

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXVI, 2

SECTIO C

1971

Institut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Zbigniew KAWECKI, Irena SUJAK

**Szczepy wirusa kleszczowego zapalenia mózgu
jako stymulatory produkcji interferonu**

Штаммы вируса клещевого энцефалита как стимуляторы продукции интерферона

Strains of Tick-borne Encephalitis Virus as the Stimulators of Interferon
Production

Punktem zwrotnym w badaniach nad zjawiskiem interferencji było wykrycie interferonu przez Isaacs i Lindenmana w r. 1957. Interferon otrzymywano w różnych systemach wirus — komórka *in vitro* i *in vivo* w organizmie człowieka i zwierząt doświadczalnych. Ścisła definicja interferonu nie jest dotychczas ustalona. Na ogół interferonami nazywa się substancje o cechach białek, odznaczające się swoistością gatunkową, mające zdolność do hamowania wewnątrzkomórkowej replikacji wirusa (8). Interferony są inhibitorami wewnątrzkomórkowej syntezy wirusów RNA oraz DNA, wirusów cytopatycznych i onkogennych (4). Interferony pojawiają się w komórce po zadziałaniu na nią bodźców zwanych induktorami. Najsilniejszymi znanymi induktorami syntezy interferonu są wirusy. Praktycznie każdy wirus może indukować syntezę interferonu, jeżeli zadziała na odpowiednio wrażliwe komórki. Najlepszymi induktorami produkcji interferonu okazały się Myksowirusy i Arbowirusy. Spośród Arbowirusów jako stymulatorów produkcji interferonu stosowano wiele wirusów, między innymi używano również wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (5, 6, 10).

Przydatność wirusa kleszczowego zapalenia mózgu jako stymulatora produkcji interferonu jest bezsporna. Namnaża się on w komórkach, przeważnie nie powodując ich degeneracji, a przy tym wykazuje bardzo szerokie spektrum działania w stosunku do komórek różnego pochodzenia. Z dobrym skutkiem stosowano różne szczepy wirusa kleszczowego zapa-

lenia mózgu jako stymulatory produkcji interferonu. Dotychczas nie przeprowadzono jednak badań porównawczych, stymulując produkcję interferonu jednocześnie przez kilka szczepów wirusa. Postanowiono więc porównać szczepy wirusa kleszczowego zapalenia mózgu różnego pochodzenia jako stymulatory produkcji interferonu. W badaniach nad aktywnością uwzględniono różny okres podania interferonu przed podaniem wirusa dokażającego i różną koncentrację inhibitora.

MATERIAŁY I METODYKA

Wirusy. Do badań użyto jako stymulatorów produkcji interferonu czterech szczepów wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. Dwóch szczepów izolowanych na terenie Polski—szczep K₅ i szczep Kłodobok, jednego szczepu izolowanego w Związku Radzieckim—szczep Chabarowski i jednego szczepu izolowanego w Czechosłowacji—szczep Hypr. Szczep K₅ otrzymano z Instytutu Medycyny Morskiej w Gdańsku, pozostałe trzy szczepy z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. Jako wirusa dokażającego używano wirusa krowianki, który podawano w dawce 100 TCID₅₀ na jedną próbkę.

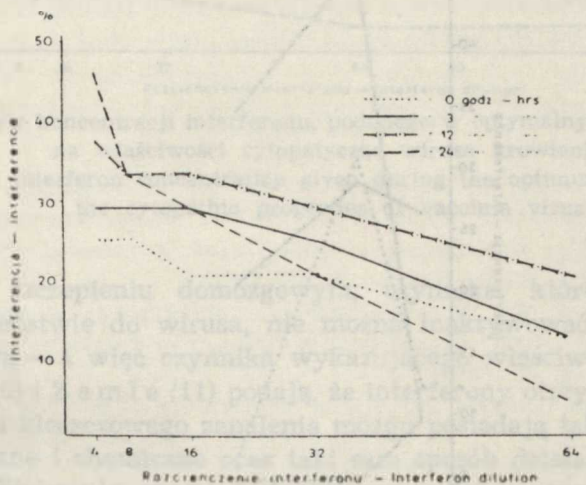
Tkanki i płyny tkankowe. Interferon produkowano w komórkach Detroit 6 oraz w tych samych komórkach sprawdzano jego aktywność. W celach porównawczych aktywność interferonu określano również w komórkach FL. Tkanke hodowano w zmodyfikowanym płynie Syvertona i Scherera (6) z dodatkiem 10% surowicy cielej. Ten sam płyn był płynem utrzymującym, jedynie zawartość surowicy zmniejszano do 1%.

Otrzymywanie interferonu. Interferon otrzymywano przez zakażenie wyrosniętych 48-godzinnych hodowli komórek Detroit 6 odpowiednim szczepem wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. W celu zwiększenia właściwości interferonotwórczych zawiesinę wirusa poddawano działaniu temp. 37°C w ciągu 24 godz. (3). Wirusa kleszczowego zapalenia mózgu wprowadzano w dawce ok. 100 LD₅₀ na próbkę. Zakażone hodowle inkubowano w temp. 37°C w ciągu 4 dni. Następnie płyn utrzymujący usuwano, tkankę przemywano buforem Earle'a, do każdej próbki zakażonej tkanki dodawano po 0,1 ml buforu Earle'a i zamrażano w temp. —20°C. Po odmrożeniu zawartość probówek wytrząsano przez godzinę i wirowano przez 20 min. przy 4500 obr./min. Płyn z nad osadu sączono przez błony gradokolowe o średnicy por 10 do 20 μ . Przesącz był źródłem interferonu. Stwierdzono, że w ten sposób przygotowany preparat jest niepatogenny dla białych myszek przy zakażeniu domózgowym i nie jest neutralizowany przez swoistą, skierowaną przeciwko kleszczowemu zapaleniu mózgu, surowicę odpornościową. Stwierdzono, że wirus kleszczowego zapalenia mózgu poddany działaniu swoistej surowicy odpornościowej nie interferuje (5, 7). Otrzymany preparat nie tracił aktywności w pH 2. A więc przygotowany czynnik wykazywał właściwości interferonu. Otrzymane preparaty dodawano do płynu utrzymującego w takich ilościach, aby otrzymać kolejne, dwukrotne rozcieńczenia, rozpoczynając od rozcieńczenia 1:4.

WYNIKI BADAŃ

Pierwszą serię doświadczeń wykonano z preparatem zawierającym interferon, otrzymany w komórkach Detroit 6 pod wpływem szczepu

K_5 wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. W przeprowadzonych doświadczeniach przebadano wpływ koncentracji i czasu działania interferonu na właściwości cytopatyczne wirusa krowianki. Wirusa dokażającego podano w różnym czasie: 0, 3, 12 i 24 godz. po potraktowaniu komórek interferonem. Preparat interferonu wprowadzono we wzrastających rozcieńczeniach — od 1:4 do 1:64. Z przeprowadzonych badań wynika, że stopień zabezpieczenia komórek zależy jest w stosunku wprost proporcjonalnym od koncentracji interferonu oraz od czasu jego dodania do komórek przed wprowadzeniem wirusa dokażającego (ryc. 1). Najlepsze zabezpieczenie komórek uzyskano, gdy interferon wprowadzono na 12 godz. przed do-



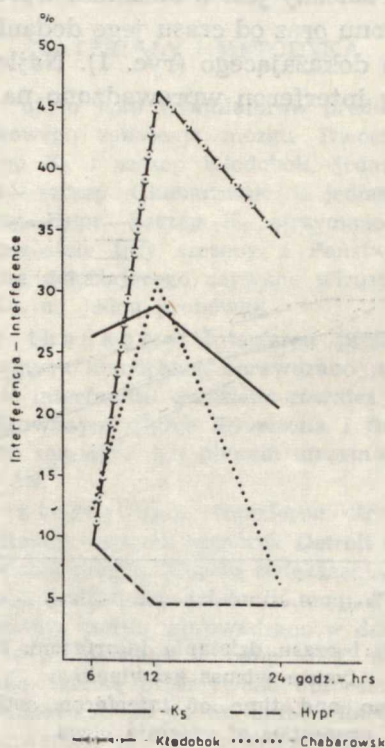
Ryc. 1. Wpływ koncentracji i czasu działania interferonu na właściwości cytopatyczne wirusa krowianki
Effect of the concentration and time of interferon action on the cytopathic properties of vaccinia virus

daniem wirusa krowianki. Nieco gorsze, ale również pozytywne, wyniki zanotowano, gdy interferon podano równocześnie z wirusem dokażającym albo w 24 godz. przed wirusem.

W następnych doświadczeniach przebadano równocześnie wszystkie cztery preparaty interferonu, otrzymane pod wpływem czterech badanych szczepów wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. Stwierdzono (ryc. 2), że trzy preparaty interferonu, otrzymane pod wpływem szczepów K_5 , Chabarowsk i Kłobodok, działają najskuteczniej, gdy są podane na 12 godz. przed wirusem dokażającym, jedynie interferon otrzymany pod wpływem wirusa Hypr działa lepiej po 6 niż po 12 godz.

Na zakończenie prześledzono aktywność wszystkich wyprodukowanych interferonów w stosunku do cytopatycznego działania wirusa kro-

wianki w optymalnym dla większości preparatów czasie 12 godz. Okazało się, że nie wszystkie szczepy wirusa kleszczowego zapalenia mózgu są jednakowo dobrymi stymulatorami produkcji interferonu. Zdecydowanie najlepszym stymulatorem okazał się szczep Kłodobok. Nieznacznie ustępują mu pod względem właściwości interferonotwórczych szczepy K_5 i Chabarowski. Uwzględniając nawet poprawkę, że czas 12 godz. nie

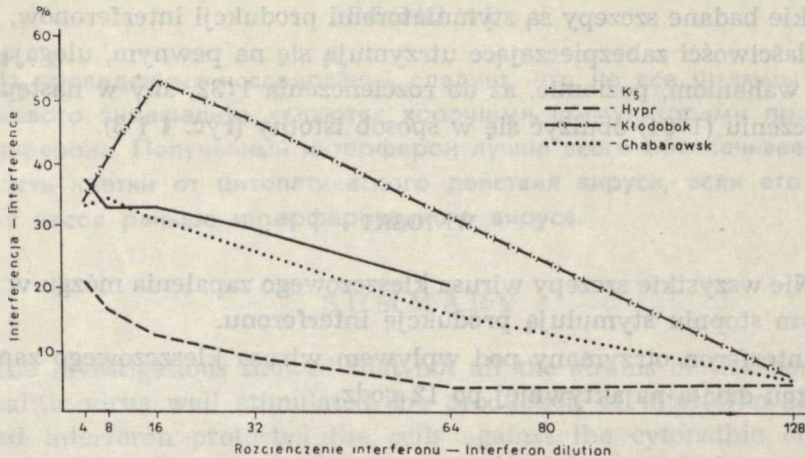


Ryc. 2. Czas działania interferonu w rozcieńczeniu 1 : 32
Time of the action of interferon at the dilution 1 : 32

jest optymalny dla działania interferonu otrzymanego pod wpływem szczepu Hypr, właśnie ten szczep okazał się najmniej przydatny spośród czterech przebadanych szczepów do stymulacji produkcji interferonu (ryc. 2 i 3). Otrzymane preparaty interferonu okazały się aktywne w nieco mniejszym stopniu w stosunku do komórek FL.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Wirus kleszczowego zapalenia mózgu może być stymulatorem czynnika zabezpieczającego silniej tkanki homologiczne niż heterologiczne, zachowującego stabilność w środowisku o pH 2, niepatogennego dla my-



Ryc. 3. Wpływ koncentracji interferonu, podanego w optymalnym czasie (12 godz.), na właściwości cytopatyczne wirusa krowianki
 Effect of the interferon concentration given during the optimum time (12 hrs) on the cytopathic properties of vaccinia virus

szek przy szczepieniu domózgowym, czynnika, którego aktywności, w przeciwieństwie do wirusa, nie można inaktywować surowicą przeciwwirusową — a więc czynnika wykazującego właściwości interferonu. *Vilcek* (10) i *Zemla* (11) podają, że interferony otrzymane pod wpływem wirusa kleszczowego zapalenia mózgu posiadają takie same właściwości fizyczne i chemiczne oraz taki sam sposób działania jak inne interferony. Wykazują znaczny stopień oporności na temp. 75°C, co nie jest właściwe innym inhibitorom tego typu. Pod wpływem czterech szczepów wirusa kleszczowego zapalenia mózgu otrzymano cztery preparaty zawierające interferon. Wykazały one działanie zabezpieczające, jeżeli były podane jednocześnie z wirusem dokażającym, jak i na 24 godz. przed podaniem wirusa. Najaktywniejsze działanie otrzymanego inhibitora przypada na okres między 6 i 12 godz. przed podaniem wirusa cytopatycznego. Wyniki są zgodne z wynikami opublikowanymi przez innych autorów. *Paucker* i *Boxaca* (9) oraz *Czerniecowa* (2) podają, że interferony działają najsilniej, jeżeli są podane na kilka do kilkunastu godzin przed podaniem wirusa.

Przydatność wirusa kleszczowego zapalenia mózgu do badań nad interferencją jest duża ze względu na jego słabe właściwości cytopatyczne i dużą wrażliwość na działanie interferonu (1). Przeprowadzone badania wykazały, że nie wszystkie szczepcy wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w jednakowym stopniu stymulują produkcję interferonu. Z przebadanych szczepów szczep *Kłodobok* wykazywał bardzo silne właściwości interferonotwórcze w przeciwieństwie do małej aktywności szczepu *Hypr*.

Wszystkie badane szczepy są stymulatorami produkcji interferonów, których właściwości zabezpieczające utrzymują się na pewnym, ulegającym małym wahaniom, poziomie, aż do rozcieńczenia 1:32, aby w następnym rozcieńczeniu (1:64) obniżyć się w sposób istotny (ryc. 1 i 3).

WNIOSKI

1. Nie wszystkie szczepy wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w jednakowym stopniu stymulują produkcję interferonu.

2. Interferon otrzymany pod wpływem wirusa kleszczowego zapalenia mózgu działa najaktywniej po 12 godz.

PIŚMIENICTWO

1. Andżaparidze O. G., Grochowska A. A., Bogomołowa N. N.: Izuczenije wzaimoswiazii miezdu rozmnozeniem wirusa kleszczowego encefalita, produkcyje intierfierona i pojawleniem fienomienna intierfierienicy w kulturie kletok. Wopr. Wirusol., 3, 296 (1967).
2. Czerniecowa J. W.: Izuczenije aktiwnosti intierfierona w sistiemie kuri-nyje fibroblasty — wirus ospowakynii w razlicznyje intierwały jego diejstwija. Wopr. Wirusol., 5, 525 (1967).
3. Dąbek-Szreniawska M.: Wpływ temperatury 37°C na właściwości interferencyjne i infekcyjne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. Acta Microbiol. Polon., seria A, 2., 133 (1970).
4. Furier N. M., Pokidowa N. W., Jermoliewa Z. W.: Intierfieron. Antibiotiki, 11, 1027 (1967).
5. Kawecki Z.: Investigations on Visualization of the Tick-borne Encephalitis Virus in Tissue Cultures by Additional Infection with Virus Poliomyelitis. Biul. I.M.M., 12, 207 (1961).
6. Kawecki Z.: Culture of Virus of Tick-borne Encephalitis in Various Tissue Lines. Acta Microbiol. Polon., 13, 299 (1964).
7. Kawecki Z.: Interference of Tick-borne Encephalitis Virus in Tissue Culture. Acta Microbiol. Polon., 13, 305 (1964).
8. Lampson G. P., Nemes M., Hilleman M.: Characterization of Chick Embryo Interferon Induced by DNA Viruses. Proc. Soc. Exper. Biology and Medicine, 118, 441 (1965).
9. Paucker K., Boxaca M.: Cellular Resistance to Induction of Interferon. Bacteriol. Reviews, 31, 2 (1967).
10. Vilcek J.: Studies on an Interferon from Tick-borne Encephalitis Virus-infected Cells. Acta Virol., 5, 278 (1961). Acta Virol., 6, 144, (1962). Acta Virol., 7, 107 (1963).
11. Zemla J., Vilcek J.: Izuczenije intierfierona iz kletok zarażonych wirusom kleszczowego encefalita. Acta Virol., 5, 367 (1961).

РЕЗЮМЕ

Из проведенных исследований следует, что не все штаммы вируса клещевого энцефалита являются хорошими стимуляторами продукции интерферона. Полученный интерферон лучше всего обеспечивает безопасность клетки от цитопатического действия вируса, если его ввести на 12 часов раньше интерферованного вируса.

SUMMARY

The investigations showed that not all the strains of tick-borne encephalitis virus well stimulated the production of interferon. The obtained interferon protected the cells against the cytopathic effect of infectious virus best of all when it was applied 12 hours before the virus.

Wirus kleszczowego zapalenia mózgu replikuje się w różnych stanach kulturalnych i w warunkach in vivo. W badaniach laboratoryjnych otrzymuje się dość dużą ilość interferonu, który chroni komórki przed cytopatycznym działaniem wirusa.

Investigations on the Interferon-Producing Properties of Tick-Borne Encephalitis Virus Strains Adapted to Tissue Culture

Wirus kleszczowego zapalenia mózgu replikuje się w różnych stanach kulturalnych i w warunkach in vivo. W badaniach laboratoryjnych otrzymuje się dość dużą ilość interferonu, który chroni komórki przed cytopatycznym działaniem wirusa. Wirus replikuje się w różnych warunkach, ale powodując ich degenerację, tylko nieliczne przez doświadczenia wykazują efekt cytopatyczny pod wpływem wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. Najwyższe dawki interferonu (10⁷) w komórkach G-9, 2 i 3, w dawce 10⁶ w komórkach Delbock i Kaweckij (4) w komórkach Guard i otrzymywali interferon synergicznie. Działalność wirusowa i cytopatyczna wirusa kleszczowego zapalenia mózgu od czasu jej użycia do czasu wywołania interferonu (1, 2, 3) zmniejszała się, a w niektórych przypadkach (4) wirus kleszczowego zapalenia mózgu nie powodował degeneracji komórek. Podsumowano więc rezultaty, jak zachowują się różne szczepy wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w odniesieniu do czasu wniknięcia kolejnych partii w określonych do badań kulturalnych.

MATERIALY I METODYKA

