

Изъ Дѣтской клиники Императорскаго Казанскаго университета
(завѣд. проф. В. К. Меньшиковъ).

Опыты съ культивированіемъ *plasmodium vivax* по методу Bass'a.*

П. И. Пичугинъ.

Со времени открытія *Laveran*'омъ паразита маляріи нѣкоторые авторы пытались изучать этого паразита внѣ организма человека.

Такъ, *Laveran*'у (1) удалось въ 1891 году сохранить жизнеспособность малярійнаго паразита въ висячей каплѣ въ теченіе 10 дней.

Сахаровъ (2) поставилъ слѣдующіе очень интересные опыты: онъ давалъ пиявкѣ возможность насосаться крови малярика и потомъ сохранялъ ее во льду въ теченіе 7 дней; при этомъ авторъ наблюдалъ, что паразиты сохранили способность къ амебоиднымъ движеніямъ. Желая убѣдиться въ томъ, что сохранившіеся въ пиявкѣ паразиты могутъ еще заразить человека, *Сахаровъ* ввелъ себѣ подъ кожу $\frac{1}{4}$ куб. с. крови, выдавленной изъ пиявки, сохранявшейся въ теченіе 4 сутокъ на льду. Черезъ 12 дней у него появился приступъ маляріи.

Попытки авторовъ *Corunado* (3) и *Кубасова* (4) получить культуру малярійнаго паразита были неудачны.

Въ 1912 году *Bass* и *Johns* (*Olpp*, 7) на послѣднемъ международномъ гигиеническомъ съѣздѣ въ Вашингтонѣ показали 4-е поколѣніе культуры малярійнаго паразита, полученной ими при работѣ въ научной экспедиціи въ Анконѣ возлѣ Панамскаго канала.

* Доложено въ Обществѣ врачей при Казанскомъ Университетѣ 2-го Мая 1913-го года съ демонстраціей микроскопическихъ препаратовъ.

Для получения культуръ малярійнаго паразита авторы предложили особые методы.

Bass (приведено по *Olpp'y*) различаетъ два метода посѣвовъ; при первомъ изъ нихъ можно получить одну генерацію, при другомъ—любое количество генерацій.

Первый методъ заключается въ слѣдующемъ.

Въ стерилизованный цилиндръ въ 2,5 сант. въ діаметрѣ наливаютъ 0,1 куб. с. 50% раствора декстрозы и тотчасъ же прибавляютъ 10 куб. с. крови, взятой изъ вены малярика спустя 1—2 часа послѣ сытной ѣды, и осторожно дефибринируютъ кровь стеклянной палочкой.

При взятіи 20 куб. с. крови декстрозы по сравненію съ предыдущимъ берется вдвое больше, т. е. 0,2 куб. с.

При вливаніи крови въ цилиндръ авторъ рекомендуетъ держать его въ наклонномъ положеніи, чтобы избѣжать примѣси воздуха къ крови.

Цилиндръ съ кровью ставится потомъ въ термостатъ при температурѣ въ 40—41°C.

Авторъ замѣтилъ, что столбъ крови въ цилиндрѣ долженъ быть вышиной не менѣе 2,5—5,0 сант., такъ какъ при высотѣ столба ниже 12 миллиметровъ паразиты гибнутъ еще до шизогоніи. Послѣ осажденія красныхъ кровяныхъ тѣлецъ въ цилиндрѣ образуется слой сыворотки въ 1,2—2,5 сан. высотой. Паразиты живутъ въ верхнемъ слоѣ осѣвшихъ красныхъ кровяныхъ тѣлецъ, именно, въ слоѣ не менѣе 1—5 милл. толщиной; ниже этого слоя паразиты по *Bass'y* черезъ 2—20 часовъ гибнутъ, хотя иногда авторъ наблюдалъ полувзрослыя формы.

Bass наблюдалъ, что при такомъ способѣ сохраненія крови паразиты тропической формы маляріи регулярно дѣлятся черезъ каждые 30 часовъ (optimum температуры для этого паразита равень 41°C).

При сохраненіи культуръ *plas. vivaх* при комнатной температурѣ *Bass* въ одномъ случаѣ наблюдалъ сегментацію черезъ 4 дня.

При второмъ способѣ (приведено по *Olpp'y*) кровь, полученную изъ вены локтевого сгиба и дефибрированную, въ теченіе не долгаго времени центрифугируютъ, чтобы всѣ лейкоциты были на поверхности.

Затѣмъ снимаютъ сыворотку и переносятъ её въ пробирки съ діаметромъ въ 12—13 милл., въ которыя предварительно наливаютъ 50% растворъ декстрозы; при этомъ необходимо, чтобы столбъ сыворотки былъ не менѣе 1,2—2,5 сант. высотой. Потомъ берутъ изъ середины 0,1—0,2 к. с. отцентрифугированныхъ крас-

ныхъ кровяныхъ тѣлецъ, содержащихъ малярійные паразиты, и засѣваютъ ихъ на дно пробирки.

Какъ при первомъ, такъ и при второмъ способѣ необходимо соблюдать слѣдующія важныя условія: во-первыхъ, пипетку, которой пользуются для взятія пробы крови, необходимо послѣ проведенія ея черезъ пламя газовой горѣлки хорошо охладить, такъ какъ даже температура въ 45—50° убиваетъ паразитовъ; во-вторыхъ, пробирки съ культурой малярійнаго паразита должны находиться въ вертикальномъ положеніи, потому что при наклоненіи пробирокъ паразиты опускаются внизъ и скоро гибнутъ.

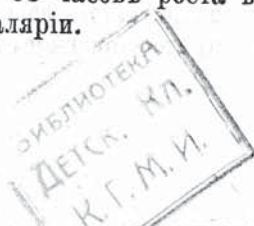
Въ своихъ опытахъ *Bass* (6) употреблялъ для посѣвовъ малярійныхъ паразитовъ не только человѣческую сыворотку, но также *Локковскій* растворъ (безъ CaCl_2) и аспитическую жидкость.

Bass (6 и 10) говоритъ, что паразиты растутъ только въ красныхъ кровяныхъ тѣльцахъ и распадаются, какъ только они выходятъ изъ нихъ наружу (въ питательную среду). Въ культурахъ наблюдалось только безполое размноженіе, при чемъ *in vitro* циклъ развитія *plas. praesox* и *plasm. vivax* не отличался отъ такового-же въ крови человѣка. Цикла полового размноженія авторъ (10) *in vitro* не наблюдалъ. *Bass* утверждаетъ, что шизонтовъ можно выращивать путемъ перевивокъ до безконечности. *Bass* и *Johns* говорятъ, что имъ не только удалось сохранить жизнеспособность, но и выкультивировать обычныя три формы малярійнаго паразита — *plasmodium vivax*, *plasm. malariae* и *plasm. immaculatum* (*praesox*). Они получили культуры въ 29 случаяхъ *malariae tropicae*, 6 случаяхъ *mal. tertiana* и въ одномъ случаѣ *malar. quartanae*.

Необходимо добавить, что по наблюденіямъ *Bass'a* (*Ziemann*, 11) въ культурахъ лучше всего развивается *plasmadium praesox*, *plasm. vivax* развивается хуже. *Bass* заявляетъ, что его опыты стали удачными съ тѣхъ поръ, какъ онъ сталъ прибавлять въ пробирки къ изслѣдуемой крови 50% растворъ декстрозы. Въмѣсто декстрозы можно употреблять такой же растворъ мальтозы; съ другими видами сахара — сахарозой, лактозой, галактозой, декстриномъ и маннитомъ — опыты съ культивированіемъ паразитовъ маляріи не удавались.

Къ сожалѣнію, ни въ работѣ *Olpp'a*, ни въ рефератахъ работъ *Bass'a* и *Johns'a* (6 и 10) не указываются подробности строенія паразитовъ маляріи при ихъ ростѣ въ пробиркахъ.

Этотъ пробѣлъ пополняется результатами изслѣдованія *Ziemann'*омъ кровяныхъ мазковъ, которые ему были присланы *Bass'*омъ. Для мазковъ *Bass* бралъ кровь изъ культуръ черезъ 5 $\frac{1}{2}$, 16, 21 $\frac{1}{2}$, 30, 40, 44, 48 и 68 часовъ роста въ культурахъ паразита тропической формы маляріи.



Выводы, въ которыхъ пришелъ *Ziemann* послѣ изученія этихъ препаратовъ, были слѣдующіе.

1. Безполое развитіе паразитовъ *in vitro* соотвѣтствуетъ вполнѣ тому развитію, которое наблюдается въ периферической крови человѣка, при чемъ развитіе паразита тропической маляріи происходитъ въ 48 часовъ, и паразиты показываютъ тѣ-же характерныя морфологическіе признаки, что и въ периферической крови (выводъ № 9).

2. Черезъ 30, 40, 44 и 48 часовъ роста паразитовъ рядомъ съ обыкновенными формами дѣлящагося паразита или съ вполнѣ взрослыми формами наблюдаются также полувзрослыя круглой формы частью съ очень слабо окрашенной протоплазмой и пылеобразно разсѣяннмъ хроматиномъ, частью съ нѣсколько болѣе сильно окрашенной въ голубой цвѣтъ протоплазмой и пылеобразнымъ или болѣе грубозернистымъ хроматиномъ. Слѣдуетъ-ли, во-первыхъ, эти формы паразитовъ считать за гаметы или за умирающія и, во-вторыхъ, получены-ли эти паразиты при первичномъ заболѣваніи или при рецидивахъ, *Ziemann* не можетъ сказать.

3. Конъюгаціи молодыхъ паразитовъ, которую отмѣтили *Mannaberg* и *Craig*, *Ziemann* не видѣлъ.

4. Оразованіе полудуній даже изъ 68 часовой культуры *Z.* не могъ констатировать.

5. Въ 48 часовой культурѣ *Z.* могъ отмѣтить большое количество паразитовъ, находящихся уже въ стадіи дѣленія.

6. Молодые мерозоиты, которые покинули дѣлящееся тѣло паразита, только короткое время находятся свободными въ плазмѣ и вскорѣ поражаютъ красныя кровяныя тѣльца.

7. Блужданія паразита отъ одного краснаго кровяного тѣльца къ другому, которому (блужданію) *Rowley-Lawson* приписывалъ большую роль, *Z.* не могъ замѣтить.

8. Малое количество или полное отсутствіе лейкоцитовъ въ культурѣ не задерживаетъ развитія паразитовъ. Большая часть паразитовъ въ 68 часовой культурѣ дегенерированы.

Были сдѣланы затѣмъ попытки получить въ культурѣ половой цѣль развитія малярійнаго паразита въ томъ видѣ, въ какомъ онъ происходитъ въ тѣлѣ комара *anopheles*.

Такъ, *Жуковъ Н. М.* (8) при изученіи маляріи на Черноморскомъ побережьѣ Кавказа ставилъ, пользуясь методомъ *Bass'a*, опыты въ этомъ направленіи, но первые его опыты были неудачны. Тогда *Жуковъ* нѣсколько видоизмѣнилъ технику *Bass'a*.

Видоизмѣненіе заключалось въ слѣдующемъ: 10 куб. с. крови, взятой съ обычными предосторожностями изъ вены локтевого сгиба у

больного тропической маляріей, были тотчасъ выпущены въ четыре стерилизованныя пробирки съ 0,5 куб. с. 10% partii citrici въ каждой. Кровь быстро смѣшивалась съ этой жидкостью для избѣжанія свертыванія и затѣмъ подвергалась въ теченіе полчаса инактивированію: двѣ пробирки при 41° и двѣ при 44°C.

Послѣ инактивированія *Жуковъ* поставилъ всѣ пробирки въ термостатъ при температурѣ въ 25—26°C, исходя изъ того теоретическаго соображенія, что для спорогоніи, происходящей въ тѣлѣ *aporpheles*, требуется указанная температура.

Изъ пробирокъ кровь бралась авторомъ черезъ разные промежутки времени, начиная черезъ 2 часа послѣ посѣва, размазывалась и фиксировалась обычнымъ путемъ и окрашивалась по способу Giemsa. Результаты этого опыта были таковы. Въ первыхъ двухъ пробиркахъ, подвергавшихся инактивированію при 41°C, была констатирована авторомъ первая стадія полового цикла развитія паразита, начиная съ *corula* и грушевидныхъ ооцинетъ съ болѣе разсѣяннымъ пигментомъ на одномъ концѣ и кончая вполне зрѣлыми ооцинетами съ центральнымъ положеніемъ ядра и пигментомъ, собраннымъ на одномъ концѣ ооцинета. На 3-й день паразиты стали гибнуть.

Въ двухъ другихъ пробиркахъ, находившихся при 44°C, паразиты погибли.

Второй опытъ, который продѣлалъ *Жуковъ* съ *plasm. malariacae*, былъ вполне удаченъ. Техника была та-же самая, что и въ предыдущемъ случаѣ; только въ каждую пробирку авторъ прибавлялъ для увеличенія жизненности паразита и красныхъ кровяныхъ тѣлецъ по 1,5—2 куб. с. жидкости Локка на каждые 4—5 куб. с. крови.

Въ этомъ опытѣ *Жуковъ* констатировалъ не только оплодотвореніе, но и дальнѣйшую сегментацию оплодотворенныхъ формъ, при чемъ въ началѣ 6 сутокъ въ препаратахъ имъ были обнаружены въ большомъ количествѣ спорозоиты самаго разнообразнаго вида, начиная отъ неполнѣ еще раздѣлившихся и кончая совсемъ зрѣлыми и свободными. Авторъ добавляетъ, что сегментациа здѣсь происходитъ по иному плану вслѣдствіе того, что здѣсь нѣтъ тканей, которыя могли бы задерживать развитіе паразитовъ, которые поэтому могутъ свободно расходиться до акта созрѣванія.

Гурко А. Г. и *Гамбургеръ Я. Э.* (9) ставили опыты съ кровью, полученной изъ *v. mediana* мальчика 8 лѣтъ, страдавшаго тропической формой маляріи (въ крови при многократномъ изслѣдованіи были обнаружены перстевидныя формы тропической формы маляріи и полулунія).

Пробирку съ засѣянной кровью авторы держали въ термостатѣ трое сутокъ при t° 39°C.

Черезъ 15 часовъ они сдѣлали первый пересѣвъ по описанному выше 2-му способу. Въ мазкахъ крови перваго посѣва (I-я пробирка) черезъ 15 часовъ были найдены ими кольца, въ большомъ количествѣ полулунія и дѣлящіеся шизонты.

Черезъ 40 часовъ въ мазкахъ крови, взятой изъ той-же пробирки, были обнаружены ими кольца, шизонты и гаметы, а черезъ 64 часа въ мазкахъ преобладали красивыя фигуры дѣлящихся шизонтовъ.

При изслѣдованіи же черезъ 24 часа перваго пересѣва, т. е. второй генераціи, авторы нашли въ мазкахъ въ огромномъ количествѣ мерозонты, а при изслѣдованіи черезъ 24 часа мазковъ втораго пересѣва, т. е. третьей генераціи авторы нашли мельчайшіе мерозонты и гаметы. Четвертая генерація погибла.

Авторами были поставлены еще два опыта, но они были неудачны.

Изъ этихъ опытовъ видно, что *Гурко* и *Гамбургеръ* могли констатировать въ культурахъ шизогонію *plasm. praesox*, т. е. тотъ способъ размноженія паразита, который происходитъ въ костномъ мозгу и капиллярахъ центральной нервной системы и не наблюдается въ периферической крови.

Сопоставляя данныя, полученныя авторами, занимавшимися культивированіемъ малярійныхъ паразитовъ, мы приходимъ къ слѣдующему.

1. Съ помощью метода *Bass'a* лучше всего удается культивировать паразитовъ тропической формы маляріи.

2. Авторы—*Bass* и *Johns*, *Гурко* и *Гамбургеръ* наблюдали въ культурахъ циклъ только безполага размноженія паразитовъ, при чемъ наибольшее количество дѣлящихся паразитовъ тропической маляріи первые два автора наблюдали черезъ 48 часовъ, вторые же черезъ 64 часа.

3. Въ культурахъ въ теченіе 6 сутокъ полученъ также и циклъ *полового развитія* паразита четырехдневной формы маляріи (*Жуковъ*).

Такимъ образомъ всѣ указанныя нами выше авторы, за исключеніемъ *Bass'a* и *Johns'a*, производили опыты съ культивированіемъ паразитовъ главнымъ образомъ тропической формы маляріи. Что касается культивированія паразитовъ трехдневной маляріи, то опытовъ въ этомъ направленіи, на сколько намъ извѣстно изъ литературы, никто, кромѣ *Bass'a* и *Johns'a*, еще не производилъ. Поэтому по предложенію глубокоуважаемаго профессора *В. К. Меншикова* мы и поставили нѣсколько опытовъ съ культивированіемъ по методу *Bass'a* паразитовъ *tertian'ы*, воспользовавшись для этой цѣли больными Дѣтской клиники.

Кровь, которая послужила намъ для постановки перваго опыта, была взята у больного мальчика, татарина Камалея 11 лѣтъ. Боленъ маляріей онъ давно, но сколько времени, сказать въ точности не можетъ. Женщина, которая привела мальчика, тоже не могла дать намъ точныхъ свѣдѣній; родители же у него умерли. При общемъ осмотрѣ Камалея обращаетъ на себя вниманіе упадокъ питанія и блѣдность кожныхъ покрововъ и видимыхъ слизистыхъ оболочекъ. При изслѣдованіи крови найдено: красныхъ кровяныхъ тѣлецъ 3.686.000, бѣлыхъ кров. тѣл. 7.700, гемоглобина (по Tallquist'у) 55%. Приступы маляріи у него были ежедневно.

Селезенка прощупывалась ниже подреберья на 10 сант., была плотной консистенціи. При изслѣдованіи мазковъ крови, взятой у этого больного, было обнаружено присутствіе *plasm. vivax* въ различныхъ стадіяхъ его развитія.

Черезъ 2 часа послѣ сытнаго завтрака (на 2-й день пребыванія его въ клиникѣ) на высотѣ приступа шприцемъ у него была взята кровь изъ вены локтевого сгиба въ количествѣ 10 куб. сант. и вылита въ соответствующаго размѣра стерильный цилиндръ, содержащій 0,1 куб. с. 50% раствора декстрозы. Послѣ дефибрирования крови стеклянной палочкой было взято стерильной пипеткой изъ цилиндра 3 куб. сант. крови, которая затѣмъ была вылита въ пробирку приблизительно того-же діаметра, каковой была указана *Bass'*омъ. Затѣмъ цилиндръ съ малярійной кровью былъ поставленъ въ термостатъ при t° въ 40°C , а кровь въ пробиркѣ была подвергнута непродолжительному центрифугированію, послѣ чего также поставлена въ термостатъ съ указанной выше температурой.

Послѣ дефибрирования крови въ цилиндрѣ стерильной пипеткой было взято нѣсколько капель крови, изъ которой было слѣдано нѣсколько мазковъ, которые затѣмъ зафиксированы метиловымъ алкогелемъ и окрашены по способу проф. *Аргутинскаго* смѣсью метиленовой синьки съ эозиномъ.

Въ виду того, что окрашиваніе паразитовъ маляріи по способу проф. *Аргутинскаго* (12) многимъ не извѣстно, а между тѣмъ этотъ способъ чрезвычайно доступенъ и простъ, мы считаемъ необходимымъ вкратцѣ остановиться на описаніи его.

Приготавливаютъ нужное количество 1% воднаго раствора метиленовой синьки (*Methylenblau medicinale Höchst a/M*) и по прибавленіи къ нему 5% воднаго раствора соды въ количествѣ 6 куб. с. на каждые 100 куб. с. раствора синьки оставляютъ его стоять на разсѣянномъ свѣтѣ при комнатной температурѣ. Слѣдуетъ замѣтить, что синька растворяется въ горячей дистиллированной водѣ, чтобы предупредить развитіе плѣсени въ растворѣ. Къ остывшему

раствору синьки прибавляется остывший-же 5⁰/₀ растворъ соды въ указанномъ выше отношеніи.

Черезъ 4—5 дней растворомъ синьки можно уже пользоваться; онъ годенъ въ теченіе многихъ мѣсяцевъ. Затѣмъ приготавливаютъ 1⁰/₀ водный растворъ эозина (В. А. extra). Эозинъ для предупрежденія заплѣсненія долженъ растворяться въ горячей дистиллированной водѣ.

Окрашиваніе же мазковъ крови производится смѣсью слабыхъ растворовъ этихъ красокъ. Слабые растворы этихъ красокъ приготавливаются такимъ образомъ. Берутъ 1 часть указанного 1⁰/₀ раствора метиленовой синьки и разбавляютъ 9-ю частями дистиллированной воды; получающійся растворъ соответствуетъ 1⁰/₁₀ ⁰/₀-ному водному раствору синьки. Далѣе берутъ 1 часть 1⁰/₀ воднаго раствора эозина и 99 частей дистил. воды; полученный растворъ соответствуетъ 1⁰/₁₀₀ ⁰/₀-ному водному раствору эозина.

Для окраски берутъ 1 часть 1⁰/₁₀ ⁰/₀ раствора синьки и смѣшиваютъ съ 5-ю частями 1⁰/₁₀₀ ⁰/₀ раствора эозина; смѣсь выливается подъ мазки крови. Окрашиваніе продолжается отъ 1¹/₂ часа до 1-го часа; затѣмъ препаратъ прополаскивается водой и высушивается.

Въ мазкахъ крови, сдѣланныхъ тотчасъ послѣ дефибринирования ея въ цилиндрѣ, были констатированы *plasm. vivax* въ различныхъ стадіяхъ своего развитія: масса колець, много молодыхъ, иногда амебидныхъ формъ паразитовъ; часто встрѣчались полувзрослые мерозонты и изрѣдка шизонты. Красныя кровяныя тѣльца, инфицированныя полувзрослыми мерозонтами, крупными кольцами и шизонтами почти всѣ обнаруживали крапчатость.

Далѣе мы представимъ описаніе препаратовъ, сдѣланныхъ изъ крови, сохраняющейся въ цилиндрѣ и находящейся въ термостатѣ при t° въ 40°C; мазки дѣлались черезъ разные промежутки времени.

Въ мазкахъ крови, сдѣланныхъ черезъ 7 часовъ пребыванія крови въ цилиндрѣ, было обнаружено большое количество паразитовъ различнаго возраста, начиная съ самыхъ молодыхъ и кончая взрослыми и начинающими дѣлиться формами; почти всѣ красныя кровяныя тѣльца, въ которыхъ находились полувзрослые и взрослые паразиты, обнаруживали ясно выраженную крапчатость.

Черезъ 24 часа въ мазкахъ крови обнаруживались исключительно мерозонты съ однимъ, изрѣдка съ двумя ядрышками, причемъ въ нѣкоторыхъ красныхъ кровяныхъ тѣльцахъ обнаруживалась крапчатость. Попадались также свободно лежащіе мерозонты и только что приставшіе къ краснымъ кровянымъ тѣльцамъ. Кроме того въ большомъ количествѣ встрѣчались погибающіе паразиты, тѣло которыхъ было окрашено въ розоватый цвѣтъ, а ядро въ красноватый или темно-красный цвѣтъ; попадались паразиты, пери-

ферія тѣла которыхъ окрашивалась въ розоватый цвѣтъ, а центральная часть протоплазмы около ядеръ была окрашена въ голубоватый цвѣтъ, ядра же окрашены были въ красноватый цвѣтъ.

Черезъ 34 часа въ кровяныхъ мазкахъ были найдены въ довольно большомъ количествѣ паразиты въ различныхъ стадіяхъ ихъ развитія, начиная съ мерозоитовъ (изрѣдка они встрѣчаются по 3 штуки въ одномъ красн. кр. тѣльцѣ), мелкихъ и болѣе крупныхъ болецъ и кончая вполне взрослыми и дѣлящимися формами; у взрослыхъ и дѣлящихся паразитовъ въ протоплазмѣ наблюдается небольшое количество мелко-зернистаго темно-бураго пигмента. Почти всѣ инфицированныя красныя кровяныя тѣльца обнаруживали мелкозернистую крапчатость. Кромѣ того, встрѣчаются погибающіе паразиты, тѣло которыхъ окрашено въ блѣдно-розовый цвѣтъ, а ядро въ красноватый; у нѣкоторыхъ паразитовъ имѣются зернышки и глыбки желто-коричневаго цвѣта пигмента.

Черезъ 46 часовъ въ мазкахъ крови обнаруживались мерозоиты и въ довольно большомъ количествѣ погибающіе паразиты, у которыхъ ядра различной величины окрашивались въ темно-розовый цвѣтъ, тѣло же паразитовъ и красныя кровяныя тѣльца окрашивались въ розоватый цвѣтъ, на фонѣ котораго рѣзко выдѣлялись иногда довольно крупныя зерна желто-бураго пигмента.

Черезъ 56 часовъ въ мазкахъ крови намъ удалось отмѣтить *только погибающіе паразиты* съ темно-розоваго цвѣта ядрами; тѣло паразитовъ было окрашено въ слабо розовый цвѣтъ. Въ большей части паразитовъ находилось небольшое количество мелко—или болѣе крупнозернистаго пигмента желто-коричневаго цвѣта.

Далѣе мы изслѣдовали подъ микроскопомъ мазки крови, взятой изъ пробирки, въ которую, какъ указывалось выше, былъ сдѣланъ—первый посѣвъ. При изслѣдованіи мазковъ, сдѣланныхъ черезъ 24 часа послѣ посѣва изъ осѣвшихъ на дно пробирки красныхъ кровяныхъ тѣлецъ, обнаруживались тѣ же формы паразитовъ, что и въ предыдущемъ случаѣ, т. е. нами были констатированы исключительно молодые мерозоиты, которые изрѣдка встрѣчались свободно лежащими между красными кровяными тѣльцами. Нѣкоторые изъ инфицированныхъ эритроцитовъ обнаруживали крапчатость. Взявъ 0,1 куб. с. эритроцитовъ изъ первой пробирки и насосавъ въ ту же пипетку 0,5 к. с. свѣжихъ эритроцитовъ, полученныхъ отъ служителя, никогда не болѣвшаго маляріей, мы эту смѣсь красныхъ кровяныхъ тѣлецъ посѣяли на дно пробирки, куда предварительно была налита кровяная сыворотка, полученная при центрифугированіи крови указаннаго служителя и смѣшанная съ 0,1 куб. с. 50% раствора декстрозы. Такой же посѣвъ былъ сдѣланъ въ другую пробирку, гдѣ находилась смѣсь инактивиро-

ванной асцитической жидкости съ 50% растворомъ декстрозы. Такимъ образомъ нами былъ сдѣланъ *первый пересѣвъ* паразитовъ.

Черезъ 24 часа роста паразитовъ въ 1-й и 2-й пробиркѣ пересѣва (черезъ 48 часовъ послѣ взятія крови) въ мазкахъ крови, взятой со дна пробирокъ, обнаруживались въ большомъ количествѣ погибшіе и погибающіе паразиты, тѣло послѣднихъ было окрашено въ слабо розовый цвѣтъ, при чемъ въ тѣлѣ многихъ паразитовъ обнаруживались желто-коричневые зернышки и глыбки пигмента; ядра небольшихъ размѣровъ были окрашены въ розовато-красный или красновато-вишневый цвѣтъ. Въ небольшомъ количествѣ встрѣчались полувзрослые и взрослые мерозонты и крупныя кольца (рѣдко) съ небольшимъ количествомъ мелко-зернистаго пигмента; какъ ядра, такъ и протоплазма этихъ паразитовъ были окрашены хорошо. Слѣдуетъ только замѣтить, что паразиты въ исследуемой культурѣ являются болѣе компактными по сравненію съ паразитами периферической крови, взятой въ тѣ-же часы и у того-же больного.

Черезъ 20 часовъ роста паразитовъ въ этихъ же двухъ пробиркахъ (черезъ 68 часовъ послѣ взятія крови) относительно часто встрѣчались погибшіе и погибающіе паразиты, тѣло послѣднихъ было окрашено въ розоватый цвѣтъ, а ядра—въ розово-красный или въ красновато-вишневый цвѣтъ. Зернышки пигмента, встрѣчавшіяся въ паразитахъ, были желто-бураго цвѣта. Изрѣдка встрѣчались шизонты, протоплазма которыхъ была прекрасно окрашена въ голубоватый цвѣтъ и содержала большое количество мелко-зернистаго желто-бураго пигмента; ядра паразитовъ были окрашены въ красноватый или красновато-вишневый цвѣтъ. Красныя кровяныя тѣльца, содержащія въ себѣ шизонты, обнаруживали крапчатость. Въ это время (черезъ 68 часовъ послѣ взятія крови) мы сдѣлали *второй пересѣвъ*: 0,1 куб. с. крови, взятой со дна одной изъ двухъ пробирокъ, была смѣшана съ 0,5 куб. с. свѣжихъ эритроцитовъ, полученныхъ отъ другого служителя—здороваго человека и никогда не болѣвшаго маляріей. Эта смѣсь эритроцитовъ была засѣяна на дно пробирки, куда предварительно была налита асцитическая жидкость, смѣшанная съ 0,1 куб. с. 50% раствора декстрозы. Такой же пересѣвъ мы сдѣлали и изъ второй пробирки.

Черезъ 10 часовъ послѣ второго пересѣва (черезъ 78 часовъ послѣ взятія крови), со дна обѣихъ пробирокъ бралась кровь, и дѣлались изъ нея мазки. При микроскопическомъ исследованіи мазковъ изрѣдка встрѣчались дѣлящіяся формы паразита; наряду съ этими формами изрѣдка попадались погибающіе паразиты.

Черезъ 17 часовъ въ мазкахъ крови, взятой изъ этихъ же пробирокъ (черезъ 85 часовъ послѣ взятія крови) изрѣдка встрѣ-

чались молодые мерозоиты, находящіеся въ красныхъ кровяныхъ тѣльцахъ; изрѣдка встрѣчались погибающіе паразиты.

Черезъ 24 и 48 часовъ послѣ второго пересѣва (черезъ 92 и 116 час. послѣ взятія крови) въ мазкахъ крови изрѣдка встрѣчались молодыя формы паразитовъ, а также погибшіе и погибающіе паразиты. Шизонтовъ и дѣлящихся формъ намъ не удалось обнаружить въ препаратахъ.

Черезъ 48 часовъ послѣ второго пересѣва былъ сдѣланъ *третій пересѣвъ*. При микроскопическомъ изслѣдованіи мазковъ, сдѣланныхъ черезъ 1 и 2 сутокъ изъ крови третьяго пересѣва, не удалось подмѣтить цикла развитія паразитовъ, и только изрѣдка встрѣчались погибающіе паразиты. Мы еще два раза брали кровь отъ этого больного по 10 куб. с. и производили изслѣдованія и пересѣвы по тому же плану, какъ мы описали выше. Результаты этихъ двухъ опытовъ были въ общемъ такіе-же, какъ и въ первомъ опытѣ, поэтому мы не приводимъ подробностей изслѣдованія крови съ малярійными паразитами, полученными при культивированіи ихъ въ пробиркахъ.

Результаты опытовъ съ культивированіемъ *plasm. vivax* намъ показали, что циклъ безполага размноженія малярійнаго паразита происходитъ, какъ въ культурахъ, такъ и въ периферической крови почти параллельно. Это легко прослѣдить, если одновременно брать мазки крови изъ культуры и у больного и послѣ фиксаціи и соответствующей окраски изслѣдовать подъ микроскопомъ. Далѣе, эти 3 опыта показали, что при первомъ циклѣ развитія *plasm. vivax* въ культурахъ удается въ мазкахъ крови констатировать большое количество живущихъ паразитовъ, на ряду съ которыми встрѣчается только немного погибшихъ или погибающихъ. Кстати замѣтимъ, что погибшими мы считаемъ тѣхъ паразитовъ, которые обнаруживаются въ красныхъ кровяныхъ тѣльцахъ, какъ окрашенные въ розоватый цвѣтъ образованія, въ которыхъ наблюдается желто-бурый пигментъ и въ которыхъ ядеръ нѣтъ. Къ погибающимъ паразитамъ мы относимъ тѣхъ изъ нихъ, тѣло которыхъ окрашивается въ розоватый цвѣтъ, а ядра — въ красноватый или красновиневый цвѣтъ.

При второй генераціи паразитовъ число живыхъ особей изъ нихъ значительно уменьшается. Очевидно, что при искусственныхъ условіяхъ роста могутъ жить только болѣе стойкія формы *plasm. vivax*, которыя и продѣлывали полный циклъ безполага размноженія. Наряду съ паразитами, хорошо окрашивающимися смѣсью метиленовой синьки съ эозиномъ, здѣсь встрѣчались въ большомъ количествѣ погибшіе и погибающіе паразиты. При третьей генераціи *plasm. vivax* намъ не удалось въ указанныхъ выше опытахъ

обнаружить въ мазкахъ крови цикла развитія этого паразита; мы могли отмѣтить только изрѣдка встрѣчающіяся молодыя формы, находящіяся въ красныхъ кровяныхъ тѣльцахъ. Очевидно, живыми остаются только немногіе изъ мерозоитовъ, отдѣлившихся отъ дѣлящагося тѣла паразита. Кромѣ молодыхъ мерозоитовъ въ препаратахъ изрѣдка наблюдаются погибающія формы паразитовъ, расположенныхъ въ красныхъ кровяныхъ тѣльцахъ.

Болезная О. Э-на, 8 лѣтъ, довольно блѣдна. Страдаетъ въ теченіе 3-хъ недѣль малярійными приступами, которые происходятъ у нея черезъ день. Селезенка прощупывается на 5 сант. ниже подреберья. Раньше болѣла маляріей. При изслѣдованіи мазковъ крови констатировано присутствіе въ ней *plasm. vivax*. При соблюденіи всѣхъ условій, о которыхъ сообщалось выше, была взята изъ вены локтевого сгиба кровь въ количествѣ 10 куб. сант. и вылита въ цилиндръ, содержащій 0,1 куб. с. 50% раствора декстрозы. Въ дальнѣйшемъ опытѣ велся въ томъ же направленіи, что и предыдущіе три опыта. Результаты его въ общемъ согласовались съ результатами предыдущихъ опытовъ, т. е. полный циклъ развитія *plasm. vivax* намъ удалось прослѣдить только въ двухъ генерацияхъ.

В. А-овъ, 9 лѣтъ, у котораго въ теченіе 1½ мѣсяцевъ были черезъ день приступы маляріи. Больной хорошаго тѣлосложенія, довольно блѣдный. Селезенка прощупывается ниже подреберья на 6 сант. При изслѣдованіи крови найдено: красныхъ кровяныхъ тѣлецъ 3.644.000, бѣлыхъ кров. тѣлецъ 7000, гемоглобина 65%; при изслѣдованіи мазковъ констатировано въ большомъ количествѣ *plasm. vivax*. У этого больного въ разное время три раза шприцемъ бралась кровь изъ вены локтевого сгиба. Опыты съ культивированіемъ паразитовъ—*plasm. vivax* производились по тѣмъ же методамъ, что и предыдущіе опыты. Къ этому слѣдуетъ добавить, что въ двухъ опытахъ пробирки во время апирексиса у больного мы держали при 37°C; при повышеніи же температуры у него мы переносили пробирки въ термостатъ съ температурой въ 40°C. Кстати упомянемъ, что мы не замѣтили какой-нибудь разницы въ ростѣ паразитовъ въ культурахъ, находящихся въ термостатѣ постоянно при 40°C, и въ культурахъ, находящихся то при 37°C, то при 40°C.

Въ одномъ изъ этихъ опытовъ получились нѣсколько иные результаты; на нихъ поэтому мы и считаемъ необходимымъ остановиться нѣсколько подробнѣе. При изслѣдованіи мазковъ крови,

получаемой изъ культуръ черезъ 6 и 24 часа послѣ посѣва, въ протоплазмѣ многихъ хорошо окрашенныхъ паразитовъ, кромѣ зернышекъ и глыбокъ желтобурого пигмента, мы замѣтили еще присутствіе темно-бурого и даже чернаго пигмента, тогда какъ въ паразитахъ периферической крови такого пигмента не было обнаружено.

Въ этомъ же опытѣ намъ удалось не только прослѣдить полный циклъ бесполого размноженія *plasm. vivax* въ двухъ генерацияхъ, но еще и видѣть мерозоитовъ и шизонтовъ третьей генерации (черезъ 5 сутокъ послѣ посѣва); дѣленія же паразита въ третьей генерации намъ не удалось видѣть. Слѣдуетъ, однако, замѣтить, что при второй генерации количество паразитовъ въ мазкахъ было не велико, тогда какъ число погибающихъ и погибшихъ паразитовъ было замѣтно больше.

При ежедневномъ изслѣдованіи культуръ *plasm. vivax* въ теченіе 17 дней, считая со дня взятія крови у больного, (культуры черезъ каждые 2—3 дня пересѣвались) намъ неизмѣнно удавалось изрѣдка встрѣчать погибающихъ паразитовъ, тѣло которыхъ содержало иной разъ желто-коричневаго цвѣта зернышки пигмента и было окрашено въ розоватый цвѣтъ; ядра же паразитовъ были окрашены въ розовато-красноватый или красновато-вишневый цвѣтъ. На 14-й день изслѣдованія въ одномъ препаратѣ мы обнаружили два паразита, въ формѣ колечекъ, окрашенныхъ слабо въ синеватый цвѣтъ; ядрышки этихъ колечекъ были окрашены въ красноватый цвѣтъ.

Тотъ фактъ, что въ теченіе 17 дней (можетъ быть, намъ удалось бы встрѣтить погибающія формы паразитовъ и въ послѣдующіе дни, но мы прекратили изслѣдованія, находя ихъ вполне достаточными для нашей цѣли) мы находили, несмотря на сильное разведеніе крови, погибающія формы паразитовъ, даетъ, какъ намъ кажется, очень многое. Съ одной стороны, мы имѣемъ нѣкоторое основаніе предполагать, что одиночные паразиты продѣлываютъ циклъ развитія; доказательствомъ чего можетъ, между прочимъ, служить фактъ находженія нами на 14-й день двухъ небольшихъ колечекъ, но намъ только не удалось прослѣдить этого цикла въ мазкахъ; съ другой стороны, мы можемъ думать, что въ искусственныхъ условіяхъ жизни *plasm. vivax* ядра этихъ паразитовъ могутъ сохраняться очень долго, тогда какъ протоплазма сравнительно рано обрекается гибели. Разъ ядра сохранились, паразиты еще не погибли и, слѣд., при усовершенствованіи метода культивирования, можетъ быть удастся послѣ многихъ пересѣвовъ находить въ культурахъ паразитовъ, протоплазма которыхъ будетъ прекрасно окрашена.

Кстати упомянемъ здѣсь, вліяетъ-ли на ростъ паразитовъ излишнее прибавленіе 50% раствора декстрозы. Мы убѣдились, что при нѣкоторыхъ пересѣвахъ крови, содержащей *plasm. vivax*, излишнее прибавленіе этого раствора сахара не оказывало вреднаго вліянія на ростъ паразита.

Послѣдній опытъ мы продѣлали съ кровью мальчика 9 лѣтъ, который былъ боленъ 2 мѣсяца маляріей. Приступы за послѣднія 1½ недѣли были ежедневно. Дома до поступленія въ клинику лечился матерью настойкой эвкалипта, но безъ какого-либо результата. Мальчикъ очень блѣдный съ ослабленнымъ питаніемъ. При ощупываніи селезенка была увеличена и плотна: она спускалась ниже подреберья на 4 сант. Изъ взятой для опыта крови въ количествѣ 10 куб. с. изъ вены локтевого сгиба этого больного 2 куб. сан. ея пипеткой перелито въ пробирку, которую потомъ около 5 минутъ центрифугировали. Черезъ сутки изъ этой пробирки былъ сдѣланъ первый пересѣвъ, черезъ вторыя—третій и т. д. Потомъ, какъ пробирки, такъ и цилиндръ съ оставшейся кровью мы сохраняли въ термостатъ при 40°C.

Черезъ 24 и 30 часовъ мы брали изъ цилиндра стерильной пипеткой кровь изъ верхняго слоя кровяного столба и со дна; изъ этой крови потомъ мы дѣлали мазки, при микроскопическомъ изслѣдованіи которыхъ констатировано при обоихъ способахъ взятія крови присутствіе *plasm. vivax*. Эти данныя опровергаютъ утвержденіе *Bass'a*, что въ кровяномъ столбѣ ниже слоя въ 1—5 миллим. паразиты черезъ 2—20 часовъ гибнутъ; однако въ верхнихъ слояхъ столба по нашимъ наблюденіямъ паразитовъ было замѣтно больше, чѣмъ въ нижнихъ слояхъ.

Коснемся здѣсь попутно такой мелочи: какъ размазывать кровь, взятую или изъ кровяного столба въ цилиндръ или изъ пробирки. Въ виду того, что при стояніи въ термостатъ пробирокъ и цилиндра красныя кровяныя тѣльца очень плотно осѣдаютъ, взятые стерильной пипеткой эритроциты распределяются на предметныхъ стеклахъ очень толстымъ слоемъ, мы всегда въ ту же пипетку насыщали изъ той-же пробирки или изъ того же цилиндра нѣкоторое количество или асцитической жидкости или кровяной сыворотки. При этихъ условіяхъ взятія крови мазки дѣлались легко, почти безъ всякаго нажиманія краемъ размазывающаго кровь стекла на поверхность другого предметнаго стекла; мазки получались тонкіе, и эритроциты располагались другъ возлѣ друга; при размазываніи же не разбавленныхъ эритроцитовъ по необходимости приходилось крѣпко нажимать краемъ предметнаго стекла, отчего сильно деформировались или даже разрушались паразиты.

Затѣмъ нѣсколько словъ относительно лейкоцитовъ, которые встрѣчаются въ мазкахъ крови, взятой изъ цилиндра. Играетъ-ли

важную роль распадъ лейкоцитовъ при ростѣ *plasm. vivax* въ цилиндрѣ, мы затрудняемся сказать, но мы убѣдились, что фагоцитозъ здѣсь почти отсутствуетъ, такъ какъ при изслѣдованіи массы кровяныхъ мазковъ намъ только два раза пришлось встрѣтить многоядерные лейкоциты, въ протоплазмѣ которыхъ находились паразиты.

На основаніи изученія мазковъ крови, получаемой нами въ опытахъ съ культивированіемъ *plasm. vivax*, мы можемъ сдѣлать слѣдующіе выводы.

1. Съ помощью метода, предложеннаго *Bass*'омъ, мы получили въ культурахъ два полныхъ цикла развитія паразита *plasm. vivax* и 3-й циклъ неполный.

2. При первой генераціи *plasm. vivax* наблюдалось большое количество этихъ паразитовъ; при второй же генераціи число ихъ значительно уменьшалось: сохранялись, очевидно, болѣе стойкія формы этого паразита; при третьей генераціи удалось констатировать только мерозонты и шизонты.

3. Въ теченіе 17 дней удалось видѣть въ мазкахъ изъ культуръ такія формы паразитовъ, у которыхъ протоплазма окрашивалась не въ голубоватый, а въ розоватый цвѣтъ; ядра же—въ красноватый или красновато вишневый цвѣтъ. Очевидно, при выращиваніи *plasm. vivax* по методу *Bass*'а ядра паразитовъ могутъ сохраняться долгое время, протоплазма же скоро измѣняется.

4. Въ виду того, что нами было констатировано въ мазкахъ крови, взятой черезъ 2 недѣли культивированія паразита, присутствіе двухъ колець, возможно, что отдѣльныя болѣе стойкія формы *plasm. vivax* въ очень незначительномъ количествѣ могутъ не только сохраняться, но и размножаться.

5. При сохраненіи крови, содержащей *plasm. vivax*, въ цилиндрѣ намъ удалось прослѣдить только одинъ циклъ развитія этого паразита, при чемъ паразиты размножаются, какъ въ верхнихъ, такъ и въ нижнихъ слояхъ кровяного столба.

6. Прибавленіе въ пробирки, въ которыя потомъ дѣлается посѣвъ *plasm. vivax*, инактивированной асцитической жидкости или кровяной сыворотки человѣка, повидимому, не вызываетъ разницы въ ростѣ *plasm. vivax*.

7. Прибавленіе 50% раствора химически чистой декстрозы въ количествѣ болшемъ, чѣмъ указано *Bass*'омъ, не огражалось вредно на ростѣ *plasm. vivax*.

8. При дѣланіи мазковъ крови, взятой изъ цилиндра или изъ пробирки, необходимо насасывать въ ту же пипетку нѣкоторое количество находящейся надъ эритроцитами жидкости, чтобы при размазываніи получился тонкій мазокъ.

Въ заключеніе считаемъ пріятнымъ долгомъ выразить искреннюю благодарность глубокоуважаемому проф. В. К. Меншикову за просмотръ препаратовъ и цѣнные совѣты при выполненіи работы.

Литература.

1. *Laveran*. Traité du paludisme. Paris, 1891.
2. *Sacharoff*. Ueber den Einfluss der Kälte auf die Lebensfähigkeit der Malaria-Parasiten. Centralbl. f. Bact. Bd. XV, №№ 5—6, S. 158.
3. *Corunado*. Reproduction del hematozoario di Laveran. Cronica med. quirurg. d. Habana, № 22, 1892. Цит. у Гурко (9).
4. *Кубасовъ*. О грибахъ палюдизма, 1895. Цит. у Гурко (9).
5. *Марциновскій*. Медицинская Микробиологія, Т. II, 1913, стр. 72.
6. *Bass C. C.* Successful cultivation of malarial plasmodia. Реф. Zeitsch. f. Jmmunitätsforsch. u. s. w. 1913, Bd. VI, Heft 8, S. 738.
7. *Olpp*. Die Reinkultur von Malariaplasmodien nach Bass und Johns. Münch. m. Woch., 1912, № 48. S. 2623.
8. *Жуковъ Н. М.* О культурахъ малярійнаго паразита. Медич. Обоз. 1913, № 2, стр. 148.
9. *Гурко А. Г.* и *Гамбургеръ Я. Э.* Предварительное сообщеніе. Къ вопросу о культивированіи плазмодіевъ тропической маляріи по способу Bass'a и Johns'a. Медицин. Обоз. 1913, № 4, стр. 359.
10. *Bass, C. C. and Johns, Forster M.* The cultivation of malarial Plasmodia (*Plasmodium vivax* and *falciparum*) in vitro. Реф. Zeitschr. f. Jmmunitätsfor. u. s. w. 1913, Bd. VI, Hef. 8, S. 735.
11. *Ziemann Prof.* Ueber die Bassche Kultur der Malariaparasiten in vitro und die daraus sich ergebenden Resultate. Centralbl. f. Bacter. 1913, Bd. 67. Heft 6, S. 482.
12. *Аргутинскій П. М.* Краткій очеркъ методики изслѣдованія крови малярійныхъ больныхъ, Günther, руководство бактериологіи, рус. издан. Галлера, 1904 г.