

## EFACTUL INHIBITOR AL ADN ASUPRA VIRUSULUI HERPETIC IN CULTURI DE CELULE KB

Doina Pop D. Popa, Al. Ábrahám

În anul 1871 *Horner* a descris pentru prima dată keratita herpetică pe 32 cazuri, din care 30 coincideau cu o erupție cutanată după o afecțiune febrilă acută.

Primele date asupra virusului herpetic datează din 1919 (*Löwenstein*, 1). *Grüter* (1) comunică ceva mai târziu (1920) experiențe pe care le-a efectuat cu mult înainte, tot în acest domeniu.

După ce proprietățile virusului herpetic au fost cunoscute, cercetătorii au asaltat tematica inhibării dezvoltării și resintetizării virusului herpetic *in vivo* și *in vitro*.

Pornind de la faptul bine cunoscut că acidul dezoxiribonucleic (ADN) viral este transportorul caracterelor infecțiozității în cazul virusului herpetic, iar în lucrările noastre anterioare (20) am comunicat aplicarea ADN nevirial în tratamentul keratitei herpetice cu bune rezultate, ne-am propus verificarea acțiunii ADN nevirial asupra efectului citopatic (e.c.p.) produs de virusul herpetic în culturi de celule KB. Rezultatele acestor cercetări constituie obiectul prezentei lucrări.

### Material și metodă

Virusul herpetic (Paris) primit de la Institutul de Inframicrobiologie al Academiei R.S.R. din București, a fost menținut prin pasaje succesive pe culturi de celule KB. Pentru experiența de față am folosit virusul herpetic provenit din mediul de cultură al pasajului nr. 124.

Culturile de celule KB au fost menținute în laboratorul nostru prin metoda de versenizare, folosindu-se mediul *Hanks-Earle* aa. cu un adaos de ser de vițel în proporție de 10%. Culturile de celule din tuburi staționare au fost infectate cu 100 DCP<sub>50</sub> de virus herpetic la 2—3 zile după versenizare, adăugându-se pentru menținere mediu *LaYe*\*, fără ser și antibiotice.

Pentru inhibarea e.c.p. am administrat la culturile infectate ADN nevirial, procurat din comerț, elaborat de firma *Chemische Fabrik „Ehrlich Nickel“* din Heidelberg, în cantitate de 0.1 mgr/ml mediu de cultură *LaYe*. Tuburile cu culturi de celule s-au împărțit în cinci loturi.

Lotul I: se infectează culturile de celule din tuburi staționare cu virusul herpetic titrat anticipat (10<sup>-7</sup>). După 30 minute de contact al virusului cu celulele KB s-au spălat tuburile și s-a administrat mediul de menținere *LaYe*. Acest lot constituia martorul pentru virus.

Lotul II: culturile de celule se infectează cu același titru de virus herpetic. După 30 de minute se spală tuburile și se adaugă ADN nevirial dizolvat în mediul *LaYe*.

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| * Lactalbumin hydrolysate NBCo | 5,0 mg    |
| Jeast extract Difco            | 1,0 mg    |
| Earle BBS                      | 1000,0 ml |

Înainte de folosire se adaugă 2 ml bicarbonat de Na 5% la 100 ml mediu.

Lotul III: se efectuează un amestec extemporaneu din diluția cunoscută de virus herpetic și ADN nevirial aa. cu care se infectează culturile din tuburile staționare. După 30 de minute se spală culturile și se administrează mediul LaYe.

Lotul IV: am adăugat ADN nevirial dizolvat în mediu LaYe (0,1 mg/ml) culturilor de celule KB. Acest lot a constituit lotul martor pentru ADN nevirial.

Lotul V: reprezintă martorul culturii pentru mediul LaYe, deci celulele neinfectate, și menținute la termostat cu un adaos de mediu LaYe.

Toate tuburile au fost menținute la temperatura de 36° C și urmărite timp de 10 zile, verificându-se zilnic sub microscop. S-au folosit pentru acest experiment un număr de 300 tuburi cu culturi de celule KB. Fiecare lot aparte a cuprins și tuburi martore, în afara loturilor martore speciale, amintite mai sus. Experiențele s-au repetat de zece ori consecutiv.

### Rezultate

În lotul I la 24 de ore după infecția culturilor, s-au observat celule cu balonări, după care acestea s-au rotunjit, s-au izolat și a treia zi au căzut în mediul de cultură. Leziunea a atins toată populația celulară (fig. 1).

La lotul II de culturi, după infectarea celulelor cu virusul herpetic, respectiv după spălare și administrare de ADN nevirial, la 24 de ore nu s-a observat e.c.p. net, doar în mici focare dispersate, atingând un număr restrâns de celule (fig. 2) După lezarea acestor celule, leziunile nu s-au extins și asupra altora, cele învecinate și restul populației celulare au rămas intacte timp de 10 zile, perioadă cât au fost urmărite de noi.

La lotul III de culturi de celule, prin infectarea celulelor cu un amestec egal de virus herpetic și ADN nevirial, am constatat cu aproximație același efect, totuși leziunile parcă erau mai discrete, focarele celulelor atinse fiind într-un număr mai redus (fig. 3).

Culturile de celule din loturile IV și V n-au prezentat e.c.p. menținându-se intacte toată perioada experimentului. Prin compararea celulelor din aceste două loturi, remarcăm o creștere mai rapidă și persistentă mai accentuată a celulelor din lotul IV, deci cel tratat cu ADN nevirial, față de martorul seriilor de culturi (lotul V).

Prin inversarea experiențelor, administrând extemporaneu ADN nevirial și adăugându-se virusul herpetic, la 30 minute după spălare, rezultatele au fost asemănătoare cu cele observate și descrise în cazul lotului II.

### Discuții

Keratitis herpetică este o boală foarte frecvent intilnită, diagnosticul clinic efectuându-se cu destulă ușurință, totuși uneori se impune necesitatea unui diagnostic diferențial pentru care examenul virusologic este indispensabil.

Izolarea virusului herpetic din afecțiunile corneene se face destul de dificil, obținându-se în medie un rezultat pozitiv de 20%. Pentru izolare se folosește inocularea materialului patologic pe ou embrionat de găină (5) cu rezultate destul de satisfăcătoare. Izolarea virusului pe culturi de celule (19, 21, 22, 24) se efectuează cu mai puțină dificultate, furnizându-ne informații și asupra sintezei intracelulare a virusului herpetic. În ultimii ani s-au încercat și alte metode, în special în ceea ce privește diagnosticul clinic în această viroză, ca imunofluorescența (12) sau metode mai complicate și complexe ca autoradiografia (6) în care caz, după izolarea virusului pe celule, se incorporează H<sup>3</sup> timidina radioactivă care se localizează exclusiv în nucleu.

Se știe că virusul herpetic conține acid dezoxiribonucleic în care procentajul de guanină și citozină este de aproximativ 70%, deci în cantitate mult

mai mare decât în ADN celulelor gazdă (1). Aceasta este în legătură directă cu resintetizarea virusului. După faza de adsorbție a virusului de celule (care durează 30—60 de minute), urmează o fază de eclipsă de câteva ore, în care perioadă virusul nu poate fi pus în evidență prin metodele tehnice uzuale. După acest timp, se observă la microscopul electronic, în citoplasma celulelor virioni fără capsidă protectoare. După trecerea câtorva ore, virusul neformat apare în nucleu sub formă de aglomerate de particule mici, care cresc treptat, refăcându-și învelișul. Probabil că resintetizarea ADN viral este precedată de formarea proteinelor. ADN se resintetizează la 4—14 ore după inocularea virusului în cultură, iar la 40 de minute cantitatea aceasta se dublează. Acest proces se efectuează la nivelul nucleului celular și nu în nucleoli, încă înaintea formării incluziilor. Antigenele specifice se găsesc în vecinătatea membranei nucleare și probabil tot aici are loc formarea nucleocapsidei, eventual cu participarea membranei nucleare. Invelișul virusului este produsul citoplasmei și a membranei citoplasmatică a celulelor infectate.

După unii autori (1, 6) heparina inhibă adsorbția virusului herpetic de celule, probabil din cauza potențialului electrono-negativ al moleculei de heparină. Alții (14) sînt de părere că efectul inhibitor se datorește grupului de sulfat din heparină care se manifestă direct asupra virusului și nu prin intermediul celulei.

Deoarece în cazul virozelor ne aflăm în fața unui fenomen esențial — sinteza acizilor nucleici, purtători ai infecțiozității — s-a încercat să se efectueze blocarea acestei sinteze prin administrarea unor analogi structurali ai bazelor azotate, care intră în constituția polimerului nucleic. Alături de acestea, mai trebuie amintite unele substanțe care acționează asupra celulelor infectate, blocînd energogeneza necesară sintezei de noi virusuri, substanțe care acționează asupra efectelor generale ale virozelor, deci ca inactivanți direcți ai corpusculilor elementari (25). Dintre numărul mare de compuși sintetizați trebuie menționați 5-bromouracilul, 5-fluorouracilul, diazouracilul, 2-tiouracilul, 5-bromodesoxiuridina, 5-fluorodesoxiuridina etc.

Dacă luăm în considerare că 5-bromodesoxiuridina inhibă incorporarea timidinei și se incorporează ea însăși în ADN viral, dînd naștere unui ADN modificat, pe de altă parte 5-fluorodesoxiuridina inhibă sinteza timinei prin care și sinteza însăși a ADN, neîncorporîndu-se în ADN viral, atunci desigur problema esențială este găsirea perioadei adecvate de intervenție prin inhibitorii specifici în faza de resintetizare a ADN viral.

În cercetările noastre, prin administrarea ADN neviral în culturile de celule s-ar putea să fi indus celula pentru resintetizarea unui ADN neviral. Admițînd faptul că virusurile nu se adsorb pe suprafața tuturor celulelor din cultură și există o oarecare rezistență și selecție celulară, am administrat la 30 minute de la infecția culturii cu virusul herpetic, ADN neviral. Pare verosimil ca acele celule care nu au adsorbit pe suprafața lor virusul herpetic, să adsorbă ADN neviral care, la rîndul lui, fiind matrița sau modelul respectiv, să oblige celula la resintetizarea noului ADN neviral. În acest fel ADN viral, după resintetizare și eliminarea noului virus din celulele lezate, nu mai poate invada celule noi care s-au angajat deja la resintetizarea de ADN neviral. Astfel s-ar explica cauza e.c.p. numai în focare și imposibilitatea generalizării leziunilor din loturile II și III.

Dacă se administrează virusul herpetic concomitent cu ADN neviral, adsorbția virusului pare să întîrzie, ceea ce se manifestă prin leziuni izolate e.c.p. în focare fără generalizarea lor. Același efect s-a găsit și după adăugarea tardivă a virusului herpetic, respectiv după administrarea de ADN neviral precoce.



Fig. nr. 1.



Fig. nr. 2.



Fig. nr. 3.



Fig. nr. 4.

Unii cercetători (2, 3, 4, 8, 11, 13, 15, 16, 18, 23, 26) au descris inhibarea leziunilor prin administrare în celule infectate sau in vivo, respectiv în ou embrionat de găină a unor substanțe ca para-fluorofenilalanina, 5-fluoro-2-deoxiuridina, bromouracildeoxiribozida, 5-metilalanino-2-deoxiuridina, guanidina, fluoropirimidina, puromicina, deoxiadenozina și uridina. Alții (9) descriu administrarea ADN nevirial înaintea infecției — precoce — obținând inhibarea leziunii sau a acțiunii virusului vaccinal și al influenței. Unii autori (10) au preconizat chiar vaccinuri extrase din culturi de celule inactivate cu raze UV, obținând o protejare a iepurilor față de infecția cu virusul herpetic.

Dacă ADN nevirial administrat de noi prin diferitele metode descrise mai sus a inhibat resintetizarea virusului herpetic sau a acționat ca un interferon, cercetările ulterioare vor fi menite a elucida aceasta. Tot atunci vom reveni și asupra titrării virusului herpetic din culturile de celule tratate cu ADN nevirial.

### Concluzii

Prin administrare de ADN nevirial culturilor celulare KB infectate cu virusul herpetic, s-a obținut o reducere a efectului citopatic la mici leziuni în focare, prin atingerea și distrugerea unui număr mic de celule.

ADN nevirial, adăugat la culturile de celule concomitent cu virusul herpetic, manifestă efect citopatic slab, numai în focare și nu duce niciodată la generalizarea leziunilor.

Administruind ADN nevirial culturilor de celule înaintea virusului herpetic, leziunile apar tot așa ca și în cazurile notate mai sus. S-ar putea să fie vorba de inhibarea resintetizării ADN viral eventual prin blocarea de către ADN nevirial a constituenților celulari.

Sosit la redacție: 19 septembrie 1966.

### Bibliografie

1. BAKÁCS T., FARKAS E.: Orvosi Virologia Bpest. 1965; 2. BORMAN G. S., ROIZMAN B.: Biochem. Biophys. Acta (1965), 1, 50; 3. COCCHI P.: Riv. Clin. Pediat. (1963), 72, 387; 4. FALKE D.: Arch. g. Virus. (1965), 3, 387; 5. HANNA L., JAWETZ E., COLEMAN V. R.: Am. J. Opht. (1957), 4, 126; 6. HARA J., NII S., KATO S.: Bikens. J. (1964), 2, 75; 7. HORVÁTH E., HADHAZY G.: Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. (1965), 2, 145; 8. JAWETZ E., SCHULTZ R., COLEMAN V., OKUMOTO. J. Immunol. (1965), 4, 635; 9. KOUCHI TAKANO, WARREN J., JENSEN K. E., NEAL A. L.: J. Bact. (1965), 90, 1542; 10. LÉPINE P., RUDDER J., MAURIN J., HENOCQ E.: Sém. Hop. (1964), 25, 1471; 11. LERMAN S., DOYLE R. F.: Nature (1962), 4832, 986; 12. LIOTET S., BONNIN P.: Arch. Opht. (1965), 3, 301; 13. LIH P. C., PAYNE F. E.: Virology. (1965), 25, 575; 14. NAHMIAS A. J., KIBRICK S. J. Bact. (1964), 87, 1060; 15. NEMES M. M., HILLEMANN M. R.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. (1965), 2, 515; 16. NEWTON A. A.: Biochem. J. (1965), 94, 1; 17. OFFRET G., PAYRAU P., RUDDER J., POULIQUEN J., FAURÉ J. P.: Arch. Opht. (1965), 3, 287; 18. PERKINS E. S., WOOD R. M., SEARS M. L., PRUSSOFF W. H., WELCH A. D.: Nature. (1962), 4832, 985; 19. RAPP F., HSU T. C.: Virology (1965), 25, 4, 01; 20. POPA DOINA, V. SĂBĂDEANU: Rev. Med. (1966), 1, 29; 21. ROIZMANN B.: Virology (1961), 13, 387; 22. RUDDER J.: Arch. Opht. (1965), 3, 257; 23. SCHAUER P., LIKAR M.: Path. Microbiol. (1965), 28, 371; 24. SZANTÓ J.: Acta Virol. (1960), 6, 380; 25. TĂUTU P.: Probleme de actualitate în medicină. Ed. Med. Buc. 1961; 26. WACKER A., REINHARDT D., CRAMER J.: Naturwiss. (1965), 52, 502.