

получению более жизнеспособного приплода для реализации генетического потенциала по репродуктивной функции.

Литература. 1. Баймишев, М. Х. Репродуктивная функция коров и факторы, её определяющие / М. Х. Баймишев, Х. Б. Баймишев. - Кинель, 2016. – 156 с. 2. Баймишев, Х. Б. Структурные преобразования в матке крупного рогатого скота при гипо- и гипердинамии / Х. Б. Баймишев // Морфология. – 2002. - Т. 121, № 2-3. – С. 18. 3. Баканова, К. А. Оплодотворяемость коров, переболевших послеродовыми заболеваниями половых органов / К. А. Баканова, Г. В. Небогатиков // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: «Наука и высшее профессиональное образование». – 2015. - № 2 (38). – С. 172-176. 4. Гематологические показатели коров при использовании иммуномодулирующих препаратов / С. П. Еремин, М. Х. Баймишев, С. А. Баймишева, Х.Б. Баймишев // Известия Самарской ГСХА. – 2019. - № 1. – С. 89-94. 5. Конопельцев, И. Г. Оплодотворяемость коров и телок в зависимости от различных факторов и способы ее коррекции / И. Г. Конопельцев, С. В. Nikolaev // Ветеринария. – 2019. - № 4. – С. 33-37. 6. Мешков, И. В. Морфо-биохимические показатели крови и ее сыворотки при лечении эндометрита у коров с использованием препарата Метролек-О / И. В. Мешков, Х. Б. Баймишев // Известия Самарский ГСХА. – 2014. № 1. – С. 15-17. 7. Перфилов, А. А. Воспроизводительные способности коров в зависимости от уровня молочной продуктивности / А. А. Перфилов, Х. Б. Баймишев / Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2006. - № 5 (25). – С. 29-31. 8. Племяшов, К. В. Репродуктивная функция высокопродуктивных молочных коров при нарушении обмена веществ и ее коррекция / К. В. Племяшов, Д. О. Моисеенко // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2019. - № 1. – С. 37-40. 9. New method of gonadorelin application for treatment of cows with follicular cysts / I. Konopeltsev, Kh. B. Baymishev, A. Batrakov [et al.] // Reproduction in Domestic Animals. – 2018. - Т. 53, № S2. – С. 151-152. 10. Increase in reproductive ability of kigh-producing cows, and qualitative parameters of their offspring under conditions of intensive milk production / I. N. Khakimov, V. S Grigorev, Kh. B. Baimischev, M. Kh. Baimischev // Asian Pacific Journal of reproduction. – 2018. – Т.7, № 4. – С. 167-171.

УДК 578.828; 615.281.8

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОЛЕЙКОЗНОЙ АКТИВНОСТИ БЕТУЛИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ МИКРОМЕТОДОМ

Бармина К.А., Новикова Н.Н.

ФГБНУ «Омский аграрный научный центр», г. Омск, Российская Федерация

В статье представлены результаты исследования противолейкозной активности бетулина, бетулиновой кислоты и её производного. Изучение проводилось «*in vitro*» с использованием культуры лимфоцитов периферической крови крупного рогатого скота, инфицированной вирусом бычьего лейкоза (*BLV*). Культура клеток инкубировалась в 96-луночном иммунологическом планшете с различными концентрациями исследуемых соединений в течение

24 и 48 часов при постоянной температуре. В результате было установлено, что титр вируса после 24-часовой экспозиции составил 1:1024, а после 48-часовой – 1:256. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) производного бетулиновой кислоты составила 31,2 мкг/мл после 24-часовой инкубации. Для бетулина и бетулиновой кислоты МПК была равна 31,2 и 500 мкг/мл соответственно, что было подтверждено отсутствием специфического свечения в прямой реакции иммунофлюоресценции (РИФ) после 48-часовой инкубации. **Ключевые слова:** бетулин, бетулиновая кислота, производное бетулиновой кислоты, вирус бычьего лейкоза, *in vitro*.

STUDY OF THE ANTI-LEUKEMIC ACTIVITY OF BETULIN AND ITS DERIVATIVES BY THE MICROMETHODE

Barmina K.A., Novikova N.N.

Omsk Agrarian Scientific Center, Omsk, Russian Federation

*The article presents the results of a study of the anti-leukemic activity of betulin, betulinic acid, and its derivative. The study was conducted *in vitro* using a culture of peripheral blood lymphocytes from cattle infected with bovine leukemia virus (BLV). The cell culture was incubated in a 96-well immunological plate with various concentrations of the test compounds for 24 and 48 hours at a constant temperature. As a result, it was found that the virus titer was 1:1024 after 24 hours of exposure and 1:256 after 48 hours. The minimum inhibitory concentration (MIC) of betulinic acid derivative was 31,2 µg/ml after 24 hours of incubation. For betulin and betulinic acid, the MPC was 31,2 and 500 µg/ml, respectively, which was confirmed by the absence of specific fluorescence in the direct immunofluorescence (DIF) reaction after a 48-hour incubation. **Keywords:** betulin, betulinic acid, betulinic acid derivative, bovine leukemia virus, *in vitro*.*

Введение. Вирус бычьего лейкоза (BLV) представляет собой РНК-содержащий ретровирус из семейства Retroviridae, подсемейства Oncornaviridae. Данный вирус преимущественно поражает у крупного рогатого скота В-лимфоциты, вызывая хроническую инфекцию с разнообразными клиническими проявлениями [1, 2]. В связи с значительными экономическими потерями в животноводстве и потенциальной угрозой для здоровья человека поиск новых эффективных методов профилактики и лечения BLV является актуальной задачей.

В настоящее время борьба с этим заболеванием основана на профилактических мерах, направленных на предотвращение передачи вируса. Однако такие меры не всегда оказываются эффективными и требуют значительных финансовых затрат [3-5]. С нашей точки зрения, перспективным направлением решения этой проблемы является поиск новых терапевтических и профилактических средств, в том числе природных соединений или их модифицированных форм, способных снизить вирусную нагрузку при инфекции BLV.

Целью данной работы провести исследование противолейкозной активности *in vitro* лекарственных препаратов бетулина, бетулиновой кислоты и ее производного.

Материалы и методы исследований. Предлагаемый метод оценки противолейкозной активности лекарственных препаратов базируется на анализе их влияния на репликацию вируса *in vitro*.

В ходе эксперимента образцы лимфоцитов, выделенных из стабилизированной крови коровы с лейкозом, были внесены в иммунологический планшет с 96 ячейками. В каждую ячейку поместили по 0,1 мл культуры лимфоцитов и добавили такое же количество поддерживающей среды, содержащей исследуемые вещества (бетулин, бетулиновая кислота и производное бетулиновой кислоты) в различных концентрациях от 1000 мкг/мл до 15,6 мкг/мл с двукратным разведением.

Планшет был герметично закрыт и помещен в эксикатор для создания условий пониженного доступа воздуха. Инкубация проводилась в термостате при температуре 37 °C в течение 24 и 48 часов. После инкубации была проведена реакция прямой иммунофлюоресценции. Для контроля титра вируса в культуре лимфоцитов периферической крови определялся до и после инкубации в термостате с поддерживающей средой, но без исследуемых веществ.

Интенсивность свечения в лунках оценивается по четырехбалльной шкале: (++++) - очень яркая люминесценция, (+++) - яркая люминесценция, (++) или (+) - слабое свечение, (-) - отсутствие люминесценции. За положительную реакцию принимается свечение в три или четыре креста [6].

Результаты исследований. Эффективность исследуемого препарата была определена посредством метода прямой реакции иммунофлюоресценции (РИФ). В контрольной культуре лимфоцитов периферической крови титр вируса оставался неизменным (1:1024) как до, так и после 24-часовой инкубации при 37°C с ограниченным доступом воздуха. К 48 часам инкубации титр вируса снизился до 1:256. Интенсивность специфического свечения антигена оценивалась в 4 креста. Аналогичные результаты были получены после 24-часовой инкубации клеточной культуры с бетулином и бетулиновой кислотой (см. таблицу 1). Положительные эффекты наблюдались у производной бетулиновой кислоты, которая демонстрировала подавление вирусной активности в диапазоне от 1000 до 31,2 мкг/мл, что характеризовалось полным отсутствием или слабым свечением (2 креста).

Анализ результатов 48-часовой инкубации показал, что бетулин подавляет вирусную активность в диапазоне от 1000 до 31,2 мкг/мл и ниже, что свидетельствует о замедленном действии препарата. Подобные изменения наблюдались у бетулиновой кислоты, которая снижала вирусную активность в диапазоне от 1000 до 500 мкг/мл. У производной бетулиновой кислоты изменения после 48-часовой инкубации составляли от 1000 до 15,6 мкг/мл.

Таблица - Исследование противовирусной активности *in vitro*

Время инкубации, ч	Разведение исследуемого препарата, мкг/мл	Название лекарственного препарата			
		Бетулин	Бетулиновая кислота	Производное бетулиновой кислоты	Контроль без препарата
Через 24 часа	1:1000	++++	++++	-	++++
	1:500	++++	++++	++	++++
	1:125	++++	++++	++	++++
	1:62,5	++++	++++	++	++++
	1:31,2	++++	++++	++	++++
	1:15,6 и ниже	++++	++++	++++	++++

Время инкубации, ч	Разведение исследуемого препарата, мкг/мл	Название лекарственного препарата			
		Бетулин	Бетулиновая кислота	Производное бетулиновой кислоты	Контроль без препарата
Через 48 часа	1:1000	-	-	-	++++
	1:500	-	-	-	++++
	1:125	-	+++	-	++++
	1:62,5	-	++++	-	++++
	1:31,2	++	++++	-	++++
	1:15,6 и ниже	+++	++++	-	++++

Примечание: за положительный результат принимают специфическое свечение антигена с оценкой в четыре, три креста.

При анализе результатов реакции через 48 часов инкубации наблюдается достоверное снижение титра вируса в лимфоцитах в четыре раза ($1024:256 = 4$). Ввиду этого, продолжение экспозиции нецелесообразно, поскольку эффективность оцениваемого препарата направлена на меньший титр вируса.

Заключение. Исследование продемонстрировало, что производное бетулиновой кислоты эффективно подавляет *in vitro* вирус бычьего лейкоза (BLV) уже через 24 часа. Минимальная концентрация, необходимая для ингибирования роста клеток BLV в культуре лимфоцитов периферической крови больной коровы, составила 31,2 мкг/мл. В то время как бетулин и бетулиновая кислота (в соотношении 1:1000 мкг/мл) показали незначительное действие на вирус после 24-часовой инкубации, их ингибирующее воздействие усилилось через 48 часов. Анализ противолейкозной активности бетулина, бетулиновой кислоты и ее производного выявил, что модифицированный препарат из бетулиновой кислоты обладает наилучшей эффективностью. Он характеризуется более низкой дозировкой и более коротким периодом времени для подавления лейкозной активности вируса бычьего лейкоза.

Литература. 1. Bovine leukemia virus infection in neonatal calves. Risk factors and control measures / V. Ruiz, N. G. Porta, M. Lomónaco [et al.] // Front. Vet. Sci. - 2018. - № 5. - Р. 267. doi: 10.3389/fvets.2018.00267. 2. Bovine leukemia viral DNA found on human breast tissue is genetically related to the cattle virus / R. Canova, M. N. Weber, R. F. Budaszewski [et al.] // One Heal. - 2021. - № 13. – Р. 100252. doi: 10.1016/j.onehlt.2021.100252. 3. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV / S. M. Rodríguez, A. Florins, N. Gillet [et al.] // Viruses. - 2011. - № 3 (7). - Р. 1210-48. doi: 10.3390/v3071210. 4. Assessment of the impact of betulin on the immune status of cows with leukemia-associated infection / V. S. Vlasenko, V. I. Pleshakova, S. T. Bayseitov, N. A. Lescheva // KnE Life Sciences. DonAgro : International Research Conference on Challenges and Advances in Farming, Food Manufacturing, Agricultural Research and Education. – Dubai : UAE. - 2021. - 693-700 с. 5. Новикова, Н. Н. Оценка эффективности методов диагностики лейкоза крупного рогатого скота / Н. Н. Новикова, В. С. Власенко // Ветеринария и кормление. - 2023. - № 5. - 57-60 с. 6. Применение прямого метода реакции иммунофлюоресценции для диагностики лейкоза крупного рогатого скота : методические рекомендации / Н. Н. Новикова, В. С. Власенко, Е. А. Вишневский, К. А. Бармина. – Омск : ФГБНУ «Омский АНЦ», 2024. - 20 с.

УДК 636.5-053.2:612.397:615.32