



УДК 612.017.11: 612.014.482.4

**ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ПТИЦ
НА АДАПТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ У МЫШЕЙ
ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ ИММУНОДЕПРЕССИИ**

**INFLUENCES OF EXTRACT FROM EMBRYONIC TISSUE OF POULTRY
ON THE ACQUIRED IMMUNITY OF MICE WITH RADIATION INDUCED
IMMUNODEPRESSION**

М.С. Погорелая, Е.А. Романова
M.S. Pogorelaya, E.A. Romanova

*Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова Национальной академии медицинских наук Украины,
Украина, 61057, г. Харьков, ул. Пушкинская, 14*

Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of NAMS of Ukraine, 14 Puschkinskaya St, Kharkov, 61057, Ukraine

E-mail: marionimmun@gmail.com

Ключевые слова: иммунодепрессия, экстракт из эмбриональных тканей птиц, специфические антитела, вирусомальная вакцина, мыши.

Key words: immunosuppression, extract from fetal tissues of poultry, specific antibodies, virosomal vaccine, mice.

Аннотация. У особей подвергающихся действию иммунокомпрометирующих факторов формирование поствакцинального иммунитета носит не адекватный характер. Потенциальным средством, способным стимулировать образование высоких титров специфических антител в ответ на введение противовирусной вакцины у особей с радиационно-индуцированной иммунодепрессией, может служить экстракт из эмбриональных тканей птиц (ЭТП).

У мышей с радиационно-индуцированной иммунодепрессией уровень выработки специфических антител на 14 сутки после вакцинации был ниже в 4.1 раза в сравнении с группой контроля, при бустерной иммунизации титр повысился лишь в 4 раза. Таким образом, вакцинация животных с иммунодепрессией не была настолько же эффективной как у здоровых животных.

Применение ЭТП перед моделированием иммунодепрессии приводит к образованию более высоких, в 2.7 раз, титров противогриппозных антител по сравнению с мышами, которым его не вводили, к 30 суткам средний геометрический титр антител повысился в 8.9 раз в динамике. Причем на данные сутки регистрации применение ЭТП приводит к образованию более высоких, в 5.1 раз, титров антител в ответ на иммунизацию по сравнению с мышами, которым его не вводили. Таким образом, профилактическое применение ЭТП перед моделированием радиационной иммунодепрессии способствует формированию высоких титров специфических антител в ответ на вакцинацию, что свидетельствует о способности данной субстанции повышать адаптивный иммунитет у иммунокомпрометированных особей. Данные свойства ЭТП, вероятно, обусловлены входящими в его состав компонентами, в известной степени обладающими тропностью к системе иммунитета. Репертуар компонентов экстракта представлен широким рядом аминокислот и жирных кислот, цитокинами (интерлейкин-1, фактор некроза опухоли- α), факторами роста (основной фактор роста фибробластов) и др.

Resume. In individuals whose immune system is exposed to compromising factors, the formation of post-vaccination immunity is not adequate and not persistent. Potential means capable of stimulating the formation of high titers of specific antibodies in response to the antiviral vaccine in individuals with radiation-induced immunosuppression may serve extract from embryonic tissues of poultry (ETP).

On the background radiation-induced immunosuppression level production of specific antibody response to the vaccine at day 14 was lower by 4.1 times in comparison with the control group. In the dynamics it increased by 6 times. Against the background of radiation-induced immunosuppression this measure in 14 days was 4.1 times lower in comparison with the control group. On the 30th day after immunization in this group of animals, titer increased 4-fold. Thus, vaccination of immunosuppressed animals evaluated over 30 days was not as effective as in healthy animals.

Application ETP before vaccination in immunodepressed animals stimulated the production of specific anti-influenza antibodies. ETP application before modeling immunosuppression leads to higher, 2.7 times, titer of anti-influenza antibodies in response to immunization, compared to mice was not injected. On the 30th after vaccination immunodepressed mice with ETP administration geometric mean antibody titer increased 8.9 times as compared to 14 days. Moreover, on a given day registration ETP application before modeling immunosuppression leads to higher, 5.1 times, titer of anti-influenza antibodies in response to immunization, compared to mice was not injected.

Thus, the prophylactic use of ETP before modeling radiation immunosuppression contributes to the formation of high titers of specific antibodies in response to vaccination, indicating the ability of the substance to increase the adaptive immune system in immunocompromised individuals. These ETP properties, probably due to its repertoire of biologically active compounds – a wide variety of amino and fatty acids, cytokines (interleukin-1, tumor necrosis factor- α), growth factors (basic fibroblast growth factor), which have affinity for the immune system.



Введение

Как известно, искусственный активный иммунитет, адаптивный иммунитет, индуцируемый при введении в организм вакцин, содержащих микроорганизмы или их антигены, является надежной превентивной мерой в борьбе с широким рядом патогенов [Новиков и др., 2009]. Вакцинация, направленная на приобретение организмом специфического искусственного иммунитета, оказывается незаменимым мероприятием для лиц, относящихся к определенным группам риска [Костинов и др., 2001].

Сейчас представляют немалый интерес возможные средства, способствующие адекватному формированию напряженного поствакцинального иммунитета, в первую очередь у особей, находящихся в состоянии иммунодепрессии. Последнее диктуется тем, что интенсивность поствакцинальной иммунной реакции определяется не только иммуногенностью самой вакцины, а и иммунной реактивностью организма, как известно, обусловленной генетическими детерминантами и суммой онтогенетических факторов [Галицкая, 2001].

Целью нашей работы было изучить влияние экстракта из эмбриональных тканей птиц (ЭТП) на формирование адаптивного иммунитета у мышей с радиационно-индуцированной иммунодепрессией при вакцинации сезонной вакциной против гриппа «Inflexal V».

Объекты и методы исследования

Объектом исследования были самки белых беспородных мышей, массой 22 ± 1.0 г, 2 месячного возраста общей численностью 110 животных. В работе был использован экстракт из эмбриональных тканей кур, полученный по методике, разработанной в Харьковской зооветеринарной академии [Жегунов и др., 2013]. Общее однократное внешнее облучение мышей осуществлялось на установке РУМ-17 в дозе 5 Гр на протяжении 12 минут 30 секунд при кожно-фокусном расстоянии 40 см, силе тока 10 мА, напряжении в трубке 180 кВ, фильтр 0.5Cu + 1Al на базе ГУ «Институт медицинской радиологии им. С.П. Григорьева НАМН Украины», г. Харьков.

В работе использовалась инактивированная поливалентная виросомальная вакцина для профилактики гриппа «Inflexal V» производства фирмы Berna Biotech AG (*Switzerland*). В её состав входят поверхностные высоко очищенные антигены гемагглютинин и нейраминидаза вирусов гриппа типа А (A/California/7/2009(H1N1) и A/Perth/16/2009(H3N2)) и типа В (B/Brisbane/60/2008). По данным производителя протективный иммунитет развивается через 2–3 недели после однократной иммунизации [Herzog et al., 2009].

Вакцинация животных осуществлялась на 14-е сутки после воздействия γ -излучения, забор крови и выделение сыворотки с целью определения специфических антител осуществлялся через 14 и 30 суток после вакцинации. Число животных в каждой группе составляло 22, половина из которых была выведена из эксперимента на 14-е сутки, вторая половина – на 30-е сутки. Группы животных: I группа – здоровые мыши, иммунизированные вакциной внутривентриально в дозе 0.25 мл; II группа – здоровые иммунизированные мыши с применением ЭТП; III группа – иммунодепрессированные облучением, иммунизированные мыши; IV группа – иммунодепрессированные иммунизированные мыши с применением ЭТП; V группа – здоровые мыши, которым вводили в той же дозе физиологический раствор (ложная вакцинация). Забор материала осуществлялся в минимальные сроки после выведения опытных и контрольных животных из эксперимента под эфирным наркозом. Работа с животными проводили согласно положениям декларации по гуманному обращению с лабораторными животными, используемыми в экспериментальных исследованиях [European Convention ..., 1986].

Титр специфических антител к антигенам вирусов гриппа, входящих в состав применявшейся вакцины, оценивали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) со специфическим антигеном. РТГА представляет собой метод выявления противовирусных антител в сыворотке крови, основанный на феномене отсутствия агглютинации эритроцитов под действием антигена в присутствии иммунной к нему сыворотки крови [Cairan et al., 2009]. С целью удаления неспецифических ингибиторов гемагглютинации, которые могут содержаться в исследуемых сыворотках, перед осуществлением анализа все образцы обрабатывались нейраминидазой холерных вибрионов, которая, воздействуя на специфические антитела, разрушает ингибиторы гемагглютинации к вирусам А и В в сыворотках человека и животных [US Centers for disease Control and Prevention, 2015].

После удаления неспецифических ингибиторов готовили двукратные разведения сывороток в ямках плексигласового планшета, начиная с 1:10 до 1:640 и выше в объеме 0.2 мл. К каждому разведению сыворотки добавляли 0.2 мл рабочей дозы антигена (4 АО). Смесь



перемешивали в шейкере при комнатной температуре и оставляли при $T=20\pm 2^{\circ}\text{C}$ на 30 мин, затем в каждую ямку добавляли 0.4 мл 1% суспензии куриных эритроцитов. Смесь повторно перемешивали в шейкере, оставляли при $T=20\pm 2^{\circ}\text{C}$ на 40–45 мин (до оседания эритроцитов в контроле), после чего проводили учет результатов реакции. При наличии специфических антител в сыворотке наблюдалась задержка агглютинации эритроцитов. Задержка гемагглютинации указывает на соответствие типа антигена и взятой сыворотки; отсутствие задержки гемагглютинации свидетельствует о несоответствии типа взятой сыворотки. Препарат учитывают как специфический, если он не реагирует в РТГА с гетерологичной сывороткой.

При проведении статистического анализа применялся критерий Стьюдента. Различия в средних арифметических считали статистически значимыми при уровне значимости $\alpha - 5\%$. Данные приведены в виде среднего геометрического титра (СГТ) с расчетом коэффициента вариации (CV).

Результаты и их обсуждение

Так, через 14 суток после однократной иммунизации противогриппозная вакцина «Inflexal V» вызвала формирование определенного уровня специфических антител в сыворотке крови здоровых мышей. В среднем по трем антигенам, входящим в состав вакцины титр антител у иммунизированных здоровых мышей составил 1:90.87 (табл.). При вакцинации на фоне применения экстракта из эмбриональных тканей птиц (ЭТП) титры специфических антител к антигенным составляющим вакцины не были существенно выше и в среднем составили 1:116.91. Далее было установлено, что на фоне радиационно-индуцированной иммунодепрессии интенсивность и уровень выработки специфических гомологических антител в ответ на введение вакцины «Inflexal V» значительно отличается, в 4.1 раза, от контрольного и в среднем по трем антигенам составил 1:21.82 по сравнению с 1:90.87 в группе иммунизированных здоровых животных.

Таблица

Средние геометрические титры специфических антител к антигенам вируса гриппа А (H1N1), (H3N2) и вируса гриппа В на 14-е и 30-е сутки после иммунизации вакциной «Inflexal V» мышей с радиационной иммунодепрессией, на фоне профилактического применения ЭТП (n = 22)

Table

Geometric mean titers of specific antibodies to the antigens of the influenza A virus (H1N1), (H3N2) and influenza B in the 14th and 30th day after immunization «Inflexal V» immunosuppressed mice with radiation, against the prophylactic application of ETP (n = 22)

Группы животных	Вирус А (H1N1)		Вирус А (H3N2)		Вирус В		Среднее по 3-м антигенам
	СГТ	CV	СГТ	CV	СГТ	CV	
14-е сутки после вакцинации							
Здоровые иммунизированные мыши	1:90.74	25.17	1:96.65	30.01	1:85.20	15.15	1:90.87
Здоровые иммунизированные мыши с применением ЭТП	1:124.35	28.28	116.76	32.09	1:109.63	30.09	1:116.91
Иммунодепрессированные иммунизированные мыши	1:24.16	37.62	1:21.30	37.76	1:20.00	41.0	1:21.82
Иммунодепрессированные иммунизированные мыши с применением ЭТП	1:51.46	30.0	1:62.17	28.28	1:66.22	22.97	1:59.95
Физиологический раствор	-	-	-	-	-	-	-
30-е сутки после вакцинации							
Здоровые иммунизированные мыши	1:529.76	22.97	1:564.22	25.00	1:681.63	15.15	1:591.87
Здоровые иммунизированные мыши с применением ЭТП	1:725.96	25.17	1:600.92	18.18	1:640.00	16.60	1:655.63
Иммунодепрессированные иммунизированные мыши	1:102.93	33.94	1:116.76	42.02	1:90.75	25.17	1:103.48
Иммунодепрессированные иммунизированные мыши с применением ЭТП	1:497.41	28.28	1:529.76	30.03	1:564.22	16.36	1:530.46
Физиологический раствор	-	-	-	-	-	-	-



При определении титра специфических антител на 14 сутки после иммунизации у животных с радиационной иммунодепрессией на фоне профилактического введения ЭТП их значения превышали таковые у группы иммунодепрессированных животных в среднем по трем антигенам в 2.7 раз, ($p \leq 0.01$).

На 30 сутки после введения вакцины СГТ специфических антител в сыворотке крови здоровых мышей в среднем по трем антигенам, входящим в состав вакцины, повысился в 6 раз по сравнению со значениями, полученными на 14 сутки после вакцинации, и составил 1:591.87 (см. табл.). Подобная картина изменений была характерна и для группы вакцинированных здоровых мышей на фоне применения ЭТП, титр специфических антител в которой повысился в 5.6 раз, и в среднем составил 1:655.63.

На 30 сутки после однократной иммунизации у иммунодепрессированных животных уровень специфических антител по сравнению со значениями на 14 сутки повысился в среднем по трем антигенам в 4.1 раз и составил 1:103.48 против 1:21.82. По сравнению со здоровыми животными вакцинация иммунодепрессированных мышей на 30 сутки опыта не была настолько же эффективной. Так уровень антител составил 17.5% от уровня у здоровых вакцинированных животных.

На 30 сутки после вакцинации иммунодепрессированных мышей с применением ЭТП средний геометрический титр антител повысился в 8.9 раз по сравнению с 14 сутками. Причем на данные сутки регистрации применение ЭТП перед моделированием иммунодепрессии приводит к образованию более высоких, в 5.1 раз, титров противогриппозных антител в ответ на иммунизацию по сравнению с мышами, которым его не вводили.

Кроме разницы в средних геометрических титрах привлекло внимание отличие в однородности антителогенеза среди экспериментальных групп, оцененное по линейному коэффициенту вариации. Последний является мерой вариации титра антител в группе образцов сывороток. Соответственно, считается, что чем ниже значение коэффициента вариации, тем ответ является более однородным.

Так, значение коэффициента вариации титра антител к каждому из антигенов в группе здоровых иммунизированных животных на 14 сутки не превышало 30.0, на 30 сутки – 25.0.

В пределах группы образцов, полученных от иммунодепрессированных животных, на 14 сутки коэффициент вариации был значительно выше и достигал значения 41.0, на 30 сутки – 42.01. При иммунизации иммунодепрессированных животных на фоне применения ЭТП на 14 и 30 сутки коэффициент вариации выработки специфических антител не превышал 30.0.

Экстракт из эмбриональных тканей птиц относится к группе адаптогенов, способных влиять на физиологические функции организма. В нем идентифицировано ряд альбуминовых белков, ксеноорганические эмбриональные пептиды, свободные аминокислоты и жирные кислоты, ряд ростовых факторов (фактор роста фибробластов), цитокинов (интерлейкин-1 и фактор некроза опухоли- α), нуклеиновых кислот. Последние представлены фрагментами ДНК и широким спектром РНК [Сизов, 1996; Кузнецова и др., 2015]. Отчасти иммуностропность данного экстракта обуславливается иммуномодулирующим влиянием аминокислот и жирных кислот, входящих в его состав. В частности, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, триптофан, аргинин, лейцин и лизин осуществляют выраженный стимулирующий эффект на количественные и функциональные показатели компонентов неспецифической резистентности и специфического иммунитета [Белокрылов, 1991; Сотникова, 2007]. В опытах, преследующих актуальную цель снижения заболеваемости и продолжительности течения инфекционных процессов в ветеринарной практике было установлено, что глицин и аланин при парентеральном введении повышают уровни эритроцитов и лейкоцитов, а также стимулируют лизоцимную, бактерицидную та фагоцитарную активность крови [Трушина и др., 1992].

Исследование влияния неэтерифицированных жирных кислот на состояние иммунной системы выявило высокую их способность влиять на число и функциональную активность В-лимфоцитов. Повышение относительного числа CD25⁺-лимфоцитов имеет место на фоне увеличения C_{20:4} арахидоновой и снижения C_{18:2} линолевой кислоты. Увеличение пролиферативного ответа в реакции бласттрансформации лимфоцитов с фитогемагглютинином (РБТЛ с ФГА) наблюдалось при увеличении C_{18:1} олеиновой и уменьшении уровня C_{18:2} и C_{18:3} неэтерифицированных жирных кислот в крови. Пролиферативная активность в ответ на митоген лактоноса (PWM) была выше при увеличении относительного содержания C_{16:0} пальмитиновой и C_{20:4} арахидоновой кислот. Авторы исследования указывают на прямую зависимость интенсивности иммунного ответа Th2-типа от содержания неэтерифицированных жирных кислот. Так авторы указывают на высокий потенциал иммуномодулирующих свойств некоторых аминокислот и жирных кислот, обусловленных их способностью к нормализации субпопуляционного соотношения лимфоцитов, пролиферативной активности лимфоцитов и продукции иммуноглобули-



нов, в целом подчеркивая значительную роль этих биомолекул в регуляции функций иммунного ответа [Шейбак и др., 2005; Сотникова, 2007].

Значительный вклад в иммуномодулирующее свойство исследуемого экстракта вносит наличие фактора роста фибробластов в его составе (ФРФ) [Joseph-Silverstein et al., 1989; Mitrani et al., 1990; Karabagli et al., 2002]. ФРФ, относясь к факторам роста, способствует пролиферации и дифференцировке комитированных клеток-предшественников в процессе базального гемопоза. В условиях патологического влияния на организм различного генеза для основного ФГФ выявлены протективные по отношению к клеткам свойства, что в совокупности с его выраженными регенеративными и пролиферативными способностями дает основания для рассмотрения его в качестве важнейшего компонента иммунопротекции в условиях иммунодепрессии внешнего влияния на организм [Loddick et al., 1998; Kawamata et al., 1997].

Заклучение

Таким образом, введение инактивированной поливалентной вирусомальной вакцины для профилактики гриппа «Inflexal V» вызывает довольно однородное образование высокого титра антител ко всем трем вакцинальным антигенам у здоровых мышей. Применение ЭТП у здоровых животных приводит к формированию адаптивного иммунитета после иммунизации вакциной «Inflexal V» сопоставимому с реакцией здоровых животных по показателям уровня средних геометрических титров специфических антител и его коэффициента вариации.

У животных с радиационной иммунодепрессией отмечены более низкие, в 4.1 раза, на 14 сутки и в 5.7 раз – на 30 сутки после вакцинации, уровни противогриппозных специфических антител, чем у здоровых животных. Профилактическое введение ЭТП особям с радиационной иммунодепрессией способствует более однородному ($cv \leq 30.0$ по сравнению с $cv \geq 42.02$) и высокому антителогенезу (СГТ в данной группе превышает значение у иммунодепрессированных мышей в 5.1 раз на 30 сутки). Изложенное свидетельствует о способности исследуемой субстанции повышать адаптивный специфический иммунитет в условиях острого действия вредных факторов.

Список литературы References

1. Белокрылов Г.А. 1991. Различия действия пептидов и составляющих их аминокислот на иммунный ответ и фагоцитоз у мышей. Иммунология, 5: 46–48.
Belokrylov G.A. 1991. Differences action of peptides and their constituent aminoacids on the immune response and phagocytosis of mice. Immunologiya [Immunology], 5: 46–48. (in Russian)
2. Галицкая М.Г. 2007. Эффективность и безопасность вакцинопрофилактики гриппа у детей с различными отклонениями в состоянии здоровья. Вопросы современной педиатрии, 5 (6): 46–48.
Galitskaya M.G. 2007. Efficacy and safety of influenza vaccine among children with different health conditions. Voprosy sovremennoy pediatrii [Current Pediatrics], 5 (6): 46–48. (in Russian)
3. Жегунов Г.Ф., Кузнецова В.Г., Тимохина Ю.О., Мершинетц Ю.О., Погоріла М.С. 2013. Отримання екстракту з ембріонів курей. Патент України №85646. Бюл. №22.
Gegunov G.F., Kuznetsova V. G., Timohina Yu. O., Mershinets Yu.O., Pogorelaja M.S. 2013. Preparations of the Extract of Chick Embryos. Patent UKR. №85646. Bull. 22. (in Ukrainian)
4. Костинов М.П., Костинова Т.А., Золотарева Т.А. 2001. Возможности вакцинации против гриппа пациентов группы риска. Лечащий врач, 10 (1). URL: <http://www.lvrach.ru/2001/10/4529128/> (19 декабря 2001).
Kostinov M.S., Kostinova T.A., Zolotarev T.A. 2001. Features of influenza vaccination of patients at risk. Lechashchiy vrach [The attending physician], 10 (01). URL: <http://www.lvrach.ru/2001/10/4529128/> (accessed 19 December 2001). (in Russian)
5. Кузнецова В.Г., Жегунов Г.Ф., Погоріла М.С. 2015. Дослідження вмісту амінокислот та жирних кислот в екстракті з ембріонів курей. Вісник проблем біології та медицини, 4 (3): 60–65.
Kuznetsova V.G., Zhegunov G.F., Pogorelaya M.S. 2015. Contents of Amino and Fatty Acids in Extract from Chick Embryos. Visnik problem biologii ta medicini [Bulletin of problems of biology and medicine], 4 (3): 60–65. (in Ukrainian)
6. Новиков Д.К., Новиков П.Д. 2009. Клиническая иммунопатология. Москва, Медицинская литература, 464.
Novikov D.K., Novikov P.D. Klinicheskaya immunopatologiya [Clinical immunopathology]. Moscow, Meditsinskaya literatura, 464. (in Russian)
7. Сизов А.А. 1996. Исследование свойств экстрактов и компонентов эмбриональных тканей птиц раннего срока развития и получение на их основе ветеринарного препарата иммуностимулирующего действия. Автореф. ... дис. канд. биол. наук. Новосибирск, 20.
Sizov A.A. 1996. Issledovanie svojstv jekstraktov i komponentov jembrional'nyh tkanej ptic rannego sroka razvitija i poluchenie na ih osnove veterinarnogo preparata immunostimulirujushhego dejstvija. [Study of the properties of extracts and components of embryonic tissues of birds early period of development and recep-



tion on their basis of a veterinary drug immunostimulatory effects]. Abstract. dis. ... cand. biol. sciences. Novosibirsk, 20.

8. Сотникова Е.П. 2007. Традиционные основы и перспективы развития тканевой терапии. Экспериментальна та клінічна фармація, 1: 15–19.

Sotnikova E.P. 2007. Traditional foundations and prospects of tissue therapy. Eksperimental'naya i klinicheskaya farmatsiya [Experimental and clinical pharmacy], 1: 15–19.

9. Трушина Э.Н., Сергеева К.В., Волгарев М.Н. 1992. Влияние полиненасыщенных жирных кислот рациона на структуру периферических лимфоидных органов, иммунологические показатели и неспецифическую резистентность организма крыс. Вопросы питания, 2: 42–47.

Trushina E.N., Sergeyev K.V., Volgarev M.N. 1992. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on the structure of the peripheral lymphoid organs, immunological parameters and nonspecific resistance in rats. Voprosy pitaniya [Nutrition], 2: 42–47.

10. Шейбак В.М., Тис А.А., Шейбак Л.Н. 2005. Фагоцитарная активность нейтрофилов пуповинной крови новорожденных *in vitro* в присутствии лейцина. Экспериментальная и клиническая фармакология, 1: 48–49.

Sheibak V.M., Tees A.A., Sheibak L.N. 2005. The phagocytic activity of neutrophils cord blood of newborns *in vitro* in the presence of leucine. Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya [Experimental and Clinical Pharmacology], 1: 48–49.

11. Caipan C., Kobasa D. 2009. Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. Journal of virology, 83: 3200–3211.

12. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. 1986. Strasburg, Council Treaty Series, 123.

13. Herzog C., Hartmann K., Künzi V., Kürsteiner O., Mischler R., Lazar H., Glück R. 2009. Eleven years of Inflexal V – a virosomal adjuvanted influenza vaccine. Vaccine, 27 (33): 4381–4387.

14. Joseph-Silverstein J., Consigli S.A., Lyser K.M., Ver Pault C. 1989. Basic Fibroblast Growth Factor in the Chick Embryo: Immunolocalization to Striated Muscle Cells and Their Precursors. The Journal of Cell Biology, 108: 2459–2466.

15. Karabagli H., Karabagli P., Ladher R.K., Schoenwolf G.C. 2002. Survey of Fibroblast Growth Factor Expression During Chick Organogenesis. The Anatomical Record, 268: 1–6.

16. Kawamata T., Ren J., Chan T.C., Charette M. and Finklestein S.P. 1998. Intracisternal osteogenic protein-1 enhances functional recovery following focal stroke. Neuroreport, 9: 1441–1445.

17. Loddick S.A., Liu X.-J., Lu Z.-X., Liu C., Behan D.P., Chalmers D.C., Foster A.C., Vale W.W., Ling N., De Souza E.B. 1998. Displacement of insulin-like growth factors from their binding proteins as a potential treatment for stroke. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95: 1894–1898.

18. Mitrani E., Gruenbaum Y., Shohat H., Ziv T. 1990. Fibroblast growth factor during mesoderm induction in the early chick embryo. Development, 109: 387–393.

19. US Centers for disease Control and Prevention. 2015. Interim Guidance on Infection Control Measures for 2009 H1N1 Influenza in Healthcare Settings, Including Protection of Healthcare Personnel. Available at: www.cdc.gov/h1n1flu/guidelines_infection_control.htm. (accessed 15 October 2009).