

УДК 57.083:616.155.392:636.2:636.92  
©2007

*Галатюк О.Є., доктор ветеринарних наук,  
Романишина Т.О., аспірант,  
Державний агроекологічний університет, м. Житомир*

## ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ $\alpha$ -ІНТЕРФЕРОНУ В РЕАКЦІЇ МІКРОНЕЙТРАЛІЗАЦІЇ У СИРОВАТЦІ КРОВІ КРОЛІВ, ЗАРАЖЕНИХ ВІРУСОМ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Постановка проблеми. Серед повільних хвороб сільськогосподарських тварин лейкоз великої рогатої худоби займає одне з провідних місць. Наукові дослідження, обґрунтовані на порівнянні загальної організації геному основних представників онкорнавірусів, дають змогу виділити ВЛ ВРХ і вірус Т-клітинного лейкозу людини в окрему групу - як тип „Е” (8).

Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв’язання проблеми. Створений Р.В. Петровим зі співавторами системно-функціональний підхід до оцінки імунного статусу організму, висунув проблему імуномодуляції на якісно новий рівень (6). Ключовими ланками цитокінової системи вважаються інтерлейкін-1 (Ш-1), фактор некрозу пухлин (ФНП-а), а також система інтерферону (ІНФ) (2, 7).

Інтерферони (родина білків та глікопротеїнів, які продукуються клітинами у відповідь, головним чином, на вірусну інфекцію, а також на синтетичні та природні індуктори) одержали свою назву завдяки загальній властивості, характерній для всіх представників цієї родини, а саме, протівірусному ефекту, що проявляється при взаємодії вірусу з клітинами. ІНФ викликає в останніх посилення синтезу захисних ферментів, здатних пригнічувати розмноження вірусів (3).

Механізм дії ШФ при хронічному лейкозі до кінця не вивчений, хоча є низка публікацій останніх років, присвячених уточненню його впливу на лейкозний процес, які переконують у можливості отримання тривалих цитогенетичних і гематологічних ремісій, підтверджених за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (9).

Постановка дослідів для вирішення даної проблеми на великій рогатій худобі економічно не ефективна.

Експериментально М.І. Гулюкін та ін. (5) підтвердили можливість зараження ВЛВРХ кролів -

*Представлена динамічна зміна рівнів інтерферону протягом шести місяців у сироватці крові кролів, заражених вірусом лейкозу великої рогатої худоби. У реакції мікронейтралізації виявлено достовірне підвищення показників біологічної активності  $\alpha$ -інтерферону в сироватці крові тварин, оброблених комбіфероном за одну та сім діб до зараження вірусом лейкозу великої рогатої худоби.*

виду, філогенетично цілком віддаленого від природного господаря цього вірусу, причому не тільки при параентеральному введенні крові інфікованої тварини, але й з молоком (через шлунково-кишковий тракт). Результати ек-

сперименту Н.С. Мандигри, І.В. Степаняка та ін.

(1) на вівцях і кролях, яким вводили лімфоцити хворої корови, показали, що застосування інтерферону викликає короткочасне підвищення імунологічної реактивності організму, що призводить до підвищення рівня титрів вірусоспецифічних антитіл і гетерогемаглютининів.

Видоспецифічність ІНФ не абсолютна; відомі випадки перехресної чутливості клітин інших видів тварин до ІНФ певної видової специфічності (10).

Повідомлень про біологічну активність  $\alpha$ -інтерферону в сироватці крові кролів, оброблених комбіфероном у різні періоди до заражених клітинами перещеплювальної культури ембріона вівці (FLK), що продукує вірус хронічного лейкозу великої рогатої худоби, в доступних нам літературних джерелах ми не зустріли.

Завдання дослідження: визначити біологічну активність  $\alpha$ -інтерферону в сироватці крові при відтворенні інфекції лейкозу великої рогатої худоби у кролів, яким попередньо застосували комбіферон.

Матеріали і методи. У досліді використали 16 кролів масою 1,5-2 кг віком 3-4 місяці. Зараження лабораторних тварин проводили культурою клітин ембріона вівці (FLK), що продукує вірус лейкозу великої рогатої худоби. Концентрація клітин культури FLK - 60-80 тис. клітин в 1 см<sup>3</sup>. Застосовували препарат - комбіферон із біологічною активністю  $\alpha$ -ІНФ 1 млн. МО/см<sup>3</sup>, у-ШФ 100 тис. МО/см<sup>3</sup>. Кролів розділили на 4 групи по 4 в кожній:

1-й групі внутрішньовенно ввели 2,5 см<sup>3</sup> куль-

тури клітин;

2-й групі за 24 години до введення вірусомісного матеріалу провели внутрішньомязеву ін'єкцію 1 см<sup>3</sup> комбіферону;

3-й групі ввели 1 см<sup>3</sup> комбіферону за 7 діб до зараження;

4-та група була контрольною.

У всіх тварин відібрали кров до початку експерименту. Після постановки досліду здійснювали забір крові через 14, 21, 30 діб після зараження, а далі щомісячно протягом 6 місяців.

Для визначення біологічної активності ІНФ у сироватці крові кролів застосовували реакцію мікронейтралізації (РН). Компонентами реакції були: перещеплювальна культура клітин трахеї теляти, герпесвірусу коней першого типу (штам „Буковина”), адаптований до зазначеної культури, комбіферон, сироватки крові кролів. РН проводили за мікрметодом у 96-лункових мікропланшетах із постійною дозою вірусу. Готували 10-кратні розведення комбіферону на підтримуючому середовищі ГЛА з відомою активністю у міжнародних одиницях (МО). Проби дослідних сироваток крові титрували у розведеннях від 1:2 до 1:256 на такому ж підтримуючому середовищі. Сироватки крові прогрівали, щоб інактивувати білки системи комплементу та термолабільні інгібітори, після чого переносили розведений комбіферон і сироватки на плашки з лунками, де сформувався 80-100% моношар культури клітин трахеї теляти. Через 24 години після внесення комбіферону і сироваток крові у кожен лунку додавали визначену дозу вірусу. Для контролю залишали лунки з культурою клітин без комбіферону та сироватки крові, замінивши в них поживне середовище. Мікропланшети інкубували у термостаті при температурі 37,5°C декілька днів.

Результати досліджень. За 10 діб до початку експерименту в кролів контрольної і дослідних груп відібрали кров для визначення початкового вмісту ІНФ. За титр ІНФ приймали величину, зворотню розведенню, при якому культура клітин у 50% була повністю захищена від ІДПД вірусу. Найкращим терміном для обліку результатів реакції були 4-6 доба.

Аналізуючи дію комбіферону в різних розведеннях, ми з'ясували, що лунка з титром комбіферону 10<sup>6.5</sup> остання, в якій нейтралізувалася ЦПД вірусу на культурі клітин трахеї теляти. Зробивши перерахунок, можна стверджувати, що стандартним зразком активності ІНФ у на-

шому досліді буде 10 МО а-інтерферону. Активність ІНФ (МО) в 1 см<sup>3</sup> сироватки крові кролів для кожної лабораторної тварини можна розрахувати за формулою:

$$BAI = BAK / T,$$

де *BAI* - біологічна активність а-інтерферону 1 см<sup>3</sup> сироватки крові дослідної тварин, МО;

*BAK* - біологічна активність комбіферону (а-інтерферону) в лунці, в якій культура повністю захищена від ЦПД вірусу, МО;

*T* - титр інтерферону в дослідній сироватці.

Перед початком досліду біологічна активність а-ІНФ у сироватці крові всіх кролів становили 250-350 МО/см<sup>3</sup>. На такому ж рівні активність зберігалась у кролів контрольної групи протягом всього досліду. Мінімальні рівні ІНФ у здорових кролів і тварин контрольної групи можна пояснити циркуляцією в їх шлунково-кишковому тракті грамнегагивних бактерій. Дані організми активують макрофаги і моноцити крові, які виділяють певні види цитокінів (ІЛ-1; ТНФ), а ці речовини стимулюють утворення інтерферонів (4).

У трьох кролів із різних дослідних груп (у 1-й групі - протягом 85-110, у 2-й - 54-63, у 3-й - 28-37 діб після зараження) відмічалися клінічні ознаки хвороби: схуднення, кон'юктивіти, риніти, пневмонія; їм проводили лікування антибіотиками цефалоспоринового ряду, однак усі вони загинули.

Спочатку визначили титри ІНФ у сироватках крові кролів, враховуючи прояв ЦПД вірусу. Результати досліджень динаміки титрів ІНФ у сироватці крові кролів представлені на рисунку 1.

На графіку помітно, що криві динаміки титрів ІНФ першої і третьої груп перетинаються, у тварин першої групи рівень інтерферону зростав до 30 доби і тримався на рівні 2-5 log<sub>2</sub> протягом ще 90 діб. Максимальні показники відмічалися на 30-60 добу. Підвищення титрів ІНФ у тварин третьої групи спостерігалось на 14-21-у добу.

У кролів другої групи титри ІНФ реєструвалися на найвищому рівні (6 log<sub>2</sub>) і трималися до 120-ї доби. Встановлена достовірна різниця у вмісті ІНФ на 21-у і 30-у добу після зараження у порівнянні з тваринами інших груп.

Титри ІНФ у кролів, яким комбіферон ввели за тиждень до зараження, до 120-ї доби зрівнялися з рівнем ІНФ тварин контрольної групи; подібне відбулося у 1-й і 2-й групах відповідно, лише на 150-у і 180-у добу.

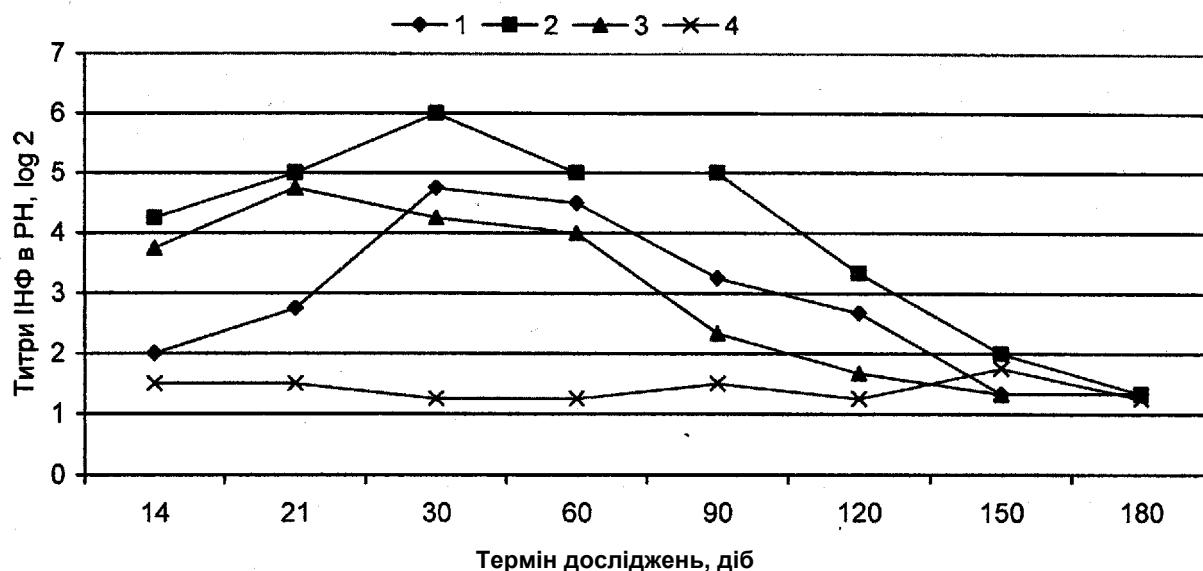


Рис. 1. Результати досліджень сироватки крові кролів на вміст ІНФ у реакції мікронеутралізації

1. Динаміка біологічної активності  $\alpha$ -інтерферону в сироватці крові кролів, МО в 1 мл ( $M \pm m$ ,  $^{\circ}n=4$ ,  $^{\circ\circ}n=3$ )

№ групи	Термін дослідження, діб							
	14	21	30	60	90	120	150	180
1	$^{\circ}450 \pm 125,83$	$^{\circ}700 \pm 100^*$	$^{\circ}2822,58 \pm 403,23^{***}$	$^{\circ}2419,35 \pm 465,61^{**}$	$^{\circ}1003,23 \pm 203,23^*$	$^{\circ\circ}804,30 \pm 404,30$	$^{\circ\circ}266,67 \pm 66,67$	$^{\circ\circ}266,67 \pm 66,67$
2	$^{\circ}2016,13 \pm 403,23^{**}$	$^{\circ}3629,03 \pm 1014,76^*$	$^{\circ}7157,26 \pm 1936,43^*$	$^{\circ}4032,26 \pm 1396,82^*$	$^{\circ\circ}3763,44 \pm 1422,45$	$^{\circ\circ}1208,60 \pm 404,30$	$^{\circ\circ}403,33 \pm 228,06$	$^{\circ\circ}270 \pm 130$
3	$^{\circ}1409,68 \pm 203,23^{**}$	$^{\circ}2822,58 \pm 403,23^{***}$	$^{\circ}2619,35 \pm 1291,71$	$^{\circ\circ}1341,94 \pm 270,97^{**}$	$^{\circ\circ}533,33 \pm 133,33$	$^{\circ\circ}333,33 \pm 66,67$	$^{\circ\circ}266,67 \pm 66,67$	$^{\circ\circ}266,67 \pm 66,67$
4	$^{\circ}300 \pm 57,74$	$^{\circ}300 \pm 57,74$	$^{\circ}250 \pm 50$	$^{\circ}250 \pm 50$	$^{\circ}300 \pm 57,74$	$^{\circ}250 \pm 50$	$^{\circ}350 \pm 50$	$^{\circ}250 \pm 50$

Примітка:  $x^*$  -  $P \leq 0,05$ ,  $x^{**}$  -  $P \leq 0,01$ ,  $x^{***}$  -  $P \leq 0,001$ , де  $P$  розрахований відносно контрольної групи

Підвищення титрів ІНФ у тварин третьої групи спостерігалось на 14-21-у добу. Титри ІНФ у кролів, яким комбіферон ввели за тиждень до зараження, до 120-ї доби зрівнялися з рівнем ІНФ тварин контрольної групи; у 1-й і 2-й групах подібне відбулося, відповідно, лише на 150-у і 180-у добу.

Ми перерахували визначені титри ІНФ у сироватках крові кролів у показники біологічної активності  $\alpha$ -інтерферону, керуючись вище вказаною формулою. Результати представлені у таблиці 1.

Із даних таблиці 1 видно, що максимальні показники біологічної активності сироватки крові кролів 1-ї і 3-ї груп досить подібні й становлять на 30-у добу після зараження 2619-2822 МО/см<sup>3</sup>. Дані свідчать про відсутність суттєвих змін активності  $\alpha$ -інтерферону в організмі тварин при введенні комбіферону за тиждень до зараження

кролів вірусом хронічного лейкозу великої рогатої худоби.

У тварин другої дослідної групи відмічали підвищення біологічної активності  $\alpha$ -інтерферону до 7157 МО/см<sup>3</sup> на 30-у добу, з поступовим зниженням активності з 21-ї по 90-у добу.

Отримані дані вказують на те, що вірус лейкозу великої рогатої худоби зумовлює активацію імунної системи організму кролів і сприяє виробленню лейкоцитами крові високого рівня інтерферону. Таку динаміку біологічної активності  $\alpha$ -інтерферону пояснюємо реакцією імунної системи на циркуляцію вірусу лейкозу великої рогатої худоби в організмі кролів, а також антивірусною та імуномодельюючою дією комбіферону.

Висновки. 1. Модифікована РН дозволяє встановити зміну біологічної активності  $\alpha$ -ІНФ у сироватці крові кролів, заражених вірусом лейкозу великої рогатої худоби.

2. Введення комбіферону кролям за 7 діб до зараження суттєво не впливає на активність ІНФ. У дослідних тварин першої і третьої груп рівень а-інтерферону коливався в межах 1000-2800 МО/см<sup>3</sup> протягом 60 діб.

### БІБЛІОГРАФІЯ

1. Влияние интерферона на инфекционный процессе, обусловленный вирусом лейкоза крупного рогатого скота / Н.С. Мандыгра, С.А. Бялецкий, И.В. Степаняк и др. // Ветеринарная медицина - экономические, социальные и экологические проблемы: тезисы докладов Республиканской конференции. Харьков. - 1990. - С. 95.
2. *Ершов Ф.И.* Система интерферона в норме и при патологии. - М.: Медицина, 1996. - 240 с.
3. *Завелевич М.П., Деев В.А., Рибалко С.Л.* Сучасні уявлення про систему інтерферону // Лабораторна діагностика. - 2004. - №4. — С. 65-72.
4. Інтерферони / Якобисяк М. // Імунологія. Переклад з польської за редакцією проф. В.В. Чопик. - Вінниця: Нова книга, 2004. - С. 180-188.
5. Особенности инфекционного процесса при заражении кроликов вирусом лейкоза крупного рогатого скота / М.И. Гулюкин, Е.А. Обыденова, Л.И. Иванова, Л.Б. Прохвятилова / У Епізоотологія і профілактика інфекційних хвороб великої рогатої худоби: тези доп. міжнародн. наук.-

3. Застосування комбіферону кролям за добу до зараження сприяло формуванню високого рівня а-інтерферону (3600-7157 МО/см<sup>3</sup>) з 21-ї по 90-у добу з поступовим зниженням його активності.

- практ. конф. НАУ, К., 14-17.03.2006. - С. 28-29.
6. *Федоров Ю.Н.* Иммунокоррекция: применение и механизм действия иммуномодулирующих препаратов // Ветеринария. - 2005. - №2 - С. 3-6.
  7. Complete nucleotide sequence of the genom of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retrovirus / N. Sagata, T. Gasunava, J. Tsuzuku-Kawamura at al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci. - 1985. - Vol. 82, № 3. - P. 677-681.
  8. *Firth M.A., Shewen P.E., Hedging D.S.* Passive and active component of neonatal innate immune defenses // Anim. Health Res. Rev. - 2005. - Dec. 6 (2).-P. 143-158.
  9. *Fuch E.I., Bedi A., Yones R.I.* H Cancer Res. - 1995.-N 1.-P. 463-466.
  10. Leukemia / M. Inoue, A. Tojo., D. Tsushimoto et al.. - 1992. - Vol. 82, N 9. - P. 948-951.
  11. *Pestka S.* Interferon standards and general abbreviations / in: Methods in Enzymology **111** Interferon. - 1986. - Vol. 119. - P.16-21.