

Irena SUJAK, Zbigniew KAWECKI

**Interferencja stymulowana wirusem kleszczowego zapalenia mózgu
w hodowlach komórek embrionalnych**

Интерференция, стимулированная вирусом клещевого энцефалита
в эмбриональных клеточных культурах

Interference Stimulated by Tick-Borne Encephalitis Virus in Embryo Cell Cultures

Najlepiej poznanymi induktorami interferonu (If) są wirusy, wśród nich największy udział wykazują myksowirusy i arbowirusy. Arbowirusy wykazują interferencyjne działanie w stosunku do wielu cytopatycznych wirusów *in vitro* i *in vivo* (12). Wirus kleszczowego zapalenia mózgu (KZM), należący do arbowirusów, namnaża się w różnych komórkach zwierząt i zwykle nie powoduje ich degeneracji. Jednocześnie jest dobrym stymulatorem interferonu *in vitro* i *in vivo*. Dzięki tym właściwościom wirus kleszczowego zapalenia mózgu stosowany jest jako stymulator interferencji (4, 11).

Celem wykonanej pracy były badania porównawcze nad określeniem przydatności komórek embrionalnych różnych zwierząt do interferencji stymulowanej wirusem kleszczowego zapalenia mózgu. Badano interferencję szczepu K₅ wirusa KZM z wirusem *Vaccinia* w hodowli komórek nerki płodu krowy, w hodowli fibroblastów zarodka myszy oraz w hodowli fibroblastów zarodka kury. Badania te miały wyjaśnić, która z łatwo dostępnych tkanek jest najbardziej odpowiednim modelem do badań nad interferencją.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy wirusów: szczep K₅ wirusa kleszczowego zapalenia mózgu izolowano w r. 1957 z larw kleszcza *Ixodes ricinus* w Instytucie Medycyny Morskiej

w Gdańsku (5). Wirus KZM pasażowano wielokrotnie na myszkach. Wirus krowianki izolowano ze szczepionki otrzymanej z Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Lublinie w r. 1964. Szczep ten pasażowano w hodowli komórek Detroit 6. Szczepy wirusów przechowywano w stanie zamrożonym w temp. -20°C .

Hodowle komórek: hodowlę fibroblastów zarodka kury (FZK) otrzymywano metodą standardową po trypsynowaniu 10—11-dniowych zarodków. Hodowle fibroblastów zarodka myszy (FZM) otrzymywano metodą standardową po trypsynowaniu 10—15-dniowych płodów myszek rasy Swiss. Hodowle komórek nerki cielęcia (HKNC) otrzymywano przez trypsynowanie nerek 3—4-miesięcznych płodów bydlięcych od krów przeznaczonych na ubój. Do badań używano jednowarstwowe hodowle komórek.

Płyny do hodowli tkankowych: stosowano płyn Parkera 193 produkcji Lubelskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek z dodatkiem 10% surowicy cielęcej. Do zakażonych hodowli używano tego samego podłoża z dodatkiem 2% surowicy cielęcej.

Metodyka interferencji: jednowarstwowe hodowle komórek embrionalnych w probówkach zakażano wirusem indukującym w dawce 10^2 — 10^4LD_{50} na 1 probówkę. Zakażone hodowle inkubowano w temp. 37°C w czasie 24, 48, 72 i 96 godz. Następnie z probówek zbierano płyny i dodawano wirusa interferowanego w dawce ok. 100 TCID_{50} na probówkę. Po 48 i 72 godz. od chwili dokażenia interferencję określono metodą efektu cytopatycznego. Kontrolę stanowiły hodowle prowadzone równolegle, zakażone tylko wirusem dokażającym w dawce, która po 48—72 godz. inkubacji dawała całkowitą degenerację hodowli. Stopień interferencji określała różnica wartości degeneracji hodowli kontrolnych, zakażonych jednym wirusem, i hodowli zakażonej dwoma wirusami, wyrażona w procentach. Dla każdego badanego parametru stosowano po 4 próbówki tkanki. Procent interferencji odczytywano jako średnią z 4 probówek. Wszystkie doświadczenia powtarzano 2 lub 3 razy. Wyniki podano jako średnią z wykonanych powtórzeń.

Otrzymywanie interferonu: jednowarstwowe hodowle komórek zakażone optymalną dla danego systemu dawką wirusa KZM inkubowano w temp. 37° w ciągu 48—72 godz. Po tym czasie hodowle zamrażano w temp. -20°C . Po odmrożeniu i rozbiciu komórek *pH* zawiesiny doprowadzono 6*n* HCl do wartości 2,0 i umieszczono w temp. 4°C na 96 godz. Następnie *pH* zawiesiny doprowadzono do 7,0 *n* NaOH. Interferon wytrącano 0,5*M* octanem cynku. Po zdekantowaniu i odwirowaniu osadu przy 3900 obr. przez 20 min. osad rozpuszczono w 0,2*n* HCl i ponownie wirowano. Supernatant przenoszono do worka dializacyjnego firmy Kehe i dializowano wobec płynu fizjologicznego 48 godz., zmieniając płyn 2-krotnie. Dializę prowadzono następnie w obecności 0,15*M* buforu fosforanowego o *pH* 6,0 w ciągu 24 godz. Preparat przenoszono do jałowego naczynia i dodawano antybiotyków w ilości 200j/ml. Preparat przechowywano w temp. 4°C ok. 1 miesiąca.

Określenie aktywności biologicznej If: sporządzano kolejne, 2-krotne rozcieńczenia preparatu w płynie fizjologicznym. Do każdej próbówki z hodowlą komórek dodawano po 0,1 ml odpowiedniego rozcieńczenia preparatu i inkubowano hodowlę w temp. 37°C przez 2 godz. Do hodowli dodawano następnie 2 ml płynu utrzymującego i inkubowano w temp. 37°C przez całą noc. Płyn z hodowli usuwano, komórki przemywano świeżym płynem utrzymującym i zakażano wirusem dokażającym. Po 48 godz. inkubacji w temp. 37°C odczytywano zahamowanie wystąpienia efektu cytopatycznego (CPE). Procent aktywności biologicznej If odczytywano analogicznie jak interferencję. Kontrolę stanowiła hodowla prowadzona równolegle, do której zamiast If dodawano taką samą ilość płynu fizjologicznego. Aktywność biologiczną If badano w komórkach homologicznych i heterologicznych.

WYNIKI BADAŃ

Badano właściwości interferencyjne wirusa KZM w poszczególnych hodowlach komórek embrjonalnych, określając kinetykę interferencji w zależności od dawki wirusa indukującego i czasu dokożania hodowli wirusem *Vaccinia*. Stwierdzono, że najwyższą aktywność interferencyjną wykazuje wirus KZM w stosunku do wirusa *Vaccinia* w hodowli fibroblastów zarodka kury. W systemie tym otrzymano 65% ochrony tkanki. W pozostałych tkankach interferencja była niższa. W hodowli komórek nerki płodu krowy wynosiła 27%, a w hodowli fibroblastów zarodka myszy tylko 18% (tab. 1).

Tab. 1. Aktywność interferencyjna wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w hodowli komórek embrjonalnych
Interference activity of tick-borne encephalitis virus in embryo cells culture

Dawka wirusowa Virus dose	Procent interferencji						Percentage of interference					
	po 24 godz. after 24 hrs			po 48 godz. after 48 hrs			po 72 godz. after 72 hrs			po 96 godz. after 96 hrs		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
10 ⁴ LD ₅₀	2,8	1,7	34,7	5,1	8,8	48,4	7,2	0	64,5	2,1	0	53,7
10 ⁵ LD ₅₀	4,1	11,6	31,4	12,4	15,7	42,8	18,7	0	55,0	8,3	0	44,0
10 ⁶ LD ₅₀	4,1	15,5	28,2	8,3	16,4	35,0	10,3	0	45,0	3,1	0	41,5
10 ⁷ LD ₅₀	2,8	20,1	22,2	3,1	27,0	24,3	5,2	5,3	40,0	1	3,5	32,7
Kontrola Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

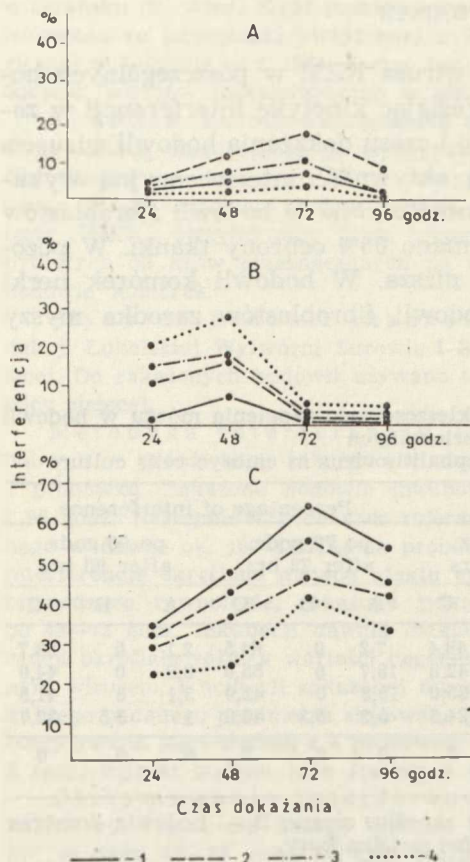
Oznaczenia: A — hodowla fibroblastów zarodka myszy, B — hodowla komórek nerki płodu krowy, C — hodowla fibroblastów zarodka kury.

Denotations: A — mouse embryo fibroblasts culture, B — cow embryo kidney cells culture, C — chick embryo fibroblasts culture.

Maksymalna interferencja występowała po upływie określonego czasu między podaniem wirusa indukcyjnego i wirusa interferowanego, a mianowicie po 48 godz. dla hodowli komórek nerki płodu krowy, a po 72 godz. dla fibroblastów zarodka kury i hodowli komórek zarodka myszy (ryc. 1).

Do stymulacji maksymalnej interferencji potrzebna jest pewna określona dawka ciałek elementarnych wirusa KZM (4). Dawka ta, jak wykazano, nie jest jednakowa dla wszystkich badanych tkanek. Maksymalną interferencję w hodowli FZM i FZK można wywołać przy zastosowaniu niewielkich dawek wirusa KZM (10⁴—10⁵LD₅₀). Natomiast do wywołania interferencji maksymalnej w HKNC potrzebna jest wyższa dawka wirusa indukującego, tj. 10⁷LD₅₀ (tab. 1).

Znaczne różnice indukcji interferencji w poszczególnych hodowlach komórek embrjonalnych w zależności od dawki wirusa KZM mogą być związane z różną zdolnością adsorpcji wirusa do poszczególnych komórek.



Ryc. 1. Kinetyka aktywności interferencyjnej wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w hodowlach komórek embrjonalnych: A — zarodka myszy, B — nerki płodu krowy, C — zarodka kury; dawki wirusa: 1— $10^4 LD_{50}$, 2— $10^5 LD_{50}$, 3— $10^6 LD_{50}$, 4— $10^7 LD_{50}$.

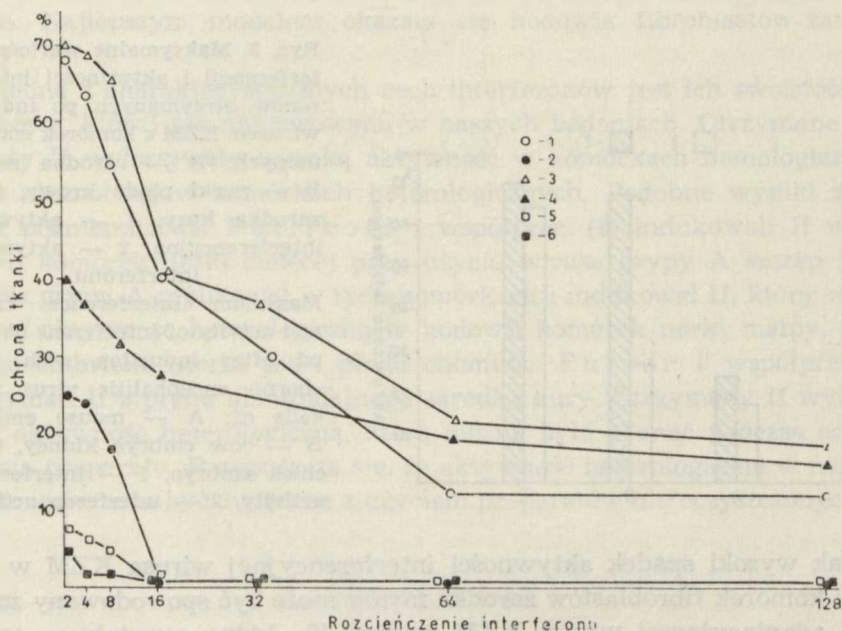
Kinetics of interference activity of tick-borne encephalitis virus in cell cultures of: A — mouse embryo, B — cow embryo kidney, C — chick embryo; virus doses: 1— $10^4 LD_{50}$, 2— $10^5 LD_{50}$, 3— $10^6 LD_{50}$, 4— $10^7 LD_{50}$.

Przy zastosowaniu optymalnych warunków interferencji, ustalonych w pierwszej części doświadczeń, substancję interferonopodobną indukowano wirusem KZM we wszystkich badanych hodowlach komórek embrjonalnych. Stwierdzono, że otrzymane preparaty były stabilne w $pH=2,0$, nie dializowały, nie traciły aktywności podczas ogrzewania w temp. $56^{\circ}C$ przez 30 min. Były odporne na działanie RN-azy, nie działały na wirusa pozakomórkowo. Po działaniu trypsyną były jeszcze w dalszym ciągu częściowo aktywne (tab. 2).

Aktywność biologiczną otrzymanych preparatów badano na tkance homologicznej i heterologicznej (ryc. 2), przy czym największą (70%) wykazywały preparaty substancji interferonopodobnej otrzymane z hodowli FZK. Aktywność If otrzymanego z komórek nerki płodu krowy była nieco niższa (68%), zaś If z hodowli komórek zarodka myszy — najniższa (8,9%). Aktywność otrzymanych preparatów badana w hodowlach heterologicznych była znacznie niższa (ryc. 2) niż w hodowlach homologicznych.

Tab. 2. Właściwości interferonów otrzymanych po indukcji wirusem kleszczowego zapalenia mózgu z hodowli komórek embrjonalnych
Activity of interferons obtained after induction with tick-borne encephalitis virus in embryo cell culture

Źródło If Source of interferon	Procent interferencji Percentage of interference		
	Komórki nerki płodu krwi Cow embryo kidney cells	Fibroblasty zarodka myszy Mouse embryo fibroblasts	Fibroblasty zarodka kury Chick embryo fibroblasts
Kontrola Control	68	8,9	70
56°/30 min. trypsyna (trypsin)	64	0	68
RN-aza (RN-ase)	10	0	10
pH — 2	67	8	70
	68	8	70

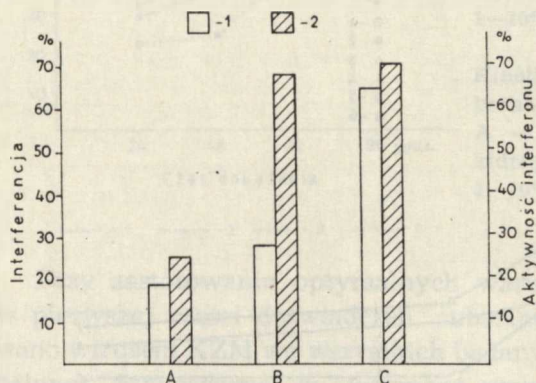


Ryc. 2. Aktywność interferonu otrzymanego w hodowli komórek embrjonalnych: 1 — nerki płodu krwi, badana w hodowli komórek homologicznych, 2 — badana na tkance heterologicznej, 3 — zarodka kury, badana w hodowli komórek homologicznych, 4 — badana na tkance heterologicznej, 5 — z komórek zarodka myszy, badana na tkance homologicznej, 6 — badana na tkance heterologicznej
Activity of interferon obtained in cell culture: 1 — of cow embryo kidney, examined in homological cell culture, 2 — examined on heterological tissue, 3 — of chick embryo, examined on homological cell culture, 4 — examined on heterological tissue, 5 — from mouse embryo cells, examined on homological tissue, 6 — examined on heterological tissue

DYSKUSJA

Szczep K₅ wirusa KZM interferuje z wirusami *Vaccinia* we wszystkich badanych hodowlach komórek embrjonalnych, ale stopień interferencji w poszczególnych systemach wykazuje znaczne różnice. Porównując przydatność badanych komórek embrjonalnych do produkcji interferonu zauważa się znaczne różnice we wrażliwości poszczególnych hodowli komórkowych na ten sam induktor wirusowy. Optymalne dawki wirusa indukującego interferencję i czas dokażania okazały się różne dla poszczególnych badanych hodowli komórek embrjonalnych. Wartości uzyskanej interferencji wahały się w szerokich granicach i były zależne głównie od rodzaju stosowanej hodowli.

W hodowli fibroblastów zarodka myszy otrzymywano najniższy procent interferencji. Interferon otrzymany z tej hodowli wykazał także najniższą aktywność (ryc. 3).



Ryc. 3. Maksymalne wartości interferencji i aktywności interferonów otrzymanych po indukcji wirusem KZM z komórek embrjonalnych: A — zarodka myszy, B — nerki płodu krowy, C — zarodka kury, 1 — aktywność interferencyjna, 2 — aktywność interferonu

Maximum interference values and activity of interferons obtained after induction with tick-borne encephalitis virus from cells of: A — mouse embryo, B — cow embryo kidney, C — chick embryo, 1 — interference activity, 2 — interferon activity

Tak wysoki spadek aktywności interferencyjnej wirusa KZM w hodowli komórek fibroblastów zarodka myszy może być spowodowany zmianami adaptacyjnymi wirusa KZM szczepu K₅, które powstały w czasie kilkuletnich pasaży na myszkach. We wcześniejszych badaniach *in vitro* wykazano bowiem, że w miarę kolejnych pasaży właściwości interferencyjne wirusa KZM ulegają osłabieniu (4).

Hodowle komórek nerki cielęcia oraz komórek nerki płodów bydlęcych były często używane do produkcji If (3). Polikoff i współprac. (9) indukowali interferon w hodowli komórek nerki cielęcia oraz w hodowli komórek płodów bydlęcych przy użyciu wirusa grypy A₂ MEL. Wirus grypy słabo replikował w tych komórkach, ale indukował interferon.

W doświadczeniach przedstawionych w tej pracy wirus KZM indukował w hodowli komórek nerki cielęcia interferencję i stymulował produkcję If o wysokiej aktywności biologicznej.

Fibroblasty zarodka kury były używane przez wielu badaczy do indukowania interferencji (1, 7) oraz stymulowania produkcji If (8, 10, 11). Przyczyną popularności tej tkanki jest łatwość zakładania hodowli oraz pozytywne wyniki otrzymane dla wielu układów. Wyniki wyżej przedstawione są zgodne z uzyskanymi przez innych badaczy. W hodowli FZK otrzymano interferon o wysokiej aktywności biologicznej także w stosowanych w naszym laboratorium warunkach. Ponieważ zdolność komórek do reakcji na induktor wirusowy zależna jest od genu (lub genów) komórki gospodarza, nie było niespodzianką, że badane hodowle komórek zareagowały różnie na ten sam induktor wirusowy. Potwierdza to zdolność wirusa KZM do indukowania interferencji i twórczenia interferonu przez wirus KZM we wszystkich przebadanych hodowliach komórek embrionalnych. Najlepszym modelem okazała się hodowla fibroblastów zarodka kury.

Jedną z charakterystycznych cech interferonów jest ich swoistość gatunkowa, której nie obserwowano w naszych badaniach. Otrzymane preparaty If wykazywały wysoką aktywność w komórkach homologicznych oraz nieznaczną w komórkach heterologicznych. Podobne wyniki znane są z piśmiennictwa. Pollikoff i współprac. (9) indukowali If w hodowli komórek nerki cielęcej przy użyciu wirusa grypy A szczep MEL. Wirus grypy A replikował w tych komórkach i indukował If, który wykazywał aktywność heterologiczną w hodowli komórek nerki małpy, ludzkiego embrionu, nerki psa i płodu chomika. Furier i współprac. (2) otrzymali If z płynu alantoidalnego zarodka kury. Otrzymany If wykazywał aktywność heterologiczną, którą można było usunąć podczas oczyszczania preparatu. Przypuszcza się, że aktywność heterologiczna w naszych badaniach może być związana z użyciem preparatów nie oczyszczonych (6).

PIŚMIENNICTWO

1. Bektemirow T. A.: Interference between *Vaccinia* and *Variola* Viruses in Chick Embryos. *Acta Virol.* 9, 546—550 (1965).
2. Furier N. M., Pokidowa N. B., Ermoljewa B. B.: Połączenie, oczyszczanie i eksperymentalno-kliniczne izuczenie interfierona w SSSR. *Antibiotiki* 11, 1027—1033 (1967).
3. Ho M.: *The Production of Interferons*. Interferons, North Holland Publ. Co. Amsterdam 1966.
4. Kawecki Z., Sujak I.: Badania nad interferencyjnymi właściwościami wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w miarę adaptacji do hodowli tkankowej. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C* 26, 21—25 (1971).

5. Lachmajer J., Wegner Z., Kawecki Z.: Spontaneous Infection of Ticks *Ixodes Ricinus* with the Virus of Tick Encephalitis in the Coast District. *Biull. I.M.M.* **8**, 173—182 (1957).
6. Lockart R. Z.: Biological Properties of Interferons; Criteria for Acceptance of a Viral Inhibitor as an Interferon. *Interferons*, North-Holland Publ. Co. Amsterdam 1966, 1—20.
7. Markovits P.: Interférence et production d'interféron dans des cellules de poulet infectées par les adénovirus 4, 7, 8 et 18. *Ann. Inst. Pasteur* **118**, 832—838 (1970).
8. Ohno S., Nozina T.: Mode of Action of Interferon on the Early Stage of *Vaccinia* Virus Multiplication in Chick Embryo Fibroblasts. *Acta Virol.* **10**, 310—314 (1966).
9. Pollikoff R., Danikien M. A., Padron A., Liu O. C.: Tissue Specificity of Interferon Prepared in Various Cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **110**, 232—234 (1962).
10. Sheaf E T., Stewart R. B.: Interaction of Interferon with Cells; The Relationship of Cell-Associated Interferon and Antiviral Activity. *Can. J. Microb.* **16**, 1303—1310 (1970).
11. Wilnier L. i współprac.: Izuczenije usłowij obrazowanija intierfierona pri arbowirusnyh infekcyjach kultury kletok kurnych embrionow. *Antibiotiki* **12**, 1093—1098 (1967).
12. Vilcek J.: *Interferon*. *Virology Monographs* 6. Ed. S. Gard, C. Hallauer, K.T. Meyer, Springer-Verlag, Wien—New York 1969.

РЕЗЮМЕ

Штамм K_5 клещевого энцефалита (воспаления мозга) вызывает *in vitro* интерференцию и образование интерферона в эмбриональных культурах клеток мышцей, в клеточных культурах куриного эмбриона и культуре эмбриональной телячьей почки. Максимальная интерференция и наиболее активный интерферон были получены в культурах клеток куриного эмбриона.

SUMMARY

Tick-borne encephalitis virus, strain K_5 , induced *in vitro* the interference and production of interferon in cells of chick embryo, mouse embryo and calf kidney.

Maximum interference and the most active interferon were obtained from chick embryo cell cultures.