

ТРИТЕРПЕНОИД МИЛИАЦИН КАК СРЕДСТВО ЭФФЕКТИВНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА БАКТЕРИАЛЬНУЮ КИШЕЧНУЮ ИНФЕКЦИЮ

© 2018 г. Б. А. Фролов¹, А. И. Смолягин¹, И. Н. Чайникова^{1,2},
Ю. В. Филиппова¹, Т. В. Панфилова¹, А. Д. Железнова¹,
Е. В. Ермолина¹, Ю. А. Сарычева¹

¹ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Оренбург, Россия;

²ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» Уральского отделения
Российской академии наук, Оренбург, Россия

Поступила: 07.05.2018. Принята: 21.06.2018

Тритерпеноид растительного происхождения милиацин оказывает защитный эффект при экспериментальной сальмонеллезной инфекции, проявляющийся снижением: гибели животных, обсемененности органов, гипоплазии костного мозга, тимуса, выраженности эндотоксинемии, продукции оксида азота макрофагами, накопления продуктов окислительного стресса. Иммуномодулирующий эффект милиацина сочетается с модифицирующим влиянием на биологические свойства сальмонелл.

Ключевые слова: тритерпеноид милиацин, инфекция, сальмонеллез, иммунная защита

DOI: 10.31857/S102872210002429-6

Адрес: 460000 Оренбург, ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Смолягин Александр Иванович. Тел.: 8(3532)50 06 06 (доб. 203).
E-mail: probllab.orenbur@mail.ru

Авторы:

Фролов Б. А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Оренбург, Россия;

Смолягин А. И., д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Оренбург, Россия;

Чайникова И. Н., д.м.н., профессор, профессор кафедры нормальной физиологии ФГБОУ «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, ведущий научный сотрудник лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований ФГБУН ИКВС УрО РАН, Оренбург, Россия;

Филиппова Ю. В., научный сотрудник проблемной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Оренбург, Россия;

Панфилова Т. В., к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Оренбург, Россия;

Железнова А. Д., к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Оренбург, Россия;

Ермолина Е. В., к.б.н., старший научный сотрудник проблемной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ

ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Оренбург, Россия;

Сарычева Ю. А., к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Оренбург, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Рост заболеваемости сальмонеллезом, разнообразие его клинических форм, высокая адаптационная способность энтеропатогенов, включающая подавление эффекторов врожденного и адаптивного иммунитета [1, 2], обосновывают необходимость использования в борьбе с этой инфекцией средств, обладающих не только иммуномодулирующими свойствами, но и способностью воздействовать на патоген.

В настоящее время к иммунокорректорам отнесены тритерпеноиды, обладающие широким спектром биологического действия. К числу последних относится и милиацин, показавший иммуностимулирующий эффект в вакцинальном процессе, а также его иммунопротекторное действие в условиях иммунодепрессии [3, 4, 5].

В настоящей работе обобщены результаты исследований, целью которых являлось изучение влияния милиацина на иммунную систему

и биологические свойства возбудителя на модели экспериментальной сальмонеллезной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пентациклический тритерпеноид милиацин (3- β -метокси- Δ^{18} -олеанен) получен из просяного масла и очищен перекристаллизацией из хлороформа. Исследования выполнены на мышам-самцах (СВАхС₅₇Bl₆) F₁. Милиацин вводили трехкратно внутрибрюшинно с интервалами в 3 дня между введениями в разовой дозе 2 мг/кг. Через 24 часа после последнего введения тритерпеноида осуществляли внутрибрюшинное заражение клиническим штаммом *Salmonella enterica subsp. enterica* серовар *Enteritidis* в дозе 2×10^6 бактерий на мыш. Использованы 4 группы животных: I – интактные (положительная группа сравнения); II – зараженные (отрицательная группа сравнения); III – зараженные после предварительного трехкратного введения растворителя для милиацина: твин 21 ($1,6 \times 10^{-7}$ моль/кг) контроль, или IV – милиацина – опыт. Животных II–IV групп выводили из эксперимента на 5, 10 и 15 сутки после заражения. Анализировались показатели гибели микробной обсемененности органов, массы и содержания клеток в тимусе, селезенке и костном мозге (КМ). Гибель мышей оценивали на протяжении 28 суток после их заражения. Спонтанную и индуцированную КонА (5 мкг/мл) продукцию ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-17, ИФН- γ оценивали по содержанию в супернатантах 48-часовых культур спленоцитов (10 сутки инфекции) методом ИФА (тест-системы “Bender MedSystems”, Австрия). Титр антител определяли в РНГА и выражали в Ig. Уровень эндотоксина определяли в плазме крови хромогенным LAL-тестом с использованием наборов Hbt LAL (Nucult biotech, Нидерланды). Маркером окислительного стресса служили продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), определяемые в сыворотке крови с использованием реактивов ТБК-АГАТ («Агат-Мед», Россия). Уровень кортикостерона исследовали методом ИФА (Immunodiagnostic systems, США). Влияние милиацина на формирование функционального фенотипа перитонеальных макрофагах (ПМ) от незараженных мышей оценивали *in vitro* по фагоцитарному показателю (ФП), фагоцитарному индексу (ФИ), метаболической активности в НСТ-тесте (в спонтанном и стимулированном зимозаном вариантах) и по продукции оксида азота (NO). Последний

определяли в 48-часовых культурах ПМ, инкубированных в присутствии ЛПС (10 мкг/мл), только в культуральной среде, в культуральной среде в присутствии растворителя и в среде, содержащей различные концентрации милиацина (1,0; 5,0 и 10,0 мкг/мл). Содержание NO оценивали по уровню его стабильного метаболита – нитрита с использованием тест-системы Total NO / Nitrite / Nitrate Assay (R&D Systems, Inc., США). При изучении влияния милиацина на способность ПМ к одновременной спонтанной и индуцированной ЛПС (10 мкг/мл) продукции ИЛ-12 и NO использовали 48-часовые культуры макрофагов от трех групп животных: интактных, получавших трехкратно растворитель для милиацина или милиацин. Влияние милиацина на биологические свойства сальмонелл оценивали по показателям антимикробной активности и биопленкообразованию (БПО) с использованием клинических штаммов *Salmonella* серовар *Enteritidis* (28) и клинических штаммах *Salmonella* серовар *Typhimurium* (24). Методом серийных разведений (МУК 4.2.1890–04.) определяли минимальную подавляющую концентрацию милиацина в диапазоне доз от 400 мкг/мл до 0,049 мкг/мл. Образование биопленок изучали на поверхности планшетов (O’Toole G.A. et al., 1998) и выражали в условных единицах, рассчитывая коэффициент БПО (КБПО): $\text{КБПО} = \text{ОДк} / \text{ОДб}$, где ОДк – оптическая плотность опытных, контрольных и проб групп сравнения, а ОДб – оптическая плотность питательного бульона. Результаты исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel и «STATISTICA 10.0», включая методы параметрического (t-критерий Стьюдента), непараметрического (U-критерий Манна-Уитни) анализов. Статистически значимыми считали изменения при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Милиацин снижал гибель зараженных животных (8 из 32–25%) по сравнению с группами II (12 из 32–37,5%) и III (13 из 32–40,6%) и уменьшал микробную обсемененность внутренних органов. Так, показатели этой обсемененности ($\text{Me} [Q_{25}-Q_{75}]$) в селезенке мышей IV группы по сравнению с группой II на 5 сутки инфекции составили 355689 [267460–618659] КОЕ/г против 1169785 [677991–1411228], $p < 0,05$; на 10 сутки 319269 [98827–413235] КОЕ/г против 2918519 [1193069–4285714], $p < 0,05$; на 15 сутки

406 [227–984] КОЕ/г против 4234 [049–237000], $p < 0,05$. Аналогичная ситуация имела место и для ткани печени на 5 и 15 сутки после заражения. У мышей контрольной группы III статистически значимые различия КОЕ/г с группой II определялись у них лишь для ткани селезенки на 5 сутки инфекции.

Предварительное введение милиацина (группа IV) обеспечивало существенное снижение эндотоксинемии ($0,200 \pm 0,033$ ЕД/мл) по отношению к другим группам зараженных животных: II ($0,310 \pm 0,037$ ЕД/мл) и III ($0,324 \pm 0,043$ ЕД/мл). Снижение эндотоксинемии ослабляло выраженность проявления общего адаптационного синдрома. Так, если среди зараженных мышей II и III групп уровень кортикостерона в крови (соответственно 100,3 [34,7–166,2] и 81,3 [7,1–143,9] нг/мл) превышал значения интактных животных (группа I) (28,9 [19,4–38,3] нг/мл) в 3,46 и в 2,81 раза, то у мышей IV группы этот показатель был превышен лишь в 1,4 раза (41,5 [36,5–102,5] нг/мл).

Инфекция приводила к увеличению содержания ТБК-РП (на 5-е сутки) в сыворотке крови у мышей II, III и IV групп при максимальных значениях во II и III группах. На 10-е сутки содержание ТБК-РП было также достоверно увеличено у зараженных мышей (0,88 [0,51–1,10] ЕД) и снижено в группе с милиацином (0,20 [0,18–0,22] ЕД) по сравнению с контролем (0,23 [0,2–0,28] ЕД).

Сальмонеллезная инфекция характеризовалась повышением способности спленоцитов к спонтанной продукции ИФН- γ – 24,60 [19,69–31,9] и ИЛ-6 – 23,9 [22,1–51,6] пг/мл и индуцированной продукции ИЛ-12, ИФН- γ , ИЛ-17, ИЛ-6 – соответственно 33,63 [17,25–51,75]; 369,8 [234,3–843,90]; 54,50 [27,15–60,20]; 375,9 [252,2–1780,0] пг/мл по сравнению с интактными животными, для спленоцитов которых показатели спонтанной продукции ИФН- γ , ИЛ-6 составили 6,03 [3,86–11,08], индуцированной – 5,02 [2,6–8,61] пг/мл ($p < 0,05$); индуцированной продукции ИЛ-12, ИФН- γ , ИЛ-17, ИЛ-6 – соответственно 8,81 [5,35–10,4] и 23,32 [20,38–31,41]; 5,40 [4,71–6,28]; 73,1 [28,2–300,9] пг/мл ($p < 0,05$). Инфекционный процесс сопровождался повышением митогениндуцированной продукции ИЛ-10 (54,50 [27,15–60,20] против 5,19 [4,33–5,81] пг/мл у интактных мышей, $p < 0,05$). Содержание ИЛ-4 в культуральной среде нестимулированных спленоцитов от зараженных мышей соответствовало значениям, определя-

мым для спленоцитов от неинфицированных животных: 1,56 [1,41–2,02] против 1,64 [1,27–1,89] пг/мл. Вместе с тем, заражение характеризовалось четкой тенденцией к двукратному снижению индуцированной продукции данного цитокина (9,13 [2,53–2,68] против 20,11 [11,63–30,85] пг/мл, $p < 0,05$).

Милиацин не отменял стимулирующего влияния инфекции на продукцию ИЛ-12 и ИФН- γ , но обеспечивал наиболее значительный прирост их спонтанной продукции. Для митогениндуцированной продукции данных цитокинов стимулирующего действия тритепеноида не наблюдалось. Применение милиацина обуславливало также наиболее высокие показатели спонтанной и индуцированной продукции ИЛ-10. В отношении ИЛ-17 и ИЛ-6 эффект носил противоположный характер – в сторону ограничения прироста митогениндуцированной продукции до минимальных значений. Спонтанная продукция ИЛ-4 спленоцитами мышей IV группы не менялась, а индуцированная характеризовалась его низким содержанием на уровне значений контроля (III группа).

Применение милиацина не сопровождалось повышением уровня антител на 5 и 15 сутки ($1,42 \pm 0,5$ Ig и $1,15 \pm 0,1$ Ig) по сравнению с мышами II ($2,05 \pm 0,2$ Ig и $1,24 \pm 0,5$ Ig) и III групп ($1,97 \pm 0,2$ Ig и $1,80 \pm 0,4$ Ig).

Милиацин не влиял на ФП и ФИ перитонеальных макрофагов от интактных животных, но приводил к увеличению спонтанного НСТ-теста. Вместе с тем тритерпеноид вызывал выраженную депрессию продукции NO при всех использованных дозах тритерпеноида (1,0; 5,0 и 10,0 мкг/мл), в присутствии которых содержание нитритов составляло 138,0 [119,3–159,3] мкмоль/л; 27,0 [17,8–34,5] мкмоль/л и 43,0 [20,3–51,3] мкмоль/л против 211,0 [176,0–275,8] мкмоль/л и 372,0 [328,8–414,0] мкмоль/л в культуральной среде спленоцитов, инкубированных без милиацина или в присутствии растворителя ($3,3 \times 10^{-7}$ моль/л). Аналогичные результаты в отношении продукции NO были получены при использовании спленоцитов от мышей I, III и IV групп. При этом в культуре спленоцитов IV группы отмечено повышение как спонтанной ($858,2 \pm 137,0$ пг/мл), так и индуцированной ($7476,4 \pm 1581,6$ пг/мл) продукции ИЛ-12, по сравнению с аналогичной продукцией в группах III ($441,7 \pm 54,1$ и $1255,4 \pm 114,4$ пг/мл) и I ($48,8 \pm 4,5$ и $78,1 \pm 3,5$ пг/мл).

Милиацин во всех исследуемых концентрациях не влиял на рост изученных серова-

ров сальмонелл. Вместе с тем в концентрации 50 мкг/мл по сравнению с контролем он вызывал трехкратное снижение БПО у *S. Typhimurium* (соответственно 0,87 [0,83–0,93] против 2,68 [1,77–2,89] у.е.; $p < 0,05$) и 1,5-кратное у *S. Enteritidis* (соответственно 0,84 [0,80–0,89] против 2,19 [2,0–2,23] у.е.; $p < 0,05$). В концентрации 100 мкг/мл он оказывал менее выраженное действие.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что защитное действие мелиацина не связано с гуморальным иммунным ответом, а обусловлено стимуляцией механизмов клеточного иммунитета (повышение продукции ИФН- γ и ИЛ-12), опосредуемого Th-1-лимфоцитами. Снижение на этом фоне ИЛ-4 – показателя активации Th-2-клеток отражает реципрокные отношения между данными субпопуляциями и подтверждает значимость клеточных механизмов иммунной защиты при сальмонеллезе [8]. Возрастание под влиянием мелиацина спонтанной и индуцированной продукции ИЛ-10 можно расценивать как проявление ауторегуляторной функции иммунной системы в виде включения супрессорного фактора (ИЛ-10), ограничивающего избыточную цитотоксичность и выраженность иммунного воспаления [9]. Снижение продукции ИЛ-17 – существенный механизм защитного действия мелиацина через ограничение участия данного цитокина в стимуляции синтеза провоспалительных цитокинов, а также в мобилизации гранулоцитов, поддерживающей остроту воспалительной реакции [10].

Результаты работы не позволяют прийти к однозначному выводу о репрограммирующем влиянии мелиацина на ПМ в пользу M1 или M2 фенотипов. Стимуляция фитостеролом генерации АФК (НСТ-тест) и активирующий эффект в отношении продукции ИЛ-12 свидетельствует о направленности дифференцировки ПМ в сторону M1-фенотипа. Однако подобная трактовка не согласуется с ингибирующим воздействием мелиацина на продукцию NO – другого референтного фактора такой дифференцировки. Эти результаты не противоречат представлениям о дифференцировке и активации макрофагов как о динамическом континууме переходных функциональных состояний данных клеток [12] и позволяют предполагать, что мелиацин способствует формированию одного из M1/M2 фенотипов с возможностью перепрограммирования в необходимом направлении при реализации

защитных и регуляторных механизмов. Таким образом, мелиацин демонстрирует иммуномодулирующую активность в отношении врожденного и адаптивного иммунитета: ограничивая продукцию NO и стимулируя секрецию ИЛ-12, он снижает флогогенный потенциал ПМ и повышает их антигенпрезентирующую активность.

Вместе с тем мелиацин можно рассматривать как бифункциональное средство, обладающее помимо иммуностропных свойств, способностью ингибировать биопленкообразование (БПО) сальмонелл. По-видимому, механизмы угнетения БПО могут быть опосредованы стероидной структурой тритерпеноида, которая позволяет ему встраиваться в клеточные мембраны, уменьшая их текучесть [13] и (или) связывать неполярные группы на поверхности бактерий, снижая их адгезивные свойства, что важно для начального этапа образования биопленок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Рожнова С. Ш., Гусева А. Н., Христюхина О. А., Виткова О. Н., Крутова Н. Е. Роль современных методов типирования в изучении генетического разнообразия и чувствительности к антибиотикам штаммов сальмонелл, выделенных из разных источников. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы 2017, 3, 15–24. [Rozhnova S. Sh., Guseva A. N., Khristiukhina O. A., Vitkova O. N., Krutova N. E. The role of modern typing methods in the study of genetic diversity and susceptibility to antibiotics of Salmonella strains isolated from different sources. Epidemiology and infectious diseases. Current issues 2017, 3, 15–24].
2. Jackson B. R., Griffin P. M., D. Cole, Walsh K. A., Chai S. J. Outbreak – associated Salmonella Enterica Serotypes and Food Commodities United States, 1990–2008. *Ermeg. Infect. Dis.* 2013, 19 (8), 1239–1244.
3. Железнова А. Д. Экспериментальное обоснование применения мелиацина для коррекции иммуносупрессии, индуцированной метотрексатом: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Пермь, 2010. 22 с. [Zheleznova A. D. Experimental substantiation of the use of meliacin for the correction of methotrexate-induced immunosuppression: author's abstract. dis. ... cand. med. sciences. Perm, 2010. 22 p.].
4. Кириллова А. В. Иммуностропная активность мелиацина: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Пермь, 2004. 25 с. [Kirillova A. V. Immunotropic activity of meliacin: author's abstract. dis. ... cand. med. science. Perm, 2004. 25 p.].
5. Панфилова Т. В. Протективная активность мелиацина при стрессиндуцированной иммуносупрессии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Пермь, 2007. 23 с. [Panfilova T. V. The protective activity of meliacin in stress-induced immunosuppression: author's abstract. dis. ... cand. med. sciences of Perm, 2007. 23 c.].

6. Олифсон Л. Е., Осадчая Н. Д., Нузов Б. Г., Галкович К. Г., Павлова М. М. Химическая природа и биологическая активность милиацина. Вопросы питания 1991, 2, 57–59. [Oliphson L. E., Osadchaya N. D., Nuzov B. G., Galkovich K. G., Pavlova M. M. Chemical nature and biological activity of miliacin. Questions of Nutrition 1991, 2, 57–59].
7. O'Toole G. A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol. Microbiol. 1998, 28 (3), 449–461.
8. Mittrücker H. W., Köhler A. A., Kaufmann S. H. Characterization of the murine T-lymphocyte response to *Salmonella* enteric serovar Typhimurium infection. Infect. Immun. 2002, 70, 199–203.
9. Cohen S. B., Crawley J. B., Kahan M. C. Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2. Immunology 1997, 92 (1), 1–5.
10. Peck A., Mellins E. D., [et al.]. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. Immunology 2010, 129 (2), 147–153.
11. Манухина Е. Б., Дауни Х. Ф., Маллет Р. Т., Малышев И. Ю. Защитные и повреждающие эффекты периодической гипоксии: роль оксида азота. Вестник российской АМН 2007, 2, 25–33. [Manukhina E. B., Downey H. F., Mallet R. T., Malyshev I. Yu. Protective and damaging effects of periodic hypoxia: the role of nitric oxide. Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences 2007, 2, 25–33].
12. Mosser D. M., Edwards J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nature reviews Immunology 2008, 8(12), 958–969.
13. Kalinin V. I., Silchenko A. S., Avilov S., Stonik V. A., Smimov A. V. Sea cucumbers triterpene glycosides, the recent progress in structural elucidation and chemotaxonomy Phytochemistry Reviews 2005, 4, 221–236.

MILIACIN TRITERPHENOID AS A MEANS OF IMPROVING EFFECTIVE IMPACT ON BACTERIAL INTESTINAL INFECTION

© 2018 B. A. Frolov¹, A. I. Smolyagin¹, I. N. Chaynikova^{1,2}, Y. V. Filippova¹, T. B. Panfilova¹, A. D. Zheleznova¹, E. V. Ermolina¹, Y. A. Sarycheva¹

¹Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

²Federal State Budget Scientific Institution “Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis”, UrO RAN, Orenburg, Russia

Received: 07.05.2018. Accepted: 21.06.2018

Triterpenoid of vegetable origin miliacin has a protective effect in experimental salmonella infection, manifested by a decrease in: animal death, organ contamination, bone marrow hypoplasia, thymus, endotoxemia, nitric oxide production by macrophages, accumulation of oxidative stress products. The immunomodulatory effect of miliacin is combined with a modifying effect on the biological properties of salmonella.

Key words: triterpenoid miliacin, infection, salmonellosis, immune defense

Authors:

Frolov B. A., MD, professor, Head of the Department of Pathological Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

Smolyagin A. I., ☒ MD, professor, professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

460000 Orenburg, Orenburg State Medical University. Phone: 8(3532)50 06 06 (add. 203). E-mail: probllab.orenbur@mail.ru;

Chaynikova I. N., MD, Professor, Professor of the Department of Normal Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation; Leading Researcher of Laboratory of Biomonitoring and Molecular Genetics Research, Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of Ural Branch of RAS, Orenburg, Russia;

Filippova Y. V., researcher of the Problem Research Laboratory, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

Panfilova T. V., PhD, associate professor of the Department of Pathological Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

Zheleznova A. D., PhD, associate professor of the Department of Pathological Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

Ermolina E. V., PhD, senior researcher of the Problem Research Laboratory, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

Sarycheva Y. A., PhD, associate professor of the Department of Pathological Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;