

О.Є. ГАЛАТЮК, доктор ветеринарних наук, професор,

Т.О. РОМАНИШИНА, аспірант

Державний агроекологічний університет (м. Житомир)

ВПЛИВ КОМБІФЕРОНУ НА ПЕРЕБІГ ІНФЕКЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ У КРОЛІВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ЗАРАЖЕНИХ ВІРУСОМ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Приведені результати досліджень свідчать про можливість експериментального відтворення лейкозу у кролів. Показано, що одноразового введення комбіферону кролям в дозі 1 см³ недостатньо, щоб захистити організм тварини від персистенції вірусу лейкозу. У групі тварин, яким вводили комбіферон за добу до зараження у одного кроля була відсутня реакція на введення культури клітин FLK..

Постановка проблеми. Однією з найбільших і актуальніших проблем ветеринаризації є лейкоз великої рогатої худоби. Ця хвороба, що розглядається в аспекті сучасних поглядів та новітніх досягнень в області онковірусології, виходить за вузькі рамки ветеринарії і являє собою загальну медико-біологічну проблему.

Вивчення пухлин у тварин допомогло виявити основні закономірності злоякісного росту, в тому числі і у людей [16]. Експериментальне відтворення пухлин у тварин дозволяє досліджувати виникнення і розвиток пухлин, а також оцінити результати застосування нових способів їх розпізнавання і лікування. Беручи до уваги теоретичні установки та концепції вірусного канцерогенезу, лейкоз великої рогатої худоби являє і певний санітарно-медичний інтерес, і не випадково він досліджується поряд з лейкозами і раковими захворюваннями людей. Пошук ефективних засобів лікування і профілактики при онковірусних інфекціях є актуальним питанням [8].

Аналіз останніх досліджень. Природний резервуар вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛВРХ) не знайдений. Разом з тим, в лабораторних умовах, а також при тривалому сумісному утриманні, ВЛВРХ здатен інфікувати багато видів тварин. При внутрішньовенному зараженні кролів у 100% випадків вдавалось відтворити інфекцію, яка підтверджувалась виділенням інфекційних вірусних частинок і персистенцією антитіл до вірусу [10].

Б.М. Ярчук, А.Є. Галатюк, , В.П. Заярнюк, С.А. Черницький провели експерименти по зараженню кроликів і морських свинок лейкоконцентратом серологічно позитивних до вірусу лейкозу телиць і культурою клітин ембріона вівці, що продукує вірус. У всіх реагуючих кролів розвиток інфекційного процесу супроводжувався незначним

лімфоцитозом з порушенням співвідношення малих, середніх і великих лімфоцитів [9].

Найкращою експериментальною моделлю на думку Зданевича П.П. і Мягих Н.В. [7] для відтворення інфекції зумовленою вірусом лейкозу великої рогатої худоби є кролі, у яких онковірусна інфекція супроводжується розвитком імунно-дефіцитного синдрому, при цьому у інфікованих кролів виявляли антитіла і провірус вірусу лейкозу великої рогатої худоби.

У досліджах В.О. Бусола, П. Г. Шульги та ін. [5]. доведено, що сироватка крові хворих лейкозом корів в поєднанні з інтерфероном затримує розвиток інфекційного процесу, викликаного вірусом лейкозу.

Ефективність серозахисту, на думку Ф. І. Єршова, О. С. Новохатського (1980), Р. М. Friedman (1987), може бути підвищена при одночасному застосуванні інтерферону. Він здатний пригнічувати ріст, поділ пухлинних клітин, запобігати трансформації нормальних клітин, стимулювати протипухлинний імунітет, підсилювати кілерну активність сенсibiliзованих лімфоцитів, підвищувати фагоцитарну активність макрофагів) [6, 15]. Ключовими ланками цитокінової системи вважаються інтерлейкін-1 (ІЛ-1), фактор некрозу пухлин (ФНП-а), а також, система інтерферону (ІФН) [10].

Встановлена висока лікувально-профілактична здатність ІФН при трансмісивному гастроентериті свиней, віспі, парагрипі телят, ротавірусній інфекції телят і поросят, вірусних ентероколітах поросят, гемобластозах корів та ін [1]. Механізм дії ІФН при хронічному лейкозі до кінця не вивчений, хоча є ряд 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 [12, 14].

Результати експерименту Мандигри Н.С., Степаняка І.В. та ін. на вівцях і кролях, яким вводили лімфоцити хворої корови, показали, що застосування інтерферону викликає зміни в імунобіологічній реактивності організму, що призводить до підвищення рівня титрів вірусоспецифічних антитіл і гетерогемаглютининів [2].

Передача лейкозу великої рогатої худоби вівцям та кролям доводить, що так званий лейкоз великої рогатої худоби не є специфічним тільки для великої рогатої худоби, і свідчить на користь гіпотези про можливість етіологічної спільності лейкозів ссавців. Слід визнати, що, не дивлячись на досягнуті успіхи, існує багато практично невирішених і теоретично нез'ясованих питань, що стосуються передачі цієї хвороби штучним шляхом. Проблема етіологічного зв'язку між лейкозами великої рогатої худоби та тварин інших видів потребує детального вивчення.

Метою нашої роботи було з'ясувати роль комбіферону у експериментальному зараженні кролів вірусом лейкозу великої рогатої худоби

Матеріал і методики досліджень. У досліді використовували 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^3 . Застосовували препарат – комбіферон з біологічною активністю α - ІНФ 1 млн МО / см^3 , γ - ІНФ 100 тис МО / см^3 . Експеримент тривав два роки. Впродовж цього терміну спостерігали за розвитком лейкозного процесу. Для проведення гематологічних та серологічних досліджень здійснювали забір крові через 14, 21, 30 діб, а потім кожен місяць протягом 8-ми місяців.

Підрахунок загальної кількості лейкоцитів у крові та виведення лейкоформул виконували за загальноприйнятими методиками [4]. Частину кролів забивали у віці 10 місяців, проводили їх розтин та відбирали матеріал для гістологічних досліджень. Гістологічні дослідження проводили на кафедрі анатомії і гістології факультету ветеринарної медицини Державного агроекологічного університету. Відібрані шматочки матеріалу фіксували в 10-12 %-му розчині формаліну, промивали, зневоднювали та заливали у парафін, застосовуючи загально прийняті методи фіксації тканин та виготовлення зрізів [3]. Для визначення морфології клітин, тканин та для отримання оглядових препаратів матеріал зафарбовували гематоксилін-еозином та вивчали за допомогою світлового мікроскопа [11].

Власні дослідження. Виходячи з актуальності завданої проблеми, нами проведено дві серії дослідів по штучному відтворенню лейкозу у здорових кролів, кози та вівці.

Кролів розділили на 4 групи по 4 тварини в кожній.

Кролям першої групи (4 кролі № 1, 2, 3 і 4) внутрішньовенно ввели 1 см^3 культури клітин FLK (60-80 тис. клітин в 1 см^3). Тваринам другої групи (4 кролі № 5, 6, 7 і 8) за 24 години до введення вірусомісного матеріалу провели внутрішньом'язеву ін'єкцію 1 см^3 комбіферону. Кролям третьої групи (4 кролі № 9, 10, 11 і 12) за 7 діб до введення культури клітин FLK провели внутрішньом'язеву ін'єкцію 1 см^3 комбіферону. Тварини четвертої групи були інтактними

У кролів контрольної групи протягом всього періоду спостережень не відмічали позитивної реакції в РІД, гематологічні показники залишались в межах фізіологічних норм.

Через 3-5 тижнів після зараження кролі дослідних груп почали хворіти: в них погіршився апетит, спостерігалось пригнічення, виснаження, проявились кон'юктивіти. У трьох кролів з різних експериментальних груп (№ 3, 6, 9) протягом 85-110, 54-63, 28-37 днів відповідно відмічались риніти, пневмонія. Їм проводили лікування антибіотиками цефалоспоринового ряду, однак, всі вони загинули.

Протягом двох місяців у тварин, яким вводили комбіферон кількість лейкоцитів була достовірно вищою у порівнянні з першою та контрольною

групами. Через 14 діб у РІД були виявлені лінії преципітації між досліджуваною і позитивною сироваткою крові в тест-системі, що свідчить про одночасну наявність у сироватці крові як антитіл, так і антигенів щодо вірусу лейкозу великої рогатої худоби. Через 30 днів після зараження додаткова лінія зникла. В сироватках титри специфічних антитіл виявлялись на рівні – нативного до 1:4. Через 90 діб після зараження специфічні антитіла у двох кролів зникли, що свідчить про зниження титру антитіл, або про рівновагу виробки антитіл та антигена [8].

Лінії преципітації між антигеном і досліджуваними сироватками з'явилися у трьох кролів другої групи, у однієї тварини першої групи (№ 1) і двох кролів третьої групи № (9, 10) вже на 14-ту добу після зараження, а у тварин № 3, 4, 10 – на 21 добу. У період з першого до третього місяця з початку досліду у п'яти тварин спостерігався лімфоцитоз (80-95 %) і титр антитіл зріс у 2-8 разів. На четвертому місяці досліду у кролів № 2, 4, 10 реакція в РІД була негативною. У тварин № 8, 11, 12 лінії преципітації між сироваткою та антигеном зникли на 120-ий день після зараження. Повернення до початкових показників відмічали на 150-180 день після зараження. У кроля № 7 (група тварин, яким вводили комбіферон за добу до зараження) була відсутня реакція на введення культури клітин FLK.

Так, через 7 місяців після зараження у всіх кролів, крім тварини №1, реакція в РІД була негативною. Через 8 місяців ми провели забій чотирьох дослідних і всіх контрольних тварин. У одного кроля № 1 титр антитіл на рівні – нативна сироватка та 1:2, тримався протягом 18 місяців, хоча кількість лімфоцитів у крові знизилась до 55 %.

У однієї тварини через три місяці після відсутності антитіл в РІД протягом тридцяти днів по всьому тілу почали розвиватись множинні пухлини щільної консистенції. Особливо виражені вони були в ділянці лівої частини тіла на передній і задній кінцівках. По мірі збільшення об'єму пухлин у кроля розвивалися набряки, тварина була пригнічена, апетит погіршився, рухи сповільнювались. У спокійному стані тварина перебувала в правому боковому положенні. Кріль хворів два місяці і загинув. При проведенні патологоанатомічного розтину трупа ознаки множинних пухлин не були виявлені. У внутрішніх органах грудної та черевної порожнини спостерігались крапчасті крововиливи.

Через рік після зараження була поставлена біопроба: 2 см³ стабілізованої крові від кроля № 2 внутрішньом'язево ввели вівці, віком два роки, а кров від кролів № 1, 4, 8, 11 (по 1 см³ від кожного) – козі віком 3 роки. Протягом 12 місяців лейкозних змін у картині крові у цих тварин не спостерігали.

Через 24 місяці після зараження стабілізовану кров від кроля №1 ін'єкціювали кролю № 17, а від кроля № 8 кролю № 18 (№ 17, 18 – безпородні клінічно здорові кролі віком 5 місяців). Через місяць після постановки біопроби у кроля № 17 погіршився апетит, з'явилась позитивна реакція в РІД при дослідженні сироватки крові. В периферичній крові відмічали лейкоцитоз, відсоток лімфоцитів підвищився до 90 %. Тварина

почала швидко худнути, кількість лейкоцитів зменшилась протягом 14 днів, але лімфоцитоз незмінно спостерігався на високому рівні (95%). Через три місяці після зараження у кроля почали прогресувати паралічі кінцівок, тому його забили. Видимих патологоанатомічних змін характерних для лейкозу при проведенні розтину не спостерігалось. У тварини № 18 протягом чотирьох місяців клінічні ознаки лейкозу були відсутні.

При проведенні патогістологічних досліджень у експериментальних кролів виявлялися зміни, які можуть свідчити про розвиток у них лейкозного процесу: наявність великої кількості лімфобластів, а також клітин лейколізу, в гістопрепаратах печінки – скупчення незрілих форм лімфоцитів (навколо міжчасточкових судин). Скупчення лімфоїдних клітин на гістологічних препаратах ми виявляли між м'язевими волокнами у вигляді маленьких вогнищ.

Висновки. 1. Клінічні ознаки, картина крові, зміни гістоструктури та клітинного складу імунних і некровотворних органів дослідних кролів свідчать про розвиток лейкозного процесу, зумовленого вірусом лейкозу великої рогатої худоби.

2. Одноразового введення комбіферону кролям в дозі 1 см³ недостатньо, щоб захистити організм тварини від персистенції вірусу лейкозу. У групі тварин, яким вводили комбіферон за добу до зараження у одного кроля була відсутня реакція на введення культури клітин FLK.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на визначення оптимальної дози комбіферону, яка буде забезпечувати захист кролів від зараження вірусом лейкозу.

1. Берус П.Т., Андреев Е.В. Применение интерферона и его индуктора // Ветеринария.—1983. — № 9 — С.28–30.

2. Влияние интерферона на инфекционный процесс, обусловленный вирусом лейкоза крупного рогатого скота / Н.С. Мандыгра, С.А. Бялецкий, И.В. Степаняк, Д.И. Бондаренко // Ветеринарная медицина – экономические, социальные и экологические проблемы: тезисы докладов Республиканской конференции. Харьков. – 1990. – С. 95.

3. Горальський Л. П., Хомич В. Т., Кононський О. І. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології. Навчальний посібник. – Житомир. – 2005. – 288с.

4. Дослідження крові тварин та клінічна інтерпретація отриманих результатів: Методичні рекомендації для студентів факультету ветеринарної медицини керівників та слухачів Інституту гаслядипломного навчання керівників і спеціалістів ветеринарної медицини / В.І. Левченко, В.М. Соколюк, В.М. Безух та ін. – Біла Церква – 2002.— 56 с.

5. *Експериментальні дослідження по вивченню можливості імунопрофілактики лейкозу* / В. О. Бусол, П. Г. Шульга, О. Є. Галатюк, М. С. Мандигра // *Ветеринарія*. – 1991. – № 66. – С. 76–78
6. *Ершов Ф. И., Новохатский А. С.* Интерферон и его продукты.— М.: Медицина – 1980.— 172 с.
7. *Зданевич П.П. і Мягих Н.В.* Визначення можливості відтворення інфекції вірусу великої рогатої худоби кролях // *Розвиток ветеринарної науки в Україні: здобутки та проблеми: збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції*. – Харків. – 1997. – С.– 113.
8. *Лалов Х. Х.* Экспериментальная передача лейкоза крупного рогатого скота // *Проблемы экспериментальной онкологии и лейкозов человека и животных.*, Под. ред. Л.М. Шабада, В.П. Шишкова — Москва. – 1979 — С. 288–292.
9. *Опыты по заражению кроликов и морских свинок вирусом лейкоза крупного рогатого скота* / А.Е. Галатюк, Б.М. Ярчук, В.П. Заярнюк, С.А. Черницкий // *Ветеринарная медицина – экономические, социальные и экологические проблемы: тезисы докладов Республиканской конференции*. – Харьков. – 1990. – С. 89.
10. *Особенности инфекционного процесса при заражении кроликов вирусом лейкоза крупного рогатого скота* / М.И. Гулюкин, Е.А. Обыденова, Л.И. Иванова, Л.Б. Прохватилова // *Епізоотологія і профілактика інфекційних хвороб великої рогатої худоби: тези доповідей міжнародної науково-практичної конференції (14-17.03.2006.)* — Київ. – С. 28–29.
11. *Потоцький М.К., Кривутенко О.І.* Основи гістопатологічної техніки. / *Метод. вказівки*. – Київ. – 2006. – 44 с.
12. *Bilhou-Nabera C., Viard F., Marit G. et al.* // *Leukemia*. – 1992. – N 6. – P. 595-598.
13. *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. – 82, № 3. – P. 677-681.
14. *Inoue M., Tojo A., Tsushimoto D. et al.* // *Leukemia*. – 1992. – Vol. 82, N 9. – P. 948-951.
15. *Friedman R. M.* Antitumor effects of interferons // *Exp. Pathol.* — 1987.— N2. – P. 203—227.
16. *Trichopoulos D., Li F.P., Hunter D.J.* What Causes Cancer // *Sci. Amer.* 1996. № 9. P. 80–87.

**ВЛИЯНИЕ КОМБИФЕРОНА НА ТЕЧЕНИЕ
ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА У КРОЛИКОВ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ ЛЕЙКОЗА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА / А.Е. Галатюк , Т.А. Романишина**

Целью работы было определить роль комбиферона в экспериментальном заражении кроликов вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Нами поставлено две серии опытов. Первый эксперимент проводили на кроликах, зараженных вирусом лейкоза. Животных разделили на 4 группы (3 опытные и 1 контрольная). Предварительно кроликам двух опытных групп в разные сроки (за сутки и за 7 суток) перед заражением вводили комбиферон. На протяжении двух лет наблюдали за развитием лейкозного процесса. Для проведения гематологических и серологических исследований брали кровь через 14, 21, 30 дней, а потом каждый месяц на протяжении восьми месяцев. Через 3 – 5 недель после заражения у опытных животных ухудшился аппетит, наблюдалось уныние, истощение. На протяжении двух месяцев у животных, которым вводили комбиферон количество лейкоцитов было достоверно выше в сравнении с первой и контрольной группами. Зафиксированы линии преципитации между исследованной и положительной сывороткой в тест-системе, что свидетельствует об одновременном присутствии в сыворотке как антител, так и антигенов к вирусу лейкозу крупного рогатого скота. Линии преципитации между антигеном и сывороткой наблюдались на протяжении 3 – 4 месяцев, у одного кролика с группы, где не использовали комбиферон – 6 месяцев. У одного животного (комбиферон вводили за сутки к заражению) отсутствовала реакция организма на введение культуры клеток FLK. Второй эксперимент – биопроба на овце и козе показала отрицательный результат. Но введение цельной крови клинически здоровому кролику вызвало ухудшение аппетита, изменения в периферической крови (лейкоцитоз с 95% лимфоцитозом), положительную реакцию с антигеном в тест-систем и параличи конечностей. Морфологические изменения внутренних органов кроликов: подтверждают перестройку организма, обусловленную лейкозным процессом и низкую эффективность комбиферона для защиты организма от лейкозной инфекции.

INFLUENCE OF COMBIPHERONI ON THE FLOW OF INFECTIOUS PROCESS FOR RABBIT EXPERIMENTAL INFECTIONING BLV / Galatyuk A.E., Romanishina T.A.

The purpose of work was to define the role of combipheroni in the experimental infection of rabbit the virus of leucosis of cattle. We are put two series of experiments. The first experiment was conducted on rabbit, infected the virus of leucosis. Animals were divided into 4 groups (3 experimental and a 1 control). Preliminary to the rabbit of two experimental groups in different lines (for days and for 7 days) combipheroni entered before an infection. During two years looked after development of leukemic process. For the leadthrough of haematological and serum researches took blood through 14, 21, 30 days, and

then every month during eight months. In 3 – 5 weeks after an infection for experimental animals an appetite was worsened, there was dejection, exhaustion. During two months at animals which the комбиферон amount of leucocytes was entered was reliable higher by comparison to the first and control groups. The lines of precipytation are fixed between an investigational and positive whey in test-system, that testifies to the simultaneous being in the whey of both antibodies and antigens to the virus to the leucosis of cattle. The lines of precipytation between an antigen and whey were observed during 3 – 4 months, for one rabbit from a group, where combipheroni did not utilize – 6 months. For one animal (combipheroni entered for days to the infection) the reaction of organism absented on introduction of culture of cages of FLK . The Second experiment – a biottest on a sheep and goat rotined a negative result. But introduction of whole blood clinically caused worsening of appetite, changes a healthy rabbit in peripheral blood (leycocytoosi with a 95% lymphocytosis), positive reaction with an antigen in test-system and paralyses of extremities. Morphological changes of internalss of rabbit: confirm alteration of organism, conditioned a leukemic process and low efficiency of combipheroni for protecting of organism from a leukemic infection.

Рецензент – доктор ветеринарних наук, професор *Л.П.Горальський*