

Z Katedry Mikrobiologii Szczegółowej Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS
Kierownik: doc. dr Zbigniew Kawecki

Małgorzata DĄBEK-SZRENIAWSKA

**Wpływ pH środowiska na właściwości interferencyjne wirusa
kleszczowego zapalenia mózgu w hodowli komórkowej**

Влияние pH среды на интерференционные свойства вируса
клещевого энцефалита в культуре клеток

Influence of pH of Medium on the Interference Properties of Tick-borne
Encephalitis Virus in Tissue Culture

WSTĘP

Wirus kleszczowego zapalenia mózgu namnaża się dobrze w hodowli szeregu komórek i wykazuje aktywność interferencyjną w stosunku do różnych wirusów. Badania nad tym zagadnieniem przeprowadzali: Kawecki (5, 6, 7, 8, 9), Altstein (1), Andżaparidze i współprac. (2, 3) oraz Vilček (11).

MATERIAŁY I METODY

Wykorzystując poprzednie obserwacje, poczynione na temat wpływu składu środowiska na właściwości interferencyjne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w hodowli komórkowej (4), użyto płynów ubogich w składniki odżywcze, a mianowicie 0,5% roztworu hydrolizatu laktoalbuminy w buforze Earle'a bez surowicy i z dodatkiem 1% surowicy cielecej. Badane płyny doprowadzono do pH 6,8 i 7,6.

Do badań użyto szczepu K₅ wirusa kleszczowego zapalenia mózgu:

a) adaptowanego do komórek Detroit 6 w postaci płynów znad hodowli komórkowej po 5 dniach inkubacji hodowli zakażonej szczepem K₅ w rozcieńczeniach 10⁻³;

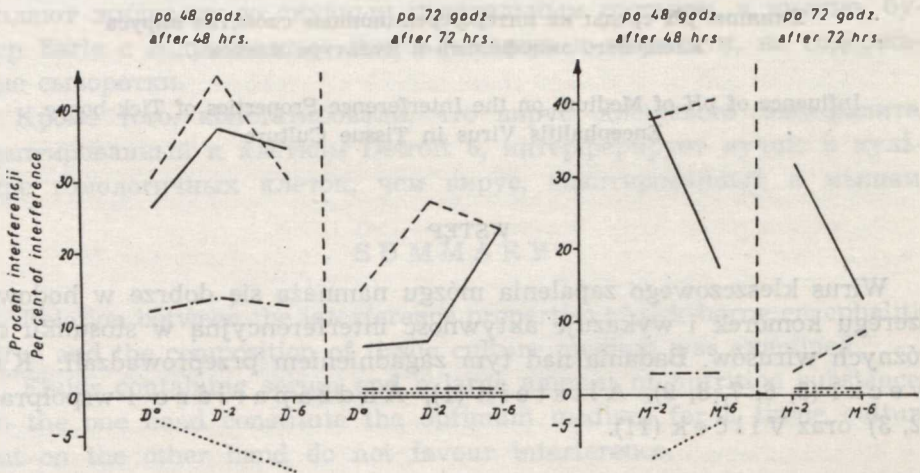
b) adaptowanego do myszek w postaci 10% zawiesiny, uzyskanej z rozcieru mózgow myszek padłych po zakażeniu wirusem kleszczowego zapalenia mózgu, następnie odwirowywanej w 3 000 obrotów przez 15 min., a płyn znad osadu używano do doświadczeń.

Szczep K₅ wirusa kleszczowego zapalenia mózgu był wprowadzany w ilości

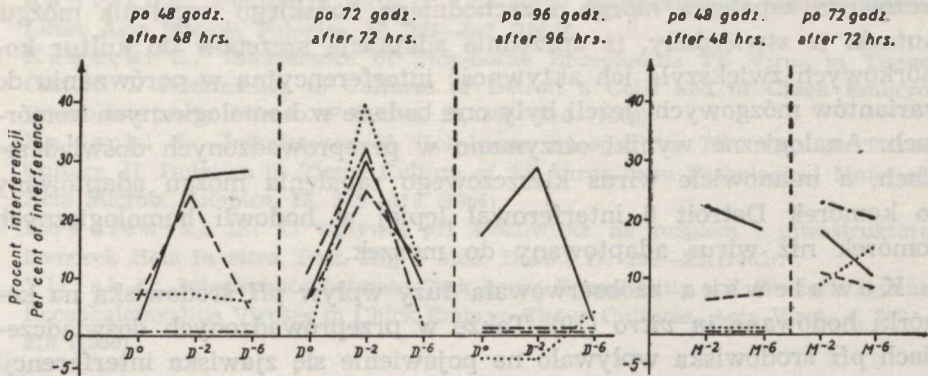
0,1 ml do hodowli komórkowej. Szczep K_5 adaptowany do hodowli komórkowej (D) badano w rozcieńczeniu 10^{-2} , 10^{-6} i nie rozcieńczony. Szczep K_5 adaptowany do myszek (M) badano w rozcieńczeniach 10^{-2} , 10^{-6} . Wirusami dokażającymi były: wirus polio i krowianki, którymi dokażano komórki po 72 godz. od zakażenia wirusem kleszczowego zapalenia mózgu. Badania przeprowadzono na linii komórek Detroit 6 w stałej temp. 37°C . Hodowlę komórek Detroit 6 prowadzono w płynie Syvertona i Scherera. Doświadczenia powtarzano co najmniej 3-krotnie, przeznaczając w każdej serii doświadczeń dla odpowiedniego rozcieńczenia wirusa po 4 próbki, równoległe dla dokażającego wirusa polio i dla wirusa krowianki kolejno przy zastosowaniu każdego z czterech wymienionych płynów. Badane hodowle komórkowe były kontrolowane każdego dnia.

WYNIKI BADAŃ

Wyniki badań nad wpływem pH środowiska na zjawisko interferencji między wirusami przedstawiono na ryc. 1 i 2.



Ryc. 1. Wpływ pH środowiska na aktywność interferencyjną szczepu K_5 wirusa kleszczowego zapalenia mózgu — wirus polio jako wirus dokażający; 1 — 0,5% hydrolyzatu laktoalbuminy w płynie Earle'a bez surowicy (pH 6,8), 2 — 0,5% hydrolyzatu laktoalbuminy w płynie Earle'a z surowicą (pH 6,8), 3 — 0,5% hydrolyzatu laktoalbuminy w płynie Earle'a bez surowicy (pH 7,6), 4 — 0,5% hydrolyzatu laktoalbuminy w płynie Earle'a z surowicą (pH 7,6), D — szczep K_5 adaptowany do komórek Detroit 6 (D^0 — nie rozcieńczony, D^{-2} — rozcieńczony 10^{-2} , D^{-6} — rozcieńczony 10^{-6}), M — szczep K_5 adaptowany do myszek (M^{-2} — rozcieńczony 10^{-2} , M^{-6} — rozcieńczony 10^{-6}) Influence of pH of medium on interference activity of the strain K_5 of tick-borne encephalitis virus — poliovirus as a challenge virus; 1 — 0.5% lactalbumin hydrolyzate in Earle's fluid without serum (pH 6.8), 2 — 0.5% lactalbumin hydrolyzate in Earle's fluid with serum (pH 6.8), 3 — 0.5% lactalbumin hydrolyzate in Earle's fluid without serum (pH 7.6), 4 — 0.5% lactalbumin hydrolyzate in Earle's fluid with serum (pH 7.6), D — strain K_5 adapted to Detroit 6 tissue culture (D^0 — not diluted, D^{-2} — diluted 10^{-2} , D^{-6} — diluted 10^{-6}), M — strain K_5 adapted to mice (M^{-2} — diluted 10^{-2} , M^{-6} — diluted 10^{-6})



Ryc. 2. Wpływ pH środowiska na aktywność interferencyjną szczepu K_5 wirusa kleszczowego zapalenia mózgu — wirus krowianki jako wirus dokażający; objaśnienia patrz ryc. 1

Influence of pH of medium on interference activity of the strain K_5 of tick-borne encephalitis virus — vaccinia virus as a challenge virus; for explanation see fig. 1

Przez cały czas doświadczeń z dokażającym wirusem polio uwidoczniła się zdecydowana przewaga płynów o pH 6,8 nad płynami o pH 7,6 (ryc. 1), zarówno z wirusem adaptowanym do myszek, jak i z wirusem adaptowanym do hodowli komórkowej. Już po 48 godz. od chwili wprowadzenia wirusa dokażającego stopień zabezpieczenia komórek był dość znaczny i dochodził do 40%, ale w ciągu następnej doby spadał do połowy. W płynach o pH 7,6 interferencja albo wcale nie zachodziła, albo była bardzo słaba.

W doświadczeniach z dokażającym wirusem krowianki (ryc. 2) zaznaczyła się również przewaga płynów o pH 6,8, ale tylko na początku, to znaczy po 48 godz. od chwili wprowadzenia wirusa dokażającego. Po dłuższym okresie przydatność wszystkich czterech płynów do wystąpienia zjawiska interferencji była mniej więcej jednakowa. Być może, płyny alkaliczne o pH 7,6 stopniowo uległy zakwaszeniu przez metabolizujące komórki i stworzyły się korzystniejsze warunki dla interferencji.

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że wyższa była aktywność interferencyjna szczepu adaptowanego do komórek Detroit 6 niż szczepu adaptowanego do myszek, a także korzystniejsze okazało się działanie płynów o pH 6,8 niż płynów o pH 7,6 na zjawisko interferencji między wirusami.

DYSKUSJA

Andżaparidze i współprac. (2, 3) badały wpływ niektórych czynników na pojawienie się zjawiska interferencji między wirusami kle-

szczowego zapalenia mózgu i zachodniego końskiego zapalenia mózgu. Autorki te stwierdziły, iż uprzednia adaptacja szczepów do kultur komórkowych zwiększyła ich aktywność interferencyjną w porównaniu do wariantów mózgowych, jeżeli były one badane w homologicznych komórkach. Analogiczne wyniki otrzymano w przeprowadzonych doświadczeniach, a mianowicie wirus kleszczowego zapalenia mózgu adaptowany do komórek Detroit 6 interferował lepiej w hodowli homologicznych komórek niż wirus adaptowany do myszek.

Kowalewska zaobserwowała duży wpływ pH środowiska na komórki hodowane *in vitro* (10). Także w przeprowadzonych doświadczeniach pH środowiska wpływało na pojawienie się zjawiska interferencji między wirusami, obserwowanego w hodowli komórkowej. Stwierdzono, że płyny o pH 6,8 są lepszym środowiskiem dla komórek, na których określona jest interferencja, aniżeli płyny o pH 7,6.

WNIOSKI

1. Płyny o pH 6,8 są odpowiedniejszym środowiskiem dla komórek, na których określana jest interferencja stymulowana przez wirus kleszczowego zapalenia mózgu, niż płyny o pH 7,6.

2. Wirus kleszczowego zapalenia mózgu adaptowany do hodowli komórkowej na homologicznej hodowli interferuje lepiej aniżeli wirus adaptowany do myszek.

PIŚMIENICTWO

1. Altstein A. D.: Titrowanie wirusa kleszczowego encefalita i wirusnieutralizujących antybiotyków w kulturze embrionalnych fibroblastów człowieka po fenomieniu intierfieriencji s wirusom poliomielita. Wopr. Wirusol., 5, 529 (1962).
2. Andżaparidze O. G., Bogomołowa N. N., Grochowskaja A. A.: Wlijanije niekatorych faktorow na projawlenije fienomienna intierfieriencji mieźdu wirusami kleszczowego encefalita i zapadnogo łoszadnogo encefalomielita w kulturie kłetok. Wopr. Wirusol., 2, 158—163 (1966).
3. Andżaparidze O. G., Grochowskaja A. A., Bogomołowa N. N.: Izuczenije wzaimoswiazii mieźdu rozmnoženijem wirusa kleszczowego encefalita, produkcyje intierfierona i projawlenijem fienomienna intierfieriencji w kulturie kłetok. Wopr. Wirusol., 3, 296—300 (1967).
4. Dąbek-Szreniawska M.: Wpływ składu środowiska na właściwości interferencyjne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w hodowli komórkowej. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C, 25 (1970).
5. Kaweckki 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).
6. Kaweckki Z.: Cytopathogenic Effect on the Tissue Line Girardi after its Infection with Tick-borne Encephalitis Virus. Biul. I.M.M., 13, 219—222 (1962).

7. Kawecki Z.: Culture of Virus of Tick-borne Encephalitis in Various Tissue Lines. *Acta Microb. Polonica*, **13**, 299—303 (1964).
8. 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).
9. 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).
10. Kowalewska D.: O wpływie pH środowiska na rozplem i ultrastrukturę komórek Hela *in vitro*. *Post. Hig. i Med. Dośw.*, **17**, 209—221 (1963).
11. Vilček J.: Interference between Tick-borne Encephalitis and Western Equine Encephalomyelitis Viruses in Chick Embryo Tissue Cultures. *Acta Virol.*, **4**, 308—310 (1960).

РЕЗЮМЕ

Наблюдали влияние pH среды на явление интерференции между вирусами в культуре клеток. Наиболее выгодные условия для выступления интерференции создают жидкости со слабокислой pH . А именно, жидкость с pH 6,8 была более соответствующей средой для клеток, на которых была определена интерференция, стимулированная вирусом клещевого энцефалита, чем жидкость с pH 7,6. Вирус клещевого энцефалита, адаптированный к клеточной культуре, интерферирует лучше в гомологичной культуре, чем вирус, адаптированный к мышам.

SUMMARY

The influence of pH of medium on interference between viruses was observed in tissue culture. Fluids of slightly acid pH favour the interference. Thus, the fluids of pH 6.8 in comparison to those of pH 7.6 provided a more suitable medium for the tissue culture in which the interference stimulated by tick-borne encephalitis virus was determined. In homologous culture the tick-borne encephalitis virus adapted to tissue culture displayed greater interference properties than that adapted to mice.

