

VYLUČOVÁNÍ PASÍVNÍCH PROTILÁTEK Z ORGANISMU OZÁŘENÝCH ZVÍŘAT

Ivo KUNSTÝŘ

Veterinární výzkumné středisko v Praze

Daleko největší pozornost byla až dosud věnována otázkám vlivu záření na imunogenezi. Méně pozornosti se soustředilo kolem otázek pasívní imunity. Hollingsworth (1950) studoval destrukci pasívně podaných protilátek u menší skupiny králíků. Zjistil, že ozáření paprsky X v dávce 300 r neovlivní rychlost jejich vylučování při podání 24 hodin po expozici. Ve vylučování protilátek jsou značné mezidruhové rozdíly (Dixon 1952, podle Talmage 1955). Doba, za kterou se sníží titer protilátek na polovinu, je u člověka odhadována na 14 až 21 dní, u myši na 1 až 2 dny. Průměrná doba nutná k restituci po středně letálních dávkách je přitom odhadována u člověka na 63 dnů, zatímco u myši na 30 dnů (Talmage 1955). Benacerraf (1960) sledoval vliv pasívní imunizace na fagocytární aktivitu retikuloendoteliálního systému u ozářených zvířat. Dokládá, že tato aktivita může být pasívní imunizací zvýšena. Aleksejevová (1958) nezjistila změny ve vývinu zánětlivé reakce u ozářených a pasívně imunizovaných morčat, jimž aplikovala difterické bakterie nebo difterický toxin, oproti neozářeným. Petrov (1957) dospívá na základě experimentů s pasívní antitoxickou protitetanovou imunitou u ozářených myši k názoru, že léčebný účinek séra je u ozářených jedinců snížen. Rovněž Klemparskaja a spol. (1958) soudí, že při použití pasívní imunizace je nutno počítat se snížením jejího ochranného efektu. Toto snížení je možno do značné míry kompenzovat zvýšením dávky séra. Vysvětlení vidí ve změnách reaktivnosti organismu, potlačení přirozené imunity a zvýšení počtu zárodků. Přitom se domnívají, že doba cirkulace protilátky v krvi a rychlost vylučování se výrazně nemění.

Závěrem kapitoly o pasívní imunitě konstatují, že stav pasívní imunity při nemoci z ozáření není dostatečně probádán a vyžaduje další studie.

Cílem naší práce bylo zjistit, zda se skutečně doba vyloučení pasívně podaných protilátek a imunních globulinů u ozářených v podstatě nemění, jak uvádějí citovaní autoři. Kromě toho jsme sledovali dobu, kdy se protilátka po intraperitoneálním podání objeví v krevním séru a zda si po určité době cirkulace v ozářeném organismu podržuje v sérologických reakcích in vitro svůj specifický účín.

Materiál a metodiky

Zvířata. Do pokusů bylo vzato celkem 32 morčat (váhy 350—400 g), 12 psů (ve váze kolem 20 kg) a 17 prasat (ve váze 25—30 kg), tvořících vždy dvě skupiny. První skupina byla ozářena a druhá, neozářená, sloužila za kontrolu.

Zdroj záření. Ve všech případech byla zvířata ozařována ze stabilního zdroje ^{60}Co tak, aby účinná dávka byla kolem LD 50/30. Dávka byla stanovena na podkladě předběžného biologického otestování zdroje v předpokusech a kontrolována hematologicky. Podle dodatečné dozimetrické kontroly se pro morčata pohybovala kolem 300 r, pro psy byla 600 r a pro prasata 510 r.

Pasívně podané protilátky. Jako protilátka bylo **morčatům** podáno intraperitoneálně rekonvalescentní psí sérum po prodělané Rubarthově hepatitidě v množství 2 ml. Sérum vykazovalo před podáním titer komplementfixačních protilátek 160—320. **Psům** byl intravenózně podán koňský gamaglobulin jako modelový nosič protilátek v množství 0,5 ml 2,5% roztoku na 1 kg. **Vepřům** bylo injikováno do retroaurikulárního vaziva homologní hyperimunní protičervenkové sérum v množství 35 ml na kus. Ve všech případech následovalo podání séra obsahujícího protilátky, resp. gamaglobulinu ihned po ozáření.

Způsoby jejich detekce. Gamaglobulinová frakce psího séra byla prokazována ve směsných vzorcích morčecí krve pomocí antigamaglobulinového králičího séra metodou **dvojitě precipitace v agaru** podle Ouchterlonyho (Šourek 1958). Kromě toho byly vlastní protilátky proti viru hepatitidy psů pozorovány v týchž vzorcích krve pomocí **vironeutralizačního testu** na tkáňových kulturách z ledvinných buněk psa. Vironeutralizační test byl používán jako barevný test (color-test), to znamená, že epiteliální buňky tkáňové kultury byly infikovány již při jejím zakládání. Aplikované sérum neutralizovalo 1000 TK ID-50 viru v ředění 1 : 142. V color-testu bylo užito 2. subkultury epiteliálních buněk psí ledviny a 1000 ID-50 viru (III. pasáž na TK). Vyšetřované sérum bylo inaktivováno a ředěno 1 : 10 k vyloučení nespecifické inhibice viru normálním morčecím sérem. Použitý kmen viru Rubarthovy hepatitidy byl izolován Čupíkem v roce 1957 a adaptován na TK.

Košský gamaglobulin podaný psům byl v jejich séru prokazován **testem spotřeby komplementu** (Chudomel a spol. 1959). Tato metoda umožňuje detekovat velmi malá kvanta antigenu, v daném případě gamaglobulinu, na principu vazby přidaného, přesně známého kvanta komplementu na precipitující komplex antigen - protilátka. Výsledek se hodnotí podle množství volného nevyvázaného komplementu, který nebyl v průběhu reakce vychytán mikroskopickým precipitátem. Jeho množství vyjadřujeme čtyřkřížkovou stupnicí, přičemž rozdíl o dvě zkumavky (1 MHD kompl.) mezi úplnou hemolýzou v pokusné a kontrolní řadě zkumavek hodnotíme +, rozdíl o tři zkumavky ++, o 4 zkumavky +++ a o 5 zkumavek ++++.

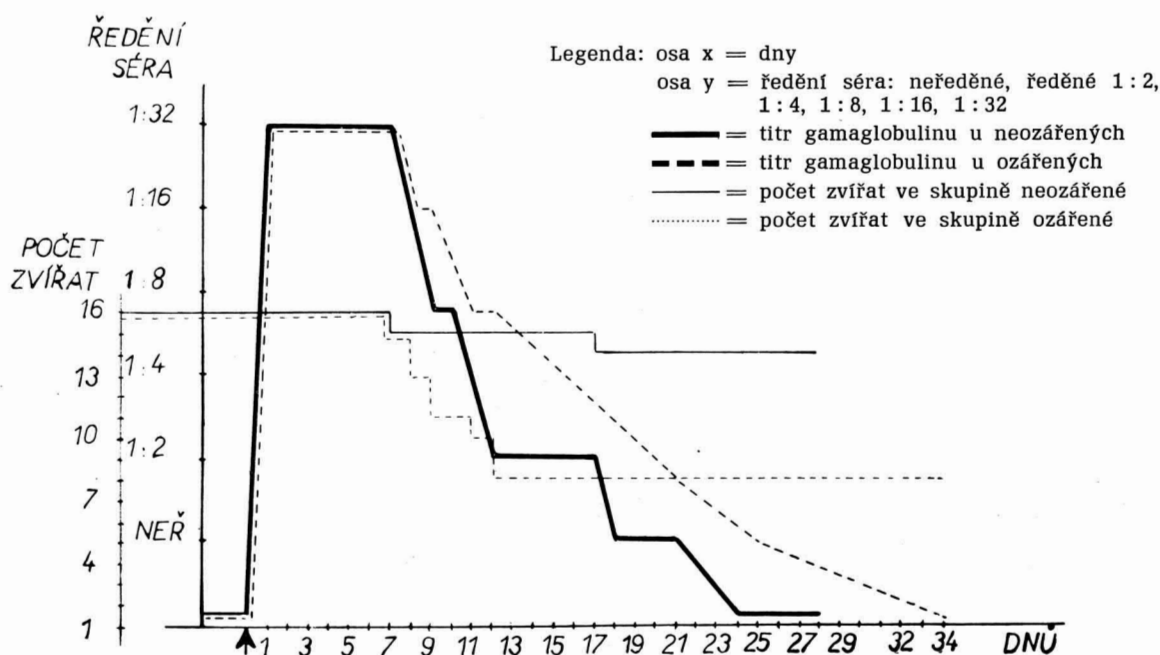
U vepřů bylo homologní hyperimunní sérum prokazováno rovněž in vitro jako bakterie aglutinující a imobilizující protilátky pomocí **tzv. růstové zkoušky** (Wachstumsprobe, ESCA test), popsané původně Wellmannem (1955) a modifikované Hubrigem (1960) a Kucserou (1961). Použili jsme Kucserovy metody s menší modifikací: Do řady zkumavek s ředěním séra (sérum + bujón) se přidá kapka bujónové kultury testovacího kmene *Erysipelothrix insidiosus*. Pomnožení případně kontaminující mikroflóry brání azid sodný přidaný do koncentrace 1 : 2000 a krystalvioleť v koncentraci 1 : 400 000 v ředidle, tj. v bujónu. Nejsou-li přítomny specifické protilátky, pomnožené mikroby vytvoří po 24hodinové inkubaci difúzní zákal. V přítomnosti specifických protilátek vytvoří imobilizovaná a zaglutinovaná mikrobní těla vločkovitý sediment, nad nímž zůstává bujón čirý.

Protože jak negativní, tak pozitivní zkoušené sérum podporovalo do jisté míry růst testovacího mikroba, pokusili jsme se alespoň částečně vyrovnat kvantum namnožených mikrobů v různých zkumavkách a zvýšit spolehlivost odečítání tím, že jsme do každé zkumavky, včetně kontrolní, přidávali po kapce telecího inaktivovaného séra. Tím jsme docílili, že mikroby rostly i ve vyšších ředěních řady zkumavek.

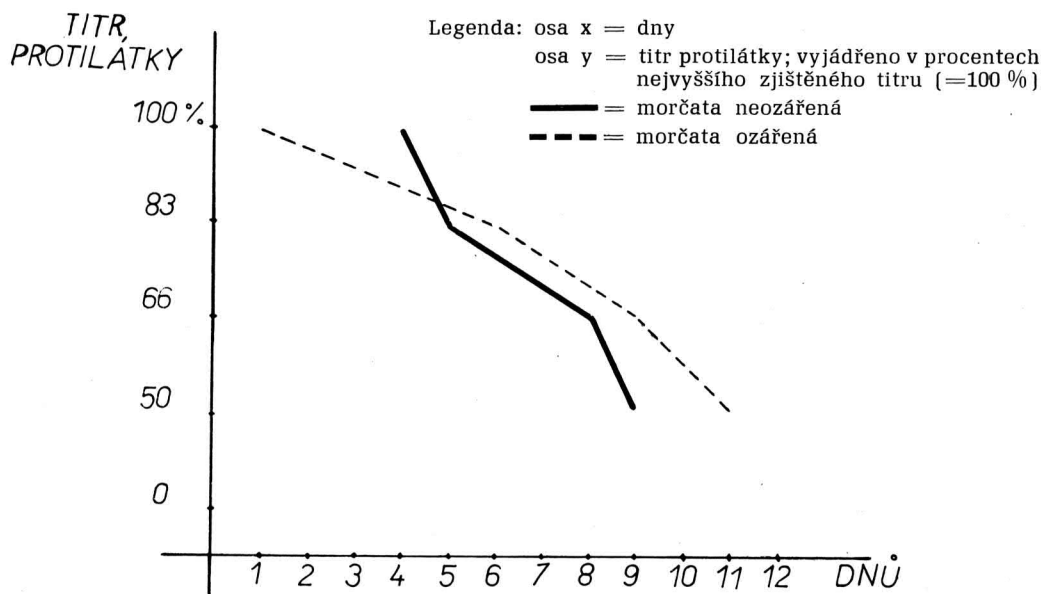
Originální testovací kmen, označený „Marienfelde“, nám laskavě poskytl prof. Wellmann.

Vzorky krve byly odebírány technikou popsanou u nás Hajdú (1957) v intervalech: čtvrtý, sedmý, čtrnáctý, jedenadvacátý a osmadvacátý den.

Graf 1. Destrukce cizorodé bílkoviny v organismu neozářených a ozářených morčat



Graf 2. Titr vironeutralizačních protilátek v séru morčat ozářených a neozářených v závislosti na čase (color-test)



Výsledky

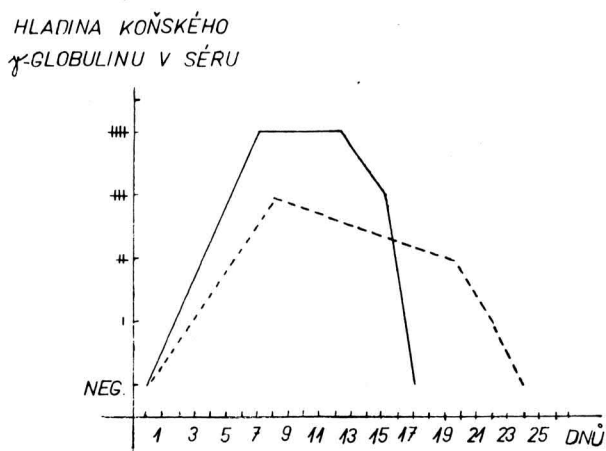
Za 18 hodin bylo podané psí sérum prokazováno jako gamaglobulinová frakce v morčecím séru jak ozářených, tak neozářených v titru vyšším než 1 : 32. Sedmý den začíná pokles titru pod 1 : 32 současně u obou skupin. V následujících dnech se vylučování u ozářené skupiny zřetelně zpožďuje proti skupině kontrolní. Pokus je znázorněn na grafu 1.

Na týchž morčatech byla další metodikou — vironeutralizačním testem prokazována vlastní účinná frakce psího séra — neutralizační proti-

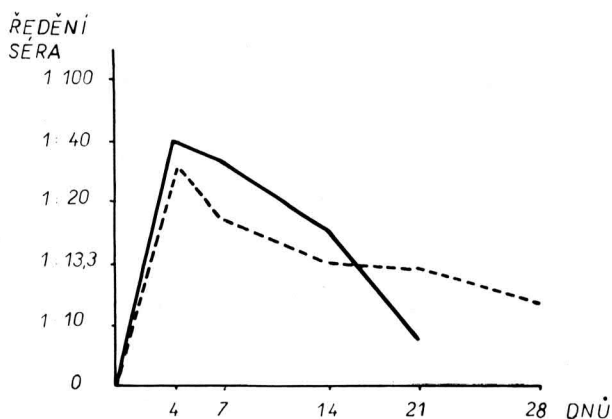
látka proti viru hepatitidy. Výsledek je znázorněn na grafu 2, kde 100 % znamená, že virus v dávce 1000 TK ID-50 byl neutralizován ve všech 6 zkumavkách a obdobně 50 % v polovině založených zkumavek, tj. ve třech.

Z průběhu křivek na grafu 1 a 2 vyplývá, že jak gamaglobulinová frakce psího séra, tak vironeutralizační protilátky klesly z detekovaného maxima na 50 % v séru neozářených mor-

Graf 3. Hladina koňského gamaglobulinu v séru psů ozářených a neozářených v závislosti na čase



Graf 4. Hladina protilátek inhibujících růst *Erysipelothrix insidiosa* v krevním séru ozářených a neozářených vepřů



Legenda: osa x = dny
osa y = hladina gamaglobulinu v séru indikovaná kvantem volného komplementu, neadsorbovaného na vytvořený mikroprecipitát
— = psi neozáření
- - - = psi ozáření

Legenda: osa x = dny
osa y = zvolené hodnoty ředění vyšetřovaného séra:
označení ředění
1 10,0 % = 1 : 10
2 7,5 % = 1 : 13,3
3 5,0 % = 1 : 20
4 2,5 % = 1 : 40
5 1,0 % = 1 : 100
— = vepři neozáření
- - - = vepři ozáření

čat přibližně ve stejnou dobu, mezi 8. a 9. dnem. Ozářená morčata vyloučila gamaglobulinovou frakci na 50 % původní hladiny poněkud později, mezi 9. a 10. dnem (graf 1). Vironeutralizační protilátky klesly v séru ozářených morčat na 50 % původní hladiny mezi 10. a 11. dnem. Terminální části obou křivek na grafu 1 vykazují již rozdíl několika dní. Tento rozdíl znázorňuje zřetelně opožděné vylučování gamaglobulinu ze séra ozářených morčat.

Jak je vidět z grafu 3, liší se hladina heterologního (koňského) gamaglobulinu v séru ozářených psů (přerušovaná čára) proti neozářeným (plná čára) již v začátku svou dynamikou: opožděje se a nedosahuje takové výše jako u kontrol. Pokles nastává z menšího dosaženého maxima u ozářených dříve, avšak povlnějí. Zatímco se organismus neozářených psů zbavil pasívně podaného gamaglobulinu za 17 dní, trvalo 24 dní, než vymizely z krve ozářených psů jeho detekovatelné stopy.

Přehled o výsledcích pokusu na prasatech podává graf 4.

Zatímco u ozářených prasat bylo 28. den po podání zjištěno ještě 36 % z celkového nejvyššího zjištěného titru protilátek, neozářená prasata podanou protilátkou do 28. dne zcela vyloučila. Strmý pokles křivky neozářených mezi 14. a 21. dnem dává tušit, že k úplnému vyloučení protilátek došlo pravděpodobně ještě dříve než 28. den.

Diskuse

Na podání pasívní protilátky je možno pohlízet do jisté míry jako na antigenní podnět. V našem případě jde o primární antigenní podnět, neboť imunizovaná zvířata se s daným antigenem, tj. pasívně podanou protilátkou, dříve nesetkala. Organismus se snaží vpravenou, ať již heterologní nebo homologní bílkovinu odstranit. Na antigenní podnět odpovídá sám aktivní obranou, zahrnující tvorbu vlastních protilátek na antigen, v daném případě pasívně podanou protilátkou. Je známo, že tvorba protilátek trvá potud, pokud koluje v organismu příslušný antigen.

K celému procesu vylučování cizorodého proteinu je nutná aktivace obranných procesů, které však jsou v našem případě u ozářených organismů potlačeny. (Uvádíme „v našem případě“, neboť za jistých podmínek může působit pronikavá radiace na tvorbu protilátek podpůrně — viz Graham a spol. 1956, Ter-Pogossjan 1962, Morozovová 1963).

Ve všech našich pokusech jsme se snažili dodržet stejný interval mezi ozářením a aplikací protilátky: aplikovali jsme protilátku bezprostředně po expozici, respektive do dvou hodin po ozáření (u prasat). Dávka záření byla ve všech pokusech blízka LD 50/30.

I když existují mezidruhové rozdíly, které v našem případě, kdy jsme použili tři různých druhů zvířat, hrají nepochybně roli, přesto lze souhrnně konstatovat, že antigen zastihl vždy

organismus pokusného zvířete ve fázi silné deprese schopnosti mobilizovat imunitní mechanismy nutné k vyloučení pasívně podaných imunních proteinů, respektive ve fázi silné radiosenzitivity protilátkové syntézy (Gengozian a Makinodan 1958, Petrov 1962, Taliaferro a Taliaferro 1964). V uvedené skutečnosti spatřujeme možné vysvětlení námi zjištěného fenoménu opožděného vylučování.

Vedle druhových rozdílů ve vylučování cizorodých protilátek je známa z literatury závislost aktivní imunitní odpovědi na věku (Nossal a Larkin 1958). Námi použitá zvířata všech tří druhů byla zhruba ve stejném věkovém období, ve fázi dospívání, před ukončením vývinu.

U prasat, kde bylo použito homologního séra, byly výsledky obdobné jako u morčat a psů, kde byla použita protilátka heterologní, což svědčí o společném příčinném mechanismu — záření — a o jeho převládajícím významu nad charakterem protilátky.

Domníváme se, že naše zjištění vzhledem ke třem modelovým druhům zvířat, ke čtyřem různým systémům antigen-protilátka a čtyřem různým sérologickým metodám detekce a konečně k přezkoušení jak heterologních, tak homologních protilátek jsou dostatečně průkazná, přestože jsou v rozporu se zjištěním Hollingswortha (1950), který použil podstatně nižší efektivní dávky záření (vyšší radiorezistence králíků), a v rozporu s domněnkami některých dalších autorů.

Je nutno zdůraznit, že z faktu námi zjištěného delšího přetrvávání pasívních protilátek v ozářeném organismu nelze přímo soudit na jejich protekční schopnost. Déle přetrvávající pasívní protilátky nemusí ještě dostatečně chránit ozářený organismus před infekčním antigenem. Naše pokusy in vitro sice svědčí pro dobrý efekt, avšak k jednoznačnému vyjádření by byly potřebné pokusy s challengeováním pokusných zvířat příslušným infekčním agens. Klemparskaja a spol. (1958), Petrov (1962), Brown (1962) a další soudí, že k zajištění protekčního účinku pasívních protilátek jsou nutná několikanásobná kvanta. Hale a Stoner (1954) uvádějí snížení účinku antipneumokokového séra u myšek po ozáření.

Vysvětlení tohoto faktu podává Říha (1956), který zjistil ve svých pokusech na ozářených myších a na kryších v uretanbarbitátovém spánku, že dochází v obou případech ke snížení účinnosti pasívně podaných protilátek. Usuzuje, že účinnost antibakteriálních protilátek není dána jen vazbou s antigenem, že však závisí na stavu celkové reaktivity organismu. Na úvodní fázi — vazbu antigenu s protilátkou — navazuje řada reakcí organismu, které nakonec rozhodují o konečném efektu protilátky. Jde o změny tkáňové permeability a permeability cévní bariéry s poruchou přestupu bílkovin, změny v mobilizaci fagocytů a hlavně snížení baktericidní schopnosti fagocytujících buněk (v čemž odporuje názorům Benacerrafa —

1960). Uzavírá, že snížení účinnosti pasívních protilátek je dokladem aktivní účasti při pasívní antibakteriální imunitě a důkazem úzkého vztahu mezi účinky protilátky a fyziologickým stavem organismu.

Souhrn

Gamaglobulinové frakce psího séra, podaného šestnácti morčatům ozářeným dávkou LD 50/30 ze zdroje ^{60}Co a šestnácti neozářeným, byly prokazatelné v séru obou pokusných skupin za 18 hodin ve vrcholném titru. Destrukce tohoto gamaglobulinu jako cizorodé bílkoviny byla v organismu ozářených zřetelně opožděna.

Vironeutralizační protilátky proti viru hepatitidy psů, obsažené v psím séru, si zachovaly neutralizační účinné in vitro v obou skupinách. Zpomalení úbytku protilátky ze séra ozářených je souhlasné s úbytkem gamaglobulinu.

Polovina gamaglobulinu z podaného séra je vyloučena neozářenými morčaty osmý až devátý den pokusu a dvacátý druhý den již není gamaglobulin prokazatelný.

Ozářená skupina vyloučila 50 % gamaglobulinu mezi 9. a 10. dnem a k vymizení došlo až 26. den. V konečné fázi pokusu je rozdíl 4 dny.

Při obdobném pokusu, provedeném na psech, nebyl podaný koňský gamaglobulin prokazatelný u kontrolních, neozářených již 17. den, zatímco u skupiny psů celotělově ozářených dávkou 600 r vymizel z krevního séra teprve 24. den.

Na skupině vepřů byl sledován vliv ozáření dávkou 510 r (LD 50/30) na vylučování homologního hyperimunního séra proti července vepřů. Bylo zjištěno, že vylučování je u ozářených způsobilé o několik dní.

Závěr

Ve čtyřech pokusech za použití tří druhů modelových zvířat - morčat (32), psů (12) a vepřů (17) - s použitím čtyř různých sérologických postupů a čtyř systémů antigen - protilátka bylo prokázáno, že zvířata jsou v období dospívání, ozářená dávkou blízkou LD 50/30 ze zdroje gama paprsků ^{60}Co , vylučují pasívní protilátku (nebo gamaglobulin) podanou bezprostředně po expozici se signifikantním zpožděním (řádově několik dní) proti zvířatům neozářeným. Je diskutován pravděpodobný mechanismus vzniku tohoto zpoždění.

Pasívně podané protilátky (nebo gamaglobulin) se objevují za stejnou dobu nebo poněkud opožděně a ve stejném nebo poněkud nižším titru v krevním séru ozářených i neozářených. Podržují si stejný účinek, prokazovaný in vitro, po zpětném získání ze séra ozářených zvířat.

Na podkladě literárních údajů je diskutována otázka protekčního účinku pasívních protilátek u ozářených.

Vyslovuji dík dr. J. Čupíkovi za laskavé svolení k uveřejnění výsledků jeho pokusů, s nimiž mé vlastní bezprostředně souvisejí.

Literatura

1. *Aleksejeva, O. G.*: In: Klemparskaja, N. N., Aleksejeva, O. G., Petrov, R. V., Sosova, V.: Voprosy infekcii, immuniteta i allergii pri ostroj lučevoj bolezni. Moskva, Medgiz 1958.
2. *Benacerraf, B.*: Influence of irradiation on resistance to infection. *Bacter. Rev.* 24, 1960 : 35.
3. *Brown, M. H.*: Effect of ionizing radiation on immunity. *Canad. med. Assoc. J.* 87, 1962 : 1183.
4. *Čupík, J.*: Nepublikovaná práce 1957.
5. *Dixon, F. J.*: Cit. podle Talmage, D. V.: Effect of ionizing radiation on resistance and infection. *Ann. Rev. Microbiol.* 9, 1955 : 335.
6. *Gengozian, N., Makinodan, T.*: Relation of primary antigen injection to time of irradiation on antibody production in mice. *J. Immunol.* 80, 1958 : 189.
7. *Graham, J. B., Graham, M. R., Neri, L., Wright, K. J.*: Enhanced production of antibodies by local irradiation. I. Measurement of circulating antibodies. *J. Immunol.* 76, 1956 : 103.
8. *Hajdú, Š.*: Odber krvi od ošipáných z prednej dutej žily. *Vet. časopis* 6, 1957 : 55.
9. *Hale, W. M., Stohler, R. D.*: Effects of ionizing radiation on immunity. *Rad. Research* 1, 1954 : 459.
10. *Hollingsworth, J. V.*: Effects of X-irradiation on passively transferred antibody. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 75, 1950 : 477.
11. *Hubrig, T.*: Vereinfachung der Wachstumsprobe nach Wellmann zur serologischen Rotlaufdiagnostik. *Zbl. Bak. I. - Orig.* 180, 1960 : 422.
12. *Chudomel, V., Ježková, Z., Libánský, J.*: Detection of leukocyte antibodies by the complement consumption test. *Blood* 14, 1959 : 920.
13. *Klemparskaja, N. N., Aleksejeva, O. G., Petrov, R. V., Sosova, V.*: Voprosy infekcii, immuniteta i allergii pri ostroj lučevoj bolezni. Moskva, Medgiz 1958.
14. *Kucsera, G.*: Versuche zum Nachweis von Schweinerotlauf Antikörpern mittels einer neuen serologischen Probe. *Acta vet. Acad. Sci. Hung.* 11, 1961 : 99.
15. *Morozova, V. P.*: Poiski metodov stimuljacii protivoleptospiroznogo immuniteta u oblučennych životnych. *Ž. Mikrob. Epid. Immun.* 40, 1963, 10 : 75.
16. *Nossal, G. J. V., Larkin, L.*: Immunological studies on lethally and sublethally irradiated animals. In: *Radiation Biology - Proc. II. Austral. Conference on Radiation Biology.* Melbourne 1958, s. 236.
17. *Petrov, R. V.*: Voprosy neinfekcionnoj immunologii v probleme biologičeskogo dejstvija ionizirujuščej radiacii. *Med. Radiol.* 2, 1957, 6 : 3.
18. *Petrov, R. V.*: Immunologija ostrogo lučevogo poraženija. Moskva, Gosatomizdat 1962.
19. *Říha, L.*: Působení protilátek v organismu se změněným stavem reaktivity. Dis. práce, Biol. ústav ČSAV 1956.
20. *Šourek, J.*: In: Raška a kol.: Mikrobiologické vyšetřovací metody. Praha, St. zdrav. nakl. 1958, s. 108-118.
21. *Taliaferro, W. H., Taliaferro, L. G.*: The relation of radiation dosage to enhancement, depression, and recovery of the initial Forssman hemolysin response in rabbits. *J. inf. Dis.* 114, 1964 : 285.
22. *Talmage, D. W.*: Effects of ionizing radiation on resistance to infection. *Ann. Rev. Microbiol.* 9, 1955:335.
23. *Ter-Pogosjan, R. A.*: K mechanismu stimulirujuščego dejstvija mestnogo oblučenija lučami rentgena na obrazovanije aglutininov. *Ž. Mikrob. Epid. Immun.* 33, 1962, 5 : 123.
24. *Wellmann, G.*: Die subklinische Rotlaufinfektion und ihre Bedeutung für die Epidemiologie des Schweinerotlaufs. *Zbl. Bakt. I. - Orig.* 162, 1955 : 265.