

## ПРОТИВОМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕОБРАБОТАННОГО ЯНТАРЯ

Зинкевич Д.Д., Лебедев А.Н., Дегтярёва Е.И., Петровская Т.А.

*Гомельский государственный медицинский университет,  
кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, г. Гомель*

**Ключевые слова:** янтарь, экстракты, золотистый стафилококк.

**Резюме:** в статье рассмотрены антимикробные свойства спиртовых и ацетоновых экстрактов, полученных из необработанного балтийского янтаря.

**Resume:** the article presents antimicrobial properties of alcohol and acetone extracts obtained from untreated Baltic amber.

**Актуальность.** Тысячелетиями складывались легенды и копились сведения о целебном янтаре, янтарной пудре и масле янтаря [1]. Группа американских ученых провели исследование, доказавшее, что в янтаре содержится природный антибиотик, который успешно справляется с бактериями, устойчивыми к ранее известным антибиотикам.

Янтáрь (*сукцинит*) – минералоид, окаменевшая ископаемая древесная смола, затвердевшая живица древнейших хвойных деревьев позднего мела и палеогена [3].

Янтарь неоднороден по своему составу: сложная смесь углеводов, смол, янтарной кислоты и масел. В состав янтаря входит более 40 соединений.

Натуральный минерал состоит из нескольких химических веществ: углерода (C), водорода (H<sub>2</sub>), кислорода (O<sub>2</sub>), серы (S). Необработанный камень – это высокомолекулярное соединение, в котором содержатся кислоты органического происхождения, как правило, с примесью серы. Обычно, дается следующая формула янтаря как "минерала" – C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>+(H<sub>2</sub>S).

В 100 г янтаря находится 81 г углерода, 7,3 г водорода, 6,34 г кислорода, немного серы, азота и минеральных веществ. Количественные соотношения между отдельными элементами в янтаре подвержены колебаниям. Они непостоянны не только для янтаря одного месторождения или проявления, но даже для янтаря одного куска. Непостоянство состава не позволяет относить янтарь к минералам. Термин «янтарь» следует считать собирательным для целого ряда ископаемых смол. Характерным представителем этого ряда является сукцинит. С ним обычно отождествляется высококачественный янтарь.

Янтарь никогда не бывает химически чистым. В нем в виде примесей (от следов до 0,5 %) найдено более 30 химических элементов (таких как Y, V, Mn, Cu, Ti, Zr, Al, Si, Mg, Ca, Fe, Nb, P, Pb, Zn, Cr, Ba, Co, Na, Sr, Si, Sn, Mo, Yb).

Наличие их в основном связывают с механическими включениями минералов, преимущественно глин, кальцита, пирита. Главные и постоянные элементы-примеси в янтарях - кальций и железо.

До сих пор полный состав и строение янтаря не известны, в настоящее время они выясняются. Летучая его часть (около 10% веса) - это ароматические соединения - терпены с 10 атомами углерода и сесквитерпены с 15 атомами углерода в молекуле. Из нелетучего остатка янтаря была выделена сукциноабиетиноловая кислота

(C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>) с двумя ОН-группами (одна карбоксильная). В чистом виде из янтаря выделены абиетиновая кислота и ее изомеры: левопимаровая, палюстриновая, неоабиетиновая, декстропимаровая и изодекстропимаровая кислоты. Первые четыре кислоты образуют химически родственную группу; они различаются между собой лишь положением двойных связей, которые легко смещаются внутри обоих колец. Абиетиновая кислота наиболее устойчивая. Только из нее обычно состоят древние ископаемые смолы. Новые данные о строении янтаря, полученные с помощью газовой и тонкослойной хроматографии, показали в его составе следующие кислоты: дегидроабиетиновая, изодекстропимаровая, дегидроизопимаровая, сандаракопимаровая, диагатеновая и абиетиновая. Они составляют 20-25% растворимой в органических растворителях части балтийского янтаря. Остаток янтаря, не растворимый ни в одном из известных растворителей, назвали сукцинитом. Данные ИК-спектроскопии показали, что сукцинит содержит лактонные (сложные эфирные) группы и представляет собой сложный эфир.

Таким образом, янтарь состоит из трёх групп соединений:

1. летучих ароматических соединений – терпенов с 10 атомами углерода и сесквитерпенов с 15 атомами углерода в молекуле (около 10% веса);
2. растворимых органических кислот: дегидроабиетиновая, изодекстропимаровая, дегидроизопимаровая, сандаракопимаровая, диагатеновая и абиетиновая и её изомеры: левопимаровая, палюстриновая, неоабиетиновая, декстропимаровая и изодекстропимаровая кислоты. Они составляют растворимую в органических растворителях часть (20-25%);
3. нерастворимых полиэфиров этих кислот со спиртами, образовавшимися из этих же кислот - сукцинит. Содержание янтарной кислоты в сукцините колеблется от 3 до 8%: наименьшее – в прозрачном сукцините (3,2-4,5%), наибольшее - в выветренной поверхностной корке (8,2%) [4].

Проблема устойчивости микроорганизмов к антибиотикам имеет глобальное значение и представляет широкий интерес с молекулярно-генетической, экологической и клинической точек зрения. На данный момент времени клинически значимые микроорганизмы можно разделить на чувствительные и устойчивые к действию антибиотиков. Резистентность микроорганизмов к антибактериальным средствам может быть врождённой и приобретённой, являться одним из примеров эволюции. Современные методики полногеномного секвенирования и комплексные базы данных нуклеотидных последовательностей дают представление о многогранности механизмов природной устойчивости к антибиотикам и способны дать информацию о генах, кодирующих метаболические ферменты и белки, регулирующие основные процессы физиологии бактерий [2].

Следовательно, лечение заболеваний, вызванных микроорганизмами, устойчивых ко многим антибиотикам, становится все более затрудненным, требуется использование альтернативных лекарственных препаратов.

**Цель:** оценить антимикробные свойства спиртовых и ацетоновых экстрактов, полученных из необработанного балтийского янтаря.

**Задачи:** 1. Изучить антимикробные свойства спиртового экстракта из необработанного балтийского янтаря; 2. Изучить антимикробные свойства ацетонового экстракта из необработанного балтийского янтаря.

**Материалы и методы.** Экстракция молекул органических кислот из порошка балтийского необработанного янтаря проводилась этиловым спиртом 96% и ацетоном. Для этого применили метод мацерации с 24-часовым периодом нагрева экстракционной смеси до температуры +35°C в шейкере с частотой 120 перемешиваний в минуту. Спиртовые и ацетоновые экстракты через сутки отделяли от янтаря и фильтровали через бактериальные фильтры.

С целью снижения физико-химического воздействия спирта и ацетона на тестируемые микроорганизмы в дальнейшем отфильтрованные экстракты вносили во взвешенные пробирки и помещали в термостат с температурой +35°C до полного выпаривания растворителя. Полное выпаривание ацетона произошло в течение суток, спирта – в течение трех суток. Проводилось повторное взвешивание пробирок и вычисление сухого остатка экстракта.

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) экстракта определяли методом микроразведений в стерильных полистироловых круглодонных 96-луночных планшетах (Starsedt, Германия).

Сухие ацетоновый и спиртовой экстракты растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO), концентрация экстракта в DMSO – 20 мг/мл. ДМСО — апротонный растворитель, в любых пропорциях смешивается с водой.

Далее из раствора DMSO готовили двукратные серийные разведения экстрактов в питательном бульоне, в диапазоне концентраций от 10000 до 100 мкг/мл.

Планшет заполняли следующим образом:

1. Заполняем все лунки, кроме 1 ряда МХБ по 100 мкл.

2. Добавляем 200 мкл рабочего раствора экстракта в 1 ряд.

3. Титруем экстракт с 1 по 11 лунки (100 мкл)

4. Делаем взвесь микроорганизма 0,5 МФ.

5. Т.к. нужно в каждую лунку внести по  $5 \times 10^5$  м/о, а в 0,5 по МФ  $1,5 \times 10^8$ , то титруем бактериальную суспензию. Берем 180 мкл физиологического раствора и добавляем 20 мкл взвеси микроорганизмов. Вносим по 5 мкл полученной смеси в каждую лунку. Но начинаем вносить с 12 ряда, чтобы не повышать концентрацию экстракта в лунках.

Таким образом, 12 ряд лунок не содержал янтарного экстракта и использовался в качестве положительного контроля (контроль роста культуры). На одном планшете в рядах А – G определялась минимальная подавляющая концентрация одновременно для 8 штаммов микроорганизмов.

Для тестирования были использованы суточные культуры 20 клинических изолятов *Staphylococcus aureus*: БС-1 - БС-20. В панель микроорганизмов для тестирования включен эталонный штамм из американской коллекции типовых культур (АТСС) *Staphylococcus aureus* АТСС 29213.

Планшеты инкубировали в термостате 24ч, 35°C. Учет МПК проводили по отсутствию видимого роста микроорганизмов, сравнивая опытные и контрольные

лунки, а также лунки с неинокулированной питательной средой в камере для визуального считывания (зеркало+увеличитель) Thermo V4007.

**Результаты и их обсуждение.** В ходе проведенного исследования были изучены антибактериальные свойства спиртовых и ацетоновых экстрактов, полученных из порошка балтийского необработанного янтаря. Минимальные концентрации ацетоновых и спиртовых экстрактов, подавляющие рост золотистого стафилококка представлены в таблице 1.

**Табл. 1.** Концентрации ацетоновых, спиртовых экстрактов, подавляющие рост тест-микробов (мкг/мл)

Тест- м/о	Ацетоновый экстракт	Спиртовой экстракт
	МПК (мкг/мл)	МПК (мкг/мл)
БС-1	10000	<b>5000</b>
БС-2	10000	10000
БС-3	10000	10000
БС-4	10000	10000
БС-5	10000	10000
БС-6	10000	10000
БС-7	10000	10000
БС-8	10000	10000
БС-9	<b>5000</b>	<b>2500</b>
БС-10	10000	10000
БС-11	10000	10000
БС-12	<b>5000</b>	<b>2500</b>
БС-13	10000	10000
БС-14	10000	10000
БС-15	10000	10000
БС-16	10000	10000
БС-17	10000	10000
БС-18	10000	10000
БС-19	<b>2500</b>	<b>2500</b>
БС-20	10000	10000
ATCC 29213	10000	10000

Из результатов, представленных в таблице 1 видно, что ацетоновые и спиртовые экстракты из порошка балтийского необработанного янтаря обладают антимикробными свойствами в отношении клинических изолятов *Staphylococcus aureus*. Так как DMSO имеет собственную антибактериальную активность, то минимальные ингибирующие концентрации экстрактов в отношении тест-культур необходимо учитывать с содержания DMSO не более 5% в смеси, что соответствует лункам с концентрацией экстракта 5000 мкг/мл и меньше. МПК спиртовых экстрактов в отношении тест-микробов выше, чем у ацетоновых. Следует отметить, что и спиртовые и ацетоновые экстракты обладают антимикробными свойствами в отношении

одних и тех же клинических изолятов *Staphylococcus aureus* (БС-9, БС-12, БС-19). Минимальные ингибирующие концентрации спиртовых и ацетоновых экстрактов, находились в диапазоне от 2,5 до 5 мг/мл. Спирт 96% как экстрагент проявил себя лучше, чем ацетон, о чем свидетельствуют значения МПК и более широкий спектр воздействия на клинические изоляты золотистого стафилококка. Ацетон и спирт по всей вероятности экстрагировали из необработанного янтаря смолы и тритерпены, которые и дали осадок экстракта.

**Выводы:** 1. Ацетоновые экстракты из порошка балтийского необработанного янтаря обладают антимикробными свойствами в отношении таких клинических изолятов *Staphylococcus aureus* как: БС-9, БС-12, БС-19; 2. Спиртовые экстракты обладают антимикробными свойствами в отношении таких клинических изолятов *Staphylococcus aureus* как: БС-1, БС-9, БС-12, БС-19; 3. Антимикробные свойства спиртовых экстрактов из янтаря выше, чем у ацетоновых. Требуется проведение дальнейших исследований для идентификации вторичных метаболитов из порошка балтийского необработанного янтаря, проявляющих антибактериальные свойства, предположительно этими веществами являются тритерпены и янтарная кислота.

#### Литература

1. Мошков, Н.Н. Исцеляющее тепло янтаря. Красота, здоровье и долголетие от природы / Н.Н. Мошков. – Калининград: Международная академия фундаментального образования «Неизвестное об известном», 2009. – 148 с.
2. Основные принципы эволюции антибиотикорезистентности у бактерий (обзор литературы) / Н. В. Давидович [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, № 6. – С. 387–393.
3. Hager, Hermann Praxis für Apotheker, Ärzte, Drogisten, und Medizinalbeamte. 1816-1897. (Fischer, Bernhard, Hartwich, Carl. Publisher Berlin: J. Springer. 1856-1905)
4. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Folgeband 5: Stoffe L-Z. Herausgeber: Bruchhausen, F., Ebel, S., Hackenthal, E., Holzgrabe, U. (Hrsg.). Springer, Berlin. 1999.