

2  
НОМЕР

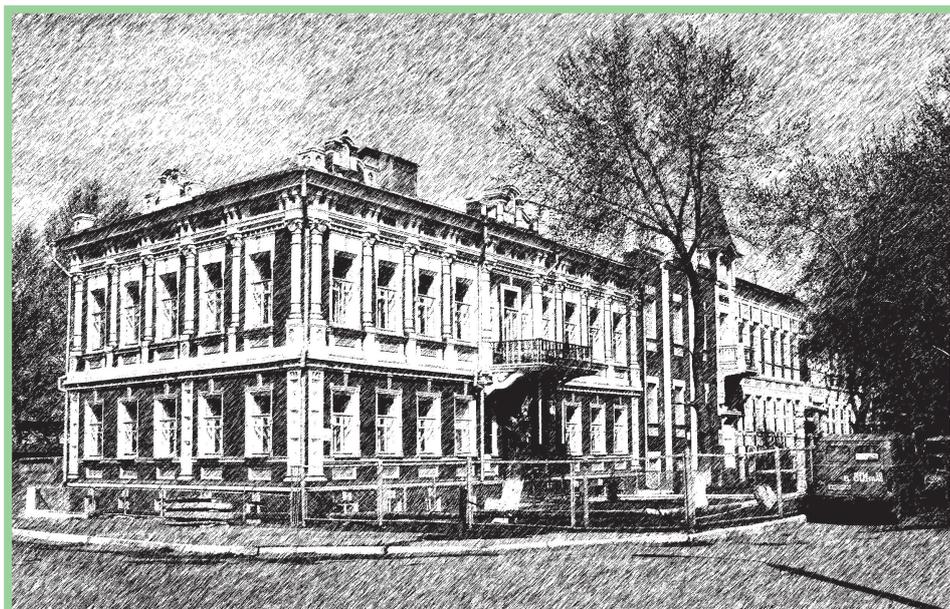


ISSN 2304-9081

Электронный журнал  
On-line версия журнала на сайте  
<http://www.elmag.uran.ru>

# БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



2016

**УЧРЕДИТЕЛИ**

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН  
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Ю.В. Филиппова, 2016

УДК 616-022-085

Ю.В. Филиппова

## **ВЛИЯНИЕ ТРИТЕРПЕНОИДА МИЛИАЦИНА НА РАЗВИТИЕ ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ, ВЫЗВАННОЙ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНОЙ ФЛОРОЙ**

Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург, Россия

*Цель.* Оценить возможности защитного влияния милиацина при экспериментальной инфекции, вызванной летальной дозой заражения грамотрицательной патогенной и условно-патогенной флорой.

*Материалы и методы.* В работе использован тритерпеноид милиацин, полученный из кристаллов просяного масла. В исследовании проведена оценка влияния тритерпеноида милиацина на развитие экспериментальной инфекции, вызванной *Salmonella* серовар *Enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* на мышах-самцах (СВАхС<sub>57</sub>В1<sub>6</sub>)F<sub>1</sub>, массой 22-25г, поставленных из питомника «Столбовая» РАМН. Для характеристики течения инфекционного процесса использовали показатели гибели животных.

*Результаты.* Заражение животных *S. enteritidis* вызывало развитие инфекции, сопровождающейся гибелью 37,5% мышей в течение 28 суток, введение милиацина снижало гибель мышей до 25,0%. Заражение мышей штаммом *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* приводило к гибели соответственно 85,7% и 70% животных в течение 48 часов. Использование милиацина не оказало защитного эффекта при инфекции, вызванной введением *K. pneumoniae*.

*Заключение.* Милиацин ослабляет тяжесть течения сальмонеллезной инфекции, что проявляется в снижении гибели животных. На развитие острой генерализованной инфекции, вызванной *K. pneumoniae* милиацин влияния не оказывает.

*Ключевые слова:* тритерпеноид милиацин, мыши, экспериментальная инфекция, грамотрицательные бактерии

---

---

Y.V. Filippova

## **INFLUENCE TRITERPENOID MILIACIN ON THE DEVELOPMENT OF INFECTION IN MICE CAUSED BY GRAM-NEGATIVE FLORA**

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

*Objective.* To evaluate the possible protective effects of miliacin during experimental infection with a lethal dose of infection by gram-negative pathogenic and conditionally pathogenic flora.

*Materials and methods.* We used the triterpenoid miliacin obtained from crystals of millet oil. The study assessed the influence of triterpenoid miliacin on the development of experimental infections caused by *Salmonella* serovar *Enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* on mice-males (СВАхС<sub>57</sub>В1<sub>6</sub>)F<sub>1</sub> weighing 22-25g, delivered from the nursery "Stolbovaya" of the RAMS. For the flow characteristics of the infection process used figures of animal deaths.

*Results.* The animals infected by *S. enteritidis* caused the development of infection and the resulting death of 37.5% of the mice within 28 days, the introduction of miliacin reduces death in mice to 25.0%. Infection of mice with a strain of *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* resulted in death, respectively, of 85.7% and 70% of the animals within 48 hours. The use of miliacin has not had a protective effect in infections caused by introduction of the *K. pneumoniae*.

*Conclusion.* Miliacin reduces the severity of Salmonella infection, which is manifested in the decrease in animal deaths. On the development of acute generalized infection caused by *K. pneumoniae* miliacin has no effect.

*Keywords:* triterpenoid miliacin, mouse, experimental infection, gram-negative bacteria

## **Введение**

В настоящее время в условиях усиливающегося влияния экологически неблагоприятных факторов, стрессовых ситуаций, стремительного распространения антибиотикорезистентности наблюдается рост заболеваний, связанных с нарушениями в системе иммунитета. С иммунобиологической позиции состояние здоровья современного человека характеризуется снижением иммунологической реактивности и, как следствие, повышением острой и хронической заболеваемости микробной этиологии. Увеличивается число случаев инфекций, вызванных условно-патогенными бактериями, включая клебсиеллы и псевдомонады, которые могут индуцировать токсико-септические состояния. Одно из ведущих мест в инфраструктуре острых кишечных заболеваний занимают инфекции, вызванные сальмонеллами, обладающими выраженными иммуносупрессивными свойствами, способностью к длительной персистенции в организме человека и животных и для которых характерно значительное разнообразие клинических проявлений (от бессимптомного бактерионосительства до генерализованной формы).

Учитывая указанные изменения структуры инфекционной патологии, наиболее заметные успехи в борьбе с патогенами и условно-патогенными микроорганизмами могут быть достигнуты благодаря использованию препаратов с иммуномодулирующими свойствами. В настоящее время к числу иммунокорректоров отнесены тритерпеноиды – вещества, обладающие широким спектром биологического действия. Продемонстрированная в ряде работ способность тритерпеноидов к стимуляции гуморального и клеточного иммунного ответа [1, 2] характеризует их как перспективные средства иммунотерапии.

Ранее было показано, что пентациклический тритерпеноид милиацин обладает широким спектром биологических свойств, включая антиоксидантную активность [3], способность уменьшать выраженность патологической эндотоксинемии [4], а также реализовывать протекцию в отношении системы иммунитета в вакцинальном процессе [5].

В этой связи представляет большой интерес изучение применения ми-

милиацина на модели инфекционного процесса бактериальной природы для изучения механизмов его протективного влияния и оценки защитного действия при остро протекающей инфекции, вызванной грамотрицательными длительно перстистирующими патогенными, а также условно-патогенными бактериями, способными вызывать инфекцию, центральным звеном патогенеза которой является токсико-септический процесс.

Целью настоящей работы являлась оценка возможности защитного влияния милиацина при экспериментальной инфекции, вызванной летальной дозой заражения грамотрицательной патогенной и условно-патогенной флорой.

### **Материалы и методы**

Все экспериментальные исследования выполнены на мышах-самцах (СВАхС<sub>57</sub>В1<sub>6</sub>)F<sub>1</sub>, массой 22-25 г, поставленных из питомника «Столбовая» РАМН. Животных содержали в стандартных пластмассовых клетках при комнатной температуре, двухразовом питании натуральным кормом в количестве, соответствующем суточным нормам, при неограниченном доступе к воде. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985). Эвтаназию мышей осуществляли дислокацией шейных позвонков.

В работе использован милиацин, полученный из кристаллов просяного масла, выпадающих при его отстаивании на холоду и очищенный перекристаллизацией из хлороформа. На основании изучения масс-, ЯМР- и ИК-спектров, хроматографической однородности и качественного состава выделенный препарат отнесен к группе пентациклических тритерпеноидов, имеющих структуру 3-β-метоксигер-маницена (3-β-метокси-A<sup>18</sup>-олеанена) [6].

В исследовании проведена оценка влияния тритерпеноида милиацина на развитие экспериментальной инфекции, вызванной *Salmonella* серовар *Enteritidis*, *Klebsiella pneumonia* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Для оценки влияния милиацина на развитие сальмонеллезной инфекции милиацин вводили трехкратно внутрибрюшинно с интервалами в 3 дня между введениями в разовой дозе 2 мг/кг. Заражение животных проводили через 24 часа после последнего введения тритерпеноида внутрибрюшинным введением клинического штамма *S. enteritidis* в дозе 2x10<sup>6</sup> КОЕ в объеме 0,5 мл на мышь. Было использовано 96 животных, разделенных поровну на 3

группы: 1 – только зараженные (группа сравнения); 2 – зараженные после предварительного трехкратного введения растворителя для милиацина (твин 21 в конечной концентрации  $1,6 \times 10^{-7}$  моль/кг) – контроль; 3 – зараженные после предварительного введения милиацина (опыт). Гибель мышей оценивали на протяжении 28 суток после их заражения.

Для оценки влияния милиацина на развитие клебсиеллезной инфекции воспроизведена модель генерализованной инфекции путем внутрибрюшинного заражения животных клиническим штаммом *K. pneumonia* в дозе  $2 \times 10^6$  КОЕ в объеме 0,5 мл на мыш. В работе использованы 64 особи мышей, разделенных на 6 групп. Первую из них составили 14 животных, подвергнутых только заражению (группа сравнения). Вторая включала 10 зараженных особей, которым через 2 часа после заражения внутрибрюшинно вводился растворитель для милиацина: твин 21 в конечной концентрации  $1,6 \times 10^{-7}$  моль/кг (контроль). 3, 4, 5 и 6 группы животных (опытные группы) подвергались через 2 часа после заражения внутрибрюшинному введению 0,5 мл милиацина соответственно в конечных концентрациях – 2, 10, 20 и 40 мг/кг. Гибель животных оценивали в течение первых трех дней после заражения.

Для оценки влияния милиацина на развитие инфекции, вызванной *P. aeruginosa* милиацин вводили трехкратно внутрибрюшинно с интервалами в 3 дня между введениями в разовой дозе 2 мг/кг. Заражение животных проводили через 24 часа после последнего введения тритерпеноида внутрибрюшинным введением клинического штамма *P. aeruginosa* в дозе  $80 \times 10^6$  КОЕ в объеме 0,5 мл на мыш. Было использовано 30 животных, разделенных на 3 группы: 1 – только зараженные (группа сравнения); 2 – зараженные после предварительного трехкратного введения растворителя для милиацина (твин 21 в конечной концентрации  $1,6 \times 10^{-7}$  моль/кг) – контроль; 3 – зараженные после предварительного введения милиацина (опыт). Гибель мышей оценивали на протяжении 8 суток после их заражения.

### **Результаты и обсуждение**

Установлено, что заражение животных *S. enteritidis* вызывает развитие инфекции, сопровождающейся гибелью 12 из 32 мышей (37,5%) на протяжении 28 суток наблюдения (группа 1). При этом наибольшая гибель регистрировалась на протяжении первых 7 суток после заражения. Предварительное введение растворителя (группа 2) не оказало существенного влияния на летальность: 13 из 32 мышей (40,6%), но способствовало смещению максимума

гибели на вторую неделю инфекции. Предварительное введение милиацина (группа 3) оказывало защитный эффект: погибли 8 из 32 мышей (25,0%), и максимум гибели животных смещался на вторую неделю инфекции (табл.1).

*Таблица 1.* Влияние милиацина на показатели гибели мышей (СВАхС<sub>57</sub>Вl<sub>6</sub>)F<sub>1</sub> при сальмонеллезной инфекции

Группы животных	n	Количество погибших мышей в динамике инфекции			Всего
		0 -7 дней	8-14 дней	15 -28 дней	
1 заражение	32	8	2	2	12 (37,5%)
2 растворитель + заражение	32	3	6	4	13 (40,6%)
3 милиацин + заражение	32	2	5	1	8 (25,0%)

Таким образом, введение милиацина ослабляет тяжесть течения сальмонеллезной инфекции, что подтверждается снижением гибели животных. Ранее полученные данные свидетельствовали, что использование милиацина приводило к уменьшению микробной обсемененности внутренних органов, ограничению гипоплазии костного мозга и тимуса, а также реакции селезенки на инфекционный процесс в виде увеличения ее массы и количества спленоцитов [7]. При этом защитное действие милиацина при сальмонеллезной инфекции не было связано с гуморальным иммунным ответом [7], что соответствует существующим представлениям об относительной роли антител в защите организма от сальмонеллезной инфекции [8, 9].

В связи с этим можно полагать, что эффекты тритерпеноида опосредуются стимуляцией им механизмов клеточного иммунитета [10], а также его антиоксидантной [3] и мембранопротекторной [11-13] активностями. Последняя представляет особое звено в механизме протекции при сальмонеллезной инфекции с учетом внутриклеточного паразитирования возбудителя [14]. Вместе с тем не исключено, что действие милиацина носит бинарный характер и определяется также его прямым бактерицидным влиянием, установленным для других тритерпенов [15], либо ограничением персистентных свойств возбудителя [16], повышающим чувствительность последнего к факторам защиты макроорганизма.

Внутрибрюшинное заражение мышей штаммом *K. pneumoniae* группы сравнения приводило к гибели 85,7% животных в течение 48 часов. Использование растворителя не повлияло на показатели гибели животных, которые на протяжении 48 часов составили 80%. Введение милиацина зараженным мышам не оказало защитного эффекта. Показатели гибели мышей в течение 48 часов при дозах тритерпеноида 2, 10, 20 и 40 мг/кг не отличались от контроля и группы сравнения, составляя, соответственно, 90, 70, 100 и 90%.

Развитие токсико-септического процесса, вызванного *P. aeruginosa* на протяжении 48 часов сопровождалось гибелью 70% мышей в первой группе, 10% – во второй и 20% – в третьей. Таким образом, предварительное ведение как растворителя (2 группа), так и милиацина (3 группа) приводило к снижению гибели мышей. Для оценки влияния тритерпеноида милиацина на инфекцию, вызванную *P. aeruginosa*, требуются дополнительные исследования.

Отсутствие коррекции сформировавшегося септического процесса, вызванного *K. pneumoniae*, может быть объяснено данными ранее выполненных исследований других авторов, в том числе с помощью подходов, направленных на нейтрализацию определенных провоспалительных агентов (специфические антитела к ФНО $\alpha$  / ИЛ 1 $\beta$ , растворимые рецепторы к ФНО, антагонисты рецепторов к ИЛ 1) [17]. Известно, что центральная роль в патогенезе генерализованной инфекции принадлежит цитокиновой экспансии, индуцируемой сигнальным каскадом при участии TLR-4, адаптерного белка MyD 88 и фактора транскрипции NF-kB, отвечающего за экспрессию генов большинства провоспалительных цитокинов. Положение усугубляется способностью самих секретируемых цитокинов (ФНО $\alpha$ ) выступать в роли индукторов NF-kB, придавая этой секреции лавинообразный характер, а также вовлекать в патологический процесс другие медиаторы воспаления. Тем самым, включаются регуляторные механизмы, формирующие системный воспалительный процесс, индуцируемый не только комплексом токсических соединений бактериального происхождения, но и громадным числом образующихся биологически активных веществ, обуславливающих полиморфизм проявлений патологии и тяжесть ее исхода. Вероятно, эффективная коррекция токсико-септических состояний может быть достигнута путем лимитирования продукции биологически активных веществ и формированием ранней эндотоксиновой толерантности [18].

## Заключение

Милицин ослабляет тяжесть течения сальмонеллезной инфекции, что проявляется в снижении гибели животных. На развитие острой генерализованной инфекции, вызванной *K. pneumonia*, милицин влияния не оказывает.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bernhardt M, Sturm C., Shaker K.H. et al. Structurally related immunological effects of triterpenoid saponins. Pharmazie. 2001. 56(9):741-3.
2. Ильичева Т.Н., Проняева Т.Р., Шульц Э.Э. и др. Иммуностимулирующая активность тритерпенов растительного происхождения и их производных. Журн. микробиол. 2001. 2: 53-56.
3. Панфилова Т.В., Штиль А.А., Фролов Б.А. Тритерпеноид милицин снижает индуцируемое стрессом ПОЛ. Бюлл. exper. биол и мед. 2006. 141(6): 633-635.
4. Фролов Б.А., Чайникова И.Н., Филиппова Ю.В. и др. Механизмы реализации защитного действия милицина при экспериментальной сальмонеллезной инфекции: влияние на эндотоксинемию и продукцию цитокинов. Журн. микробиол. 2014. 5: 8-12.
5. Кириллова А.В., Скачков М.В., Панфилова Т.В. и др. Стимуляция иммунитета к столбнячному анатоксину милицином. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2003. 6: 36-38.
6. Олифсон Л.Е., Осадчая Н.Д., Нузов Б.Г. и др. Химическая природа и биологическая активность милицина. Вопросы питания. 1991. 2: 57-59.
7. Фролов Б.А., Чайникова И.Н., Железнова А.Д. и др. Защитный эффект милицина при экспериментальной сальмонеллезной инфекции. Журн. микробиол. 2013. 6: 3-8.
8. Чайникова И.Н. Инфектологическая характеристика сальмонеллеза. Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. Оренбург, 2006. 47с.
9. Lessard M., Hutckings D.L., Spencer J.L. Cell-mediated and humoral immune responses in chickens infected with *Salmonella typhimurium*. Avian diss. 1995. 39: 230-238.
10. Железнова А.Д., Панфилова Т.В., Смолягин А.И. и др. Влияние милицина на дисфункцию иммунной системы у мышей, при действии метотрексата. Иммунология. 2009. 5: 298-302.
11. Калинина О.В., Красиков С.И., Шехтман А.М. и др. Гепатопротекторное действие милицина при токсическом поражении печени метотрексатом. Российский биотерапевтический журнал. 2009. 8(1): 48-54.
12. Фролов Б.А., Кириллова А.В. Милицин как мембранопротектор. Защитное действие милицина при детергент-индуцированной иммуносупрессии. Российский аллергол. журнал. 2011. 4(1): 402-403.
13. Чернов А.Н., Павлова М.Н., Олифсон Л.Е. Средство, стабилизирующее биологические мембраны. А.С. № 1043860 от 23.05.1983. А61K35/78.
14. Kiney-Cain T., Clements J.D., Bost K.L. Endogenous and exogenous interleukin-12 augment the protective immune response in mice orally challenged with *Salmonella* Dublin. Infect. Immunol. 1996. 64: 1444-1447.
15. Nick A., Wright A.D., Sticher O., Rali T. Antibacterial triterpenoid acids from *Dillenia raruona*. J. Nat. Prod. 1994, 52: 1245-1250.
16. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999. 367 с.
17. Маркина А.А. Комплексное экспериментальное моделирование шоковых состояний. Иммунология. 2012. 5: 250-254.
18. Remick D.G., Ward P.A. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. Shock. 2005. 24: 7-11.

Поступила 16.05.2016

(Контактная информация: **Филиппова Юлия Владимировна** – м.н.с. проблемной

научно-исследовательской лаборатории по изучению процессов естественного иммунитета Оренбургского государственного медицинского университета; адрес: 460014, г. Оренбург, ул. Советская, 6; тел. 8 (3532) 777172; e-mail: [problab.orenburg@mail.ru](mailto:problab.orenburg@mail.ru)

---

---

## LITERATURE

1. Bernhardt M., Sturm C., Shaker K.H. et al. Structurally related immunological effects of triterpenoid saponins. *Pharmazie*. 2001. 56(9):741-3.
2. Il'icheva T.N., Pronjaeva T.R., Shul'c Je.Je. i dr. Immunostimulirujushhaja aktivnost' triterpenov rastitel'nogo proishozhdenija i ih proizvodnyh. *Zhurn. mikrobiol.* 2001. 2: 53-56.
3. Panfilova T.V., Shtil' A.A., Frolov B.A. Triterpenoid miliacin snizhaet induciruemoe stressom POL. *Bjull. jeksper. biol i med.* 2006. 141(6): 633-635.
4. Frolov B.A., Chajnikova I.N., Filippova Ju.V. i dr. Mehanizmy realizacii zashhitnogo dejstvija miliacina pri jeksperimental'noj sal'monelleznoj infekcii: vlijanie na jendotoksinemiju i produkciju citokinov. *Zhurn. mikrobiol.* 2014. 5: 8-12.
5. Kirillova A.V., Skachkov M.V., Panfilova T.V. i dr. Stimuljacija immuniteta k stolbnjachnomu anatoksinu miliacinom. *Jepidemiologija i vakcinoprofilaktika*. 2003. 6: 36-38.
6. Olifson L.E., Osadchaja N.D., Nuzov B.G. i dr. Himicheskaja priroda i biologicheskaja aktivnost' miliacina. *Voprosy pitanija*. 1991. 2: 57-59.
7. Frolov B.A., Chajnikova I.N., Zheleznova A.D. i dr. Zashhitnyj jeffekt miliacina pri jeksperimental'noj sal'monelleznoj infekcii. *Zhurn. mikrobiol.* 2013. 6: 3-8.
8. Chajnikova I.N. Infektologicheskaja harakteristika sal'monelleza. *Avtoref. diss. ... dokt. med. nauk.* Orenburg, 2006. 47s.
9. Lessard M., Hutckings D.L., Spencer J.L. Cell-mediated and humoral immune responses in chickens infected with *Salmonella typhimurium*. *Avian diss.* 1995. 39: 230-238.
10. Zheleznova A.D., Panfilova T.V., Smoljagin A.I. i dr. Vlijanie miliacina na disfunkciju immunnoj sistemy u myshej, pri dejstvii metotreksata. *Immunologija*. 2009. 5: 298-302.
11. Kalinina O.V., Krasikov S.I., Shehtman A.M. i dr. Gepatoprotekornoje dejstvie miliacina pri toksicheskom porazhenii pečeni metotreksatom. *Rossijskij bioterapevtičeskij zhurnal*. 2009. 8(1): 48-54.
12. Frolov B.A., Kirillova A.V. Miliacin kak membranoprotektor. Zashhitnoe dejstvie miliacina pri detergent-inducirovannoj immunosupressii. *Rossijskij allergol. zhurnal*. 2011. 4(1): 402-403.
13. Chernov A.N., Pavlova M.N., Olifson L.E. Sredstvo, stabilizirujushhee biologicheskie membrany. *A.S. № 1043860 ot 23.05.1983. A61K35/78*.
14. Kiney-Cain T., Clements J.D., Bost K.L. Endogenous and exogenous interleukin-12 augment the protective immune response in mice orally challenged with *Salmonella* Dublin. *Infect. Immunol.* 1996. 64: 1444-1447.
15. Nick A., Wright A.D., Sticher O., Rali T. Antibacterial triterpenoid aids from *Dillenia papuana*. *J. Nat. Prod.* 1994, 52: 1245-1250.
16. Buharin O.V. *Persistencija patogennyh bakterij*. M.: Medicina, 1999. 367 s.
17. Markina A.A. Kompleksnoe jeksperimental'noe modelirovanie shokovyh sostojanij. *Immunologija*. 2012. 5: 250-254.
18. Remick D.G., Ward P.A. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock*. 2005. 24: 7-11.

### **Образец ссылки на статью:**

Филиппова Ю.В. Влияние тритерпеноида милиацина на развитие инфекции у мышей, вызванной грамотрицательной флорой, *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2016. 2: 8с. [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/FYV-2016-2.pdf>).