

Lebendgewicht von 350–500 g durchgeführt. Die Tiere wurden bei einer Standarddiät gehalten und ad libitum mit Wasser getränkt. Vor Benutzung der Tiere wurde ihnen das Futter entzogen.

Die Polynuclear-Leukozyten wurden gewonnen durch zweimalige i.p. Injektion der Tiere mit 1% Natriumchlorid¹², dem 5 IE Heparin/ml der Lösung zugefügt war. Die Durchführung der Phagozytose erfolgte mittels Inkubation eines Teils der Zellen mit einer Suspension des Aujeszky-Virus im Verhältnis von 50 Virusteilchen je Zelle bei 37°C, während 30 min, der andere Teil der Zellen diente als Kontrolle. Nach Ablauf dieser Frist wurden die inkubierten wie auch die Kontrollzellen dreimal mit PBS gewaschen und je siebenmal eingefroren und bei 25°C aufgetaut. Bei einem Teil der gespaltenen Zellen wurde die Trockensubstanz und bei anderem ihre proteolytische Aktivität nach der von POLJAKOVA modifizierten Methode von ANSON^{13,14} bestimmt. Angesichts des vergleichenden Charakters der Untersuchungen drückten wir die proteolytische Aktivität nicht in IE sondern in der pro Stunde aus 1 mg trockener Zellmasse gebildeten Tyrosinmenge aus.

Resultate. Die Untersuchungen wurden auf Zellsediment peritonealer Flüssigkeit von 20 Meerschweinchen durchgeführt. Die Ergebnisse werden in der Tabelle angeführt.

Das Enzymsystem enthält 2 ml 2% Pferdehämglobin, 0,5 ml Puffer, pH 3,8 und 0,5 ml Extrakt von polymorphkernigen Leukozyten, Inkubation 1 h bei 37°C.

Aus der Tabelle geht hervor, dass von 1 mg trockener Zellmasse normaler Polynuclearleukozyten von Pferdehämglobin/h 92 mg Tyrosin und von denselben Leukozyten nach Antigenbehandlung (Aujeszky-Virus) 124 mg Tyrosin abgespalten werden. Daraus folgt, dass sich die proteolytische Aktivität der Polynuclearleukozyten nach Behandlung mit dem Aujeszky-Virus erhöht. Verglichen mit den unbehandelten Leukozyten beträgt die Erhöhung rund 34,5%.

Der biologische Wert dieser Erhöhung der proteolytischen Aktivität lässt sich schwer bestimmen. Einige Literaturangaben geben jedoch zu gewissen Vermutungen Anlass.

Es wurde festgestellt, dass Leukozyten lösliche Eiweissantigene aufnehmen, was auch bei den Viren wahrscheinlich durch Pinozytosis erfolgt^{15–17}. Die Korpuskularantigene, die in vorliegendem Falle Teilchen des Aujeszky-Virus sind, spalten sich kurz nach der Agglutination¹⁸. Die Spaltung wird durch proteolytische Enzyme bewerkstelligt. Auf Grund der Untersuchungen von LAPRESLE und DURIEUX¹⁹ wurde festgestellt, dass bei dieser Spaltung Bausteile gewonnen werden, die ihren antigenen Charakter beibehalten. Laut einer Reihe von Befunden können sich Antigenfragmente, wenn auch nur in geringen Mengen, mit der RNS der Polynuclearleukozyten ver-

binden, wobei der produzierte Komplex instande wäre, die Bildung von Antigenkörpern zu induzieren²⁰. So gelang es einem von uns, mittels Ribonucleinsäure, die aus mit Aujeszky-Virus behandelten Polynuclearleukozyten isoliert wurden, in normalen Lymphknotenzellen Antikörper zu induzieren, welche ihrerseits instande sind, die zytopathogene Wirkung des Aujeszky-Virus zu neutralisieren²¹.

Auf Grund der obigen Angaben dürfte die Erhöhung der proteolytischen Aktivität der Polynuclearleukozyten eine Schutzreaktion sein, bei der Antikörper gegen das verwendete Virus produziert werden.

Proteolytische Aktivität normaler und antigenstimulierter Polynuclearleukozyten

	Polynuclearleukozyten	
	normal	antigenstimuliert
Anzahl der Versuche	20	20
Durchschnittswert der proteolytischen Aktivität	92	124
Standardabweichung	3,5	3,1

mg freigesprochenes Tyrosin je mg trockene Zellmasse im Laufe 1 h bei 37°C.

Summary. The proteolytic activity of polynuclear leucocytes of the guinea-pig was determined prior to and after incubation with the pseudorabies virus (the virus of Aujeszky disease). It was found that the proteolytic activity of leucocytes treated with the virus was increased by 34.5%. There is a brief discussion of the biological value of the increased proteolytic activity.

O. NACHKOVA, G. BOYADJIEV
and D. NACHKOV

*Institut für Immunologie, Sofia 24 (Bulgarien),
2. Januar 1968.*

¹² F. ROSSI und M. ZATTI, Br. J. exp. Path. *15*, 5 (1964).
¹³ M. L. ANSON, J. gen. Physiol. *22*, 79 (1958).
¹⁴ O. POLJAKOVA, Ukr. biokhem. Zh. (1961).
¹⁵ M. BESSIS und E. BRICKA, Revue Hémat. *5*, 396 (1957).
¹⁶ M. BESSIS, Biologie méd. *46*, 1 (1957).
¹⁷ C. CHAPMAN-ANDRESSEN, Expl. Cell Res. *12*, 397 (1957).
¹⁸ R. J. DUBOS, in *Biochemical Determinants of Microbial Diseases* (Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1954), p. 34.
¹⁹ C. LAPRESLE und J. DURIEUX, Annls. Inst. Pasteur, Paris *92*, 62 (1957).
²⁰ G. S. GARVEY und J. H. CAMPBELL, J. exp. Med. *105*, 361 (1957).
²¹ D. NACHKOV, im Druck.

Experimental Antibodies to Walker Ascitic Tumour Cell Nuclei: Their Production and Biological Activity

Recently we have described the experimental production of immunofluorescent specific antibodies in rabbits to human leucocyte nuclei¹. The present report concerns the production of antisera against Walker ascitic tumour cell nuclei for the purpose of determining their biological activity in vivo.

Material and methods. Walker ascitic cells were obtained by peritoneal aspiration from 30 female rats (Wistar strain,

150–200 g). Walker cell nuclei were isolated in sucrose² and in citric acid media¹. For the immunization, nuclei pre-incubated with active human antinuclear sera or non-

¹ D. ŽITNAN and L. CEBECAUER, Folia biol., Praha *14*, 215 (1968).
² H. BUSCH, W. C. STARBUCK and J. R. DAVIS, Cancer Res. *19*, 684 (1959).

Effect of experimental antinuclear sera produced in rabbits by immunization with Walker cell nuclei on the growth of Walker ascitic tumour in rats

	No. of survivors Whole No.		Mean survival time (days)		Significance	
Rabbit antiserum W 1/68 c.a.	a 2/5	5/10	25.0	28.2	> 0.1; < 0.2	< 0.01
	b 3/5		31.4		< 0.01	
Rabbit antiserum W 2/68 s	a 0/5	3/10	21.2	26.5	> 0.1; < 0.2	< 0.01
	b 3/5		31.8		< 0.01	
Rabbit antiserum W 3/68 s	a 0/5	1/10	9.0	13.9	> 0.3	> 0.3
	b 1/5		18.8		> 0.1; < 0.2	
Human antinuclear serum	a 1/5	4/10	15.2	20.6	> 0.3	> 0.05; < 0.1
	b 3/5		26.0		> 0.1; < 0.2	
Normal rabbit serum	a 1/5	1/10	19.6	16.9	> 0.3	> 0.1; < 0.2
	b 0/5		14.2		> 0.1; < 0.2	
Saline	a 0/5	0/10	13.6	11.4		
	b 0/5		9.2			

Rabbit antisera against Walker cell nuclei: W 1/68 c.a., nuclei isolated in citric acid and pre-incubated with SLE serum, W 2/68 s, nuclei isolated in sucrose and pre-incubated with SLE serum, W 3/68, nuclei isolated in sucrose without pre-incubation, a, i.p. implantation with the mixture of Walker cells and antisera, b, the same as (a) + further i.p. injection of antiserum, P, probability of mean differing from that of controls (implantation with saline) by chance alone calculated by the Student *t*-test.

incubated nuclei were used. Antisera were produced in chinchilla rabbits by combined immunization throughout 4 weeks (3 s.c., 3 i.m., 3 i.p. and 3 i.v. injections weekly). Nuclear suspension in 2 ml of saline was administered in each case; the total dose of nuclei corresponded to 5–8 mg DNA³.

Rabbits were bled by cardiac puncture 2 weeks after the final injection. Sera from immunized rabbits were tested by means of immunofluorescence on Walker cell nuclei and other nuclear preparations, and by immunoelectrophoresis using pooled rat ascitic fluid and human sera. Biological activity of antisera was tested *in vivo* using 60 Wistar female rats. Walker ascitic cells were mixed with rabbit antisera and/or with active human antinuclear serum, normal rabbit serum and saline respectively in a ratio 1:1. The mixture contained 2×10^7 Walker tumour cells in 0.6 ml and was administered i.p. to groups of 10 rats immediately after preparation. Rabbit antisera and/or control solution (mean amount 1.5 ml) were applied i.p. after 24 h to 5 rats from each group. The mean survival time was followed up in the course of 36 days. After this period the surviving rats were killed.

Results. Three rabbits, immunized with Walker ascitic cell nuclei pre-incubated with human antinuclear serum, produced antisera which reacted in a high titre in the immunofluorescent test only with nuclei of Walker cells but not with nuclei of human leucocytes, rabbit and rat liver and spleen and chicken and frog erythrocytes. These sera formed IgG precipitin lines against human antinuclear or normal sera in the immunoelectrophoresis. The sera of 2 rabbits immunized with non-incubated Walker cell nuclei had a very low reactivity. Sera of all rabbits immunized with Walker cell nuclei formed an unidentified precipitin line against rat pooled ascitic fluid.

The results of the biological assay are summarized in the Table. Rabbit antisera against Walker ascitic cell

nuclei pre-incubated with human antinuclear sera (W1/68 and W2/68) showed a significant increase in mean survival time of implanted rats compared with a control group mainly when injected on the second day i.p. Normal rabbit serum, human antinuclear serum and rabbit serum against non-preincubated Walker ascitic cell nuclei were without significant effect on tumour growth.

Our results, similar to those of COLTER and ELLEM⁴ who obtained biologically active antisera to DNA from Ehrlich ascites tumour, show a further possibility of production of specific experimental immunofluorescent antibodies to Walker cell nuclei. Rabbit antinuclear antisera produced by our method possess a significant inhibition effect on implanted Walker ascitic tumour cells in rats *in vivo*.

Zusammenfassung. Es gelang bei einer Kaninchen-Immunisierung mit Walkers Ascites-Tumorzellkernen, die zuvor mit einem humanen, antinukleären Serum inkubiert wurden, experimentelle, spezifische, fluoreszierende Antikörper zu produzieren. Die gewonnenen Kaninchen-Antisera haben *in vivo* einen signifikanten Inhibitions-effekt auf Walkers Ascites-Tumorzellen der Ratten.

D. ŽITNAN, L. CEBECAUER and V. UJHÁZY

Research Institute of Rheumatic Diseases, Piestany, and Cancer Research Institute, Bratislava (Czechoslovakia), 14 May 1968.

³ W. C. SCHNEIDER, in *Methods in Enzymology* (Ed. S. P. COLLOWICK and N. O. KAPLAN; Academic Press, New York 1957), vol. 3, p. 680.

⁴ J. S. COLTER and K. A. O. ELLEM, *Nature* 190, 550 (1961).