

Disciplina de microbiologie și inframicrobiologie stomatologică a I.M.F.
(cond.: șef de lucrări Al. Abraham, doctor în medicină). Clinica oftalmologică
(cond.: prof. V. Săbădeanu, doctor-docent, medic emerit
al Republicii Socialiste România) din Tg.-Mureș

CERCETĂRI ASUPRA INHIBĂRII EFECTULUI CITOPATIC PRODUS DE VIRUSUL HERPETIC ÎN CULTURI DE CELULE CU IDU ȘI ADN-NEVIAL*

Al. Abraham, Doina Pop D. Popa, Monica Sabău

Kauffmann, în lucrările sale privind tratamentul keratitei herpetice prin administrarea substanței IDU (5-iodo-2-desoxiuridina) (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18) i-a demonstrat acțiunea virostatică față de acest virus. De la prima aplicare a acestui tratament cu IDU în cazul keratitelor herpetice de tip dendritic și pînă azi, el s-a răspîndit în multe țări, comunicîndu-se rezultate satisfăcătoare (11, 19, 24, 20, 25, 31, 35, 36). Acțiunea IDU se bazează pe faptul, că el intră în componența acidului desoxiribonucleic viral, substituind timidina și prin acest act inhibă ultima fază a polimerizării nucleotidei în acid nucleic infecțios. Ulterior s-au comunicat rezultatele experimentării pe iepure cu IDU (8, 9, 31, 34), însă comunicările referitoare la inhibarea resintetizării virusului herpetic în culturi de celule sint limitate (6, 7).

* Lucrare prezentată la U.S.S.M. din Tg.-Mureș. la data de 31 martie 1967

În lucrările noastre anterioare (29, 30) am comunicat acțiunea inhibitoare a ADN-neviral (străin) asupra inhibării resintetizării virusului herpetic în culturi de celule și unele rezultate clinice obținute prin tratarea keratitelor herpetice cu acest material. În prezenta lucrare, ținem să aducem unele contribuții comparative asupra acțiunii acestor două substanțe (IDU și ADN-neviral) în procesul inhibării efectului citopatic produs de virusul herpetic în culturi de celule.

Material și metode

În cursul cercetărilor noastre, am întrebuințat Herpes virus hominis (Paris) menținut în culturi de celule timp de mai mulți ani în laboratorul nostru, care a dat un efect citopatic constant, foarte intens și generalizat, începând din ziua 2 a infectării celulelor, (titrul virusului $DCP_{50} = 10^{-5}$ în 0,2 ml. Pentru cercetări am folosit 0,2 ml din diluție de 10^{-4}). Virusul inoculat la iepure prin scarificarea corneeană, a produs în ziua a 10-a moartea animalelor cu fenomenele binecunoscute. Culturile de celule folosite pentru experiment, au provenit din linia Detroit-6 (VA), fiind o variantă obținută de László. Mediul de creștere utilizat a fost $M_{199} + HAKNKS + EARLE$ cu 0,5% lactalbumină și 10% ser de vițel. Pentru menținere am folosit mediul Earle cu 2,5% ser de vițel și lactalbumină.

Acidul desoxiribonucleic neviral (Chemische Fabrick „Ehrlich Nickel“ Heidelberg) s-a administrat culturilor celulare la 30 minute după infectarea lor cu virusul herpetic, într-o diluție de 0,1% în mediul de menținere (0,1 ml/ml mediu) IDU (5-Iodo-2-desoxiuridina). „Röhms und Haas Pharma-Darmstadt“ s-a folosit din soluția stock de fabrică 0,1% din care s-a administrat 0,1 ml la 1 ml mediu de menținere, ca și în cazul anterior.

Martorii seriilor le-au constituit culturile de celule infectate cu virusul herpetic, respectiv tuburile cu celule neinfectate. Tuburile staționare au fost menținute la o temperatură de $37^{\circ}C$ și verificate zilnic la microscop timp de 10 zile. În ziua 6 unele tuburi au fost sacrificate prin fixare cu alcool metilic, extrasă pinza celulară cu colodiu, montată pe lame și colorată cu haematoxilină-eozină. În acest fel am obținut stratul monocelular nemodificat și în cantitate necesară verificării amănunțite a leziunilor și cu posibilități largi de fotografiere.

Rezultate și discuții

În tuburile martore (IDU și ADN-neviral) nu s-a obținut efect toxic, ci o oarecare creștere în volum a celulelor. În tuburile martore, efectul citopatic (e.c.p) produs de virusul herpetic a apărut la 24 de ore după infecție, manifestându-se printr-un început de rotunjire a celulelor atinse. În următoarele zile leziunile s-au accentuat cu tendința de generalizare tot mai crescândă, ceea ce s-a soldat cu desprinderea majorității celulelor lezate de pe peretele tubului. În ziua 5—6, pe perețele tuburilor se mai observau doar urme de celule, colorate intens, fără a se putea diferenția nucleul de protoplasmă, și unele rămășițe ale celulelor se mai leșau între ele prin punți subțiri de protoplasmă (fig. 1).

La 24—48 de ore de la administrarea IDU culturile infectate anticipat cu virusul herpetic, nu au prezentat e.c.p. Creșterea și menținerea integrală a structurii celulare pare a demonstra o inhibiție totală a efectului citopatic. În unele cazuri am considerat chiar că celulele s-au mărit în volum, față de cele martore, netratate. După 3—5 zile de la administrarea IDU, însă, au apărut în mod izolat, și într-un număr mic, celule rotunjite cu tendința de izolare, sau pe alocuri formațiuni care păreau să imite celulele multinucleate, așa zisele pseudosinciții. Toate aceste formațiuni, înconjurate de celule normale au dispărut, au căzut în mediu, și la 6—10 zile după tratament, pinza celulară rămasă a apărut intactă ca în primele zile ale infecției (fig. 2, 3, 4).

AL. ABRAHĂM ȘI COLAB.: CERCETĂRI ASUPRA INHIBĂRII EFECTULUI CITOPATIC
PRODUS DE VIRUSUL HERPETIC ÎN CULTURI DE CELULE CU IDU ȘI ADN-NEVIRAL



Fig. nr. 1.



Fig. nr. 2.



Fig. nr. 3.



Fig. nr. 4.





Fig. nr. 5.



Fig. nr. 6.



Fig. nr. 7.

La 24—48 de ore după administrarea ADN-neviral culturilor infectate cu virusul herpetic, s-au observat unele leziuni mai accentuate decât în culturile tratate cu IDU, dar și aceste formațiuni celulare lezate, rotunjite au fost izolate fără a manifesta tendința de generalizare. În ziua 6-a majoritatea celulelor au arătat un aspect normal, cu persistența în continuare a celulelor lezate, colorate mai intens și rotunjite, debarasate de restul celulelor (fig. 5. 6. 7).

Unii cercetători ca *Gnädiger* și *Zintz* (7) au verificat în diferite concentrații acțiunea IDU asupra culturilor celulare primare de cornee de iepure neinfectate. Acești autori au considerat că IDU nu produce proliferarea celulelor normale — în vitro — dar nici nu se comportă ca un citostatic asupra dezvoltării lor. În cursul cercetărilor noastre am observat o creștere mai intensă a celulelor din liniile celulare tumorale după administrare de ADN-neviral, respectiv IDU, ele devenind mai voluminoase și stratul celular mai uniform și încheat. S-ar putea ca această acțiune să se refere numai la celulele din liniile tumorale.

Falke (6), *Lerman*, *Doyle* și *Eisenschmidt* (21. 22) au verificat acțiunea unor anti-metaboliți asupra inhibării virusului herpetic ca: fluoro-desoxiuridina, para-fluoro-phenilalanina, jodo-desoxiuridina, proflavina, actinomicina-D și altele, constatând inhibarea sintezei noii particule virale infecțioase, fără afectarea formelor celulare gigante (sincitii). *Bormann* și *Roizman* (3) au comunicat că desoxiuridina și desoxiadenosina în concentrații milimolare inhibă resintetizarea virusului herpetic în culturi de celule HEP—2, prin blocarea sintezei ARN, a timidin-kinazei, a ADN-viral, respectiv a capsidei particulelor virale. Aceste rezultate s-au obținut dacă antimetaboliții au fost administrați imediat după infectarea celulelor cu virusul herpetic. *Bemda* (2) descrie acțiunea heparinei ca inhibitor al resintetizării virusului herpes „B”. Alți autori ca *Bowen* (4. 5), *Maass*, *Müller*, *Nakanoim*, *Vogt* (23), *Pereira*, *McCallum* (27) și *Persechino* (28) au folosit alți metaboliți în procesul inhibării infecției virale, obținând reducerea sau blocarea totală a e.c.p., respectiv inhibarea resintetizării virusurilor polioma, SV—40, Adeno₈, Adeno₁₂ sau a virusului rinotraheitei infecțioase bovine.

În cercetările noastre, prin administrarea IDU am obținut inhibarea e.c.p. al virusului herpetic în culturile Detroit₆ (VA) cu apariția într-un număr foarte mic a celulelor lezate. Verificând acțiunea IDU asupra inhibării e.c.p. produs de alte virusuri de tip ARN (Coxsackie B₅, ECHO₁₃) și ADN (Adeno₃), nu am obținut inhibarea efectului în cazul virusurilor de tip ARN, iar în cel de al doilea caz, inhibarea efectului s-a manifestat asupra virusului Adeno₃, dar cu apariția tardivă a numeroaselor celule lezate și a sincitiiilor.

Comparând rezultatele obținute prin administrarea IDU culturilor de celule infectate cu virusul herpetic, cu cele obținute după administrarea ADN-neviral, am remarcat o diferență netă în inhibarea acestui proces; în acest ultim caz, e.c.p. s-a manifestat mai accentuat, celulele lezate au fost în număr mai mare și au persistat pînă la terminarea experimentelor, fără însă a produce generalizarea efectului (10 zile).

Dacă inhibarea e.c.p. s-a produs de IDU prin blocarea la nivelul unor etaje a resintetizării particulei virale herpelică, atunci după administrarea ADN-neviral s-ar putea să intervină un interferon elaborat de celulele din cultură, eventual o blocare a sistemului enzimatic al acestora ceea ce nu a dat posibilitatea infectării altor celule de către virusul resintetizat în celulele pe care le-a lezat. De altfel *Rotem* (33) a comunicat rezultatele cercetărilor sale asupra inhibării resintetizării virusului vaccinal în culturi de ce-

lu'e prin administrare de ARN-neviral. S-ar putea să fie vorba și în prezența cercetare de producerea de interferon care să inhibe e.c.p. Asupra acestei ipoteze vom reveni într-o lucrare ulterioară.

Concluzii

Comparând acțiunea IDU cu cea a ADN-neviral asupra inhibării efectului citopatic produs de virusul herpetic în culturi de celule Detroit-6 (VA), am remarcat o acțiune inhibitoare a 5-iodo-2-desoxiuridinei, cu apariția unor celule lezate într-un număr foarte mic și care s-au desprins rapid, rămânând pinza celulară normală. ADN-neviral a inhibat parțial acțiunea virusului herpetic, efectul citopatic manifestându-se prin rotunjirea și izolarea unor celule în focar fără generalizarea procesului nici după 10 zile de urmărire. IDU produce deci o inhibiție mai accentuată a efectului citopatic decât ADN-neviral. Cauza inhibării e.c.p. de către ADN-neviral nu este pe deplin stabilită, ipoteza propusă urmează a fi discutată după continuarea cercetărilor în această direcție.

Sosit la redacție: 30 martie 1967.

Bibliografie

1. AURELIAN L. ROIZMAN B.: J. Mol. Biol. (1965), 11, 539; 2. BEMDA R. Acta Virol. (1966), 10, 376; 3. BORMAN G. S., ROIZMAN B.: Biochim. Biophys. Acta (1965), 103, 50; 4. BOWEN J. M., HUGHES R. B., DMOCHOWSKY L.: Texas Rep. Biol. Med. (1966), 24, 143; 5. BOWEN J. M., HUGHES R. G., DMOCHOWSKY L.: Texas Rep. Biol. Med. (1966), 24, 143; 6. FALKE D.: Arch. ges. Virusforsch. (1965), 3, 387; 7. GNÄDIGER M., ZINTZ R.: Ophthalm. (1964), 4, 167; 8. GRAEBER W.: Klin. Mbl. Augenhk. (1964), 144, 75; 9. HOFFMANN D. H., SEEGER E.: Klin. Mbl. Augenhk. (1964), 144, 1; 10. IMRE GY., KORCHMAROS J., NÁSZ I., KULCSÁR G.: Mbl. Augen. (1964), 144, 81; 11. JEPSON C. N.: Am. J. Ophthalm. (1964), 57, 213; 12. KAUFFMANN H. E.: Arch. Ophthalm. (1962), 68, 692; 13. KAUFFMANN H. E., MARTOLA E. L., DOHLMAN C.: Arch. Ophthalm. (1962), 68, 235; 14. KAUFFMANN H. E., MALONEY E. D.: Arch. Ophthalm. (1962), 68, 396; 15. KAUFFMANN H. E., MALONEY E. S.: Arch. Ophthalm. (1963), 69, 626; 16. KAUFFMANN H. E., MARTOLA E. L., DOHLMAN C. H.: Arch. Ophthalm. (1963), 69, 468; 17. KAUFFMANN H. E., MALONEY E. D.: Pharmakotherapie (1963), 1, 43; 18. KAUFFMANN H. E.: Soth. Med. J. Ass. (1964), 57, 163; 19. LAIBSON P. R., SRY T. W., LEOPOLD I. H.: Arch. Ophthalm. (1963), 70, 32; 20. LAIBSON I. R., LEOPOLD I. H.: Am. Acad. Ophthalm. CRL (1964), I, 22; 21. LEHMAN S., DOYLE J., DOYLE R. F.: Nature (1962), 194, 986; 22. LERMAN S., EISENSCHMID J.: Am. J. Ophthalm. (1963), 56, 725; 23. MAAS G., MÜLLER J., NAKANOIM K., VOGT A., HAAS R.: Arch. ges. Virusforsch. (1965), 4, 549; 24. MAXWELL E.: Am. J. Ophthalm. (1963), 55, 237; 25. MAXWELL E.: Am. J. Ophthalm. (1963), 56, 571; 26. PEUTHERER J. F., SMITH J. W.: J. Path. Bact. (1966), 92, 230; 27. PEREIRA M. S., MC CAL-LUM F. C.: Lancet (1964), 25, 198; 28. PERSECHINO A., ORFEI Z.: Arch. ges. Virusforsch. (1965), 1, 116; 29. POP D., POPA D., SĂBĂDEANU V.: Rev. Med. (1966), 4, 364; 30. POP D., POPA D., SĂBĂDEANU V.: Rev. Med. (1966), 1, 29; 31. EYE R. C., HUGHES W. F., HOLMES A. W., DEINHARDT F.: Tr. Am. Ophthalm. Soc. (1963), 61, 100; 32. ROIZMAN R., AURELIAN L.: J. Mol. Biol. (1965), 11, 528; 33. ROTEM Z.: Israel J. Exp. Med. (1964), 11, 174; 34. RUDDER J.: Arch. Opht. (Paris), (1965), 25, 257; 35. STEPANIK J.: Klin. Mtbl. Augenbl. (1964), 144, 58; 36. WOLLENSAK J.: Dok. Ophthalm. (1966), 21, 408