

CONTRIBUŢII LA ETIOLOGIA VIRALĂ A REUMATISMULUI ACUT

Nota X: Studiul histochimic al culturilor de celule infectate cu virusul „R”

Al. Ábrahám, Magdalena Babonits, Monica Sabău

În cursul anilor precedenţi, am comunicat datele cercetărilor noastre cu privire la izolarea unor virusuri din lichidul cefalorahidian al copiilor bolnavi de reumatism acut. Pe parcurs am verificat comportarea acestor virusuri pe culturi de celule monostratificate de rinichi de maimuţă *Cercopithecus Aethiops* (R₁CA), cord de maimuţă *Cynomolgus* (CM) şi pe celule primare, obţinute prin tripsinizarea diverselor tesuturi utilizate în mod curent în laboratoarele de virusologie (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8). Rezultatele noastre demonstrează că, aceste virusuri, considerate de noi candidate pentru reumatism acut şi denumite virusuri „R”, administrate la iepuri concomitent cu extract streptococic, produc miocardită acută, cu apariţia unor granuloame de tip Aschoff (9). Valorile rezultatelor noastre histologice însă, nu erau în concordanţă cu cele obţinute prin reacţia ASLO, care se deosebeau de la animal la animal. Faptul, că nici virusul individual, nici extrasul streptococic nu au indus miocardită evidentiabilă, în schimb complexul virus + extract streptococic a produs leziuni cardiace, ne-a determinat să presupunem o legătură între aceste două microorganisme în procesul declanşării bolii.

În literatura de specialitate se găsesc referiri la obţinerea miocarditelor experimentale la animale, prin administrare de virusuri Coxsackie, în special a celor din grupa B (10, 11, 12, 13, 14, 20, 21, 23, 26, 27, 28). De la bolnavii de miocardită acută, s-au izolat şi alte virusuri, respectiv în serul acestora s-au găsit anticorpi antivirali (15). Persistă totuşi o neconcordanţă între diversii adepţi ai etiologiei reumatismului acut, ca cei ai streptococului, autoimunităţii, autoagresiunii etc. (16, 17, 19, 22, 24).

Virusul „R” izolat de noi şi considerat ca agent etiologic în reumatism acut — în formaţia virus+extras streptococic — a fost cercetat în laboratorul nostru, adaptat culturilor celulare de natură tumorală HeLa şi KB. Deoarece în literatura de specialitate se arată că, virusul Coxsackie din grupa B joacă un rol important în etiologia miocarditelor, iar în cercetările noastre am presupus o oarecare legătură imunologică, neevidentiabilă încă, între virusul „R” şi virusul Coxsackie din grupa B, am verificat reacţiile histochimice ale celulelor R₁CA şi HeLa după infectarea lor cu virusurile de mai sus. Prezenta lucrare redă rezultatele acestor cercetări.

Material şi metode

Virusul „R” a fost titrat pe culturile celulare HeLa şi R₁CA, fiind considerat titrul DCP₅₀ = 10³/ml; în cercetările noastre am folosit titrul de 2.10^{1.5}/ml mediu, cantitate care a produs la 48—72 de ore după infecţie în mod constant efect citopatic.

Virusul Coxsackie B—5, izolat de noi de la cazuri de miocardite acute la sugari şi copii mici (10), a avut un titru DCP₅₀ = 10⁴/ml. În experiment am folosit doza 2 10²/ml mediu, cu care am obţinut efectele citopatice dorite în culturile de celule de mai sus.

* Lucrare prezentată la U.S.S.M. Secţia patol. infecţioasă Tîrgu Mureş, la 23 I 1969.

Culturile de celule HeLa, de natură tumorală și R₁CA normale, menținute în laboratorul nostru prin versenizare de ani de zile, au fost infectate după obținerea de pinză celulară monostratificată, cu o cantitate de 0,2 ml de virus, din doza de mai sus.

Pentru reacțiile histochemice, pinza celulară infectată cît și cea de control, a fost fixată cu soluția Carnoy, respectiv formalină tamponată și extrasă cu celoidină. Această pinză celulară a fost montată pe lamă, obținându-se astfel celulele nealterate, în strat compact în mărimea dorită (5, 30).

Glicogenul a fost determinat prin reacția PAS, fosfataza alcalină și acidă prin metoda Gömöry modificată (18, 30), iar acidul ribonucleic cu colorația de galocianină (5). S-au folosit martori pentru colorație și martori ai culturilor de celule neinfectate. În total am folosit în acest experiment un număr de 480 de tuburi cu culturi de celule HeLa și R₁CA.

Rezultate

Glicogenul, în culturile celulare R₁CA, după 48—72 de ore de la infecție cu virusul „R”, s-a localizat în citoplasma celulară sub formă de granulații mici, uneori mai mari, colorate în roșu, formînd în jurul nucleului, conglomerate masive roșii. În celulele martore, neinfectate, granulele de glicogen, PAS pozitive s-au orientat în același mod, însă ele erau mai fine și mai dispersate.

Celulele R₁CA, infectate cu virusul Cocksackie B—5, au prezentat granulații PAS pozitive mai mici decît cele infectate cu virusul „R”.

În celulele HeLa martore, glicogenul s-a localizat în special la periferia citoplasmei sub forma unor granulații fine, care însă, în imediata vecinătate a nucleului s-au îngroșat, formînd conglomerate masive, roșii.

Celulele HeLa infectate cu virusul „R”, au prezentat o aglomerare a glicogenului, ceea ce, microscopic s-a manifestat printr-o colorație mai abundentă, conglomerări mai mari și în număr relativ mai mare. După 48 de ore de la infecția acelorași celule cu virusul Cocksackie B—5, glicogenul s-a localizat mult mai abundent în împrejurimea nucleului și mai rar și mai fin la periferia citoplasmei. Comparînd cele două tipuri de culturi de celule infectate cu virusurile amintite, se observă o diferență netă în localizarea glicogenului, evidențiable prin densitatea mărită a glicogenului PAS-pozitiv în celulele infectate cu virusul Cocksackie B—5. Pe alocuri, în aceste celule, toată masa citoplasmatică prezintă conglomerări de glicogen, deslușindu-se foarte greu relieful granulațiilor roșii (fig. 1, 2, 3).

Fosfataza acidă, efectuată în repetate rînduri prin ambele metode pe cele două tipuri de culturi de celule, folosind aceleași virusuri, nu a putut fi evaluată. Deși de la această reacție am așteptat cel mai interesant rezultat, totuși, poate din cauza substanțelor de calitate slabă folosite în experiment, nu am obținut rezultatele scontate. Din această cauză, aceste rezultate au fost omise din prezentul experiment.

Fosfataza alcalină, a fost verificată numai pe culturi de celule HeLa. În această reacție am observat o deosebire marcată între localizarea acesteia în celulele infectate cu virusul „R” și virusul Cocksackie B—5. La 48 de ore după infecție, celulele cu granulații fine colorate în negru se deosebeau de cele neinfectate, deși și aceste celule conțineau fosfataza alcalină, însă era prezentă în majoritatea celulelor rotunjite, îmbătrînite sau degradate. După 72 de ore de la infecție, celulele cu efect citopatic, conțin agregate colorate în negru și granulațiile nu se mai individualizează, ele acoperind uneori și nucleul. Celulele neinfectate, martore, deși prezintă o activitate fosfatazică alcalină, aceasta este mult mai scăzută decît în celulele infectate, iar granulațiile negre se evidențiază net în citoplasmă. În apropierea nucleului, ele formează pe alocuri conglomerate negre. Deosebirea marcantă observată între celulele

AL ABRAHAM ȘI COLAB : CONTRIBUTII LA ETIOLOGIA VIRALA
A REUMATISMULUI ACUT. NOTA X.



Fig nr. 1: Cultură de celule HeLa martor. Reacția PAS. Mărire: Imersie.

Fig. nr. 2: Cultură de celule HeLa infectat cu virusul Cox-sackie B-5. Reacția PAS. Mărire: Imersie.



Fig nr. 3: Cultură de celule HeLa infectat cu virusul „R”. Reacția PAS. Mărire: Imersie.

Fig nr. 4: Cultură de celule HeLa martor. Fosfatiza alcalină. Mărire: ob 40 X. oc. 8X.

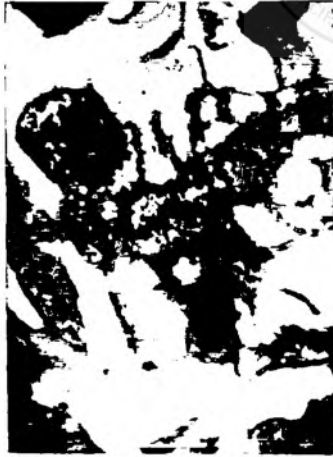


Fig nr. 5: Cultură de celule HeLa infectat cu virusul Coxsackie B-5. Fosfataza alcalină. Mărire: Imerție.



Fig nr. 6: Cultură de celule HeLa infectat cu virusul „R”. Fosfataza alcalină. Mărire: Imerție.



Fig. nr 7: Cultură de celule HeLa infectat cu virusul Coxsackie B-5. Colorație: gallocianină. Mărire: Imerție.



Fig. nr. 8: Cultură de celule infectat cu virusul „R”. Colorație cu gallocianină. Mărire: Imerție.

infectate cu virusul „R” și Coxsackie B—5, pare să fie mai accentuată la acestea din urmă care au prezentat conglomerate mai abundente față de martori (fig. 4, 5, 6).

Detectarea acidului ribonucleic cu colorație galocianinică, a fost dată prin colorabilitatea nucleolilor măriți la celulele infectate, observându-se totodată și ușoare granulații colorate în citoplasma celulară. În cazul infectării celulelor cu ambele virusuri, celulele R₁CA, au prezentat nucleoli măriți față de martori, care s-au colorat intens, în special în cazul celulelor cu efect citopatic (rotunjite-stelate). Asemenea efect s-a observat și în celulele infectate, de tip HeLa, cu o oarecare accentuare a colorabilității, probabil din cauză că aceste celule erau mai intens supuse activității virale.

Virusul Coxsackie B—5 a produs un efect mai pronunțat decât virusul „R”, nucleolii au devenit mai mari, deci au prezentat conglomerate mai masive, care uneori au ocupat majoritatea suprafeței nucleare.

Cea mai mare posibilitate de diferențiere s-a înregistrat la 72 de ore după infecția cu virusul Coxsackie B—5, când reacția cu galocianină era mai accentuată față de celulele infectate cu virusul „R” (fig. 7, 8).

Discuții

Virusul Coxsackie B—5 produce efect citopatic foarte asemănător cu virusul „R” pe culturile de celule amintite mai sus, totuși în reacțiile histochemice se observă o diferență, reacțiile fiind mai accentuate în cazul virusului Coxsackie B—5. Trebuie însă, să se țină seama și de degradarea unor celule în pinza celulară normală, care prezintă reacție histochemică pozitivă.

Acumularea de glicogen în celulele lezate de virusuri, se datorește ori activității metabolice scăzute a celulei respective, ori deteriorării sistemelor enzimactice.

În procesul de infecție cu virusul „R” și Coxsackie B—5, schimbările metabolice ale celulelor sînt îndreptate în direcția resintetizării acidului ribonucleic viral și a proteinelor virale, mai puțin a celor celulare, fapt care se realizează prin însăși distrugerea masivă și treptată a celulei. Acestui fapt i se datorește creșterea activității fosfatazei alcaline obținută prin metodele histochemice.

Acizii ribonucleici se găsesc în cantitate considerabilă în celulele infectate cu virusuri de tip ARN. Centrul sintezei proteinelor este nucleul, mai precis cromatina. Acest acid nucleic, prin introducerea masivă a virusurilor în celule, se acumulează, iar reacția cu galocianină este pozitivă, ceea ce echivalează acțiunii intense de resintetizare a proteinelor virale. Am considerat că participarea activă și nelipsită a nucleolilor în procesul resintetizării virale, se manifestă prin mărirea în volum a acestora, și prin accentuarea reacției de colorabilitate.

Concluzii

Reacțiile histochemice efectuate la culturile celulare R₁CA și HeLa infectate cu virusurile „R” și Coxsackie B—5 au fost pozitive la 48 de ore și mai accentuate la 72 de ore. Activitatea fosfatazei alcaline, acumularea de glicogen și prezența crescută a acidului ribonucleic în aceste celule, deși mai accentuate în cazul virusului Coxsackie B—5, ridică posibilitatea înrudirii acestor două virusuri. Cercetările imunochimice vor putea aduce dovezi în favoarea acestor posibilități.

Sosit la redacție: 24 ianuarie 1969.

Bibliografie

1. ABRAHÁM AL., FILEP GY., NUSSBAUM O.: Simpozion de reumatologie, Tîrgu Mureș, 1961;
2. ABRAHÁM AL., PAPP Z.: Orv. Szle. (1963), 3, 284;
3. ABRAHÁM AL., PAPP Z.: Proc. of IV. Congr. of the Hung. Microbiol., Budapest, 1964;
4. ABRAHÁM AL., SABÁU MONICA, NUSSBAUM O., PAPP Z.: Orv. Szle.

(1965), 1. 41; 5. ÁBRAHÁM AL.: Teză de doctorat, I.M.F., București, 1965; 6. ÁBRAHÁM AL., SABÁU MONICA, NUSSBAUM O.: Rev. Med. (1966), 1. 45; 7. ÁBRAHÁM AL., FILEP GY.: Rev. Med. (1966), 3. 289; 8. ÁBRAHÁM AL., FILEP GY., SABÁU MONICA, NUSSBAUM O., SEBE B.: Stud. cerc. inframicrobiol. (1967), 5. 337; 9. ÁBRAHÁM AL., BABONITS MAGDA, MONICA SABÁU: Considerații asupra etiologiei virale a reumatismului acut. Comunicare U.S.S.M. Tirgu Mureș. Secția patol. infect. 23 I 1969; 10. ÁBRAHÁM AL., DOMOKOS KLÁRA, CSIDEY J.: Virusul Coxsackie B; răspunzător pentru miocarditele acute ale sugarului. Comunicare U.S.S.M. Tirgu Mureș. Secția patol. infect. 23 I 1969; 11. BERKOVICH S., RODRIGUEZ-TORREZ R., SHOUNG-LIN J.: Am. J. Dis. Child. (1968), 115. 207; 12. BRIGHTMAN V. J., Mc NAIR, SCOTT T. F., WESTPHAL M., BOGGS T. R.: J. Ped. (St. Louis) (1966), 2. 179; 13. BROWN C. G.: Am. Heart. J. (1968), 2. 145; 14. BURCH G. E., SUN S. C., COLCOLOUGH H. L., SOHAL R. S., DE PASQUALE N. P.: Am. Heart. J. (1967), 1. 13; 15. GAINER J.: J. Am. Veter. Med. Ass. (1967), 4. 421; 16. GERACI J. E., HANSON K. C., GIULIANI E. R.: Mayo Clin. Proc. (1968), 43. 420; 17. GINSBURG J., LAUFER A., ROSENBERG S. Z.: Brit. J. exp. Path. (1960), 1. 19; 18. GÖMÖRI G.: Proc. Soc. exp. Biol. (1939), 42. 23; 19. HALPERN B. N., RAHMAN S.: Brit. J. Pharmacol. Chemoter. (1968), 3. 441; 20. KIBRICK S., BENIRSCHKE K.: New-Engl. J. Med. (1956), 255. 883; 21. KILBOURNE E. D., WILSON C. B., PERRIER D.: J. Clin. Invest. (1956), 4. 362; 22. LAUFER A., ROSENMANN A., DAVIES A. M.: Brit. J. exp. Path. (1966), 6. 605; 23. LIEBESKIND B.: Thèse nr. 2864. Genève, 1963; 24. NAKHALA L. S., GLYNN L. E.: Immunol. (1967), 2. 209; 25. SEIFERTH J.: Ztschr. g. exp. Med. (1967), 142. 69; 26. SUSSMAN M. L., STRAUSS L., HODES H. L.: A.M.A. Child. (1959), 97. 483; 27. VAN CREVELD S., JAGER D. H.: Ann. Paed. (1956), 1/2, 100; 28. VERLINDE J. D., VAN TONGEREN H. A., KRET A.: Ann. Paed. (1956), 1/2. 113; 29. WEGELIUS O., KLOCKARS M., VAINIO K.: Acta med. scand. (1968), 183. 549; 31. WIENER F., ÁBRAHÁM AL., BABONITS MAGDA: Rev. Med. (1958), 3—4, 210.