

Disciplina de microbiologie stomatologică (cond.: șef de lucrări dr. M. Péter, doctor în medicină), Disciplina de microbiologie și inframicrobiologie (cond.: prof. dr. I. László, doctor în medicină) ale I.M.F. și Academia de științe medicale, Centrul de cercetări medicale (cond.: prof. dr. L. Csögör, doctor-docent, medic emerit, membru al Academiei de științe medicale) din Tirgu Mureș

CERCETAREA PATOGENITĂȚII TULPINILOR DE ESCHERICHIA COLI PE CULTURI DE CELULE * Nota IV.

dr. Monica Sabău, dr. Mirela Becuș, dr. L. Domokos

Într-o lucrare anterioară (13) am demonstrat existența unei corelații între proveniența tulpinilor de *Esch. coli* și efectul produs asupra unor tipuri de culturi celulare, în sensul că, tulpinile izolate de la cazuri cu enterocolită acută au produs modificări celulare la doze infectante minime. Aceste modi-

* Lucrarea a fost comunicată la sesiunea anuală a Centrului de cercetări medicale Tirgu Mureș, ianuarie 1971.

ficări sînt caracterizate prin detaşarea legăturilor intercelulare, rotunjirea celulelor şi micşorarea lor în volum, refringenta protoplasmăi care este lipsită de structură, nucleu picnotic intens colorabil. Tulpinile izolate de la sănătoşi nu au produs aceste efecte nici la doze infectante mari.

Am demonstrat de asemenea (12) că acest efect citopatic este determinat de adsorbţia, penetrarea şi multiplicarea intracitoplasmatică a germeilor, multiplicare ce depinde probabil de virulenţa suşelor, germeni care posedă o virulenţă mărită dezvoltîndu-se în citoplasmă, în timp ce pentru flora banală, respectiv pentru tulpinile izolate de la copii fără manifestări digestive, această multiplicare a fost minimă.

Înmulţirea intracitoplasmatică a germeilor patogeni şi deci inducerea efectului citopatic este legată probabil de anumite perturbări produse de aceşti germeni în metabolismul celular.

În acest sens, în lucrarea de faţă am urmărit modificarea unor constituenţi chimici şi enzimatici ai celulelor infectate cu suşe patologice de *Esch. coli*.

Material şi metodă

Am utilizat linia celulară KB, pe care am infectat-o cu suspensii de *Esch. coli*, izolate de la bolnavi cu enterocolită acută, conţinînd 10 şi 1000 germeni ml. La 30 de minute după infectare, culturile au fost spălate cu o soluţie tampon fosfat sterilă, operaţia repetîndu-se de 3 ori, din 30 în 30 de minute.

În scopul urmăririi unor constituenţi chimici şi enzimatici ai celulelor am aplicat următoarele metode histochemice (8, 11):

- metoda cu albastru de bromfenol sublimat — Mazia — (pentru evidenţierea proteinelor totale);
- metoda cu verde metil pironină (pentru acizii nucleici);
- metoda PAS (pentru evidenţierea mucopolizaharidelor);
- metoda PAS după o prealabilă digestie cu amilază (pentru evidenţierea glicogenului);
- metoda Gömöri (pentru fosfatazele acide şi alcaline);
- metoda Nachlas cu Nitro BT (pentru succindehidrogenază).

Rezultate şi discuţii

Tabloul histochimic al celulelor infectate cu suşe patologice de *Esch. coli* prezintă următoarele aspecte:

— proteinele scad pînă la dispariţie în citoplasmă, rămîind pozitive în nucleu, spre deosebire de celulele martore unde sînt repartizate uniform şi difuz în citoplasmă, cu o intensitate de culoare mai crescută la nivelul nucleilor;

— prin coloraţia cu verde de metil pironină am evidenţiat prezenţa ARN-ului în citoplasmă şi nucleoli şi a ADN-ului în cromatina nucleară a celulelor martore. Infectarea culturilor de celule cu suşe patologice de *Esch. coli* duce la scăderea aproape totală a ARN-ului, ADN-ul avînd aspect normal;

— urmărind dinamica modificării mucopolizaharidelor şi a glicogenului am observat că în timp ce la martori reacţia PAS ne evidenţiază o dispersare difuză a granulelor în citoplasma celulelor, în celulele infectate poziţia lor este neuniformă, scăzînd în zona mijlocie şi externă a citoplasmăi şi acumulîndu-se în granule mari sub aspectul unei coroane perinucleare;

— activitatea fosfatazei alcaline prezintă în citoplasma celulelor martore sub aspectul unor granule fine, localizate difuz, cręste semnificativ în celulele infectate, apărînd microscopic sub aspectul unor conglomerate mari, negre, care acoperă şi nucleul;

— fosfataza acidă manifestă la celulele infectate o scădere semnificativă în citoplasma celulară, spre deosebire de celulele neinfectate, unde este prezentă atât în citoplasmă, cât și în nucleu, sub forma unor granulații fine pulverulente intens pozitive;

— un tablou asemănător ne prezintă și succindehidrogenaza: de la o poziție difuză a granulelor violete de formazan în citoplasma celulelor mar-tore, activitatea acestei enzime scade pînă la dispariție totală în culturile de celule infectate.

Datele recente din literatură dovedesc că, proteinele celulare considerate altă-dată ca elemente structurale fixe ale edificiului citoplasmatic iau parte activă în procesele metabolice. Trecerea de la o excitație normală la una patologică (depinzînd de gradul excitației) duce la denaturarea proteinelor, denaturare care poate deveni ireversibilă în caz de iritație patologică. Cercetările noastre asupra proteinelor din celulele infectate cu sușe patogene de *Esch. coli*, dovedesc grade variate ale modificărilor survenite în procesul de degradare. Astfel, am găsit o scădere marcată a proteinelor, tradusă prin pierderea afinităților tinctoriale, mergînd pînă la reducerea colorării lor cu albastru de bromofenol sublimat. Scăderea proteinelor totale este însoțită de o dezintegrare a structurii proteinelor: fibrilare, care iau aspect granular, realizînd tabloul tipic al alterării metabolismului protidic.

În favoarea acestor constatări vin și modificările acizilor nucleici, în special a ARN-lui, care a manifestat o tendință marcată de scădere pînă la dispariția totală, cromofobia fiind interpretată de *Casperson* (4) ca o consecință a unei stimu-lări crescute a celulei.

Intrucît *Allison* (1, 2, 3) și *Mallucci* (9) au demonstrat rolul enzimelor lizo-zomale în genaza efectului citopatic produs de anumite virusuri, am cercetat și noi comportarea fosfatazelor acide și alcaline în celulele infectate.

Alterarea distribuției mucopolizaharidelor, a glicogenului și a acizilor nucleici atrage după sine și modificări în activitatea acestor enzime. Astfel, celulele infectate au prezentat o marcată tendință de creștere a fosfatazei alcaline, în timp ce curba activității fosfatazei acide a scăzut.

Scăderea activității fosfatazei a fost înregistrată și de *Nagy* (10) în epiteliu mucoasei jejunale a copiilor, mai ales cînd acest epiteliu prezintă alterări toxice sau inflamatorii mai accentuate.

Mitocondriile sînt organite celulare care dețin în structura lor enzime oxido-reductoare, sistemele oxidative jucînd un rol important în procesele metabolice și respiratorii ale celulelor vii. Activitatea succindehidrogenazei este strict legată de integritatea structurală a celulei, respectiv a mitocondriilor.

Scăderea pînă la dispariție a acestei enzime în celulele infectate, corelată cu aspectul citopatic al celulelor, este o dovadă în plus a distrugerii funcțiilor normale ale celulei, respectiv a metabolismului energetic.

Infectînd culturi de celulele renale de embrion uman cu tulpini atipice de *Esch. coli*, tulpini cu fracțiuni antigenice de *Sh. flexneri*, *Domokos* (5, 6), a observat în aceste celule inhibarea activității succindehidrogenazei.

Diminuarea accentuată a acestei enzime a fost înregistrată și pe culturi de celule infectate cu virusuri. *Wiener*, *László* și *Szekely* (14) semnaleză scăderea pînă la dispariție a activității succindehidrogenazei în culturi de celule Detroit 6(VA) infectate cu virusuri hepatice, iar *Kim Ho* (7) dovedește același lucru pe culturi de celule R₁CA infectate cu virusul Coxsackie B₄.

Infectarea culturilor de celule cu sușe patogene de *Esch. coli* determină deci o stare de epuizare a mijloacelor care furnizează energia necesară resintetizării constituenților chimici și energetici, ducînd la o modificare a structurii chimice a celulei, care se vizualizează prin alterarea gravă a metabolismului protidic, gluci-dic și energetic.

Concluzii

Bulversarea metabolismului protidic, glucidic și energetic, tradusă prin scăderea proteinelor totale, a acizilor nucleici, mucopolizaharidelor, fosfatazei acide și succindehidrogenazei, precum și creșterea activității fosfatazei alcaline, determinată de pătrunderea și multiplicarea germeilor patogeni în citoplasma celulară este după părerea noastră una dintre cauzele inducerii de către acești germeni a efectului citopatogen.

Sosit la redacție: 6 februarie 1971.

Bibliografie

1. ALLISON M., ZAPPASODI P., LURIE M.: Amer. Rev. Resp. Disease (1961), 84, 3, 364;
2. ALLISON M., ZAPPASODI P., LURIE M.: Amer. Rev. Resp. Disease (1962), 85, 3, 364;
3. ALLISON C., MALLUCCI L.: J. exp. Med. (1965), 121, 3, 463;
4. CASPERSON T. O.: Cell growth and cell function, Ed. Norton, New York, 1950;
5. DOMOKOS L., LÁSZLÓ I., PAP Z., SEBE B.: Siófoki Közegészségügyi Napok. VIII—IX, 90;
6. DOMOKOS L., LÁSZLÓ I., SEBE B., PAP Z.: Patogenitatea unor tulpini de Esch. coli cu fracțiuni antigenice străine la animale de experiență și pe culturi de celule. Sesiunea științifică a I.M.F. Tîrgu Mureș, 1959;
7. KIM HO U., ATHANASIU P., PETRESCU AL., RUSSU M., SAMUEL I.: Rev. Roum. d'Infra-microbiol. (1969), 6, 1, 23;
8. KISZELY GY., BARKA T.: Gyakorlati mikrotechnika és hisztokémia, Ed. Medicina, Budapest, 1958;
9. MALLUCCI L., ALLISON C.: J. exp. Med. (1965), 121, 3, 477;
10. NAGY V., MALATINSZKY E., PUSKÁS GH., GYERGYAY F.: Rev. Med. (1968), 1, 52;
11. PEARSE A. G.: Histochemistry Theoretical and Applied, Ed. II, Churchill Ltd, London, 1960;
12. SABÁU M., ABRAHAM AL.: Rev. Med. (1969), 2, 180;
13. SABÁU M., ABRAHAM AL.: Rev. med. chir (1969), 3, 667;
14. WIENER F., LÁSZLÓ I., SZÉKELY K.: Experientia (1967), 23, 84, 1—4.