

Биология

УДК 581.3

Н. Ж. СААКЯН, М. Т. ПЕТРОСЯН

ИЗУЧЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ИНГИБИРУЮЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ
ИЗОЛИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ ЖИВУЧКИ ЖЕНЕВСКОЙ
(*AJUGA GENEVENSIS* L.)

Выявлена высокая антибактериальная активность экстрактов из каллусных культур *A. genevensis*. Определены характер этой активности и минимальная ингибирующая концентрация изучаемых экстрактов в отношении *E. coli*.

Введение. Одним из значительных достижений медицины является открытие антибиотиков, но неконтролируемое или необдуманное использование бактерицидных веществ приводит ко все большему усугублению проблемы антибиотикорезистентности. Формирование природной или приобретенной резистентности микроорганизмов к тому или иному препарату обусловлено генетически – приобретением новой генетической информации или изменением уровня экспрессии собственных генов. Это вызывает необходимость искать новые, более эффективные препараты [1].

Растения вырабатывают широкий спектр вторичных метаболитов, которые обеспечивают им биологическую защиту против микробов и насекомых. Некоторые из этих веществ могут быть токсичны и для животных [2]. Одной из главных составляющих биологической активности природных соединений является их антимикробная активность, которая и служит мишенью для исследований в поиске новых противомикробных препаратов.

Механизм действия летучих противомикробных веществ заключается в том, что они вызывают разнообразные изменения микробной клетки: подавляют ее дыхание, растворяют и разрушают поверхностные слои и составные части протоплазмы (ферменты и др.). Они не позволяют микроорганизмам создавать собственные механизмы защиты. Существенно, что при этом генетический аппарат микроорганизмов не изменяется, то есть эти вещества не обладают мутагенными свойствами. Следовательно, широкое использование растительных выделений не способствует селекции видоизмененных, устойчивых форм бактерий [3, 4].

В литературе встречаются данные об антимикробной активности таких соединений, как липиды, различные вещества стероидной природы, вещества

нестероидной природы (шиконин, аллицин, берберин, госсипол, хинин, рицин и др.), терпеновые соединения и эфирные масла, алифатические соединения, сапонины, алкалоиды и хиноны, полифенолы, кумарины, флавоноиды и др. [2–4]. Наряду с этим ряд авторов отмечает, что некоторые вещества обладают этим свойством только в условиях взаимодействия с другими соединениями [4, 5], что значительно осложняет получение этих веществ синтетическим путем.

К настоящему времени из высших растений выделено более 700 антибиотических веществ, способных подавлять развитие бактерий, вирусов, угнетать рост опухолевых клеток. По своему химическому строению они относятся к различным группам соединений.

Согласно литературным данным, род *Ajuga* семейства *Lamiaceae* обладает довольно высокой метаболической активностью. Многие его виды вырабатывают цитотоксичные [6–10], противооплазмодийные [11], инсектицидные [12], антибактериальные [9], противовирусные [13], антимикобактериальные [8] вещества. Описанные в Армении виды этого рода, распространенные в различных районах [14], с медицинской точки зрения имеют большое значение. Так, *A. genevensis* содержит иридоиды, флавоноиды, гликозиды, терпеноиды, дубильные вещества, стероиды, обладает противовоспалительным, гемостатическим, ранозаживляющим свойствами [14–16]. Поэтому мы сочли целесообразным изучение биологической активности экстрактов из полученной нами ранее культуры *in vitro* *A. genevensis* [17].

Методы исследования. Каллусную биомассу высушивали при 70°C в течение 12–16 ч. При таких условиях сушки возможность потери интересующих нас метаболитов сводится к минимуму благодаря инаktivации ферментов.

Для приготовления экстракта 1 г высушенной биомассы экстрагировали 10 мл дистиллированной воды в течение 20 ч на магнитной качалке при температуре 4°C. Затем, образованная суспензия центрифугировалась в течение 10 мин (5000 об/мин), после чего надосадочная жидкость подвергалась выпариванию на водяной бане (40°C) до получения экстракта объемом в 1 мл. Стерилизацию экстрактов проводили с помощью бактериальных фильтров однократного использования (“Sigma”, США).

Концентрация экстракта, при воздействии которой не наблюдается прироста бактериальной биомассы и питательная среда остается прозрачной, называется минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) [18, 19]. Она определялась по следующей схеме: в несколько пробирок, содержащих одинаковый объем питательной среды (мясопептонный бульон, МПБ), инокулированной тест-бактерией *Escherichia coli*, шт. 5009 (10^3 – 10^6 бакт. на 1 мл), добавлялся исследуемый экстракт с уменьшающейся концентрацией: 200; 100; 50; 25 и 12,5 мкл экстракта на 1 мл бактериальной суспензии. Результаты оценивали через 24 ч инкубации при 36–37°C по накоплению бактериальной биомассы в МПБ измерением оптической плотности (ОП) на спектрофотометре СФ–26 (Россия) при длине волны $\lambda=560$ нм.

Необходимую концентрацию суспензии тест-организма получали методом серийных разведений [18].

Статистическую обработку данных проводили по Меркурьевой [20].

Для понимания механизма действия антибактериального вещества изучаемого экстракта исследовалось его влияние на искусственные двух-слойные липидные мембраны в двух направлениях: с учетом этого влияния на сопротивляемость мембран (при различных концентрациях экстрактов) и на продолжительность жизни мембран (при напряжении 400 мВ).

Для установления времени воздействия экстрактов на тест-микрорганισμό исследуемый экстракт с минимальной ингибирующей концентрацией добавлялся в бактериальную суспензию и в течение инкубации на спектрофотометре определялся прирост бактериальной биомассы через каждые 20 мин (см. рисунок).

Результаты и обсуждение. Ранее нами было установлено, что каллусные культуры из *A. genevensis* L. проявляли высокую антибактериальную активность в отношении различных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [21]. Для оценки реального воздействия изучаемых экстрактов была определена их МИК в отношении условно-патогенного микроорганизма *E. coli*. Исследовались экстракты двадцатидневных каллусных культур, поскольку именно в экспоненциальной фазе роста (на 19–20-й день) синтез веществ с противомикробной активностью достигал максимума [22].

Воздействие различных концентраций экстракта из каллуса A. genevensis L. на оптическую плотность бактериальной суспензии

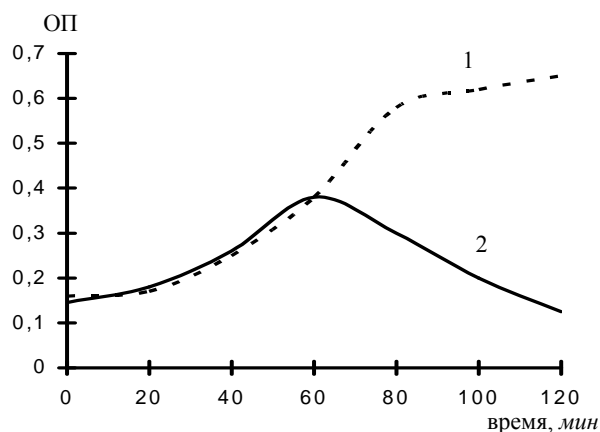
Концентрация экстракта в бакт. суспензии, мкл/мл	Оптическая плотность			
	опытная исходная	опытная, после 24-часовой инкубации	контрольная исходная	контрольная, после 24-часовой инкубации
200	0,21 ± 0,012	0,09 ± 0,005	0,070 ± 0,003	0,33 ± 0,01
100	0,13 ± 0,01	0,07 ± 0,005	0,074 ± 0,004	0,34 ± 0,015
50	0,23 ± 0,008	0,24 ± 0,01	0,080 ± 0,005	0,45 ± 0,010
25	0,10 ± 0,01	0,46 ± 0,006	0,075 ± 0,004	0,43 ± 0,01
12,5	0,10 ± 0,01	0,53 ± 0,015	0,070 ± 0,001	0,41 ± 0,005

Примечание: в контрольных вариантах экстракты с антибактериальной активностью были заменены МПБ в объемах, соответствующих объемам экстрактов в каждом варианте. Большая величина ОП в опытных исходных вариантах обусловлена коричневатым оттенком внесенного экстракта.

Исследования показали (см. таблицу), что в контрольных вариантах в течение 24-часового культивирования ОП бактериальной биомассы увеличилась в среднем в 5–6 раз. Примерно пятикратное увеличение бактериальной биомассы наблюдалось при введении экстракта в двух наименьших концентрациях: 12,5 и 25 мкл/мл. В опытных вариантах значения ОП либо не менялись (при концентрации экстракта 50 мкл/мл), либо снижались почти вдвое (100 и 200 мкл/мл). Таким образом, было установлено, что МИК соответствует концентрации экстракта 50 мкл/мл, т.к. при ней величина ОП суспензии после 24-часовой инкубации оставалась неизменной.

Для выявления характера действия экстракта на тест-микрорганισμό микробную массу, подвергнутую действию экстракта, переносили на свежую питательную среду, где бактерии начинали размножаться. Следовательно, можно сделать вывод, что влияние экстракта на микробную клетку имеет бактериостатический характер.

Для установления времени воздействия исследуемого экстракта на бактериальную клетку использовался экстракт в его минимальной ингибирующей концентрации. Исследования проводились на 24-часовой культуре *E. coli*, шт. 5009, одна колония которой была суспендирована в 10 мл МПБ и активирована на качалке в течение 1,5 ч при 37⁰С. Образованная суспензия центрифугировалась в течение 5 мин (8000 об/мин), осадок был ресуспендирован в 0,9% растворе NaCl. Экстракт добавлялся в полученную бактериальную суспензию и в течение инкубации определялся прирост бактериальной биомассы через каждые 20 мин (см. рисунок).



Влияние экстракта из каллусов *A. genevensis* L. на бактериальную суспензию в период культивирования:
1 – контроль; 2 – опыт.

ную суспензию и в течение инкубации определялся прирост бактериальной биомассы через каждые 20 мин (см. рисунок).

Исследования выявили, что если в контрольном варианте наблюдался равномерный рост бактериальной биомассы в течение почти всего периода культивирования, то в опытном варианте уже через 60 мин оптическая плотность резко падала, а через 120 мин достигала исходной отметки. Это показывает, что

антибактериальное влияние экстракта наступает уже через 60 мин.

Исследования на искусственных двухслойных липидных мембранах показали, что вещество с антимикробной активностью не влияет на сопротивляемость мембран, а только сокращает продолжительность их жизни примерно в три раза при напряжении 400 мВ.

Была исследована также термостойкость антибактериального вещества. Выяснилось, что активность экстракта сохранялась при нагревании до 50–60⁰С, а оптимальное значение его рН соответствовало 5,5–6.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о перспективности использования исследуемой нами культуры *A. genevensis* L. *in vitro* как потенциального протектора в профилактике различных бактериальных инфекций.

Кафедра микробиологии и биотехнологии
микроорганизмов и растений

Поступила 07.06.2009

ЛИТЕРАТУРА

1. Никитина В.С., Кузьмина Л.Ю., Мелентьев А.И., Шендель Г.В. Прикладная биохимия и микробиология, 2007, т. 43, № 6, с. 705–712.
2. Фитоэкдистероиды. Под ред. В.В. Володина. С.-Пб.: Наука, 2003, 293 с.
3. Wallace R.J. Proceeding of the Nutrition Society, 2004, v. 63, p. 621–629.
4. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Наука, 2004, 525 с.
5. Филиппова В. Особенности вторичного метаболизма в культурах растительных клеток. 2001, <http://www.komisc.ru>
6. Akbay P., Calis I., Heilmann J., Sticher O. Naturforsch., 2003, v. 58, № 3–4, p. 177–180.

7. Ben Jannet H., Hazallah-Skhiri F., Mighri Z., Blaney W.M. *Fitoterapia*, 2000, v. 71, № 2, p. 105–120.
8. Cantrel C.L., Rajab M.S., Franzblau S.G., Fronczek F.R. *Planta Med.*, 1999, v. 65, № 8, p. 732–734.
9. Chen H., Tan RX., Liu ZL., Zhao Cy., Sun J. *Acta Crystallogr. C.*, 1997, № 53 (Pt 6), p. 814–816.
10. Dinan L., Whiting P., Bourne P., Coll J. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 2001, v. 1, № 11, p. 1077–1082.
11. Kuria K.A., De Coster S., Muriuki G., Masengo W., Hoogmartens J., Laekeman G.M. *Ethnopharmacol.*, 2001, v. 74, № 2, p. 141–148.
12. Fujimoto Y., Morisaki M., Ikekawa N. *Yakugaku Zasshi.*, 2000, v. 120, № 10, p. 863–873.
13. Tang X., Chen H., Zhang X., Quan K., Sun M. *Tradit. Chin Med.*, 1994, v. 14, № 1.
14. Золотницкая С.Я. Лекарственные ресурсы флоры Армении. Т. 2. Ер.: Изд-во АН Арм. ССР, 1965, с. 222–223.
15. Соколов П.Ф. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Л.: Наука, 1974, 402 с.
16. Тахтаджян А.Л. Жизнь растений. Т. 5, ч. 2. М.: Просвещение, 1981, с. 404–412.
17. Саакян Н.Ж., Агаджанян Дж.А., Петросян М.Т., Попов Ю.Г. Ученые записки ЕГУ, 2007, № 2, с. 96–100.
18. Руководство к практическим занятиям по микробиологии, 2-е издание (под ред. Н.С. Егорова). М.: Изд-во МГУ, 1971, 221с.
19. Ланчини Д., Паретти Ф. Антибиотики. Гл. II. М.: Мир, 1985, 269 с.
20. Меркурьева Е.К. Основы биометрии. М.: Изд-во МГУ, 1963, 300 с.
21. Саакян Н.Ж., Петросян М.Т., Агаджанян Дж.А. Биол. журн. Армении, 2008, № 1–2, с. 60–65.
22. Sahakyan N.Zh., Petrosyan M.T., Volodin V.V., Volodina S.O., Aghajanyan J.A., Popov Yu.G. *The New Armenian Medical Journal*, 2008, v. 2, № 4, p. 65–74.

Ն. Ժ. ՍԱՀԱԿՅԱՆ, Մ. Թ. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ

ԺՆԵՎՅԱՆ ԴԱՆԿԵՈՏԻ (*AJUGA GENEVENSIS* L.) ՄԵԿՈՒՍԱՅՎԱԾ ԿՈՒՆՏՈՒՐԱՅԻ ՆՎԱԶԱԳՈՒՅՆ ԱՐԳԵԼԱԿՈՂ ԿՈՆՑԵՆՏՐԱՅԻԱՅԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ամփոփում

Բացահայտվել է *Ajuga genevensis* L.-ի կալուսային կուլտուրայից ստացված լուծամզվածքների բարձր հակաբակտերիական ակտիվությունը, որոշվել է ուսումնասիրվող լուծամզվածքների արգելակման նվազագույն կոնցենտրացիան *E. coli*-ի նկատմամբ և դրանց հակաբակտերիական ակտիվության բնույթը:

N. Zh. SAHAKYAN, M. T. PETROSYAN

STUDY OF THE MINIMAL INHIBITED CONCENTRATION OF ISOLATED CULTURE OF BUGLEWEED (*AJUGA GENEVENSIS* L.)

Summary

The antibacterial activity of extractions from *calli* cultures of *Ajuga genevensis* L. was revealed. The character of antibacterial activity and the minimal inhibiting concentration of studied extractions towards *E. coli* was determined.