

6. Basset J. M., Maddil D., Burks A. H., Pinches R. A.: *J. Develop. Physiol.* 4, 379, 1982.
7. Bloom S. R., Edwards A. V.: *J. Physiol.* 253, 157, 1975.
8. Bloom S. R., Edwards A. V., Vaughan N. J. A.: *J. Physiol.* 233, 457, 1973.
9. Brockman R. P.: *can. Vet. J.* 19, 55, 1978.
10. Brockman R. P.: *Comp. Biochem. Physiol.* 73A, 337, 1982.
11. Clarke D. W., Mudd L., Boud F. T. Jr., Fields M., Raizada K. K.: *J. Neurochem.* 47, 831, 1986.
12. Fowden A. L.: *J. Endocrin.* 87, 113, 1980.
13. Froesch E. R., Schmid Ch., Zangger I., Schoenle E., Eigenmann E., Zapf J.: *J. Anim. Sci.* 63, 57, 1986.
14. Haupt T. R.: *Am. J. Physiol.* 227, 161, 1974.
15. Koppel J., Kuchar S., Mozes S., Herzova J., Beda K.: *Horm. Metabol. Res.* 14, 631, 1982.
16. Martin R. J., Ramsay T. G., Harris R. B. S.: *Domest. Anim. Endocrinol.* 1, 99, 1984.
17. Nicholson T.: *Ann. Rech. Vet.* 10, 237, 1979.
18. Nowak J., Kania J.: *Pol. Arch. Wet.* 25, 31, 1986.
19. Rezek M.: *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 54, 659, 1976.
20. Ross J. P., Kitts W. D.: *J. Nutr.* 103, 488, 1973.

Adres autora: prof. dr hab. Tadeusz Studziński, ul. Akademicka 12, 20-023 Lublin

Студзинский Т., Чарнецкий А., Глушак А., Радымская-Вавжиняк К. — Влияние перорального и внутривенного ввода глюкозы, фруктозы и лактозы на выделение инсулина у телят в постнатальный период

Исследования провели на 28 телятах нч-п породы, возрастом 2—22 дня. Цель исследования состояла в определении инсулиновых секреторных реакций и изменений концентрации глюкозы в кровяной плазме под влиянием внутривенного и перорального ввоза (сосание из будылочки через соску) глюкозы и фруктозы, а также перорального ввода лактозы. Глюкозу а фруктозу вводили внутривенно и перорально в растворах 40% в дозе 1 г/кг м.т., лактозу же перорально в растворе 20% также в дозе 1 г/кг м.т. Все исследования провели после применения 15-часового голодания. Наибольшие инсулиновые секреторные эффекты отметили после внутривенной инфузии глюкозы после которой концентрация гормона быстро росла от исходных величин в ср. 4,3  $\mu\text{U/ml}$ , достигая пикового уровня в среднем 37,7  $\mu\text{U/ml}$  через 20 мин. после ввода сахара. Пероральный ввод глюкозы вызывал меньший рост концентрации инсулина, достигавшей наивысшей величины в ср. 10,7  $\mu\text{U/ml}$  через 40 мин. после потребления сахара. Внутривенная инфузия фруктозы не вызывала существенных из-

менений концентрации инсулина в кровяной плазме телят, а средняя концентрация гормона колебалась от 2,2  $\mu\text{U/ml}$  до наивысшей величины 10,5  $\mu\text{U/ml}$  через 15 мин. после ввода сахара. Отметим дифференцированные инсулиновые секреторные реакции после перорального ввода фруктозы. У 5 исследуемых телят не обнаружили изменений концентрации гормона, у 1 же появился значительный выброс инсулина, достигший величины 45  $\mu\text{U/ml}$  через 100 мин. после ввода фруктозы. Дифференцированные секреторные реакции инсулина отметили после перорального ввода лактозы у телят, 5 из которых не показало существенных изменений концентрации гормона, у 1 же теленка отмечился ее рост от величины 2  $\mu\text{U/ml}$  до 18  $\mu\text{U/ml}$  через 40 и 50 мин. после ввода лактозы.

Studziński T., Czarnecki A., Gluszek A., Radymaska-Wawrzyniak K. — Effects of intravenous and oral application of glucose, fructose and lactose on insulin secretion in calves during postnatal life

The study was performed on 28 calves of black and white lowland breed aged from 2 to 22 days to determine the effect of glucose and fructose given orally from a bottle to suction and the influence of intravenous infusions of those sugars on the level of plasma insulin. Glucose and fructose were administered as 40 per cent solutions at doses of 1 g/kg of body weight. All the experiments were conducted after 15 hours since feed deprivation. The highest levels of insulin were observed after intravenous infusions of glucose: the concentration of 4.3 uU/ml to 37.7 uU/ml was found after 20 min. Oral intake of glucose by suckling from a bottle resulted in an increase of insulin to the highest mean value of 10.7 uU/ml reached in 40 min after sugar intake. Intravenous infusions of fructose changed the level of plasma insulin from 2.2 uU/ml to its highest value of 10.5 uU/ml reached in 15 min; however, that rise was not significant statistically. Oral intake of fructose did not influence the level of insulin in 5 calves; only in one animal an increase to 45 uU/ml was observed in 100 min after fructose intake. Oral administration of lactose did not change the level of insulin in 5 calves; one animal reacted with an increase of the hormone concentration from 2.0 uU per 1 ml to 18.0 uU/ml between 40 and 50 min.

## ПРАКТИКА ЛАБОРАТОРНОЙ

BARBARA MAJER-DZIEDZIC, JERZY ROSTKOWSKI\*

### Оценка различных методов мытья стекла стосованного в вирусологии

Zakład Mikrobiologii Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

\* Zakłady Przemysłu Bioweterynaryjnego, 24-100 Puławy-Michałówka

Ходовле коморок первоных и лине коморок з wielokrotnymi subpasażami, tzw. hodowle ciągłe, wymagają do swego wzrostu wysokogatunkowego szkła o obojętnym oddziaływaniu na podłoża, w których komórki dzielą się i rozmnażają. Bardzo ważną rzeczą jest zastosowanie właściwego sposobu mycia szkła wirusologicznego, aby nie dopuścić do toksycznego oddziaływania używanych preparatów na tkanke

(1, 2, 3, 5). W pracowniach wirusologicznych stosuje się różne metody przygotowywania szkła laboratoryjnego używanego do badań.

Celem pracy było przebadanie 4 różnych technik mycia szkła wirusologicznego i sprawdzenie, która z zastosowanych metod jest najbardziej ekonomiczna i równocześnie najodpowiedniejsza dla prowadzonych hodowli komорок первоных и лине ciągłych.

## Materiał i metody

Do badań użyto czterech różnych hodowli komórkowych:

- komórek wyprowadzonych ze skóry płodu bydłęcego oznaczonych jako SK (20—25 subpasaż),
- komórek linii ciągłej FL (feline lung) uzyskanych z płuc embrionu kota,
- komórek linii ciągłej MDCK wyprowadzonych z nerki psa (rasa — cocker spaniel),
- komórek hodowli pierwotnej fibroblastów zarodka kurzego (CEC).

Badania wykonywano, stosując fabrycznie nowe, szklane butelki Roux o pojemności 500 ml, które wstępnie dla metody pierwszej i trzeciej były moczone przez kilka godzin w 2% roztworze kwasu solnego a następnie przepłukane kilka razy wodą bieżącą i destylowaną. Do każdej serii badań zastosowano butelki myte czterema metodami: a — sposobem tradycyjnym przez moczenie w roztworze fosforanowo-żółciowym, b — w podchlorynie sodu, c — w szarym mydle, d — w roztworze Rovonexu.

## Metoda pierwsza (I)

Po przemyciu szkła w destylowanej wodzie, butelki moczone całą noc w roztworze fosforanowo-żółciowym (40 l H<sub>2</sub>O dest + 2,5 l żółci bydłowej + 3 kg fosforanu trójsodowego). Następnie szkło dokładnie szczotkowano i płukano w wodzie bieżącej i destylowanej. Dalsze postępowanie polegało na kilkugodzinnym moczeniu butelek w 0,5% roztworze kwasu solnego i ponownym płukaniu w wodzie bieżącej i destylowanej. Po tym procesie butelki moczone 24 godz. w wodzie destylowanej i ponownie płukano kilka razy w świeżej wodzie destylowanej. Dokładnie osączone szkło suszono w temperaturze 80°C przez 2 godz., a następnie po przykryciu kapturkami z folii aluminiowej sterylizowano w 160°C przez 2—3 godz.

## Metoda druga (II)

Szkło surowe moczone w 10% kwasie solnym przez 2 dni, lub w 20% przez 24 godziny. Po wyjęciu płukano w wodzie bieżącej przez 24 godz. i gotowano do 2 godz. w mydlinach przygotowywanych ze zwykłego szarego mydła, przeznaczając na 30—40 l H<sub>2</sub>O dest. 0,5 kg mydła. Po tym okresie butelki szczotkowano pod ciepłą bieżącą wodą i dokładnie płukano w zimnej wodzie. Następnie szkło ponownie dokładnie płukano 3 razy w wodzie destylowanej, suszono i jałowiono jak w metodzie pierwszej.

## Metoda trzecia (III)

Po przemyciu w destylowanej wodzie butelki moczone 24 godz. w roztworze podchlorynu sodu (NaOCl), stosując 30 ml NaOCl na 10 l wody destylowanej. Po zakończonym moczeniu szkło trzymano 2 godz. w H<sub>2</sub>O dest., a następnie 3 razy płukano również H<sub>2</sub>O dest. Wysuszone butelki przykrywano kapturkami z folii aluminiowej i sterylizowano w 160°C przez 2—3 godz.

## Metoda czwarta (IV)

Butelki przepłukane destylowaną wodą myto w wodnym roztworze Rovonexu 22 (firmy Rovon). Szkło moczone 24 godziny w 2% roztworze płynu. Po tym okresie czasu butelki płukano cztero-pięciokrotnie w ciepłej, a następnie zimnej wodzie. Po kolejnym przepłukaniu woda destylowaną szkło moczone przez 24 godziny w wodzie destylowanej. Następnego dnia butelki płukano ponownie w świeżej wodzie destylowanej, suszono w temp. 80°C przez 2 godziny, a po przykryciu kapturkami z folii sterylizowano w temp. 160°C przez 2—3 godziny.

W butelkach zakładano hodowle o gęstości wyjściowej komórek  $1 \times 10^5$  w 1 ml. Komórki zawieszano w płynie Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy cielęcej i antybiotyków w ilości 100 j. m/ml septymocyyny.

Dzielące się komórki trypsynowano (roztwór 0,25%) po 24, 48 i 72 godz. inkubacji, stosując po 5 butelek Roux do każdego typu badań. Komórki liczone w komorze Burkera. Przed liczeniem sprawdzano żywotność komórek dodając 0,05 ml 1% błękitu trypanu do 1 ml zawiesiny komórek. Liczone komórki żywe niezabarwione.

## Wyniki i omówienie

Hodowle komórkowe służące do izolacji i namnażania wirusów odgrywają dużą rolę tak w badaniach teoretycznych, jak i w praktyce. Wiele niepowodzeń w tych pracach wynikało w przeszłości z niewłaściwego przygotowania szkła (3, 4). Obecne badania wykazały, że zastosowanie odpowiedniej techniki mycia szkła do badań wirusologicznych ma istotny wpływ na prawidłowe dzielenie i rozmnażanie się tak komórek hodowli pierwotnych, jak i linii ciągłych (tab. 1). Różnice te były widoczne już po

Tab. 1. Wpływ mycia szkła na namnażanie się komórek SK, FL, MDCK, CEC

Metoda przygotowania szkła	Rodzaj hodowli komórkowej	24h inkub.		48h inkub.		72h inkub.	
		Stopień pokrycia w %	Liczba komórek w 1 ml x 10 <sup>6</sup>	Stopień pokrycia w %	Liczba komórek w 1 ml x 10 <sup>6</sup>	Stopień pokrycia w %	Liczba komórek w 1 ml x 10 <sup>6</sup>
I	SK	20	4,0	40	6,5	90-100	10,0
	FL	30	3,0	60	7,0	80	11,5
	MDCK	30	4,0	60	8,0	70-80	9,0
	CEC	80	25,0	100	26,5	100	27,0
II	SK	20	4,0	30-40	5,5	90-100	8,5
	FL	20	2,5	50	5,0	90	14,5
	MDCK	40	5,5	60	8,0	80-90	10,0
III	SK	30	4,5	40	5,0	100	12,0
	FL	50	5,0	80	7,5	100	16,0
	MDCK	40-50	6,0	70	10,0	90-100	12,0
IV	SK	20-30	3,5	60	9,5	100	12,0
	CEC	70-80	23,5	100	29,0	100	30,0

24 godz. inkubacji komórek badanych hodowli, przy czym najkorzystniejsze wyniki zaobserwowano stosując do mycia podchloryn sodu. Stopień pokrycia zarastającą tkanką był lepszy o 10—20% dla komórek SK, FL i MDCK, co w przeliczeniu na liczbę komórek zawartą w 1 ml osadu wynosiło od 500 tys. do 2 mln komórek. Po 48 godz. inkubacji wyniki dla komórek SK kształtowały się następująco: najlepsze pokrycie szkła (60%) uzyskano w butelkach mytych preparatem Rovonex 22; liczba komórek w 1 ml osadu była najwyższa w porównaniu z masą komórek namnożonych w butelkach mytych innymi metodami (tab. 1). Przy stosowaniu metody I i II po 72 godz. komórki zarastały całkowicie powierzchnię szkła w postaci jednolitej warstwy, ale były większe, kształtu bardziej wrzecionowatego, przypomi-

nające wyglądem fibroblasty. Stąd też różnica od 2—3,5 mln komórek w 1 ml na korzyść metody III i IV, przy których ta sama liczba komórek zajmowała mniejszą powierzchnię szkła.

Wzrost komórek FL był najniższy na szkle mytym metodą II. Różnica w liczbie komórek po 24 godz. inkubacji wynosiła tylko 0,5 mln/1 ml na korzyść metody I, ale aż o 2,5 mln na korzyść metody III. Ta dysproporcja utrzymywała się nadal po 48 godz. inkubacji i wynosiła w dalszym ciągu 2,0 mln/ml komórek w metodzie I i 2,5 mln/ml w metodzie III. Po 72 godz. najkorzystniejsze wyniki zaobserwowano stosując mycie podchlorynem sodu, gdzie przy 100% pokryciu szkła przez komórki FL otrzymano ich aż 16 mln w 1 ml. Uzyskano tym samym o 1,5 mln komórek w 1 ml więcej niż w metodzie II i aż o 4,5 mln komórek więcej/ml w porównaniu z metodą tradycyjną. Namnażanie się komórek MDCK na butelkach mytych metodą III było również najlepsze tak po 24 godz. inkubacji, jak i po 48 oraz 72 godz. Różnica w liczbie komórek przypadających na 1 ml osadu w tej metodzie wynosiła od 0,5 mln (metoda II) do 2 mln (metoda I) po pierwszym dniu inkubacji i utrzymywała się do 2 dnia, gdzie na szkle przygotowanym tak metodą I, jak i II było o 2 mln/1 ml komórek mniej niż w metodzie III. W trzecim dniu inkubacji na szkle mytym podchlorynem sodu w 1 ml osadu znajdowało się 12 mln komórek, co stanowiło wartość najwyższą biorąc pod uwagę wszystkie trzy metody, a różnica wynosiła 2 mln/ml w porównaniu do metody II i 3 mln/ml do metody I.

Preparat Rovonex 22 firmy PZ „Rovan” używano już po zakończeniu powyższych badań i stąd metodę IV przygotowywania butelek Roux zastosowano tylko dla dwóch hodowli komórkowych SK i hodowli pierwotnej fibroblastów zarodka kurzego (CEC). Uzyskane wyniki są bardzo dobre i wskazują na dużą przydatność tego preparatu w pracowniach wirusologicznych. Po 24 godzinach inkubacji komórek na szkle przygotowywanym metodą IV, w 1 ml uzyskano 0,5 mln komórek SK mniej, a komórek CEC 1,5 mln mniej w porównaniu z metodą tradycyjną. W drugim dniu inkubacji liczba komórek CEC gwałtownie wzrosła osiągając poziom 29 mln komórek w 1 ml tj. o 5,5 mln więcej niż po 24 godz. inkubacji (metoda IV). Po tym samym okresie czasu liczba komórek SK wzrosła o 6 mln/ml w porównaniu z jednodobowym okresem inkubacji (metoda IV). W końcowym efekcie, po 72 godz. inkubacji uzyskano tak dla komórek SK, jak i CEC o wiele lepszy wzrost na butelkach przygotowanych metodą IV, aniżeli metodą I (tradycyjną), (tab. 1).

### Wnioski

1. Zastosowane nowe metody mycia szkła wirusologicznego są korzystniejsze dla namnażania się komórek *in vitro* w porównaniu ze spo-

sobem tradycyjnym.

2. Wyniki uzyskane z podchlorynem sodu i preparatem Rovonex 22 — lepszy stopień pokrycia szkła, więcej komórek w ml osadu w tych samych warunkach inkubacji, mniejsza pracochłonność — uzasadniają celowość szerszego ich stosowania w pracowniach bakteriologicznych, a zwłaszcza wirusologicznych.

### Piśmiennictwo

1. Buczek J.: Biul. Inform. Zjedn. Przem. Zoop. Wet.-Zoo-techn. 1, 11, 1965.
2. Jabłoński L.: Wirusologia lekarska, PZWL, Warszawa 1980.
3. Larski Z.: Wirusologia weterynaryjna, PWRiL, Warszawa 1965.
4. Larski Z.: Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt, PWRiL, Warszawa, 1977.
5. Mayr A., Bachmann P. A., Bibrack B., Wittmann G.: Virologische Arbeitsmethoden. T. 1, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1974.

Adres autora: dr Barbara Majer-Dziedzic, 20-725 Lublin, ul. Wietkopolska 77

Маер-Дзедзиц Б., Ростковский Я. — Оценка разных методов промывки стекла, применяемого в вирусологии

Исследовали 4 разные клеточные культуры, проводимые на стеклянных бутылках Ру, промываемых несколькими методами: а — в фосфатножелчном растворе, б — в гипохлорите натрия, в — в сером мыле, г — в растворе „Rovonex” 22. Исследования показали, что применение соответствующей промывки стекла для вирусологических исследований имеет существенное влияние на правильное деление и размножение как клеток первичных культур, так и непрерывных линий.

Эти различия были заметны уже через 24 часа инкубации клеток исследуемых культур, причем наиболее полезные результаты наблюдались после промывки гипохлоритом натрия. Данные, полученные с препаратом „Rovonex” 22, тоже очень хорошие, указывают на большую его пригодность в вирусологических лабораториях. По сравнению с традиционными технологиями промывки стекла после применения как гипохлорита натрия так и „Rovonex” 22 получают лучшую степень покрытия стекла и больше клеток в 1 мл осадка в те же самые периоды инкубации. Большим достоинством этих методов является сравнительно малая их трудоемкость.

Принимая во внимание эти все качества, рекомендуется более широкое применение этих методов в вирусологических лабораториях.

Majer-Dziedzic B., Rostkowski J. — An assessment of different methods of glass washing applied in virological laboratories

There were assessed four different cell cultures growing on Roux flasks which had been washed by means of various techniques using solutions of sodium phosphate and bile or sodium hypochlorite or soap or Rovonex 22. It was found that the use of a proper method for glass washing was of great importance as it influenced normal cell divisions and growth of primary cell cultures and cell lines. The differences were seen within 24 hours. The best results were observed when cell cultures were propagated on bottles which had been washed using sodium hypochlorite. Almost similar findings were recorded using Rovonex 22. The other solutions were less effective. In comparison to traditional methods of washing the administration of sodium hypochlorite or Rovonex solutions resulted in cell cultures of higher number of cells covering the surface of glass bottles and also labour-saving.