

Martyna KANDEFER-SZERSZEŃ

**Indukcja interferonu mysiego *in vivo* i *in vitro* w hodowli leukocytów
śledziony**

Индукция мышинного интерферона *in vivo* и *in vitro* в культуре лейкоцитов
селезенки

The Induction of Mouse Interferon *in vivo* and *in vitro* in Culture of Spleen
Leukocytes

Interferony mysie obok interferonów człowieka należą do najlepiej poznanych (13). Pomimo dużego postępu w poznaniu systemu interferonowego myszy, pozostaje szereg nie wyjaśnionych do końca, budzących kontrowersje, problemów, dotyczących na przykład wytwarzania interferonu w organizmie myszy w różnym wieku czy różnym stanie fizjologicznym (5, 9, 18, 28), roli komórek śledziony w wytwarzaniu interferonu *in vivo* po indukcji induktorami wirusowymi czy niewirusowymi (3, 8, 24).

Celem pracy jest określenie zdolności komórek śledziony myszy w różnym wieku, po urodzeniu i w okresie życia płodowego do wytwarzania interferonu indukowanego wirusem choroby Newcastle (NDV) oraz induktorami niewirusowymi, a także wpływu immunizacji myszy homologicznym wirusem na wydajność produkcji interferonu w komórkach śledziony.

MATERIAŁY I METODY

Wirusy: Szczep Radom (NDV-R) wirusa rzekomego pomoru drobiu (choroby Newcastle) namnażano w 9-dniowych zarodkach kury, zakażając je do jamy omocznici. Zebrany płyn omoczniowy zawierał NDV-R o mianie 10^8 TCID₅₀/ml. Typ Indiana wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej bydła (VSV) namnażano w hodowli komórek fibroblastów zarodka kury (FZK). Miano wirusa wynosiło $10^{7.5}$

TCID₅₀/ml. Obydwa wirusy otrzymano z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu (IITD).

Zwierzęta: Do badań użyto myszy Swiss-albino w różnym wieku, które otrzymano od hodowców myszy z Warszawy.

Hodowle komórek: FZK — pierwotną hodowlę fibroblastów zarodka kury otrzymano rutynową metodą trypsynizacji tkanki skórno-mięśniowej 9-dniowych zarodków kurzych. Hodowli FZK używano w trakcie doświadczeń do namnażania i miareczkowania wirusów. L₉₂₉ — linię ciągłą mysich komórek otrzymano z IITD PAN we Wrocławiu i używano do miareczkowania interferonu mysiego. Komórki L₉₂₉ i FZK hodowano w płynie Parkera z dodatkiem 10% surowicy cielęcej i antybiotyków.

Indukcja interferonu *in vitro*: Hodowlę leukocytów ze śledziony myszy w różnym wieku otrzymano w następujący sposób: pobraną od 10 szt. zwierząt śledzionę, po przepłukaniu płynem Eagle'a, „wyczesywano” nożyczkami z ostrym końcem, uwolnione komórki oddzielano od fragmentów tkanki, wirowano, zawieszano w płynie Eagle'a z 10% surowicy cielęcej, nanoszono na standardowy roztwór Ficoll-Paque (Pharmacia) i wirowano przy 400×g przez 30–40 min. Warstwę białych ciałek na granicy dwóch faz zbierano, przepłukiwano 3-krotnie płynem Eagle'a i zawieszano w takiej objętości płynu Eagle'a z 10% surowicy cielęcej, aby uzyskać 5×10⁶ kom./ml. Podobnie postępowano z komórkami wątroby i śledziony płodów mysich. Komórki przenoszono do szklanych lub plastikowych płytek i dodawano induktory interferonu. Komórki inkubowano w temp. 37°C w atmosferze z 5% CO₂ przez czas określony warunkami doświadczenia. Próbkę płynu hodowlanego zbierano, wirowano i przechowywano w temp. -20°C do momentu miareczkowania interferonu. Próbkę interferonu indukowanego wirusem zakwaszano do pH 2 1 M HCl. Po 3 dniach inkubacji w temp. 4°C próbki neutralizowano 1 M NaOH i miareczkowano. Doświadczenie powtarzano 3-krotnie.

Indukcja interferonu *in vivo*: Mysiom wagi 20 g wstrzykiwano do otrzewnowo 5×10⁷ TCID₅₀/mysz wirusa NDV-R lub roztwór kompleksu poli I·poli C z DEAE-dekstranem w dawce odpowiednio 50 µg i 100 µg/mysz. W odpowiednim czasie grupę 10 szt. myszy skrwawiano ze splotu oczodołowego, pobierano narządy, z których wykonywano 10% ekstrakty w PBS i zamrażano. Z krwi po skrzepnięciu oddzielano surowicę i również przechowywano w temp. -20°C. Na 3 dni przed miareczkowaniem próbki odmrażano, zakwaszono 1 M HCl do pH 2. Przed miareczkowaniem pH próbek neutralizowano 1 M NaOH i próbki wirowano.

Miareczkowanie interferonu: Miano interferonu zawartego w próbkach określano stosując mikrometodę opisaną przez Stewarta (21) z hodowlą komórek L₉₂₉ oraz VSV jako wirusem *challenge*.

Immunizacja myszy: Myszy w wieku 3 mies. szczepiono do poduszki łapy NDV-R w dawce 10⁸ TCID₅₀/mysz, zmieszonym 1:1 z kompletnym adiuwantem Freund'a. Do immunizacji stosowano NDV-R o pełnej zjadliwości, NDV-R-uv inaktywowany promieniami uv 43,5 J/m² oraz NDV-R-F, wirus inaktywowany formaldehydem 700 µg/ml (11). W odstępach co 7 dni grupę 10 myszy skrwawiano i określano poziom przeciwciał w surowicy krwi w odczynie zahamowania hemaglutynacji (OZHA). Inhibitory hemaglutynacji eliminowano z surowicy przez wyśycenie CO₂ i odwirowanie wytrąconego osadu.

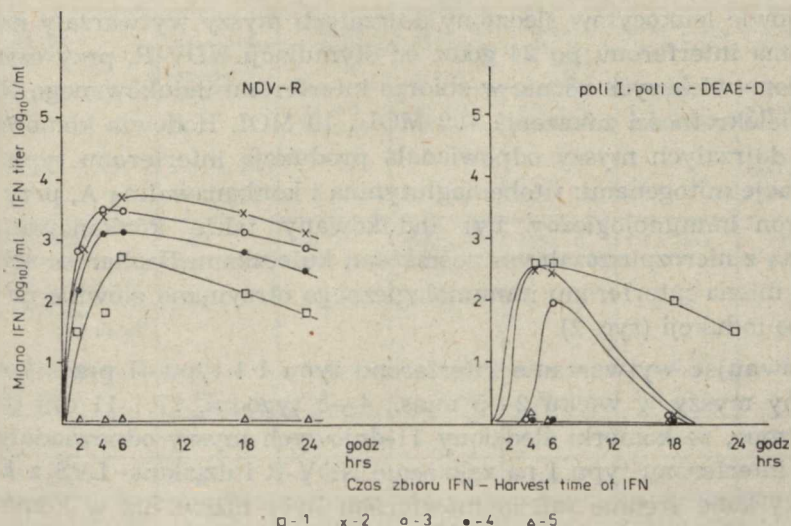
Charakterystyka interferonów w mysich. Obecność mostków dwusiarczkowych, niezbędnych do przeciwwirusowej aktywności interferonu, wykrywano według metody opisaną przez Stewarta (22), możliwość uzyskania che-

micznej reaktywacji interferonów badano według metody Stewarta (22), powinowactwo interferonów do konkanawaliny A określano według metody Besancon (1), a obecność reszt cukrowych w preparatach interferonu badano według metody Stewarta (23).

WYNIKI BADAŃ

We wstępnych doświadczeniach ustalono, że spośród badanych szczepów wirusa choroby Newcastle: Hertfordshire, LaSota i Radom, NDV-R jest najlepszym induktorem interferonu *in vivo*. Dlatego w dalszej części pracy szczep Radom stosowano jako induktor interferonu w organizmie myszy i w hodowlach komórek mysich.

Wytwarzanie interferonu w organizmie myszy indukowano przez dożrnawą iniekcję 5×10^7 TCID₅₀ NDV-R lub iniekcją syntetycznego dwuniciowego kwasu rybonukleinowego poli I · poli C w kompleksie z DEAE dekstranem w dawce składników odpowiednio 50 i 100 µg/mysz (ryc. 1). Najwyższy poziom interferonu, zarówno po indukcji poli I · poli C jak i NDV-R, obserwowano w 4—6 godz. od momentu iniekcji. Po indukcji NDV-R interferon występował nie tylko w surowicy krwi, ale również



Ryc. 1. Miano interferonu w surowicy krwi i narządach myszy po indukcji NDV-R oraz poli I · poli C-DEAE-dekstran; dawka induktorów podawanych dożylnie wynosiła: NDV-R 5×10^7 TCID₅₀/mysz, poli I · poli C 50 µg/mysz, oraz DEAE-dekstranu 100 µg/mysz; 1 — surowica krwi, 2 — śledziona, 3 — wątroba, 4 — grasica, 5 — mózg
Interferon titer in serum and organs of mice after induction with NDV-R or poly I · poly C-DEAE-dextran; dose of inducers introduced intravenously: NDV-R 5×10^7 TCID₅₀/mouse, poly I · poly C 50 µg/mouse, and DEAE-dextran 100 µg/mouse; 1 — serum, 2 — spleen, 3 — liver, 4 — thymus, 5 — brain

w śledzionie, wątrobie i grasicy, a poziom interferonu był wysoki jeszcze w 24 godz. po iniekcji. Natomiast w mózgu nie stwierdzono interferonu. Obecność NDV-R wykryto, oprócz mózgu, we wszystkich badanych organach, gdzie występował przez 6 godz. od momentu zakażenia. Świadczy to o korelacji między obecnością wirusa w poszczególnych organach i wytwarzaniem interferonu w odpowiedzi na ten induktor. Drugi ze stosowanych induktorów poli I · poli C najwyższe miana interferonu indukował w surowicy krwi i śledzionie, natomiast mniejsze w wątrobie, nie wykryto go w mózgu i grasicy. Po indukcji, zarówno NDV-R, jak i poli I · poli C, śledziona myszy okazała się ważnym miejscem produkcji interferonu odpornego na pH 2.

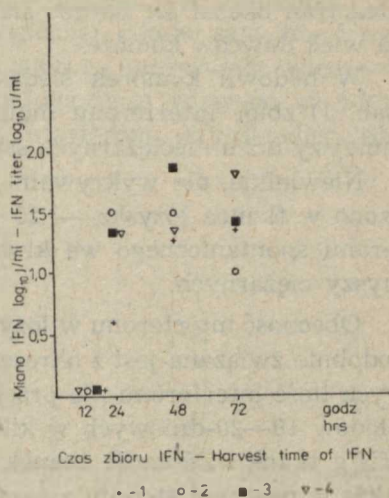
Śledziona, jako narząd limfatyczny, zawiera komórki immunologicznie kompetentne, które uczestniczą w wytwarzaniu interferonu immunologicznego (typu II) po indukcji mitogenem lub wtórnym kontakcie z antygenem. Hodowlę komórek izolowanych ze śledziony myszy w różnym wieku, a także w okresie życia płodowego i po urodzeniu, indukowano NDV-R, syntetycznym poli I · poli C, mitogenami: fitohemaglutyniną (PHA) i konkanawaliną A (Con A) oraz lipopolisacharydem z *E. coli* (LPS). Wyniki doświadczeń przedstawiono na kolejnych ryc. 1—3 oraz zestawiono w tab. 1—3.

Hodowle leukocytów śledziony dojrzałych myszy wytwarzały najwyższe miana interferonu po 24 godz. od stymulacji NDV-R, przy czym nie zauważono większych różnic w zbiorze interferonu indukowanego NDV-R przy wielokrotności zakażenia 100 MOI i 10 MOI. Hodowla komórek śledziony dojrzałych myszy odpowiadała produkcją interferonu typu II na stymulację mitogenami: fitohemaglutyniną i konkanawaliną A, przy czym interferon immunologiczny był indukowany także konkanawaliną A związaną z nierozpuszczalnym nośnikiem: kuleczkami Sepharose 4B. Najwyższe miana interferonu immunologicznego otrzymano głównie na drugi dzień po indukcji (ryc. 2).

Porównując wytwarzanie interferonu typu I i typu II przez komórki śledziony myszy w wieku 2—5 mies., 4—5 tygodni, 17 i 11 dni (tab. 1) stwierdzono, że komórki śledziony 11-dniowych myszy odpowiadały produkcją interferonu typu I na zakażenie NDV-R i działanie LPS z *E. coli*, choć uzyskane średnie miana interferonu były niższe niż w komórkach śledziony zwierząt starszych. Natomiast komórki te nie były zdolne do produkcji interferonu immunologicznego w odpowiedzi na fitohemaglutyninę i konkanawalinę A. Komórki śledziony myszy 17-dniowych produkowały niskie, ale już wykrywalne ilości interferonu immunologicznego po indukcji fitohemaglutyniną. Dopiero komórki śledziony myszy w wieku 4—5 tygodni okazały się w pełni sprawne do produkcji obu typów interferonu. W naszych doświadczeniach *in vitro* poli I · poli C + DEAE-

Ryc. 2. Miano interferonu w hodowii leukocytów śledziony myszy w wieku 2–5 miesięcy po indukcji mitogenami: fitohemaglutyniną (PHA), konkanawaliną A (Con A) oraz konkanawaliną kowalentnie związaną z sefarozą (Con A — Sepharose); 1 — PHA 10 $\mu\text{g/ml}$, 2 — Con A 10 $\mu\text{g/ml}$, 3 — Con A — Sepharose 10 $\mu\text{g/ml}$, 4 — Con A — Sepharose 100 $\mu\text{g/ml}$

Interferon titer in cultures of spleen leukocytes of 2–5-months-old mice after induction with mitogens: phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A (Con A) and with concanavalin covalently bound with Sepharose (Con A — Sepharose); 1 — PHA 10 $\mu\text{g/ml}$, 2 — Con A 10 $\mu\text{g/ml}$, 3 — Con A — Sepharose 10 $\mu\text{g/ml}$, 4 — Con A — Sepharose 100 $\mu\text{g/ml}$



Tab. 1. Indukcja interferonu α/β i γ w hodowii leukocytów śledziony myszy w różnym wieku i myszy ciężarnych

Induction of interferon α/β and γ in culture of spleen leukocytes of mice at different age and pregnant mice

Induktor Inducer	Czas zbioru /godz./ Harvest time /hrs/	Miano IFN u/ml \pm SD z hodowli komórek myszy w wieku: Interferon titer u/ml \pm SD of cells cultures of mice at age:				
		11 dni 11 days	17 dni 17 days	4-5 tyg. 4-5 weeks	2-5 mies. 2-5 months	ciężarnych II poł. ciąży pregnant II half of gestation
NDV-R 10 MOI	24	320 \pm 0	1000 \pm 0	1000 \pm 0	1183 \pm 519	246 \pm 103
pol1 /I/ . pol1 /C/ 50 $\mu\text{g/ml}$ DEAC-Deastran 100 $\mu\text{g/ml}$	24	<5	<5	5 \pm 5	5 \pm 5	5 \pm 0
PHA 10 $\mu\text{g/ml}$	48	<5	5 \pm 5	21 \pm 11	100 \pm 0	5 \pm 0
Con A 10 $\mu\text{g/ml}$	48	<5	<5	10 \pm 0	32 \pm 0	55 \pm 45
LPS 10 $\mu\text{g/ml}$	48	5 \pm 5	10 \pm 0	10 \pm 0	16 \pm 11	16 \pm 11

Objaśnienia: PHA — fitohemaglutynina (M), Con A — konkanawalina A, LPS — lipopolisacharyd z *E. coli*. Optymalne dawki induktorów i czas zbioru określono we wstępnych doświadczeniach.

Explanation: PHA — phytohemagglutinin (M), Con A — concanavalin A, LPS — lipopolysaccharide from *E. coli*. Optimal doses of inducers and harvest time were estimated in preliminary experiments.

-dekstran okazał się bardzo słabym induktorem interferonu bez względu na wiek dawców komórek.

W hodowli komórek śledziony myszy ciężarnych (wiek 3—4 mies.) (tab. 1) zbiór interferonu indukowanego NDV-R czy PHA był znacznie mniejszy niż u nieciężarnych samic i u samców w tym samym wieku.

Niewielkie, ale wykrywalne, ilości interferonu spontanicznego stwierdzono w tkance łożyska — 20 j. IFN/g tkanki, natomiast nie było interferonu spontanicznego we krwi, wątrobie, śledzionie, nerkach i płucach myszy ciężarnych.

Obecność interferonu w łożysku, jak wykazały dalsze badania, prawdopodobnie związana jest z okresem ciąży. W łożyskach płodów 14—16-dniowych ilość interferonu nie przekraczała 20 j. IFN/g tkanki, a w łożyskach płodów 19—20-dniowych w kilka dni przed porodem wzrastała do 100 j. IFN/g tkanki. Zdolność tkanek płodów mysich do produkcji interferonu także w pewnym stopniu zależała od okresu życia płodowego (tab. 2).

Komórki śledziony i wątroby płodów 14—16-dniowych odpowiadały wytwarzaniem interferonu jedynie na induktor wirusowy. Natomiast komórki płodów starszych, 19—20-dniowych wytwarzały także interferon w odpowiedzi na LPS z *E. coli*.

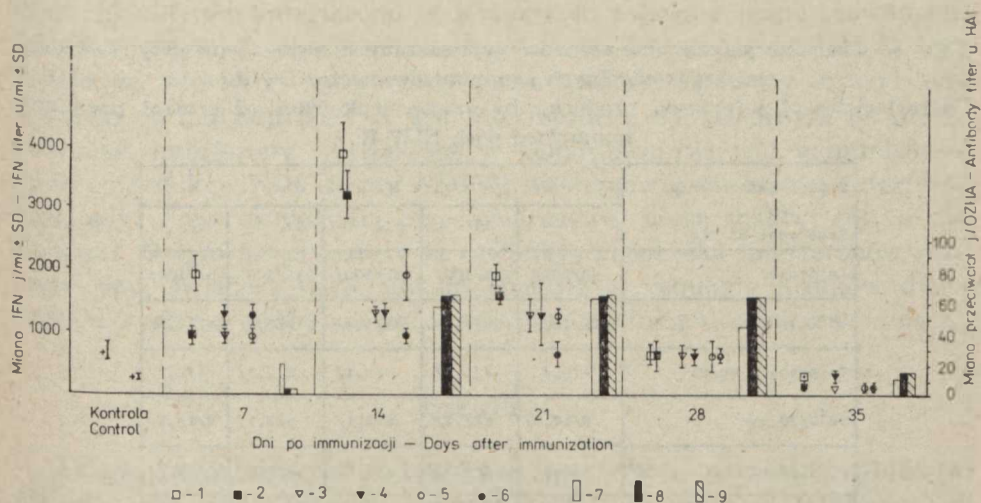
Tab. 2. Indukcja interferonu α/β i γ w hodowli komórek śledziony i wątroby oraz w skrawkach tkanki skórno-mięśniowej płodów mysich
Induction of interferon α/β and γ in cultures of spleen and liver cells and in fragments of cutaneo-muscular tissue of mouse embryos

Rodzaj komórek Cell type	Induktor IFN IFN inducer	Miano IFN j/ml \pm SD dla wieku płodów IFN titer u/ml \pm SD for embryos at age	
		14-16 dni 14-16 days	19-20 dni 19-20 days
Wątroba + • śledzioną 5 x 10 ⁶ kom./ml	NDV-R 10 MOI	1000 \pm 0	1000 \pm 0
	poli I/-poli I/C/ 50 μ g/ml		
	DEAE-D 100 μ g/ml	< 5	< 5
	PHA 10 μ g/ml	< 5	< 5
	Con A 10 μ g/ml	< 5	< 5
	LPS 10 μ g/ml	< 5	10 \pm 0
Skórno-mięśniowa /skranki/	NDV-R 10 ⁷ TCID ₅₀ /ml	320 \pm 0	1000 \pm 0
Łożyseko	-	20 j IFN/g tkanki	100 j IFN/g tkanki

Objaśnienia: czas zbioru interferonu: 24 godz. po indukcji NDV-R i poli I · poli C, 48 godz. po indukcji PHA, Con A i LPS.

Explanation: harvest time of IFN: 24 hrs after induction with NDV-R and poly I · poly C, 48 hrs after induction with PHA, Con A and LPS.

Ponieważ interferon γ produkowany jest przez komórki immunologicznie kompetentne w czasie reakcji immunologicznej, z kolei sam interferon działa modulująco na odpowiedź immunologiczną, interesujące więc jest zbadanie wpływu immunizacji myszy homologicznym wirusem na zdolność komórek śledziona do produkcji tego interferonu. Wyniki doświadczenia przedstawiono na ryc. 3.



Ryc. 3. Indukcja interferonu za pomocą NDV-R lub NDV-R uv w hodowli leukocytów śledziona pobranych od myszy kontrolnych (nie immunizowanych) oraz immunizowanych NDV-R, NLV-R uv lub NDV-R-F; 1 — myszy immunizowane NDV-R, induktor interferonu *in vitro* NDV-R, 2 — myszy immunizowane NDV-R, induktor interferonu *in vitro* NDV-R uv, 3 — myszy immunizowane NDV-R uv, induktor interferonu *in vitro* NDV-R, 4 — myszy immunizowane NDV-R uv, induktor interferonu *in vitro* NDV-R uv, 5 — myszy immunizowane NDV-R-F, induktor interferonu *in vitro* NDV-R, 6 — myszy immunizowane NDV-R-F, induktor interferonu *in vitro* NDV-R uv, 7 — miano przeciwciał przeciw NDV-R w surowicy krwi myszy immunizowanych NDV-R, 8 — miano przeciwciał przeciw NDV-R w surowicy krwi myszy immunizowanych NDV-R uv, 9 — miano przeciwciał przeciw NDV-R w surowicy krwi myszy immunizowanych NDV-R-F

Induction of interferon by NDV-R or NDV-R uv in culture of spleen leukocytes obtained from control (not immunized) and immunized with NDV-R, NDV-R uv or NDV-R-F mice; 1 — mice immunized with NDV-R, interferon inducer *in vitro* NDV-R, 2 — mice immunized with NDV-R, interferon inducer *in vitro* NDV-R uv, 3 — mice immunized with NDV-R uv, interferon inducer *in vitro* NDV-R, 4 — mice immunized with NDV-R uv, interferon inducer *in vitro* NDV-R uv, 5 — mice immunized with NDV-R-F, interferon inducer *in vitro* NDV-R, 6 — mice immunized with NDV-R-F, interferon inducer *in vitro* NDV-R uv, 7 — titres of antibodies against NDV-R in serum of mice immunized with NDV-R, 8 — titres of antibodies against NDV-R in serum of mice immunized with NDV-R uv, 9 — titres of antibodies against NDV-R in serum of mice immunized with NDV-R-F

Myszki immunizowano, wstrzykując do poduszki łapy 10^8 TCID₅₀/mysz NDV-R o pełnej zjadliwości, NDV-R uv inaktywowanego promieniami uv lub wirusa inaktywowanego formaliną (NDV-R F). W tygodniowych odstępach grupę 10 szt. myszy immunizowanych żywymi lub zabitymi wirusami skrwawiano, a poziom przeciwciał w surowicy krwi określano w OZHA.

Przeciwciała pojawiały się w surowicy krwi po 7 dniach zarówno po

Tab. 3. Charakterystyka interferonów wytwarzanych przez leukocyty śledziony myszy kontrolnych i immunizowanych NDV-R

Characteristic of interferon produced by spleen leukocytes of control mice and immunized with NDV-R

Sposób traktowania IFN Treatment of IFN	Miano IFN j/ml - IFN titer u/ml				
	I	II	III	IV	V
Kontrola	64/100/	256/100/	256/100/	256/100/	64/100/
pH 2,72 godz. 4°C	64/100/	64/25/	8/3,1/	8/3,1/	8/12,5/
Trypsyna 1 mg/ml	4/6,2/	4/1,5/	8/3,1/	8/3,1/	4/6,2/
56°C/30 min	8/12,5/	8/3,1/	8/3,1/	8/3,1/	8/12,5/
100°C/2 min	4/6,2/	4/1,5/	4/1,5/	4/1,5/	4/6,2/
Uglikozylacja wg Stewart /23/	16/25/	32/12,5/	32/12,5/	16/6,2/	8/12,5/
Redukcja 5-S wg Stewart /22/	16/25/	16/6,2/	32/12,5/	32/12,5/	32/50/
Reaktywacja 100°C wg Stewart /22/	64/100/	128/50/	64/25/	64/25/	16/25/
Wiązania z Con A - Seph wc Bessancone /1/	32/50/	128/50/	128/50/	128/50/	64/100/

Objaśnienia: I — IFN z komórek śledziony myszy kontrolnych — induktor NDV-R, II — IFN z komórek śledziony myszy immunizowanych NDV-R, — induktor NDV-R, III — IFN z komórek śledziony myszy immunizowanych NDV-R uv — induktor NDV-R uv, IV — IFN z komórek śledziony myszy immunizowanych NDV-R uv — induktor NDV-R uv, V — IFN z komórek śledziony myszy immunizowanych NDV-R-F — induktor NDV-R uv.

Explanation: I — IFN from spleen cells of control mice — inducer NDV-R, II — IFN from spleen cells of mice immunized with NDV-R — inducer NDV-R, III — IFN from spleen cells of mice immunized with NDV-R uv — inducer NDV-R uv, IV — IFN from spleen cells of mice immunized with NDV-R uv — inducer NDV-R uv, V — IFN from spleen cells of mice immunized with NDV-R-F — inducer NDV-R uv.

immunizacji żywymi, jak i inaktywowanymi wirusami, osiągały szczyt 14 i 21 dnia, po czym poziom ich stopniowo spadał.

Wytwarzanie interferonu w komórkach myszy immunizowanych, zwłaszcza po 14 dniach od immunizacji, a więc w okresie wzrostu miana przeciwciał, było wyraźnie wyższe niż w komórkach śledziony zwierząt kontrolnych. Także inaktywowany uv NDV-R, indukujący niskie miana interferonu w komórkach śledziony zwierząt kontrolnych, okazał się dobrym induktorem interferonu w komórkach zwierząt immunizowanych. Charakterystyka fizykochemiczna uzyskanych interferonów (tab. 3) wykazała, że interferon wytwarzany przez komórki śledziony myszy kontrolnych po indukcji NDV-R jest interferonem α/β , odpornym na pH 2, natomiast interferony wytwarzane w komórkach zwierząt immunizowanych po indukcji NDV-R czy NDV-R uv stanowią mieszaninę interferonów, gdyż część aktywności przeciwwirusowej ulega inaktywacji w niskim pH. O tym, że preparaty te zawierają mieszaninę interferonów różnego typu, świadczą także wyniki chemicznej redukcji mostków dwusiarczkowych czy próby wiązania z lektyną roślinną — konkanawaliną A.

DYSKUSJA

Jednym z najlepszych induktorów interferonu u wielu gatunków zwierząt jest wirus choroby Newcastle (21). Jednakże w zależności od gatunku zwierzęcia poszczególne szczepy tego wirusa: welo-, mezo- i lentogeniczne mogą różnić się pod względem zdolności do indukcji interferonu. U ptaków, naturalnych gospodarzy tego wirusa, szczepy lentogeniczne są zwykle dobrymi induktorami interferonu, podobnie jak szczepy o większej zjadliwości, ale częściowo inaktywowane promieniami uv. Natomiast u innych gatunków zwierząt szczepy welo- i mezogeniczne są na ogół lepszymi niż lentogeniczne induktorami interferonu (2, 4, 15, 16, 25, 29).

Przeprowadzone doświadczenia wykazały również, że welogeniczny szczep Radom (NDV-R) jest najlepszym, spośród badanych szczepów wirusa choroby Newcastle, induktorem interferonu u myszy. Obserwowano wyraźną zależność między wytwarzaniem interferonu w poszczególnych organach a obecnością w nich NDV-R. Podobną korelację stwierdzili w swoich doświadczeniach Sołowiow i współprac. (19).

Innymi induktorami, które, jak stwierdzono, w organizmie gryzoni indukują wysokie miana interferonu, są naturalne i syntetyczne dwuniciowe kwasy rybonukleinowe (21). Zastosowany syntetyczny kompleks poli I · poli C z DEAE-dekstranem okazał się skutecznym induktorem, stymulując w surowicy krwi myszy po 4—6 godz. wysoki poziom interferonu.

Brak interferonu w mózgu, zarówno po indukcji NDV-R, jak i poli I · poli C+DEAE-dekstranu świadczy o istnieniu naturalnej bariery między krwiobiegiem a mózgiem, nieprzenikalnej zarówno dla NDV, jak i syntetycznego polimeru.

Bezpośrednia domózgowa iniekcja NDV (2) prowadziła do indukcji wysokich mian interferonu w tkance mózgowej, pojawiał się on także w wielu narządach. Wynika z tego, że bariera dotyczy przenikania induktorów z krwiobiegu do mózgu, natomiast nie hamuje przenikania z mózgu do krwiobiegu. Znaczenie śledziony w produkcji surowiczego interferonu indukowanego wirusem było badane przez wielu autorów, ale uzyskane wyniki są kontrowersyjne (3, 8, 10, 24). Z pewnością śledziona odgrywa pewną rolę w produkcji surowiczego interferonu indukowanego wirusami i jest ważnym, ale nie jedynym miejscem jego produkcji w organizmie.

W przeprowadzonych doświadczeniach, po indukcji NDV-R oraz poli I · poli C, w śledzionie myszy występowały wysokie miana interferonu; w przeliczeniu na 1 g tkanki były one równe, a nawet większe od miana interferonu w surowicy krwi. Dlatego w dalszych badaniach stosowano hodowlę komórek śledziony myszy i badano zdolność tych komórek, pobranych od zwierząt w różnym wieku, do produkcji interferonu.

Dane piśmiennictwa, dotyczące zdolności płodów zwierzęcych i osesków do wytwarzania interferonu, nie są jednoznaczne, choć z większości prac wynika, że młode płody są na ogół gorszymi producentami interferonu niż płody starsze (12, 17). Są one poza tym mniej wrażliwe na działanie interferonu (6), co prawdopodobnie jest naturalnym mechanizmem obronnym przed antyproliferacyjnym działaniem interferonu. Także wyniki prac dotyczących wytwarzania interferonu indukowanego wirusami u osesków różnych gatunków zwierząt są często sprzeczne. Mówią o wysokich mianach interferonu przy równoczesnej intensywnej replikacji wirusa Sindbis w mózgu osesków mysich (28), a z kolei z innych prac wynika, że noworodki mysie zakażone wirusem Coxsackie B mają wysokie miana wirusa we wszystkich organach, lecz bardzo niskie miana interferonu (9). Także wirus Sendai indukuje mniej interferonu i utrzymuje się dłużej w organizmie osesków niż u myszy dorosłych (18).

W naszych doświadczeniach komórki 14—16-dniowych płodów mysich posiadały jedynie zdolność wytwarzania interferonu w odpowiedzi na induktor wirusowy (NDV-R). Nie odpowiadały natomiast na inne stosowane induktory.

Komórki mysich 17-dniowych osesków produkowały niewielkie miana interferonu immunologicznego, lecz praktycznie dopiero komórki 4—5-tygodniowych zwierząt odpowiadały produkcją interferonu na wszystkie stosowane induktory.

Upośledzenie produkcji interferonu obserwowano również w hodowli komórek śledziony myszy ciężarnych. Efekt ten może być wynikiem działania hormonów sterydowych, które, jak wykazały badania (27), hamują wytwarzanie interferonu indukowanego NDV. W czasie doświadczeń obserwowano obecność spontanicznego interferonu w łożysku, którego poziom, początkowo niski, ulegał zwiększeniu w łożyskach przed porodem. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami innych autorów (7).

Immunizacja zwierząt, zarówno homologicznym, jak i różniącym się antygenowo, ale spokrewnionym wirusem, powoduje wzrost miana interferonu indukowanego wirusem w organizmie zwierząt oraz w hodowli komórek izolowanych z takiego organizmu (14, 26).

W przeprowadzonych doświadczeniach obserwowano wyraźną korelację między poziomem produkowanych przeciwciał w surowicy krwi a zdolnością komórek śledziony do wytwarzania interferonu. Prawdopodobnie przyczyną wyższego zbioru interferonu z komórek śledziony zwierząt immunizowanych było wytwarzanie interferonu również przez komórki immunologicznie kompetentne (20). Świadczy o tym wstępna charakterystyka uzyskanych interferonów, które prawdopodobnie stanowią mieszaną z równo interferonów α/β jak i γ .

Wytwarzanie interferonu w organizmie myszy oraz w hodowli mysich komórek śledziony zależy nie tylko od wieku zwierząt, ale również od stanu fizjologicznego (ciąża, wcześniejsza immunizacja). Zmienia się nie tylko poziom wytwarzanego interferonu, ale inna jest jego charakterystyka, gdyż w zależności od stanu fizjologicznego produkują go różne komórki organizmu.

PISMIENICTWO

1. Besancon F., Bourgeade M. F.: Affinity of Murine and Human Interferon for Concanavalin A. *J. Immunol.* **113**, 1061—1063 (1974).
2. Błach-Olszewska Z.: Interferon Induction by Newcastle Disease Virus in Mice. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **18**, 418—441 (1970).
3. Borecky L., Lacković V.: The Cellular Background of Interferon Production *in vivo*. Comparison of Interferon Induction by Newcastle Disease Virus and *B. pertussis*. *Acta Virol.* **11**, 150—158 (1967).
4. Clavell L. A., Bratt M. A.: Relationship between the Ribonucleic Acid Synthesizing Capacity of Ultraviolet-irradiated Newcastle Disease Virus and Its Ability to Induce Interferon. *J. Virol.* **8**, 500—508 (1971).
5. De Maeyer E., De Maeyer-Guignard J.: Effect of Different Carcinogenic Agents on the Production of Interferon in Tissue Culture and in Animal [w:] Ciba Symposium on Interferon. Ed. J. A. Churchill, 218—239, (1967).
6. Drasner K., Epstein Ch. J., Epstein L. B.: The Antiproliferative Effects of Interferon on Murine Embryonic Cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **160**, 46—49 (1979).

7. Fowler A. K., Reed C. D., Giron D. J.: Identification of an Interferon in Murine Placentas. *Nature* **286**, 266—267 (1980).
8. Fruitstone M. J., Michaelis B. S., Rudloff D. A. C., Sigel M. M.: Role of Spleen in Interferon Production in Mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* **122**, 1008—1011 (1966).
9. Heineberg H., Gold E., Robbins F. C.: Differences in Interferon Content in Tissues of Mice of Various Ages Infected with Coxsackie B1 Virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* **115**, 947—953 (1964).
10. Hellmann W., Kohlhage H.: Role of Spleen in Production of Virus Induced Interferon in Rabbits. *Arch. Ges. Virusforsch.* **39**, 396—400 (1972).
11. Hilfenhaus J., Hinz J., Maule r R.: Induction of Interferon by Formaldehyde Inactivated Influenza Virus in the Mouse. *Z. Immun. Forsch.* **146**, 377—388 (1974).
12. Isaacs A., Baron S.: Antiviral Action of Interferon in Embryonic Cells. *Lancet* **2**, 946—947 (1960).
13. Kawade Y.: Purification and Properties of Murine Interferon. *Texas Rep. Biol. Med.* **41**, 219—224 (1981—1982).
14. Manejias R. E., Hamburg S. I., Rabinovitch M.: Serum Interferon and Phagocytic Activity of Macrophages in Recombinant Inbred Mice Inoculated with Newcastle Disease Virus. *Cell. Immunol.* **38**, 209—213 (1978).
15. Meager A., Burke D. C.: Production of Interferon by Ultraviolet Radiation Inactivated Newcastle Disease Virus. *Nature* **235**, 280—282 (1972).
16. Łobodzińska M. i wsp.: Characterization of NDV Strains Used as Interferon Inducers in Mouse Embryonic Cell Cultures. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **21**, 209—218 (1973).
17. Overall J. C., Lovell J. R., Glasgow A.: Fetal Response to Viral Infection. Interferon Production in Sheep. *Science* **167**, 1139—1141 (1970).
18. Sawicki L.: Influence of Age of Mice on the Recovery from Experimental Sendai Virus Infection. *Nature* **192**, 1258—1259 (1961).
19. Sołowiow W. D. i wsp.: K woprosu o produkcji intierfierona w organizmie myszej. *Wopr. Wirusol.* **11**, 418—421 (1966).
20. Stanton G. J., Langford M. P., Weigent D. A.: Cell Types Involve in Production of Interferon by Leukocytes. *Texas Rep. Biol. Med.* **41**, 84—88 (1981—1982).
21. Stewart W. E.: *The Interferon System*. Springer-Verlag, Wien—N. York 1979.
22. Stewart W. E. i wsp.: Distinct Molecular Species of Human Interferons: Requirement for Stabilization and Reactivation of Human Leukocyte and Fibroblast Interferons. *J. Gen. Virol.* **26**, 327—331 (1975).
23. Stewart W. E. i wsp.: Elimination of Size and Charge Heterogeneities of Human Leukocyte Interferon by Chemical Cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 4200—4204 (1977).
24. Subrahmanyam T., Mims C.: Fate of Intravenously Administered Interferon and the Distribution of Interferon during Virus Infection in Mice. *Brit. J. Exp. Path.* **47**, 168—176 (1966).
25. Sypuła A i wsp.: Comparative Studies on Chicken and Mouse Interferon Induced with Newcastle Disease Virus. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **21**, 219—226 (1973).
26. Szalaty H., Łobodzińska M., Albin M.: The Influence of Immunization on the Production of Interferon *in vitro* and *in vivo*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **25**, 719—723 (1977).

27. Talas M., Stöger I.: Effect of Hormone Preparations on Interferon Production. Proc. Microbiol. Res. Group Hung. Acad. Sci. 4, 45 (1972).
28. Vilček J.: Production of Interferon by Newborn and Adult Mice Infected with Sindbis Virus. Virology 22, 651—652 (1964).
29. Zdanowa L. W., Mientkiewicz L. M.: Intierfieronogenność' i drugije swojstwa wirusa bolesti Niukasla. Wopr. Wirusol. 4, 435—439 (1969).

РЕЗЮМЕ

Исследовали кинетику образования интерферона в организме мышей, индуцированных при помощи Newcastle disease virus, Radom-штамм (NDV-R) и poli I·poli C в присутствии DEAE-декстрана. Самый высокий титр интерферона в сыворотке крови мыши обнаружили через 6 часов после введения индукторов интерферона. Самые высокие титры интерферона наблюдали в селезенке. Культуры лейкоцитов селезенки мышей разного возраста индуцировали к образованию интерферона при помощи NDV-R, poli I·poli C с DEAE-декстраном, фитогемагглютинином, конканавалином А и липополисахарида с *E. coli*. Клетки селезенки мышшиных эмбрионов образовывали интерферон лишь после стимулирования их при помощи NDV-R и липополисахаридом с *E. coli*. И клетки селезенки 17-и дневных мышей образовывали низкие титры интерферона после индукции фитогемагглютинином и конканавалином А. Зато культуры селезенки 4—5-и недельных мышей образовывали высокие титры интерферона α/β и γ , похожие на наблюдаемые в культурах клеток, взятых у 2—5-и месячных мышей. Клетки селезенки, взятые у мышей, которые были подданы иммунизированию при помощи NDV-R, образовывали интерферон с более высоким титром, чем титр интерферона, образованного в клетках, взятых у контрольных, не иммунизированных мышей, особенно тогда, когда селезенки брали на 14-й день после иммунизации.

SUMMARY

The kinetics of interferon production induced by Newcastle disease virus, strain Radom (NDV-R) and poli I·poli C in the presence of DEAE-dextran was studied in the organism of mice. The highest interferon production in mouse serum was obtained 6 hrs after induction with both inducers. The high titers of interferon were also found in the spleen. The cultures of spleen leukocytes from embryos and mice of different ages were induced with NDV-R, poly I·poly C with DEAE-dextran, with phytohemagglutinin, concanavalin A and LPS from *E. coli*. The embryo spleen cells produced interferon only after stimulation with NDV-R and LPS. Spleen cells from 17-day-old suckling mice very poorly produced interferon type II after induction with mitogens. The cultures of spleen cells from 4—5-week-old mice produced high titres of interferon α/β and γ similarly to the cultures of 2—5-month-old mice. Spleen cells from mice immunized with NDV-R produced higher titres of interferon than cells of control not-immunized donors, especially if they were taken 14 days after immunization.

The first part of the book is devoted to a general history of the United States from its discovery by Columbus in 1492 to the present time. It covers the early years of settlement, the struggle for independence, and the formation of the Constitution. The second part is a detailed account of the Civil War, from its outbreak in 1861 to its conclusion in 1865. The third part deals with the Reconstruction period, the Gilded Age, and the Progressive Era. The fourth part is a history of the United States in the twentieth century, from the First World War to the present.

The book is written in a clear and concise style, and is suitable for use as a textbook in schools and colleges. It is also a valuable reference work for anyone interested in the history of the United States. The author has drawn on a wide range of sources, and has provided a comprehensive and up-to-date account of the country's history. The book is divided into four main parts, each of which is further subdivided into chapters and sections. This makes it easy to find specific information, and also allows the reader to follow the development of the country's history over time. The book is a well-organized and informative work, and is highly recommended for anyone who wants to learn more about the United States.

The book is a well-organized and informative work, and is highly recommended for anyone who wants to learn more about the United States. It is a comprehensive and up-to-date account of the country's history, and is suitable for use as a textbook in schools and colleges. The author has drawn on a wide range of sources, and has provided a clear and concise style. The book is divided into four main parts, each of which is further subdivided into chapters and sections. This makes it easy to find specific information, and also allows the reader to follow the development of the country's history over time. The book is a well-organized and informative work, and is highly recommended for anyone who wants to learn more about the United States.