

PRAKTYKA LABORATORYJNA

KONRAD MALICKI, JERZY WIŚNIEWSKI, ANNA ŁADYŃSKA,
ANNA CHMIELEWSKA, MARCIN W. BANBURA

Namnażanie komórek i wirusów metodą rotacyjną w butelkach do plazmy

Zakład Wirusologii Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa
Pracownia Kontroli Szczepionki Zakładu Badania Pryszczycy Instytutu Weterynarii
Warszawa

Wysoki stopień wykorzystywania wewnętrznej powierzchni naczyń używanych w rotacyjnej metodzie namnażania komórek i wirusów przesądził o powszechnym stosowaniu tej metody w badaniach naukowych i produkcji wielu biopreparatów, wymagających użycia znacznych ilości wirusowego antygeny. Pierwowzorem okrągłościennych naczyń hodowlanych była niewątpliwie probówka zastosowana w rotacyjnej metodzie hodowli tkanek (roll tubes tissue culture) (2) lub we wcześniejszych jeszcze próbach (3, 7). Naczynia hodowlane obecnie stosowane w metodzie rotacyjnej to okrągłościenne butle o pojemności od kilkuset ml do kilkunastu litrów, obracane różnego typu i wielkości rotorami lub rolerami, okresowo wstawianymi do ciepłarek lub termostatowych pomieszczeń względnie stanowiącymi stałe wyposażenie szafowych inkubatorów, czy hal termostatowych.

Wielokrotne zwiększenie wewnętrznej powierzchni naczyń jest także możliwe w stacjonarnej metodzie hodowli komórek przez zastosowanie mikronośnika (microcarrier) (12, 13), specjalnych wkładek (4) lub umieszczenie szklanych perełek w naczyniach (10). Mikronośniki produkowane przez określone firmy, np. „Cytodex” Pharmacia Fine Chemicals (Szwecja), „Biosilon” A/S Nunc (Dania), znalazły zastosowanie do namnażania na wielką skalę zwierzęcych komórek i do produkcji szczepionek (14). Wobec znanych trudności w uzyskiwaniu dla pracowni wirusologicznych aparaturowego i materiałowego wyposażenia z importu (6), podjęto poszukiwanie prostych, ale skutecznych metod namnażania komórek i uzyskiwania wysokiego plonu wirusa, przy zastosowaniu wyposażenia dostępnego na krajowym rynku.

Wykonane próby polegały na:

- wykorzystaniu butelek do plazmy w rotacyjnej metodzie namnażania komórek i wirusów, a to ze względu na dobrą jakość szkła i nietoksyczność gumowych kapsli zabezpieczających metalową nakrętką,
- przystosowaniu do tego celu rotora lub rolery dostępnego na krajowym rynku lub uzyskaniu takiego we własnym zakresie,
- przeprowadzeniu oceny efektywności namnażania komórek i wirusów metodą rotacyj-

ną w butelkach do plazmy (w warunkach zaadaptowanego wyposażenia), w porównaniu z metodą stacjonarną w zwykłych butelkach Roux, zawierających jedną warstwę szklanych perełek i z metodą rotacyjną w butelkach do plazmy 250 ml wypełnionych szklanymi perełkami. Badania miały charakter modelowy i były przeprowadzone na wybranej, ustalonej linii komórkowej, z celowym użyciem dwóch wirusów, należących do różnych rodzin. Przyjęto, że miernikiem efektywności metody i sposobu namnażania komórek w porównywanych hodowlach, założonych z jednakowej objętości zawiesiny komórek, będzie stopień gęstości hodowli i ogólny plon komórek uzyskany w danym naczyniu po jednakowym czasie inkubacji, a miernikiem efektywności namnażania wirusów będzie miano wirusa w porównywanych hodowlach komórek, uzyskiwane w jednakowym czasie po zastosowaniu jednakowej dawki zakażającej. Morfologiczne i cytochemiczne obserwacje porównawcze komórek namnożonych metodami stacjonarną i rotacyjną, przedstawiono w oddzielnej publikacji (10).

Materiał i metody

Linia komórek. Do modelowych badań użyto ustalonej linii komórek nerki świni IB-RS-2 (1). Po wyjęciu z ciekłego azotu komórki IB-RS-2 namnażano przez 4–5 pasaży metodą stacjonarną, w sposób rutynowy, przy zastosowaniu płynów i podłoży dostarczanych przez Wytwórnę Surowic i Szczepionek w Lublinie. Jako podłoże namnażające stosowano podłoże Eagle'a 1959 (MEM) 90% i surowicę cielęcą 10% z dodatkiem antybiotyków. Podłoże utrzymujące zawierało te same składniki, ale tylko 1% surowicy cielęcej.

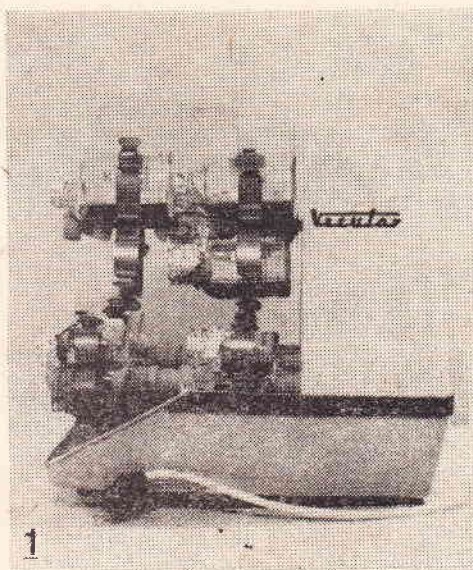
Sposoby hodowli. Po uzyskaniu dostatecznej liczby subkultur zapewniających odpowiednią masę potomnych komórek do wykonania pełnego doświadczenia hodowle, trypsynizowano w sposób rutynowy przy użyciu 0,25% trypsyny (PBS-T), sporządzano zawiesinę o gęstości około 3×10^5 komórek/ml podłoża namnażającego i rozdzielano ją po 100 ml do:

- zwykłych butelek Roux 1000 ml, ustawianych w ciepłarce CWE-2 (I),
- butelek Roux 1000 ml, zawierających jedną warstwę szklanych perełek o średnicy 8–9 mm, wstawianych do ciepłarki CWE-2 (II),
- butelek do plazmy 500 ml, układanych na rolery w ciepłarce CWE-2 (III),
- butelek do plazmy 500 ml, wstawianych w uchwytu Virutora (IV),
- butelek do plazmy 250 ml, całkowicie wypełnionych szklanymi perełkami o średnicy 8–9 mm, wstawianych w uchwytu Virutora (V).

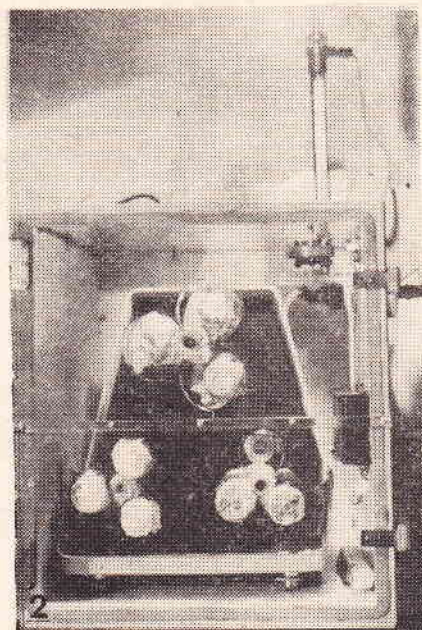
Każdorazowo sporządzano co najmniej 3 komplety porównywalnych hodowli komórek. Butelki do plazmy zamykano oryginalnymi gumowymi kapslami z metalową nakrętką. Wszystkie hodowle komórek inkubowano w temp. 37°C przez jednakowy okres.

Charakterystyka aparatów

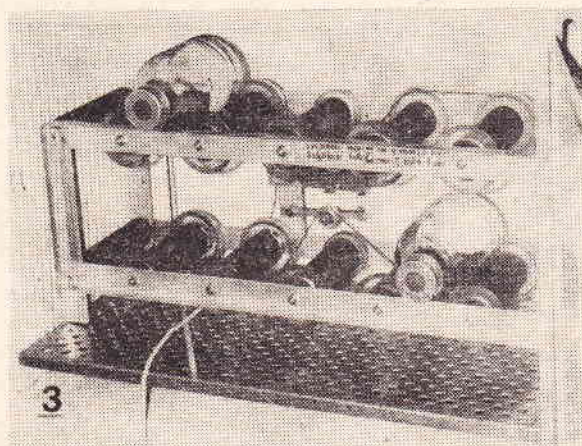
a) Rotor. Zastosowano „Virutor” typ Labor 3981/01, produkcji WRL, dający 14 obrotów na godzinę, dostępny na rynku krajowym w połowie lat siedemdziesiątych. Rotor przystosowano do butelek do plazmy przez wykonanie specjalnych, wymiennych statywów z uchwytami, pozwalającymi na łatwe i szybkie umocowywanie butelek do plazmy o pojemności 500 ml, 250 ml i 100 ml, ryc. 1. Virutor umieszczono w specjalnej, izotermicznej komorze z termoregulatorem kontaktowym i wiatraczkiem stale wymuszającym konwekcję powietrza w komorze, co zapewniało równomierną temperaturę 37°C, z dokładnością do $\pm 0,5^\circ\text{C}$, ryc. 2. Statywy z uchwytami i komorę skonstruował na zamówienie technik Alfred Gronecki z Zakładu Aparatury SGGW-AR.



Ryc. 1. Virutor wyposażony w statywy do umocowania różnej pojemności butelek do plazmy, widok z boku



Ryc. 2. Virutor umieszczony we własnej komorze izotermicznej, wykonanej przez techn. A. Groneckiego



Ryc. 3. Roler wykonany przez inż. K. Łukasiewicza, model na 12 butelek do plazmy 500 ml, umieszczony w komorze ciepłarki CWE-2

b) Roler. Wykorzystano urządzenie inż. Kazimierza Łukasiewicza z Wytwórni Surowic i Szczepionek w Warszawie, wykonane na zamówienie. Pod względem wymiarów roler był dostosowany do umieszczenia w komorze ciepłarki CWE-2, ryc. 3. Roler pozwalała na poruszanie od 1 do 12 butelek plazmy o pojemności 500 ml, z szybkością 7,5 obrotów na godzinę. Urządzenie było niezawodne i proste w obsłudze.

Obserwacje mikroskopowe. Hodowle komórek namnożonych metodą stacjonarną i rotacyjną obserwowano przy użyciu mikroskopów odwróconych MOD-2 PZO lub Televal Zeissa. Oceniano prawidłowość rozwoju hodowli, stopień pokrycia komórkami powierzchni naczyń oraz morfologię komórek przed zakażeniem wirusa i po zakażeniu, dla oceny stopnia nasilenia efektu cytopatycznego (CPE).

Określanie plonu komórek. Hodowle komórek uznawano za dostatecznie wyrosnięte, gdy w jednym z porównywalnych sposobów namnażania komórek uzyskiwano 90–100% pokrycia powierzchni naczynia warstwą komórek. Po jednej butelce każdego sposobu hodowli komórek przeznaczano do określenia plonu. Hodowle przepłukiwano krótko PBS-T, dodawano nową porcję 10 ml PBS-T na butelkę (do butelek z pepekami 50 ml PBS-T) i wstawiano do ciepłarki. Po

odklejeniu komórek, zawiesiny zbierano do oddzielnych probówek wirówkowych i wirowano przez 10 min. przy 1000 obr./min. Osady komórek zawieszano w oddzielnych 10 ml porcjach buforowego roztworu fizjologicznego (PBS) i liczone komórki w komorze Bürkera, w sposób stosowany do określania gęstości zawiesiny komórek przygotowywanych do zamrożenia w ciekłym azocie (11). Rozcieńczenie wstępne 1/10 uwzględniono przy końcowym wyliczeniu komórek w 1 ml.

Szczepy wirusa. Użyto własnego szczepu pikornawirusa świń, określonego jako *Enterovirus P1/73-P*, namnażającego się dobrze w komórkach linii IB-RS-2 oraz herpeswirusa koni *Equid herpesvirus 1*, szczep RAC-H, który otrzymano od prof. dr St. Woyciechowskiej.

Mianowanie wirusów. Do określania plonu wirusów w poszczególnych sposobach hodowli komórek wykorzystywano od 2 do 4 butelek z hodowlą komórek, pozostałych po wyznaczeniu butelek do oceny plonu komórek. Porównywane hodowle zakażano jednakowymi dawkami tego samego wirusa. Namnażanie

wirusa przerywano w jednakowym czasie we wszystkich hodowlach, po osiągnięciu w jednej z porównywanych hodowli 60–100% CPE. Butelki zamrażano w temperaturze -20°C, następnie odmrażano, zbierano zawiesinę wirusa z każdej butelki do oddzielnego naczynia i mianowano metodą próbówkową w hodowli komórek IB-RS-2. Obliczano miano wirusa w CCID₅₀/ml wg metody Kärber (5), na podstawie tablic opracowanych przez Lorenza (8). Końcowy wynik podawano jako średnią logarytmiczną.

Wyniki i omówienie

Mikroskopowe obserwacje hodowli komórek linii IB-RS-2 namnażanych metodą stacjonarną w butelkach Roux i metodą rotacyjną w butelkach do plazmy wykazały, że dynamika namnażania komórek w różnych systemach i sposobach hodowli nie była tak sama. W jednakowym czasie 18, 24 i 48 h po założeniu hodowli, największą gęstość i największy stopień — 100% pokrycia powierzchni szkła jedną warstwą komórek uzyskiwano w zwykłych stacjonarnych hodowlach w butelkach Roux 1000 ml (I) i w rotacyjnych hodowlach w butelkach do plazmy 500 ml poruszalnych rolarem (III), średnią gęstość i stopień pokrycia 80–90% uzyskiwano w butelkach Roux 1000 ml z jedną warstwą perełek szklanych (II) i w rotacyjnych hodowlach w butelkach do plazmy 500 ml poruszanych Virutorem (IV), a niedostateczną gęstość hodowli i stopień pokrycia 30–40% powierzchni szkła obserwowano w hodowlach komórek inkubowanych rotacyjnie w Virutorze w butelkach do plazmy 250 ml (V), wypełnionych szklanymi perełkami (ryc. 4. A, B, C, D). Teoretycznie można było oczekiwać, że im większa wewnętrzna powierzchnia naczynia użytego do hodowli komórek, tym większe będą możliwości uzyskania wysokiego plonu komórek, a co za tym idzie wysokiego plonu namnożonego wirusa. Z przeprowadzonych pomiarów wynikało, że robocza powierzchnia wewnętrzna butelki Roux 1000 ml, używanej zwykłej stacjonarnej meto-

dzie (I) wynosi 162 cm² (100%). Robocza powierzchnia wewnętrzna butelki do plazmy 500 ml, zastosowanej w warunkach rotacyjnej metody (III i IV) wynosi 280 cm² (173%) a robocza, wewnątrz powierzchnia samych tylko ścian butelki do plazmy 250 ml użytej ze szklanymi perełkami w rotacyjnej metodzie (V) — wynosi 252 cm² (156%). W tym ostatnim sposobie hodowli komórek i w butelkach Roux 1000 ml z jedną warstwą szklanych perełek (II) robocza powierzchnia jest w rzeczywistości kilka lub kilkakrotnie większa, a to ze względu na dużą powierzchnię tworzoną przez szklane perełki.

Tab. 1. Porównywane metody i sposoby namnażania komórek linii IB-RS-2 oraz uzyskiwane plony komórek

Oznaczenie sposobu hodowli	Metoda	Sposób hodowli	Liczba (log*) komórek w ml zawiesziny uzyskanej po trypsynizacji hodowli
I	stacjonarna	butelki Roux	6,14
II		butelki Roux z jedną warstwą szklanych perełek	6,24
III	rotacyjna	butelki do plazmy 500 ml - rolery	6,21
IV		butelki do plazmy 500 ml - Virutor	6,02
V		butelki do plazmy 250 ml wypełnione szklanymi perełkami - Virutor	5,90

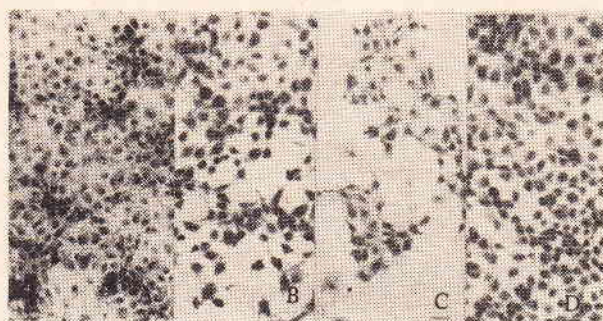
Objaśnienie: * — średnie geometryczne wartości z trzech doświadczeń pierwszej serii.

Tab. 2. Miana modelowych wirusów uzyskiwane w hodowli komórek linii IB-RS-2 metodą stacjonarną w butelkach Roux i metodą rotacyjną w butelkach do plazmy

Oznaczenie sposobu hodowli	Liczba (log**) komórek w ml zawiesziny po trypsynizacji hodowli	Enterowirus PL/72-P log CCID ₅₀ /ml		Herpeswirus RAC-H log CCID ₅₀ /ml	
		dawka zakazająca na butelkę	uzyskane miano**	dawka zakazająca na butelkę	uzyskane miano**
I	6,33		7,48		6,44
II	6,45		8,00		6,50
III	6,39	6,0	7,80	5,60	6,50
IV	6,20		7,09		6,22
V	5,95		7,10		5,99

Objaśnienia: Oznaczenie sposobu hodowli jak w tab. 1. rubryka 3; ** — średnie geometryczne wartości z 3–5 doświadczeń drugiej serii.

Wykonane badania nie potwierdziły teoretycznych założeń. Wyniki zebrane w tab. 1 i tab 2. wskazują, że plony komórek i modelowych wirusów, uzyskiwane w rotacyjnej metodzie nie są proporcjonalne do wielkości roboczej powierzchni naczyń, w porównaniu ze zwykłą stacjonarną metodą namnażania komórek i wirusów w butelkach Roux 1000 ml (I) oraz metodą stacjonarną zmodyfikowaną przez dodanie do butelek jednej warstwy szklanych perełek (II). Porównanie plonów komórek i wirusów, uzyskiwanych przy namnażaniu metodą rotacyjną w butelkach do plazmy 500 ml, poruszanych rolarem inż. Łukasiewiczza (III) i poruszanych Virutorem (IV) wykazało przewagę tego pierwszego sposobu. Istotnym czynnikiem była mniejsza liczba obrotów na godzinę, wykonywanych przez butelki umieszczone na wałach rolera. Ponieważ namnażanie komórek i wirusów metodą w butelkach do plazmy 500 ml, poruszanych role-



Ryc. 4. Gęstość hodowli komórek linii IB-RS-2 w 48 h po założeniu; powiększenie mikroskopowe ok. 63x: A — stacjonarna metoda, butelka Roux 1000 ml (I), B — rotacyjna metoda, butelka do plazmy 500 ml, inkubacja w Virutorze (IV), C — rotacyjna metoda, butelka do plazmy 250 ml, wypełniona szklanymi perełkami, inkubacja w Virutorze (V), D — rotacyjna metoda, butelka do plazmy 500 ml, inkubacja na rolarze (III)

rem (III) dawało lepsze wyniki niż stacjonarna metoda w butelkach Roux 1000 ml (I), można pozytywnie ocenić przydatność butelek do plazmy dla celów wirusologicznych. Warto podkreślić, że stacjonarną metodą w butelkach Roux 1000 ml, zawierających jedną warstwę szklanych perełek o średnicy 7—8 mm (II), uzyskiwano w porównywalnych warunkach lepsze plony komórek i wirusów, niż w różnych sposobach rotacyjnej metody (III, IV, V). Wyniki liczbowe obrazujące uzyskiwane plony, np. namnażanych komórek, nie mają wartości bezwzględnych. Mogą one w znacznym stopniu zależeć od biologicznej aktywności różnych wersji linii komórkowej, oddzielnie wyprowadzonych z banku komórek w ciekłym azocie, liczby wykonanych pasażów, a także od okresowych wahań w dynamice namnażania, nierzadko obserwowanych z bliżej nieokreślonych przyczyn w hodowlach komórek. Można w ten sposób wyjaśnić różnice plonów komórek, uzyskiwanych w doświadczeniach pierwszej i drugiej serii, wykonywanych w różnym czasie, tab. 1 rubr. 4 i tab. 2 rubr. 2.

Wnioski

1 Butelki do plazmy 500 ml mogą być z powodzeniem wykorzystywane do rotacyjnej metody namnażania komórek i wirusów.

2. Rotacja naczyń z hodowlą komórek z szybkością 7,5 obr./h jest korzystniejsza niż rotacja z szybkością 14 obr./h.

3. Użycie szklanych perełek o średnicy 8—9 mm do zwiększania wewnętrznej, roboczej powierzchni hodowlanych naczyń w rytunowej hodowli komórek, daje lepsze efekty w postaci jednej warstwy na dnie butelek Roux w stacjonarnej metodzie, niż całkowite wypełnienie perełkami butelek używanych w metodzie rotacyjnej.

Piśmiennictwo

1. de Castro M.: Arq. Inst. Biol., S. Paulo 31, 63, 1964.
2. Feller A., Enders J., Weller T.: J. exp. Med. 72, 367, 1940.
3. Gey G.: Am. J. Cancer 17, 752, 1933.
4. van Hemert P.: Biotechnol. Bioeng. 6, 381, 1964.
5. Kärber G.: Naunyn — Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 162, 480, 1931.
6. Larski Z.: Medycyna Wet. 34, 193, 1978.
7. Lewis W.: Carnegie Inst. Washington Publ. 459. Contrib. Embryol. 25, 161, 1935.
8. Lorenz R. J.: Tabellen zur näherungsweise Bestimmung von Infektositäts- und Neutralisationstiter sowie der zugehörigen mittleren Fehler nach dem Verfahren von Kärber. Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen a. N. 1960.
9. Malicki K., Bańbura M. N., Skorupka T.: Biul. V Zjazdu PTNW. Olsztyn 425, 1974.
10. Malicki K., Malicka E., Katkiewicz M.: Medycyna Wet. — w druku.
11. Niemiłtowski M.: Medycyna Wet. 34, 570, 1978.
12. van Wezel A.: Nature 216, 64, 1967.
13. van Wezel A.: Methods and application of tissue culture. P. Kruze i M. Patterson. Academic Press, New York, 1973.
14. van Wezel A., van der Velden de Groot C.: Process. Biochem., March 6, 1978.

Adres autora: prof. dr Konrad Malicki, ul. J. Bruna 14 m. 20, 02-594 Warszawa.

Z HISTORII WETERYNARII

KORNEL RATAJCZAK

Rodowód Wrocławskiej Kliniki Chirurgicznej — — w 100-lecie założenia Akademii Medycyny Weterynaryjnej we Lwowie

Klinika Chirurgiczna Wydziału Weterynaryjnego AR, Pl. Grunwaldzki 51, 50-366 Wrocław

Obserwuje się obecnie powszechny wzrost zainteresowania ludzi własnym rodowodem, ustalaniem genealogii rodzinnej. Ta sama idea wydaje się ze wszech miar słuszną także w odniesieniu do historii specjalności zawodowych i losów ludzi, których działalność składa się na ich rozwój. Roman Bratkowski w swej książce pt. „Skąd przychodzimy” napisał: „...jeśli mamy rosnąć wyżej ustalmy najpierw kim jesteśmy, bo jakże możemy dążyć dalej z niewiedzą o samym sobie”. Powyższe słowa można uznać za motto tej publikacji, która jest próbą krótkiego przedstawienia najważniejszych faktów z przeszłości Katedry Chirurgii i Zakładu Chorób Kończyn we Lwowie, protoplastów dzisiejszej Wrocławskiej Kliniki Chirurgicznej. Potrzeba zajęcia się tym tematem wynika również z dwóch faktów spinających 100-letnią kłamrą dzieje naszego zakładu naukowego, a mianowicie: rocznicy założenia Szkoły Weterynaryjnej we Lwowie w 1881 r. i oddania do użytku w 1980 r. nowego gmachu Wrocławskiej Chirurgii Weterynaryjnej.

Historia Kliniki zaczęła się 15 września 1881 r., kiedy to „Najjaśniejszy Pan, Jego C. K. Apostolska

Mość raczył najwyższym swym dekretem zamianować dyrektora i dwóch profesorów zwyczajnych dla nowokreowanej Szkoły Weterynarii we Lwowie” (cyt. 8). Wydarzenie to poprzedziło ponad 70 lat starań, petycji i memoriałów kierowanych przez polskie środowisko we Lwowie do rządu austriackiego. W pierwszym okresie czas nauki w Szkole wynosił 3 lata. Dopiero po roku 1896 zaczęto przy przyjęciu wymagać od kandydatów świadectwa maturalnego, a studia przedłużono do lat 4. W tym też czasie uczelni nadano nazwę Akademii, którą od tej pory kierował Rektor. Początkowo, ze względu na szczupłość kadry pedagogicznej, profesorowie wykładali po kilka przedmiotów. Dla prowadzenia pozazawodowych, czysto przyrodniczych przedmiotów, przewidziano 3 etaty docentów. Ponadto do pracy dydaktycznej zaangażowany był 1 adiunkt i 2 asystentów. Zarządca ekonomiczny posiadał do pomocy jednego urzędnika kancelaryjnego, woźnego, odźwiernego i 3 służących.

Szkoła Lwowska była nie tylko ośrodkiem nauczania, z którego korzystali Polacy z trzech zaborów, lecz również stanowiła centrum kształcenia integrujące wiele narodowości słowiańskich. W pierw-