

// Trends in Plant Sci. – 2001. – Vol. 6. – P. 219-226. **9.** Edelbaum O., Stein D., et al. Expression of active human interferon-beta in transgenic plants // *J Interferon Res.* – 1992. – Vol. 12. – P. 449-453. **10.** Sawahel, W.A. The production of transgenic potato plants expressing human alpha-interferon using lipofectin-mediated transformation // *Cell Mol Biol Lett.* – 2002. – Vol. 7. – P. 19-29. **11.** Masumura, T., Morita, S., et al. Production of biologically active human interferon- α in transgenic rice // *Plant Biotechnology* – 2006. – Vol. 23. – P. 91-97. **12.** Ohya K., Matsumura T., et al. Expression of two subtypes of human IFN- α in transgenic potato plants // *J Interferon Cytokine Res.* – 2001. – Vol. 21. – P. 595-602. **13.** Chen T.L., Lin Y.L., et al. Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures // *Transgenic Res.* – 2004. – Vol. 13. – P. 499-510. **14.** Arlen, P.A., Falconer, R., et al. Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b // *Plant Biotechnol J.* – 2007. – Vol. 5. – P. 511-525. **15.** Sheludko, Y.V. Agrobacterium-mediated transient expression as an approach to production of recombinant proteins in plants // *Recent Patents on Biotechnology.* – 2008. – Vol. 2. – P. 198-208. **16.** Li, J., Chen, M., et al. Transient expression of an active human interferon-beta in lettuce // *Scientia Horticulturae* – 2007. – Vol. 112. – P. 258-265. **17.** Шелудько, Ю. В., Сіндаровська, Я. Р., Герасименко І. М., Банникова М. О., Олевинська З.М., Співак М. Я., Кучук М. В. Agrobacterium-опосередкована транзійтна експресія: перспективний підхід для масштабної продукції рекомбінантних білків у рослинах // *Наука та інновації.* – Т. 2 (N6). – С. 65-76. **18.** Song, L., Zhao, D.G., et al. Transient expression of chicken alpha interferon gene in lettuce // *J Zhejiang Univ Sci B* – 2008. – Vol. 9. – P.351-355. **19.** Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497. **20.** Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell Res.* – 1968. – Vol. 50. – P. 151-158. **21.** Гочева, Є.А., Сахно, Л.О., Кучук, М.В. Спосіб отримання трансформованих рослин ріпаку методом агробактеріальної трансформації // Патент України на корисну модель № 39205. – Публ. 10.02.2009, бюл. № 3. **22.** Querci, M., Jermini, M., Van den Eede, G. (ed.) Training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms – User manual // Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. – 2006. – 229 p. **23.** Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254. **24.** Rubinstein, S., Famillett, i P.S., Pestka, S. Convenient assay for interferons // *Journal of Virology.* – 1981. – V. 37. – P. 755-758. **25.** Белоцкий, С.М., Співак, Н.Я. Интерфероны: биологические и клинические эффекты // К.: Фитосоцицентр, 2006. – 288 с. **26.** Gils, M., Kandzia, R., et al. High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system // *Plant Biotech. J.* – 2005. – Vol. 3. – P. 613-620.

PERSPECTIVES OF USE OF TRANSGENIC PLANTS PRODUCING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE HUMAN INTERFERON ALPHA2B IN VETERINARY MEDICINE

Sheludko Yu.V.¹, Gerasimenko I.M.¹, Shcherbak N.L.¹, Sahno L.A.¹, Lipovaya N.N.¹,
Sindarovskaya Ya. R.¹, Olevinskaya Z.M.², Klestova Z.S.³, Spivak N. Ya.², Kuchuk N.V.¹

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NASU, Kiev

² Institute of microbiology and virology of Zabolotnogo name of NASU, Kiev

³ Institute of Veterinary medicine of UAAS, Kiev

The article describes the obtaining of tobacco, lettuce, and rape plants expressing human interferon alpha2b gene. Agrobacterium-mediated transformation of plant nuclear genome has been carried out with genetic constructions harbouring the gene of interest under control of CaMV 35S promoter. The presence of the transgen in the selected plants has been proved by PCR analysis. The extracts of transformed tobacco, lettuce and rape plants were shown to reduce the cytopathic effect of the vesicular stomatitis virus on human fibroblast cells. The obtained plants can be used in veterinary medicine for development of food supplements stimulating the resistance of animals to viral diseases.

УДК 619.616.98.578.2'213.15:615.37.41

МЕХАНИЗМ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БЕТУЛИНА ПРИ ИРТ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Шуляк А.Ф.¹, Щегловитова О.Н.², Величко Г.Н.¹

¹ Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко,
г. Москва, Россия

² НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, г. Москва, Россия

Целью исследований являлось изучение действия бетулина при экспериментальном и спонтанном ИРТ. В опытах на 118 телятах различного возраста испытывали препарат «Бересты экстракт сухой» (БЭС), содержащий не менее 87% бетулина. Детекцию вирусов в биоматериале проводили в ПЦР и классическом культуральным методом,

специфических антител – в РН микрометодом. Вирулицидное действие определяли по изменению инфекционного титра вируса под воздействием препарата. ИФН выявляли биотестированием, цитокины - в ИФА. Бетулин в дозах 4-12 мг/кг живой массы профилактировал заболевание и оказывал терапевтический эффект у больных телят. Механизм этого действия связан как с противовирусной активностью препарата, так и его иммуномодулирующими свойствами, реализуемыми через систему ИФН и цитокинов. Бетулин может эффективно дополнить систему мероприятий по борьбе с ИРТ крупного рогатого скота.

Введение. Этиология респираторных болезней крупного рогатого скота (КРС) являлась предметом многочисленных научных исследований. Более чем пятидесятилетний опыт изучения этой проблемы продемонстрировал ведущую роль вируса ИРТ в возникновении вспышек острых респираторных заболеваний среди КРС в большинстве стран мира.

Основным методом борьбы с этой инфекцией является вакцинация, эффективность которой зависит как от качества применяемых вакцин, схемы иммунизации, так и от состояния иммунной системы вакцинируемых животных. Против ИРТ применяется большое число вакцин. Сообщений об искоренении этой инфекции только за счет вакцинации в доступной литературе нет. Вакцинация в большинстве стран не является обязательной. Кроме того, она проводится не всегда своевременно, и поэтому вероятность возникновения вспышек болезни весьма высока. Возникает вопрос о том, какие меры принимать в условиях неблагополучного очага? Этот вопрос актуализирует исследования, направленные на поиск методов лечения заболевших животных.

Количество противовирусных препаратов и лекарств, способствующих купированию вирусных инфекций в организме животных, крайне ограничено. Целью исследований, обобщенных в настоящей статье, являлось изучение терапевтической эффективности бетулина при ИРТ, противовирусная и интерферониндуцирующая активность которого выявлена при гриппе и гепатите С на лабораторных животных (Дерябин П.Г., Исаева Е.И., Львов Д.К., Балакшин В.В., 2003).

Материалы и методы. В опытах использовали препарат БЭС («Бересты экстракт сухой»), выделенный из коры березы, очищенный от смол, танинов, главным компонентом которого (87%) является пентациклический тритерпеновый спирт бетулин. Препарат вводили животным *per os* в форме порошка с водой, молоком или в капсулах.

Опыты провели на 118 телятах: 12 клинически здоровых серонегативных телятах в возрасте 2-5 мес; 14 новорожденных телятах, 54 животных в возрасте 2-3 недели, 38 - в возрасте 3-4 мес.

Клиническую реакцию животных на заражение оценивали в баллах по системе, разработанной Н.М.Белкиной (1974).

Детекцию вирусов в биоматериале проводили в ПЦР с праймерами, специфичными для фрагментов гена тимидинкиназы ВНУ-1, и классическим культуральным методом.

Уровень специфических антител к вирусу ИРТ в сыворотке крови определяли в РН на 96-луночных планшетах, используя культуру клеток МДВК.

Вирулицидное действие бетулина определяли по изменению инфекционной активности вируса под воздействием препарата.

Интерфероновый статус включал в себя показатели сывороточного ИФН; ИФН, продуцируемого лейкоцитами спонтанно; ИФН- α , продуцируемого под воздействием ВБН и вируса ИРТ; ИФН- γ при индукции ФГА. Активность ИФН определяли методом биотестирования в культуре МДВК на 96-луночных культуральных планшетах.

Для количественного определения цитокинов применяли твердофазный иммуноферментный метод (ИФА) с использованием коммерческих наборов «Pro-Cop» (Санкт-Петербург). Результаты ИФА оценивали на фотометре «Antos 2020» по коэффициенту оптического поглощения (ОП 450).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью про-

граммы «Microsoft Excel», входящую в пакет программ «Microsoft Office 7.0».

Результаты исследований. Серонегативные клинически здоровые телята в возрасте 2-3 мес, ежедневно в течение 5-ти суток получали бетулин в дозе 4 мг/кг живой массы. Затем их заражали интраназально вирулентным штаммом ТНЛ вируса ИРТ в дозе $2 \times 6,5 \text{ ТЦД}_{50} / \text{мл}$. В последующие 5 суток животные продолжали получать бетулин по указанной схеме. Параллельно инфицировали трех контрольных животных, которые не получали бетулин. Клиническая реакция телят опытной и контрольной группы имела существенные различия. Телята опытной группы сохраняли удовлетворительное общее состояние, тяжесть клинического проявления не превышала 2 баллов. Вирус ИРТ от этих телят реизолировать не удалось. Через 30 суток после заражения сероконверсия отсутствовала. Тяжесть клинических симптомов у животных контрольной группы достигала 10 баллов, выявлена сероконверсия и от двух животных реизолирован вирус ИРТ.

В стационарно неблагополучном по ИРТ и ВД-БС хозяйстве провели серию опытов на телятах различного возраста.

Применение бетулина новорожденным клинически здоровым телятам с двухсуточного возраста в течение 5-7 суток в дозе 4 мг/кг живой массы предупреждало развитие респираторного синдрома; при этом вирус ИРТ в ПЦР не выявили. У 70 % животных контрольной группы регистрировали признаки респираторной болезни и у 43 % выявлен вирус ИРТ.

Клинически здоровые телята в возрасте 2-3 недели, получавшие бетулин в дозе 10 мг/кг живой массы, а также контрольные животные, не получавшие бетулина, не проявляли респираторных симптомов, сохранность животных в обеих группах составила 100%. Вирус ИРТ выявили у 17 % обработанных и 58 % контрольных животных. У подопытных телят не обнаружили сероконверсии, в то время как у контрольных животных выявили 4-16- кратный прирост антител к вирусу ИРТ ($3,03 \pm 0,25$ до $18,04 \pm 0,25$).

Телята в возрасте 2-3 недели с манифестантной респираторной инфекцией получали бетулин с молоком на протяжении 5-7 суток в дозе 4 мг/кг живой массы. В течение недели постепенно исчезали признаки респираторной болезни, и сохранность животных составила 100 %. У контрольных животных в течение всего срока наблюдения (1 месяц) проявлялись признаки респираторной болезни вначале острой, в последствии - хронической. Сохранность животных в контрольной группе составила 86%. Через 7 суток клиническая картина при оценке в баллах у телят опытной группы приближалась к нулевым значениям, в отличие от контрольной группы, где она оценивалась в 10-12 баллов на протяжении всего срока наблюдения. У телят опытной группы вирус ИРТ выявили у 21 % животных, тогда как в контрольной группе - у 75 %. В течение 6 мес среди обработанных бетулином животных не регистрировали рецидивов респираторной болезни. Среди телят, не получавших препарата, в возрасте 3 мес наблюдался рецидив массовой респираторной болезни, и у трети животных она принимала хроническое течение.

Телята в возрасте 3-4 мес с хронической формой болезни получали бетулин в капсулах в дозе 12 мг/кг живой массы через день на протяжении 10 суток. Контрольная группа не получала препарата. В течение 1 мес у телят обеих групп гибель составляла 10-12% и признаки выздоровления отсутствовали. При этом после обработки бетулином вирус ИРТ выявили у 35 %, в контрольной группе - у 60 % животных.

Результаты всех экспериментов продемонстрировали профилактическую и терапевтическую эффективность бетулина, которая проявлялась в предупреждении развития болезни, выздоровлении больных животных, сокращении продолжительности клинической стадии болезни, отсутствии рецидивов, снижении уровня инфицированности вирусом ИРТ.

Отсутствие сероконверсии и снижение уровня инфицированности у телят, получавших бетулин, свидетельствовало об ингибирующей активности препарата в отношении вируса ИРТ. В связи с этим, исследовали прямое действие бетулина на возбудитель. Под действием бетулина вирус ИРТ снижал свою инфекционную активность с $6,5 \text{ lg ТЦД}_{50} / \text{мл}$ до не выявляемого уровня. Наши результаты согласуются с данными американских исследователей (Стикс Г., 2006), которые изучали механизм действия препарата, полученного из коры березы и платана, в отношении различных штаммов

ВИЧ. Ими показано, что производные бетулиновой кислоты влияют на позднюю стадию репликации вируса, происходит сбой в процессе расщепления новосинтезированного белка GAG, что приводит к утрате вирусом инфекционности.

Значимость и универсальность контрольно-регуляторных функций ИФН делают его важнейшим фактором неспецифической резистентности. Сообщения ряда исследователей об интерфероногенной активности бетулина (Носик Н.Н. и др., 2004), привели к предположению, что это свойство может лежать в основе выявленного нами терапевтического эффекта. В связи с этим, следующей задачей являлось изучение влияния бетулина на функционирование системы интерферона у крупного рогатого скота.

У экспериментально инфицированных вирусом ИРТ животных бетулин приводил к увеличению уровня сывороточного ИФН с 256 до $426,7 \pm 85,3$ ед/мл ($p < 0,05$), снижению продукции ИФН лейкоцитами крови спонтанно с $426,7 \pm 85,3$ до 128 ед/мл ($p > 0,05$) и не влиял на синтез ИФН- α (в пределах 128 ед/мл) и ИФН- γ . У контрольных инфицированных животных, не получавших препарат, уровень сывороточного ИФН увеличивался незначительно при исходно высоком значении, уровень продуцируемого лейкоцитами спонтанного ИФН не менялся. Титр ИФН- α , индуцируемого ВБН, снижался с $106,7 \pm 21,3$ до $37,3 \pm 5,3$ ед/мл ($p < 0,05$), а продукция ИФН- γ увеличивалась $96,0 \pm 32,0$ до 256 ± 0 ед/мл ($p < 0,05$).

У серопозитивных и серонегативных животных через 24 ч после получения бетулина в сыворотке крови повышался титр ИФН ($p > 0,05$), а к 72 ч понижался до первоначальных значений. Продукция спонтанного ИФН лейкоцитами серонегативных телят понижалась с $96,0 \pm 18,5$ до $7,7 \pm 4,4$ ед/мл ($p < 0,05$), тогда как у серопозитивных животных повышалась через 24 ч с $13,3 \pm 2,7$ до $72,0 \pm 30,3$ ед/мл ($p > 0,05$) и к 72 ч снижалась до $20,0 \pm 6,1$ ед/мл ($p > 0,05$).

Исходный уровень продукции ИФН- α лейкоцитами крови серонегативных телят был высоким - $160,0 \pm 32$ ед/мл, и при индукции ВБН снижался, к 72 ч достигал уровня $3,7 \pm 1,5$ ед/мл ($p < 0,05$). У серопозитивных животных титр ИФН- α до начала исследования был низким - $8,7 \pm 1,8$ ед/мл, через 24 ч после индукции ВБН повышался до $144,0 \pm 60,6$ ед/мл и уменьшался к 72 ч до $32,0 \pm 16,0$ ед/мл ($p > 0,05$).

Продукция ИФН- α лейкоцитами крови серопозитивных телят при индукции ВВН-1 через 24 ч возрастала с $8,3 \pm 3,7$ до $85,3 \pm 54,1$ ед/мл ($p > 0,05$). У серонегативных животных высокий исходный уровень ИФН - $53,3 \pm 23,2$ ед/мл - уменьшался и к 72 ч достигал $8,0 \pm 2,0$ ед/мл ($p > 0,05$).

Уровень ИФН- γ , продуцируемого лейкоцитами серонегативных телят под действием бетулина, изменялся незначительно (с $104,0 \pm 76,0$ до $68,0 \pm 33,5$ ед/мл, $p > 0,05$); у вакцинированных серопозитивных животных этот показатель имел тенденцию к увеличению в динамике исследования: с $88,0 \pm 54,5$ до $181,3 \pm 46,5$ ед/мл ($p > 0,05$).

Таким образом, определение ИФН статуса позволило выявить как интерфероногенные, так и иммуномодулирующие свойства бетулина, заключающиеся в повышении исходно низких и понижение исходно высоких показателей продукции ИФН.

В продолжение изучения механизма действия бетулина определяли его способность индуцировать цитокины в культуре клеток эндотелия кровеносных сосудов. Цитокины играют важную роль в функционировании иммунной системы и её взаимодействии с другими системами организма. Под действием бетулина эндотелиальные клетки не продуцировали ИФН и ФНО- α , но продуцировали провоспалительные цитокины ИЛ-6 и ИЛ-8, что свидетельствует о способности бетулина регулировать иммунные процессы через цитокиновую сеть.

Проведенные эксперименты позволяют отнести бетулин к лекарственным средствам двойного действия. С одной стороны, он непосредственно ингибирует образование инфекционного вируса, с другой стороны, регулирует иммунный ответ организма. Подобные препараты известны науке и применяются в практике, например фоспренил (А.В.Пронин, 2005).

Выводы. Бетулин обладает лечебно-профилактической эффективностью при ИРТ. Механизм этого действия связан как с противовирусной активностью препарата, так и с его иммуномодулирующей способностью, реализуемой через систему