

## OBSERVAȚII ÎN LEGĂTURĂ CU ETIOLOGIA VIRALĂ A LEUCEMIILOR UMANE

I. László, V. Filep

Cercetările virusologice complexe din ultimii ani în problema etiologiei virale a leucemiilor umane au adus o serie de date referitoare la rolul unor agenți transmisibili în această boală (4), (14), (15).

Menționăm că prin complexitatea lor, cercetările efectuate de *Nastac* și colab. (12) la Institutul de inframicrobiologie „St. S. Nicolau” al Acad. R. S. România, au avut-o importantă contribuție în acest domeniu. În cele ce urmează, consemnăm unele dintre rezultatele cercetărilor efectuate de acest colectiv între anii 1961—1969.

Prin inocularea la șoareci albi hibrizi — a unei suspensii de măduvă sternală și sînge de la bolnavi de leucemie limfatică cronică s-a obținut la unele animale creșterea numărului de leucocite (8). Într-o altă serie de experiențe, s-a reușit chiar transmiterea maladiei, constantîndu-se proliferarea celulelor limfatice în splina animalelor de experiență (9).

La embrionii de găină inoculați cu singele sau serul bolnavilor de leucemie mieloidă se semnalează apariția malformațiilor congenitale în 25% a cazurilor (10). Aceste rezultate pledează pentru prezența unui agent transmisibil în serul sau sîngele bolnavilor de leucemie umană.

Într-o lucrare publicată în 1966 autorii citați (11) demonstrează acțiunea patogenă a acidului dezoxiribonucleic (ADN), obținut din țesuturile leucemice umane cu ajutorul fenolului. ADN-ul extras din splină și inoculat la șoareci AKM și Cs7, determină apariția de tumori, în diferite organe, cu mențiunea că în urma inoculărilor intranazale apar în special tumori pulmonare (12).

*Ito* și *Asakuma* (5) au reușit să demonstreze acțiunea oncogenă pentru animalele de experiență a acizilor nucleici preparați din carcinom uman.

Se pare că cercetările lui *Nastac* (11), ca și cele ale lui *Ito* și *Asakuma* (5) sînt confirmate prin rezultatele lui *Graffi* și colab. (3) care au reușit cu ajutorul acizilor nucleici obținuți din țesuturile șoarecilor leucemici să transmită leucemie la șoareci nou-născuți, chiar dacă pentru acest scop s-a folosit lichidul culturilor de celule inoculate în prealabil cu acizii nucleici.

Izolarea unor agenți citopatogeni din produse leucemice umane se leagă în primul rînd de cercetările lui *Magrassi* (15) care, folosind celule HeLa, KB și celule renale umane, constată apariția efectului citopatic (ECP) transmisibil.

Ni se pare deosebit de interesant faptul că o parte dintre agenții transmisibili izolați de către unii autori [(*Murphy* și colab. (7), *Negrone* (13)], au fost identificați ca făcînd parte din grupul *Mycoplasmei* (2).

*Levine* și colab. (6) fac unele considerațiuni privitoare la stadiul clinic al bolnavilor leucemici și prezența în plasma lor a unor particule asemănătoare virusurilor. Particulele găsite în sedimentul plasmei bolnavilor de leucemie mieloidă sau limfoidă acută se aseamănă cu particulele virale de leucemie murină.

Aceste particule au cca. 100 milimicroni și sînt similare cu cele descrise de *Porter* și *Dalton* (16).

În concluzie, pe baza datelor bibliografice, trebuie să admitem că formațiuni similare virusurilor găsite în leucemiile umane pot avea un rol etiologic în această boală.

Cercetările noastre, efectuate cu un virus izolat de la bolnavi cu leucemie umană de către *Nastac și colab.* (11) au fost întreprinse cu scopul de a studia rolul acestui agent în leucemiile umane.

#### *Material și metodă*

1. Tulpina de virus — 846 — izolată la *Nastac*, a fost menținută prin treceri succesive pe celule  $R_1CA$  (1). Mediul de creștere și de întreținere a fost același (Sol. Hanks+sol. Earle aa, hidrolizat de lactalbumină 0,5%, sol. N 16×2,5% (preparat de Inst. Dr. I. Cantacuzino), l-glutamină, antibiotice, ser de vițel 10%). Titrul virusului, adică  $DCP_{50}=0,2$  cc din diluția  $10^{-3}$ .

După apariția și extinderea ECP, lichidul culturilor de celule s-a folosit pentru inoculări la hamsteri, iar celulele pentru examinări electronmicroscopice (e.m.)

#### *2. Examinări electronmicroscopice.*

În general, după 5 zile de la infectare, celulele  $R_1CA$  au fost fixate, după metoda Palade, cu tetroxid de osmiu și apoi incluse într-un amestec de metacrilat de butil și metil (8,5: 1,5), după care au fost secționare cu ultramicrotom Reichert și examinate la microscopul electronic TESLA BS 242 A.

#### *3. Inoculări la hamsteri*

Din lichidul culturilor de celule, după 5 zile de cultivare, s-a inoculat o cantitate de 0,5 cc la 20 hamsteri de 65—70 gr. După 6 săptămâni au fost sacrificate 10 animale. S-a recoltat sânge din cord și măduvă din osul femural pentru frotiuri, care au fost colorate cu soluția Giemsa. De la două animale s-au recoltat ganglionii inghinali pentru cercetări e. m.

#### *4. Cercetări de imunofluorescență.*

În aceste cercetări am aplicat metoda directă. Serurile recoltate de la bolnavii de leucemie și de la indivizii sănătoși au fost cuplate cu izotiocianat de fluoresceină și puse în contact cu celulele  $R_1CA$ , infectate în prealabil cu tulpina de virus. Examinările le-am făcut cu microscopul de cercetare MC-1, folosind lampa HBO 200.

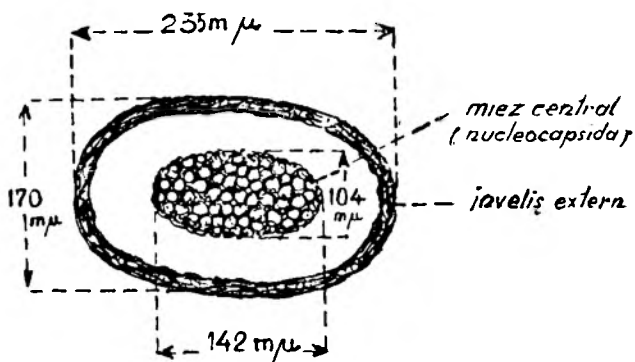
#### *Rezultate*

1. Modificările celulelor  $R_1CA$  infectate cu virusul 846: ECP apare după 24—48 ore în focare, fiind caracterizat de rotunjirea, balonizarea și vacuolizarea intensă a unor grupuri de celule. După 5—6 zile ECP atinge majoritatea celulelor, însă mai rămân grupuri de celule intacte. Menționăm că sensibilitatea celulelor Detroit-6 (VA) este mai scăzută față de acest virus, decât cea a celulelor  $R_1CA$ .

#### *2. Examinări electronmicroscopice*

În urma infectării culturilor celulare  $R_1CA$  cu virusul 846 pot fi constatate leziuni în special la nivelul citoplasmei și mai puțin în nucleu. Citoplasma este intens vacuolizată, predomină leziunile mitocondriilor, a căror structură internă nu poate fi diferențiată. Reticulul endoplasmatic este dezintegrat. În aceste celule alterate pot fi găsite grămezi de particule similare virusurilor, cu formă ovalară, având un miez dens. Aceste particule au dimensiuni uniforme, de 235 milimicroni. Miezul central — nucleocapsida — este de 142 milimicroni. Pe alocuri pot fi văzute particule fără miez central, acestea fiind foarte probabil forme imature. Din punct de vedere morfologic acest virus seamănă cu virusurile din grupul variola-vaccina.

3. *Rezultatele inoculărilor la animale*, încă nu pot fi evaluate, deoarece cercetările sînt în curs. Menționăm însă că examinarea frotiurilor preparate



Reprezentarea schematică a particulei virale

din măduva animalelor infectate cu virusul 846 arată modificări în sensul înmulțirii unor elemente celulare tinere, asemănătoare limfoblaștilor. Acest tablou este absent la animalele sănătoase.

Pe de altă parte, în ganglionii limfatici pot fi observate la microscopul electronic particule asemănătoare virusurilor, având aceeași dimensiune ca și cele găsite în celulele R<sub>1</sub>CA după infecție.

4. *Metoda imunofluorescenței directe* arată că serurile bolnavilor de leucemie marcate cu izotiocianat de fluoresceină dau o fluorescență intensă în celulele infectate cu virusul 846; această fluorescență se constată nu numai în citoplasmă, ci și la nivelul peretelui celular.

În cazul serurilor obținute de la indivizi sănătoși, imunofluorescența este foarte slabă, necaracteristică.

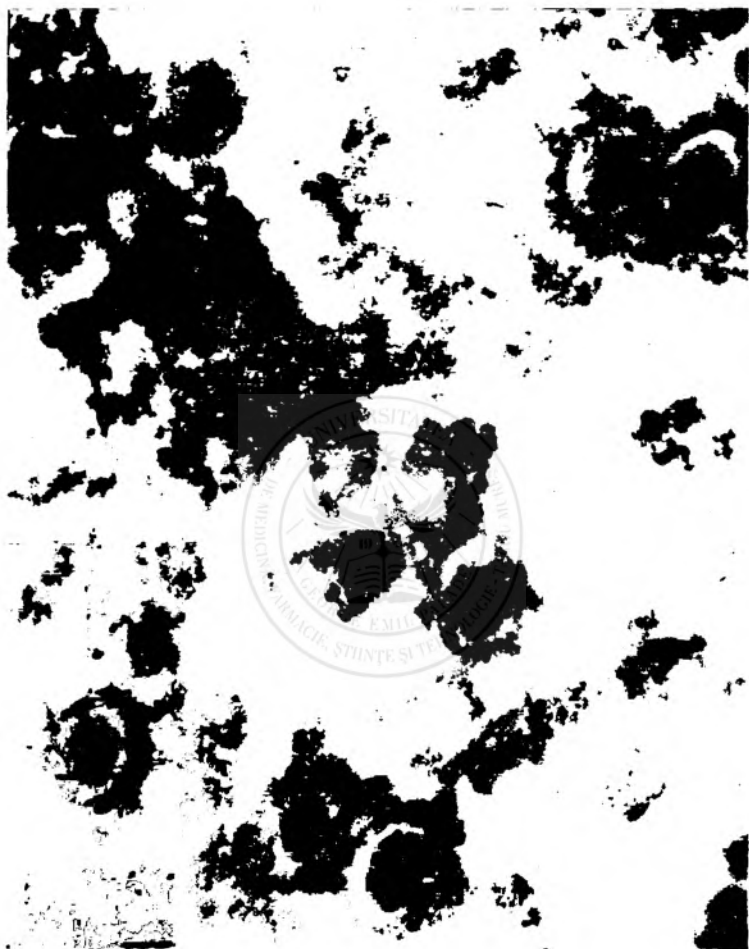
#### Discuția rezultatelor

Virusul 846, izolat de *Nastac* și colab. prin inocularea șoarecilor cu ADN extras din țesuturi leucemice umane poate fi cultivat pe celulele R<sub>1</sub>CA (rinichi de *Cercopithecus aethiops*) cărora le cauzează un efect citopatic caracteristic.

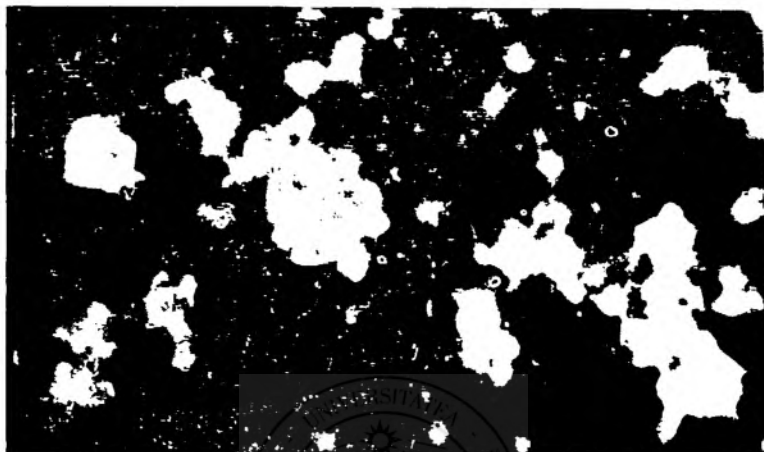
Acest ECP atinge grupuri de celule, determinând o balonizare și o vacuolizare intensă. În acest stadiu ECP seamănă cu cel cauzat de virusul vaccinal. Comparând ECP cauzat de virusul 846 cu cel cauzat de virusul vaccinal pe celule Detroit-6 (VA), am constatat diferențe semnificative. Astfel virusul vaccinal cauzează ECP în focare, cu balonizarea celulelor și dezintegrarea lor, pe cînd tulpina 846 provoacă formarea unor sinciții mari, în focare, care după 5—6 zile duc la apariția unor celule mici rotunde, care se desprind de pe peretele tuburilor.

Dimensiunea tulpinei de virus 846 este asemănătoare cu cea a virusului vaccinal, fiind mai mare decît a aceleia găsite în plasma bolnavilor de leucemie umană (100 milimicroni) de *Levine* și colab. (6), sau decît aceea descrisă de *Graffi* (45—70 milimicroni) (4).

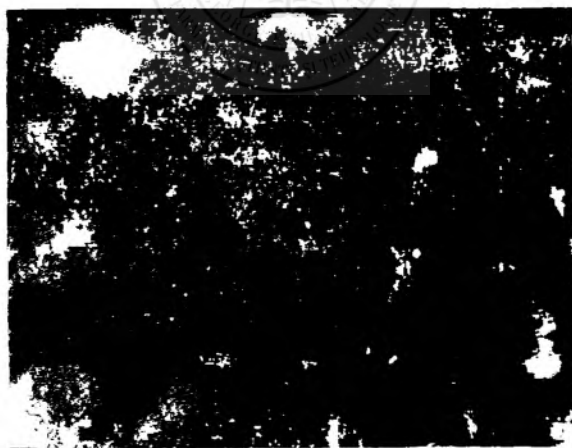
Inoculările la hamsteri și în special metoda imunofluorescenței directe arată că, în serul unor bolnavi de leucemie limfatică se găsesc anticorpi specifici față de tulpina izolată de *Nastac* și colab., deși, după acești autori nu este exclusă



*Fig. nr. 1:* Ultrasecțiune din celulă R<sub>1</sub>CA, infectată cu virusul 846. Particule virotice în citoplasma celulei. Mărire: 81.000 x.



*Fig. nr. 2:* Fluorescență marcată a celulelor infectate cu tulpina 846, în prezența serului unui bolnav de leucemie (ser cuplat cu izotiocianat de fluoresceină).  
Ob. 20 x. oc. 10 x.



*Fig. nr. 3:* Absența fenomenului de fluorescență în celulele R<sub>1</sub>CA, infectate cu virusul 846, în prezența unui ser recoltat de la un individ sănătos. Ob. 20 x. oc. 10 x.

posibilitatea ca inoculul folosit (ADN obținut din țesutul leucemic uman) să fi exacerbât un virus latent, preexistent în organismul animalelor (12). Atât cercetările lui Ito și Asakuma (5), cât și cele ale lui Graffi și colab. (3) care obțin rezultate pozitive în tentativele lor de transmitere prin acizii nucleici a unor forme de cancer respectiv leucemii, vin în sprijinul teoriei lui Nastac, conform căreia virusul, agentul etiologic al leucemiilor, „s-ar găsi integrat în celula malignă (pe care a generat-o) sub formă de acid nucleic, de infravirus, cum îl numește Nicolau, formă care se multiplică o dată cu celula” (12).

În acest sens metoda preconizată de Nastac (11) prezintă mari avantaje în studierea etiologiei leucemiilor umane.

Deși cercetările noastre arată că agentul studiat de noi are proprietăți morfologice și biologice similare cu cele ale virusului vaccinal, prezența anticorpilor antivirali în serul bolnavilor de leucemie, pledează pentru existența unei înrudiri antigenice dintre agentul cauzal al leucemiilor umane și tulpina izolată de Nastac.

### Concluzii

1. Virusul izolat de Nastac și colab. din leucemia umană, are un efect citopatic pe celulele R<sub>1</sub>CA, similar celui cauzat de virusul vaccinal; diferențiabil însă pe celulele Detroit-6 (VA).

2. Structura și dimensiunea particulelor virale sînt asemănătoare cu acele ale virusurilor din grupa variolo-vaccinei (235 milimicroni).

3. În cercetările preliminare a fost observată la hamsteri acțiunea virusului asupra tabloului sanguin.

4. Aplicarea metodei de imunofluorescență directă, relevă existența unei înrudiri antigenice dintre virusul izolat și agentul etiologic al leucemiilor umane.

Sosit la redacție: 27 octombrie 1969.

### Bibliografie

1. ADERCA I., IFTIMOVICI MAGDALENA, GHELERTER LUIGINA, NACHTIGAL M.: St. cerc. inframicrobiol. (1966), 17/6, 443; 2. GIRARDIA. J., HAYFLICK A., LEWIS A. M., SOMERSON N. L.: Nature (1965), 205, 188; 3. GRAFFI A., SCHRAMM T., FÖRSTER W.: Rev. Roum. d'inframicrobiol. (1967), 4, 1, 53; 4. GRAFFI A., BIELKA H.: Probleme de oncologie experimentală, Ed. Acad. R.P.R., 1962; 5. ITO J., ASAKUMA R.: Oncologia (Basel), (1966), 20, 4, 267; 6. LEVINE P. H., HOROSZEVICZ J. S., GRACE J. T., CHAI L. S., ELLISON ROSE RUTH., HOLLAND J. F.: Cancer (1967), 20, 10, 1563; 7. MURPHY W. H., FURTADO D., PLATA E.: J.A.M.A. (1964), 188, 439; 8. NASTAC E., FUHRER-ANAGNOSTE B., TĂRCHILĂ D.: St. cerc. inframicrobiol. (1961), XII, 3, 359; 9. NASTAC E., ANAGNOSTE B., BALMUȘ GH.: Șt. cerc. inframicrobiol. (1962), XIII, 1, 47; 10. NASTAC E., POPESCU GR., BALMUȘ GH., RUTTER C., ISAIA G., LUNGU M., ANAGNOSTE V.: Șt. cerc. inframicrobiol. (1963), XIV, 6, 713; 11. NASTAC E., PETRESCU AL., LUNGU MICHAELA, STOIAN M., PĂCURARU EVA: Rev. Roum. d'inframicrobiol. (1966), 3, 2, 155; 12. NASTAC E., HOZOC MARIA, SAMUEL I., IONESCU THEODORA, CIUFECU ELVIRA, LUNGU MICHAELA, BALMUȘ GH., STOIAN M.: St. cerc. inframicrobiol. (1968), 19, 3, 191; 13. NEGRONI G.: Brit. Med. J. (1964), 1, 927; 14. NICOLAU ȘT. Ș., NASTAC ELISABETA: Virusuri și tumori, Ed. Acad. R.S.R., București, 1968; 15. NICOLAU ȘT. S.: Cancer și virusuri, Ed. Acad. R.P.R., București, 1952; 16. PORTER G. H., DALTON A. J., MOLONEY J. B., MITCHEL E. Z.: J. Nat. Cancer Inst. (1964), 33, 547.