

РОМАНИШИНА Т.О., аспірант

Державний агроекологічний університет, м. Житомир

ВПЛИВ КОМБІФЕРОНУ НА КУЛЬТУРУ КЛІТИН *FLK*

Досліджено вплив комбіферону на культуру клітин, хронічно інфіковану вірусом лейкозу великої рогатої худоби. Використовували культури *FLK* та трахеї теляти, які витримували 10 днів у термостаті при температурі 37 °С, і препарат Комбіферон. За ними спостерігали щодня візуально, звертаючи увагу на колір поживного середовища, а під мікроскопом відмічали зміни форми і розмірів клітин та рівномірність моношару. Результати вивчення впливу імуномодулювального препарату Комбіферон на культуру *FLK* і трахеї теляти показують, що при дії середніх і низьких доз препарату припиняється процес репродукції вірусу в культурі клітин *FLK*.

Актуальність. Вірусні інфекції сільськогосподарських тварин становлять серйозну проблему ветеринарної медицини. Це зумовлено різними факторами, перш за все специфікою будови вірусів та особливістю репродукції вірусних частинок. Відповідно до сучасних уявлень інтерферони належать до найважливіших регуляторів імунної системи і модифікаторів реактивності у тварин [1]. Пошук ефективних засобів лікування й профілактики при онковірусних інфекціях є актуальним питанням.

Постановка проблеми. Вірус лейкозу великої рогатої худоби репродукується у хронічно інфікованих перещеплюваних культурах клітин [2]. У світі найбільш поширена перещеплювальна лінія клітин *FLK-BLV*, яку одержав у 1974 р. *Van der Maaten* співкультивуванням ембріональних клітин нирки вівці з лейкоцитами лейкозної корови. Така лінія клітин використовується для біохімічних і морфологічних досліджень та отримання антигену для серологічної діагностики хвороби [3].

Інтерферони - це білки, що кодуються генетичним апаратом хребетних (від риб до людини) [2]. Інтерферони (ІФН) належать до класу цитокінів, що являють собою складний комплекс ендогенних імуномодуляторів, які здійснюють регуляцію імунної відповіді [1]. У ветеринарній практиці препарати ІФН-у найчастіше використовують як противірусні засоби, оскільки рекомбінантні Інтерферони значно дешевші за свої природні аналоги, але за ефективністю не поступаються останнім [5].

Визначена висока лікувально-профілактична здатність ІФН при трансмісивному гастроентериті свиней, віспі, парагрипі телят, ротавірусній інфекції телят і поросят, вірусних ентероколітах поросят, гемобластозах корів та ін. [6]. При вірусних ентероколітах у поросят і парагрипі у телят високоєфективними виявились препарати ІФН-у свиней та корів [7, 8]. Відомо, що ефективне, успішне використання вакцин неможливе без ад'ювантів, імуномодуляторів та інтерферонів [9].

Препарат Комбіферон, виготовлений на основі рекомбінантних а- та у-інтерферонів, має широкий спектр антивірусної та імуномодулювальної дії [5]. Повідомлень про його вплив на клітинному рівні на культури *FLK* і трахеї телят в літературних джерелах ми не зустріли.

Мета роботи - вивчити вплив комбіферону на культуру клітин, хронічно інфіковану вірусом лейкозу великої рогатої худоби.

Матеріал і методи досліджень. У дослідах використовували 72-годинні культури *FLK* і трахеї теляти у флаконах об'ємом 250 мл з 100%-ним моношаром. Згідно із стандартною методикою

клітини *FLK* культивували на живильному середовищі, до складу якого входили у рівних об'ємах середовища 199 + ДМЕМ (45%) та RPMI (45%) з додаванням 10%-ної сироватки великої рогатої худоби і гентаміцину. Для культивування культури трахеї теляти використовували ростове середовище такого складу: ГЛА (45%) + середовище 199 (45%) + 10% сироватки великої рогатої худоби та гентаміцин [2,10].

Препарат Комбіферон застосовували в дозі 2,5; 1,25; 0,5; 0,25 см³, що відповідає - 100 тис. МО / см³; 50 тис. МО / см³; 20 тис. МО / см³; 10 тис. МО / см³. Використовували по 3 матраці на кожну дозу комбіферону, відповідно для дози 100 тис. МО / см³ - матраці № 1,2,3; 50 тис. МО / см³ - № 4,5,6; 20 тис. МО / см³ - № 7, 8, 9; 10 тис. МО / см³ - № 10, 11, 12. Аналогічно пронумерували матраці з культурою трахеї теляти, починаючи з № 16.

Для вивчення стану культур під впливом різних доз комбіферону було сформовано 2 варіанти дослідів. Перший експеримент проводили на культурі *FLK*, контролем служили 3 флакони культури такого ж віку без препарату, відповідно матраці № 13,14,15; другий - проводився на культурі клітин трахеї теляти із застосуванням препарату в таких же дозах. Контролем для цього досліді була культура клітин трахеї теляти без внесення комбіферону (№ 28,29, 30).

Культури клітин витримували 10 днів у термостаті при температурі 37 °С. Спостерігали щодня візуально - за змінами кольору середовища і під мікроскопом при малому збільшенні (8x 15), звертаючи увагу на форму і розміри клітин та рівномірність моношару.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати досліджень представлені в таблиці 1. Колір середовища у флаконах перших двох дослідів не змінювався після внесення комбіферону, залишився оранжевим, що пояснюється повним припиненням росту культури клітин. В інших матрацах колір змінився до яскраво-жовтого, тобто тут препарат не так швидко подіяв на клітини.

Таблиця 1 - Зміни в культурах клітин трахеї теляти і *FLK* під дією різних доз комбіферону

Доза	№ матраца	Зміни в моношарі досліджених культур клітин за добу									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Культура <i>FLK</i>									
Д-1	1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Д-2	4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Д-3	7	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Д-4	10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	11	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	12	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
контроль	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Культура трахеї теляти									
Д-1	16	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	17	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	18	-	-	4	+	+	+	+	+	+	+
Д-2	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-
д-3	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Д-4	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
контроль	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітка. Д-1 - 100 тис. МО на 1 см³, Д-2 - 50 тис. МО на 1 см³, Д-3 - 20 тис. МО на 1 см³, Д-4-10 тис. МО на 1 см³ - - цитопатична дія не проявлялась; + - цитопатична дія проявлялась.

На третю добу у матрацах № 1-6, на четверту - № 7, 8, 9 і на п'яту в матрацах 10, 11, 12 цілісність моношару порушилась, з'явилися клітини округлої форми, почалися їх аглютинація та відшарування. У двох останніх дослідях спостерігали наявність клітин з хвостоподібними відростками. Через 24 год у перших двох експериментах відбулася повна загибель клітин.

При дозі 20 і 10 тис. МО / см³ на шосту добу вікна в моношарі збільшилися, у матрацах № 7, 8 вогнища росту зникли, а в інших матрацах вони місцями залишилися, хоча більше 50 % моношару вже плавало у товщі середовища. На сьому добу у матрацах № 10, 11, 12 видовжених клітин уже не спостерігали. Повне руйнування моношару відбулося у третьому досліді на 8-у, а в четвертому - на 9-у добу. На десяту добу всі матраці були вибракувані.

У контрольних матрацах змінився колір середовища з яскраво-оранжевого до жовтого, а відшарування клітин почалося тільки на 11-у добу внаслідок старіння моношару.

Відносно культури клітин трахеї теляти слід зазначити, що токсична дія високої дози комбіферону (2,5 см³) спостерігалася в культурах через 82-96 год. Проявлялася вона округленням клітин та їх аглютинацією. Моношар повністю зруйнувався через 130-140 год.

Препарат в інших дозах мав стимулювальну дію: поживні середовища почали різко змінювати колір внаслідок збільшення швидкості росту культури клітин. Вже на другу добу у матрацах № 19, 20, 21 і на третю в інших (№ 22-27) клітини витягнулись, стали веретеноподібними, а ще через 48 год їх концентрація підвищилася. Клітини повністю вкрили скло матраців, збільшилися в розмірах, набухли, висвітлились. На п'яту добу при дозі комбіферону 50 і 20 тис. МО / см³ (№ 22, 23, 24, 25, 26, 27) над моношаром почали виступати дрібненькі клітини, деякі з них відшарувались і плавали в середовищі. Через дві доби моношар почав старіти, на що вказував „виснажений” колір середовища. Аналогічні зміни відбулися в останній серії цієї частини досліді, але з затримкою на дві доби. У контрольних матрацах (№ 28, 29, 30) культура клітин трахеї теляти розвивалася значно повільніше, злушення клітин почалося лише на 14-у добу.

Таким чином, при контакті інтерферонів, які входять до складу комбіферону, з клітинами, ураженими вірусом лейкозу, пригнічується синтез вірусних структурних білків і ферментів, потрібних для реплікації вірусного геному, а оскільки РНК вірусу лейкозу вживлений у геном клітин, то призупиняється не тільки процес репродукції вірусу, а й настає загибель клітин.

Висновки. 1. Високі дози комбіферону є токсичними не тільки для культури *FLK*, а й для культури клітин трахеї телят.

2. Дози комбіферону 20 і 10 тис. МО / см³ справляють стимулювальний вплив на культуру клітин трахеї теляти і згубний - на культуру *FLK*.

3. Дози комбіферону 100; 50; 20; 10 тис. МО / см³ зумовлюють аглютинацію клітин культури *FLK* відповідно на 3, 6 і 8-у добу після його внесення.

4. Комбіферон здатний пригнічувати репродукцію вірусу лейкозу великої рогатої худоби.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення дії комбіферону на організм лабораторних тварин, експериментально заражених вірусом лейкозу, і можливість застосування його для профілактики та лікування лейкозу великої рогатої худоби.

Список літератури

1. Федоров Ю.Н. Иммунокоррекция: применение и механизм действия иммуномодулирующих препаратов // Ветеринария - 2005. - №2. - С. 3-6.
2. Собко А.И., Сюсюкин А.И. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных: Справочник. - М.: Агропромиздат, 1986. - С. 274—291.
3. Етіологія лейкозу великої рогатої худоби / О.Б.Домбровський, Л.Є. Корнієнко, Б.М. Ярчук та ін. // Лейкоз великої рогатої худоби. - Біла Церква, 2003. - С. 12-22.
4. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Гуморальні фактори противірусного імунітету // Ветеринарна вірусологія: Підручник. - К.: Вища освіта, 2004. - С. 213-234.
5. Інтерферон у ветеринарній медицині: перспективи використання / В.Н.Зоценко, Н.О.Тимошок, М.Я.Співак, О.Я.Карась // Вет. медицина України. - 2001. - № 4. - С. 43-44.
6. Берус П.Т., Андреев Е.В. Применение интерферона и его индуктора // Ветеринария. - 1983. - № 9. - С. 28-30.
7. Співак Н.Я., Кишко Я.Г. Сравнительная характеристика препаратов свиных альфа- и гамма-интерферонов // Использование интерферонов в ветеринарии: Материалы Всесоюз. семинара. - Киев, 1989. - С.43-44.
8. Cummings J.M., Texal A.B. Low dosage of interferon to enhance vaccine efficiency: Пат. 1323564 // M. University system: № 545085: Заявл. 21.08.87. Опубл. 26.10.93.
9. Cytokines as adjuvants for ruminant vaccines / S.A. Lofthouse, A.E. Andrews, M.I. Elhay et al. // Intern. J. Parasitol. - 1996.-P.835-842.

10. Методические указания по применению культур клеток в диагностических исследованиях / Б.И. Антонов, В.В. Борисова, П.М. Волкова и др. //Лабораторные исследования в ветеринарии, бактериальные инфекции: Справочник. - М.: Агропромиздат, 1986. - С. 279-298.

Т.А. Романишина

Влияние комбиферона на культуру клеток FLK

Целью работы было изучить влияние комбиферона на культуру клеток, хронически инфицированную вирусом лейкоза крупного рогатого скота. В опытах использовали культуры *FLK* и трахеи телёнка, которые выдерживали 10 дней в термостате при температуре 37 °С, и препарат Комбиферон. За ними наблюдали каждый день визуально, обращая внимание на цвет питательной среды и под микроскопом, отмечая изменения формы и размеров клеток, равномерность моношара. Представлены результаты изучения влияния иммуномодулирующего препарата Комбиферон на культуру *FLK* и на культуру трахеи телёнка. Показано, что при действии средних и низких доз препарата останавливается процесс репродукции вируса в культуре клеток *FLK*.

T.O.Romanishina

Influence combipheroni on culture of cells FLK

By the purpose of activity was learn influencing combipheroni on culture of cages chronically infected by a virus of a leucosis of the large cattle. In experience have used cultures *FLK* and tracheas of the calf, which one maintained 10 days in the thermostat at the temperature of 37 °C a drug combipheroni of them watched each day visually, paying attention on colour of a medium and under a microscope, marking changes of the form and sizes of cages, uniformity of a monosphere. Results of studying of influence a preparation combipheroni on culture *FLK* and on culture of a trachea couts. They are submitted, that at action of average and low dozes of a preparation process of a reproduction of a virus in culture of cells *FLK* stops.