

Medycyny Morskiej w Gdańsku (12). Do badań użyto szczepu K₅ adaptowanego do myszek (M) i adaptowanego do komórek Detroit 6 (D)

Do doświadczeń szczep adaptowany do myszek przygotowany był następująco: mózgi myszek padłych po zakażeniu z objawami porażen rozcierano, przygotowując 10% zawiesinę, którą następnie odwirowywano przy 3000 obrotów przez 15 min. Płyn znad osadu używano do doświadczeń

Szczep adaptowany do hodowli komórkowej stanowiły płyny zebrane znad hodowli po 5 dniach inkubacji hodowli komórkowej zakażonej szczepem K₅ w rozcieńczeniach 10⁻³.

Szczep K₅ wirusa kleszczowego zapalenia mózgu, jako szczep stymulujący interferencję, był wprowadzony w ilości 0,1 ml zawiesiny w odpowiednim rozcieńczeniu: szczep K₅, adaptowany do hodowli komórkowej, badano w rozcieńczeniach 10⁻², 10⁻⁶ oraz nie rozcieńczony. Szczep K₃ adaptowany do myszek badano w rozcieńczeniach 10⁻², 10⁻⁶.

Jako wirusów dokażających używano wirusa krowianki i wirusa polio, którymi dokażano komórki po upływie 72 godz. od zakażenia wirusem kleszczowego zapalenia mózgu. Przed przystąpieniem do doświadczenia szczepy dokażające mianowano i wprowadzano je w ilości 0,1 ml w takim największym rozcieńczeniu, które wywoływało całkowitą degenerację użytych do doświadczeń komórek w ciągu 48 godz.

W każdym doświadczeniu oprócz próbek z hodowlami komórkowymi zakażonymi dwoma wirusami były próbki kontrolne: nie zakażone, zakażone wirusem kleszczowego zapalenia mózgu i wirusem dokażającym.

Właściwości interferencyjne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu przejawiały się w opóźnieniu zmian cytotatycznych występujących pod wpływem wirusów dokażających.

Doświadczenia wykonywano na hodowli komórek linii Detroit 6. Komórki namnażano w butlach Roux w płynie Syvertona i Scherera (8), stanowiącym źródło substancji odżywczych. Doświadczenia przeprowadzano w próbkach ze szkła marki Sylvit, używając:

1) płynu Syvertona i Scherera w buforze Earle'a z 10% surowicy cielęcej (płyn odżywczy),

2) płynu Syvertona i Scherera w buforze Earle'a z 1% surowicy cielęcej,

3) płynu Syvertona i Scherera w buforze Earle'a bez surowicy,

4) buforu Earle'a z hydrolizatem laktoalbuminy i z 1% surowicy cielęcej,

5) buforu Earle'a z hydrolizatem laktoalbuminy bez surowicy.

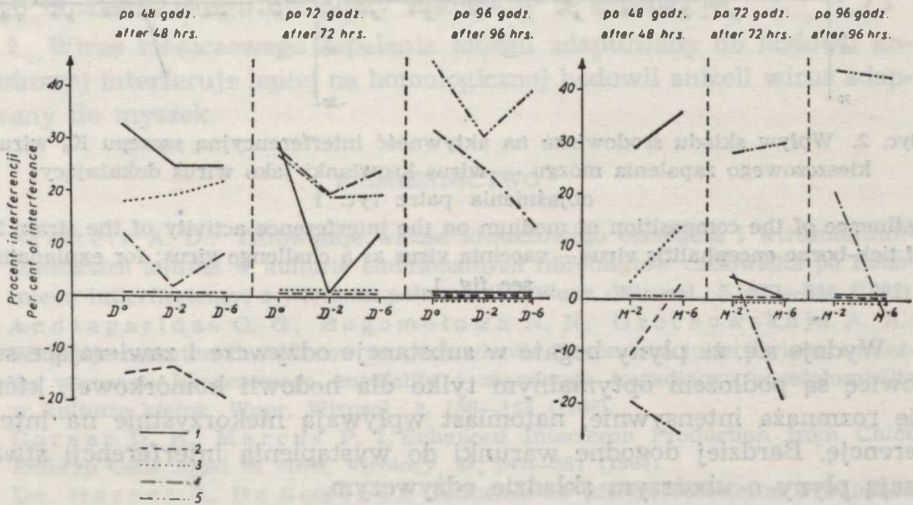
Doświadczenia powtarzano co najmniej 3-krotnie. W każdym wariantcie rozcieńczenia używano po 4 próbki w jednej serii doświadczeń, równoległe dla dokażającego wirusa polio i dla wirusa krowianki oraz kolejno dla każdego z pięciu wymienionych wyżej płynów.

WYNIKI BADAŃ

Wyniki badań przedstawiono na ryc. 1 i 2. Z wirusem polio (ryc. 1) po 48 godz. zarysowuje się przewaga płynu odżywczego, a więc najuboższego w substancje odżywcze. W tym okresie płyn ten jest najkorzystniejszy do wywołania interferencji między wirusami. W ciągu trzeciej doby przewaga tego płynu raptownie maleje. Najlepsze wyniki uzyskiwano stosując dwa płyny najuboższe w substancje odżywcze, a więc

płyn Earle'a z surowicą i bez surowicy. Zdecydowana przewaga tych płynów utrzymywała się do końca doświadczenia.

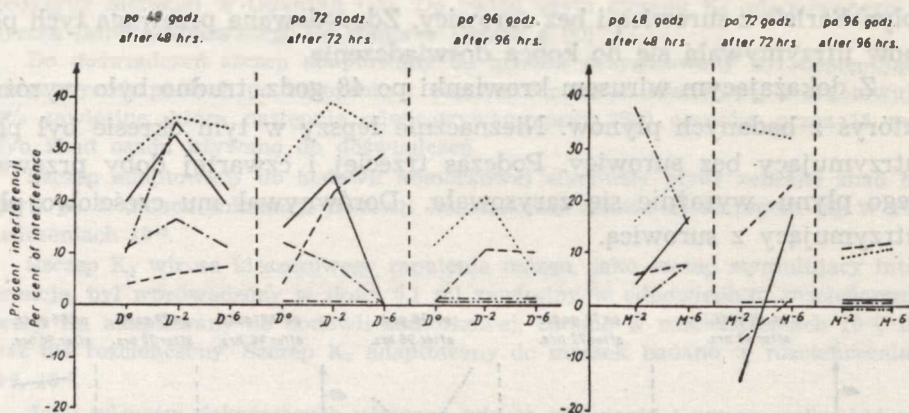
Z dokazującym wirusem krowianki po 48 godz. trudno było wyróżnić któryś z badanych płynów. Nieznacznie lepszy w tym okresie był płyn utrzymujący bez surowicy. Podczas trzeciej i czwartej doby przewaga tego płynu wyraźnie się zarysowała. Dorównywał mu częściowo płyn utrzymujący z surowicą.



Ryc. 1. Wpływ składu środowiska na aktywność interferencyjną szczepu K₅ wirusa kleszczowego zapalenia mózgu — wirus polio jako wirus dokazający; 1 — płyn odżywczy, 2 — płyn utrzymujący z surowicą, 3 — płyn utrzymujący bez surowicy, 4 — płyn Earle'a z surowicą, 5 — płyn Earle'a bez surowicy, D — szczep K₅ adaptowany do komórek Detroit 6 (D⁰ — nie rozcieńczony, D⁻² — rozcieńczony 10⁻², D⁻⁶ — rozcieńczony 10⁻⁶), M — szczep K₅ adaptowany do myszek (M⁻² — rozcieńczony 10⁻², M⁻⁶ — rozcieńczony 10⁻⁶)

Influence of the composition of medium on the interference activity of the strain K₅ of tick-borne encephalitis virus — poliovirus as a challenge virus; 1 — nutrition fluid, 2 — maintenance fluid with serum, 3 — maintenance fluid without serum, 4 — Earle's fluid with serum, 5 — Earle's fluid without serum, D — strain K₅ adapted to Detroit 6 tissue culture (D⁰ — not diluted, D⁻² — diluted 10⁻², D⁻⁶ — diluted 10⁻⁶), M — strain K₅ adapted to mice (M⁻² diluted 10⁻², M⁻⁶ — diluted 10⁻⁶)

Jest rzeczą ciekawą, iż dla poszczególnych badanych płynów trudno określić, w którym rozcieńczeniu wirus kleszczowego zapalenia mózgu najintensywniej interferuje. Jest jednak znamienne, że dla płynu utrzymującego z surowicą rozcieńczeniem najsilniej interferującym było zawsze rozcieńczenie największe wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (10⁻⁶).



Ryc. 2. Wpływ składu środowiska na aktywność interferencyjną szczepu K₃ wirusa kleszczowego zapalenia mózgu — wirus krowianki jako wirus dokazający; objaśnienia patrz ryc. 1

Influence of the composition of medium on the interference activity of the strain K₃ of tick-borne encephalitis virus — vaccinia virus as a challenge virus; for explanation see fig. 1.

Wydaje się, że płyny bogate w substancje odżywcze i zawierające surowicę są podłożem optymalnym tylko dla hodowli komórkowej, która się rozmnaża intensywnie, natomiast wpływają niekorzystnie na interferencję. Bardziej dogodnie warunki do wystąpienia interferencji stwarzają płyny o uboższym składzie odżywczym.

DYSKUSJA

Wpływ warunków środowiska na wystąpienie i natężenie zmian cytopatycznych w komórkach pod wpływem wirusów obserwuje K a n t o c h (5). Autor ten uważa zmiany degeneracyjne za wykładnik wrażliwości komórek na zakażenie wirusem, a wrażliwość hodowanych komórek może ulec zmianie pod wpływem różnorodnych bodźców.

Wpływ niektórych czynników na pojawienie się zjawiska interferencji między wirusami kleszczowego zapalenia mózgu i zachodniego końskiego zapalenia mózgu badała Andżaparidze i współprac. (2), zwracając uwagę, iż uprzednia adaptacja szczepów wirusa kleszczowego zapalenia mózgu do kultur komórkowych powiększyła ich aktywność interferencyjną w porównaniu z wariantami mózgowymi, jeżeli były one badane w homologicznych hodowlach komórkowych. Jest to zgodne z uzyskanymi przeze mnie wynikami, ponieważ wirus kleszczowego zapalenia mózgu adaptowany do komórek Detroit 6 interferuje lepiej w hodowli homologicznych komórek niż wirus adaptowany do myszek. Ponadto stwierdzono, że istnieje zależność właściwości interferencyjnych

wirusa kleszczowego zapalenia mózgu od doboru odpowiedniego podłoża, a mianowicie — płyny o uboższym składzie odżywczym stwarzają bardziej dogodne warunki do wystąpienia interferencji niż płyny bogatsze w substancje odżywcze.

WNIOSKI

1. Płyny ubogie w substancje odżywcze stwarzają dogodniejsze warunki do wystąpienia interferencji stymulowanej przez wirus kleszczowego zapalenia mózgu niż płyny zasobne w te substancje.
2. Wirus kleszczowego zapalenia mózgu adaptowany do hodowli komórkowej interferuje lepiej na homologicznej hodowli aniżeli wirus adaptowany do myszek.

PIŚMIENNICTWO

1. Altstein A. D.: Titrowanie wirusa kleszczowego encefalita i wirusnieutralizujących antybiotyków w kulturze embrionalnych fibroblastów człowieka po fenomieniu intierfieriencji s wirusom poliomielioty. Wopr. Wirusol., 5, 529—534 (1962).
2. Andżaparidze O. G., Bogomołowa N. N., Grochowska A. A.: Wlijanije niekatorych faktorow na projawlenije fienomiena intierfieriencji między wirusami kleszczowego encefalita i zapadnego łozadynogo encefalomielita w kulturie kletok. Wopr. Wirusol., 2, 158—163 (1966).
3. Carver D. H., Marcus P. I.: Enhanced Interferon Production from Chick Embryo Cells Aged *in vitro*, Virology, 32, 247—257 (1967).
4. De Maeyer E., De Somer P.: Influence of pH on Interferon Production and Activity. Nature, 194, 1252—1253 (1962).
5. Kańtoch M.: Efekt cytopatyczny jako wykładnik zakażenia wirusowego *in vitro*. Post. Hig. i Med. Dośw., 19, 635—645 (1965).
6. Kawecki Z.: Investigations on Visualization of the Tick-borne Encephalitis Virus in Tissue Culture by Additional Infection with Virus Poliomyelitis. Biul. I.M.M., 13, 207—217 (1961).
7. Kawecki Z.: Cytopathogenic Effect on the Tissue Line Girardi after its Infection with Tick-borne Encephalitis Virus. Biul. I.M.M., 13, 219—222 (1962).
8. Kawecki Z.: Culture of Virus of Tick-borne Encephalitis in Various Tissue Lines. Acta Microb. Polonica, 13, 299—303 (1964).
9. Kawecki Z.: Interference of Tick-borne Encephalitis (TE) Virus in Tissue Culture. I. Interference in Cultures of Detroit 6 Cells and of Chick Embryo Fibroblasts. Acta Microb. Polonica, 13, 305—313 (1964).
10. Kawecki Z.: Interference of Tick-borne Encephalitis (TE) Virus in Tissue Culture. II. Isolation in Tissue Culture of TE Virus from Pathological Material. Acta Microb. Polonica, 13, 315—319 (1964).
11. Kowalewska D.: O wpływie pH środowiska na rozplam i ultrastrukturę komórek Hela *in vitro*. Post. Hig. i Med. Dośw., 17, 209—221 (1963).
12. Lachmayer J., Wegner Z., Kawecki Z.: Spontaneous Infection of Ticks Ixodes Ricinus with the Virus of Tick Encephalitis in the Coast District. Biu. I.M.M., 8, 173—182 (1957).
13. Skurska Z.: Interferon. Post. Hig. i Med. Dośw., 17, 245—262 (1963).



14. Szurman J.: Wpływ składników odżywczych na układ komórka-wirus. Post. Hig. i Med. Dośw., 18, 357—385 (1964).
15. Vilček J.: Interference between Tick-borne Encephalitis and Western Equine Encephalomyelitis Viruses in Chick Embryo Tissue Cultures. Acta Virol., 4, 308—310 (1960).

РЕЗЮМЕ

Исследовали зависимость интерференционных свойств вируса клещевого энцефалита в клеточной культуре от состава среды.

Жидкости, богатые питательными субстанциями и содержащие сыворотку, являются оптимальной средой только для культуры клеток, которая интенсивно размножается, но создают невыгодные условия для интерференции.

Более выгодные условия для интерференции в культуре клеток создают жидкости со скудным питательным составом, а именно, буфер Earle с гидролизатом лактоальбмина и жидкости, не содержащие сыворотки.

Кроме того, констатировали, что вирус клещевого энцефалита, адаптированный к клеткам Detroit 6, интерферирует лучше в культуре гомологичных клеток, чем вирус, адаптированный к мышам.

SUMMARY

Relation between the interference properties of tick-borne encephalitis virus and the composition of tissue culture medium was examined.

Fluids containing serum and a large amount of nutrition substances on the one hand constitute the optimum medium for a tissue culture but on the other hand do not favour interference.

Favourable conditions for interference in tissue culture are created by fluids of a small amount of nutrition substances such as Earle's buffer with lactalbumin hydrolyzate and fluids without serum.

Besides, it was found out that in homologic tissue culture the tick-borne encephalitis virus adapted to Detroit 6 tissue culture displays greater interference properties than that adapted to mice.