

Catedra de microbiologie și inframicrobiologie (cond.: conf. I. László, doctor în medicină), Catedra de farmacognozie (cond.: prof. G. Rácz, doctor farmacist) și Catedra de igienă (cond.: prof. N. Horváth) ale I.M.F. Tg.-Mureș

ACTIUNEA UNOR SUBSTANȚE BIOLOGICE ȘI CHIMICE ASUPRA REPRODUCERII VIRUSURILOR HEPATITICE ȘI ADENOVIRUSURILOR

I. László, G. Rácz, V. Filep, C. Bedő, M. Péter, E. Bálint, Iuliana Both

Datorită legăturii strânse dintre virus și celula gazdă, chimioterapia virozelor constituie și astăzi o problemă dificilă. Virusurile mari, cele din grupul pararickettsiilor sînt sensibile față de antibioticele cu spectru larg, însă virusurile mici rămîn insensibile la aceste substanțe.

Literatura de specialitate înregistrează o serie de lucrări importante, legate de problema amintită (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13), scopul acestor cercetări fiind desigur găsirea unor substanțe biologice sau chimice, care ar în-

pieдика decursul reproducerii virusurilor însă fără alterarea organismului gazdă.

Deși majoritatea cercetărilor au fost efectuate pe culturi de celule, totuși acestea au contribuit la înțelegerea unor procese necunoscute în sinteza virusurilor, în urma căreia, unele substanțe au putut fi aplicate în profilaxia și tratamentul unor boli virotice. (N-metil-isatin-beta-tiosemicarbazona, Mecpacrina, PANS 610, IDU etc.).

Scopul cercetărilor noastre a fost de a studia acțiunea unor substanțe biologice și chimice asupra reproducerii virusurilor izolate din hepatită și virusurilor adeno.

Material și metodă

I. Substanțe biologice

1. *Extract de sulfină* (*Melilotus officinalis* L.) (3). Prepararea extractelor apoase s-a făcut la Catedra de farmacognozie a I.M.F. Tg.-Mureș. Doza pentru culturi de celule a fost 0.2 cc/2 cc mediu din diluția 1/20; iar pentru hamsteri de cca. 90—125 g din diluția 1/5 0.2 cc administrate intraperitoneal, consecutiv, 3 zile. În cercetările în care administrarea extractului de sulfină s-a făcut pe cale perorală, hamsterii au primit zilnic timp de 20 zile 100 g făină de mălai cu extract de sulfină (100 g făină + 20 cc extract).

2. *Substanță inhibitoră* (SI) extrasă din timus. a fost preparată de C. Bedő la catedra de igienă a I.M.F. Tg.-Mureș. Doza pentru culturi de celule a fost 0.2 cc/2 cc mediu din diluția 1/5.

3. *Lysozyme* (NBCo. Cleveland Ohio. USA). Doza pentru culturi de celule a fost 250 gamma/cc.

4. *Substanța X și 223*. filtratul a două tulpini de 24 ore de stafilococ alb nepatogen. Doza pentru culturi de celule: 0.2 cc/2 cc.

5. *Substanța SA*. filtratul unei tulpini de *Sarcina flava*. cultivată în mediu M 199, timp de 3—4 săptămâni. Doza pentru celule: 0.2 cc/2 cc mediu.

II. Substanțe chimice

1. *Hydroxy-benzyl-benzimidazol* (HBB). A fost preparat în laboratorul de virologie a I.M.F. Tg.-Mureș. de VI. Blazsek. Doza pentru culturi de celule a fost 45—90 gamma/cc mediu.

2. *6-Mercaptopurina* „Puri-Nethol“ tbl 50 mg (Burroughs Wellcome and Co. London). Doza pentru celule: 100 gamma/cc mediu.

III Tulpini de virusuri

Acțiunea agenților chimici și biologici a fost testată pe următoarele tulpini de virusuri izolate de noi din cazuri de hepatită: R, V/9, V/6. 163 S. 208, 209, 226. Caracterile morfologice, biologice și serologice ale acestor virusuri au fost studiate în lucrările noastre anterioare (10, 11). Titrul virusurilor în experiențele de față, adică 1000 DCP₅₀ a fost 0.2 cc din diluția 10⁻².

Pentru compararea acțiunii substanțelor folosite asupra reproducerii virusurilor din tip ADN și ARN s-au utilizat virusurile adeno tip 3, virusul Rc (un adenovirus izolat de noi din hepatită), virusul vaccinal și virusul ECHO tip 13. În cursul cercetărilor acțiunea substanțelor pe celule a fost studiată față de 1000 DCP₅₀ de virus.

IV. Linia de celule

În cursul cercetărilor am folosit celulele Detroit-6 (VA) obținute de noi în 1964. Mediul de menținere a fost M 199 1 parte + mediul Earle 2 părți, la care s-a adăugat 3,5% ser de vițel inactivat și penicilină 100 U/cc.

V. Studiarea acțiunii substanțelor biologice și chimice asupra virusurilor pe celule Detroit-6 (VA)

Din fiecare produs biologic și chimic doze în prealabil titrate s-au adăugat culturilor de celule înainte de infectare cu virus, menținând tuburile în poziție orizontală la temperatura camerei timp de 30 minute. După acest timp fiecărui tub i-am adăugat doza de virus (1000 DCP₅₀), păstrind tuburile încă 30 minute în condițiile de mai sus. Din fiecare material s-au inoculat câte 5 tuburi, același număr de tuburi cu celule fiind întrebuițate ca martori normali și de virus. Tuburile inoculate au primit încă 1.6 cc mediu de menținere, după care, timp de 8—12 zile au fost controlate zilnic pentru determinarea efectului citopatic (ECP).

VI Experiențe pe animale

1. *Experiențele cu extract de sulfină* au fost efectuate în două serii. În seria I-a 19 hamsteri au fost tratați în modul următor: 12 hamsteri au fost inoculați intraperitoneal cu virus hepatitic R cu doza de 0.5 cc din 2 în 2 zile de trei ori, după care în 3 zile consecutive au primit intraperitoneal extract de sulfină din diluția 1/5, câte 0.2 cc. Trei hamsteri au fost inoculați de trei ori numai cu virusul R (0.5 cc i. p. de 3 ori), 2 animale au fost inoculate cu extract de sulfină (0.2 cc din diluția 1/5 de trei ori), 2 hamsteri ne-au servit ca martori sănătoși, neinoculați.

După o lună de la începutul inoculărilor din fiecare lot câte 2 animale au fost sacrificate, iar ficatul examinat histologic și electronmicroscopic. După 14 zile de la infectare și tratament, din materiile fecale s-au efectuat însămînțări pe celule Detroit-6 (VA), pentru controlul eliminării virusurilor.

2. În a II-a serie de experiențe 11 hamsteri au fost tratați în modul următor: 3 animale au primit extract de sulfină peroral timp de 20 de zile, 4 animale virus R din 2 în 2 zile (total 3.5 cc) intraperitoneal; 4 animale au primit virus R (total 3.5 cc), iar după 6 săptămâni au primit timp de 20 zile extract de sulfină pe cale bucală. După 2 săptămâni de la terminarea tratamentului s-a studiat eliminarea virusurilor prin materiile fecale la hamsteri, utilizând metoda de izolare a virusurilor hepatitice folosită de noi.

Rezultate

I. *În legătură cu acțiunea unor substanțe biologice asupra reproducerii virusurilor pe celule Detroit-6 (VA)*, observațiile noastre sînt următoarele:

— *Extractul de sulfină* are o acțiune inhibantă asupra reproducerii virusurilor izolate din hepatită (virusurile R, 163 S, V/6, V/9 și 208), inhibă multiplicarea virusului ECHO tip 13, scade intensitatea multiplicării virusurilor adeno (tulpinile adeno-3 și Rc), și intensifică multiplicarea virusului vaccinal.

— *Substanța inhibitoare extrasă din timus (SI)* cu excepția virusului R, atenuază reproducerea virusurilor hepatitice 163 S și V/9, inhibă virusurile V/6, 208 și 209, însă intensifică multiplicarea virusurilor de tip ADN.

— *Lizozimul* nu influențează semnificativ reproducerea virusurilor care conțin ARN sau ADN.

— *Substanța SA* (filtrat de Sarcina flava) contribuie la apariția precoce al ECP cauzat de virusul R și adeno-3 și micșorează ECP cauzat de virusul vaccinal.

— *Filtratul de stafilococ alb* (X și 223) din cultură de 24 ore inhibă reproducerea virusului adeno tip 3.

II. Acțiunea agenților chimici asupra reproducerii virusurilor pe celule Detroit-6 (VA):

Dintre agenții chimici HBB inhibă complet replicarea unor virusuri izolate din hepatită, ca tulpinile V/6, V/9, 208 și 226, precum și virusul ECHO-13 — deci acționează asupra virusurilor care conțin ARN. 6-Mercaptopurina nu are nici un efect inhibitor asupra virusului R și 209 și nici asupra virusurilor adeno-3 sau v. vaccinal.

III. Experiențe pe animale cu extract de sulfină

Seria I.

Animalele (hamsterii) infectate pe calea intraperitoneală și tratate ulterior cu extract de sulfină nu elimină virus. Examinările histopatologice cît și cele electronoptice nu arată alterări patologice la animalele tratate, numai acele care au fost inoculate exclusiv cu virusul R.

Din materiile fecale ale animalelor infectate cu virusul R, agentul patogen a putut fi reizolat folosind linia de celule Detroit-6 (VA). Acest virus în ficatul hamsterilor cauzează apariția particulelor virotice, caracteristice în hepatită (11).

Seria II.

Extractul de sulfină administrată hamsterilor pe cale orală, inhibă reproducerea virusului (tulpina R), deoarece din materiile fecale ale hamsterilor nici după 3 treceri nu a putut fi reizolat virusul.

Discutarea rezultatelor

În cercetările noastre anterioare am atras atenția asupra faptului că virusurile hepatitice umane, care deseori cauzează infecția latentă a celulelor, pot fi cultivate numai la un pH ușor alcalin și pe linii de celule cu un metabolism accentuat cum ar fi și linia Detroit-6 (Va). Reproducerea lor lentă, cu un efect citopatic deseori moderat, sau chiar absent îngreunează decelarea lor. Folosind în cercetările de față hidroxy-benzyl-benzimidazolul (HBB) am constatat că această substanță inhibă complet reproducerea virusurilor hepatitice izolate de noi și totodată și virusul ECHO tip 13, deci virusurile izolate de noi din hepatită fac parte din grupul virusurilor de tip ARN. Este interesantă însă o altă constatare, că o tulpină izolată din hepatită (tulpina 226), care din punct de vedere morfologic este asemănătoare cu adenovirusurile, nu se multiplică în prezența HBB-ului.

Părerea noastră asupra etiologiei hepatitei epidemice, pe baza unor cercetări complexe efectuate în anii din urmă, este că virusurile hepatitice sînt virusuri defective, care se reproduc probabil numai în prezența unui adenovirus auxiliar. Aplicînd metoda de imunofluorescență am putut într-adevăr demonstra existența unei înrudiri antigenice dintre virusurile hepatitice care se reproduc în citoplasmă (163 S. V/9, S 239) și cele care se multiplică în nucleu (virusul 226). Probabil că prin această înrudire antigenică acționează și HBB asupra unui virus (226) cu aspect morfologic de adenovirusuri.

Cercetările cu extract de sulfină pe hamsterii infectați în prealabil cu virus hepatitic, arată că animalele după un tratament parental sau peroral cu această substanță, nu elimină virusuri și nici alterări microscopice sau submicroscopice evidente nu pot fi detectate la animalele tratate, față de cele inoculate cu virus. Aceste observații indică necesitatea aprofundării cercetărilor cu extractul de sulfină, cu scopul de a elucida mecanismul de acțiune asupra reproducerii virusurilor hepatitice.

Concluzii

1. Extractul de sulfină atit in vitro, cit și in vivo, inhibă reproducerea unor tulpini de virusuri, izolate din hepatită.

2. Lizozimul, 6-mercaptapurina în doza folosită de noi nu exercită nici o acțiune inhibantă asupra virusurilor hepatitice.

3. Dintre agenții chimici HBB, care inhibă reproducerea virusurilor de tip ARN pe celule Detroit-6 (VA) inhibă și reproducerea virusurilor hepatitice, însă substanța inhibitoare extrasă din timus (SI) exercită un efect inhibant parțial.

Sosit la redacție: 18 aprilie 1968.

Bibliografie

1. ACKERMANN W. W.: J. Exp. Med. (1951), 93, 635; 2. BLASKOVIC O., RADA B.: IX. Int. Congr. Microbiol. Moscow, July 24—30, 1966, 529; 3. EVDOCHIA COICIU, G. RACZ: Plante medicinale și aromatice. Edit. Acad. R.P.R. 1962, București; 4. GALEGOV G. A.: IX. Int. Congr. Microbiol. Moscow, 1966, 530; 5. GROUPE V., PUGH L. M., LEVINE A.S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1952), 80, 710; 6. HALVORSON H. O., SPIEGELMAN S.: J. Bact. (1952), 64, 207; 7. HIRUNA Y., ITO Y., MATSUMOTO SH., ISHIDA N.: cit. Rivers-Horsfall: Viral and Rickettsial Infections of Man, 3rd Ed. Lippincott Co, 1959; 8. HORSFALL F. L., McCARTY: J. Exp. Med. (1947), 85, 623; 9. KAUFFMAN H. E., MALONEY E. D.: Pharmacotherapia (1963), 5, 1, 43; 10. LÁSZLÓ J., BÁLINT E., FILEP V., PÉTER M., ABRAHÁM A., ALMÁSI ZSUZSA: Nature (1965), 207, 326; 11. LÁSZLÓ J., PÉTER M., FILEP GY., BÁLINT E., ALMÁSI SUSANNE, ABRAHÁM S., SABÁU MONICA: Z. ges. Inn. Med. (1966), 6, 174; 12. MARRENIKOVA S. S., KAPTSOVA T. J.: IX. Int. Congr. Microbiol. Moscow, (1966), 545; 13. TAMM I., TYRREL D.A.J.: J. Exp. Med. (1954), 100, 541.