

Piśmiennictwo

1. Hanko J., Rosko L.: Zbornik Statnej Vet. Spravy MPVŽ SSR 8, 149, 1980.
2. Ritter W., Ruttner F.: Allg. Dt. Imkerzeitung 8, 134, 1980.
3. Stolbov N. M., Vaskov N. A.: Pčelovodstvo 8, 17, 1976.

Adres autora: doc. dr hab. Konstanty Romaniuk, ul. Słoneczna 42, 10-710 Olsztyń

Романюк К. — Попытка улучшения распознавания варроза у медоносной пчелы.

Разработан простой метод исследования пчел относительно варроза. В этом методе использовано известное явление влияния повышенной температуры (42—44°C) для спонтанного оставления *V. jacobsoni* хозяев. Распознавание инвазии *V. jacobsoni* у пчел, а прежде всего определение ее интенсивности заключается в выполнении следующих действий: 1) усыпления пчел в пластмассовом мешочке или баночке хлороформом или эфиром, 2) пересыпания усыпленных пчел в крупную пластинку Петри и подогревания их по температуры 42—44°C 4—6 мин. под лампой (излучатель), 3) переноса пчел в кювет с сеткой, 4) потряхивания пчелами в кювете, 5) изъятия сетки из кювета, высыпания пчел на стол и пересчета их, 6) пересчета паразитов, оставшихся в сосудах (пластмассовые мешочки, баночки), а также на плитке кювета.

ZYGMUNT CYGAN, JANUSZ WIERCINŃSKI,
IRENA BARCZ, ANDRZEJ KRÓL

Lokalizacja znakowanych ^{14}C glukozą antygenów *P. acnes* w narządach myszy

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Słowicza 2, 20-336 Lublin
Centralne Laboratorium Aparaturowe AR, ul. Akademicka 13, 20-033 Lublin

Antygeny beztlenowców *P. acnes* (APA) wzbudzają wyjątkowo duże zainteresowanie ze względu na aktywność immunostymulacyjną (1, 2, 9, 26, 39, 52) i działanie przeciwnowotworowe (8, 34, 51), wykazywane na różnych modelach przeszczepialnych guzów zwierzęcych (10, 31, 43, 53) oraz sprawdzane w próbach terapii złośliwych nowotworów człowieka (12, 17, 23, 33). Stymulacyjny wpływ APA, na niektóre parametry odporności, został już w znacznej mierze poznany (11, 15, 18, 19, 29, 30, 32, 49). Natomiast niewiele dotychczas wiadomo na temat rozmieszczenia antygenów *P. acnes* (APA) w organizmie, zwłaszcza przy różnych drogach ich wprowadzenia. Prześledzenie lokalizacji APA ma znaczenie dla lepszego poznania mechanizmu immunostymulacji warunkowego, w znacznym stopniu, predylekcją tych antygenów do różnych narządów, zwłaszcza zasobnych w komórki odporności specyficznej i niespecyficznej.

W związku z powyższym celem badań własnych było określenie — przy różnych interwałach czasowych — lokalizacji znakowanych ^{14}C glukozą antygenów *P. acnes* w organizmie myszy, przy dożylniej, dootrzewnowej i podskórnej drodze ich wprowadzenia. Realizacja tego zamierzenia wymagała, już na wstępie, ustalenia warunków najbardziej wydajnego

7) подсчета процента заражения исследуемых пчел по формуле:

$$x\% = \frac{\text{число } V. \text{ jacobsoni} \times 100}{\text{число исследованных пчел}}$$

Romaniuk K. — A trial of the diagnosis of Varroa disease in the honey bee.

The author elaborated a simple method of the diagnosis of Varroa disease in bees. In the method was exploited the influence of a high temperature (42—44°C) on a spontanatic leaving of bees by Varroa jacobsoni. The diagnosis of the disease in bees, and especially the determination of its intensity was performed in the following manner: 1. anaesthesia of bees with chloroform or aether in a plastic bag or in a jar, 2. transfer of anaesthetized bees into a large Petri dish and their heating up to 42—44°C for 4—6 minutes under a lamp, 3. transfer of bees into a cuvette with a bottom screen, 4. Agitation of bees in cuvette, 5. taking out of a screen from a cuvette, pouring out of bees on a table and their counting, 6. counting the number of parasites in a plastic bag, in a jar, and in a Petri dish and in a bottom of a cuvette, 7. calculation of a percent of infestation of bees according to the following formula:

$$x\% = \frac{\text{number of } Va. \text{ jacobsoni} \times 100}{\text{number of examined bees}}$$

wykorzystania glukozy przez użyty szczep *P. acnes*, namnażany w opracowanym podłożu półsyntetycznym.

Materiał i metody

Szczep. W badaniach użyto szczep „IB 18” *P. acnes*, wyosobniony ze zmian nekrotyczno-ropnych w wątrobie gęsi tuczonych (kolekcja ZHW Lublin).

Oznaczanie glukozy. Wykorzystanie przez bakterie *P. acnes* (szczep IB 18) glukozy w półsyntetycznym podłożu badano metodą antronową według Bjornesjo (6) z zastosowaniem aparatu typu Specord UV-VIS (C. Zeiss, NRD).

Hodowla. Szczep bakteryjny namnażano w opracowanym we własnym zakresie, półsyntetycznym podłożu, zawierającym 0,1% poszczególnych aminokwasów, tj.: argininę, treoninę, chlorowoderek cysteiny, asparaginę, serynę, tyrozynę, tryptofan, lizynę, ornitynę, histydynę, cystynę, fenylo-alaninę, walinę i leucynę (Sigma Chemical Company, USA), uzupełnionym przez dodatek 0,1% Tweenu 80 (Koch-Light Laboratories LTD, Colnbrook-Bucks, Anglia) i 0,3% glukozy (POCH Gliwice), a poza tym 0,1% ekstraktu drożdżowego (Difco USA) oraz 10 µg/ml hematyny (Koch-Light Lab. LTD, Colnbrook-Bucks, Anglia). Do gotowego podłoża w objętości 20 ml wprowadzano znakowaną ^{14}C glukozę o aktywności 3,7 MBq (Radioactive, Praga, CSR), a następnie wsiewano 0,5 ml 48 godzinnej hodowli z podłoża Wrzoska. Czas namnażania bakterii w atmosferze $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (9:1) w 37°C wynosił 3 dni. Po tym czasie kulturę odwirowywano (4000×g — 45 min.), a uzyskany osad bakteryjny przemywano 4-5-krotnie płynem fizjologicznym aż do uzyskania aktywności supernatantu wy-

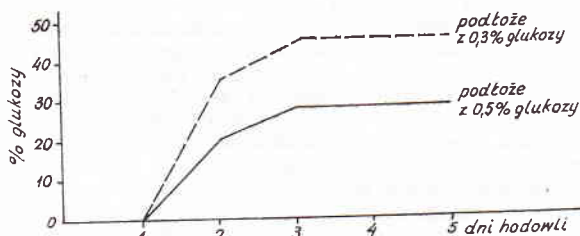
noszącej 3×10^{-1} Bq/ml. Wysuszony w 37°C osad przechowywano w 4°C .

Podawanie APA. Grupom liczącym po 2 myszy wprowadzano dożylnie, dootrzewnowo i podskórnice po 2 mg znakowanej APA (2,5 kBq/mysz) i po upływie 1 i 5 dni zwierzęta usypiano eterem, po czym ważono je, a następnie wypreparowywano badane narządy, które poddawano liofilizacji.

Pomiary promieniowania α i β . Oznaczanie aktywności promieniowania α i β przeprowadzano przy użyciu licznika ZR-16 (Polon), przystosowanego do prowadzenia pomiarów w geometrii 2π . Badane próbki umieszczano w typowych naczyniach pomiarowych i po zastosowaniu głowicy LPP-25 (Polon) oraz zasilaacza wysokiego napięcia ZWN-41 (Polon) dokonywano oznaczeń. Wyniki tych pomiarów, po odjęciu wartości biegu własnego licznika, przedstawiano jako procentową aktywność promieniowania poszczególnych narządów i tkanek w stosunku do stwierdzonej aktywności promieniowania całego organizmu myszy.

Wyniki i omówienie

Warunki określające wykorzystanie glukozy przez szczep *P. acnes*, w opracowanym podłożu, ilustruje ryc. 1. Wynika z niej, że zużycie glukozy — przy użytych koncentracjach 0,3 i 0,5% tego substratu — było najwyższe w 3 dniu inkubacji hodowli i wynosiło kolejno 43,5% oraz 25%. Podkreślić przy tym należy, że w obu przypadkach stopień namnożenia zarazka był podobny. Stąd też uznano, że optymalną wydajnością w budowania ^{14}C glukozy — w struktury antygenowe namnażanego beztlenowca *P. acnes* — będzie można osiągnąć przy dodatku izotopu do podłoża z 0,3% glukozy, inkubowanym przez okres 3 dni.



Ryc. 1. Wykorzystanie glukozy w hodowli beztlenowców *P. acnes*

Wyniki badań nad rozmieszczeniem APA (znakowanie „in vivo” ^{14}C glukożą) w narządach i tkankach myszy przedstawia tab. 1. Zawarte w niej dane wskazują na lokalizowanie się antygenów *P. acnes* głównie w węzłach chłonnych, w przewodzie pokarmowym, śledzionie, wątrobie i w płucach. Aktywność promieniowania α i β tych tkanek była podobna zarówno po upływie 1 doby od wprowadzenia APA, jak i po 5 dniach. Wykazane najwyższe wartości wynosiły dla: węzłów chłonnych („in situ” iniekcji APA) 43,2% (5 dzień s.c.), śledziona 39,75% (1 dzień i.p.), przewodu pokarmowego 38,8% (5 dzień i.p.), wątroby 26,8% (1 dzień i.v.) i płuc 23,05% (5 dzień, i.v.). Natomiast stwierdzona aktywność promieniowania α i β w pozostałych badanych narządach i tkankach nigdy nie przekraczała 9%.

Na szczególne podkreślenie zasługuje wyraż-

nia korelacja rozmieszczenia APA w narządach zależnie od drogi jego wprowadzenia myszom. Antygeny *P. acnes* przy dożylnym i dootrzewnowym podaniu lokalizowały się — bez względu na interwał czasowy — głównie w wątrobie, śledzionie, w przewodzie pokarmowym i w płucach. W badanym węzle chłonnym występowały w niewielkiej koncentracji (2,95%—9,5% ogólnej aktywności α i β). Natomiast iniekcja podskórna APA wpływała na gromadzenie się antygenowego „depôt” przede wszystkim w regionalnym węzle chłonnym (40,95% ogólnej aktywności promieniowania — 1 dzień oraz 43,2% — 5 dzień).

Tab. 1. Aktywność promieniowania α i β zlokalizowana w tkankach myszy po podaniu im antygenów *P. acnes* znakowanych ^{14}C glukożą

Badane narządy i tkanki	Czas po wprowadzeniu APA					
	1 dzień			5 dni		
	Droga podania APA					
	i.p.	i.v.	s.c.	i.p.	i.v.	s.c.
Wątroba	17,50	26,80	8,50	21,00	24,60	9,05
Śledziona	39,75	23,30	7,65	14,50	23,35	5,95
Nerki	4,05	4,40	5,90	2,50	0	2,80
Płuca	7,45	22,45	5,20	10,20	23,05	9,90
Przewód pokarmowy	22,00	15,30	20,20	38,80	17,15	26,80
Węzeł chłonny	4,55	2,95	40,95	5,20	9,50	43,20
Kość udowa	2,80	3,80	4,90	8,40	2,90	3,05
Mięśnie	1,65	0,90	5,00	0	0	0

Objaśnienie: oznaczenia cyfrowe = aktywność promieniowania w %/mg tkanki (średnie wartości dla 2 myszy).

Dotychczas wiadomo, że immunostymulacyjny wpływ antygenów *P. acnes* polega na wzroście liczby komórek immunokompetentnych w takich ośrodkach ich namnażania, jak: węzły chłonne, szpik kostny, śledziona, wątroba i płuca (1, 15, 18, 31). Przeprowadzone badania własne z antygenem znakowanym ^{14}C glukożą wskazują, iż lokalizuje się on w tych przede wszystkim narządach. Pod tym względem uzyskano więc potwierdzenie wcześniejszych badań Dimitrova i wsp. (16) oraz Scotta (45) przeprowadzonych z użyciem ^{125}J , a także Bartha i Singla (3, 4) przy wykorzystaniu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ czy też Sadler i wsp. (44) stosujących antygen z ^3H -tymidyną.

Z ostatnich prac wynika, że komórkami proliferującymi, po podaniu APA, są granulocyty i monocyty (11, 18, 19), a także makrofagi (26, 31) i limfocyty (9, 36). Poza tym podnosi się znacznie poziom lizozymu we krwi (2) oraz dochodzi do indukcji wytwarzania interferonu (35).

W badaniach własnych stwierdzono selektywne gromadzenie się APA w narządach, w zależności od drogi iniekcji. Bowiem przy systemowym (i.v. i i.p.) podaniu antygen lokalizował się głównie w narządach zasobnych w makrofagi (wątroba, płuca i śledziona), podczas gdy podskórne wprowadzenie powodowa-

to umiejscowianie się APA w regionalnych węzłach chłonnych, tj. w głównych centrach limfatycznych (komórki zatrzymujące antygen — makrofagi dendrytyczne i retykularne, wg 48).

Obecność silnie rozbudowanej tkanki limfatycznej w jelitach, głównie w tzw. warstwie „lamina propria” i w kępkach Peyera (5, 21), może tłumaczyć wykazaną predylekcję APA do przewodu pokarmowego. O jej możliwościach funkcjonalności świadczy liczba 550 000 plazmocytołów przypadających na 1 mm³ „lamina propria” (14). Wytwarzane immunoglobuliny, zwłaszcza IgA, hamują adhezję bakterii i wirusów do nabłonka (20), zabezpieczając przeciwważką „szczelność” bariery jelitowej (20) ciągle atakowanej przez znajdujące się tu w dużej ilości zarazki (13).

Wykazane w badaniach własnych rozmieszczenia APA w narządach szczególnie zasobnych w makrofagi tkankowe lub limfocyty, zdaje się potwierdzać słuszność poglądu Scotta (46, 47) o stymulującym wpływie antygenów *P. acnes* na mechanizmy odporności niespecyficznego i specyficznego. Oddziaływanie to jest wyjątkowo silne (26, 40) i dlatego zrozumiałe stają się sugestie różnych autorów o możliwości użycia antygenów *P. acnes* w terapii niektórych schorzeń przebiegających z dysfunkcją odporności, występującą w zakażeniach bakteryjnych (28, 37), wirusowych (7, 41), a także w chorobach nowotworowych (27, 38, 42) oraz jatrogenicznych (13).

Piśmiennictwo

- Adam C., Scott M. T.: J. med. Microbiol. 6, 261, 1973.
- Barcz I.: Niektóre parametry aktywności immunostymulacyjnej wybranego szczepu zwierzęcego *P. acnes* I. Praca dokt. Lubin (w opracowaniu).
- Barth R. F., Singa O.: Cancer Res. 33, 32, 1973.
- Burn R. F., Singa O.: Develop. Biol. Stand. 38, 129, 1978.
- Bazin H.: Annals Med. Vet. 124, 161, 1980.
- Björnebo A. B.: J. clin. Lab. Invest. 7, 141, 1955.
- Brouy J. A., Overfield T., Hammes L. M.: New Engl. J. Med. 271, 1294, 1964.
- Carter S. K.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 277, 722, 1976.
- Castro J. E.: Europ. J. Cancer 10, 115, 1974.
- Castro J. E.: Europ. J. Cancer 10, 121, 1974.
- Chare M. J. B., Baum M.: Develop. Biol. Stand. 38, 195, 1978.
- Chare M. J. B., Webster D. J. T., Baum M.: Develop. Biol. Stand. 38, 495, 1978.
- Collins F. M.: Critical Rev. Microbiol. 5, 27, 1979.
- Crabbe P. A.: Signification du tissu lymphoïde du muqueuses digestives. Brussels i Maloigne, Paris 1967.
- Cullen R. T.: Develop. Biol. Stand. 38, 285, 1978.
- Dimitrov N. V., Greenberg C. S., Denny T.: J. natn. Cancer Inst. 58, 278, 1977.
- Dykes P. W., Trejdosiewicz L. K.: Develop. Biol. Stand. 38, 547, 1978.
- Eliopoulos G., Andre S., Halpern B.: Develop. Biol. Stand. 38, 183, 1978.
- Foster R. S.: Develop. Biol. Stand. 38, 245, 1978.
- Fuvar E. S., Freter R.: J. Immun. 111, 395, 1973.
- Gowans J. L., Knight K.: Proc. Roy. Soc. Biol. 159, 257, 1964.
- Griscelli C., Vassali P., McCluskey R.: J. exp. Med. 130, 1427, 1969.
- Günther U., Hoefer-Janker H., Scheef W.: Develop. Biol. Stand. 38, 507, 1978.
- Guy-Grand D., Griscelli C., Vasali P.: Europ. J. Immun. 4, 435, 1974.
- Guy-Grand D., Griscelli C., Vasali P.: J. exp. Med. 149, 1661, 1978.
- Halpern B. N., Prevot A. R., Biozzi G., Stiffel C., Mouton D., Morard J. C.: J. Reticuloendothel. Soc. 1, 77, 1963.
- Hausman M. S., Brozman S., Synderman R., Mickey M. R., Falley J.: J. natn. Cancer Inst. 55, 1047, 1975.
- Heiss L. I., Palmer D. L.: Am. J. Med. 56, 324, 1974.
- Howard J. G., Christie G. H., Scott M. T.: Cellular Immun. 7, 290, 1973.
- Jones P. D. E., Sadler T. E., Castro J. E.: Develop. Biol. Stand. 38, 259, 1978.
- Mantovani A., Tagliabue A., Vecchi A., Spreafico F.: Europ. J. Cancer 14, 143, 1976.
- McBrade W. H., Peters L. J., Mason K. A., Milas L.: Develop. Biol. Stand. 38, 233, 1978.
- Medenica K., Girard J. R., Maurice P.: Develop. Biol. Stand. 38, 483, 1978.
- Mitcheson H. D., Castro J. E.: Develop. Biol. Stand. 38, 509, 1978.
- Neumann C., Macker E., Sorg C.: Immunobiology 157, 12, 1980.
- Neveu T., Branellec A., Biozzi G.: Anns Inst. Pasteur, Paryż 106, 771, 1963.
- Palmer D. L., Zyman S. N.: Infect Immun. 23, 27, 1979.
- Pike M. C., Synderman R.: J. Immun. 117, 1243, 1976.
- Prevot A. R., Tran Van Phi J.: C. r. hebd. Seanc. Acad. Sci., Paryż 258, 4619, 1964.
- Raynaud M., Kouznetzowa B., Bizzini G., Cherman J. C.: Anns Inst. Pasteur, Paryż 122, 695, 1972.
- Regelson W.: Med. Chem. 8, 160, 1973.
- Remacle-Bonnet M. M., Pommier G. J., Kaplański S., Rance R. J., Depieds R. C.: J. Immun. 117, 1145, 1976.
- Roumlantzeff M., Colombet G.: Develop. Biol. Stand. 38, 65, 1978.
- Sadler T. E., Cramp W. A., Castro J. E.: Develop. Biol. Stand. 38, 137, 1978.
- Scott M. T.: Develop. Biol. Stand. 38, 123, 1978.
- Scott M. T.: J. natn. Cancer Inst. 53, 861, 1974.
- Scott M. T.: J. natn. Cancer Inst. 55, 65, 1975.
- Vernon-Roberts B.: The Macrophage, Univ. Press, Cambridge 1972.
- Warr G. W., Stijvic V. S.: Clin. exp. Immun. 17, 519, 1974.
- Weissman I. L.: Transplant. Rev. 24, 115, 1975.
- Whisnant J. K.: Develop. Biol. Stand. 38, 559, 1978.
- Wilkinson P. C., O'Neil G. J., Wapshaw K. G.: Immunology 24, 997, 1973.
- Whillmoth N., Pimm M. V., Baldwin R. W.: Develop. Biol. Stand. 38, 39, 1978.

Adres autora: doc. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Żelazowej Woli 6 m. 13, 20-854 Lublin.

Цыган З., Вединский Я., Барч И., Круль А. — Локализация меченых ¹⁴C глюкозой антигенов *P. acnes* в органах мыши.

Проследили при разных интервалах времени локализацию меченых ¹⁴C глюкозой антигенов *P. acnes* (APA) в органах мыши при внутривенном, внутрибрюшном и подкожном их введении. Вступительное установили условия наиболее продуктивного включения изотопа в антигенные структуры анаэроба, размножаемого в разработанной собственными силами специальной питательной среде. Показали отчетливую корреляцию размещения APA в органах в зависимости от метода его введения. Антигены *P. acnes* при внутривенном и внутрибрюшном введении накапливались независимо от интервала времени главным образом в печени, селезенке, пищеварительном тракте и легких. В исследуемых лимфатических узлах появлялись они в небольшой концентрации (2,95—9,5% общей активности α и β). Подкожная же инъекция APA влияла на задержание антигенного „derôt” прежде всего в региональном лимфатическом узлу (40,95% общей активности излучения в 1 день и 43,2% в 5 день). На основе полученных результатов продискутировано влияние антигенов *P. acnes* на стимуляцию специфического и неспецифического иммунитета.

Cygan Z., Wierciński J., Barcz I., Król A. — Localization of *P. acnes* antigens labelled with ¹⁴C glucose in internal organs in mice.

Localization of *P. acnes* antigens labelled with ¹⁴C glucose (APA) in internal organs of mice following i.v., i.p. and s.c. injections was examined. It was found a distinct correlation between APA in internal organs and the route by which they were given. *P. acnes* antigens after i.v. and i.p. application were found out independently on lapse of time in the liver, spleen, alimentary tract and in the lungs. In lymph nodes they appeared in low concentrations (2.95—9.5% of general alpha and beta activity). Instead APA after s.c. injection accumulated in regional lymph nodes (40.95% of general activity in the first day and 43.2% at the fifth day). On the basis of the results the authors discussed the influence of *P. acnes* antigens on specific and nonspecific stimulation of immunity.