

Amber Drug

Autor: Igor Kaczmarczyk

Absolwent III Liceum Ogólnokształcącego im. Marynarki Wojennej RP w Gdyni

Opiekun: dr Magdalena Cichowicz - Cieślak, Pomorski Park Naukowo Technologiczny w Gdyni

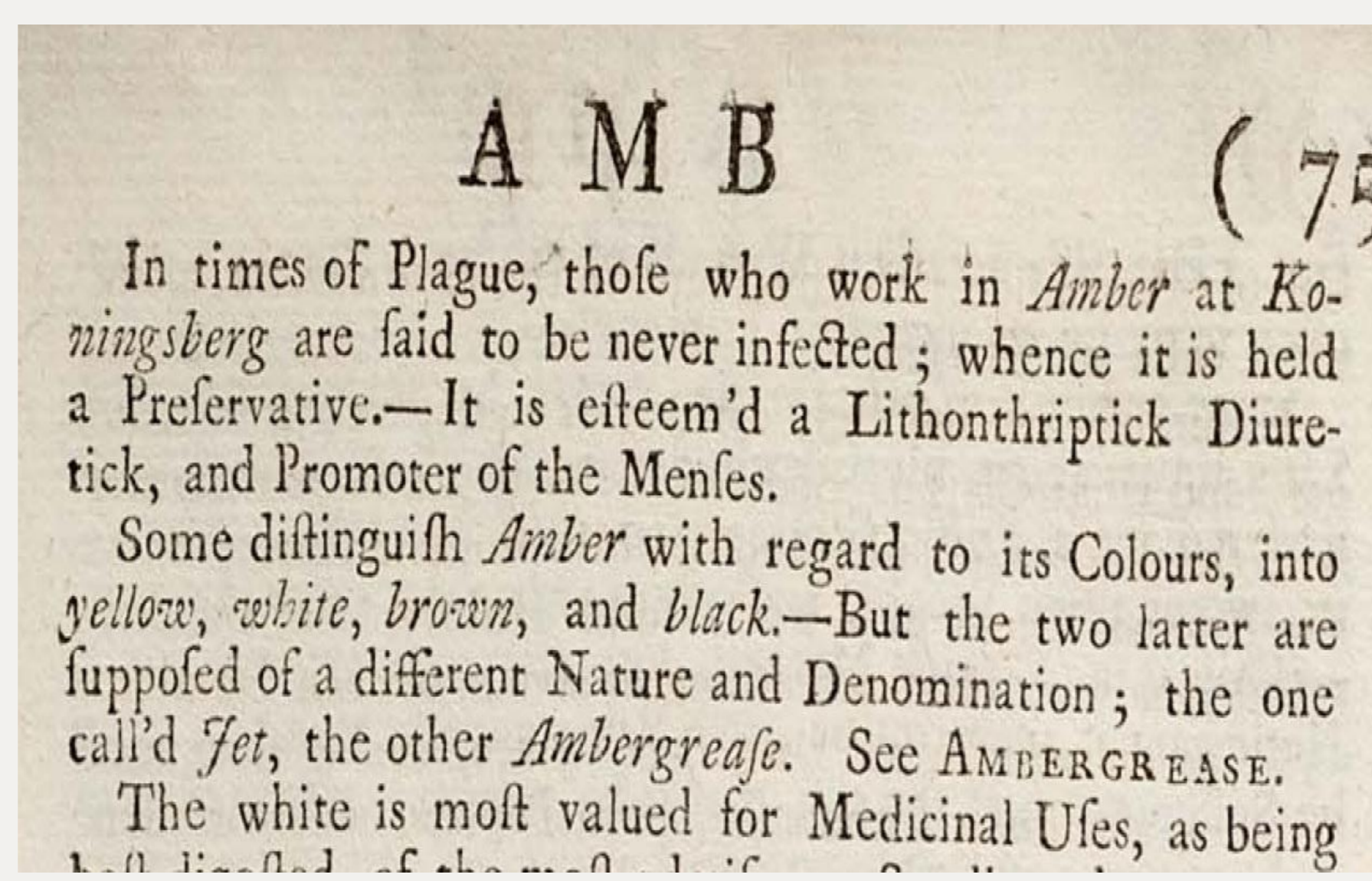
Streszczenie

Projekt opiera się na szerokim studium wpływu ekstraktów z żywic kopalnych (bursztyń bałtycki, bursztyń meksykański, cedaryt – kredowy bursztyń kanadyjski) oraz subfosylnych (gedanit, kopal kolumbijski) na wzrost wybranych mikroorganizmów. W toku badań został wyselekcjonowany ekstrakt, który wykazuje silne właściwości bakteriobójcze w kierunku bakterii Gram dodatnich (*Staphylococcus aureus* - szczep wzorcowy z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów oraz szczep lekooporny - MRSA; *Bacillus subtilis*; *Enterococcus faecalis*). Określono wskaźnik MIC (ang. *minimal inhibitory concentration*) ekstraktu dla wybranych szczepów mikroorganizmów. Udowodniono, że czysty kwas 1,4-butanodiowy wykryty w ekstrakcie podczas analiz HPLC-QToF-MS ma hamujący wpływ na wzrost wszystkich badanych mikroorganizmów, na podstawie czego wnioskuje się iż kwas 1,4-butanodiowy jest jedną z substancji mających kluczowe znaczenie w bakteriobójczej aktywności bursztyń bałtyckiego. Informacje uzyskane w toku badań dają duże nadzieje na możliwe zastosowanie opracowanych ekstraktów w leczeniu zakażeń lekoopornymi bakteriami (m.in. *S.aureus* – przyp.) będących coraz większym problemem medycyny, poprzez aplikację do konwencjonalnych środków powierzchniowo czynnych oraz nowej generacji materiałów opatrunkowych ze stopniowanym systemem uwalniania substancji.

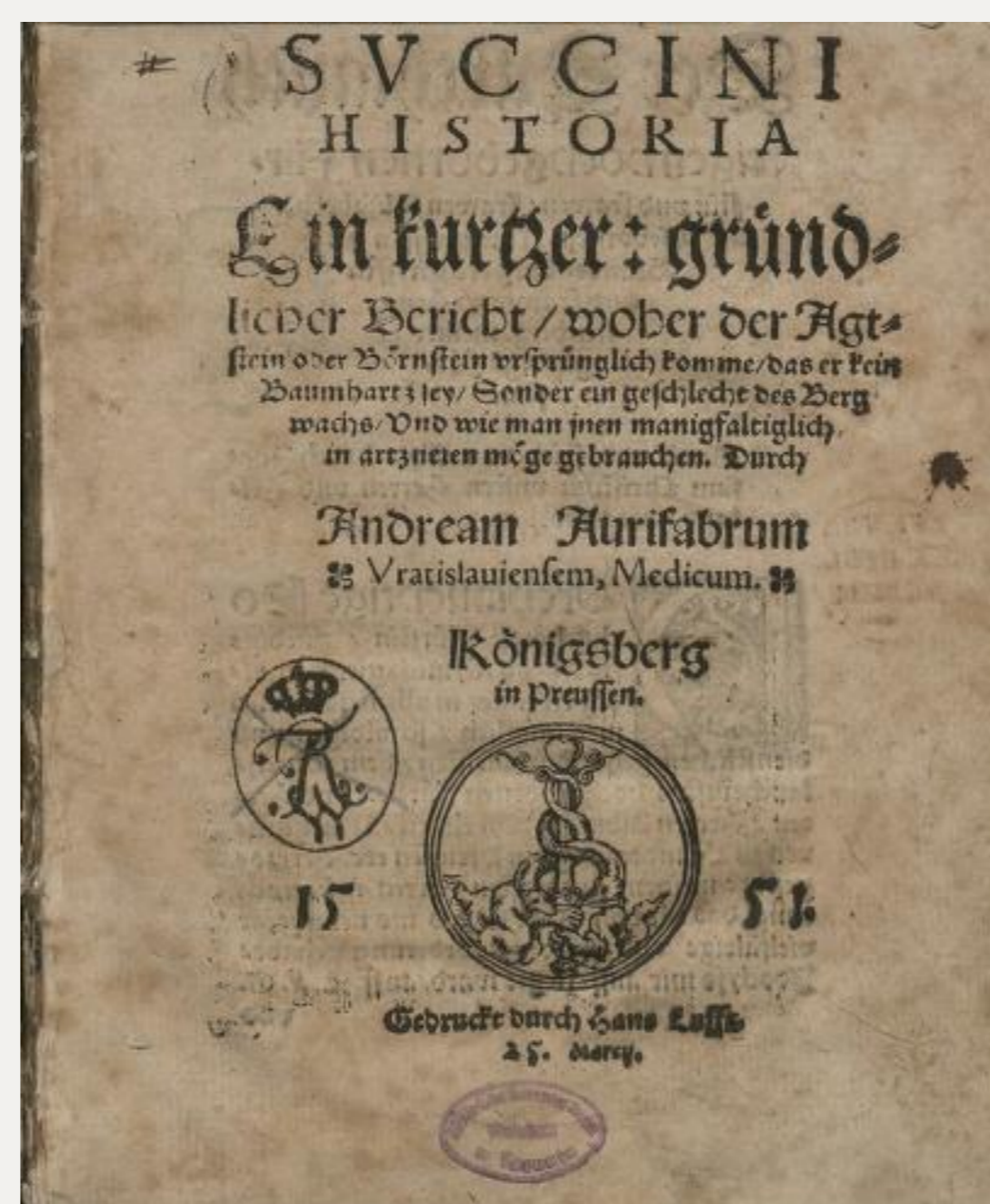
Rys historyczny

Według danych historycznych, najstarsze ozdoby i amulety wykonane z bursztyń bałtyckiego pochodzą z paleolitu. Bursztyń bałtycki towarzyszy ludziom niemalże od zawsze. Poza swoim pięknem budził ciekawość ze względu na właściwości elektrostatyczne ale też doszukiwano się w nim leku na wiele chorób. W podaniach ludowych z pokolenia na pokolenie przekazywane były informacje o leczniczych - wręcz magicznych właściwościach bursztyń bałtyckiego.

Przez wieki *sukcynit* w postaci surowych, nieoszlifowanych bryłek, pyłu, okładów, maści czy nalewki stosowano na wiele chorób: od tych pochodzenia bakteryjnego np. dżuma, do schorzeń reumatycznych i chorób układu nerwowego (Duffin, 2015). Wzmiankę o leczniczych właściwościach sukcyntu podczas epidemii dżumy znajdziemy także w dziele angielskiego encyklopedysty Ephraim'a Chambers'a z 1728 roku (Chambers, 1728) [Ryc. Nr 1]. O ile w kwestii badań geologicznych, fizycznych oraz chemicznych powstało wiele współczesnych opracowań szeroko poruszających tematykę bursztyń, o tyle ciekawym jest że kulturowane przez wieki podania ludowe i wierzenia na temat leczniczych właściwości bursztyń opracowywane są w ramach publikacji z dziedziny historii dopiero w XXI wieku a wiele z nich – jak zastosowanie nalewek czy produktów destylacji bursztyń czeka jeszcze na zebranie w jedno miejsce (Duffin, 2015). Wiele dzieł poruszających tematykę leczniczych właściwości *sukcynitu* zostało zapomnianych i czeka na tłumaczenie (Aurifaber, 1551) [Ryc. Nr 2].



Ryc. Nr 1 Fragment encyklopedii E. Chambersa



Ryc. Nr 2 Strona tytułowa dzieła A. Aurifabera

Inspiracja

1. **Brak współczesnych danych naukowych w obszarze aktywności biologicznej bursztyń bałtyckiego.** → Postanowiono zweryfikować wielowiekowe wierzenia ludowe za pomocą nowoczesnej aparatury laboratoryjnej.

2. **Rosnący problem lekooporności bakterii chorobotwórczych** → potrzeba poszukiwania nowych rozwiązań i środków skutecznych w leczeniu oraz przydatnych w kwestii zrozumienia mechanizmów nabywania przez bakterie oporności na leki.

Cel badań

Celem projektu jest **zbadanie** wpływu ekstraktów z bursztyń bałtyckiego oraz wyodrębnionych substancji potencjalnie w nich występujących na wybrane mikroorganizmy (m.in. chorobotwórcze) oraz **wykrucie** substancji czynnych występujących w ekstraktach. Podjęto się sprawdzenia korelacji między obecnością w korze bursztyń bałtyckiego dużych ilości kwasu 1,4-butanodiowego a rzeczywistymi właściwościami bakteriobójczymi ekstraktów pozyskanych z bursztyń niepozabawionego zwierzeliny – tzw. kory. Celem było również zbadanie, czy ekstrakty z innych żywic kopalnych oraz żywic subfosylnych wykazują aktywność biologiczną wobec mikroorganizmów.

Hipoteza

Ekstrakty z bursztyń bałtyckiego wykazują aktywność bakteriobójczą

Metody

Do przygotowania ekstraktów wykorzystywano następujące rozpuszczalniki: DMSO (dimetylosulfotlenek), etanol, aceton, chloroform.

Badaniom poddano wodny roztwór kwasu 1,4-butanodiowego.

Wpływ substancji na mikroorganizmy badano za pomocą następujących metod:

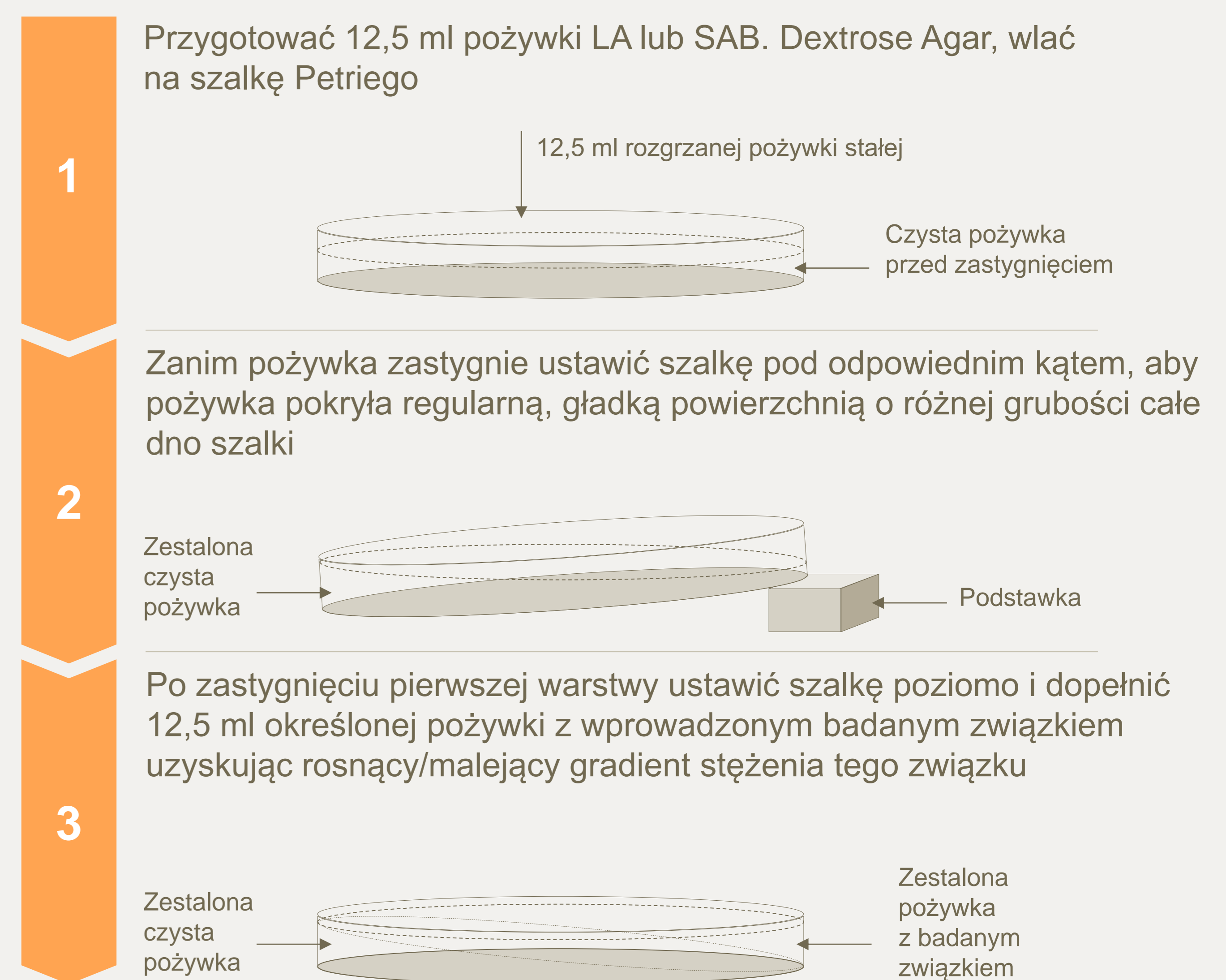
→ **Metoda dyfuzyjno – krążkowa** (Kirby – Bauera)

→ **Metoda seryjnych mikro-rozcieńczeń** (na płytce titracyjnej 96-dółkowej)

→ **Metoda płytek gradientowych** (Ryc. Nr 3)

W celu badania jakościowego składu ekstraktu wykorzystano następującą metodę:

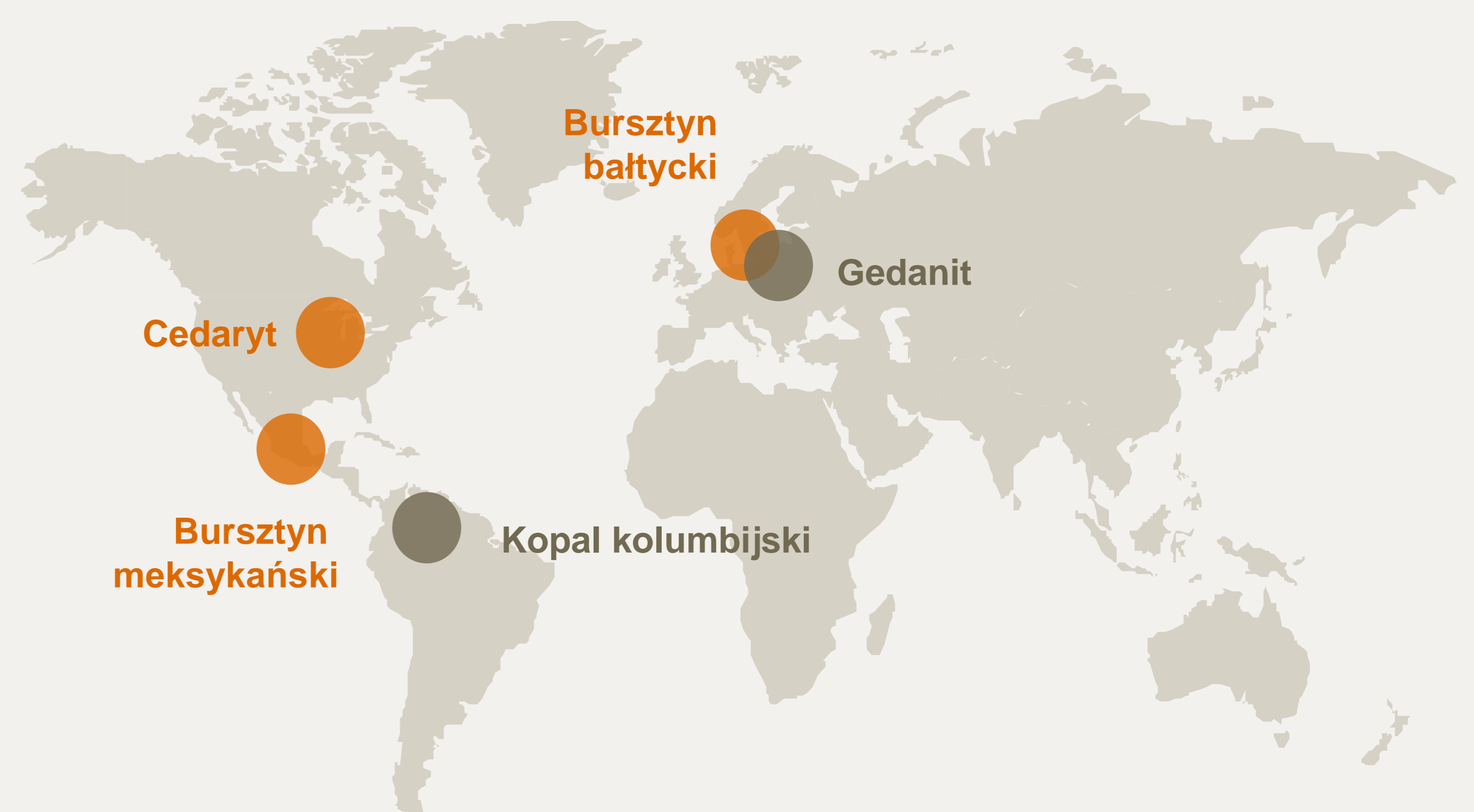
→ **Wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (HPLC-QToF-MS)**



Ryc. Nr 3 Procedura przygotowania „płytek gradientowych” – z liniową zmianą stężenia badanej substancji.

Materiały

Ryc. Nr 4 Żywice kopalne wykorzystane w badaniach – lokalizacja złóż



● Kopalne ● Subfosylne

W badaniach wykorzystywano następujące szczepy bakteryjne:

- *S. aureus* PCM2602, Methycillin Resistant *S. aureus*,
- *E. coli* PCM 2561,
- *P. aeruginosa* PCM2562,
- *B. subtilis*,
- *E. faecalis*;

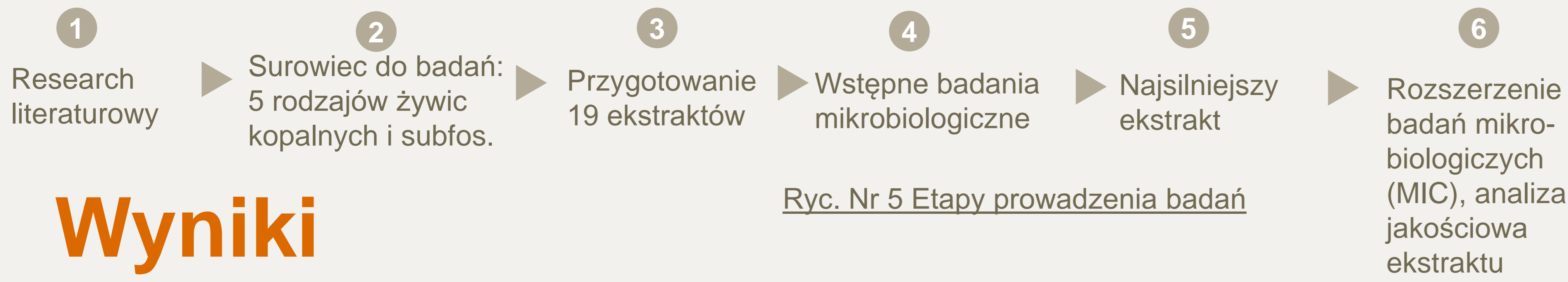
Oraz szczep grzybowy: *C. albicans* PCM2566

Współpraca



Badanie wpływu ekstraktów z żywic kopalnych i subfosylnych oraz kwasu 1,4-butanodiowego na wybrane mikroorganizmy

Przebieg badań

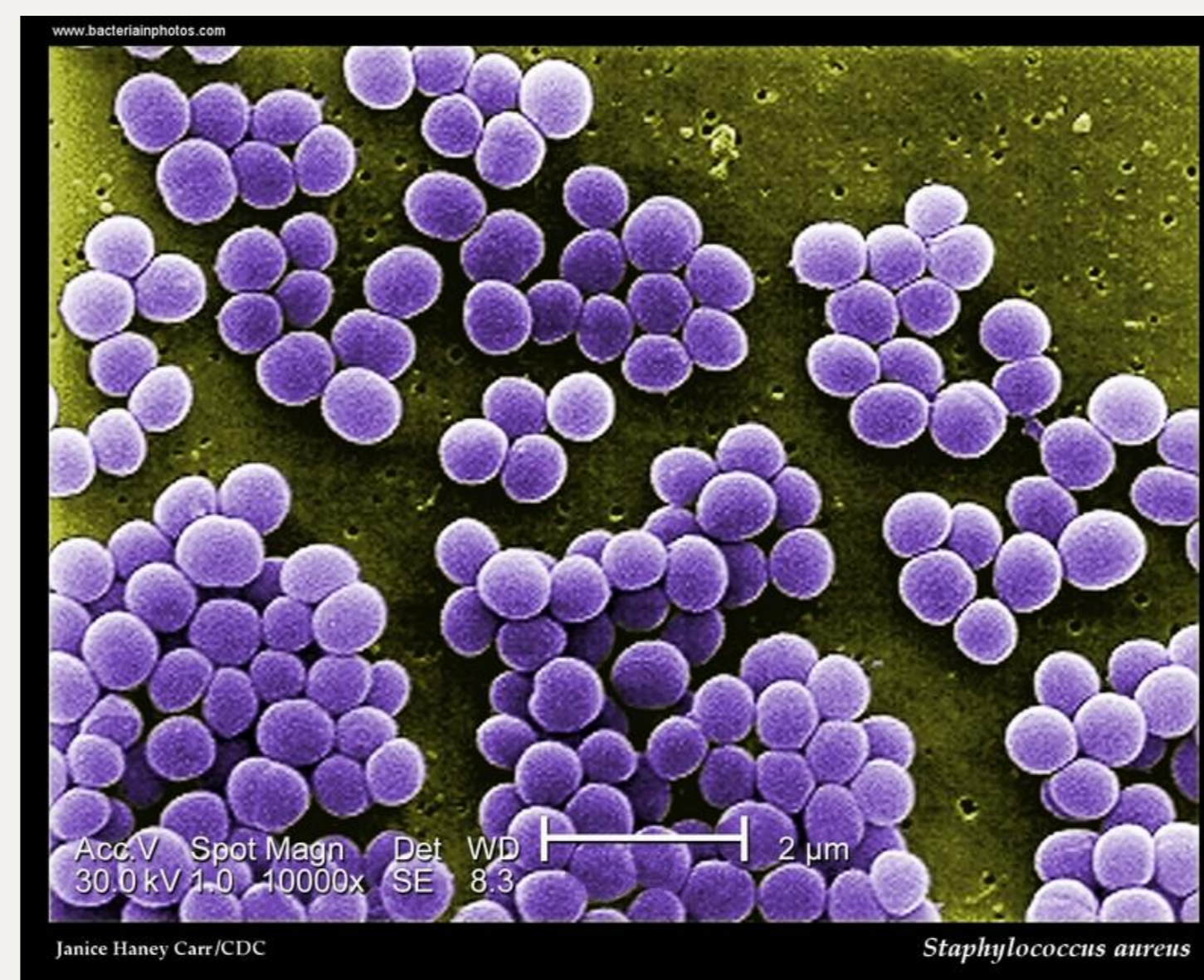
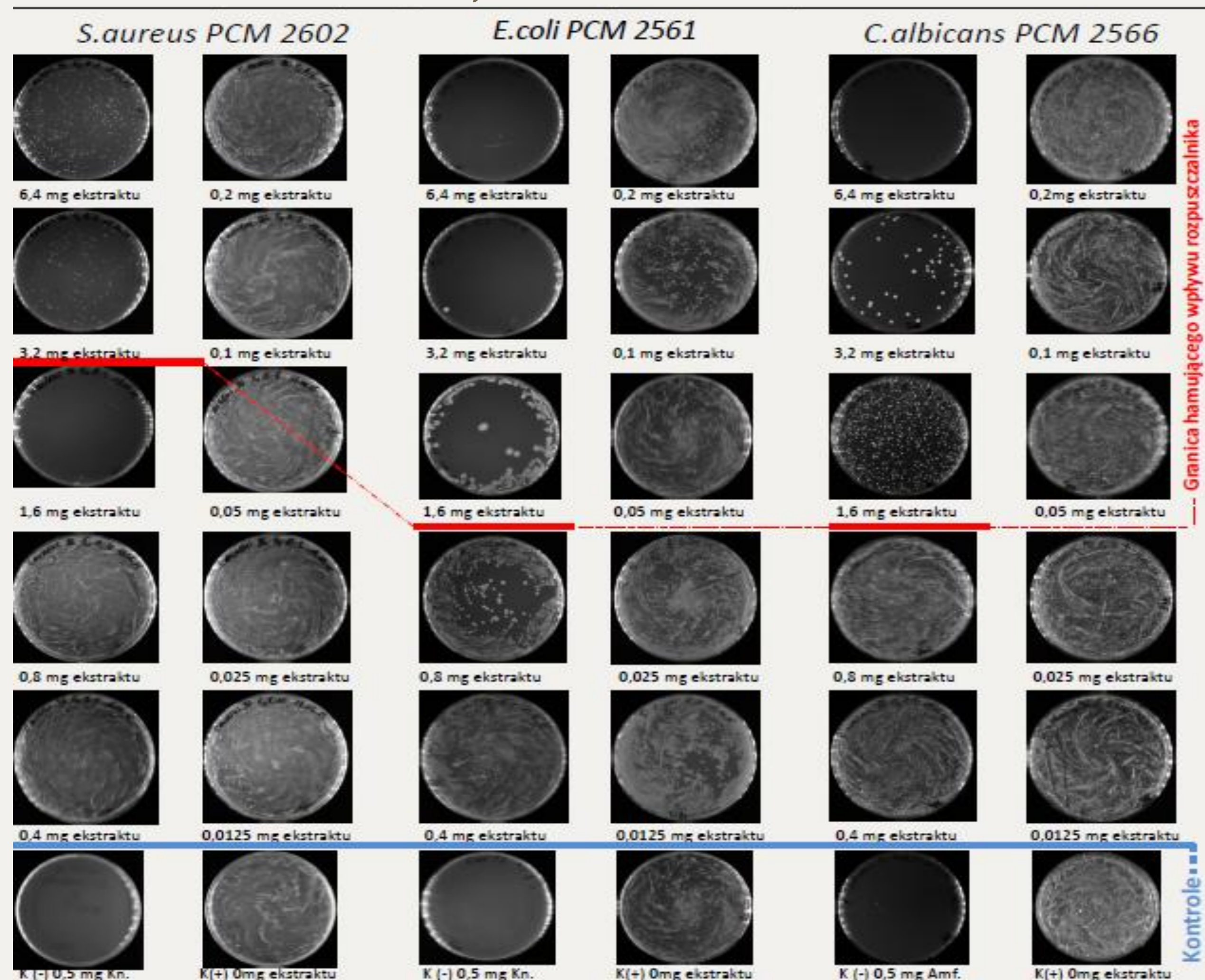


Wyniki

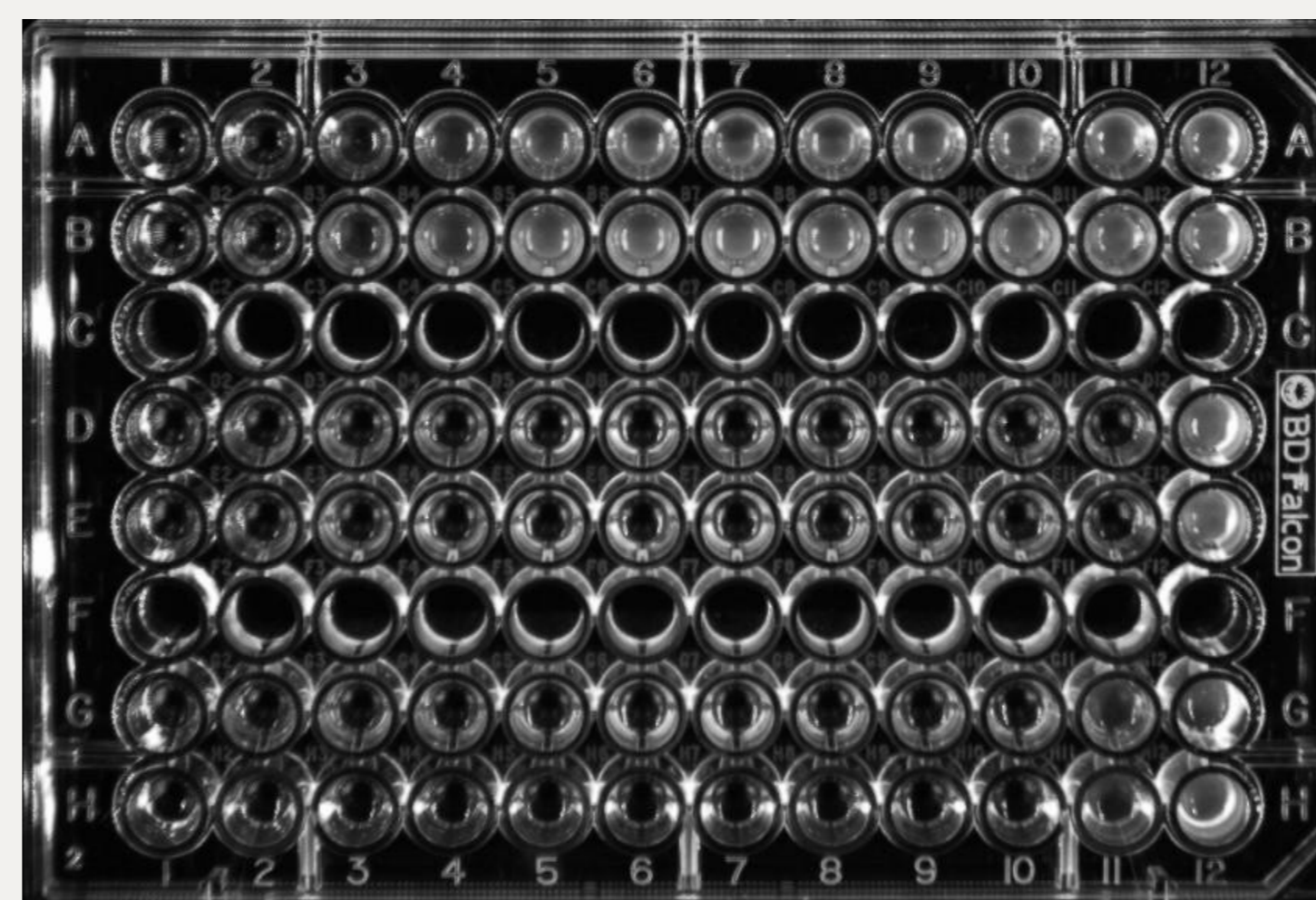
Ryc. Nr 5 Etapy prowadzenia badań

- Wyselekcjonowano ekstrakt o najsilniejszych właściwościach bakteriobójczych – ekstrakt z oszlifowanego bursztynu bałtyckiego.
- Wykazano, że ekstrakty z gedanitu, cedarytu, bursztynu meksykańskiego oraz kopalu kolumbijskiego nie wykazują właściwości bakteriobójczych w kierunku *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *C.albicans*.
- Ekstrakt z oszlifowanego bursztynu bałtyckiego wykazuje właściwości bakteriobójcze w kierunku *S.aureus* w stężeniu > 1,6 mg/ml (Minimal Bactericidal Concentration). Nie wykazuje ograniczającego wpływu na *E.coli*, *P.aeruginosa*, *C.albicans*.
- Kwas 1,4-butanodiowy wykazuje działanie hamujące wzrost *S.aureus* (MIC>5,473 mg/ml), *E.coli* (MIC>5,473 mg/ml), *P.aeruginosa*, *C.albicans*.
- Ekstrakt jest skomplikowaną mieszaniną kilkuset różnorodnych organicznych związków chemicznych.

Ryc. Nr 6 Fotografie posiewów rozcieńczeń dziesiętnych ekstraktu z oszlifowanego bursztynu bałtyckiego inokulowanych *S. aureus*, *E. coli* oraz *C. albicans*



Ryc. Nr 7 *S. aureus* - mikrofotografia



Ryc. Nr 8 Płytki titracji 96-dołkowa

Ryc. Nr 9 Pomiary spektrofotometryczne seryjnych rozcieńczeń ekstraktu z oszlifowanego bursztynu bałtyckiego inokulowanych *S. aureus* PCM 2602 (2 powtórzenia: E1, E2). Analogiczne badanie wykazało brak hamującego wpływu ekstraktu z oszlifowanego bursztynu bałtyckiego na *E. coli* PCM2561 oraz *C. albicans* PCM2566

<i>S. aureus</i> PCM 2602		1 (K-)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (K+)
T = 0 h S.	E1	0,046	0,581	0,336	0,207	0,122	0,083	0,064	0,052	0,046	0,044	0,042	1,054
	E2	0,041	0,619	0,327	0,190	0,124	0,085	0,066	0,054	0,047	0,044	0,042	1,019
T = 21 h S.	E1	0,047	0,215	0,166	0,132	0,234	0,399	0,444	0,356	0,316	0,325	0,340	0,286
	E2	0,042	0,240	0,204	0,128	0,185	0,394	0,439	0,354	0,334	0,315	0,353	0,284

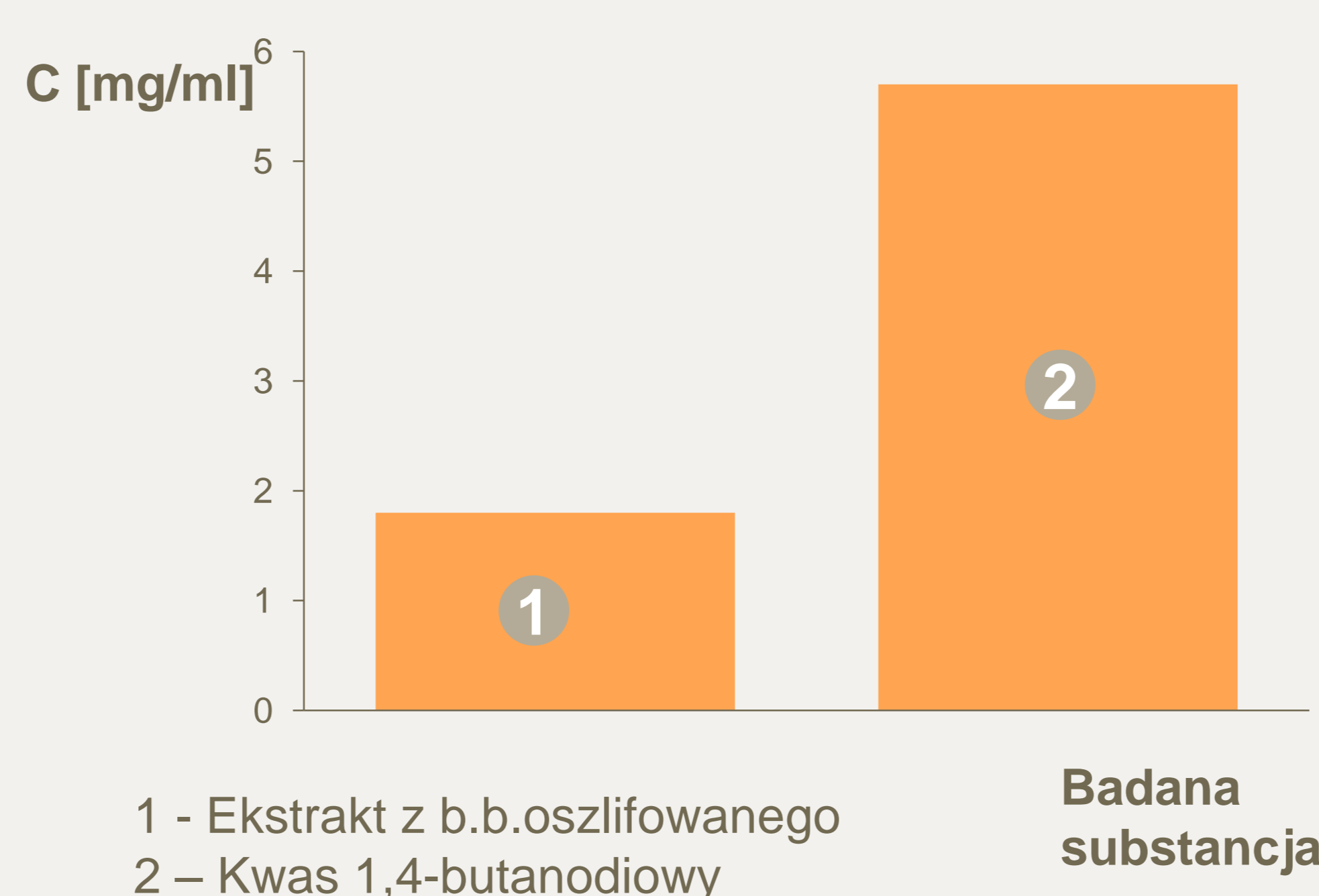
Stężenia ekstraktu powodujące zahamowanie wzrostu bakterii

Stężenie graniczne rozpuszczalnika hamujące wzrost komórek bakteryjnych

Wnioski

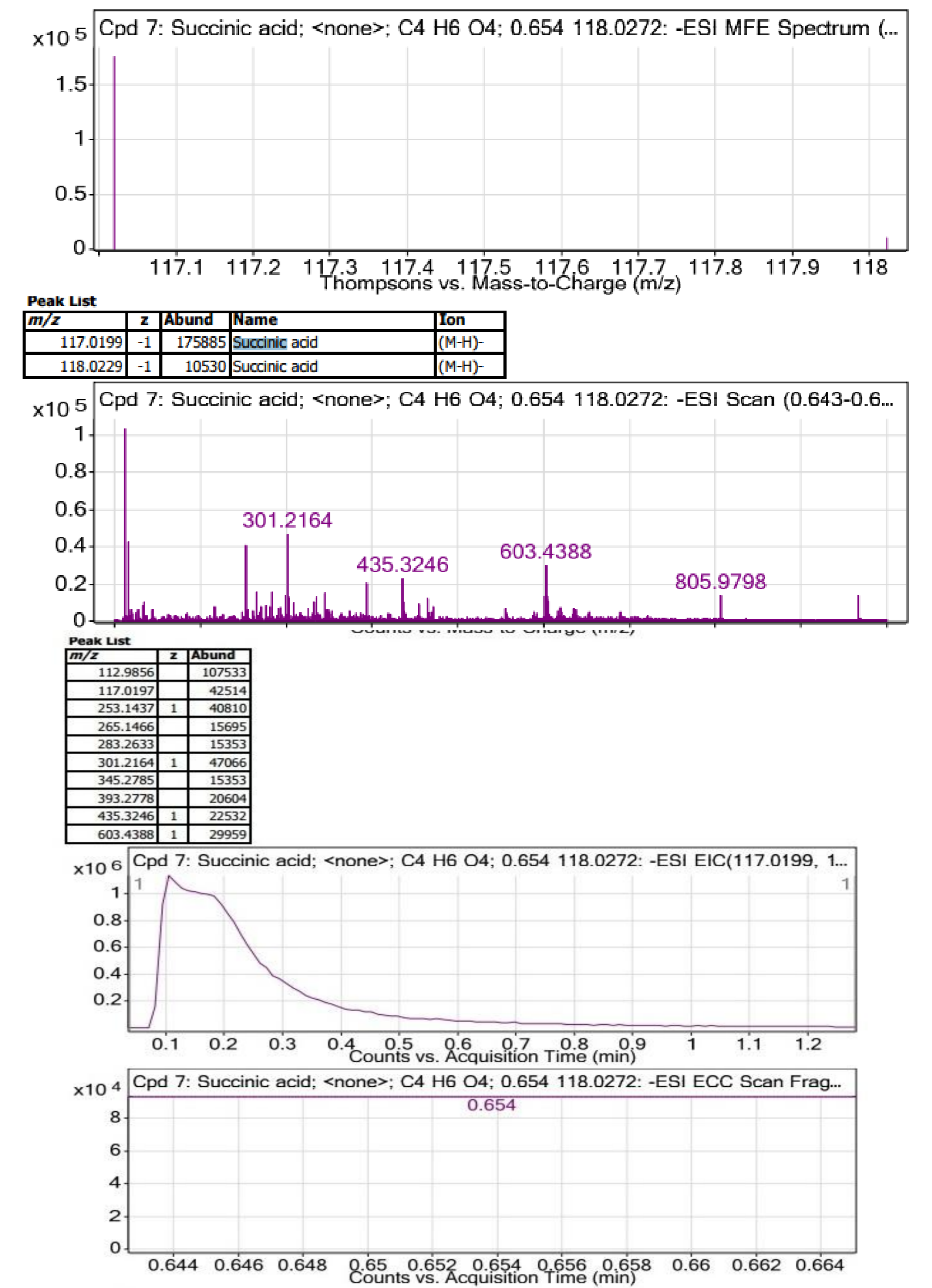
- Niski wskaźnik MIC ekstraktu z oszlifowanego bursztynu bałtyckiego dla bakterii *S.aureus* daje duże nadzieje na możliwość wyodrębnienia z ekstraktu substancji aktywnej bądź stosowanie całego ekstraktu w leczeniu trudno gojących się zakażeń.
- Wykazane w pracy bakteriobójcze właściwości kwasu 1,4 – butanodiowego w kierunku wszystkich badanych szczepów bakteryjnych mogą dawać nadzieję na nowe zastosowanie kwasu 1,4-butanodiowego jako środka bakteriobójczego w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym.
- Za pomocą opracowanej w badaniach metody ekstrakcji, można otrzymać ekstrakt o potencjale bakteriobójczym tylko z bursztynu bałtyckiego.

Ryc. Nr 10 Minimalne stężenie badanych subst. ograniczające rozwój *S.aureus* PCM 2602

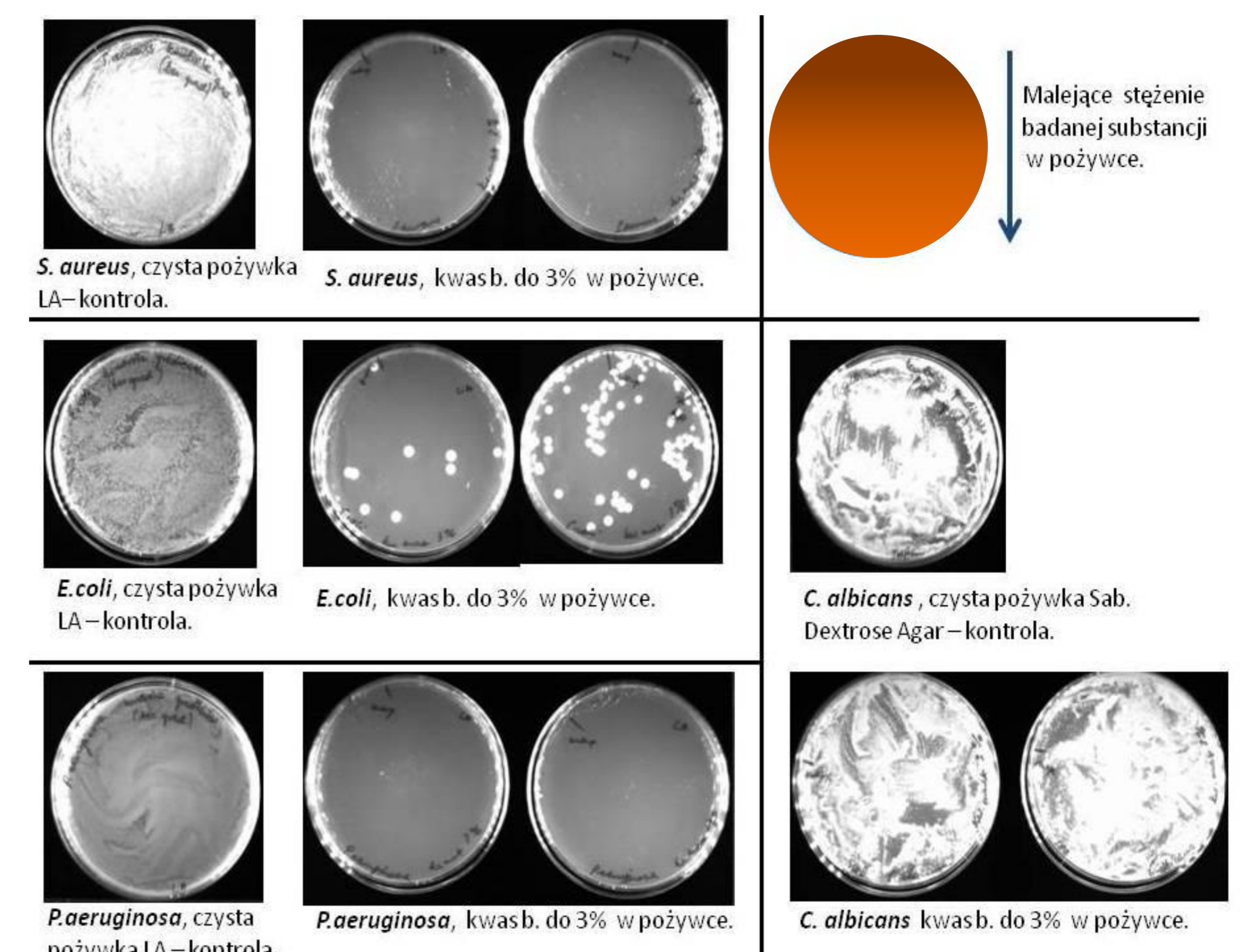


1 - Ekstrakt z b.b.oszlifowanego
2 – Kwas 1,4-butanodiowy

Ryc. Nr 11 Fragment wyników analizy jakościowej ekstraktu – potwierdzenie obecności kwasu 1,4-butanodiowego w ekstrakcie



Ryc. Nr 12 Badanie wpływu kwasu 1,4-butanodiowego na wzrost *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* oraz *C. albicans* metodą płytek gradientowych



Literatura

- Baza danych składników produktów żywnościowych <http://Food-Info.net>
- Baza danych związków chemicznych zarządzana przez National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2015. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- Bursztynisko, 2005-2014. Czasopismo Międzynarodowego Stowarzyszenia Bursztynników. Gdańsk
- Chambers E., Cyclopaedia, or, an Universal Dictionary of Arts and Sciences, 1728. Great Britain.
- Gao Z., Shao J., Sun H., Zhong W., Zhuang W., Zhang Z., 2012. Evaluation of different kinds of organic acids and their antibacterial activity in Japanese Apricot fruits. African Journal of Agricultural Research 7(35):4911-4918.
- Holderna-Kędzia E., 2010. Działanie substancji olejkowych na bakterie i grzyby. Postępy Fitoterapii 1: 3-8.
- Holderna-Kędzia E., Kędzia B., Mścisz A., 2009. Poszukiwanie wyciągów roślinnych o wysokiej aktywności antybiotycznej. Postępy Fitoterapii 1: 3-11.
- Hryniewicz Waleria et al, 2001. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości i Drobnoustrojów. Centralne Laboratorium Surowic i Szczepionek. Warszawa.
- Kunicki – Goldfinger W. J. H., 2006. Życie bakterii. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- Markiewicz Z. Kwiatkowski Z. A., 2012. Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- Matuszewska A., 2010. Bursztyn (sukcynit), inne żywice kopalne, subfosylny i współczesne. Oficyna Wydawnicza Waclaw Walasek. Katowice.
- Skrivanova E., Marounek M., Benda V., Brezina P., 2006. Susceptibility of Escherichia coli, Salmonella sp. And Clostridium perfringens to organic acids and monolaurin. Veterinari Medicina 51:81-88.