



Биол. журн. Армении, 1 (67), 2015

## ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВОДОРАСТВОРИМОГО МЕЛАНИНА

А.Р. МАРТИКЯН<sup>1</sup>, С.В. АВETИСЯН<sup>2</sup>, Н.Э. МИКАЕЛЯН<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Армянский Медицинский Институт

<sup>2</sup>НПЦ «Армбиотехнология» ГНКО НАН РА

hasmik.57@mail.ru

Изучение бактериостатического и бактерицидного действия водорастворимого меланина, полученного на основе мутантного штамма *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* K1 (BTGK1), на бактериальных тест-организмах показало, что бактериальный меланин (БМ) обладает бактериостатическим свойством по отношению к некоторым грамотрицательным энтеробактериям. В опытах на белых крысах показано нейропротекторное влияние БМ.

*Bacillus thuringiensis* – водорастворимый бактериальный меланин –  
бактериостатическое действие – нейропротекторное влияние

*Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* K1 (BTGK1) մուտանտ շտամից ստացված ջրալուծ մելանինի բակտերիաստատիկ և բակտերիասպան ազդեցության ուսումնասիրությունը բակտերիական տեստ-օրգանիզմների կիրառմամբ ցույց է տրվել, որ բակտերիական մելանինը (ԲՄ) ցուցաբերում է բակտերիաստատիկ հատկություն որոշ գրամբացասական էնտերոբակտերիաների նկատմամբ: Սպիտակ առնետների վրա կատարված փորձերում ցույց է տրվել ԲՄ-ի նյարդապաշտպանիչ ազդեցությունը:

*Bacillus thuringiensis* – ջրալուծ բակտերիական մելանին – բակտերիաստատիկ  
ազդեցություն – նյարդապաշտպանիչ ազդեցություն

Study of bacteriostatic and bactericidal effects of water-soluble melanin, produced by mutant strain *B.thuringiensis* subsp. *galleriae* K1 (BTGK1), on bacterial test organisms showed that bacterial melanin (BM) had a bacteriostatic effect on some gram-negative enterobacteria. The neuroprotector effect of BM was demonstrated on experimental animals.

*Bacillus thuringiensis* – water-soluble bacterial melanin –  
bacteriostatic effect – neuroprotector effect

Меланины различного происхождения обладают уникальными физико-химическими свойствами, которые обуславливают их фотопротекторную, генопротекторную, сорбционную и другую активность [3, 5, 7, 10, 11]. Специфическое строение молекулы меланинов, способствующее проявлению полифункциональных свойств пигментов, обеспечивает надежную защиту клеточных систем от экзогенных факторов мутагенной и канцерогенной природы [5]. Генерализованное поглощение в широком диапазоне длин волн в

сочетании с антиоксидантными свойствами обеспечивает значительное уменьшение токсического действия УФ-излучения [7]. Высокое содержание парамагнитных центров позволяет меланинам дезактивировать природные радикалы, образующиеся в ряде физических и химических процессов за счет большой электронно-абсорбционной емкости этих соединений [5].

В НППЦ “Армбиотехнология” НАН РА на основе мутантного штамма *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* K1 (BTGK1) был получен водорастворимый меланин, обладающий высокой биологической активностью [1]. Были определены некоторые физико-химические свойства полученного меланина (элементный состав, эмпирическая формула, ИК-спектры, ЭПР-спектры, молекулярная масса и др.) [8, 9].

Целью настоящей работы являлось изучение бактериостатического и бактерицидного действия водорастворимого меланина на прокариотические тест-объекты, определение его антиоксидантной активности, а также нейропротекторное влияние БМ на животных (белые крысы).

**Материал и методика.** Для получения БМ в работе использован штамм *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* 696K1 (Sac-, Nic-, pig, коллекционный номер по ЦДМ ИНМИА 11212).

Ферментацию проводили в колбах Эрленмейера емкостью 500 мл с 50-70 мл разработанной нами среды следующего состава, %: пшеничные отруби – 1,5; гидролизат рыбной муки – 4; NaCl – 0,2 и CaCl<sub>2</sub> – 0,05, на качалке со скоростью вращения 220 об/мин, при температуре 32°C в течение 72 ч. В качестве посевного материала для ферментации использовали суспензии клеток культур, полученные методом смыва со скошенного мясопептонного агара после выращивания штаммов в течение 48 ч.

Уровень пигментообразования оценивали по интенсивности окрашивания ростовой среды спектральным методом на спектрофотометре Perkin Elmer 550S UV-VIS (США) при длине волны  $\lambda = 315$  нм. В качестве контроля использовали водный раствор (рН 9,0) синтетического меланина (Sigma).

Выделение из супернатанта культуральной жидкости БМ проводили сорбционным методом. Освобождение от пирогенов и других микропримесей элюата проводили ультрафильтрацией с дальнейшим вакуум упариванием [2, 9].

Изучение бактериостатического и бактерицидного действия водорастворимого БМ проводили на грамотрицательных бактериях: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas putida* и грамположительных бактериях: *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* и *Corynebacterium glutamicum*.

Определение влияния различных концентраций меланина (0,45%; 0,9%; 1,8%; 4,5%) на рост бактерий проводили в условиях выращивания их на плотных и жидких полноценных средах. Концентрации меланина были выбраны с учетом значений концентраций меланина, проявляющих биологическую активность [6].

Для исследования нейропротекторного влияния БМ как у контрольных (n=6), так и у экспериментальных животных (n=6) была удалена сенсомоторная кора. У всех животных (белые крысы массой тела 180-220 гр) заранее был выработан условный рефлекс балансирования. Экспериментальным животным был введен раствор БМ в концентрации бмг/мл из расчета 170 мг/кг. В течение месяца определялось восстановление инструментального условного рефлекса (ИУР).

Статистическую обработку полученных данных проводили по Берстейну [4]. Статистические параметры (средняя величина, стандартное отклонение), используемые в экспериментах, вычислены также при помощи программы Excel.

**Результаты и обсуждение.** Для характеристики полученного нами БМ целесообразным являлось изучение его бактериостатического и бактерицидного действия.

На основании полученных результатов было сделано заключение, что БМ в испытанных концентрациях не оказывал бактерицидного действия на тест-микроорганизмы. Наличие у исследуемых энтеробактерий зон угнетения или слабого остаточного роста вокруг капли меланина в концентрации 4,5 % указывало на бактериостатическое действие меланина на грамотрицательные тест-бактерии.

Из результатов, приведенных в табл. 1, видно, что меланин в концентрации 0,9 % не оказывает влияния на рост исследуемых бактерий, а в концентрации 4,5% не влияет на рост грамположительных коринеформных бактерий, но оказывает бактериостатическое действие на некоторые грамотрицательные энтеробактерии.

**Таблица 1.** Действие БМ на грамотрицательные и грамположительные бактерии

Штамм	Исходный титр, клеток/мл	Титр культур через 24 ч		
		без меланина	0,9 % меланина	4,5 % меланина
<i>E. coli K-12</i>	$8,9 \cdot 10^8$	$4,4 \cdot 10^9$	$5,0 \cdot 10^9$	$6,1 \cdot 10^8$
<i>P. putida</i>	$6,3 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^9$	$3,7 \cdot 10^9$	$4,5 \cdot 10^7$
<i>S. typhimurium Г-38</i>	$2,4 \cdot 10^8$	$5,5 \cdot 10^9$	$5,1 \cdot 10^9$	$4,5 \cdot 10^8$
<i>B. lactofermentum</i>	$9,8 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^9$
<i>B. flavum</i>	$2,3 \cdot 10^8$	$7,9 \cdot 10^9$	$6,3 \cdot 10^9$	$7,8 \cdot 10^9$
<i>C. glutamicum</i>	$4,1 \cdot 10^8$	$6,7 \cdot 10^9$	$6,4 \cdot 10^9$	$5,6 \cdot 10^9$

Было изучено также нейропротекторное действие БМ на животных. В опытах было показано, что полное восстановление движения у интактных крыс наступает через 10-12 суток после унилатерального удаления сенсомоторной коры, а у экспериментальных животных после введения низкой концентрации (6 мг/мл) раствора БМ приводит к достоверному ( $p < 0,001$ ) уменьшению времени восстановления ИУР (6 суток).

**Таблица 2.** Сроки восстановления ИУР у крыс с унилатеральным удалением сенсомоторной коры у контрольной (А) и у экспериментальной групп (Б).

Группы животных		Время восстановления ИУР после удаления сенсомоторной коры, экспериментальные дни	Время восстановления движения задней конечности после удаления сенсомоторной коры, экспериментальные дни
<b>А</b>	Контрольная группа ( $n = 6$ )	$16 \pm 2,2$	Нет полного восстановления
<b>Б</b>	Экспериментальная - введение раствора БМ 6 мг/мл ( $n = 6$ )	$5,8 \pm 1,03$	$10,2 \pm 2,3$

Такие значительные изменения наступают благодаря усилению трофики нервной ткани под действием БМ, когда усиливается процесс спраутинга [12].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что БМ обладает бактериостатическим свойством по отношению к некоторым

грамотрицательным энтеробактериям. Показано также нейропротекторное влияние БМ на животных (белые крысы).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Հովսեփյան Ա., Աղաջանյան Ա., Գարաբեկով Բ., Սաղյան Ա., Չախալյան Ա., Քելեջյան Ա., Չիլ-Հակոբյան Լ., Հովհաննիսյան Գ., Միրաբեյլյան Ն., Ավետիսյան Ս. Մանրագրային հանրագրով ջրալուծելի մելանինի ստացման եղանակ: ՀՀ Արտոնագիր № 1385 А2, 2003:
2. Агаджанян А.Е. Хроматографическая очистка водорастворимого меланина из ферментационного раствора и изучение некоторых его свойств, Биотехнология, 1, с.36–42, 2006.
3. Барабой В.А. Меланин: структура, биосинтез, биологические функции. Укр. биохим. ж., 71, 4, с. 5-14, 1999.
4. Бернштейн А.Л. Справочник статистических решений. М., Статистика, 162 с. 1968.
5. Борщевская М.И., Васильева С.М. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов. Вопросы медицинской химии, 45, 1, с. 13-24, 1999.
6. Меликсетян И.Б., Геворкян О.В., Овсепян А.С., Аветисян С.В. Морфофункциональное изучение влияния ВТ-меланина на пластичность мозга. Структурно-функциональные и нейрохимические закономерности ассиметрии и пластичности мозга. Всероссийская конференция с международным участием. Сборник материалов, Москва: ИКАР, с. 178-182, 2005.
7. Новиков Д.А., Курченко В.П., Азарко И.И. Фотопротекторные свойства меланинов из винограда и черного чая. Радиационная биология. Радиэкология, 41, 6, с. 664-670, 2001.
8. Aghajanyan A.E., Hambardzumyan A.A., Hovsepyan A.S., Asaturian R.A., Vardanyan A.A. Saghiyan A.S. Isolation and Purification of Water-Soluble Bacillus thuringiensis Melanin and its Physicochemical Characterization. Pigment Cell Res., 18, 2, p. 130-135, 2005.
9. Aghajanyan A.A., Asaturian R.A., Hambardzumyan A.A., Sargsyan L.B., Hovsepyan A.S., Vardanyan A.H. and Saghiyan A.S. Obtaining of Water Soluble Microbial Melanin and Study of its Some Properties. Prikl. Biokhim. Mikrobiol., 47, 5, p. 555-557, 2011.
10. Butler M.J., Day A.W. Fungal melanins: a review. Can. J. Microbiol., 44, 12, p. 1115-1136, 1998.
11. Fogarty R.V., Tobin J.M. Fungal melanins and their interactions with metals. Enzyme Microb. Technol., 19, 4, p. 311-317, 1996.
12. Murakami F., Higashi S., Katsumaru H., Od Y. Formation of new corticorubral synapses as a mechanisms for classical conditioning in the cat. Brain Res., 437, 3, p. 319-382, 1987.

Поступила 02.09.2014