

Таким образом, анализируя полученные данные иммунофенотипирования лимфоцитов можно сделать вывод, что введение в состав вакцинных препаратов рекомбинантного интерлейкина-2 и комбинированных адъювантов вызывало существенное изменение фенотипа Т-клеток, особенно через одну неделю после третьей вакцинации.

**Выводы.** Проведённые комплексные исследования иммунного ответа цыплят на интраназальное введение экспериментальных мукозальных вакцин против НБ показали, что интерлейкин-2 при отдельном введении и в комбинации с САР-частицами усиливал мукозальный и гуморальный иммунный ответ. На основании изучения фенотипа Т-лимфоцитов периферической крови цыплят после вакцинации было установлено, что интерлейкин-2 обладал адъювантной активностью и усиливал клеточный иммунный ответ на антиген вируса НБ при интраназальном введении.

Работа выполнена в рамках проекта МНТЦ 3460р.

#### Список литературы

1. Применение иммуноферментной тест-системы для выявления специфических IgA, IgM и IgG к вирусу ньюкаслской болезни птиц в секреторных жидкостях и сыворотках крови кур / М.А. Волкова, А.В. Ирза, М.Е. Качалова, Н.С. Мудрак, В.В. Дрыгин, В.В. Борисов, С.К. Старов // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2007. – Т. 6. – С. 176-185. 2. AL-Garib, S.O. Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination / S. O. Al Garib, A.L. Gielkens, E. Druys, G. Koch // World's Poultry Science Journal. – 2003. – V. 59. – P. 185-200. 3. Calcium phosphate nanoparticles induce mucosal immunity and protection against Herpes Simplex virus type 2 / Qing He, A. Mitchell, T. Morcol and S.J.D. Bell // Clinical and diagnostic laboratory immunology. – 2002. – V. 9. – P. 1021-1024. 4. Illum, L. Chitosan as a novel delivery system for vaccines / L. Illum, Jabbal-Gill, M. Hinchcliffe at al. // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2001. – V. 51(3). – P. 81-96. 5. Wigley, P. Avian cytokines in health and disease / P. Wigley, P. Kaiser // Brazilian Journal of Poultry Science. – 2003. – V.3. – P. 1-8.

### STUDY OF RECOMBINANT INTERLEUKIN-2 AS ADJUVANT UPON INTRANASAL VACCINATION OF CHICKEN AGAINST NEWCASTLE DISEASE

**Volkova M.A., Irza A.V., Frolov S.F., Drygin V.V., Kapchinsky D.R.<sup>1</sup>**

FGI "Federal Centre for Animal Health" (FGI "ARRIAH"), Vladimir,

<sup>1</sup>ARS, USA

*The immunomodulating activity of recombinant human IL-2 expressed in yeast was studied following intranasal coadministration of chickens with inactivated Newcastle disease virus (NDV) vaccine. After three vaccinations with inactivated NDV containing recombinant IL-2, or in combination with calcium phosphate-particles and chitosan, a significant increase in antibody titers in blood and tracheal washings was observed when compared with the administration of only antigen. The proportion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells in peripheral blood of chicks immunized by preparations with immunopotentiators was higher 1-2 weeks following the 3<sup>rd</sup> vaccination as compared to control birds and birds vaccinated by antigen alone. Thus, human interleukin-2 efficiently changed cellular, mucosal and humoral immunity and it makes it possible to use it in the future as a potential adjuvant for production of vaccines for poultry.*

УДК 578.831:615.371

### ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ІМУНОГЕННОСТІ ПРОТИПАНДЕМІЧНИХ ГРИПОЗНИХ ВАКЦИН З ОСОБЛИВОСТЯМИ ЇХ ПРОТЕЇДНОГО СКЛАДУ

**Волянський А.Ю.**

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України», м. Харків

Грип – одне з поширеніших захворювань вірусної етіології, летальність від наслідків якого є найбільшою серед усіх інфекційних хвороб. У XX сторіччі було зареєстровано чотири пандемії (1918, 1957, 1968, 1977 рр.). Тільки одна з них, 1918-1919 рр., забрала життя більше ніж 20 мільйонів людей[1]. Навесні 2009 р. розпочалася остання пандемія, що була спричинена новим штамом А/Н1N1/Каліфорнія. Перша хвиля не зачепила Україну, але під час другої, з жовтня 2009 по січень 2010 переохворіло біля 5 мільйонів та померло більш, ніж 1000 українців. Це значно менш, ніж померло протягом минулого року від СНІДу та туберкульозу, але потрібно враховувати те, що максимальна захворюваність спостерігалась у осіб молодого віку, соціально адаптованих, але маючих в більшості випадків фонову хронічну патологію. Третя хвиля в сезоні 2010-2011рр. характеризувалася значно меншою інтенсивністю епідемічного процесу та сумісною циркуляцією декількох штамів грипу. Тем не менш, в лютому 2011 року пандемічний штам був знову включений ВОЗ до складу актуальних вакцин на сезон 2011-2012рр. для Північної півкулі.

Дуже велика захворюваність жителів України в порівнянні з сусідніми країнами під час цієї пандемії зумовлена кількома факторами, але головніший, на нашу думку – відмова від щеплення населення. Жодна з протипандемічних вакцин не була зареєстрована в Україні. У Світі було вакциновано біля мільярду осіб, у Західній Європі – більш ніж 100 мільйонів людей. У сусідніх Росії та Білорусі було щеплено за державні кошти протипандемічними вакцинами більш ніж 15 мільйонів та 500 000 представників груп ризику відповідно.

Враховуючи те, що протягом дуже короткого часу було розроблено та випробувано декілька нових препаратів, ми спробували проаналізувати на імуногенність та особливості нуклеопротеїдного складу різних протипандемічних вакцин та надати рекомендації для подальшої оптимізації їх розробки та виробництва, підвищення їх ефективності.

**Матеріали і методи дослідження.** Об'єктом дослідження було обрано моновалентні протипандемічні вакцини розробки та випуску 2009 р.: «Паненза» (Санофі Пастер, Франція), «МоноГриппол» (ООО «Петровакс»), «МоноГриппол Нео Плюс» (ООО «Петровакс»), субдиничний субстрат вакцини «МоноГриппол» (НДІ вакцин та сироваток, Санкт-Петербург, Росія).

Препарат «Паненза» являє собою інактивовану моновалентну розщеплену безад'ювантну вакцину проти вірусу грипу А(Н1N1), що містить 15 мкг гемаглютиніну ізольованого штаму вірусу А/California/07/2009 (H1N1) на дозу. В індивідуальних формах випуску не містить консерванту, протипоказана особам з підтвердженою тяжкою гіперчутливістю до яєчного білку, який входить до складу вакцини.

«МоноГриппол» є інактивованою моновалентною субдиничною ад'ювантною вакциною проти А(Н1N1). Антигени отримані з очищеного вірусу А(Н1N1), вирощеного на курячих ембріонах. В склад вакцини входить гемаглютинін та нейрамінідаза в кількості 5 мкг (в перерахунку на гемаглютинін) та імуномодулятор «Поліоксідоній».

«МоноГриппол Нео» є інактивованою моновалентною субдиничною ад'ювантною вакциною проти А(Н1N1). Її склад є аналогічним складу вакцини «МоноГриппол», але антигени отримані з очищеного вірусу А(Н1N1), вирощеного на перещеплюваній клітинній лінії нирки свавця (Madin-Darby canine kidney (MDCK)).

Субстрат вакцини «Моногриппол» являв собою суміш поверхневих антигенів у кількості 50 мкг/мл у перерахунку на гемаглютинін.

Експерименти були проведені на нелінійних дорослих білих мишах вагою 20-22 г у кількості 216 тварин.

Піддослідних тварин одно- та дворазово імунізували препаратами внутрішньочеревно (в/ч), дозою 0,3 мл, друга імунізація проводилася через 14 днів. Були сформовані наступні групи тварин, імунізованих: 1) вакциною «Паненза»; 2) вакциною «Моногриппол»; 3) вакциною «Моногриппол Нео Плюс»; 4) субстратом вакцини «Моногриппол Нео» у концентрації 10 мкг/мл; 5) субстратом вакцини «Моногриппол Нео» у концентрації 30 мкг/мл; 6) введення в/ч води для ін'єкції стерильної у дозі 0,3 мл на першу та 14-ту добу (контроль). До кожної групи входило 36 особини. Половину дослідних тварин виводили з експерименту на 14-ту добу шляхом декапітації під ефірним наркозом з отриманням сироватки крові, іншу частину – на 30-ту добу.

Дослідження проводили в умовах контролю за факторами довкілля. Підтримувалася постійна температура (20-25 °C) та відносна вологість повітря (50-70 %). Раціон та якість води були стандартними, доступ до води був необмеженим. Тварини були розміщені у клітках групами по 12 мишей. Усі роботи з тваринами проводились згідно ОСТ 42 1-88 «Тварини лабораторні. Технологічний процес» з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших наукових цілях від 18.03.1986, Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і МОЗУ №281 від 01.11.2000р.

Склад білків, що містять досліджувані вакцини, вивчали за допомогою біоаналізатора «Agilent-2100» («Agilent Technologies», США), застосовуючи метод SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Цей високоефективний метод розділення та ідентифікації білкових сумішей являє собою електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності могутнього детергенту – додецилсульфату натрію у модифікації Леммлі [5, 6].

Білковий склад вакцин визначали за електрофореграмами, отримуючи дані про молекулярну масу білкових фрагментів, їх концентрацію та відсотковий вміст у досліджуваному препараті.

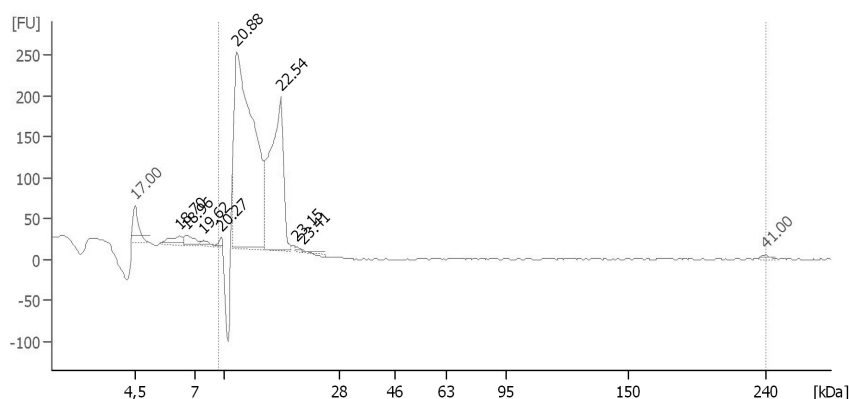
Імуногенність вакцин оцінювали за реакцією гальмування гемаглютинації (РГГА) зі специфічним антигеном. З метою видалення неспецифічних інгібіторів гемаглютинації, які могли міститись у досліджуваних сироватках, перед здійсненням аналізу всі зразки оброблялися нейрамінідазою холерних вібріонів, що, не впливаючи на специфічні антитіла, руйнує інгібітори гемаглютинації до вірусів грипу сироватках людини і тварин [8].

Оцінювалися наступні параметри сероконверсії – середні титри антитіл до відповідних гемаглютининів та відсоток щеплених вакциною особин, у яких має місце відповідне підвищення специфічних антитіл [9].

Для оцінки зв'язку між імуногенністю та білковим складом вакцин було математично визначено співвідношення між середнім титром антитіл та середнім вмістом білку на один штаб.

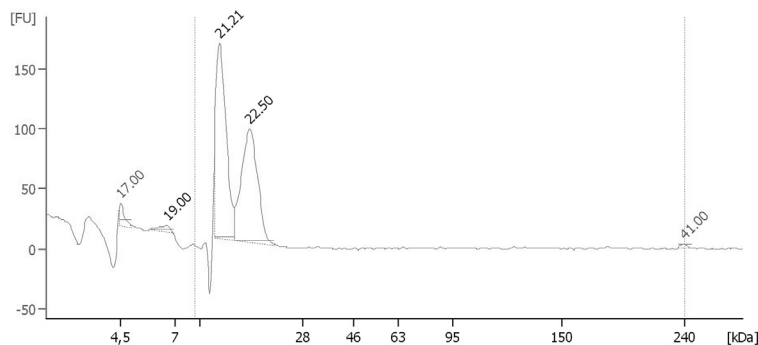
Статистичну обробку даних проводили, використовуючи пакет прикладних програм Microsoft Excel-Statgraphics. Для виявлення значимих розбіжностей показників, що порівнювалися, використовували t-критерій Ст'юдента. Розбіжності вважали достовірними за рівня значущості  $p < 0,05$ . Дані наведені у вигляді середнього арифметичного значення  $\bar{M}$  та середньоквадратичного відхилення  $\sigma$ .

**Результати досліджень.** У результаті проведеного аналізу білкового складу протипанемічних моновалентних вакцин розробки 2009 р. було встановлено, що загальна кількість білку у субодиничних вакцинах «МоноГриппол» та «МоноГриппол Нео» значно нижча, ніж у розщепленій вакцині «Паненза» – 67,14 мкг/мл (33,57 мкг/дозу) та 58,68 мкг/мл (29,34 мкг/дозу) проти 119,86 мкг/мл (59,93 мкг/дозу) відповідно. Відомо, що вимоги Європейської Фармакопеї до складу вакцин неоднакові щодо субодиничних і розщеплених вакцин [10]. Загальний вміст білку у розщеплених вакцинах не повинен перевищувати 100 мкг на один використаний штаб і, відповідно, на одну дозу щодо моновалентних вакцин, щодо субодиничних вакцин цей показник становить 80 мкг. У складі субодиничних вакцин дозволяється не більше 40 мкг іншого, ніж гемаглютинін, білку на один вірусний штаб.



**Рис. 1** Склад білків вакцини «Паненза», визначений за електрофореграмою біоаналізатору «Agilent 2100»

У вакцині «Паненза» превалювали білок з молекулярною вагою 16,4 кДа, кількість якого у препараті становила 13,04 мкг/мл (66,9 % всього білкового складу), та складова 21,4 кДа в об'ємі 6,25 мкг/мл (32,1 % загального білку).



**Рис. 2** Склад білків вакцини «МоноГриппол», визначений за електрофореграмою біоаналізатору «Agilent 2100»

У вакцині «МоноГриппол» було виявлено білок 32,0 кДа у кількості 46,10 мкг/мл (68,7 % від загальної кількості), а також білок 48,2 кДа у кількості 21,05 мкг/мл (31,3 %)

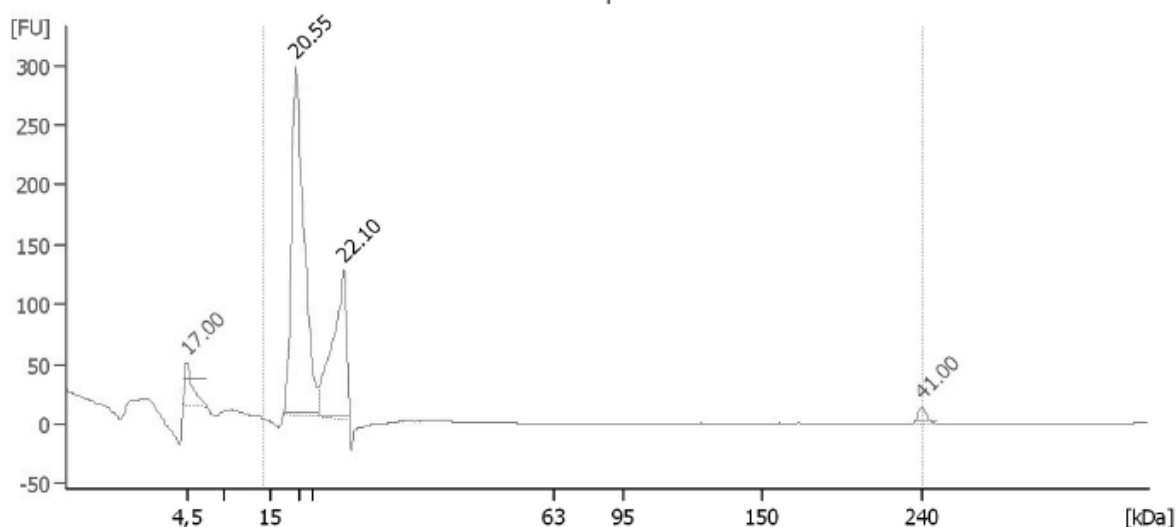


Рис. 3 Склад білків вакцини «МоноГриппол нео», визначений за електрофореграмою біоаналізатору «Agilent 2100»

У препараті «МоноГриппол Нео» було знайдено також 2 протеїна – з масою 26,4 кДа (70,1 %) та з масою 48,1 кДа (29,9 %).

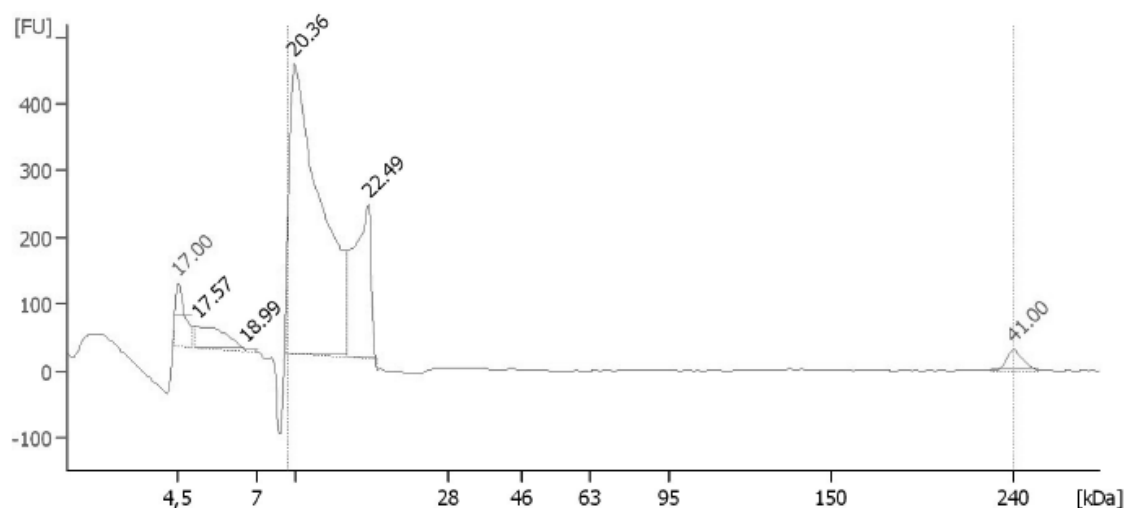


Рис. 4 Склад білків субстрату вакцини «МоноГриппол», визначений за електрофореграмою біоаналізатору «Agilent 2100»

Аналізуючи склад субстрату вакцини «МоноГриппол Нео» також було виявлено наявність у ньому двох протеїнів – з масою 14,7 кДа (79,1 %) та 21,2 кДа (20,9 %). Загальна кількість білку становила 42,9 мкг/мл (21,5 мкг/дозу).

Раніше в експериментах на мишах було виявлено, що матриксні білки (М) та нуклеопротеїди (НП), що у мінімальних кількостях присутні у розщеплених вакцинах, відіграють важливу роль у стимуляції специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів та гуморальних імунних реакціях [10]. Щодо останнього, у нашому дослідженні було виявлено, що вакцинний препарат «Паненза» містить додаткову кількість деяких білків (рис. 1, таб. 1) окрім головних складових. Так, у кількості 122,9 нг/мл було визначено білок з молекулярною вагою 14,1 кДа, а також білки 23,2 кДа та 24,0 кДа, вміст яких у препараті становив 59,3 нг/мл та 22,0 нг/мл відповідно.

**Таблиця 1** – Характеристика білкового складу актуальних протигрипозних вакцин за результатами дослідження на біоаналізаторі Agilent 2100

Назва вакцини	Тип вакцини	Загальна кількість білка на штаб, мкг/мл	Кількість протеїнів
«Паненза»	розщеплена	119,9	5
«МоноГриппол»	субодинична	67,1	2
«МоноГриппол Нео»	субодинична	58,6	2
Субстракт «МоноГриппол»	субодинична	42,9	2

Результати дослідження імуногеності вакцин подані у табл. 2 та рис. 5

Таблиця 2 – Титри специфічних антитіл до вірусу А(Н1N1) за імунізації експериментальних тварин протипандемічними моновакцинами

Вакцинні препарати	Перша імунізація		Друга імунізація	
	Середнє геометр. титру АТ	Частка тварин, сироватка яких містила титр не нижче, %	Середнє геометр. титру АТ	Частка тварин, сироватка яких містила даний титр, %
«Паненза» 9 мкг	46,0 ± 25,17	1:40 80%	160,0 ± 130,64	1:160 80%
«МоноГриппол» 3 мкг	80,0 ± 0	1:80 100%	264,0 ± 181,6	1:320 70%
«МоноГриппол Нео» 3 мкг	56,0 ± 34,03	1:40 80%	90,0 ± 43,08	1:80 80%
Субстрат 3 мкг	56,0 ± 47,68	1:40 50%	80,0 ± 40,17	1:80 80%
Субстрат 9 мкг	88,0 ± 42,0	1:80 80%	250,0 ± 147,23	1:320 80%
Контроль	14,0 ± 5,77		11,0 ± 6,11	

Найвища імуногенність серед вивчених моновалентних вакцин спостерігалася у препарата «МоноГриппол», а також у взятого окремо субстрату цієї вакцини з концентрацією гемаглютиніну 15 мкг/доза. Звичайний вакцинальний вміст білку субстрату (5 мкг/доза в перерахунку на гемаглютинін) без ад'юванту «Поліоксідоній» не викликав високої імунної відповіді як за першої, так і за другої імунізації. Субодиночна вакцина «МоноГриппол Нео» демонструвала подібну імуногенність. Введення спліт-вакцини «Паненза» результатам другої імунізації.

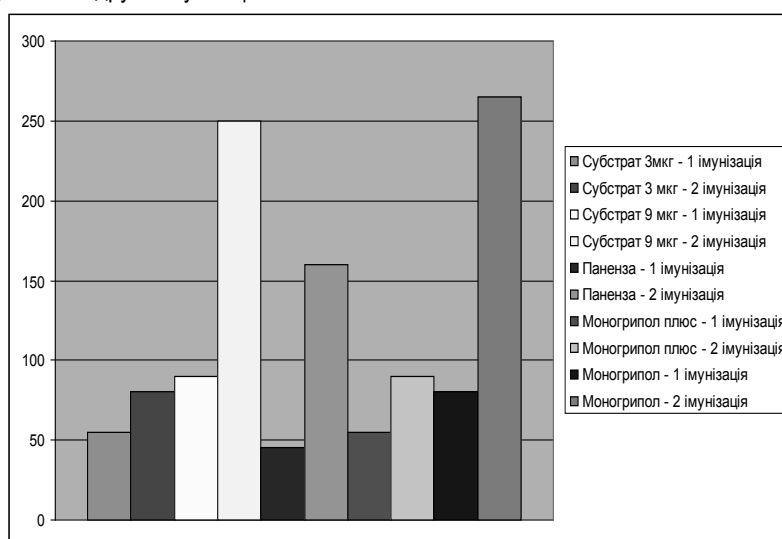


Рис. 5 Середній гемаглютинуючий титр антитіл в РТГА після імунізації моновалентними протигрипозними вакцинами

Вивчення співвідношення імуногенності і білкового вмісту у моновалентних вакцин виявило його максимальні значення у ад'ювантної вакцини «МоноГриппол» (рис. 6). Ймовірно, наявність ад'юванта «Поліоксідоній» забезпечує високу імунну відповідь незалежно від низького вмісту білку у складі препарату.

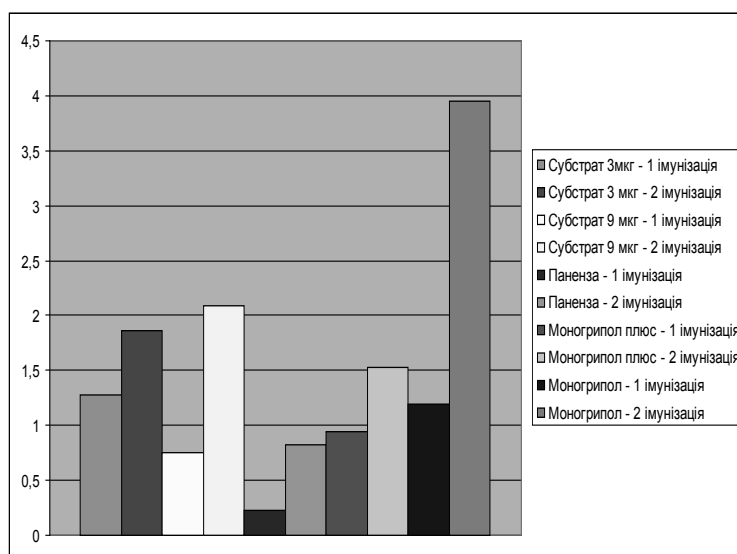


Рис. 6 Коефіцієнт середній титр антитіл/ загальний вміст білку для моновалентних протигрипозних вакцин

**Висновки.** 1. За допомогою біоаналізатора «Агілент-2100» було визначено кількість протеїнів та їх сумарну масу і процентне співвідношення у кожній вакцині. Усі досліджені препарати відповідали нормативами європейської фармакопеї по загальній кількості білку. Субодиничні вакцини містили по 2 білкових компонента, розщеплена вакцина «Паненза» – 5 білкових складових. Молекулярна маса білкових фрагментів різнилась від 15 kDa до 50 kDa, переважна більшість протеїнів була представлена фрагментами з молекулярною масою  $26 \pm 1,0$  kDa,  $32 \pm 1,0$  kDa,  $42 \pm 1,0$  kDa,  $48 \pm 2,0$  kDa. Враховуючи те, що молекула гемаглютиніна має масу 225 kDa і являє собою тример з масою кожної одиниці 75 kDa, а тетраметр нейрамінідази важить біля 200-250 kDa, можливо припустити, що на етапах виробництва досліджених вакцин має місце нарізка поверхневих білків на більш дрібні фрагменти.

2. Після дворазової імунізації мишей усі вакцини, що були в експерименті, показали достатню індукцію продукції специфічних антитіл (не нижче 1:40 після першої вакцинації та не нижче 1:80 після введення другої дози у 80 % тварин). Найвищі титри гальмування гемаглютинації були отримані після щеплення моновалентною субодиничною вакциною «Моногриппол» (не нижче 1:80 після першої імунізації та не нижче 1:320 після повторного щеплення).

3. Оцінюючи зв'язок між імуногеністю та кількістю специфічного білка у вакцин, ми довели, що значний приріст продукції антитіл може викликатися двома шляхами: або високою кількістю вірусного антигену («Паненза», субстрат «Моногриппол»), або використанням сучасних ад'ювантів («МоноГриппол»). Коефіцієнт зв'язку «імуногеність/кількість білку» для вакцини «Моногриппол» значно перевищував показники інших препаратів. Цей показник може використовуватися як науковцями, так і виробниками вакцин для більш ефективного скринінгу кандидатів у офіційні препарати.

4. Враховуючи на те, що у теперішній час в Україні не існує власних рекомендацій щодо вивчення протигрипозних вакцин і при реєстрації вакцин відповідні державні установи змушені використовувати АНД виробника, рекомендації, прийняті в ЕС та Росії, необхідно рекомендувати фармацевтичному комітету України при створенні власних нормативних документів, регламентуючих оцінку протигрипозних вакцин, включити в перелік досліджень визначення коефіцієнта «імуногеність/кількість білку» для більш ретельнішої оцінки ефективності та безпечності вакцин.

#### Список літератури

1. В.Ф. Лавров, Е.В. Русакова, А.А. Шапошников и др. Основы иммунологии, эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней. – М.: ЗАО «МП Гигиена», 2007. – 311 с.
2. Грипп и другие респираторные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия. Под ред. Киселева О.И., Маринича И.Г., Сомининой А.А. – СПб, 2003. – 244 с.
3. Г. Ада, А. Рамсей. Вакцины, вакцинация и иммунный ответ: Руководство / М.: Медицина, 2002. – 328 с.
4. Kunzel, W., Glathe, H., Engelman, H., Van Hoecke Ch. Kinetics of humoral antibody response to trivalent inactivated split influenza vaccine in subjects previously vaccinated or vaccinated for the first time // Vaccine. – 1996. – V.14, №12. – P. 1108-1110.
5. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – V.227. – P. 680-685.
6. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот / М.: МЦНМО, 2002. – 248 с.
7. Л.С. Резникова, Р.В. Эпштейн-Литвак, М.И. Леви Серологические методы исследования при диагностике инфекционных болезней - Москва, 1962. – 178 с.
8. Бектимиров, Т.А., Лонская, Н.И., Агафонова, Н.А. и др. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа: Методические указания. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 32 с.
9. Грипп та його профілактика/ за ред. Дзюблик І.В., Широкова В.П. – К., 2005. – 194 с.
10. Chaloupka, I., Schuler, A., Marschall, M., Meier-Ewert, H. Comparative analysis of six European influenza vaccines // Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. – 1996. – V.15. – P. 121-127.
11. Remyantsev, A. A., Zhang, Z., Gao, O. et al. Direct random insertion of an influenza virus immunologic determinant into the NS1 glycoprotein of a vaccine flavivirus // Virology. – V. 396, № 2. – 2010. – P. 329-338.
12. Караулов, А.В. Инфекции и иммунодефициты – приоритеты сегодня // Практикующий врач. – 1997. – №9. – С.3-4.
13. Хайтов, Р.М., Некрасов, А.В., Горбунов, М.А. и др. Вакцинация детей гриппом // Вакцинация. – 2001. – Т.17, №5. – С. 8-12.
14. Berantó, J., Prymula, R., Chibber, R. et al. Evaluation of reactogenicity and immunogenicity of two influenza vaccines (vaxigrip and fluarix) in the season 1996-1997 // Cent.Eur.J.Public Health. – 1998. – №64. – P. 269-273.
15. Spila-Alegiani, S., Salmasso, S., Rota, M.S. Reactogenicity in the elderly of nine commercial influenza vaccines: results from the Italian SVEVA study. Study for the evaluation of adverse events of influenza vaccinations // Vaccine. – 1999. – V.17. – P. 1898-1904.

#### CONNECTION OF IMMUNOGENITY OF PANDEMIC FLU VACCINES WITH FEATURES OF THEIR PROTEIN COMPOSITION

Volyansky A.Yu.

Institute of Microbiology and Immunology named after I.I. Mechnikov, Kharkiv

The article presents investigations of immune response to vaccination of white mice with different pandemic flu vaccines and protein composition of this preparation. A new coefficient of antibody titer/quantity of specific proteins was suggested for estimation of vaccine efficiency. "Monogrippol" had highest level of this index.

УДК 619:576.31:616.155.392

#### ОЦІНКА ІМУНОСУПРЕСИВНОГО СТАНУ ПРИ КЛІНІЧНОМУ ЛІМФОЛЕЙКОЗИ ЗА МОРФОМЕТРИЧНИМИ ЗМІНАМИ ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ

Горбатенко В.П.

Харківська державна зооветеринарна академія

Шутченко П.О.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» м. Харків

Імунна система має високочутливі механізми швидкого реагування на зовнішні впливи і відповідає на них глибокою перебудовою. Лімфатичні вузли є важливим компонентом імунної системи, вони приймають безпосередню участь в адаптаційно-компенсаторних реакціях організму до різних подразнень, у тому числі інфекційної етіології [3, 4, 5].

Серед факторів інфекційної етіології, що викликають імуносупресивний стан організму тварин, особливе місце займає вірус лейкозу великої рогатої худоби. Вражаючи органи імунної системи, збудник обумовлює прояв імунодефіциту, завдяки чому значно знижується резистентність організму тварин [1, 2].

Метою наших досліджень було вивчення імунологічних змін у лімфатичних вузлах інфікованих вірусом лейкозу корів, що знаходились у стадії клінічного прояву лімфолейкозу.