

## METODY I WYNIKI BADAŃ NAD BIAŁACZKAMI DROBIU NA PRZESTRZENI OSTATNICH LAT

MARIAN GRUNDBOECK

Pracownia Patologii Komórkowej Instytutu Weterynarii w Puławach  
Kierownik: dr M. Grundboeck

Roczniki Zdrowotności Zwierząt FAO-OIE (20, 21, 22, 23) w okresie ostatnich kilku lat wykazują, że białaczki drobiu występują niemal na całym świecie. Fakt ten potwierdzają liczne publikacje ukazujące się w prasie fachowej różnych krajów. W Europie występowanie tej grupy schorzeń na obszarze całego kraju stwierdzono: w Anglii, Austrii, Danii, Finlandii, Hiszpanii, Holandii, Islandii, Norwegii, Rumunii, Szwecji, Włoszech, Związku Radzieckiego i na Cyprze. Pozostałe kraje meldują tylko o sporadycznych przypadkach białaczek.

Ameryka zarówno Północna, jak i Południowa stanowi obszar znacznego występowania białaczek. Dotyczy to zwłaszcza Argentyny, Chile, Kanady, Kuby, Meksyku, Nikaragui, Paragwaju, Trinidadu, Urugwaju i USA. W większości państw Afryki notuje się tylko sporadyczne występowanie omawianej choroby, jakkolwiek o znacznym jej nasileniu donoszą meldunki z Egiptu (ZRA), Kenii, Północnej Rodezji, Unii Południowoafrykańskiej i niektórych mniejszych państw. Na terenie Azji dużą zapadalność na białaczkę notuje się w Hong-Kongu, Japonii, Jordanii, Singapurze oraz na Cejlonie. Ponadto terenem znacznego rozprzestrzenienia choroby jest Australia i Nowa Zelandia.

Oficjalna statystyka przedstawia tylko orientacyjny, niezbyt wierny obraz stanu faktycznego. Tym niemniej na jej podstawie można uważać, że białaczki drobiu są schorzeniem nasilającym się i rozprzestrzeniającym coraz bardziej. Szereg państw, jak np. Cejlon, Islandia, Nikaragua, Włochy, gdzie do niedawna notowano tylko sporadyczne przypadki występowania białaczek, dzisiaj zalicza się do obszarów o znacznym nasileniu tej choroby. W niektórych państwach, jak np. w Austrii lub Egipcie choroba do niedawna ograniczała się tylko do pewnych prowincji; dziś objęła już terytorium całego państwa.

Również na terenie Polski stwierdza się coraz częstsze ogniska występowania białaczek. W znacznej części przypadków dotyczą one ptaków pochodzących z importu. Brak szczepionek i innych radykalnych środków zapobiegawczych sprawia, że białaczki drobiu stają się poważnym problemem w naszej hodowli.

Zagadnienie zwalczania białaczek czeka na rozwiązanie w skali światowej. Intensywne badania nad chorobami, należącymi do tego zespołu, prowadzone są w licznych państwach. Przewodzą tu Stany Zjednoczone, Szwecja, Anglia, Dania, Kanada i Japonia. Znaczny jest też dorobek polskich uczonych pracujących zarówno w kraju, jak i zagranicą.

Przedstawione poniżej metody i wyniki badań podano w oparciu o aktualne piśmiennictwo, osobiste kontakty z badaczami oraz na podstawie własnych prac. Z bardzo szerokiego materiału wybrano i omówiono pokrótce następujące zagadnienia:

- 1) pasażowanie wirusa na kurczętach drogą przeszczepiania tkanek lub wstrzykiwania bezkomórkowych przesączów; pasażowanie wirusa na zarodkach oraz w hodowli tkanek;
- 2) etiologia białaczek drobiu;
- 3) właściwości wirusów;
- 4) lokalizacja wirusów;
- 5) właściwości antygenowe;
- 6) lokalizacja antygenów;
- 7) szczepionki i metody uodporniania;
- 8) przenoszenie się wirusa przez jaja;
- 9) wpływ diety na rozwój białaczek;
- 10) czynniki antybiotyczne i onkolityczne.

### Przeszczepianie tkanki białaczkowej na kurczęta

Wszczepiając kurczętom tkankę nowotworową niektórych szczepów limfomatozy, uzyskuje się obraz limfomatozy trzewiowej bardzo podobny do schorzenia występującego w sposób naturalny. Przeszczepienie tkanki jest zabiegiem prostym i nie wymaga używania ptaków o genetycznie uwarunkowanej wrażliwości na zakażenie. Zakażenie inplantatem powoduje bardzo szybki przebieg schorzenia, który może się zamknąć w granicach zaledwie kilku dni.

Przykładem zastosowania techniki przeszczepiania jest wyizolowanie i adaptacja czynnika wywołującego limfomatozę (O l s o n, 36, 37), nazwanego później RPL 12. Materiał wyjściowy pochodził od kury, która padła wskutek limfomatozy trzewiowej. Rozdrobnioną tkankę nowotworową wprowadzano kurczętom domięśniowo. W miejscu wszczepienia tworzyły się guzy, z których pobierano materiał do następnego pasażu, zwykle co 10 dni. W pasażach od pierwszego do trzydziestego, 32,6% prób transplan-

tacji dało wynik negatywny. Wzrost przeszczepionej tkanki odbywał się przeważnie w miejscu wstrzyknięcia, a nieliczne przerzuty miały charakter umiejscowiony. Natomiast w pasażach od 45 do 132 tylko 1,3% przeszczepień dało wynik ujemny, a w ponad 50% przeszczepy obok wzrostu miejscowego dawały przerzuty do narządów wewnętrznych, które z reguły wykazywały cechy wzrostu rozlanego. W pasażach od 31 do 132 przerzuty powstawały głównie w żołądku gruczołowym, sercu, trzustce i nadnerczu. Rzadko występowały przerzuty w śledzionie, a jeszcze rzadziej w wątrobie, bo tylko w 2,4% przypadków.

Szczep ten pasażowany w dalszym ciągu przez Grundboeck a i Fredricksona (25) wykazał w 27 przeprowadzonych pasażach dalsze uzjadliwienie. Przeszczepiania dokonywano co 7 dni ze względu na skrócenie się czasu choroby i niemal 100-procentową śmiertelność. Przerzuty w wątrobie i śledzionie występowały częściej niż w innych narządach, jednakże równoczesne wystąpienie zmian w wątrobie i śledzionie zdarzało się rzadko.

Obraz histologiczny zmian, zachodzących po wszczepieniu tkanki limfomatycznej opisali szczegółowo Love i Scharplless (34). W cyklu zmian wyróżnili oni stadium wzrostu tkanki nowotworowej, trwające 10—17 dni oraz stadium destrukcji tej tkanki, trwające 3—4 dni. W pierwszym stadium do szybko postępującego wzrostu guza dołącza się reakcja ustroju. Część wstrzykniętego materiału, nie będąca komórkami nowotworowymi, zostaje sfagocytowana, natomiast na obwodzie rosnącego ogniska pojawiają się skupienia limfocytów i makrofagów. W śledzionie wzrasta w tym czasie liczba komórek plazmatycznych.

W drugim stadium następuje fagocytoza komórek nowotworowych, nie wykazujących żadnych objawów uszkodzenia. W ognisku stwierdza się znaczne nacieczenie makrofagami, limfocytami i komórkami plazmatycznymi. Liczba plazmacytów w śledzionie wzrasta, znacznie natomiast maleje liczebność limfocytów w tym narządzie. W następnym okresie 1—2 tygodni w ognisku nie stwierdza się już komórek nowotworowych. Nacieczenie limfocytami i plazmacytami utrzymuje się. Uszkodzenia tkanki mięśniowej wywołane wzrostem guza ulegają reperacji. W okresie dalszych 1—2 tygodni nacieki w miejscu zlikwidowanego ogniska zanikają, a struktura śledziony powraca do stanu prawidłowego.

Doświadczalne zakażenia kurcząt erytroblastozą, względnie mieloblastozą, drogą wstrzykiwania komórek nowotworowych były dokonywane przez różnych badaczy. Lagerlöf (31, 32) wstrzykiwał dożylnie kurczętom komórki erytroblastozy. Następował wówczas szybki rozplem tych komórek w różnych narządach nowego gospodarza. Najintensywniej rozwijały się zmiany w szpiku i śledzionie. Śmierć ptaków w wielu przypadkach następowała przed upływem tygodnia od chwili przeszczepienia.

## Doświadczalne zakażanie kurcząt bezkomórkowymi przesączami zawierającymi wirus

Metoda ta jest szeroko stosowana w badaniach nad limfomatozą prowadzonych w Regional Poultry Research Laboratory, East Lansing, Mich., w Stanach Zjednoczonych. Źródłem wirusa używanego tu do zakażenia były odchody, ślina lub zarodki z jaj pochodzących od zarażonych kur. Większe stężenie wirusa zawierało osocze lub wyciągi z narządów ptaków chorych na limfomatozę. Dla uzyskania wysokiego stopnia zakaźności używano młodych kurcząt pochodzących z wrażliwych na limfomatozę linii genetycznych. Wirus można wstrzykiwać pozajelitowo lub wprowadzać dospojówkowo, donosowo lub do tchawicy. Choroba rozwija się podobnie jak po naturalnym zakażeniu. Tkanka nowotworowa rozwija się w narządach wewnętrznych niezależnie od sposobu zakażenia. Gdy użyje się dużych dawek wirusa, proces u wrażliwych kurcząt kończy się zejściem po 4—16 tygodniach. Gdy użyje się natomiast małych dawek wirusa lub gdy kurczęta są bardziej odporne, ptaki padają w podobnym czasie jak przy zakażeniu naturalnym (Burmester i Waters, 12.)

Zakażenia kurcząt wirusami mieloblastozy i erytroblastozy dokonywano w Duke University Medical Center, Durham, N. C., w Stanach Zjednoczonych. Stwierdzono tu, że wirus erytroblastozy jest bardziej zjadliwy niż wirus mieloblastozy, ponieważ ilość potrzebna do zakażenia jest w przypadku pierwszego wirusa 100—1000 razy mniejsza niż w przypadku drugiego. Zachodzi również znaczna różnica w ostrości przebiegu schorzenia. W erytroblastozie początek choroby można rozpoznać w ciągu 48 godzin, a śmierć następuje przeciętnie w 9 dni po zakażeniu, natomiast po wprowadzeniu wirusa mieloblastozy zmiany białaczkowe we krwi stwierdza się dopiero po 9 dniach, a śmierć następuje zazwyczaj po 17 dniach od chwili zakażenia.

Beard (1) wskazuje, że wrażliwość na zakażenie zależy od wieku kurcząt, ale nie przedstawia się ona jednakowo w przypadku erytroblastozy, mieloblastozy i limfomatozy. Najbardziej wrażliwe na zakażenie wirusem mieloblastozy są kurczęta trzydniowe, a oporność wzrasta z wiekiem. Podobnie przedstawia się oporność na limfomatozę. Stwierdzono natomiast, że trzydniowe kurczęta są bardziej odporne na zakażenie wirusem erytroblastozy niż 77-dniowe. Przy zakażeniu wszystkimi trzema rodzajami wirusa najlepsze wyniki daje wprowadzenie dożylnie.

Lagerlöf (31, 32) zakażał kurczęta podając im dożylnie zawiesinę wirusa erytroblastozy. Schorzenie rozwijało się wolniej niż w wypadku przeszczepiania komórek erytroblastozy. Pierwsze komórki białaczkowe pojawiały się w krążeniu dopiero po upływie 5 dni, a śmierć nie następowała wcześniej jak po 7 dniach od zakażenia.



## Zakażanie zarodków kury wirusem limfomatozy

Defendi i Sharpless (15) zakażali dożylnie zarodki 12-dniowe wirusem RPL 12. W pierwszych dwóch dobach po zakażeniu stwierdzili oni powstanie ciałek wtrętowych w jądrach komórek wątrobowych. Ciałka te wykazywały znaczną zawartość kwasu dezoksyrybonukleinowego. W okresie następnych 2—3 dni zaobserwowano w tkance mezenchymalnej wątroby i innych narządów rozplam dużych komórek zasadochłonnych. W trzecim okresie, trwającym aż do wylegu, utrzymywał się rozplam komórek zasadochłonnych, przy czym powstawały, zwłaszcza w wątrobie, rozległe ogniska martwicy.

Również Gentry i Burmester (24) namnażali na ten sam szczep wirusa limfomatozy RPL 12 w pasażach na zarodkach kury. Stosowano zakażenie do woreczka żółtkowego w 8 dniu inkubacji. Następny pasaż przeprowadzano, gdy zakażone zarodki osiągnęły 15 dzień rozwoju. Materiał do zakażeń przygotowywano z homogenizowanego rozcieru zakażonych zarodków i przylegającej części woreczka żółtkowego. W sposób tu opisany przeprowadzono 5 pasażów wirusa.

## Wirusy białaczek drobiu w hodowli tkanek

Wirusy białaczek można wprowadzać do hodowli w dwojaki sposób: zakładając hodowlę z komórek białaczkowych lub też zakażając zawiesiną wirusa hodowle normalnych komórek. Obydwóch metod użyli Davis i Gustafson (14) w stosunku do limfomatozy. Używając materiału z kur zakażonych doświadczalnie wirusem RPL 12 zakładali oni hodowlę na pożywkę zawierającą: płyn puchlinowy z wodobrzusza ludzi, roztwór Gey'a z czerwienią fenolową, wyciąg z zarodków kury oraz penicylinę. Porównując hodowle z narządów dotkniętych limfomatozą oraz analogicznych narządów kur zdrowych stwierdzono dużo szybszy rozplam oraz intensywniejsze wywędrowywanie limfoblastów nowotworowych z ognisk namnażania. Płyn z hodowli komórek limfomatozy był zakaźny dla kurcząt. Płyn ten posłużył również do zakażenia hodowli komórek z normalnej śledziony. Następstwem zakażenia był znaczny rozplam fibroblastów oraz komórek limfoidalnych. Komórki hodowli zakażonych wykazywały w zarodki obfitą ziarnistość.

Również Defendi i Sharpless (15) utrzymywali wirus limfomatozy RPL 12 w hodowli tkankowej. Hodowle uzyskano z wątroby 15-dniowych normalnych zarodków kury. Pożywka składała się z surowicy końskiej i podłoża 199. Po zakażeniu hodowli wirusem obserwowano w jądrach komórek powstanie dużych ciałek wtrętowych o znacznej zawartości kwasu dezoksyrybonukleinowego. Morfologia tych ciałek wydała się badaczom swoista dla wirusa limfomatozy.

Levine i Sharpless (33) obserwowali na agarowych hodowlach powstawanie „łysinek” wskutek zakażenia komórek wirusem limfomatozy. Do hodowli użyto komórek z 9-dniowych zarodków kury. „Łysinki” ukazały się po 5 dniach, a osiągnęły maksimum — po 6. Obserwować je można było po zabarwieniu czerwienią obojętną. Średnica ich wahała się od 0,5 do 2 mm. Gdy przed zakażeniem wirus był poddany działaniu surowicy przeciw limfomatozie, do powstawania „łysinek” nie dochodziło.

Zdarzają się przypadki mimowolnego pasażowania wirusa limfomatozy w hodowli tkanek. Zjawisko to zanotował w swej pracowni Rubin (43). Najpierw stwierdził on występowanie czynnika hamującego zakażenie komórek hodowli wirusem mięsaka Rousa. Droga dalszych badań doszedł do wniosku, że zachodzi tu zjawisko interferencji między wirusem mięsaka Rousa a wirusem limfomatozy, który przez zarodki dostał się do hodowli z jaj zakażonych. W obserwowanych przypadkach zakażenie fibroblastów zarodka kury wirusem limfomatozy nie cechowało się żadnymi zmianami morfologicznymi lub też zmiany te były trudno dostrzegalne.

Wirusem mieloblastozy w hodowli tkanek zajmuje się zespół badawczy w Duke University Medical Center, Durham, N. C., w USA (1—5, 42). Do badań używany jest wirus BAI ze szczepu A. Do hodowli tkanek zastosowano podłoże 199 z osoczem krwi kury oraz dodatkiem witamin B i C.

W części doświadczeń zakażano wirusem hodowlę komórek normalnego szpiku kurczęcia. Niezakażone mieloblasty szpiku giną w hodowli po krótkim czasie. W wyniku zakażenia występowało natomiast po 12—20 dniach intensywne namnażanie się mieloblastów, przy czym ilość tych komórek podwajała się co 7 dni. Zakażone komórki wydzielają wirus do podłoża. Ilość cząsteczek wydzielanych przeciętnie przez jedną komórkę wynosiła 66,2 po 5—7 dniach, a 92,4 cząsteczek po 31 dniach od zakażenia.

Uzyskano również hodowlę z mieloblastów pobranych z krwi kurcząt, u których doświadczalnie wywołano mieloblastozę. Mieloblasty białaczkowe z krwiobiegu nie różnią się morfologicznie od normalnych mieloblastów szpiku kury. Bardzo rzadko w zakażonych komórkach można stwierdzić cząsteczki wirusa leżące w małych pęcherzykach lub wodniczkach. Zakażone mieloblasty przeniesione z krwi do hodowli tkankowej o odpowiednim podłożu wykazują wyraźne zmiany już po 2 godzinach. Wzrasta w nich ilość struktur określanych jako ciała szare lub „wiroplasty”. Ponadto niektóre mitochondria wykazują znamiona zwyrodnienia.

W okresie pierwszych 24 godzin hodowli wzrasta dalej w zarodki komórek ilość wiropłastów; wiele z nich zawiera już wyraźne cząsteczki wirusa. W 6-dniowej hodowli szare wiropłasty o zbitej budowie występują już rzadko, natomiast spotyka się liczne struktury stanowiące wachlarz przejść od mitochondriów o nieuregulowanej budowie do pustych wakuoli.

Część wiropłastów reaguje dodatnio w odczynie na ATP-azę. Jest to charakterystyczne, gdyż wirus BAI szczep A wykazuje znaczną aktywność tego enzymu. Trzeba jednak zaznaczyć, że niektóre ziarnistości normalnego mieloblasta w procesie jego dojrzewania zawierają również adenozynotrójfosfatazę (ATP).

W hodowlach, w których normalne komórki są zakażane wirusem *in vitro*, populacja komórek nie różni się morfologicznie od postaci pochodzących z mieloblastów białaczkowych. Obserwacje wskazują, że wirus wnika do komórki i namnaża się w strukturach poprzedzających ziarnistości cytoplazmatyczne.

B e a r d i współpracownicy (2) utrzymywali również w hodowli tkanek erytroblasty białaczkowe. Stwierdzili oni, że hodowane komórki produkowały wirus erytroblastozy. Komórki ulegały w hodowli rozpadowi stosunkowo szybko i wskutek tego badania można było prowadzić niewiele dłużej niż przez dwa tygodnie.

L a g e r l ö f (28, 29, 30) utrzymywał w hodowli tkankowej komórki erytroleukemiczne. Pochodziły one bądź to z komórek białaczkowych, bądź też od normalnych komórek szpiku, zakażonych *in vitro* wirusem erytroblastozy. Podłoże hodowli składało się z fizjologicznego roztworu soli zawierającego heparynę, podłoża Parkera 199 oraz osocza kury.

Komórki białaczkowe zachowywały w hodowli swe charakterystyczne cechy przez okres przynajmniej dwóch miesięcy. Komórki wydzielały w tym okresie wirus do podłoża.

W przypadkach zakażenia normalnych komórek wirusem erytroblastozy po zakażeniu następowała faza eklipsy, trwająca około 5 dni, w którym to okresie nie można było w hodowli wykazać aktywnego wirusa, a po tym okresie komórki produkowały nowe jego cząsteczki. Po 2—3 tygodniach hodowli komórki nabierały właściwości charakterystycznych dla erytroblastów białaczkowych z krwiobiegu, tzn. były one zdolne wywołać u kurcząt transplantacyjny typ procesu chorobowego.

### Etiologia białaczek drobiu

Wszystkie postacie białaczek drobiu są wywoływane przez czynnik przesykalny. Jest jednak zagadnieniem otwartym, czy ma się tu do czynienia z kilkoma różnymi wirusami czy też z jednym czynnikiem multipotentnym. Według B u r m e s t e r a (6, 8) wszelki materiał, który zawiera wirus wywołujący limfomatozę, powoduje również w pewnych warunkach erytroblastozę. Na 7 badanych szczepów wirusa limfomatozy 5 wywoływało oprócz tych dwóch wymienionych schorzeń jeszcze osteopetrozę. Część badanych szczepów wywoływała dodatkowo nowotwory typu fibrosarcoma lub myxosarcoma. W nielicznych przypadkach do ze-

społu zmian dołączały się objawy typowe dla mielocytoza, neurolimfomatozy, granuloblastozy lub limfomatozy ocznej.

Stwierdzono, że duże dawki wirusa wywoływały erytroblastozę, która rozwijała się przed upływem 4 miesięcy; małe dawki natomiast wywoływały limfomatozę trzewiową, przy czym śmierć następowała po upływie 4 miesięcy od zakażenia.

Burmeser i współpracownicy (11) stwierdzili, że bezkomórkowe preparaty wirusa erytroblastozy szczepu R (Beard) wywołują limfomatozę trzewiową u części ptaków, które przebyły erytroblastozę, wywołaną tym samym zakażeniem. Podobnie szczep A wirusa mieloblastozy (Beard) wywoływał obok mieloblastozy limfomatozę trzewiową, gruczolaki nerek i osteopetrozę.

W dalszym etapie badań przeprowadzonych przez Burmestera i Waltera (9) wirus mięsaka Rousa wstrzykiwano kurczętom dożylnie. Obok typowego mięsaka rozwinęła się u części zakażonych ptaków limfomatoza trzewiowa i erytroblastoza w okresie 70—270 dni po zakażeniu. Z warunków doświadczenia wynikało, że zjawiska tego nie można tłumaczyć przypadkowym występowaniem białaczek w szczepionej grupie.

Przedstawione badania, jakkolwiek rzucają wiele światła na etiologię białaczek, wymagają dalszej pracy dla pełnego wyjaśnienia zagadnienia. Dalszym, otwartym dotychczas zagadnieniem jest stosunek choroby Marekka i limfomatozy ocznej do typowych białaczek drobiu.

### Właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne wirusów białaczki

Dmochowski i współpracownicy (16, 17) dokonali pomiarów średnicy cząsteczek wirusa za pomocą mikroskopu elektronowego. Na podstawie pomiarów 700 cząsteczek każdego rodzaju wirusa stwierdzili oni, że w zmianach o charakterze limfomatozy wywołanej czynnikiem RPL 12 cząsteczki wirusa mają średnicę przeciętnie 720 Å. Ten sam czynnik RPL 12 w zmianach o charakterze erytroblastozy wykazywał tylko nieznacznie większą średnicę, bo 730 Å. Analogicznie mierzone cząsteczki wirusa erytroblastozy szczepu R wykazywały średnią wielkość 640 Å, zaś wirusa mieloblastozy szczepu A — 620 Å. Cząsteczki wirusa badanych szczepów wykazywały podobieństwo strukturalne. Zawierały one zagęszczone, środkowo położone jądro, otoczone jaśniejszą powłoką. Średnica jądra stanowiła około  $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$  średnicy całej cząsteczki.

Analizy chemicznej wirusa mieloblastozy dokonali Beard z zespołem (2). Kwas rybonukleinowy stanowi 2,2% suchej masy wirusa. Zawartość kwasu dezoksyrybonukleinowego jest mniejsza od 0,1%. Zawartość fosforu 1,29% jest stosunkowo wysoka w porównaniu z poziomem kwasów nu-



kleinowych. Możliwe, że część fosforu wchodzi w skład fosfolipidów. Zawartość lipidów jest stosunkowo wysoka, bo wynosi aż 37%. Kwas nukleinowy stanowi integralną część cząsteczek wirusa, ponieważ nie ulega hydrolizie pod wpływem rybonukleazy.

Wobec trudności uzyskania większej ilości czystego wirusa erythroblastozy i limfomatozy nie przeprowadzano analizy ich składu chemicznego. Beard i współpracownicy przypuszczają, że te wirusy o podobnych właściwościach fizycznych i antygenowych nie powinny wykazywać większych różnic w zakresie podstawowych składników chemicznych.

Drogą frakcjonowania za pomocą ultrawirówki osocza kurcząt chorych na mieloblastozę stwierdzono, że cząsteczki wirusa, czynnik zakaźny, czynnik mający zdolność wiązania dopełniacza oraz materiał zawierający ATP-azę wykazują tę samą szybkość sedymentacji. Jest to jednym z dowodów, że wszystkie wymienione czynniki zawarte są w cząsteczkach wirusa. Wykazano również za pomocą aparatu elektroforetycznego Tiseliusa, że cząsteczki wirusa wędrują z tą samą szybkością, z jaką przesuwają się materiały zawierające ATP-azę, co jest dalszym potwierdzeniem enzymatycznej aktywności wirusa. Wysoką wartość ma stwierdzenie, że aktywność ATP-azy zawiesiny wirusa ma ścisły związek z ilością cząsteczek w jednostce objętości.

Układ enzymatyczny wirusa mieloblastozy może powodować defosforylację nie tylko adenozyno-trójfosforanów, lecz również inozyno-trójfosforanów.

Wirusy białaczek zachowują zdolności patogenne po przechowywaniu nawet przez kilkaset dni w temperaturze suchego lodu. Temperatura  $+55^{\circ}\text{C}$  inaktywuje wirus. Unieczynniająco działają również rozcieńczone roztwory formaldehydu oraz promienie pozafioletkowe.

### Umiejscowienie wirusów białaczkowych w komórkach

F a g r a e u s i T h o r e l l (19) badali umiejscowienie wirusa erythroblastozy w komórkach. Sporządzali oni naprzód zawiesinę komórek ze śledziony kurcząt chorych na erythroblastozę. Zawiesinę tę poddawali łagodnej homogenizacji, aby nie uszkodzić jąder, a oddzielić od nich protoplazmę. Po odwirowaniu zawiesiny uzyskiwano w osadzie jądra, a płyn nad osadem stanowił tzw. frakcję cytoplazmatyczną. Do celów kontrolnych sporządzano dokładny homogenizat z całych komórek. Stwierdzono, że usunięcie jąder z komórek nie zmniejszało w preparacie miana wirusa, mierzonego testem zakażenia kurcząt. Autorzy wysnuli wniosek, że wirus jest związany z zarodkiem. W kontrolnych badaniach autorzy przemywali płynem fizjologicznym komórki występujące przy erythroblastozie przed

sporządzeniem homogenizatu. Właściwości zakażające preparatu zmniejszyły się przez to tak nieznacznie, że autorzy wywnioskowali, iż większość cząstek wirusa nie jest związana z powierzchnią komórki, lecz znajduje się w jej wnętrzu. Potwierdziły to dalsze prace, w których frakcję protoplazmatyczną frakcjonowano w kolumnach krzemionkowych. Stwierdzono, że czynnik zakaźny towarzyszy frakcji zawierającej kwas rybonukleinowy. Przemawia to za umiejscowieniem wirusa w całej protoplazmie komórkowej.

B e a r d i współpracownicy (2) badali za pomocą mikroskopu elektronowego umiejscowienie wirusa mieloblastozy w komórkach zakażonych kurcząt. Stwierdzali oni bardzo rzadko obecność cząsteczek wirusa w protoplazmie komórek nowotworowych. Natomiast wirus obficie występował w komórkach siateczki śledziony i szpiku, w komórkach wątroby oraz w makrofagach śledziony.

Umiejscowienie cząsteczek wirusa w komórkach śledziony kurcząt, zakażonych doświadczalnie szczepem RPL 12, była badana przez D m o c h o w s k i e g o i współpracowników (16, 17). Stwierdzono, że zarówno w zmianach o charakterze limfomatozy trzewiowej, jak i erytroblastozy cząsteczki wirusa znajdują się w cytoplazmie, wewnątrz ciałek wtrętowych i wakuoli oraz w przestrzeniach międzykomórkowych.

### Właściwości antygenowe

O l s o n i Z e i s s i g (40) badali obecność antygenów przy limfomatozie trzewiowej, w nerwach objętych tym procesem oraz w tkance limfatycznej zdrowej kury. Preparaty antygenów były bądź to wyciągami alkoholowymi, bądź też zawiesiną wysuszonych sproszkowanych tkanek w mieszaninie roztworu fizjologicznego soli kuchennej z glicerolem. Preparaty te posłużyły do uzyskania surowic odpornościowych. Poza tym przygotowano surowicę przeciw antygenowi Forssmana drogą wystrzykiwania królikom preparatów z nerki świnki morskiej. Na antygeny uzyskane w ten sposób działano surowicami przeprowadzając szereg krzyżowych reakcji, których wynik uwidoczniano odczynem odchylenia dopełniacza.

Stwierdzono obecność antygeny Forssmana w niektórych narządach normalnych kur oraz w narządach dotkniętych limfomatozą trzewiową i neorolimfomatozą. Nie udało się wykazać różnic antygenowych między normalną tkanką limfatyczną a utkaniem powstającym w przebiegu limfomatozy.

B e a r d (1) wywoływał u kur powstanie przeciwciał przeciw mieloblastozie drogą wstrzykiwania szczepu A wirusa BAI. Początkowe dawki uodporniające zawierały wirus inaktywowany formaliną, późniejsze zaś czynny wirus. Uzyskane przeciwciała zobojętniały wirus *in vitro* i wywo-

ływały precypitację. Również króliki po podaniu wirusa mieloblastozy produkowały przeciwciała neutralizujące ten wirus i wiążące dopełniacz, jednakże nie powodowały precypitacji wirusa.

Stwierdzono ponadto, że u królików immunizowanych tkankami normalnego kurczęcia lub normalną surowicą kury także powstają przeciwciała wiążące komplement w obecności wirusa mieloblastozy; przeciwciała te unieczynniały też wirus mieloblastozy *in vitro*. Właściwość zobojętniania omawianego wirusa posiadały też surowice królików zawierające przeciwciała Forssmana.

Autor dochodzi do wniosku, że wirus mieloblastozy zawiera: 1) swoisty antygen, właściwy dla wirusa, wywołujący reakcję w organizmie kury; 2) antygen czynny immunologicznie podobnie jak normalna tkanka kury; 3) antygen Forssmana.

Beard wraz z zespołem (1) stwierdził również zobojętnienie wirusa erytroblastozy przez surowicę odpornościową kury, uzyskaną za pomocą tego wirusa. Wirus erytroblastozy był również unieczynniany przez surowicę królika, immunizowanego normalną tkanką kury lub też surowicą zdrowej kury. W odróżnieniu od wirusa mieloblastozy wirus erytroblastozy nie jest zobojętniany przeciwciałami Forssmana.

Wirusy mieloblastozy, erytroblastozy i limfomatozy reagują krzyżowo z przeciwciałami, skierowanymi przeciw tym wirusom. Nie udało się jedynie stwierdzić unieczynniania wirusa erytroblastozy surowicą przeciw limfomatozie.

Ponadto stwierdzono znaczne pokrewieństwo antygenowe wirusa Rousa z wirusami białaczkowymi.

#### Badania umiejscowienia antygenów za pomocą przeciwciał znakowanych

Grundboeck i współpracownicy (26) podjęli badania nad rozmieszczeniem substancji antygenowych w komórkach kur z doświadczalnie wywołaną limfomatozą. Badaniom poddano rozmazy i preparaty odciskowe z różnych narządów wewnętrznych. Surowice odpornościowe uzyskiwano od kur doświadczalnie zakażonych implantatem komórek nowotworowych, u których zmiany chorobowe cofnęły się i nastąpiło wyzdrowienie. Do badań użyto zarówno metody pośredniej, jak i bezpośredniej.

W metodzie pośredniej na rozmaz działano naprzód surowicą odpornościową, następnie zaś roztworem znakowanych fluorescencyjnie  $\gamma$ -globulin królika, uodpornionego normalnymi  $\gamma$ -globulinami kury. W pierwszym etapie tej reakcji przeciwciała ( $\gamma$ -globuliny) surowicy kurzej łączyły się z antygenem zawartym w komórkach. W drugim etapie natomiast,

znakowane przeciwciała królika łączyły się z  $\gamma$ -globulinami kury (związanymi już z antygenem), wykazując ich umiejscowienie w komórce.

W reakcji bezpośredniej używano koniugaty, stanowiącej roztwór znakowanych  $\gamma$ -globulin kury-ozdrowieńca hiperimmunizowanej dodatkowymi dawkami antygeny. Do znakowania przeciwciał użyto izotiocyjanianu fluoresceiny. Reakcja była jednofazowa, tzn. ograniczała się do działania koniugaty na rozmaz utrwalony acetonem.

Wyniki obydwóch metod były zgodne. Protoplazma komórek limfomacyjnych wykazała intensywną fluorescencję, jądra komórkowe natomiast pozostały ciemne. W cytoplazmie komórek nowotworowych znajdują się zatem antygeny reagujące z przeciwciałami, produkowanymi w przebiegu limfomatozy. Limfoblasty i limfocyty zdrowej kury wykazywały odczyn ujemny, tzn. nie wchodziły w reakcję z wymienionymi przeciwciałami. Ujemnie również wypadła reakcja komórek limfomatozy z surowicą zdrowej kury nieuodpornionej.

#### Próby opracowania szczepionek i metod uodporniania kur przeciw limfomatozie

Olson (38, 39) przeprowadził próby uodporniania kurcząt przeciw doświadczalnemu zakażeniu limfomatozą. Wstrzykiwał on ptakom zawieszinę tkanki z roztworów limfomacyjnych, która uprzednio była poddana działaniu wysokiej temperatury (60—100°C) bądź też wysuszeniu nad stężonym kwasem siarkowym. Próbowano również działania na materiał zakaźny fenolem lub formaliną. Próby dały wynik ujemny. Jeśli materiał zatracił zdolność powodowania wzrostu nowotworowego, nie wywoływał również odporności. Odporność powstawała tylko u tych ptaków, u których guz nowotworowy rozwijał się, a następnie zanikał.

Opierając się na spostrzeżeniu, że przeciwciała wyprodukowane przez kurę przedstają się do jej jaj, powodując bierną odporność potomstwa, B u r m e s t e r i współpracownicy (10) wstrzykiwali kurom w wieku poniżej jednego roku po kilka dawek zawiesiny zjadliwego wirusa limfomatozy domięśniowo lub dootrzewnowo. Stwierdzono, że kurczęta wylęte z jaj tych kur są bardziej odporne na zakażenie tym samym wirusem niż kurczęta z jaj tych samych kur, zniesionych przed podaniem wirusa. Potomstwo kur szczepionych było poza tym bardziej odporne od potomstwa kur nieszczepionych.

Gdy zawieszinę wirusa przed wstrzyknięciem unieczynniono za pomocą formaliny, bierna odporność u potomstwa kury również występowała, ale była słabiej zaznaczona niż w przypadku użycia wirusa aktywnego. Opisana metoda uodporniania jest jeszcze w stadium badań i nie nadaje się w obecnej postaci do szerszego stosowania w praktyce.



## Przenoszenie się wirusa białaczek przez zakażone jaja

Burmeister i współpracownicy (7) poddali badaniom jaja 22 kur klinicznie zdrowych z populacji zakażonej limfomatozą. Z 15-dniowych zarodków, pochodzących z tych jaj pobierano wątrobę i sporządzano z niej zawiesinę komórek. Zawiesina ta wstrzyknięta dootrzewnowo kurczętom wrażliwym wywoływała w przypadkach silniejszego zakażenia kliniczne objawy limfomatozy. Badania wykazały, że kury pochodzące z linii genetycznych, wykazujących często występowanie limfomatozy, znoszą duży odsetek jaj zakażonych wirusem. W dalszych badaniach stwierdzono, że odsetek zakażonych jaj u tej samej kury maleje z wiekiem kury; jest on mniejszy u kur 2- i 3-letnich niż u kur rocznych (Burmeister i Waters, 13).

Zakażenie jaj wirusem limfomatozy stwierdził również Rubin (43), który zaobserwował najpierw obecność w zarodkach czynnika hamującego zakażenie hodowli tkanek wirusem mięsaka Rousa. Dalsze badania wykazały, że czynnik ten jest identyczny z wirusem limfomatozy.

Domański i Dobrowolska (18) w swych badaniach nad białaczkami drobiu zaobserwowali, że choroba typu erytroblastozy i neurolimfomatozy nie przenosi się przez jaja wylegowe.

## Wpływ diety na rozwój procesu białaczkowego u kur doświadczalnie zakażanych

Domański i Dobrowolska (18) badali wpływ diety ubogiej w witaminy B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub> i C na doświadczalne zakażenie kur erytroblastozą. Do zakażenia używano przesączonego rozcieru tkankowego kury chorej na erytroleukemię. Stwierdzono, że przy niedoborze wymienionych witamin zakażone kury zapadały na erytroblastozę w 50%, podczas gdy w grupie kontrolnej, karmionej pełnowartościową paszą, zachorowania wystąpiły tylko w 20%.

Stwierdzono, że wyciągi wątrobowe i witamina B<sub>12</sub> podawane kurom chorym przywracały fizjologiczny bieg regeneracji krwi, jednakże nie likwidowały one ognisk neoplastycznych w narządach wewnętrznych.

Hilli i Garren (27) badali wpływ doustnego podawania choliny na wzrost tkanki nowotworowej u kurcząt zakażanych implantatami komórek limfomatozy. Stwierdzili oni, że dodatek 1,05% chlorku choliny do paszy znacznie obniża odsetek kurcząt, u których rozwijają się zmiany chorobowe. Betaina, inozitol oraz metionina, podawane w analogiczny sposób, nie wywierały wpływu na wynik przeszczepiania tkanki limfomatycznej.

O l s o n (41) porównywał rozwój doświadczalnej limfomatozy wywołanej przeszczepami tkankowymi u kurcząt na normalnej diecie oraz u kurcząt otrzymujących w paszy dodatkowo tran. Zaobserwowano, że dodatek tranu znacznie hamował rozwój sprawy nowotworowej. Badania na ten temat są jeszcze w toku i ostatecznych wniosków nie sformułowano.

### Czynniki przeciwdziałające procesowi chorobowemu w doświadczalnej limfomatozie

S o k o l o f f i współpracownicy (44) badali wpływ molazyny na kurczęta, doświadczalnie zakażone wirusem limfomatozy RPL-12. Molazyna jest substancją produkowaną przez grzyb *Penicillium brevicompactum*. Nie wywiera ona działania antybiotycznego na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, jednakże działa hamująco na niektóre wirusy.

11-dniowe kurczęta zakażano dożylnie wirusem limfomatozy RPL-12, a po 24 godzinach zaczęto podawać im molazynę. Wstrzykiwano ją podskórnie trzy razy tygodniowo przez 5 tygodni; dzienna dawka wynosiła 100 mg na kilogram żywej wagi kurczęcia. Podawanie molazyny zredukowało śmiertelność kurcząt z 86,5% do 46,8%.

Stwierdzono również, że molazyna działa hamująco na wirus limfomatozy R (Beard), w zakażonych doświadczalnie zarodkach kury. Podawanie antybiotyku przedłużało czas formowania się ciałek wtrętowych, typowych dla zakażenia limfomatozą. Poza tym molazyna obniżyła śmiertelność zarodków oraz wylęgłych piskląt, która w wyniku zakażenia wirusem R jest znaczna. Autorzy stwierdzili ponadto hamujące działanie molazyny względem wirusa mięsaka Rousa.

Innego rodzaju czynnikiem, przeciwdziałającym procesowi doświadczalnej limfomatozy jest wirus zapalenia mózgu z Saint Louis (szczep NFT, Love i Sharpless, 35). Gdy zawiesinę tego wirusa wstrzyknięto kurczętom domięśniowo w trzy dni po przeszczepieniu komórek limfomatozy tworzące się guzy nowotworowe uległy znacznej regresji. Wirus NFT obniżył znacznie w użytej grupie kurcząt śmiertelność będącą następstwem limfomatozy. Stwierdzono, że wirus zapalenia mózgu zastosowany w doświadczeniu namnażał się w komórkach limfomatycznych nie uszkadzając ich w widoczny sposób. Jednakże skutek działania wirusa NFT komórki nowotworowe zostały przygotowane do sfagocytowania, a reakcja obronna organizmu w stosunku do zakażenia limfomatozą została wzmożona.

## PISMIENNICTWO

1. Beard J. W. (1957) *Annal. N. Y. Acad. Sci.* 68, 473—486.
2. Beard J. W., Bonar R. A., Beaudreau G. S., Becker C., Beard D. — *Biochemistry of the Avian Leukemia Viruses. 4th International Congress of Biochemistry, Vol. VII, Biochemistry of Viruses, Pergamon Press, London, New York, Paris, Los Angeles*
3. Beaudreau G. S., Becker C., Bonar R. A., Wallbank A. M., Beard D., Beard J. W. (1960) — *J. Nat. Cancer Inst.* 24, 395—415, 1960
4. Bonar R. A., Weinstein D., Sommer J. R., Beard D., Beard J. W. (1960) — *J. Nat. Cancer Inst. Monogr. No. 4*, 251—290, 1960
5. Bonar R. A., Parsons D. F., Beaudreau G. S., Becker C. (1959) — *J. Nat. Cancer Inst.* 23, 199—225
6. Burmester B. R., Fontes A. K., Walter W. G. (1960) — *J. Nat. Cancer Inst.* 24, 1423—1442
7. Burmester B. R., Gentry R. F., Waters N. F. (1955) — *Poultry Sci.* 34, 609—617
8. Burmester B. R., Gross M. A., Walter W. G., Fontes A. K. (1959) — *J. Nat. Cancer Inst.* 22, 103—127
9. Burmester B. R. and Walter W. G. (1961) — *J. Nat. Cancer Inst.* 26, 511—518
10. Burmester B. R., Walter W. G., Fontes A. K. (1957) — *Poultry Sci.* 36, 79—87
11. Burmester B. R., Walter W. G., Gross M. A., Fontes A. K. (1959) — *J. Nat. Cancer Inst.* 23, 277—291
12. Burmester B. R. and Waters N. F. (1956) — *Avian Lymphomatosis. Yearbook of Agriculture, U. S. Dept. of Agriculture*, pp. 466—674
13. Burmester B. R. and Waters N. F. (1956) — *Poultry Sci.*, 35, 939—944
14. Davis O. S. and Gustafson D. P. (1959) — *Am. J. Vet. Res.*, 20, 119—126
15. Defendi V. and Sharpless G. R. (1958) — *J. Nat. Cancer Inst.* 21, 925—959
16. Dmochowski L., Grey C. E., Burmester B. R., Gross M. A. (1959) — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100, 514—516
17. Dmochowski L., Grey C. E., Burmester B. R. (1959) — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100, 517—519
18. Domański E. i Dobrowolska D. (1957) — *Roczn. Nauk Roln.* 68, E, 1—23.
19. Fagraeus A. and Thorell B. (1956) — *Exp. Cell Res.* 10, 515—522
20. FAO-OIE, *Animal Health Yearbook*, 1957
21. FAO-OIE, *Animal Health Yearbook*, 1958
22. FAO-OIE, *Animal Health Yearbook*, 1959
23. FAO-OIE, *Animal Health Yearbook*, 1960
24. Gentry R. F. and Burmester B. R. (1955) — *Poultry Sci.* 34, 669—672
25. Grundboeck M. i Fredrickson T. N. — Nie publikowane dane.
26. Grundboeck M., Olson C., Fredrickson T. N. (1961) — *Avian Dis.* 5, 392—399
27. Hill C. H. and Garren H. W. (1956) — *Cancer Res.*, 16, 1019—1022.
28. Lagerlöf B. (1960) — *Acta path. et microbiol. scand.*, 49, f. 3, 344—360.
29. Lagerlöf B. (1960) — *Acta path. et microbiol. scand.*, 49, 3, 361—372
30. Lagerlöf B. (1960) — *Acta path. microbiol. scand.* 49, f. 4, 467—479
31. Lagerlöf B. (1960) — *Acta path. et microbiol. scand.* 49, f. 4, 438—454
32. Lagerlöf B. (1960) — *Acta path. et microbiol. scand.* 49, f. 4, 455—466

33. Levine S. and Sharpless G. R. (1959) — *Virology*, 8, 265—267
34. Love R. and Sharpless G. R. (1953) — *Cancer Res.* 13, 869—875
35. Love R. and Sharpless G. R. (1954) — *Cancer Res.* 14, 640—647
36. Olson C. (1941) *Cancer Res.* 1, 384—392
37. Olson C. (1944) — *Cancer Res.* 4, 707—712
38. Olson C. (1945) — *Cornell Vet.* 35, 221—230
39. Olson C. (1946) — *Cornell Vet.* 36, 41—47
40. Olson C. and Zeissig A. (1936) — *J. Immunol.*, 31, 309, 320
41. Olson C. — Konsultacije ustne
42. Parsons D. F., Beaudreau G. S., Becker C., Bonar R. A., Beard J. W. (1959) — *Internat. contre le Cancer*, 15, 826—831, 1959
43. Rubin H. — Konsultacije ustne
44. Sokoloff B., Enomoto K., Fujisawa M., McConell B., Zbar F., Trauner W., Renninger G. (1959) — *Growth*, 23, 137—157

М. Грундбецк

## МЕТОДЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛЕЙКОЗОВ ПТИЦ ЗА ПОСЛЕДНИЕ ГОДЫ

Резюме

На основании литературы, устных консультаций и собственных исследований автор представил ряд проблем по лейкозному синдрому у птиц.

Произведен просмотр экспериментального пассажа вируса, а также антигенов, вакцины, перенос вируса через яйца и влияние диеты, антибиотических и онкологических факторов.

M. Grundboeck

## RECENT METHODS AND RESULTS OF STUDIES ON THE FOWL LEUCOSES

Summary

On the basis of relevant literature, personal communications and his own studies, the author presents several problems concerning the avian leucosis complex. Experimental propagation of the virus, etiology of the diseases, properties and localization of viruses and antigens, vaccines, transmission of the virus through eggs, influence of diet, as well as antibiotic and oncolytic factors have been reviewed.