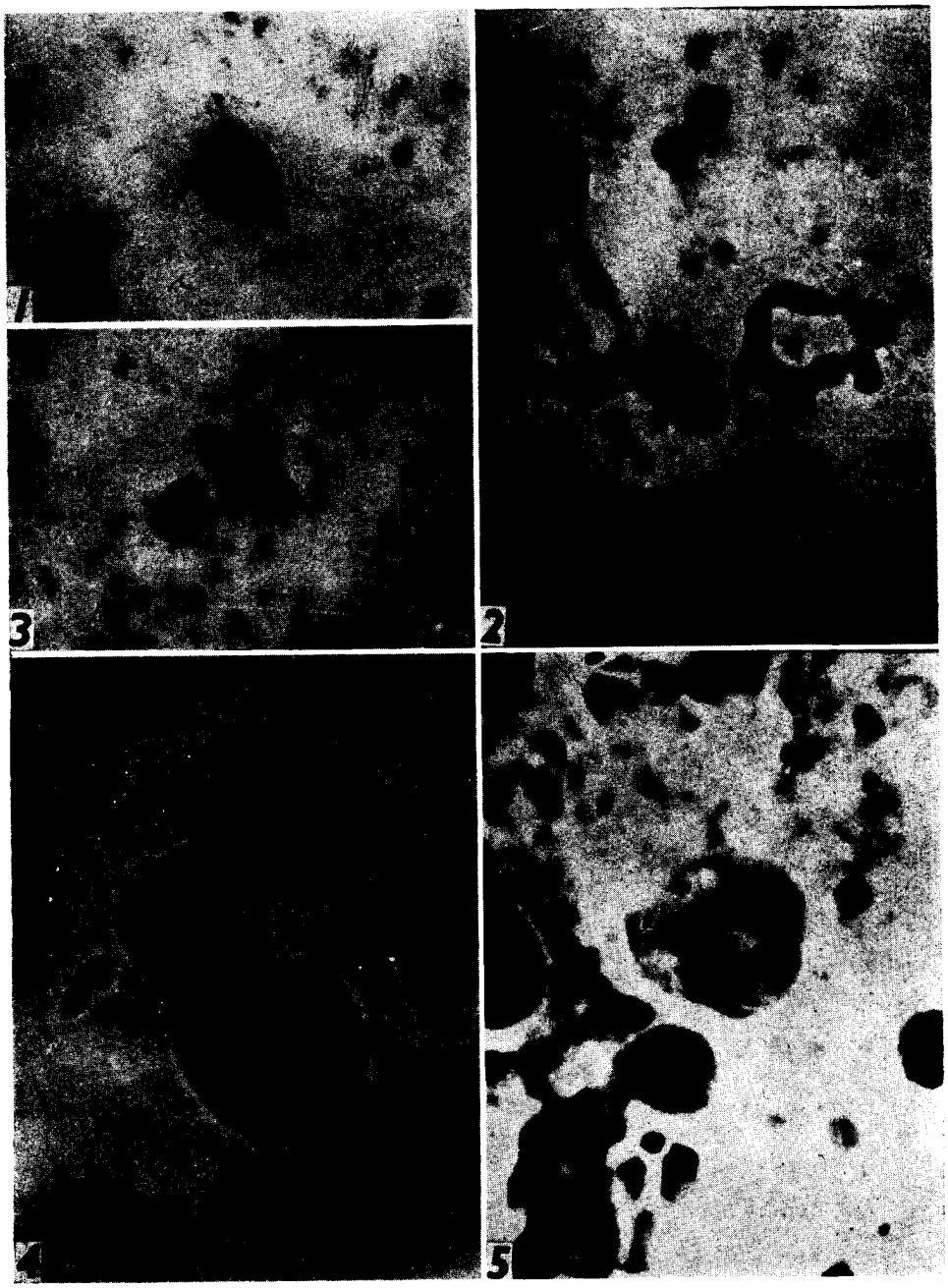


Рис. 1. Плазматический шар приблизительно через 6 час. после посева в питательную среду Начало роста. В центре одно ядро. Feulgen. Увеличение в 1000 раз.

Рис. 2. 12-часовые плазматические образования с длинными отростками. В правом из них пока одно ядро, образуемое двумя отчетливо заметными продолговатыми тельцами. В левом образовании уже 2 ядра, каждое на одном конце. Feulgen. Увеличение в 1000 раз.

Рис. 3. Плазматическое образование с 3 ядрами. В некоторых местах неясные контуры образования. Feulgen. Увеличение в 800 раз.

Рис. 4. 48-часовое плазматическое образование с 5 ядрами. Feulgen. Увеличение в 1000 раз.

Рис. 5. Плазматическое образование с 4 ядрами. Гематоксилин. Увеличение в 1000 раз.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

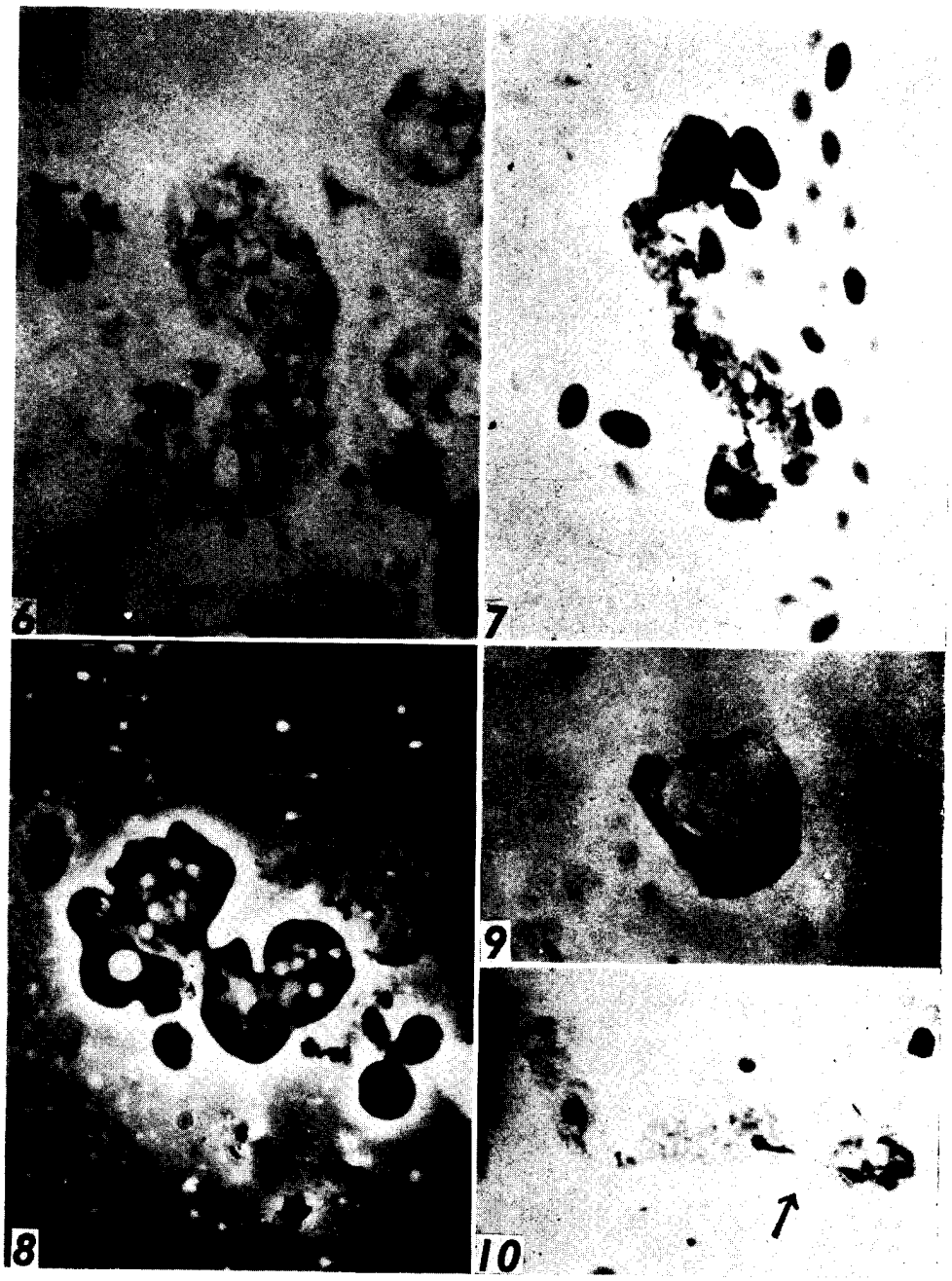


Рис. 6. Другое 48-часовое плазматическое образование с 5 ядрами. Гематоксилин. Увеличение в 1000 раз.

Рис. 7. 60-часовое плазматическое образование с длинными отростками и с 7 ядрами. Гематоксилин. Увеличение в 1000 раз.

Рис. 8. Фотография плазматического образования в фазовом микроскопе. Заметно несколько ядер. Увеличение в 1000 раз.

Рис. 9. Плазматическое образование с 3 ядрами, сконцентрированными в одном месте. Feulgen. Увеличение в 1000 раз.

Рис. 10. Продолговатое плазматическое образование. Обозначенное стрелкой деление ядра можно считать амитозом. Гематоксилин. Увеличение в 1000 раз.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

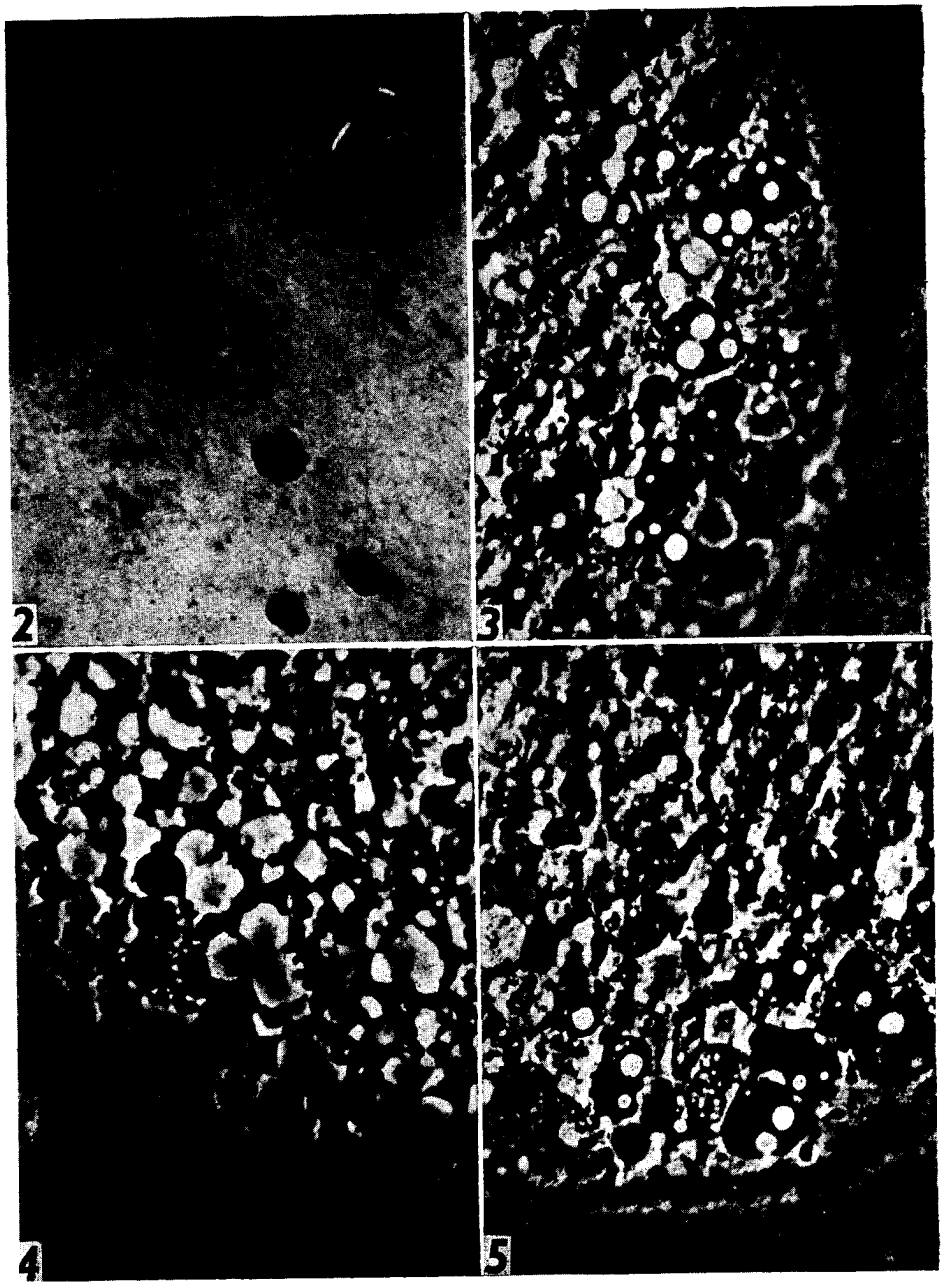


Рис. 2. Группа L-колоний. Плотный центр колонии и редкая вакуолизированная периферическая кайма. 6000 ед/мл. Увеличение в 300 раз.

Рис. 3, 4, 5. Деталь периферии молодых L-колоний с вакуолизацией различных степеней. Фазовый контраст. Увеличение в 1000 раз.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

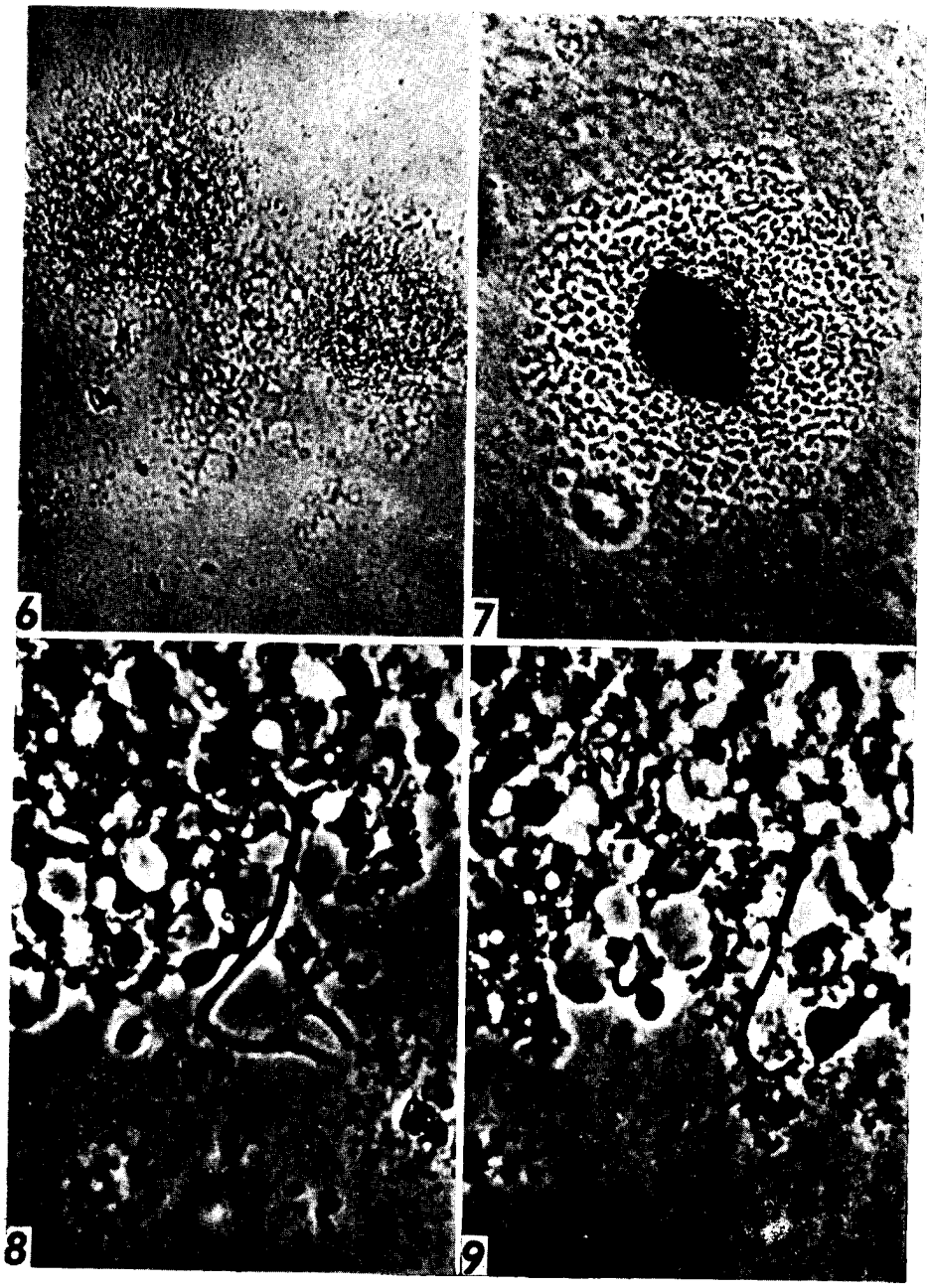


Рис. 6. Две L-колонии Proteus vulgaris, которые не реагировали на палочки. Периферия состоит из вакуолизированных остатков ККТ. Увеличение в 700 раз.

Рис. 7. Другая колония с небольшим, плотным центром и широкой каймой. Фазовый контраст. Увеличение в 500 раз.

Рис. 8, 9. Деталь L-колонии с растущими продолговатыми тельцами, от которых почкованием отделяются новые палочки Proteus vulgaris. Фазовый контраст. Увеличение в 1000 раз.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8

СОДЕРЖАНИЕ CONTENTS INHALT

Herčík, F.: On the Problem of the Microstructure of Living Matter (Герчик, Ф.: К вопросу микроструктуры живого вещества) 1

Блашкович, Д. с сотрудниками: К проблеме фильтрующихся форм бактерий (Blaškovič, D. et al.: On the Problem of Filtrable Forms of Bacteria 8

Šterzl, J. and Hrubešová, M.: The Transfer of Antibody Formation by Means of Nucleoprotein Fractions to Non-immunised Recipients (Штерцль, Я. и Грубешова, М.: Перенос способности к образованию антител на неиммунизированных реципиентов нуклеопротеидными фракциями) 21

Нечас, О.: Жизнеспособность клеточных фрагментов дрожжей. IV. (Nečas, O.: The Vitality of Cell Fragments of Yeast. IV. 29

Нермут, М. и Нечас, О.: L-формы бактерий, III. (Nermut, M. and Nečas, O.: L-forms of Bacteria. III.) 36

Hraba, T., Hašková, V., Lengerová, A. and Vojtíšková, M.: The Influence of Intra-embryonal Injections of Foreign Blood on the Formation of Antibodies. I. (Граба, Т., Гашкова, В., Ленгерова, А. и Войтишкова, М.: Влияние внутризародышевых впрыскиваний чужеродной крови на образование антител. I.) 43

Hašek, M.: The Influence of Intra-embryonal Injections of Foreign Blood on the Formation of Antibodies. II. (Гашек, М.: Влияние внутризародышевых впрыскиваний чужеродной крови на образование антител. II.) 48

Hašek, M., Hraba, T. and Esslová, M.: Suppression of the Formation of Immune Agglutinins in Chicks in which Approximation was Produced on the First Day after Hatching by Means of Iniections of Erythrocytes and Leucocytes (Гашек, М., Граба, Т. и Эсслова, М.: Подавление образования иммуных агглютининов у цыплят, которым на первый день после выклевывания впрыскивались чужеродные эритроциты и лейкоциты) 54

Граба, Т. и Гашек, М.: Гомотрансплантация кожи у однодневных цыплят, утят и индюшат (Hraba, T. and Hašek, M.: Skin Homotransplants in Day-old Chicks, Ducks and Turkeys) 61

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500016-8