

Mając za sobą wszystkie czynności przygotowawcze, można przystąpić teraz do właściwego procesu chromatografii jonowymiennej biopolimerów. Metodyce tego procesu poświęcona zostanie cz. II artykułu.

Piśmiennictwo

1. DEAE-Sephacel, beaded cellulose ion exchanger, Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1977.
2. DEAE-Sephacel CL-6B, CM-Sephacel CL-6B for ion exchange chromatography. Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1976.
3. Hill E.: Laboratory Products Revs. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1978.
4. Huisman T. H., Dozy A. M.: J. Chromatogr. 19, 160, 1965.
5. Ion exchange chromatography. Principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1980.
6. Male C.: Methods Med. Res. 12, 221, 1970.
7. Morris C. J., Morris P.: Separation Methods in Biochemistry. Wiley-Interscience, New York, 1964.
8. Peterson E., Sober H. A.: J. Am. Chem. Soc. 78, 751, 1956.
9. Sephadex ion exchangers. A guide to ion exchange chromatography. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1978.

Adres autora: doc. dr hab. Janusz Wierciński, ul. Sowińskiego 8/31. 20-040 Lublin.

KONRAD MALICKI, ELŻBIETA MALICKA, MARIA KATKIEWICZ

Morfologiczne i cytochemiczne obserwacje komórek linii IB-RS-2 namnożonych metodami stacjonarną i rotacyjną

Zakład Wirusologii i Zakład Patologii Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Uzyskana przez Marię Pereria de Castro (2) w Instytucie Biologicznym w Sao Paulo ustalona linia komórek nerki świni, nazwana zgodnie z zasadami terminologii hodowli tkanek (4) linią IB-RS-2, wykazuje wielką przydatność do izolacji i seryjnego namnażania wielu wirusów. Jest ona dość powszechnie stosowana w wirusologicznych pracowniach w wielu krajach i w Polsce do wykonywania różnych rutynowych badań wirusologicznych. Duża wzrostowa aktywność linii IB-RS-2 oraz względnie proste i niedrogo podłoże wzrostowe stosowane do jej namnażania wydają się przynajmniej teoretycznie wskazywać na przydatność tej linii do produkcyjnego namnażania wirusa i wykonywania badań kontrolnych w produkcji różnych wirusowych szczepionek.

Celem pracy była porównawcza obserwacja morfologicznych i cytochemicznych właściwości komórek posiadanej linii IB-RS-2, namnożonych metodami stacjonarną i rotacyjną. Badania te były powiązane z obserwacją dynamiki namnażania komórek linii IB-RS-2 po wyjęciu z banku komórek oraz z oceną przydatności butelek do plazmy w rotacyjnej metodzie namnażania komórek, co stanowi treść oddzielnej publikacji (7).

Materiał i metody

Hodowle komórek linii IB-RS-2. Z banku komórek przechowywanych w ciekłym azocie wyjmowano ampulki zawierające zamrożoną zawiesinę komórek linii IB-RS-2 i po właściwym odrożeniu (8) komórki namnażano w temperaturze 37°C, stacjonarnie w butelkach Legroux lub butelkach Roux 1000 ml. Notowano wyniki mikroskopowych obserwacji dotyczących ogólnej morfologii komórek i szybkości rozwoju jednowarstwowej hodowli. Po 4—5 przeszczepieniach hodowli, wykonanych w stosunku 1:2, uzyskiwano w subkulturach pulę potomnych komórek wystarczającą do założenia porównywalnych hodowli i przeprowadzenia zasadniczych obserwacji. Zawiesinę o gęstości ok. 3×10^5 komórek/ml w płynie namnażającym o składzie: podłoże Eagle'a 1959 (MEM) 90%,

surowica cielęca 10%, antybiotyki (penicylina i streptomycyna) po 100 j.m./ml, sporządzano metodą rutynową i rozdzielano po 100 ml do: butelek Roux 1000 ml — hodowle stacjonarne (I), butelek do plazmy 500 ml — hodowle rotacyjne zwykłe (II) i butelek do plazmy 250 ml, ściśle wypełnionych szklanymi perełkami — hodowle rotacyjne o zwiększonej powierzchni (III). Komórki w butelkach Roux inkubowano w cieplarni CWE-2, a w butelkach do plazmy w aparacie „Virutor” zaopatrzone w specjalne uchwyty (7).

Lamelkowe preparaty. W celu uzyskania preparatów do badań morfologicznych i cytochemicznych, przed dodaniem zawiesiny komórek do naczyń hodowlanych, na ich wewnętrznej powierzchni przyczepiano kropelkami twardej parafiny od 3 do 6 szkiełek przykrywkowych, dających się później łatwo wyjąć w określonym czasie. Bezpośrednio po wyjęciu z płynu wzrostowego płukano je w buforowanym roztworze fizjologicznym (PBS) i dalsze postępowanie uzależniano od przewidywanej metody badania.

Obserwacje morfologiczne i cytochemiczne. Preparaty utrwalano w roztworach odpowiednich dla danej metody badania: w 4% buforowanej formalinie do barwienia metodą przeglądową hematoksyliną — eozyną, w płynie Carnoy'a do barwienia oranżem akrydynowym na zawartość kwasów nukleinowych metodą wg Bertalanffy'ego (1) oraz w płynie Bakera dla badania aktywności kwaśnej fosfatazy metodą wg Gomori'ego (5). Hodowle nie utrwalone poddawano badaniu aktywności dehydrogenazy kwasu bursztynowego metodą wg Nachlasa (10). W preparatach barwionych hematoksyliną — eozyną oceniano gęstość pokładu komórek i morfologię komórek, określano indeks mitotyczny (liczba mitoz na 1000 komórek, ustalana jako średnia arytmetyczna z 3 pomiarów, wykonywanych dla każdej doświadczanej grupy oddzielnie) oraz wielkość jąder komórkowych. Pomiar wielkości jąder wykonywano aparatem Mop AM 03 firmy Kontrom, bezpośrednio z filmu negatywowej błony fotograficznej, uzyskanego w mikroskopie NU-2 Zeissa. Wyniki pomiarów jąder opracowano statystycznie testem t Studenta, przy poziomie istotności 0,05 oraz 0,01. Obliczenia wykonano na mini-komputerze PDP 11/34 Digital Equipment Co. Zawartość kwasu rybonukleinowego oceniano w preparatach barwionych oranżem akrydynowym na podstawie intensywności fluorescencji w promieniach ultrafioletowych, emitowanych lampą HBO 200, w mikroskopie NU-2 Zeissa. Ocenę aktywności badanych enzymów przeprowadzano na podstawie obserwacji ziarnistego strątu, powstającego w komórkach jako produkt reakcji.

Wyniki i omówienie

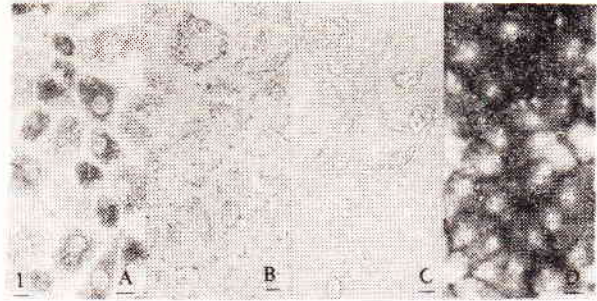
Wykonano 5 serii doświadczeń obejmujących każdorazowo 3 komplety porównywalnych hodowli (I, II, III) komórek IB-RS-2. W bezpośrednim badaniu mikroskopowym oraz w preparatach przeglądowych stwierdzono, że hodowle komórek różnią się gęstością w poszczególnych sposobach hodowli i wynikającym stąd kształtem komórek, łączących się cytoplazmatycznymi wypustkami. W stacjonarnej hodowli w butelkach Roux (I) i w rotacyjnej hodowli w butelkach do plazmy 500 ml (II) komórki rosły obficie, ściślej przylegały do siebie, niekiedy występowały wśród nich pojedyncze komórki wielojądrzaste. W cytoplazmie niektórych komórek występowały drobne wodniczki. W rotacyjnej hodowli w naczyniach 250 ml wypełnionych szklanymi perełkami (III), wzrost komórek był znacznie mniej obfity. Z reguły komórki tworzyły grupy lub wysypki ze znacznym występowaniem cytoplazmatycznych wypustek. Różnice w gęstości hodowli komórek uzyskiwanych w poszczególnych sposobach hodowli znajdowały potwierdzenie w wartościach indeksu mitotycznego, tab. 1.

Tab. 1. Wartość indeksu mitotycznego, chi-kwadrat i ocena istotności różnicy średnich z pomiarów jąder komórek linii IB-RS-2, namnażanych metodą stacjonarną (I), rotacyjną (II) i rotacyjną w butelkach do plazmy wypełnionych szklanymi perełkami (III)

Sposób hodowli	Wartość indeksu mitotycznego	Wartość chi-kwadrat	Istotność
I	50	2,692	I—II T=1,787
II	41	0,078	I—III T=0,524
III	31	0,144	II—III T=0,163

Nie stwierdzono różnic wielkości jąder komórkowych. Normalność rozkładu wyników w obrębie trzech stosowanych sposobów hodowli badano przy pomocy testu chi-kwadrat. Użytkano zgodność wyników z teoretycznym rozkładem normalnym. Do badania istotności różnic pomiędzy parami grup zastosowano test t Studenta dla zmiennych niezależnych. Wartość chi-kwadrat oraz istotność różnicy średnich pomiarów jąder w poszczególnych grupach doświadczalnych podano w tab. 2. Uzyskane wyniki wskazują na brak znamiennych różnic pomiędzy średnimi wartościami wielkości jąder komórkowych w badanych grupach (I, II, III), zarówno przy poziomie istotności 0,05 jak i przy 0,01.

Badania cytochemiczne nie wykazywały większych różnic we właściwościach komórek uzyskiwanych w poszczególnych sposobach hodowli. Zawartość RNA przedstawiała się w znacznej liczbie komórek jednakowo. W pre-



Ryc. 1. Aktywność enzymów i zawartość kwasu rybonukleinowego w komórkach linii IB-RS-2. Pow. mikroskopowe ok. 125X. A — dehydrogenaza kwasu bursztynowego w komórkach hodowli stacjonarnej (I), B — kwaśna fosfataza w komórkach hodowli rotacyjnej (II), C — zasadowa fosfataza w komórkach hodowli rotacyjnej ze szklanymi perełkami (III), D — kwas rybonukleinowy w komórkach hodowli stacjonarnej (I)

paratach otrzymanych z różnych sposobów namnażania tylko nieznaczna liczba komórek (bardziej wydłużone) wykazywały większą zawartość RNA. W komórkach uzyskiwanych w preparatach z poszczególnych sposobów hodowli nie obserwowano różnic w aktywności kwaśnej fosfatazy, zasadowej fosfatazy i dehydrogenazy kwasu bursztynowego. Wyniki badania aktywności enzymów oraz zawartości RNA podano w tab. 3.

Ustalane linie komórek pasażowane seryjnie *in vitro* mogą ulegać morfologicznej transformacji, w następstwie genetycznej zmienności, powodowanej zmianami w chromosomach lub punktową mutacją. Zmiany takie były opisy-

Tab. 2. Wyniki badania aktywności enzymów oraz zawartości RNA w komórkach linii IB-RS-2 namnażonych metodą stacjonarną (I), rotacyjną (II) i rotacyjną w butelkach do plazmy wypełnionych szklanymi perełkami (III)

Sposób hodowli	Seria	Aktywność enzymów			Zawartość RNA w cytoplazmie
		FK	FZ	SDH	
I	D ₁	++	+	+	++
	D ₂	nb	+	nb	++
	D ₃	+	+	+++	+
	D ₄	+++	+	+++	++
	D ₅	+++	+	nb	++
II	D ₁	++	+	++	++
	D ₂	++	+	nb	++
	D ₃	+	+	nb	++
	D ₄	+++	+	+++	+++
	D ₅	++	nb	+++	++
III	D ₁	+++	+	++	+++
	D ₂	++	nb	ub	+++
	D ₃	+	+	+++	+++
	D ₄	++	+	+++	+++
	D ₅	++	+	+	+++

Objaśnienia: FK — fosfataza kwaśna; FZ — fosfataza zasadowa; SDH — dehydrogenaza kwasu bursztynowego; + — słaba aktywność; ++ — umiarkowana aktywność; +++ — znaczna aktywność; nb — nie badano.

wane także w ustalonych liniach komórek nerki świni, np. dość często występowały w komórkach linii PK (9). Zjawiska klonalnej zmienności, odnoszące się do morfologii komórek, ich kariotypu i wrażliwości na określony wirus były opisywane w komórkach linii IB-RS-2 (3). W opisywanych przez nas sposobach namnażania komórek linii IB-RS-2 nie obserwowano przejawów genetycznej zmienności.

Wnioski

1. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji morfologicznych i cytochemicznych wydaje się, że zastosowany w badaniach sposób namnażania komórek w niewielkiej liczbie pasaży po wyjęciu z banku komórek, nie powoduje pojawiania się genetycznej zmienności komórek linii IB-RS-2 w stacjonarnych i rotacyjnych hodowlach.

2. Obserwowane różnice gęstości hodowli komórek, potwierdzone różnicami wartości indeksu mitotycznego, przy równoczesnym braku różnic cytochemicznych w komórkach namnażanych rotacyjnie i stacjonarnie, wydają się wskazywać, że zmiana wielkości wewnętrznej powierzchni użytkowej (użycie szklanych perełek) i zastosowanie odmiennych warunków inkubacji (rotacja), wymaga dostosowania i innych parametrów prowadzenia i pielęgnacji hodowli komórek.

Piśmiennictwo

1. Bertalanffy L., Bickis I.: J. Histochem. Cytochem. 4, 481, 1956.
2. de Castro M. P.: Arq. Inst. Biol., S. Paulo 31, 63, 1964.
3. de Castro M. P.: Arq. Inst. Biol., S. Paulo 37, 103, 1970.
4. Chang R. S., Hayflick L., Murphy W., Shannon J., Yerganin G.: Rep. ad hoc Comm. Nomenclature in Tissue Culture: Terminology in Tissue Culture. 1964.
5. Davenport H. A.: Histochemistry and Histochemical Tech-

- nics W. B. Saunders Co., Philadelphia — London 1969, s. 354.
6. Krygier A., Godlewski H. (red. red.): Skrypt metod histochemicznych. Polskie Tow. Histochem. Cytochem. Warszawa 1963, s. 142.
7. Malicki K., Wiśniewski J., Ładyńska A., Chmielewska A., Bańbura M.: Medycyna Wet. — w druku.
8. Niemiattowski M.: Medycyna Wet. 34, 570, 1978.
9. Ruddle F. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109, 116, 1962.
10. Thompson S. W.: Selected Histochemical and Histopathological Methods. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois 1969, s. 697.

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

Малицкий К., Малицкая Э., Каткевич М. — Морфологические и цитохимические наблюдения клеток линии IB-RS-2, размноженных стационарным и ротационным методами.

Сравнивали формы клеток, величину ядер, значение митотического индекса, активность кислой и щелочной фосфатаз, а также дегидрогеназы янтарной кислоты и содержание RNA в цитоплазме клеток, размноженных стационарно и ротационно в 4—5 пассаже после изъятия линии из банка клеток, заложеного в жидком азоте. Наблюдаемые различия касались главным образом формы и численности клеток в однослойной культуре и значения митотического индекса. Другие исследуемые свойства клеток не показывали существенных различий.

Malicki K., Malicka E., Katkiewicz M. — Morphological and cytochemical observations on IB-RS-2 cells cultivated by rotatory and stationary methods.

The 4-th or 5-th passage of cell lines taken from the cell bank in liquid nitrogen, cultivated in stationary and rotatory methods, were compared with regard to the cell shape, nuclei size, mitotic index, cytoplasmic RNA, the activity of acid and alkaline phosphatase and succinic acid dehydrogenase. The differences noted concerned mainly the number and cell shape, mitotic index in cells cultivated in monolayer. The other parameters studied remained unchanged.

TIONG S. K., SING K. Y.: Izolacja i identyfikacja mykoplazm z płuc świń w Singapurze. (Isolation and identification of mycoplasmas from pig lungs in Singapore). Vet. Rec. 108, 75—77, 1981 (4).

Do izolacji mykoplazm z 656 próbek płuc (196 próbek pochodziło z płuc chorych świń z silnie zaznaczonymi zmianami w płucach, 230 pochodziło z płuc zmienionych i niezmienionych pochodzących od świń poddanych ubojowi) stosowano zmodyfikowane podłoże Frus i wsp. Wyizolowane szczepy identyfikowano w oparciu o odczyn DGI i AGD. Mykoplazmy lub Acholeplazmy wyizolowano ze 102 próbek, w tym w 51 przypadkach z płuc chorych świń ze zmianami zapalnymi, w 34 przypadkach z płuc świń z objawami subklinicznymi. Dwadzieścia siedem szczepów zidentyfikowano jako *M. suis* pneumoniae, 14 jako *M. hyorhinis*, 35 jako *Acholeplasma granularum* i 4 jako *A. laidlawii*. Wykazano przy tym na występowanie ścisłego pokrewieństwa antygenowego między *M. suis* pneumoniae i *A. granularum*.

G.

KONO Y., HATAKEYAMA H., ISHIKAWA H., SENTSUI H.: Miano przeciwciał u krów klinicznie i subklinicznie zakażonych wirusem białaczki bydła. (Antibody titres in cattle clinically and subclinically infected, with bovine leukemia virus). Vet. Microbiol. 6, 167—170, 1981 (2)

W odczynie immunodyszki określono miana przeciwciał dla antygeny białkowego (p) i glikoproteinowego (gp) wirusa białaczki bydła w dwóch grupach krów. U zwierząt z grupy pierwszej występowały kliniczne objawy enzootycznej białaczki, zaś w grupie drugiej białaczka miała przebieg subkliniczny. U 99 (89,2%) z 111 krów z białaczką o klinicznym przebiegu występowały przeciwciała dla antygeny p i gp, u 9 (8,1%) przeciwciała wyłącznie dla antygeny gp, zaś u 3 (2,7%) krów nie stwierdzono obecności przeciwciał. Natomiast spośród 165 krów z białaczką o przebiegu subklinicznym 111 krów (67,3%) posiadało przeciwciała wyłącznie dla antygeny p. Średnie miano przeciwciał dla obydwu antygenów było statystycznie znacznie wyższe u krów z białaczką o przebiegu klinicznym.

G.