

## Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC

### The state of innate immunity of sheep in case of experimental lymphocytic leukemia and the use of means for its specific prevention

L.V. Kovalenko

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

*Article info*

Received 20. 05.2018

Received in revised form

26.05.2018

Accepted 01.06.2018

National Scientific Center  
«Institute of Experimental and  
Clinical Veterinary Medicine»,  
Pushkinska str., 83, Kharkiv,  
Ukraine  
Tel. +38-057-707-10-90  
E-mail:  
[nsc.iecvm.kharkov@gmail.com](mailto:nsc.iecvm.kharkov@gmail.com)

In ensuring the animal health under the influence of biotic and abiotic factors, the role of immune system, the primary elements of which are the factors of innate (non-specific) immunity, is very important. The aim of the research was to determine the peculiarities of the state of innate immunity of sheep in case of experimental leukemia infection and immunization with “Profileik-3” vaccine against bovine leukemia and a specific oligo-nucleoprotein with activity of the transfer factor (SOTF). The experiment was conducted on 24 sheep (4 groups, 6 animals in each group). Sheep of the first group №1 were infected with bovine leukemia agent (BLV). Animals of the second group were inoculated with SOTF, SOTF and the vaccine, and the vaccine at intervals of 3 and 7 days, respectively, animals of the third group were vaccinated twice at interval of 7 days. Animals of the fourth group (control group) were injected 0.9% NaCl solution according to the same procedure. On the 101st day of the experiment, sheep of groups №2 and №3 were infected with BLV. The trial period was 184 days. The material for study was stabilized blood and blood serum, which were studied using conventional microscopic, spectrophotometric, immunoassay and serological methods. It has been found that in the initial stages of the leukemic process there is a fluctuation in the number of leukocytes, and the maximum increase of this index by 27,1% compared to the control group has been noted at the end of the experiment, and the most acute increase in the activity of phagocytosis has been determined on day 50 and 87. The maximum increase in the concentration of globulins by 50.2% was found on the 20th day after infection with BLV. The functioning patterns of the humoral and cellular components of innate immunity when using “Profileik-3” vaccine against leukemia separately and in the complex with SOTF have been characterized. There have been determined the dynamic changes in the level of leukocytes, globulins and mediators of the immune response (circulating immune complexes and seromucoids) under the influence of drugs. A positive effect on SOTF on phagocytic activity of neutrophils, which indicators increased by 17,2–34,5% compared to control group, has been discovered. The most acute changes caused by SOTF were in the intensity of production of cytokines. While in animals of group №2 the level of IL-1 maximally exceeded the control parameters by 91.0%, and IF- $\gamma$  by 2 times, then when using only vaccine exceeded the limits by 39.7% and 48.2% respectively. An active compensatory reaction of the antioxidant defense system on activation of lipid peroxidation in infected with BLV and vaccinated animals has been also revealed. Thus, it has been proved that the course of the infectious and post-vaccination processes of experimental lymphocytic leukemia is characterized by dynamic changes in the state of humoral and cellular factors of innate immunity. The use of a specific transfer factor allows to prevent the development of pathoimmunobiochemic disorders and to activate the cell-mediated link of non-specific resistance of the organism of experimental animals during vaccination. It is promising to use the methodology for the examination of the dynamics of innate immunity in the study of the pathogenesis of other infectious animal diseases and the development of their prophylactic vaccination.

*Key words:* vaccine; transfer factor; cytokines; lipid peroxidation; antioxidant defense

**Citation:**

Kovalenko, L.V. (2018). The state of innate immunity of sheep in case of experimental lymphocytic leukemia and the use of means for its specific prevention. *Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC*, 6(2), 38–48.

## Стан вродженого імунітету овець за експериментального лімфолейкозу та застосування засобів його специфічної профілактики

Л.В. Коваленко

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,  
Харків, Україна

У забезпеченні здоров'я тварин за дії біотичних і абіотичних чинників важливою є роль системи імунного захисту, первинною ланкою якої виступають фактори вродженого (неспецифічного) імунітету. Мета досліджень – визначити особливості стану вродженого імунітету овець за експериментальної лейкозної інфекції та імунізації вакциною проти лейкозу великої рогатої худоби “Профілейк-3” і специфічним олігонуклеопротеїдом із активністю фактора переносу (СОФП). Дослід проведено на 24 вівцях (4 групи по 6 тварини у кожній). Вівці 1 групи інфіковані збудником лейкозу великої рогатої худоби (BLV). Тваринам 2 групи інокульовано СОФП, СОФП і вакцину та вакцину з інтервалом 3 та 7 днів відповідно, 3 групи – вакцину двічі з інтервалом 7 днів. Тваринам 4 групи (група контролю) вводили 0,9% розчин NaCl за аналогічною схемою. На 101 добу досліду вівці 2 та 3 груп групи були інфіковані BLV. Термін досліду – 184 доби. Матеріал – стабілізована кров і сироватка крові, які досліджували з використанням загальноприйнятих мікроскопічного, спектрофотометричного, імуноферментного та серологічного методів. Встановлено, що на початкових стадіях лейкозного процесу відбувається коливання кількості лейкоцитів, а максимальне зростання цього показника на 27,1% щодо контролю відмічено наприкінці досліду, найвираженіше підвищення активності фагоцитозу встановлено на 50 та 87 добу. Виявлено максимальне підвищення концентрації глобулінів на 50,2% на 20 добу після інфікування BLV. Охарактеризовано закономірності функціонування гуморальної та клітинної ланок вродженого імунітету при застосуванні вакцини проти лейкозу “Профілейк-3” окремо та у комплексі з СОФП. Встановлено динамічні зміни рівня лейкоцитів, глобулінів та медіаторів імунної відповіді (циркулюючих імунних комплексів та серомукоїдів) під дією препаратів і виявлено позитивний вплив СОФП на фагоцитарну активність нейтрофілів, показники якої підвищувались на 17,2–34,5% щодо контролю. Найбільш виражені зміни СОФП викликав у інтенсивності продукування цитокінів. Якщо в тварин 2 групи рівень ІЛ-1 максимально перевищував показники контролю на 91,0%, а ІФ- $\gamma$  – у 2 рази, то при застосуванні лише вакцини – на 39,7% та 48,2%. Виявлено також активну компенсаторну реакцію системи антиоксидантного захисту на активізацію ПОЛ у інфікованих BLV і щеплених тварин. Таким чином, доведено, що перебіг інфекційного та поствакцинального процесу за експериментального лімфолейкозу характеризується динамічними змінами стану гуморальних та клітинних факторів вродженого імунітету. Застосування специфічного фактора переносу дозволяє запобігти розвитку патоімунобіохімічних порушень та активізувати клітинно-опосередковану ланку неспецифічної резистентності організму дослідних тварин при вакцинації. Перспективним є використання методології дослідження динаміки вродженого імунітету при вивченні патогенезу інших інфекційних захворювань тварин та розробці засобів їх вакцинопрофілактики.

*Ключові слова:* вакцина; трансфер-фактор; цитокіни; перекисне окиснення ліпідів; антиоксидантний захист

### Вступ

Численні дослідження останніх десятиріч дозволили скласти більш поглиблене уявлення про взаємодію клітин та біохімічних процесів у системі неспецифічної та специфічної відповіді на дію біотичних і абіотичних чинників на організм людини і тварин (Nairz et al., 2018). У цій системі первинною ланкою виступають фактори неспецифічного імунітету. Для індукції гуморальної відповіді необхідна участь макрофагів, які без дії Т-клітин, індують і регулюють активацію В-лімфоцитів (Masljanko, 1999). Особлива роль у цьому процесі відведена гуморальній ланці неспецифічного імунітету та біохімічним процесам (Mesova, 2016; Vijay, 2018; Bauer, et al., 2018)

Теоретичною і методологічною основою визначення ролі кожного з факторів імунітету та розробки засад застосування цих знань у практичній та гуманній медицині можуть стати теорії Нобелівських лауреатів Н. Jerne та S. Tonegawa. Суть теорії першого автора полягає в тому, що сам

активний центр антитіла є антигенною детермінантною першого порядку (антиідіотипові антитіла). Наступні здатні нести подібні детермінанти та викликати утворення антитіл другого порядку, ті, свою чергу, – третього і т. д. Теорія S. Tonegawa, як вказує Masljanko (1999) полягає в утворенні внаслідок генних варіацій великої кількості клонів імунокомпетентних Т-клітин, які походять із мезенхімальних клітин і здатні реагувати з різними антигенами чи їх детермінантами.

За сучасними даними серед фагоцитуючих клітин важливе значення має система моноцитів кісткового мозку, крові, вільних і зв'язаних тканинних макрофагів. Макрофаг є одним із основних функціональних одиниць клітинного механізму захисту організму від інфекційних агентів і учасником майже усіх стадій запалення. У цих клітинах знаходиться (продукується) 117 активних молекул, серед яких поліпептидні гормони, ферменти, інгібітори ферментів і цитокінів, компоненти комплементу, фактори

коагуляції, білки клітинної адгезії, олігопептиди, а також реакційно здатні метаболіти кисню та інші (Nathan, 1987; Wolf and David, 2014; Mindt et al., 2018; Outlioua et al. 2018; Jing et al., 2018).

Упродовж останніх 50 років в організмі людей і тварин визначено велику кількість біологічно активних речовин, які мають регуляторні функції та обумовлюють міжклітинні взаємовідносини в імунній системі (Masljanko, 1999; Valkenburg, et al., 2016; Dash et al., 2017).

Одним із перспективних напрямів сучасної біотехнології у ветеринарній медицині є створення імунокоректорів антигеннаправленої дії, у тому числі з активністю трансфер-фактору для профілактики багатьох захворювань, особливо тих, в основі імунного захисту яких, лежить клітинний імунітет, так званих «тяжких» інфекцій (лейкоз великої рогатої худоби, вірусний імунодефіцит, туберкульоз, африканська чума свиней та інші). Цей фактор здатний переносити клітинно-опосередкований імунітет на несенсибілізовані лімфоцити (Kirkpatrick, 2000; Berrón-Pérez, et al., 2007) та справляти багатоплановий вплив на імунну систему, регулюючи функцію Т-супресорів, Т-кіллерів і макрофагів (Viza, 2013; Skybic'kyj and Kozlovs'ka, 2015), а також обумовлювати розвиток адаптивного імунітету (Dudley and Rosenberg, 2007).

Необхідно відмітити, що в гуманній медицині дослідженню біологічної дії та практичному застосуванню препаратів на основі трансфер-фактора приділяється значна увага, тоді як у ветеринарній медицині вивчення цих проблем займає досить скромні позиції (Kleisius and Fudenberg, 1977; Bezin et al., 2011; Skybic'kyj and Kozlovs'ka, 2015).

Зокрема, розроблено спосіб отримання специфічного щодо вірусу лейкозу великої рогатої худоби специфічного олігонуклеопротеїду з активністю фактора переносу (СОФП) (Busol et al., 2011) та вивчено його вплив на розвиток специфічного поствакцинального імунітету у овець (Tons'ka, 2012).

Однак залишилось нез'ясовним питання щодо впливу цього препарату при щепленні розробленої вакцини проти лімфолейкозу “Профілейк-3” на стан системи вродженого, неспецифічного, імунітету у тварин, сприйнятливих до вірусу лейкозу великої рогатої худоби (*Bovine leucosis virus*, BLV). Крім того, являє значний загальнобіологічний інтерес вивчення спрямованості та активності реакції факторів неспецифічної резистентності за дії ретровірусу на початкових стадіях інфекційного процесу. У цьому контексті й була визначена мета наших досліджень.

**Мета** досліджень – встановити особливості функціонування факторів вродженого імунітету овець у динаміці розвитку лейкозної інфекції та поствакцинальних процесах за імунізації вакциною “Профілейк-3”, у тому числі на тлі застосування СОФП.

### Матеріал і методи досліджень

Дослідження здійснювали на експериментальній базі та у профільних лабораторіях Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини спільно зі співробітниками НУБіП України, які є співавторами розробки технологій виготовлення та регламентів застосування вакцинного препарату проти лейкозу “Профілейк-3” та СОФП.

Дослід проведено на 24 вівцях (4 групи по 6 тварини у кожній), підібраних за принципом аналогів. Вівці 1 групи на першу добу досліді були інфіковані BLV шляхом внутрішньошкірного введення 1,0 см<sup>3</sup> крові хворої на лейкоз корови (вміст лейкоцитів 51,0 Г/л).

За 3 доби до початку досліді тваринам 2 групи з метою формування пасивного імунітету інокульовано СОФП. На першу добу досліді вівцям цієї групи введено СОФП повторно та вакцину “Профілейк-3”, тваринам 3 групи – лише вакцину, а на 7 добу вівцям 2 та 3 груп – вакцину. Імуногени вводили підшкірно у дозі 1,0 см<sup>3</sup>. Тваринам 4 групи (група контролю) у ці ж терміни вводили 0,9% розчин NaCl за аналогічною схемою.

На 101 добу досліді вівцям 2 та 3 груп введено 1,0 см<sup>3</sup> крові хворої на лейкоз корови (рівень лейкоцитів – 51,0 Г/л) з метою їх зараження BLV.

Кров для дослідження у овець відбирали на 20, 50, 67, 87, 98, 162 та 184 добу досліді. Визначали рівень еритроцитів, вміст гемоглобіну, лейкоцитів загальноприйнятими методами, а також фагоцитарну активність нейтрофілів із використанням культури *Staphylococcus aureus* (Men'shikov, 1987). У сироватці крові визначали рівень загального білка, білкових фракцій, циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) середньої молекулярної маси (Men'shikov, 1987), сермукоїдів (Sm) (Kondrahin et al., 1985) спектрофотометрично, інтерлейкіну-1 (ІЛ-1), інтерферону-гама (ІФ-γ) – з використанням ІФА-тест-систем CORMAY, а також активність лізоциму турбідиметричним методом із зависсю *Micrococcus lysodecticus* (Labinskaja, 1978). Стан системи перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту (ПОЛ-АОЗ) досліджували за концентрацію дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА) з використанням модифікованої нами методики В. Б.

Гаврилова і М. І. Мішкорудної (1985), загальною антиокиснювальною активністю (АОА) ліпідів активністю ферменту каталази та концентрацією вітамінів А та Е (Stegniy et al., 2009). Визначали рівень антитілопродукування проти BLV в реакції радіальної імунодифузії за стандартною методикою.

Статистичну обробку одержаних даних виконано загальноприйнятими методами із використанням комп'ютерної програми MS Excel.

### Результати та їх обговорення

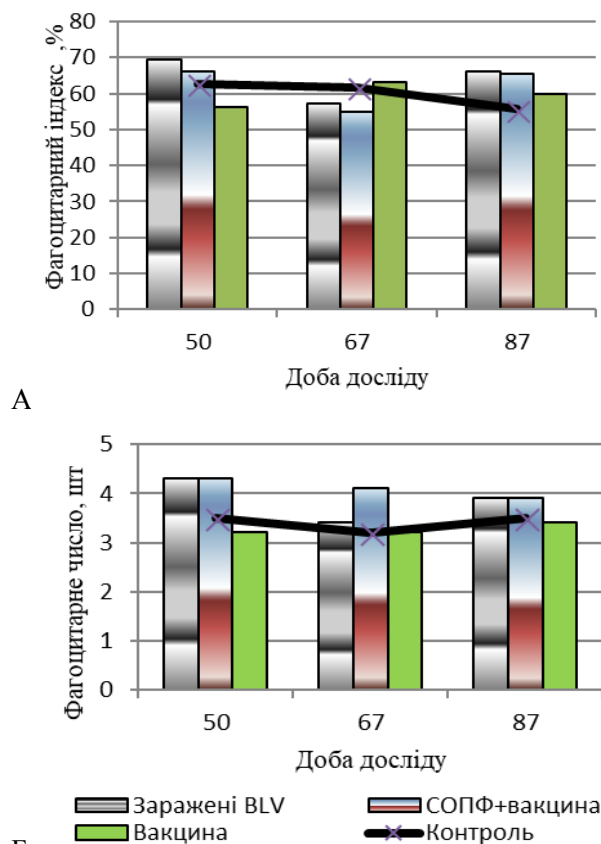
Перший прояв сероконверсії щодо BLV у овець 1 групи встановлено на 20 добу після зараження з активністю  $1,0 \log^2$  у 100% тварин, у наступні терміни рівень антитіл збільшувався та наприкінці досліду (184 доба) досяг  $3,3 \pm 1,0 \log^2$ , що свідчить про розвиток активного лейкозного процесу в організмі інфікованих тварин. За даними Тонської (2012), спільно з якою проведено дослід, введення препарату "Профілейк-3" викликало продукування антитіл до BLV, починаючи з 9 доби поствакцинального періоду у нативних титрах, на 50 добу досліду їх рівень досяг  $8,3 \pm 0,17 \log^2$  (Tonska, 2012). Особливістю при додатковому застосуванні СОФП стала відсутність специфічної гуморальної імунної відповіді до 98 доби досліду, тоді як у тварин, щеплених лише вакциною, рівень антитіл досягав  $1,0 \log^2$ . Однак зараження BLV призводило до інтенсивного накопичення специфічних антитіл у імунізованих тварин обох груп максимальним титром 1:256 на 25 добу після інфікування (Tonska, 2012.)

Аналіз визначених клінічних показників крові овець 1 групи свідчить, що навіть на початкових стадіях лейкозного процесу (до 6 місяців після зараження) BLV відбувається низка виражених змін маркерів неспецифічної резистентності овець. Так, статистично вірогідні зміни рівня лейкоцитів вперше проявляються на 50 добу після зараження ( $7,7 \pm 0,3$  Г/л), що на 22,2% перевищує показник групи контролю. На 67 добу зафіксована тенденція до зниження кількості лейкоцитів у тварин 1 групи відносно попередніх показників, а на 80 добу кількість лейкоцитів була нижчою на 24,0% ( $p \leq 0,05$ ) щодо контрольних значень ( $7,5 \pm 0,4$  Г/л). У наступні терміни спостереження рівень лейкоцитів мав тенденцію до підвищення у порівнянні з контролем, а максимальне зростання цього показника на 27,1% щодо контролю відмічено наприкінці досліду на 184 добу після зараження.

Порівняльним аналізом біологічного впливу на організм овець вакцини "Профілейк-3" окремо (3 група) та у комплексі з СОФП (2 група) встановлено підвищення рівня лейкоцитів на 43 добу після другої вакцинації (50 доба досліду),

вираженіше при комплексній вакцинації. Через 60 діб після зараження BLV (162 доба досліду) у тварин 2 групи зафіксовано статистично вірогідне зниження вмісту лейкоцитів на 18,5% щодо контрольного показника ( $7,0 \pm 0,5$  Г/л).

Про неоднозначний вплив на клітинні фактори імунітету BLV та засобів специфічної профілактики лейкозу, свідчать також отримані дані щодо фагоцитарної активності нейтрофілів, яку оцінювали за двома показниками – фагоцитарним індексом (ФІ) та фагоцитарним числом (ФЧ). Найвираженіше підвищення ФІ на 18,5% зараження збудником лейкозу викликає на 87 добу, а ФЧ – на 22,8% на 50 добу досліду ( $p \leq 0,05$ ) (Рис. 1).



**Рис. 1.** Фагоцитарна активність нейтрофілів периферійної крові овець при зараженні BLV і застосуванні засобів специфічної профілактики лейкозу ВРХ: А – фагоцитарний індекс; Б – фагоцитарне число.

Особливістю впливу на фагоцитарну активність вакцини "Профілейк-3" є незначне зниження ФІ на 50 добу, а також фактична відсутність впливу на ФЧ упродовж терміну дослідження, тоді як застосування препарату у поєднанні з СОФП призводило до вірогідного підвищення ФІ на 87 добу досліду (на 17,2%) та ФЧ на 50 і 67 добу (на 34,3% і 28,1% відповідно).

Досить суттєві зміни в процесі досліду у тварин 1 групи виявлені щодо кількості еритроцитів – на 20 добу після зараження їх рівень

був нижчим відносно контролю на 13,5% ( $p \leq 0,05$ ) і складав  $7,7 \pm 0,3$  Т/л, а на 67 та 87 добу зниження сягало 21,6% та 28,8% при показниках контрольної групи  $6,0 \pm 0,1$  Т/л та  $6,6 \pm 0,4$  відповідно. Ці дані підтверджують зроблений нами раніше висновок про залучення еритроїдного ростка кровотворення у лейкозний процес (Kovalenko, 1999).

При вивченні маркерів неспецифічного гуморального імунітету у сироватці крові овець 1 групи встановлено статистично вірогідне підвищення концентрації глобулінів на 20 добу після зараження – їх рівень ( $36,5 \pm 1,1$  г/л) перевищував контрольні значення на 50,2% і на 87 та 162 добу, – на коли ці показники склали  $33,9 \pm 1,4$  г/л і 16,5% та  $42,1 \pm 1,6$  г/л і 29,1% і відповідно. У інші терміни досліджень спостерігали тенденцію до підвищення рівня глобулінів у інфікованих BLV овець щодо показників контрольної групи. Упродовж 6 місяців розвитку ретровірусної інфекції у овець не відмічено суттєвих змін рівня ЦІК та Sm.

Застосування вакцини “Профілейк-3” з СОФП (2 група) призводило до підвищення рівня Sm на 13,3% та активності лізоциму у сироватці крові на 50,9% щодо показників контролю ( $0,19 \pm 0,01$  мг/мл та  $44,0 \pm 4,3$  мкг/мл відповідно). Спостерігали незначне підвищення (на 10,5%) продукування ЦІК на 20 добу досліді (13 діб після вакцинації) біологічна роль яких, полягає в активації системи комплементу, а також ефекторних механізмів імунітету за допомогою взаємодії з клітинними рецепторами нейтрофілів, що в результаті запускає реакцію фагоцитозу (Stuart and Ezekowitz, 2005). У овець 3-ї групи зафіксовано аналогічне підвищення рівня ЦІК, а концентрація Sm та активність лізоциму змінились не так виражено – на 6,6% і 52,3% відповідно.

На 47 добу після вакцинації під дією комплексного застосування імуногенних препаратів у овець посилюється синтез глобулінів на 23,3% та знижується рівень Sm на 20,0% ( $p \leq 0,05$ ), тоді як після введення вакцини таких виражених змін не відбувається, що вказує на зниження імуносупресивних процесів при застосуванні СОФП на цьому етапі досліді (Byshevskij and Gersenov, 1994; Rojt at al., 2000). У цей термін досліді активність лізоциму у овець 2-ї групи складала  $32,0 \pm 2,0$  мкг/мл, що вище контрольних значень на 33,3%, тоді як у тварин 3 групи цей показник знижувався до  $18,0 \pm 1,0$  мкг/мл.

Як свідчать отримані дані (рис. 2), BLV викликає підвищення активності лізоциму, що є важливим показником інтенсивності інфекційного процесу та стану системи неспецифічного захисту організму (Pisarzhevskij at al., 1977), на 59,1% відносно контролю до  $70,0 \pm 2,3$  мкг/мл вже на 20

добу після інокуляції. У наступні терміни дослідження спостерігається зниження даного показника у овець 1 групи на тлі пригнічення активності цього ферменту в тварин контрольної групи, очевидно, пов'язане з впливом сезону року (грудень–січень), з 162 доби досліді (березень) знову проявляється стимуляція моноцитарно-макрофагальної системи неспецифічного захисту під впливом лейкозної інфекції: показники інфікованих тварин перевищують контрольні на 62,8% та 28,3% на 162 та 184 добу відповідно.

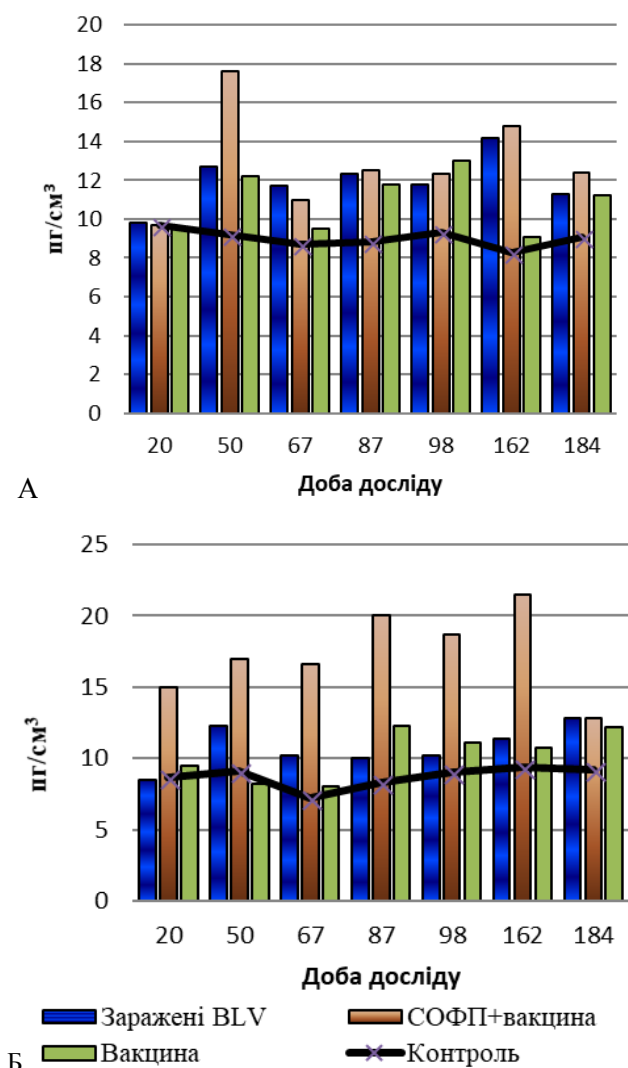
Після зараження BLV лише у тварин 2 групи зафіксовано тенденцію до підвищення рівня глобулінів на 11,4% через 61 добу та зниження рівня ЦІК та Sm через 83 доби (184 доба досліді). Активність лізоциму на 61 добу перевищувала контрольні значення на 42,8%, а на 81 добу знаходиться на рівні контролю ( $68,0 \pm 3,0$  мкг/мл). У тварин 3 групи вже на 61 добу цей показник був наближеним до контрольного, а на 83 добу – нижчий на 19,4% ( $p \leq 0,05$ ) і складає  $54,0 \pm 3,0$  мкг/мл, що вказує на послаблення вродженого імунітету в організмі вакцинованих тварин.

Серед факторів неспецифічної резистентності організму особливе місце займають медіатори імунної відповіді (цитокіни), які регулюють активність клітин імунітету (Haitov, 2009). Встановлено, що розвиток початкових стадій інфекційного процесу за експериментального лейкозу у овець (1 група) супроводжується стійким підвищенням рівня ІЛ-1 (див. рис. 2).

Упродовж досліді, починаючи з 50 доби, їх рівень вірогідно перевищує контрольні показники на 24,1–71,1% з максимальним підйомом на 162 добу досліді. У той же час не встановлено суттєвого посилення продукування ІФ- $\gamma$  у овець під дією BLV.

У овець 2 групи, яким проведено комплексне щеплення (вакцина+СОФП) на 50 добу досліді зафіксовано значне накопичення ІЛ-1 у сироватці крові – його рівень перевищував показники контролю на 91,0%, і до 98 доби досліді підвищення складало 26,4%–42,0%. Зараження тварин BLV викликало посилення індукції ІЛ-1, про що свідчить збільшення його концентрації на 78,3% через 61 добу.

Необхідно відмітити, що лише у овець, вакцинованих комплексно з СОФП впродовж усього досліді виявлено значне підвищення рівня ІФ- $\gamma$ : на 20 добу інтенсивність його продукування була вищою, ніж у тварин контрольної групи на 72,4%. У наступні терміни дослідження цей показник помірно підвищувався до 87 доби, коли підвищення контрольного рівня досягло 140,0%.



**Рис. 2.** Рівень цитокінів у сироватці крові овець при зараженні BLV та застосуванні засобів специфічної профілактики лейкозу ВРХ: А) – IL-1; Б) – IF-γ.

На 98 добу рівень цього цитокіну незначно знизився щодо попереднього значення, однак залишався вищим за контрольні показники більш ніж у 2 рази. Через 61 добу після зараження овець цієї групи спостерігали новий сплеск продукування IF-γ, коли його концентрація була збільшена на 128,7% відносно показників групи контролю.

На відміну від дії комплексної вакцинації проти лейкозу, після щеплення дослідних тварин лише вакциною “Профілейк-3” підвищення продукування IF-γ відмічено на 87 та 98 добу дослідження на 48,2% та 34,4% відповідно, а також на 184 добу дослідження (через 83 доби після зараження BLV) на 23,1% порівняно з показниками контролю у відповідні терміни. Виражену індукцію IL-1 у цих тварин спостерігали на 50, 87 та 98 добу дослідження, коли цей показник зростав на 32,6%, 34,0% та 39,7% щодо контрольних значень.

Отримані результати щодо позитивного впливу СОФП на індукцію вищезначених цитокінів співпадають з даними як вітчизняних, так і зарубіжних дослідників. Трансфер-фактор головним чином діє на ефекторні механізми клітинно-опосередкованого імунітету через індукцію Th1-цитокінів, переш за все інтерферон-γ та IL-1, IL-1-2, що супроводжується розвитком імунної відповіді за Th1-сценарієм і пригніченням активності Th2-клітин (Kirkpatrick, 2000; Grinevich at al., 2014). Завдяки такому комплексному ефекту в організмі реципієнта відновлюється кількість і функціональна активність Т-лімфоцитів та активуються фактори вродженого імунітету.

Для оцінки комплексу систем організму, що забезпечують його захист від несприятливих зовнішніх чинників, важливе значення має визначення стану перекисного окислення ліпідів, а також системи антиоксидантного захисту тварин. Їх стан змінюється під впливом різних стрес-факторів (Mesova, 2016), до яких можна віднести розвиток інфекційного та поствакцинального процесів. Встановлено, що розвиток лейкозного процесу супроводжується зміною активності ліпопероксидації – на 50 добу дослідження зафіксовано вірогідне зниження концентрації ДК в сироватці овець на 14,9% щодо контрольних показників (11,4±0,13 мкмоль/л), тоді як починаючи з 67 доби і до завершення дослідження відмічали підвищення рівня ДК та МДА, найбільш виражене на 162 добу дослідження, коли їх рівні досягли значень 15,9±2,713 мкмоль/л та 1,6±0,151,6±0,15 і перевищили значення контролю на 41,9% та 33,3% відповідно.

Отримані дані свідчать також про активну реакцію системи антиоксидантного захисту на активізацію ПОЛ. На рис. 3 візуалізовано відсоток підвищення або зниження показників стану АОЗ в динаміці дослідження щодо контрольних значень, з якого видно, що на початкових етапах (до 87 доби) розвитку експериментальної ретровірусної інфекції у овець відбувається зниження рівня усіх досліджених складових антиоксидантної системи, зокрема концентрація вітаміну Е максимально зменшується на 53,3% на 20 добу, вітаміну А на 50,0% на 50 добу, в цей термін досліджень також на 40,8% пригнічується каталазна активність (p<0,05) (таблиця).

Однак на 87 добу відбувається незначна компенсаторна активізація АОЗ, про що свідчить підвищення загальної антиоксидантної активності ліпідів сироватки крові до 55,7% інгібіції та активності каталази до 59,0 мМН2O2/сек/мг білку.

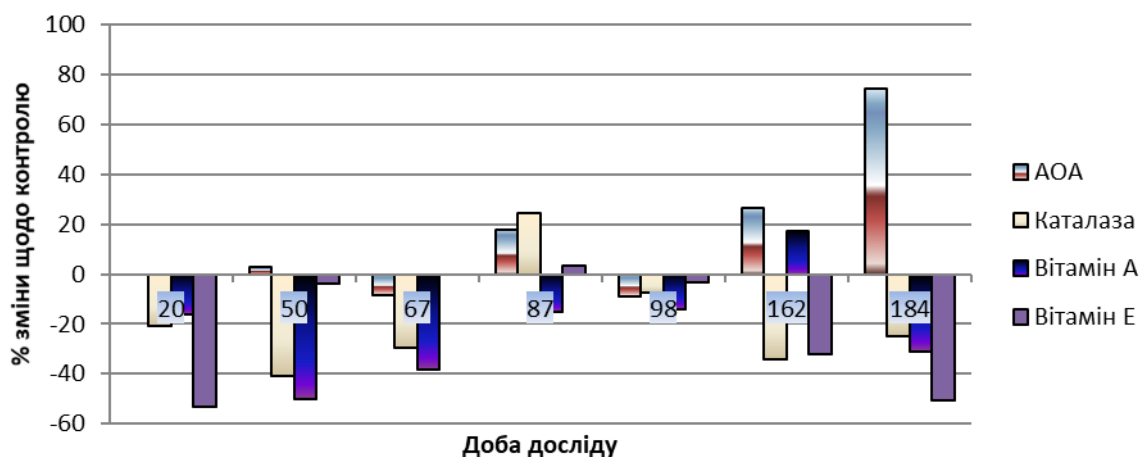


Рис. 3. Динаміка порушень стану факторів антиоксидантної системи овець при інфікуванні BLV.

На 162 добу дослідю спостерігали підвищення загальної АОА ( $72,8 \pm 3,5\%$  інгібіції) та, очевидно, компенсаторний вихід вітаміну А із депо у кров'яне русло. Цікаво, що на 184 добу дослідю АОА досягає своїх максимальних значень ( $74,3 \pm 6,0\%$  інгібіції) на тлі ознак виснаження ферментативної (зниження активності каталази) та неферментативної ланок АОЗ (вірогідне зменшення концентрації вітамінів А та Е) у сироватці крові.

Також встановлено особливості дії вакцини "Профілейк-3" окремо та у поєднанні з СОФП на систему ПОЛ-АОЗ. Як свідчать дані таблиці, вже на 20 добу після вакцинації у тварин 2 групи спостерігається гальмування процесів ПОЛ – рівень ДК та МДА вірогідно знижується на 22,3% та 16,6% відповідно, тоді як при застосуванні лише вакцини – тенденція до підвищення цих показників. Аналогічна направленість змін інтенсивності ПОЛ під дією препаратів відмічена і через 43 доби після вакцинації. У цей період зафіксовано й вірогідне зниження активності каталази у тварин 3-ї групи на 39,8% – 17,9% щодо показників контролю, у овець 2 групи пригнічення каталазної активності зафіксовано лише на 43 добу.

Також встановлено, що в процесах антиоксидантного захисту при імунізації проти лейкозу приймають активну участь вітаміни, що проявляється у коливальних змінах їх концентрації в сироватці крові. Так, рівень вітаміну А на 13 добу після вакцинації у овець 2 і 3 груп підвищується на 88,0% і 44,0% відповідно, тоді як уміст вітаміну Е знижується на 51,1 та 20,0% відповідно щодо контролю. На 47 добу пул вітаміну А у тварин цих груп знижувався на 55,0 та 22,5%, тоді як уміст вітаміну Е відновлюється до рівня контролю.

Однак упродовж 17 наступних діб (до 60 доби після вакцинації) відбувається активізація процесів ПОЛ, що проявляється, зокрема

підвищенням на 80% рівня МДА у тварин 3 групи, у овець 2 групи зафіксовано лише підвищення ДК на 16,6%. У цей термін активність каталази та вітаміну А у тварин 2 і 3 груп залишались зниженими на 30,4% і 23,8% та 46,8% і 42,5% відповідно.

Однак протягом 17 наступних діб (до 60 доби після вакцинації) відбувається активізація процесів ПОЛ, що проявляється, зокрема підвищенням на 80% рівня МДА у тварин 3 групи, у овець 2 групи зафіксовано лише підвищення ДК на 16,6%. У цей термін активність каталази та вітаміну А у тварин 2 та 3 груп залишались зниженими на 30,4% і 23,8% та 46,8% і 42,5% відповідно.

При дослідженні на 71 добу після введення препаратів спостерігається зниження інтенсивності ПОЛ – у тварин 2 групи – концентрація МДА вірогідно знижена на 22,2%, у овець 3 групи встановлена тенденція до зниження цього показника. У той же час активність каталази вища у овець 3 групи (на 51,7%), а 2 групи – знижена на 22,4%. При тому, що вміст Вітамінів А та Е суттєво не відрізнявся від значень у контролі, у цей термін дослідю зафіксовано зрушення загальної АОА ліпідів сироватки у овець 3 групи, яка до цього часу суттєво не відрізнялась від контрольних значень, у бік підвищення до 19,3%.

Такий процес дестабілізації АОЗ продовжувався й надалі. На 87 добу АОА та активність каталази були підвищеними у тварин 2 групи на 12,4% та 168,9%, а у овець 3 групи – на 27,7% та 52,4% відповідно.

Зараження вакцинованих овець BLV призводило до суттєвої активізації перекисних процесів. Так, на 61 добу після зараження рівень накопичення ДК та МДА у щеплених лише вакциною підвищився на 38,4% та 25,0% відповідно, а у комплексно вакцинованих тварин – у середньому на 25,5%.

## Таблиця.

Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів та стан антиоксидантної у овець при застосуванні засобів специфічної профілактики лейкозу ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Група	Інтенсивність ПОЛ		АОА, % інгібіції	Каталаза, мМН <sub>2</sub> О <sub>2</sub> /сек/м г білка	Вітамін А, мкг%	Вітамін Е, мкг/мл
	ДК, мкмоль/л	МДА, Δ D				
20 доба дослідю, 13 доба після вакцинації						
1. СОПФ +вакцина	29,3 ± 0,3	4,0 ± 0,1*	91,1 ± 2,6	14,9 ± 1,2	4,7 ± 0,23*	2,2 ± 0,07*
2. Вакцина	41,1 ± 1,8	5,5 ± 0,3	83,1 ± 3,1	10,1 ± 1,1%*	3,6 ± 0,22*	3,6 ± 0,1*
3. Контроль	37,7 ± 0,8	4,8 ± 0,2	85,3 ± 2,7	16,8 ± 0,7	2,5 ± 0,03	4,5 ± 0,07
50 доба дослідю, 43 доба після вакцинації						
1. СОПФ +вакцина	10,6 ± 1,5	1,6 ± 0,1*	90,7 ± 4,0	26,2 ± 1,3*	1,8 ± 0,37*	2,5 ± 0,06
2. Вакцина	9,9 ± 0,1	1,7 ± 0,1	90,5 ± 5,3	27,5 ± 2,0*	3,1 ± 0,2*	2,4 ± 0,05
3. Контроль	11,4 ± 0,13	2,0 ± 0,2	92,8 ± 2,7	33,5 ± 1,6	4,0 ± 0,2	2,7 ± 0,06
67 доба дослідю 60 доба після вакцинації						
1. СОПФ +вакцина	14,7 ± 1,0	1,8 ± 0,4	88,0 ± 4,0	21,0 ± 1,8*	2,2 ± 0,1*	3,4 ± 0,05
2. Вакцина	17,2 ± 0,9*	2,7 ± 0,2*	88,0 ± 4,0	23,4 ± 2,0*	2,7 ± 0,3*	4,0 ± 0,07
3. Контроль	12,6 ± 0,7	1,5 ± 0,1	92,8 ± 0,8	30,2 ± 1,0	4,7 ± 0,4	3,5 ± 0,33
83 доба дослідю, 71 доба після вакцинації						
1. СОПФ +вакцина	21,3 ± 0,6	2,1 ± 0,09*	68,9 ± 6,2	36,7 ± 1,3*	1,7 ± 0,06	3,1 ± 0,07
2. Вакцина	24,3 ± 2,2	2,4 ± 0,3	80,3 ± 3,8*	71,5 ± 3,3*	2,2 ± 0,1	3,7 ± 0,1
3. Контроль	24,4 ± 0,7	2,7 ± 0,03	67,3 ± 2,1	47,3 ± 2,2	2,0 ± 0,1	3,2 ± 0,13
98 доба дослідю 91 доба після вакцинації						
1. СОПФ +вакцина	21,0 ± 1,2*	2,3 ± 0,10	70,0 ± 6,4	94,4 ± 8,9*	1,8 ± 0,03	2,9 ± 0,07
2. Вакцина	25,1 ± 1,3	2,5 ± 0,20	79,6 ± 2,4*	53,5 ± 3,8%*	2,0 ± 0,07	3,3 ± 0,2
3. Контроль	25,1 ± 0,1	2,6 ± 0,08	62,3 ± 3,8	35,1 ± 3,0	2,1 ± 0,07	3,7 ± 0,13
162 доба дослідю, 61 доба після зараження BLV						
1. СОПФ +вакцина	14,4 ± 0,6*	1,5 ± 0,03*	86,1 ± 2,1*	14,7 ± 1,2*	1,4 ± 0,16*	4,1 ± 0,06*
2. Вакцина	15,5 ± 0,7*	1,5 ± 0,1*	68,3 ± 2,5*	32,9 ± 1,1	3,2 ± 0,56	3,9 ± 0,05*
3. Контроль	11,2 ± 0,4	1,2 ± 0,03	57,5 ± 1,8	27,9 ± 1,3	2,9 ± 0,1	5,0 ± 0,06
184 доба дослідю, 83 доба після зараження BLV						
1. СОПФ +вакцина	9,4 ± 0,4*	1,5 ± 0,1	84,3 ± 7,2*	15,0 ± 1,6	1,7 ± 0,03	2,7 ± 0,1*
2. Вакцина	10,2 ± 0,2*	1,5 ± 0,1	61,1 ± 6,1*	13,8 ± 1,2	1,1 ± 0,06*	3,9 ± 0,03*
3. Контроль	7,9 ± 0,3	1,5 ± 0,1	39,8 ± 3,1	16,2 ± 0,9	1,6 ± 0,12	6,9 ± 0,23

Примітка: \* – різниця вірогідна щодо показника контрольної групи ( $p \leq 0,05$ )

На 83 добу відбувалось підвищення рівня лише первинного продукту ПОЛ – ДК на 18,9% у овець другої групи та на 29,1% – третьої. Цей період характеризується значним напруженням у роботі системи антиоксидантного захисту, зокрема у овець 2 групи на 61,0% підвищеною була АОА на 49,7% на тлі зниження активності каталази на 47,3%, і концентрації вітамінів А – на 51,7% та Е – на 18,%. На 83 добу в тварин цієї групи рівень АОА набував максимальних значень (перевищення показників контролю на 118,8%), а вітаміну Е – був зниженим на 60,8%. Відмінностями стану АОЗ у

овець 3 групи були менш виражені зниження АОА (вище контрольних значень на 53,5%) та концентрації вітаміну Е (на 43,4%) та зменшення концентрації вітаміну А на 32,2% відносно контролю.

Таким чином, узагальнюючий аналіз отриманих результатів досліджень свідчить, що перебіг інфекційного та поствакцинального процесу за експериментального лімфолейкозу характеризується динамічними змінами стану гуморальних і клітинних факторів вродженого імунітету, а застосування специфічного фактору



переносу дозволяє запобігти розвитку виражених патоімунобіохімічних порушень та активізувати клітинно-опосередковану ланку неспецифічної резистентності організму дослідних тварин при вакцинації.

### Висновки

1. Зараження овець вірусом лейкозу великої рогатої худоби на початкових стадіях (до 6 місяців) викликає незначну активізацію фагоцитарної активності нейтрофілів, посилення лізоцимної активності сироватки крові, продукування глобулінів та індукції інтерлейкіну-1 з максимальним зростанням його рівня на 71,1% на 162 добу. Розвиток інфекційного процесу супроводжується посиленням процесів перекисного окиснення ліпідів, що сягає 33,3% наприкінці досліду (184 доба), та виснаженням складових системи антиоксидантного захисту (активності каталази та пулу вітамінів А та Е).

2. Щеплення вівцям розроблюваного препарату "Профілейк-3" спільно з специфічним фактором переносу, порівняно з вакциною, обумовлювало підвищення здатності нейтрофілів до фагоцитозу, зниження імуносупресивного впливу вакцини, значне накопичення таких цитокінів як інтерлейкін-1 та інтерферон-гама.

3. СОФП справляє незначну антиоксидантну дію та стабілізує стан системи ПОЛ-АОЗ. Аналогічна спрямованість його впливу на маркери вродженого імунітету овець встановлена і після зараження вакцинованих овець вірусом лейкозу великої рогатої худоби.

### Перспективи подальших досліджень

Отримані дані мають загальнобіологічне та практичне значення і можуть бути використані як підґрунтя для розробки та застосування засобів ефективних вакцинних препаратів і специфічних поліпептидів з функцією переносу для профілактики інфекційних захворювань, що перебігають з клітинно-опосередкованою імунною відповіддю на антигени збудника, а також оцінки активності факторів вродженого імунітету. Планується використати методологію дослідження динаміки вродженого імунітету, застосовану у даній роботі, при вивченні патогенезу інших інфекційних захворюваннях тварин і їх вакцинопрофілактики.

### Подяки

Висловлюємо щирі вдячність науковому консультанту, доктору ветеринарних наук, професору, академіку НААН Б.Т. Стегнію за всебічну підтримку, співробітникам лабораторій клінічної біохімії та вивчення лейкозу ННЦ

«ІЕКВМ» за активну участь у проведенні досліджень.

### References

- Bauer, M., Weis, S., Netea, M. G., & Wetzker, R. (2018). Remembering Pathogen Dose: Long-Term Adaptation in Innate Immunity. *Trends in Immunology*, 39(6), 438–445.
- Berrón-Pérez R., Chávez-Sánchez R., Estrada-García I., Espinosa-Padilla S., Cortez-Gómez R., Serrano-Miranda E., Ondarza-Aguilera R., Pérez-Tapia M., Pineda Olvera B., Jiménez-Martínez Mdel C., Portugués A., Rodríguez A., Cano L., Pacheco P.U., Barrientos J., Chacón R., Serafín J., Mendez P., Monges A., Cervantes E., Estrada-Parra S. (2007). Indications, usage, and dosage of the transfer factor. *Rev.Alerg. Mex*, 54 (4), 134–139.
- Bezin, A.N., Malov, D.V. & Verjaskina, Ju.V. (2011). Stimuljacija immunogo otveta v komplekse lechebno-profilakticheskikh meroprijatij pri boleznyah kopytec u korov golstino-frizskoj porody [Primenenie transfer-faktora v kachestve immunostimuljatora pri vakcinacii korov protiv nekrobakterioza] [Stimulation of the immune response in a set of therapeutic and prophylactic measures for hoof diseases in Holstein-Friesian cows [Application of a transfer factor as an immunostimulant in vaccinating cows against necrobacteriosis] – *Izvestija Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, (4), 119-120 (in Russian).
- Busol, V. O., Kovalenko, L. V., Tons'ka, T.G. & Sytnik, V.A. (2012) Sposib otrymannja transfer-faktora, specyfichnogo shhodo zbudnyka lejkozu velykoi' rogatoi' hudoby [A method of obtaining a transfer factor specific to the pathogens of on bovine leukemia]. Pat. № 66610 MPK. Zajavl. 20.06.2011. Opubl. 10. 01. 2012 bjul. № 1, 2012 (in Ukrainian).
- Byshevskij, A.Sh. & Gersenov, O.A. (1994) Biohimija dlja vrachej [Biochemistry for physicians]. Ekaterinburg, Ural'skij rabochij (in Russian).
- Dash, P., Fiore-Gartland, A. J., Hertz, T., Wang, G. C., Sharma, S., Souquette, A., Crawford, J.C., Clemens, E.B., Nguyen, T.H.O., Kedzierska, K., La Gruta, N.L., Bradley, P. & Thomas, P. G. (2017). Quantifiable predictive features define epitope-specific T cell receptor repertoires. *Nature*, 547(7661), 89–93.
- Dudley, M. E. & Rosenberg, S. A. (2007). Adoptive Cell Transfer Therapy. *Seminars in Oncology*, 34(6), 524–531.
- Grinevich, Ju., A., Fil'chakov F. V., Shumilina E. S. & Ljon A. D. (2014). Faktor perenosa i problema

- immunoprofilaktiki metastazov zlokachestvennyh novoobrazovaniy (obzor literatury i sobstvennyh issledovaniy [The transfer factor and the problem of immunoprophylaxis of metastases of malignant neoplasms (review of literature and own research)]. *Naukovij zhurnal MOZ Ukraini*, (1), 118–127 (in Russian).
- Haitov, R.P. (2009) *Immunologija* [Immunology]. Moscow (in Russian).
- Jing, Y., Ran, Y., Zhao, J., Zhou, Z., Zhang, J., Qian, Y., Yin, Z., Zhang, M., Lv, Z., Zhou, L. & Wang, B. (2018). Peptidoglycan Suppresses Phagocytic Activities and Apoptosis of Macrophages in Colonic Mucosa Tissues of Crohn's Disease Patients and In Vitro. *Medical Science Monitor*, 24, 3382–3392.
- Kirkpatrick, C. H. (2000). Transfer factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules. *Molecular Med*, 6(4), 332–341.
- Klesius, P. H., & Fudenberg, H. H. (1977). Bovine transfer factor: In vivo transfer of cell-mediated immunity to cattle with alcohol precipitates. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 8(2), 238–246.
- Kondrahin I. P., Kurilov N. V., Malahov A. G., Arhipov A.V., Belov A.D., Beljakov I.M., Blinov N.I., Korobov A.V., Frolova L.A. & Sevast'janova N.A. (1985). *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika v veterinarii*. [Clinical laboratory diagnostics in veterinary science]. Moscow (in Russian).
- Kovalenko, L. V. (1999). Perekysne oksylennja lipidiv i funkcional'nyj stan erytrocytiv veljkoji' rogatoji' hudoby pry lejkozi [Peroxide lipid oxidation and functional state of red blood cells in cattle with leukemia]. *Extended abstract of candidates thesis*. Kyi'v (in Ukrainian).
- Labinskaja A.S. (1978). *Mikrobiologija s tehnikoj mikrobiologicheskijh issledovaniy* [Microbiology with the technique of microbiological research]. Moscow (in Russian).
- Masljanko, R. P. (1999) *Osnovi imunobiologii* [Fundamentals of Immunobiology]. L'viv (in Ukrainian).
- Men'shikov, V. V. (1987). *Laboratornye metodicheskie issledovanija v klinike* [Laboratory methodical research in the clinic]. Moscow (in Russian).
- Men'shikov, V.V., Delektorskaja, L.N. & Zolotnickaja, R.P. (1987). *Laboratornye metody issledovanija v klinike*. Spravochnik. Moscow: Medicina (in Russian).
- Mesova, A.M. (2016) *Immunologicheskaja reaktivnost', perekisnoe okislenie lipidov i antioksidantnaja aktivnost' pri stresse* (Literaturnyj obzor) [Immunological reactivity, lipid peroxidation and antioxidant activity under stress (Literary review)]. *Vestnik KazNIMI*, (4), 309-313 (in Russian).
- Mindt, B. C., Fritz, J. H., & Duerr, C. U. (2018). Group 2 Innate Lymphoid Cells in Pulmonary Immunity and Tissue Homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 9.
- Nairz, M., Dichtl, S., Schroll, A., Haschka, D., Tymoszuk, P., Theurl, I., & Weiss, G. (2018). Iron and innate antimicrobial immunity—Depriving the pathogen, defending the host. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 48, 118–133.
- Nathan, C. F. (1987). Secretory products of macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 79(2), 319–326.
- Outlioua, A., Pourcelot, M., & Arnoult, D. (2018). The Role of Optineurin in Antiviral Type I Interferon Production. *Frontiers in Immunology*, 9.
- Pisarzhevskij, S.A., Globa, A.G., Shirshov, O.N., Marchuk, A.I., Svetuhin, A.M., Karelin, A.A. (1977) Metod opredelenija aktivnosti lizocima v syvorotke krovi s ispol'zovaniem v kachestve substrata hitinazura [Method for determining the activity of lysozyme in serum using chitin azure as a substrate]. *Voprosy medicinskoj himii*, 43(3), 185-190 (in Russian).
- Rojt, A., Brostoff, Dzh., Mejl D. (2000). *Immunologija* [Immunology]. Moscow (in Russian).
- Skybic'kyj, V.G. & Kozlovs'ka, G.V. (2015), Imunitet tvarynnogo organizmu ta perspektyvnyj zasib jogo koryguvannja [Immunity of the animal organism and a promising means of its correction]. *Veterynarna medycyna Ukrainy*, (5), 26–29 (in Ukrainian).
- Stegnij B.T. Kovalenko L.V., Roman'ko M.Je., Ushkalov V.O., Dolec'kyj S.P., Bojko V.S., Krotovs'ka Ju.M., Matjusha L.V (2009) *Metody ocinky intensyvnosti perekysnogo oksyennja lipidiv ta jogo reguljacii' u biologichnyh ob'jektiv* [Methods of assessing the intensity of lipid peroxidation and its regulation in biological objects]. *Metodychni rekomendacii'*. Harkiv (in Ukrainian).
- Stuart, L. M., & Ezekowitz, R. A. B. (2005). *Phagocytosis*. *Immunity*, 22(5), 539–550.
- Tons'ka, T.G. (2012) Vplyv specyfichnogo nyz'komolekuljarnogo polipeptydu na imunogennist' protylejkoznogo preparatu "Profilejk 3" [The effect of a specific low molecular weight polypeptide on the immunogenicity of the anti-leukemia drug "Profilejk 3"]. *Naukovyj visnyk Nacional'nogo universytetu bioresursiv ta pryrodokorystuvannja Ukrainy*, 172(2), 186–191 (in Ukrainian).

- Valkenburg, S. A., Josephs, T. M., Clemens, E. B., Grant, E. J., Nguyen, T. H. O., Wang, G. C., Price, D.A., Miller, A., Tong S.Y., Thomas, P.G., Doherty, P.C., Rossjohn, J., Gras, S. & Kedzierska, K. (2016). Molecular basis for universal HLA-A\*0201-restricted CD8+T-cell immunity against influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(16), 4440–4445.
- Vijay, K. (2018). Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *International Immunopharmacology*, 59, 391–412.
- Viza, D., Fudenberg, H.H., Halareti, A., Ablashi D., De Vinci, C. & Pizza, G. (2013) Transfer factor: an overlooked potential for the prevention and treatment of infectious diseases, 59(2), 53-67.
- Wolf, A. J., & Underhill, D. M. (2014). Phagocytosis. *Macrophages: Biology and Role in the Pathology of Diseases*, 91–109.
-