

10. Cutlip R. C., Lehmkuhl H. D., Jackson T. A.: Am. J. vet. Res. 42, 1795, 1981.
11. Dawson M., Venables C., Jenkin C. E.: Vet. Rec. 116, 588, 1985.
12. De Boer G. F.: Zwoegerziekte. Praca dokt. Utrecht 1970.
13. De Boer G. F., Terpstra C., Houwers D. J.: Res. vet. Sci. 26, 202, 1979.
14. East N. E., Rowe J. D., Madewell B. R., Floyd K.: J. Am. vet. med. Ass. 190, 180, 1987.
15. Ellis T., Robinson W., Wilcox G.: Aust. vet. J. 60, 326, 1983.
16. Fatzer R.: Schweizer Arch. Tierheilk. 121, 329, 1979.
17. Griffin D. E., Narayan O., Adams R. J. I.: J. infect. Dis. 138, 340, 1978.
18. Gudnadottir M.: Host virus interaction in maedi infected sheep. Materiały konf., Perugia, Italy, 1966, s. 81.
19. Gudnadottir M.: Progr. med. Virol. 18, 336, 1974.
20. Hoff-Jorgensen R.: Vet. Sci. Commun. 1, 251, 1977.
21. Honger D., Leitold B., Schuller W.: Berl. Münch. tierarztl. Wschr. 103, 939, 1990.
22. Houwers D. J., Koenig C. D., De Boer G. F., Schaake J. Jr.: Vet. Microbiol. 8, 179, 1983.
23. Kennedy R. C., Ecklund C. M., Lopez C., Hadlow W. J.: Virology 35, 483, 1968.
24. Kita J., Cutlip S., Kempski W., Sacks J.: Pol. Arch. wet. 30, 1, 1990.
25. Leitold B., Schuller W.: Dt. tierärztl. Wschr. 97, 15, 1990.
26. Łosieczka K., Klimentowski S.: Medycyna Wet. 44, 590, 1988.
27. Martin W. B., Scott F. M., Sharp J. M., Angus K. W., Norval M.: Nature 264, 183, 1976.
28. Narayan O., Wolinsky J. S., Clements J. E., Standberg J. D., Griffin D. E., Cork L. C.: J. gen. Virol. 59, 345, 1982.
29. Palsson P. A.: Front Biol. 44, 17, 1976.
30. Palsson P. A.: Proc. EEC. Workshop „Slow viruses in sheep, goats and cattle” Reykjavik 1982 i Edinburgh 1983, s. 46.
31. Payne A., York D. F., De Villiers E. M., Verwoerd D. W., Querat G., Barban V., Sauce N., Vigne R.: Onderstepoort J. vet. Res. 55, 55, 1986.
32. Peluso F., Haase A., Stowring L., Edwards H., Ventura P.: Virology 147, 233, 1985.
33. Peterhans E., Zanoni R., Krieg T., Balcer Th.: Schweizer Arch. Tierheilk. 130, 681, 1988.
34. Querat G., Barban V., Sauce N., Vigne R., Payne A., York D., De Villiers E. M., Verwoerd D. W.: Virology 158, 158, 1987.
35. Safran N., Zimmer A., Irving S. G., Perk K.: Int. J. Cancer 35, 499, 1985.
36. Salwa A., Węgrzyn G.: Medycyna Wet. 49, 298, 1993.
37. Sharp J. M., Angus K. W., Gray E. W., Scott F. M. M.: Arch. Virol. 78, 89, 1983.
38. Sharp J. M., Herring A. J.: J. gen. Virol. 64, 2323, 1983.
39. Sihvonen L., Estola T., Tuomi J.: Acta vet. scand. 21, 124, 1980.
40. Sihvonen L.: Acta. vet. scand. 21, 689, 1980.
41. Sigurdadottir B., Thormar H.: J. infect. Dis. 114, 55, 1964.
42. Sigurdsson B., Grimsson H., Palsson P. A.: J. infect. Dis. 90, 233, 1952.
43. Sigurdsson B., Palsson P. A., Tryggvadottir A.: J. infect. Dis. 93, 166, 1953.
44. Sigurdsson B., Palsson P. A., Grimsson H.: J. Neuropath. 16, 389, 1957.
45. Sigurdsson B., Palsson P. A.: Br. J. exp. Path. 39, 519, 1985.
46. Sigurdsson B., Thormar H., Palsson P.: Arch. ges. Virusforsch. 10, 368, 1961.
47. Statni veterinarni spravy Ceske Republiky: Metodické pokyny Statni veterinarni spravy Ceske republiky k prevenci a tlumeni onemocneni Maedi-visna ovci a koz v roce 1993.
48. Straub O. C.: Proc. EEC Workshop Reykjavik 1982 i Edinburgh 1983 s. 84.
49. Tontis A., Zwahlen R.: Arch. Tierheilk. 126, 305, 1984.
50. Vadheim K. L., Schipper J. A.: Proc. 3 Int. Symp. World Ass. Vet. Lab. Diagnost. 2, 455, 1983.
51. Verwoerd D. W., Payne A. L., York D. F., Meyer M. S.: Onderstepoort J. vet. Res. 50, 309, 1983.
52. Verwoerd D. W., Williamson A., De Villiers E. M.: Onderstepoort J. vet. Res. 47, 275, 1980.
53. Wendt M., Straub O. C.: Tierarztl. Umsch. 42, 460, 1987.

Adres autora: dr Piotr Kołodziej, ul. Paderewskiego 6, 59-520 Chojnów

AGNIESZKA SZUSTER-CIESIELSKA, TERESA KAMIŃSKA, WOJCIECH RZESKI,
MARTYNA KANDEFER-SZERSZEN, JÓZEF FILAR*, MARIAN KONDRACKI**

Perspektywy zastosowania induktorów interferonu bydlęcego

Zakład Mikrobiologii Stosowanej Instytutu Mikrobiologii Uniwersytetu M. Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

*Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin,

**Instytut Weterynarii, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Inducers of bovine interferon: perspectives of their application

Three different strains of NDV and antiviral veterinary vaccines, i.e. Poxvac I, Poxvac K, Canivac F, Lapest and Suivac A, were used as inducers of interferon production. The following cells were used: bovine embryo cells (tracheal and nosopharyngeal epithelium), skin and kidney fibroblasts, MDBK cell line and cultures of blood and spleen leukocytes. Of the viruses used, only three strains of NDV, Suivac A and Bayferon were active in the induction of bovine IFN. Synthetic RNA poly: poly C also elicited IFN production in the bovine skin fibroblasts and in blood leukocytes, especially when the cells were treated before induction with low concentrations of interferon („priming”), or when inhibitors of transcription and translation were used for the inhibition of IFN genes repressors synthesis („superinduction”). Superinduction caused a high increase in the final IFN yield, i.e. 5-fold from Bf and 16-fold from bovine leukocytes.

Interferony (IFN) stanowią grupę białek lub glikoprotein uwalnianych przez komórki w odpowiedzi na bodźce zwane induktorami: wirusy, bakterie i ich produkty, wysoko i niskocząsteczkowe substancje syntetyczne i mitogeny roślinne. Bydłęce interferony na podstawie cech antygenowych, właściwości fizyko-chemicznych podzielono na typy: IFN α i IFN β , które są produktami zgrupowań genów oraz IFN γ – produkt pojedynczego genu (11). Interferony odgrywają ważną rolę w odporności przeciwwirusowej, przeciwnowotworowej oraz posiadają właściwości immunoregulacyjne (3, 10, 11).

Stosując czyste preparaty interferonu bydlęcego otrzymane z rekombinantów bakteryjnych wykazano częściową skuteczność terapii interferonowej w enzootycznej bronchopneumonii cieląt (10) oraz zakaźnej biegunce nowo narodzonych cieląt (21). W profilaktyce i leczeniu chorób wirusowych była użyteczna także indukcja endogennego interferonu, np. preparat Bayferon zawierający atenuowany szczep HBV-1 (7), Vaccina L (atenuowany szczep wirusa choroby Newcastle (1) lub mutant ts wirusa paragrypy 3 (20).

Celem badań była próba oceny różnych wirusowych szczepionek weterynaryjnych pod kątem ich użyteczności jako endogennych induktorów interferonu w profilaktyce i leczeniu chorób wirusowych bydła oraz wybranie induktora interferonu bydłowego, który mógłby znaleźć zastosowanie w produkcji tego białka *in vitro* z użyciem metod biotechnologicznych.

Materiał i metody

Hodowle komórek bydłowych. Płody bydłowe pobrano od krów będących w 2-4 miesiącu ciąży. Stosując standardową metodę trypsynizacji otrzymano szczepy komórkowe: nabłonek tchawicy (Ntch), nabłonek jamy nosowej (Nno), fibroblasty nerki (Fne), fibroblasty skóry (Fs), fibroblasty płuc (Fpl). Linię MDBK (komórki nerki bydła Maden Darby) otrzymano z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Komórki hodowano w płynie Eagle'a MEM (Minimum Essential Medium) z dodatkiem antybiotyków oraz 10% surowicy cielęcej. Przed wykonaniem doświadczeń komórki przeszczepiano na plastikowe płytki Petriego o śr. 3,2 mm, a po 48 godz. komórki trypsynowano i obliczano średnią liczbę komórek na 1 płytce.

Hodowle leukocytów otrzymano z heparynowanej krwi (30 j hep./ml) pobranej od zdrowych krów. Krew mieszano z wodnym roztworem 0,3% galaktozy w proporcji (v/v) 1 część krwi i 1,5 części roztworu galaktozy (8). Po 3 minutach dodawano 1,5 części zimnego 0,1% roztworu żelatyny w 0,85% NaCl. Po odwirowaniu osad leukocytów przemywano zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS). Leukocyty zawieszano w płynie Eagle'a MEM z dodatkiem antybiotyków i 10% surowicy cielęcej uzyskując gęstość 5×10^6 komórek/ml. Leukocyty śledziona otrzymywano „wyczesując” igłami preparacyjnymi komórki z fragmentu śledziona pobranego od zdrowego bydła rzeźnego, po czym opracowano je jak leukocyty krwi.

Indukcja interferonów. Użyto trzy szczepy wirusa rzekomego pomoru drobiu (NDV) – Radom i LaSota (z Instytutu Weterynarii w Puławach) oraz Hertfordshire (z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu) namnożone na zarodkach kurzych, o mianie: NDV Radom $10^{8,33}$ TCID₅₀/ml, Hertfordshire $10^{8,0}$ TCID₅₀/ml oraz LaSota $10^{9,0}$ TCID₅₀/ml. Z dostępnych szczepionek weterynaryjnych (produkcji Biovet) wybrano szczepionki przeciwwirusowe zawierające żywe atenuowane lub zmodyfikowane przez liczne pasażę wirusy należące do różnych rodzin: (*Poxviridae*)-Poxvac I, Poxvac K, (*Paramyxoviridae*)-Canivac F, (*Paramyxoviridae* i *Adenoviridae*)-Canivac FH, (*Togaviridae*)-Lapest, (*Herpesviridae*)-Suivac A oraz Bayferon – preparat zawierający atenuowany szczep BHV-1 (Bayer).

Komórki na płytkach oraz zawiesinę leukocytów krwi i komórek śledziona zakażano takim rozcieńczeniem wirusów aby uzyskać wielokrotność zakażenia wynoszącą 1, 5 lub 10 TCID₅₀/komórkę. Szczepionki przy których brak było informacji o mianie wirusa, rozcieńczano tak, aby na 10^6 komórek hodowli przypadło od 0,4 do 0,04 dawki przeznaczonej dla jednego zwierzęcia. Po 24 godz. zbierano supernatanty i miareczkowano interferon. Do indukcji interferonu stosowano także syntetyczny dwuniciowy kwas poliinozylowy: policytydylowy (poliI:poliC) (Sigma) (14) łącznie z DEAE-dekstranem.

W celu zwiększenia zbioru interferonu użyto metodę „priming” (7). Hodowle Bf oraz leukocyty krwi inkubowano przez 6 godz. z 30 j/ml ludzkiego rekombinowanego Hu IFN α 88 (dar E. Lundgren, Szwecja), który jest aktywny w komórkach bydłowych, przed indukcją wirusem lub poliI:poliC. Zbiór interferonów zwiększano także stosując metodę „superindukcji”. Do komórek Bf lub leukocytów krwi dodawano poliI:poliC w dawce 25 μ g/ml z dodatkiem 10 μ g/ml cykloheksymidu (inhibitor translacji). Po 5 godz. inkubacji w 37°C dodawano 1 μ g/ml aktynomycyny D (inhibitor transkrypcji) i inkubowano przez następną godz. w 37°C. Po dokładnym przemyciu do

komórek dodawano płyn Eagle'a z dodatkiem antybiotyków i 5% surowicy cielęcej. Po 18 lub 24 godz. zbierano supernatanty.

Miareczkowanie interferonów. Wirus obecny w supernatantach znad komórek adherentnych lub leukocytów inaktywowano naświetlaniem promieniami UV (50 000 J/m² przez 30 min.). Do miareczkowania interferonu stosowano mikrometodę opisaną przez Stewarta (17). Za miano interferonu uznawano odwrotność najwyższego rozcieńczenia próbki wywołującego ochronę 50% komórek przed cytopatycznym działaniem wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej bydła (VSV). Na każdej płytce miareczkowano także rHuIFN α 88 jako standard interferonu (12). Miano standardu określono wcześniej wobec międzynarodowego standardu interferonu 69/19. Pozwoliło to na wyrażenie mian IFN w jednostkach międzynarodowych.

Wyniki i omówienie

Najlepszym induktorem we wszystkich badanych typach komórek bydłowych był szczep NDV-Radom (tab. 1). Suivac A, zawierający atenuowany wirus choroby Aujeszky'ego indukował interferon w komórkach bydłowych z wyjątkiem linii ciągłej MDBK. Pozostałe badane szczepionki nie indukowały interferonu w nabłonkowych i fibroblastycznych komórkach bydłowych. Leukocyty izolowane z krwi i śledziona odpowiadały wysokimi mianami interferonu na indukcję trzema szczepami NDV, Suivac A oraz na Bayferon. Pozostałe szczepionki nie indukowały interferonu (tab. 2). Uzyskane wyniki potwierdzają badania innych autorów, że różne szczepy NDV są aktywnymi induktorami interferonu w komórkach bydłowych. Inne wirusy, takie jak wirus Sendai (*Paramyxoviridae*), krowianki (*Poxviridae*), paragrypy 3 (*Paramyxoviridae*) oraz BVDV (*Picornaviridae*) także opisano jako aktywne induktory interferonów w komórkach bydłowych (4, 12, 13, 20, 24). W naszych doświadczeniach wirusy ospy ptaków w przeciwieństwie do wirusa krowianki nie były induktorami interferonów w komórkach bydłowych podobnie jak wirus nosówki psów czy wirus pomoru świń. Przyczyny braku zdolności indukcyjnych tych wirusów mogą wynikać zarówno z ich właściwości biologicznych jak i braku wrażliwości komórek na badane wirusy.

Do indukcji interferonu użyto także poliI:poliC. Induktor ten w przeciwieństwie do wirusów nie replikuje się w komórkach, a w obecności DEAE-dekstranu indukuje interferony w różnych typach komórek pochodzących z wielu gatunków zwierząt (19).

W przeprowadzonych doświadczeniach „priming” trwający 6 godz. zwiększał 1,7-krotnie wytwarzanie interferonu w komórkach Bf po indukcji poliI:poliC oraz 4-krotnie po indukcji NDV-Radom (tab. 3). Zjawisko zwane „priming” jest charakterystyczne dla aktywności biologicznej interferonów zwierząt i człowieka (7). Inną z metod stosowaną z powodzeniem do wytwarzania ludzkiego fibroblastycznego interferonu na skalę przemysłową jest „superindukcja” (9). Inhibitory translacji (cykloheksymid) i transkrypcji (aktynomycyna D) prowadzą do opóźnienia syntezy represora genów interferonowych (16). W naszych doświadczeniach zastosowanie „superindukcji” wraz z poliI:poliC jako induktorem pozwoliło na uzyskanie 5-krotnie wyższych zbiorów interferonu z hodowli Bf oraz 16-krotnie wyższych mian interferonu z hodowli leukocytów krwi bydłowej (tab. 3). Otrzymane wyniki badań stanowią podstawę do zastosowań praktycznych. Przykładem może być łagodzenie przebiegu bronchopneumonii enzootycznej cieląt przez donosowe podawanie Vaccina L (1). Innym z możliwych zastosowań uzyskanych wyników jest próba wytwarzania interferonu metodami biotechnologicznymi. Komórki bydłowe (Bf) rosnące

Tab. 1. Indukcja interferonu (j/ml) w hodowli różnych komórek bydłych

Induktor	Dawka MOI/D	Komórki					
		Ntch	Nno	Fne	Fs	Fpl	MDBK
NDV-R	5 MOI	1100±320	200±32	1020±70	1000±40	320±20	980±200
NDV-L	5 MOI	295±32	< 5	< 5	260±42	< 5	< 5
Suivac A	0,4 D	100±20	120±50	720±50	32±20	70±10	< 5
Poxvac I	od 0,04 do 0,4 D	nie stwierdzono wytwarzania IFN					
Poxvac K							
Canivac FH							
Canivac F							
Lapest							

Objaśnienia: Czas zbioru interferonu 24 godz., MOI (multiplicity of infection) ilość TCID₅₀/1 komórkę. D – dawka szczepionki przeznaczona w/g producenta do szczepienia 1 zwierzęcia.

Tab. 2. Indukcja interferonu w leukocytach krwi i śledziony bydłej

Induktor	Dawka MOI/D	Miano IFN (j/ml)	
		leukocyty krwi	leukocyty śledziony
NDV-R	10	3990±150	480±136
	5 MOI	1380±370	990±140
	1	570±79	480±136
NDV-H	10	1600±240	2060±1100
	5 MOI	470±54	490±79
	1	250±83	280±54
NDV-L	10	1200±300	790±81
	5 MOI	1850±280	580±49
	1	1620±150	330±101
Suivac A	0,4	1240±71	820±130
	0,2 D	1950±320	540±240
	0,04	480±240	200±160
Bayferon	0,1 D	210±77	1650±42
	0,01	70±18	510±110
Poxvac I	nie stwierdzono wytwarzania IFN		
Poxvac K			
Canivac F			
Lapest			

Tab. 3. Wpływ „priming” oraz „superindukcji” na wytwarzanie IFN w komórkach Bf i leukocytach krwi po indukcji NDV-R oraz poliI:poliC

Induktor	Czas zbioru (godz)	Miano IFN (j/ml)	
		Komórki Bf	Leukocyty krwi
NDV 10 MOI	24	1000±40	3990±150
NDV + priming 30 j/ml HuIFNα88	24	4000±240	14 100±520
PoliI:poliC 25 µg/ml + DEAE- dekstran 10 µg/ml	18	1040±57	114±57
PoliI:poliC 25 µg/ml + DEAE- dekstran 10 µg/ml + priming 30 j/ml HuIFNα88	18	1824±63	182±42
PoliI:poliC 25 µg/ml + DEAE- dekstran 10 µg/ml + „superindukcja”	24	5700±115	1824±78

w bioreaktorze na nośnikach szklanych (15) poddawane indukcji poliI:poliC i superindukcji wytwarzają około 20 000 j interferonu na 1 ml płynu hodowlanego (wyniki nie opublikowane).

Podsumowując, niektóre ze znanych szczepionek przeciwwirusowych stosowanych w praktyce weterynaryjnej, mogą znaleźć zastosowanie jako induktory endogennego interferonu bydłowego, w profilaktyce i leczeniu zakażeń wirusowych. Opracowany układ: komórki Bf – poliI:poliC jako induktor, w określonych warunkach hodowli może być wydajnym źródłem preparatów interferonu bydłowego.

Piśmiennictwo

1. Czakła S., Kondracki M., Szuster A., Zdzisińska B., Kandefer-Szerszeń M.: Tierärztl. Umschau 47, 153, 1992.
2. Chrigos M. A.: Thymus 19, 57, 1992.
3. Czarniecki Ch., Hamilton E., Fennie Ch. W., Wolf K.: J. Interferon Res. 6, 29, 1986.
4. Jacobsen K. L., Rockwood G. A., Abolhassani M., Evans D. L., Chitwood S. W., Charamella L.: Am. J. Vet. Res. 49, 1441, 1988.
5. Jacobsen K. L., Rockwood G. A., Abolhassani M., Evans D. L., Chitwood S. W., Charamella L.: J. Interferon Res. 8, 137, 1988.
6. Kandefer-Szerszeń M., Szuster A., Rzeski W., Kamińska T., Kawecki Z.: Arch. Immunol. Ther. Exp.: 36, 447, 1988.
7. Kühnel S., Gründer H. D.: Dtsch. Tierärztl. Wsch. 92, 345, 1985.
8. Lefkowitz S. S., Luna V. E. R.: Intervirology 21, 221, 1984.
9. Luna V. E. R., Luk A. D. H., Tying S. K., Helleman J. M., Lefkowitz S. S.: Experientia 40, 1410, 1984.
10. Morandi M., Valeri A.: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology v 37 (ed. A. Fiechter) Springer Verlag Berlin Heidelberg 1988, p. 57-70.
11. Ohman H. B., Babiuk L. A.: J. Interferon Res. 5, 551, 1985.
12. Ohman H. B., Lawman M. J. P., Babiuk L. A.: Antiviral Res. 7, 187, 1987.
13. Rinaldo C. R., Isackson D. W., Overall J. C., Glasgow L. A., Brown T. T., Bistner S. J., Gillespie J. H.: Infect. Immun. 14, 660, 1976.
14. Rosenquist B. D., Loan R. W.: Am. J. Res. 30, 1305, 1969.
15. Rossi C. R., Kiesel G. K.: Am. J. Vet. Res. 41, 552, 1980.
16. Rzeski W., Kandefer-Szerszeń M., Kaczor J., Dawidowicz A., Wozowicz A.: Acta Biotechnol. 13, 275, 1993.
17. Sehgal P. B., Tamm I.: Virology 92, 240, 1979.
18. Stewart W. E.: II The Interferon System – Springer-Verlag Wien New York 17, 1979.
19. Taylor-Papadimitriou Y., Shearer M.: J. Interferon Res. 4, 553, 1984.
20. Torrence P. F., De Clercq E.: Pharmac. Ther. 2, 1, 1977.
21. Werne J.: Outlook on Agriculture, Pergamon Press, London, 1985.
22. Zygraich N.: Tierärztl. Umsch. 39, 127, 1984.

Adres autora: prof. dr hab. Martyna Kandefer-Szerszeń, ul. Tumidajskiego 6/16, 20-247 Lublin

CLUTTON R. E.: Edrophonium – antagonist blokady neuromięśniowej u psów. (Edrophonium for the antagonism of neuromuscular blockade in dogs). Vet. Rec. 134, 674-678, 1994 (26)

Edrophonium (3hydroksyfenyl dimetyl etylowy bromek amoniowy) zastosowano jako antagonistę blokady neuromięśniowej indukowanej przez vecuronium u 87 psów poddanych narkozie halotanowej. Preparat zastosowano w dawce 500 µg/kg m.c z atropiną (40 µg/kg), po minucie po jej podaniu w dawce 600 µg, względnie edrophonium (250 µg/kg mc) podano z atropiną w dawce 20 lub 40 µg/kg. Całkowitą rewersję uzyskano w 75 przypadkach. U 12 psów, u których zastosowano małe dawki edrophonium istniała potrzeba powtórzenia preparatu. Zaprzestano stosowania samego edrophonium, ponieważ u jednego psa wystąpiły zaburzenia ze strony układu krążenia, u drugiego zwiększone wydzielanie śluzu w oskrzelach i nadmierne ślinienie. Częstotliwość akcji serca wzrastała po podaniu małej dawki edrophonium i dużej dawki atropiny. Akcja serca wzrastała, a następnie spadała, gdy edrophonium w dawce 500 µg/kg podano po minucie po iniekcji atropiny (600 µg). Akcja serca była stabilna po podaniu edrophonium z atropiną zarówno w małej, jak i dużej dawce.