

Utjecaj različitih antimikrobnih tvari na krivulju rasta *Enterococcus faecalis*

Ljubić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:034908>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Istraživanje i razvoj lijekova

Martina Ljubić

Utjecaj različitih antimikrobnih tvari na krivulju rasta *Enterococcus faecalis*

Diplomski rad

Rijeka, 2022. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Istraživanje i razvoj lijekova

Martina Ljubić

Utjecaj različitih antimikrobnih tvari na krivulju rasta *Enterococcus faecalis*

Diplomski rad

Rijeka, 2022. godina

Mentor rada: doc. dr. sc. Željka Maglica

Komentor rada: prof. dr. sc. Ivana Gobin

Diplomski rad obranjen je dana 30. rujna 2022. godine pred povjerenstvom:

1. izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj
2. izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti
3. doc. dr. sc. Željka Maglica
4. prof. dr. sc. Ivana Gobin

Rad ima 62 stranice, 28 slika, 7 tablica i 39 literaturnih navoda.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Željki Maglici što mi je pružila priliku da izradim ovaj diplomski rad pod njezinim mentorstvom. Hvala Vam na ukazanom povjerenju, razumijevanju i svim korisnim savjetima. Također, hvala i svim djelatnicima Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci.

Hvala djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci, a naročito komentorici prof. dr. sc. Ivani Gobin. Hvala Vam na vremenu, strpljenju, pomoći i prenesenom znanju.

Najveće hvala mojim roditeljima i sestri na podršci i razumijevanju ne samo tijekom pisanja ovog rada, već tijekom cijelog života.

Hvala i Matiji na motivaciji i podršci.

SAŽETAK

Bakterije roda *Enterococcus* su Gram – pozitivni, anaerobni patogeni koji se prirodno nalaze u gastrointestinalnom traktu čovjeka, a najzastupljenija vrsta je pritom *Enterococcus faecalis*. Iako se smatraju komenzalnim bakterijama, vrlo često uzrokuju urinarne infekcije – infekcije prisutne u bilo kojem dijelu mokraćnog sustava. Urinarne infekcije jedne su od najčešćih bakterijskih infekcija te su jedan od najučestalijih razloga posjeta liječniku. Uz urinarne infekcije, enterokoki su i nerijetko uzročnici endokarditisa, intraabdominalnih infekcija, neonatalne sepse, meningitisa te nozokomijalne bakterijemije.

Uslijed povećane rezistencije enterokoka na antimikrobna sredstva, poželjno je istražiti druge alternativne pristupe koji bi omogućili efikasnu terapiju i profilaksu. Zbog toga je u ovom istraživanju ispitan utjecaj različitih antimikrobnih tvari na krivulju rasta dva soja *E. faecalis*. Ispitivao se utjecaj dva antibiotika: nitroksolina, efikasnog antibiotika u borbi protiv infekcija biofilmom čije se antimikrobno djelovanje temelji na keliranju te gentamicina, aminoglikozidnog antibiotika sa širokim rasponom baktericidnog djelovanja. Ispitao se i utjecaj hidrokinona koji je aromatski, fenolni organski spoj nastao razgradnjom arbutina u enterocitima crijevnih resica.

Cilj istraživanja bio je ispitati kako različite antimikrobne tvari u različitim koncentracijama djeluju i pojedinačno i u kombinacijama na krivulje rasta *E. faecalis* soja 36 i soja ATCC29212. Također, na temelju minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i frakcijske inhibitorne koncentracije (FIC) određene su interakcije između kombinacija antimikrobnih tvari. Rezultati su pokazali veliki potencijal između različitih koncentracija kombinacije nitroksolina i hidrokinona pa je tu kombinaciju spojeva potrebno dodatno istražiti.

Ključne riječi: *Enterococcus faecalis*, urinarne infekcije, nitroksolin, gentamicin, hidrokinon, antimikrobna rezistencija

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Enterococcus* are Gram-positive, anaerobic pathogens that are naturally found in the gastrointestinal tract of humans, and the most common species is *Enterococcus faecalis*. Although they are considered commensal bacteria, they very often cause urinary infections - infections present in any part of the urinary tract. Urinary tract infections are one of the most common bacterial infections and are one of the most common reasons for visiting a doctor. In addition to urinary infections, enterococci are often the cause of endocarditis, intra-abdominal infections, neonatal sepsis, meningitis and nosocomial bacteremia.

Due to the increased resistance of enterococci to antimicrobial agents, it is advisable to investigate other alternative approaches that would enable efficient therapy and prophylaxis. Therefore, in this study, we were examining the influence of different antimicrobial substances on the growth curve of two strains of *E. faecalis*. The impact of two antibiotics was tested: nitroxolin, an effective antibiotic in the fight against biofilm infections whose antimicrobial action is based on chelation, and gentamicin, an aminoglycoside antibiotic with a wide range of bactericidal action. The influence of hydroquinone, which is an aromatic, phenolic organic compound created by the breakdown of arbutin in the enterocytes of the intestinal villi, was also tested.

The aim of the research was to examine how different antimicrobial substances in different concentrations act both individually and in combinations on the growth curves of *E. faecalis* strain 36 and strain ATCC29212. Also, on the basis of minimum inhibitory concentration (MIC) and fractional inhibitory concentration (FIC), interactions between combinations of antimicrobial substances were determined. The results showed great potential between different concentrations of the combination of nitroxoline and hydroquinone, so this combination of compounds needs to be further investigated.

Key words: *Enterococcus faecalis*, urinary tract infections, nitroxolin, gentamicin, hydroquinone, antimicrobial resistance

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Urinarne infekcije.....	1
1.1.1.	Definicija urinarnih infekcija.....	1
1.1.2.	Epidemiologija urinarnih infekcija.....	1
1.1.3.	Etiologija urinarnih infekcija.....	2
1.1.4.	Patogeneza urinarnih infekcija.....	4
1.1.5.	Klasifikacija i klinička slika urinarnih infekcija.....	5
1.1.6.	Dijagnostika urinarnih infekcija.....	7
1.1.7.	Prevenција urinarnih infekcija.....	7
1.2.	Enterokoki.....	9
1.2.1.	Taksonomija enterokoka.....	9
1.2.2.	Strukturna građa i karakteristike enterokoka.....	9
1.2.3.	Epidemiologija i ekologija enterokoka.....	10
1.2.4.	Bakterijska adhezija i patogeneza enterokoka.....	11
1.2.5.	Klinička slika.....	12
1.2.6.	Laboratorijska dijagnostika.....	13
1.2.7.	Liječenje enterokoka.....	14
1.3.	Antibiotici i liječenje urinarnih infekcija.....	15
1.3.1.	Razvoj antibiotika.....	15
1.3.2.	Podjela antibiotika.....	15
1.3.3.	Mehanizam djelovanja.....	16
1.3.4.	Antimikrobna rezistencija.....	17
1.3.5.	Liječenje urinarnih infekcija.....	18
1.3.6.	Gentamicin i nitroksolin.....	19
1.3.7.	Prirodne tvari za liječenje urinarnih infekcija.....	21
1.3.8.	Arbutin i hidrokinon.....	21
2.	Cilj rada.....	24
3.	Materijali i metode.....	25
3.1.	Bakterijski soj.....	25
3.2.	Priprema bakterijske suspenzije.....	25
3.3.	Priprema antibiotika.....	26
3.3.1.	Priprema gentamicina.....	26
3.3.2.	Priprema nitroksolina.....	26
3.4.	Priprema hidrokinona.....	26

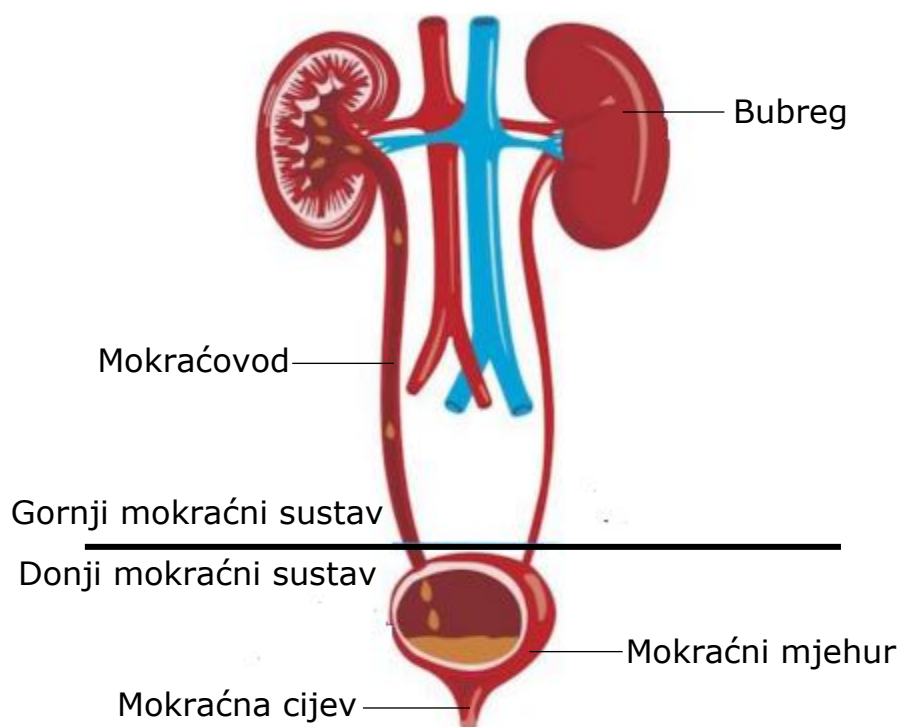
3.5.	Metoda šahovnice	26
3.6.	Mjerenje OD (engl. <i>optical density</i>).....	28
3.7.	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK).....	28
4.	Rezultati	30
4.1.	Određivanje MIK vrijednosti za antimikrobne tvari.....	30
4.2.	Izračun postotka inhibicije	35
4.2.1.	Postotak inhibicije nitroksolina	35
4.2.2.	Postotak inhibicije gentamicina.....	36
4.2.3.	Postotak inhibicije hidrokinona.....	37
4.3.	Određivanje interakcija između nitroksolina i gentamicina metodom šahovnice.....	39
4.4.	Određivanje interakcija između nitroksolina i hidrokinona metodom šahovnice.....	43
5.	Rasprava	49
6.	Zaključak.....	56
7.	Literatura	57
8.	Životopis.....	61

1. Uvod

1.1. Urinarne infekcije

1.1.1. Definicija urinarnih infekcija

Termin infekcije mokraćnog (urinarnog) sustava, odnosno urinarne infekcije (UTI od engl. *urinary tract infections*), su sve infekcije koje su lokalizirane u bilo kojem dijelu mokraćnog sustava – bubreg, mokraćni mjehur, ureter (mokraćovod) ili uretru (mokraćna cijev) (Slika 1.) (1). Obzirom na anatomske i funkcionalne status zahvaćenog dijela mokraćnog sustava, infekcije se mogu razlikovati po kliničkoj slici, epidemiologiji, sklonosti recidiviranju, potrebnoj terapiji te ishodu (2).



Slika 1. Prikaz dijelova mokraćnog sustava (3).

1.1.2. Epidemiologija urinarnih infekcija

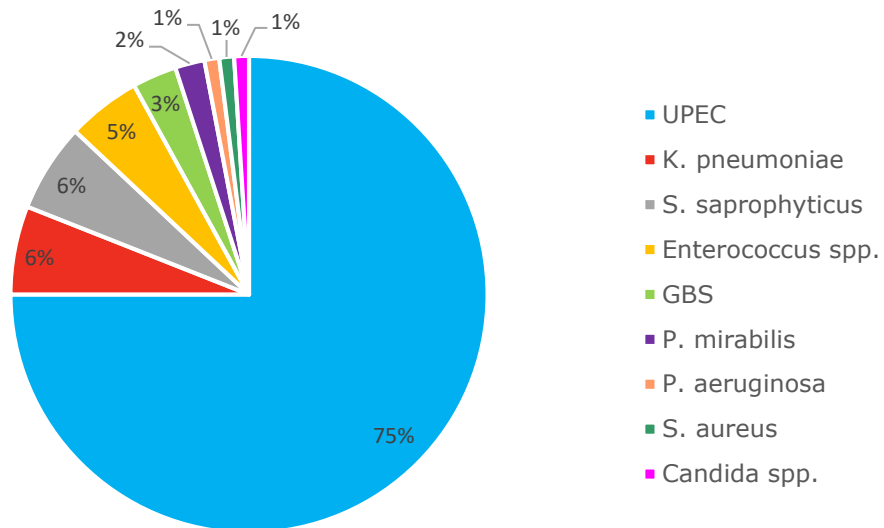
Urinarne infekcije su najzastupljenije bakterijske infekcije koje zahtijevaju prikladnu medicinsku skrb, a na globalnoj razini svake godine pogađaju otprilike 150 milijuna ljudi (4). Infekcije mokraćnog sustava čine 10 – 20% svih infekcija liječenih u primarnoj zdravstvenoj zaštiti i 30 – 40%

infekcija liječenih u hospitalnim uvjetima (5). Prisutne su u svim dobnim skupinama, uključujući i novorođenačku dob. Prvih šest mjeseci života, infekcije su češće javljaju kod muške dojenčadi, a kasnije su više zastupljene kod djevojčica (2). U odrasloj dobi, urinarne infekcije se češće pojavljuju kod žena i to zbog anatomskih faktora koji omogućuju prolazak uropatogenih bakterija iz gastrointestinalnog trakta u mokraćni. Također, žene imaju kraću mokraćnu cijev, kraću udaljenost od otvora uretre do anusa nego li muškarci i nemaju baktericidni učinak prostatičnog sekreta (4). Kod muškaraca mlađih od 50 godina je tendencija pojavljivanja urinarnih infekcija niska, a ako ipak dođe do infekcije, najčešće je to indikator mogućih uroloških abnormalnosti. Uzroci visoke prevalencije urinarnih infekcija kod muškaraca starijih od 65 godina mogu biti smanjena baktericidna aktivnost prostatnog sekreta, povećana prostata, primjena urinarnih katetera, multipli komorbiditeti (2).

Rizični faktori povećavaju incidenciju urinarnih infekcija, a uključuju različita stanja poput nefrolitijaze, urinarne inkontinencije, prijašnje uroginekološke operacije, dijabetes, dugotrajnu uporabu urinarnih katetera, upotrebu spermicidnih sredstava te rizične spolne odnose (6).

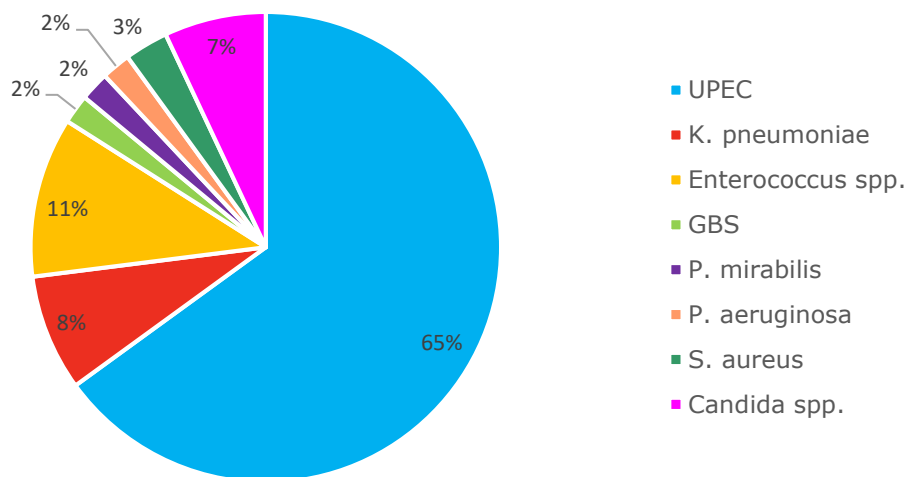
1.1.3. Etiologija urinarnih infekcija

Uzrok urinarnih infekcija mogu biti različiti patogeni, uključujući Gram – pozitivne i Gram – negativne bakterije te neke gljivice. Uropatogena *Escherichia coli* (UPEC) je najčešći uzročnik kompliciranih, ali i nekompliciranih urinarnih infekcija (7). UPEC su ustvari sojevi *E.coli* koji egzistiraju i rastu u mokraćnom traktu, a pritom ispoljavaju širok spektar strategija i faktora virulencije pa su tako odgovori za otprilike 90% nekompliciranih infekcija mokraćnog sustava (8). Uz UPEC, najčešći uzročnici nekompliciranih urinarnih infekcija su *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* grupe B, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Candida spp* (Slika 2.).



Slika 2. Zastupljenost uzročnika nekomplikiranih urinarnih infekcija (7).

Nakon UPEC-a kao najčešćeg uzročnika kompliciranih urinarnih infekcija, slijede *Enterococcus* spp., *K. pneumoniae*, *Candida* spp., *S. aureus*, *P. mirabilis* i *P. aeruginosa* (Slika 3.) (7).



Slika 3. Zastupljenost uzročnika kompliciranih urinarnih infekcija (7).

1.1.4. Patogeneza urinarnih infekcija

Do urinarnih infekcija dolazi zbog obostranog međudjelovanja obrambenog mehanizma domaćina i patogena koji uzrokuje infekciju. Pritom, poznata su tri puta proširivanja bakterija unutar mokraćnog sustava:

- a) Ascendentni put gdje prvo dolazi do kolonizacije uretre, a potom patogeni migriraju u mokraćni mjehur različitim mehaničkim podražajima (2). Međutim, postoje obrambeni mehanizmi koji sprečavaju ulazak bakterija u mokraćni mjehur poput niskog pH mokraćne, sačuvane dinamike pražnjenja mokraćnog mjehura, prisutnost Tamm – Horsfallovog proteina, sekrecija IgA (9).
- b) Hematogeni put gdje u tijeku bakterijemije patogene bakterije iniciraju dijelove mokraćnog sustava.
- c) Limfogeni put u kojem limfom dolazi do dotoka patogena u bubreg zbog povišenog tlaka u mokraćnom mjehuru (2).

Urinarne infekcije najčešće počinju periuretralnom kontaminacijom uropatogenom bakterijom podrijetlom iz crijeva, a nakon toga dolazi do kolonizacije mokraćne cijevi. Daljnja migracija patogenih bakterija u mokraćni mjehur praćena je ekspresijom fimbrija (pili) i bičeva (flageli). Kompleksne interakcije između patogenih bakterija i domaćina u mokraćnom mjehuru definiraju uspješnost moguće kolonizacije patogena ili njihovu eliminaciju. Uspješnu kolonizaciju omogućuju bakterijski adhezini koji sudjeluju u prepoznavanju receptora smještenih na epitelu mokraćnog mjehura. Kao upalni odgovor domaćina na kolonizaciju patogena događa se infiltracija neutrofila pri čemu neutrofilni započinju s uništavanjem izvanstaničnih bakterija. Međutim, neki patogeni ili izbjegnu ili nadvladaju imunološki sustav domaćina i to invazijom stanica domaćina, morfološkim promjenama (npr. filamentacija) te stvaranjem biofilma. Biofilm je ustvari fizička zaštita od antimikrobnih tvari, imunoloških odgovora, ali i ostalih stresova, a stvaraju ga fimbrije, bičevi, izvanstanična DNA, egzopolisaharidi te ljepljiva vlakna. Takve su bakterije u mogućnosti proizvesti proteaze i

toksine koji dovode do oštećenja stanica domaćina što onda dovodi do uspona bakterija u bubreg. Dolazi do bakterijske kolonizacije bubrežnog epitela i ponovne proizvodnje toksina koji sada oštećuju tkivo. Ako se pravovremeno ne reagira i ne liječi, urinarna infekcija može napredovati u bakterijemiju u slučaju da patogena bakterija prijeđe tubularnu epitelnu barijeru (4).

1.1.5. Klasifikacija i klinička slika urinarnih infekcija

Prema Infectious Diseases Society of America (IDSA) i European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) infekcije mokraćnog sustava mogu se podijeliti u pet kategorija: akutni nekomplikirani UTI donjeg urotakta u žena, akutni nekomplikirani pijelonefritis, komplicirane UTI i UTI u muškaraca, asimptomatska bakteriurija i rekurentni UTI.

Akutni nekomplikirani cistitis jedna je od najčešćih bakterijskih infekcija u žena s incidencijom od 25-35% u dobi između 20 i 40 godina. U ovu skupinu infekcija striktno pripada samo akutni cistitis bez komplikacija. Klinički simptomi (nagli početak bolesti, disurija, polakisurija, urgencija, inkontinencija i suprapubična osjetljivost) i leukociturija kriterij su za dijagnozu akutnog nekomplikiranog cistitisa.

Akutni nekomplikirani pijelonefritis jest akutna upala bubrega uz značajnu bakteriuriju u osoba s anatomske i funkcionalno urednim urinarnim traktom i odsutnošću komorbiditeta koji mogu pospješiti infekciju i povećati incidenciju relapsa i reinfekcije. Klinički se očituje febrilitetom, zimicama, tresavicama, bolovima lumbalno, nikturijom i poliurijom.

Komplicirane UTI su heterogena skupina kliničkih sindroma koje se razlikuju prema tijeku, težini, razvoju komplikacija te prema potrebnom antimikrobnom režimu. U komplicirajuće čimbenike ubrajaju se: opstrukcija (urolitijaza, tumori, striktore mokraćne cijevi, hiperplazija prostate, kongenitalne abnormalnosti, divertikuli mokraćnog mjehura, ciste bubrega, stenoza pijelouretralnog vrata), strana tijela (urinarni kateter,

uretralne proteze, nefrostoma), metaboličke bolesti (šećerna bolest), druge kronične bolesti (imunosupresija, bubrežna insuficijencija, stanje nakon transplantacije bubrega, spužvasti bubreg), funkcionalne abnormalnosti (neurogeni mjehur, vezikouretralni refluks) i drugo (zahvati na urotraktu, muški spol, trudnoća, dob nakon 65 godina, hospitalno akvirirana infekcija, recentna upotreba antibiotika). Ovakve infekcije mokraćnog trakta vrlo rijetko su izolirane i pojedinačne, često su rekurentne ili kronične s relapsima i recidivima.

UTI u muškaraca su infekcije koje uvijek treba svrstati u komplicirane dok se ne dokaže suprotno. Obično se manifestiraju disurijom, perinealnim bolovima (akutni bakterijski prostatitis), sa ili bez erektilne disfunkcije te uz opće infektivne simptome (febrilitet, zimice, tresavice).

Asimptomatska bakteriurija je klinički sindrom u kojem nema urinarnih simptoma, već postoji leukociturija uz signifikantnu bakteriuriju (za žene: $>10^5$ bakterija/mL istog bakterijskog soja u dvjema uzastopnim urinokulturama srednjeg mlaza urina uzetimima u razmaku od >24 sata; za muškarce: $>10^5$ bakterija/mL u jednoj kulturi srednjeg mlaza urina).

Rekurentne UTI su infekcije mokraćnog sustava koje se javljaju bez jasnih komplicirajućih čimbenika u najmanje dva ili više navrata tijekom šest mjeseci ili u najmanje tri ili više navrata u tijeku jedne godine, a dokazane su etiološki. Češće su u žena, a muškarci bez predisponirajućih čimbenika rijetko obolijevaju. S obzirom da ove infekcije mokraćnog sustava značajno utječu na kvalitetu života i ozbiljan su javnozdravstveni problem, ulaže se mnogo truda u njihovu prevenciju (antimikrobna profilaksa, promjena životnih navika, topički estrogene, brusnica...) (2,9,10).

1.1.6. Dijagnostika urinarnih infekcija

Postavljanje točne dijagnoze bazira se na laboratorijskim nalazima i kliničkim simptomima. Prema tome, dijagnoza se postavlja temeljem različitih parametara koji uključuju anamnezu, laboratorijske pretrage, fizikalni pregled te mikrobiološku dijagnostiku (9).

Uzorak za analizu mokraće uzima se metodom čistog srednjeg mlaza, a uzima se jutarnja mokraća, nakon što bolesnik barem tri sata nije mokrio. Na prisutnost urinarne infekcije ukazuju leukociturija, cilindurija i bakteriurija, a uz to mogu se verificirati i hematurija te proteinurija. Više od pet leukocita u svakome vidnom polju pod velikim povećanjem mokraćnog sedimenta smatra se patološkim nalazom, a sediment se dobije centrifugiranjem na 2000 okretaja tijekom 5 minuta. Navedena vrijednost ovisi o količini centrifugirane mokraće i o količini supernatanta. Ipak, točnija metoda određivanja leukociturijske jest brojenje leukocita u Fuchs - Rosenthalovoj komorici, a patološkim nalazom smatra se nalaz s više od 10 leukocita u 1 mililitru mokraće i više od 10^6 leukocita u 12-satnoj mokraći (Addisov broj).

Za dokaz bakterija postoji i nitratni test, koji je orijentacijski test, a izvodi se "dipstick" metodom. Osjetljivost navedenog testa je 35 – 85%, a specifičnost 32 – 100%. Bakterije koje ne reduciraju nitrate (npr. *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp) dat će lažno negativan rezultat (2).

Podaci o eventulanim morfološkim promjenama mokraćnog sustava dobivaju se radiološkom dijagnostikom koja se koristi kod kompliciranih urinarnih infekcija, dok se kod bolesnika koji ne odgovaraju na standardnu terapiju antibioticima koristi citoskopija (9).

1.1.7. Prevencija urinarnih infekcija

Uz prikladnu antibiotsku terapiju, preporuča se i odgovarajuća prevencija urinarnih infekcija kako bi se pokušala smanjiti njihova incidencija u populaciji. U posljednje desetljeće su se uspješnima u

prevenciji urinarnih infekcija pokazali proizvodi od brusnice, D – manoz, probiotici te estrogen.

Proizvodi od brusnice sadrže proantocijanidine (plavi i ljubičasti pigmenti u biljkama), a u svrhu prevencije upotrebljavaju se u obliku ekstrakta brusnice, soka ili tableta. Djeluju na način da inhibiraju adheziju bakterija na stanice uroepitela pa time bakterije nisu u mogućnosti dospjeti u sluznicu urinarnog trakta (11). D – manoz je monosaharid koji se prirodno nalazi u biljkama poput prethodno spomenute brusnice, a pritom se brzo apsorbira i kroz pola sata dolazi do perifernih organa te se na kraju izlučuje putem urinarnog trakta. Pritom, djeluje tako da smanjuje prijanjanje bakterija na sluznicu mjehura (12). Upotreba intravaginalnih ili oralnih probiotika može biti korisna u obnovi prirodne mikrobiote, a pritom i vodi postupnom smanjenju potrošnje antibiotika. Estrogen je ženski spolni hormon važan za regulaciju ženskog reproduktivnog sustava, ali sudjeluje i u smanjenju vaginalnog pH te potiče proliferaciju laktobacila. Uz to, bitan je kod inhibicije razmnožavanja bakterija te ima ulogu u pojačavanju antimikrobnog potencijala uroepitela (11).

1.2. Enterokoki

1.2.1. Taksonomija enterokoka

U prošlosti, za enterokoke se smatralo da su komenzalne, bezopasne bakterije koje mogu imati brojne pozitivne učinke na razna gastrointestinalna stanja. Međutim, mnogobrojne studije i istraživanja dokazala su da enterokoki ipak mogu uzrokovati neželjene infekcije ako je komenzalizam s domaćinom narušen (13).

Termin „enterokok“ datira iz 19. stoljeća kada Thiercelin prvi puta opisuje Gram – pozitivni, saprofitni kok koji izaziva infekciju, a podrijetlom je iz crijeva (14). Krajem 19. stoljeća, enterokoki su nazivani streptokokima D skupine zbog D – antigena pronađenog u staničnoj stijenci, no 1984. godine je na temelju DNA hibridizacijskih analiza ustanovljeno da se enterokoki razlikuju od ostalih streptokoka D skupine pa su tako klasificirani u rod *Enterococcus* (*E*) (2). Na osnovu biokemijskih, morfoloških i fizioloških karakteristika, enterokoki pripadaju u koljeno *Firmicutes* te u obitelj *Enterococcaceae*, a trenutno rod *Enterococcus* broji više od 50 vrsta (15).

1.2.2. Strukturna građa i karakteristike enterokoka

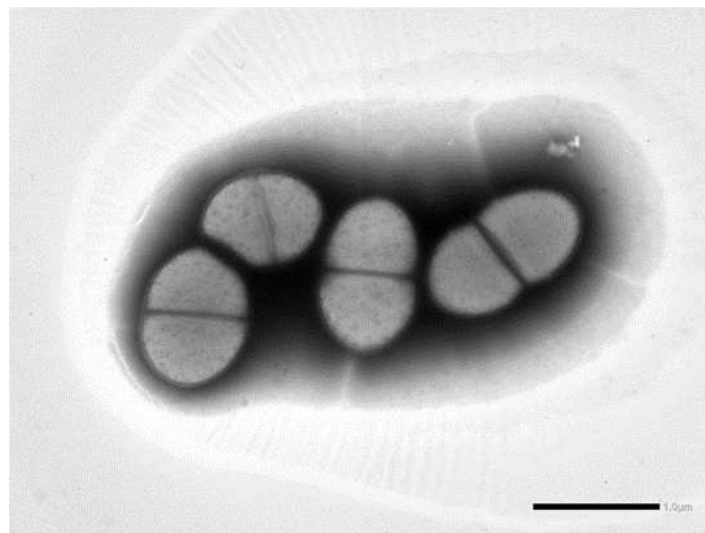
Enterokoki su Gram – pozitivne, na katalazu negativne, fakultativno anaerobne bakterije mliječne kiseline kuglastog oblika te se kao takve pojavljuju u obliku diplokoka ili u kratkim lancima.

Radi se o vrlo izdržljivim bakterijama koje mogu podnijeti razne nepovoljne uvjete te preživjeti u stresnom okolišu, uključujući temperaturni raspon 10 – 45 °C (optimum 35 – 37 °C) i raspon pH 4.6 – 9.9. Također, podnose i visoku koncentraciju natrijevog klorida do 6.5%, žučne soli do 40% te isušivanje iako ne proizvode spore (16).

Sve navedeno enterokoke čini idealnima za primjenu fermentacije, no upravo ove karakteristike dodatno kompliciraju njihovo uklanjanje i kontrolu (13).

1.2.3. Epidemiologija i ekologija enterokoka

Enterokoki su sastavni dio ljudskog mikrobioma – donjeg gastrointestinalnog trakta, genitalnog trakta i usne šupljine. U crijevu čovjeka prirodno se nalazi od 10^6 do 10^7 enterokoka, a većina otpada na *E. faecalis* i *E. faecium* (Slika 4.) (15). Uz navedene, *E. gallinarum* i *E. casseliflavus* imaju medicinsku važnost jer posjeduju urođenu rezistenciju na vankomicin. Jedni su od vodećih uzročnika nozokomijalnih infekcija, a pojavom na vakomicin rezistentnih enterokoka (VRE) pojavile su se i enterokokne infekcije epidemijskih razmjera (2).



Slika 4. Bakterija *E. faecium* snimljena transmisijskim elektronskim mikroskopom.

Otpornost enterokoka doprinijela je njihovom naseljavanju različitih sredina, uključujući vodu, tlo i kanalizaciju te ne samo probavni sustav čovjeka, već i probavnih sustav različitih sisavaca, ptica, gmazova i vodozemaca. Nedavnim ekološkim studijama potvrđena je njihova jednostavna izolacija iz okoliša, prehrambenih proizvoda (riba, kobasice, sir) te biljaka (npr. masline). Neke od vrsta enterokoka su komenzali pa iz tog razloga mogu stimulirati imunološki sustav, a imaju i važnu ulogu kod održavanja homeostaze crijeva. Također, enterokoki posjeduju probiotička svojstva te se kao probiotici mogu upotrebljavati kao dodatak prehrani, a važni su i kod fermentacije sireva i mesa kao početne kulture te kod

konzerviranja hrane budući da proizvode bakteriocine (15). Zbog široke rasprostranjenosti, lakoće uzgoja i otpornosti, enterokoki se upotrebljavaju i kao indikatori fekalne kontaminacije i komponenta su higijenskih normativa za vodu (13).

1.2.4. Bakterijska adhezija i patogenezna enterokoka

Bakterijska adhezija označava dinamične i složene interakcije kojima bakterije adheziraju na receptorska mjesta. Svaka infekcija u organizmu započinje upravo bakterijskom adhezijom te je iz tog razloga bitno spriječiti njezino pojavljivanje. Nakon bakterijske adhezije na odgovarajuću površinu, bakterije nastavljaju rasti te dolazi do stvaranja biofilma. Biofilm pruža enterokokima zaštitu od antibiotika, UV svjetla i drugih antimikrobnih sredstava, a pritom matrica biofilma djeluje kao biokemijski i mehanički štit koji osigurava povoljne, prikladne uvjete za bakterije (17).

Enterokoki kodiraju nekoliko adhezina i to enterokokni površinski protein (engl. *enterococcal surface protein*, Esp), kolagenski adhezin (engl. *collagen adhesin*, Ace), enterokokni polisaharidni antigen (engl. *enterococcal polysaccharide antigen*, Epa) te pili povezane s endokarditisom i biofilmom (engl. *endocarditis and biofilm associated pili*, Ebp) (7). Esp je protein koji je povezan sa staničnom stijenkom, dok je gen *esp*, koji se sastoji se od 5 622 parova baza, najčešći u izolatima koji su dobiveni od infekcija. Vjeruje se da stimulira adheziju i kolonizaciju, pridonosi formiranju biofilma, ali ima i ulogu u izbjegavanju imunološkog sustava domaćina. Također, važnu ulogu u formiranju biofilma ima i Ebp čiji se operon sastoji od *ebpA*, *ebpB*, *ebpC* i pridruženog gena *srtC* (kodira sortazu C) (18). Ace je izražen nakon rasta u serumu ili u prisustvu kolagena te je uključen u patogenezu enterokoknih infekcija. Također, bitan je faktor koji je povezan s virulencijom, a nedavno istraživanje je pokazalo da je i obećavajući cilj za profilaktičku terapiju protiv enterokoka (19). Enterokoki proizvode površinski polisaharid Epa koji je nužan za formiranje biofilma, patogenezu, otpornost na antibiotike, ali ima u ulogu tijekom rasta i dioba stanica (20).

Spomenuti adhezini nalaze se na površini enterokoka i pomoću njih se bakterije vežu za stanice probavnog sustava, a pritom dolazi do izlučivanja izvanstaničnih proteina s proteolitičkim (gelatinaze, proteaze) i hemolitičkim (citolizini) djelovanjem. U virulenciji enterokoka bitan je i protein Gls24 koji ima ulogu u rezistenciji prema solima žuči te agregacijski proteini čija je uloga povećanje prijanjanja i ulazak enterokoka u stanice domaćina (2).

1.2.5. Klinička slika

U posljednje vrijeme zabilježen je značajan porast enterokoknih infekcija u zdravstvenim ustanovama te su najrizičnije skupine stariji, kronično bolesni pacijenti izloženi složenim abdominalnim operacijama ili bolesnici podvrgnuti peritonejskim dijalizama. Također, podložnost infekcijama enterokoka povezuju se i sa zloćudnim bolestima, gastrointestinalnim poremećajima, bolestima jetre i bilijarnog sustava i upotrebom katetera (peritonejski, vaskularni). Otprilike 15% svih bolničkih urinarnih infekcija, bakterijemija i intraabdominalnih infekcija uzrokuju upravo enterokoki. Najčešća vrsta izolirana iz humanih uzoraka je *E. faecalis* (80 – 90% izolata), slijedi ga *E. faecium* (5 – 10% izolata), dok su ostale enterokokne vrste rijetke (*E. casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum*).

Najčešća klinička prezentacija infekcije enterokokom je bakterijemija gdje je smrtnost vrlo visoka (35%), a glavni čimbenici koji dodatno utječu na moguć smrtni ishod su starija životna dob, teške preegzistentne bolesti, prethodna antimikrobna terapija. Zabilježen je i velik broj drugih kliničkih manifestacija kojima je uzrok enterokok, ali infekcije najčešće nisu teške, a jedinstvena klinička slika ne postoji (Tablica 1.) (2,21).

Tablica 1. Najčešće kliničke manifestacije enterokoknih infekcija

Tip infekcije	% uzrokovan enterokokom
Endokarditis	5 – 20
Urinarne infekcije	5 u prethodno zdravih, mladih žena 15 nozokomijalnih infekcija
Intraabdominalne infekcije	15
Spontani peritonitis	5 – 10
Nozokomijalna bakterijemija	5 – 10
Neonatalna sepsa	5
Meningitis	0,3 – 4
Apsces jetre, pluća i mozga	Rijetko
Pneumonija	Rijetko

1.2.6. Laboratorijska dijagnostika

Uzorci poput mokraće, punktata i obriska rane uzgajaju se na neselektivnim medijima (krvni agar), dok se kod uzoraka poput obriska rektuma ili stolice upotrebljavaju selektivni mediji. Nakon uzgoja od 24 sata na krvnom agaru, dolazi do stvaranja α – hemolitičkih i nehemolitičkih kolonija promjera 1 – 2 mm. Zbog svog fermentativnog metabolizma, enterokoki proizvode mliječnu kiselinu koja je produkt fermentacije glukoze.

U kliničkoj mikrobiologiji postoje i automatizirani i neautomatizirani komercijalni sustavi koji se upotrebljavaju u svrhu identifikacije bakterija, a na taj se način mogu detektirati i različite vrste enterokoka (21).

1.2.7. Liječenje enterokoka

U posljednje vrijeme, rezistencija enterokoka na često korištene antibiotike značajan je problem koji je sve više u porastu. Rezistencija se dijeli na intrinzičnu koja je kodirana kromosomom pa je tako svojstvena za sve enterokoke i stečenu koja je varijabilna i samim time posljedica je mutacija. Lijekovi prvog izbora kod enterokoknih infekcija su ampicilin i penicilin, a ako se radi o izolatima enterokoka koji proizvode β – laktamazu, upotrebljavaju se inhibitori β – laktamaza (sulbaktam, klavulanska kiselina). Ukoliko je riječ o teškim infekcijama poput endokarditisa ili meningitisa, koristi se kombinirana terapija antibiotika koji utječu na staničnu stijenku (penicilin, ampicilin, vankomicin) i aminoglikozida (gentamicin), a takva terapija podigla je stope izlječenja s 40% na otprilike 85% (2,21).

Sve veći problem današnjice su i VRE koji su vodeći uzrok infekcija povezanih sa medicinskom skrbi, a njihova rezistencija na veliku većinu raspoloživih antibiotika čini ih kliničkim izazovom za liječenje. Rezistencija na vankomicin uzrokovana je promjenama u zadebljanju stanične stijenke, genomske plastičnosti i u prekursorima peptidoglikana. Međutim, trenutne terapijske mogućnosti za VRE su linezolid i daptomicin, no potrebno je bolje razumijevanje mehanizama i kliničke uloge rezistencije u svrhu što bolje optimizacije njihove primjene (22).

1.3. Antibiotici i liječenje urinarnih infekcija

Antibiotici su lijekovi kojima je primarna karakteristika selektivna toksičnost – toksični su za bakterije, a netoksični ili slabo toksični za organizam (21). Primjena antibiotika u klinici smatra se jednim od najvećih medicinskih postignuća 20. stoljeća. Uz liječenje zaraznih bolesti, upotreba antibiotika olakšala je i druge medicinske postupke poput transplantacije organa, operacije na otvorenom srcu, ali je i pripomogla u liječenju raka (23).

1.3.1. Razvoj antibiotika

Temelj suvremene medicine postavljen je krajem 19. stoljeća kad je Paul Ehrlich (koji je radio s *in vivo* bojama) razvio teoriju o sparivanju spojeva koji mogu ući u stanice s toksinima. Njegov rad omogućio je razvoj salvarsana, prvog antibakterijskog lijeka. 1935. godine Gerhard Domagk dolazi do saznanja da je prontosil (crvena boja), efikasan za infekcije streptokokom te je on prvi lijek sulfonamidne skupine. Iako danas skoro i nije u upotrebi jer postoje bolje mogućnosti liječenja, prontosil je široko upotrebljavan kroz 20. stoljeća, naročito tijekom Drugog svjetskog rata.

Salvarsan i prontosil bili su glavni lijekovi početaka upotrebe antimikrobne terapije, ali premda su bili baktericidni, radilo se o sintetskim molekulama. Penicilin, prvi pravi antibiotik, otkrio je je Alexander Fleming 1928. godine uz opažanje da gljivica *Penicillium notatum* inhibira rast stafilokoka na agaru. Daljnja istraživanja dovela su do efektivnije izolacije, identifikacije i pročišćavanja penicilina, a ustanovljeno je i da gljivica *Penicillium chrysogenum* proizvodi puno više penicilina od *Penicillium notatum* (24).

1.3.2. Podjela antibiotika

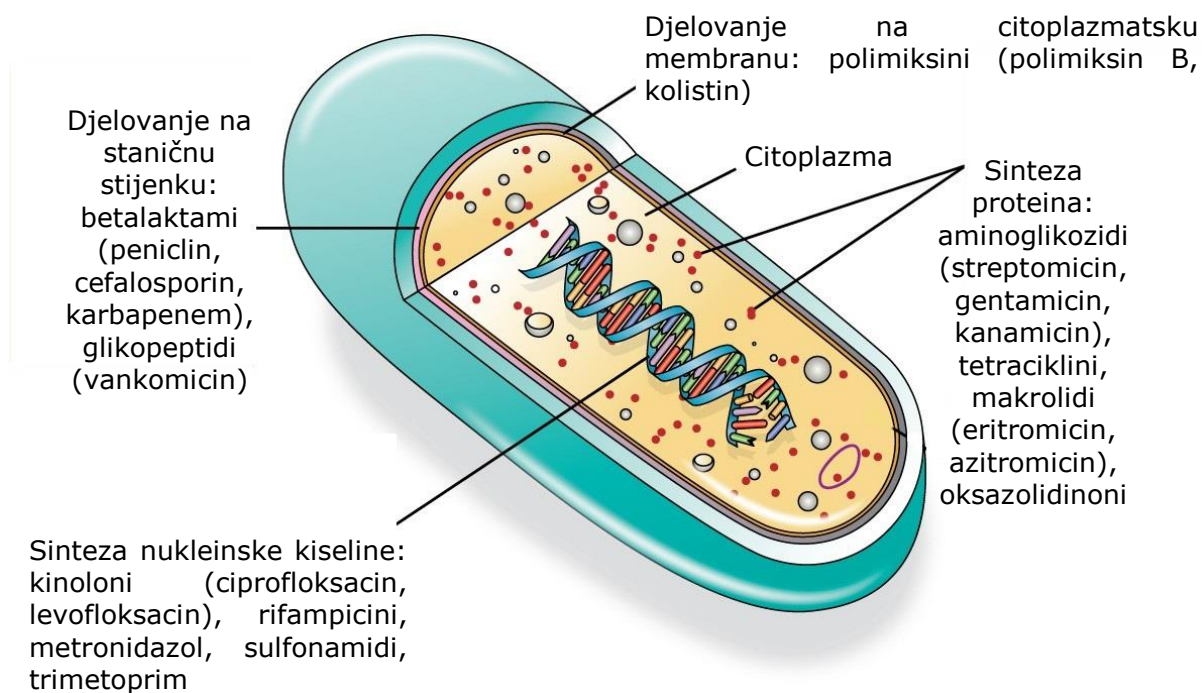
Nekoliko je načina podjele antibiotika, ali najčešće se podjele baziraju na temelju njihove molekularne strukture, spektru aktivnosti i načinu djelovanja. Antibiotici istog razreda pokazuju sličan način djelovanja, toksičnosti i mogućih alergija.

Najpoznatija podjela antibiotika temeljena prema njihovim molekularnim i kemijskim strukturama uključuje betalaktamske antibiotike, aminoglikozide, makrolide, tetracikline, kinolone, sulfonamide i glikopeptide (25).

1.3.3. Mehanizam djelovanja

Antibiotici posjeduju bakteriostatičko djelovanje gdje bakterijsku stanicu zaustavljaju u rastu i razmnožavanju, ali je pritom ne ubijaju. Međutim, postoji i baktericidno djelovanje gdje antibiotik ubija bakteriju. Pritom, antibiotici mogu djelovati na specifične procese u bakterijskoj stanici i tako dovesti do prestanka njezinog rasta i razmnožavanja ili do smrti stanice (Slika 5.):

- a) Djelovanje na citoplazmatsku membranu manifestira se poremećajem funkcionalne kompaktnosti membrane, a antibiotici koji ometaju funkciju citoplazmatske membrane su polimiksni.
- b) Djelovanje na staničnu stijenku bakterije je ustvari utjecaj na sintezu prekursora peptidoglikana ili na ukomponiranje prekursora u staničnoj stijenci i oblikovanje peptidoglikanskog sloja. Ključni antibiotici ove skupine su betalaktamski i glikopeptidni antibiotici.
- c) Ometanje sinteze proteina je princip djelovanja većine antibiotika. Najznačajniji predstavnici su makrolidi, tetraciklini, aminoglikozidi i linkozamidi.
- d) Ometanje sinteze nukleinskih kiselina vrlo je efikasan princip djelovanja antibiotika, a skupine takvih antibiotika su kinoloni, sulfonamidi i rifampicini (21).



Slika 5. Mjesta djelovanja različitih skupina antibiotika na bakterijsku stanicu (21).

1.3.4. Antimikrobna rezistencija

Antimikrobna rezistencija (AMR) postaje jedna od vodećih globalnih prijetnji ljudskom zdravlju 21. stoljeća, a recentna istraživanja tvrde da bi AMR mogao biti poguban za 10 milijuna ljudi godišnje do 2050. godine (26).

Do antimikrobne rezistencije dolazi kad se bakterijske stanice, virusi, paraziti i gljivice izmijene i više ne reagiraju na korištene lijekove, a najčešće se radi o genetskim promjenama zbog evolucije prirodnom selekcijom. Posljedica nastale rezistencije na lijekove dovodi do neučinkovitosti antibiotika i antimikrobnih lijekova pa samim time infekcije postaju teže, njihovo liječenje predstavlja izazov te se povećava rizik od širenja bolesti. Jedan od glavnih razloga velike upotrebe antibiotika je još uvijek nedovoljno razumijevanje razlika između bakterija, virusa i ostalih patogena te neznanje o adekvatnoj upotrebi antibiotika (27).

1.3.5. Liječenje urinarnih infekcija

Pacijentima kojima je dijagnosticirana bilo koja vrsta urinarne infekcije potrebno je osigurati obilnu hidrataciju, a po potrebi i mirovanje, analgetike i antipiretike. Nakon 48 – 72 h (nakon kliničkog poboljšanja), parenteralnu terapiju potrebno je zamijeniti oralnom.

Također, kad su nalazi urinokulture raspoloživi, potrebno je empirijsku terapiju uskladiti s antibiogramom, a liječenje mora biti bazirano na antibiotiku koji ima najuži spektar te djelotvorno utječe na utvrđenog uzročnika.

Na temelju ISKRA (Interdisciplinarna sekcija za kontrolu rezistencije na antibiotike) smjernica, trenutno se primjenjuje nekoliko antibiotika za liječenje urinarnih infekcija (Tablica 2.) (28).

Tablica 2. Antibiotici u upotrebi kod liječenja različitih urinarnih infekcija

Vrsta urinarne infekcije	Liječenje	
	Prvi izbor	Alternativa
Akutni nekomplikirani cistitis	Nitrofurantoin, fosfomicin	Koamoksiklav, cefaleksin, norfloksacin
Akutni nekomplikirani pijelonefritis	Koamoksiklav	Cefalosporini II. Ili III. generacije, gentamicin
Komplicirane urinarne infekcije	Koamoksiklav	Ceftibuten, ciprofloksacin, gentamicin
Urinarne infekcije u muškaraca	Ciprofloksacin	Koamoksiklav, ceftibuten
Asimptomatska bakteriurija	Bez liječenja, osim kod trudnica i bolesnika s invazivnim urološkim intervencijama – koamoksiklav, ceftibuten, nitrofurantoin	
Rekurentne urinarne infekcije	Amoksicilin, cefaleksin, trimetoprim	Kotrimoksazol, ciprofloksacin

1.3.6. Gentamicin i nitroksolin

Gentamicin pripada u skupinu aminoglikozida, a pritom pokazuje baktericidno djelovanje u borbi protiv aerobnih Gram – negativnih bakterija. Vrlo je učinkovit u terapiji kod infekcija koje uzrokuju mikroorganizmi obitelji *Enterobacteriaceae* (npr. *E. coli*, *K. pneumoniae* i *Enterobacter* spp.). Zbog njegove minimalne gastrointestinalne apsorpcije, najčešće se administrira parenteralno uz topikalne i sistemske formulacije.

Na temelju smjernica Američke Agencije za hranu i lijekove (FDA), gentamicin se može primijeniti na temelju prikladnih epidemioloških podataka i informacijama o osjetljivosti. Zbog toga, koristi se u stanjima poput bakterijske septikemije, urinarnih infekcija, infekcijama gastrointestinalnog trakta i meningitisa. Također, ponekad se i primjenjuje u kombinaciji s drugim antibioticima (naročito betalaktamskim antibioticima koji razbijaju staničnu stijenku bakterije) i to kod teških infekcija kao što su enterokokne bakterijemije i bakterijski endokarditis.

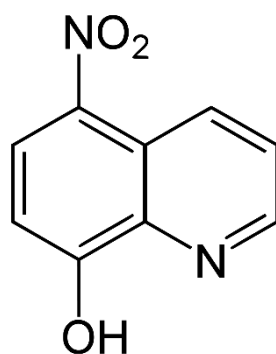
Kao što je već spomenuto, gentamicin djeluje baktericidno što znači da nepovratno ubija bakterije. On prolazi kroz Gram – negativnu membranu bakterija tijekom aktivnog transporta ovisnog o kisiku te tako ulazi u citoplazmu bakterije. U citoplazmi se veže za 16s rRNA na 30s podjedinicu ribosoma, ometa translaciju mRNA što rezultira stvaranjem nefunkcionalnih proteina.

Poput svih aminoglikozida, gentamicin pokazuje efikasno ubijanje bakterija ovisno o koncentraciji, tj. više koncentracije gentamicina povezane su s većim antimikrobnim ubijanjem. Usto, kod najnovijih istraživanja opaženi su mogući sinergistički učinci aminoglikozida u kombinaciji s drugim lijekovima na Gram – pozitivne bakterije, no točan mehanizam još nije potvrđen (29).

Nitroksolin (5-nitro-8-hidroksikinolin, NIT) je aromatski heterociklički spoj, a pripada u skupinu derivata 8-hidroksikinolina s vrlo širokim rasponom nefarmakoloških i farmakoloških upotreba. Temeljem klasifikacije antibakterijskih lijekova, nitroksolin ne pripada nijednoj uobičajenoj klasi zbog čega se i u posljednje vrijeme najčešće koristi za liječenje infekcija koje uzrokuju uropatogeni rezistentni na veliku većinu antibakterijskih lijekova.

Antibakterijsko djelovanje, bioaktivnost i inhibicija stvaranja bakterijskog biofilma, manifestiraju se zbog svojstava keliranja nitroksolina. Jednostavna i mala struktura jezgre nitroksolina sadrži fenol i pirimidinski prsten te hidroksi skupinu o kojoj ovise svojstva kelacije (Slika 6.). Para položaj i prisutnost nitro skupine (-NO₂) važni su za načine djelovanja nitroksolina (engl. *modes of action*, MOA), a pritom nijedan derivat 8-hidroksikinolina ne ispoljava takvo antibakterijsko djelovanje. Također, p- položaj nitro skupine odgovoran je za pojačavanje kiselosti hidroksilne skupine pa se na taj način povećava sposobnost keliranja (30).

Nitroksolin djeluje bakteriostatski na Gram – pozitivne i Gram – negativne bakterije koje su uzrok urinarnih infekcija, a prikladan je i za njihovu profilaksu i recidive. Pojam bakteriostatskog djelovanja odnosi se na antibiotike koji inhibiraju rast i razmnožavanje bakterija, a pritom djeluju reverzibilno i zajedno s imunološkim sustavom. Na nitroksolin su osjetljive i mikroplazme (npr. *Ureaplasma urealyticum*), dok se mikroorganizmi roda *Pseudomonas* uglavnom smatraju rezistentnima (31).



Slika 6. Struktura nitroksolina

(preuzeto: <https://en.wikipedia.org/wiki/Nitroxoline>).

1.3.7. Prirodne tvari za liječenje urinarnih infekcija

Velik broj biljaka i biljnih pripravaka sadrži niz tvari koje doprinose njihovom antimikrobnom učinku. Primarna skupina spojeva koji su odgovorni za antimikrobni učinak jesu polifenoli – sekundarni metaboliti biljaka koji pridonose okusu, boji, mirisu, gorčini i oksidativnoj stabilnosti biljaka. Pritom, imaju i širok raspon bioloških učinaka, od kojih su najbitniji protuupalni, antimikrobni, antioksidativni, antikancerogeni i kardioprotektivni.

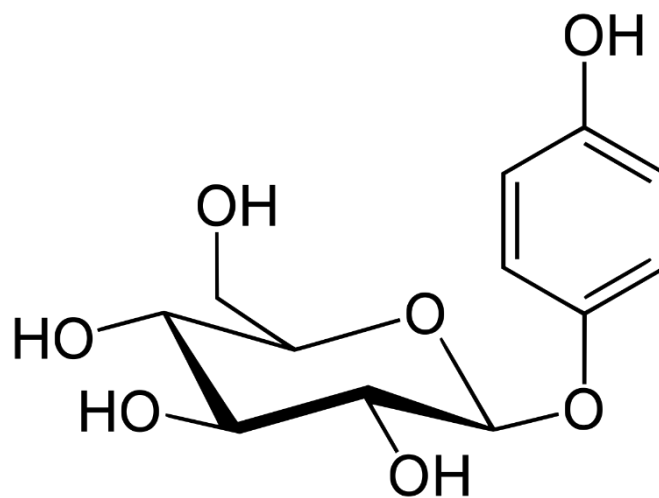
Općenito su najčešći mehanizmi djelovanja antimikrobnih tvari na bakterije narušavanje transmembranskog i aktivnog transporta, inhibicija anaboličkih i kataboličkih reakcija, gubitak integriteta stanične membrane, onemogućavanje procesa stvaranja energije respiratornim lancem te izravna liza stanica. Antimikrobna aktivnost biljaka i biljnih pripravaka pripisuje se mnogostrukim mehanizmima, a u usporedbi s antibioticima, potencijal bakterijskih stanica za razvijanje rezistencije na biljne antimikrobne tvari je relativno manji. Iz tog se razloga u liječenju urinarnih infekcija primjenjuju biljni pripravci obične planike, zimzelene medvjete te uvin čaj (32).

1.3.8. Arbutin i hidrokinon

Arbutin (hidrokinon- β -D-glukopiranozid), prirodan spoj biljnih vrsta *Rosaceae*, *Betulaceae* i *Ericaceae*, biljke sintetiziraju tijekom obrane od infekcija koje uzrokuju razni patogeni te u stresnim uvjetima (vrlo niske ili visoke temperature). Za arbutin se vjeruje da je jedan od najvažnijih fenolnih spojeva, a nalazi se u kori, listovima i plodovima biljnih vrsta kao što su obična planika i medvjeta. Zbog prisutnosti hidroksilne skupine u kemijskoj građi (Slika 7.), arbutin posjeduje antioksidativan učinak, a inhibicija proliferacije patogena ostvaruje se zbog njegovog oksidativnog potencijala.

Arbutin se apsorbira u debelom crijevu i to putem nosača glukoze, a djelovanjem crijevne mikroflore se metabolizira u sulfatne konjugate i glukuronide. Arbutin se u crijevnim resicama unutar 24 sata metabolizira i u hidrokinon koji predstavlja aktivniji oblik arbutina (33).

Naširoko se koristi za liječenje urinarnih infekcija, ali i za liječenje bubrežnih kamenaca. Sve više studija dokazuje antioksidativna svojstva arbutina koja bi mogla pripomoći u kožnim depigmentacijama, a upotrebljava se i kao alternativa hidrokinonu u posvjetljivanju kože (34).



Slika 7. Struktura arbutina sastavljena od hidrokinona i D – glukoze (preuzeto: <https://en.wikipedia.org/wiki/Arbutin>).

Hidrokinon (Benzen-1,4-diol)

Hidrokinon je aromatski, fenolni spoj koji se sastoji od benzenskog prstena i dvije –OH skupine, a nastao je razgradnjom arbutina. Razgradnja arbutina odvija se pomoću β – glukozidaze u enterocitima crijevnih resica debelog crijeva. Hidrokinon je sastojak mnogih namirnica biljnog podrijetla poput kruške, brokule, pšeničnih proizvoda. Primjenjuje se za izbjeljivanje kože, kao antioksidans za masti i ulja te kao polimerizacijski inhibitor. Raspoloživ je u obliku bijelih kristala, a u dodiru sa zrakom i vodom dolazi do tamnjenja boje i oksidacije (35,36).

Neke bakterije gastrointestinalnog trakta u alkalnom mediju metaboliziraju arbutin do hidrokinona pa se zbog svog antimikrobnog, antimutagenog, antioksidacijskog i antikancerogenog učinka upotrebljava za liječenje urinarnih infekcija. Uz brojne pozitivne učinke, negativni se učinci manifestiraju enzimima potpomognutom aktivacijom ili autooksidacijom. Prilikom oksidacije nastaje kancerogeni p – benzokinon, a u crijevnoj mikroflori otkrivena su nefrotoksični, hepatotoksični i mutageni efekti (33).

2. Cilj rada

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati pojedinačni utjecaj različitih antimikrobnih tvari, ali i njihove kombinacije na krivulje rasta dva soja *E. faecalis*. Antimikrobne tvari koje smo izabrali ispitati bile su nitroksolin (N), gentamicin (G) te hidrokinon (H). Sljedeći cilj bio je ispitati učinak kombinacije dva antibiotika (N + G) te kombinacije antibiotika i fenola (N + H). Također, za svaku antimikrobnu tvar cilj je utvrditi minimalnu inhibitornu koncentraciju kako bi dobili frakcijsku inhibitornu koncentraciju i frakcijski inhibitorni indeks. Na temelju frakcijskog inhibitornog indeksa, pokušale su se odrediti interakcije između antimikrobnih tvari, a pozornost će se obratiti na kombinacije koje uzrokuju sinergiju. Uz sve navedeno, za sve tri antimikrobne tvari i za oba soja, izračunat će se postoci inhibicije.

3. Materijali i metode

3.1. Bakterijski soj

U radu su korišteni sojevi *Enterococcus faecalis* – soj 36, soj 55 i standardni soj ATCC29212. Bakterije su čuvane u frižideru na temperaturi od 4°C, a uzgajane su na krvnom agaru u Petrijevim zdjelicama.

3.2. Priprema bakterijske suspenzije

U tri staklene epruvete s čepom (označene 10^8 CFU/ml, 10^7 CFU/ml, 10^6 CFU/ml) stavljen je Müller – Hinton Broth (MHB). U prvu je stavljeno 2 ml MHB-a, u drugu 1.8 ml, a u treću 9 ml MHB-a. Potreban soj enterokoka uzet je i prenesen mikrobiološkom ušicom (ezom) iz Petrijeve zdjelice u prvu epruvetu. Ezom su bakterije najprije razmazane po unutrašnjosti epruvete, a nakon toga eza je umočena u MHB. Automatskom pipetom uzeto je 500 ml MHB-a te je preneseno u plastičnu kivetu. Kiveta je postavljena u spektrofotometar (Spectrophotometer: BioPhotometer, "Eppendorf", Njemačka) i mjerena je apsorbancija na 600 nm u svrhu kalibracije spektrofotometra. Iz prethodno pripremljene bakterijske suspenzije, automatskom mikropipetom prenijeto je 500 ml u čistu kivetu i mjerena je apsorbancija. Apsorbancija bi trebala biti u rasponu od 280 do 400 nm (ako je apsorbancija niža od 280 nm, dodaje se još bakterija, a ako je viša od 400 nm, razrjeđuje se MHB-om). Epruveta s bakterijskom suspenzijom promućkana je uz pomoć vorteksa (VORTEX 2 Shaker, IKA, Njemačka), a pritom je čep epruvete djelomično otvoren te je automatskom pipetom prenijeto 200 µl u drugu epruvetu (označena 10^7). Nakon toga, bakterijska suspenzija u drugoj epruveti je promućkana te je prebačen 1 ml u treću epruvetu kako bi se dobila suspenzija od 10^6 CFU/ml. Sadržaj posljednje epruvete prelio se u čistu plastičnu Petrijevu zdjelicu za što lakše i brže pipetiranje kasnije.

3.3. Priprema antibiotika

3.3.1. Priprema gentamicina

Računanjem je određeno da je za pripremu gentamicina koncentracije 512 µg/mL potrebno 512 µL gentamicina iz originalnog pakiranja te 9.488 mL MHB-a. Navedene vrijednosti gentamicina i MHB-a pomiješane su u plastičnoj epruveti s čepom.

3.3.2. Priprema nitroksolina

Izračunom je utvrđeno koliko miligrama nitroksolina treba za pripremu STOCK otopine koncentracije 1.024 mg/mL. Koncentracija korištenog nitroksolina iznosila je 256 µg/mL. Na temelju izračuna, u plastičnu epruvetu s čepom dodano je 5 mL STOCK otopine i 15 mL MHB-a te se taj nitroksolin upotrebljavao za daljnji rad.

3.4. Priprema hidrokinona

U staklenu Erlenmeyerovu tikvicu dodano je 5.9 g hidrokinona (bijeli prah), a masa hidrokinona određena je pomoću laboratorijske vage (precizna vaga: PB602-S, METTLER TOLEDO, SAD). Staklenom menzutom odmjerenom je 100 mL destilirane vode koja je potom dodana u tikvicu, a njen sadržaj dobro je promućkan. Na plastičnu epruvetu s čepom postavljen je sterilni filter za špricu, a pomoću šprice i sterilne igle izvađen je sadržaj tikvice koji je zatim i filtriran preko sterilnog filtera. Dobiveni hidrokinon, koncentracije 59 mg/mL, korišten je za rad.

3.5. Metoda šahovnice

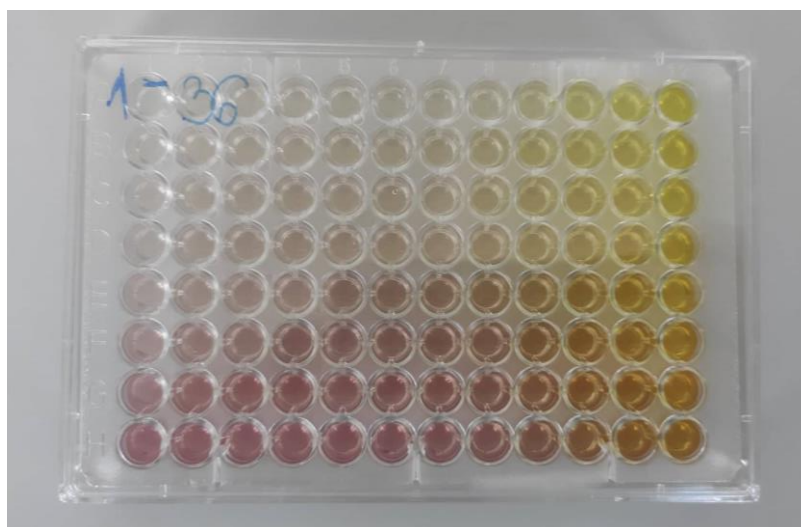
U svrhu dobivanja jedne mikrotitarske ploče koja sadrži različite kombinacije koncentracija dvaju antimikrobnih sredstava, napravljene su dvije ploče po principu šahovnice. Za hidrokinon i nitroksolin korištena je po jedna mikrotitarska ploča te su ploče na kraju spojene. U prvu mikrotitarsku ploču multikanalnom je pipetom dodano 50 µL MHB-a u sve jažice, osim u jažice stupaca 1 i 12. Nakon toga, u red A dodano je još 50 µL MHB-a, a zatim je samo u stupac 12 (od A12 do G12) dodano 100 µL nitroksolina koncentracije 256 µg/mL. Multikanalnom pipetom su

napravljeni serijska razrjeđenja od 50 μL i to od stupca 12 do stupca 2 te je na kraju iz stupca 2 izbačeno 50 μL suspenzije.

U drugu mikrotitarsku ploču dodano je 100 μL MHB-a u sve redove izuzev redova A i H. Automatskom pipetom je u red H dodano 200 μL hidrokinona koncentracije 59 mg/mL. Napravljeni su serijska razrjeđenja od 100 μL do reda B, tako da u svim jažicama ostane po 100 μL suspenzije.

Spajanje dviju mikrotitarskih ploča napravljeno je na način da je iz druge mikrotitarske ploče preneto 50 μL suspenzije u odgovarajući red prve mikrotitarske ploče (red B druge ploče u red B prve ploče; taj je postupak napravljen za sve jažice). Rezultat je bila jedna mikrotitarska ploča gdje je red A bio nitroksolin, dok je stupac 1 bio hidrokinon, a preostale jažice bile su mješavina hidrokinona i nitroksolina (Slika 8.). Na kraju, u sve jažice mikrotitarske ploče dodano je 100 μL prethodno pripremljene bakterijske suspenzije enterokoka koncentracije 10^6 CFU/mL.

Na mikrotitarsku ploču zalijepljen je sterilni, optički, ljepljivi film (MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, SAD) koji sprječava moguće kontaminacije mikrotitarske ploče, ali i prelijevanje nanijetih uzoraka u jažicama. Mikrotitarska ploča je umotana u aluminijsku foliju i odnijeta na analizu na Odjel za biotehnologiju u Rijeci.



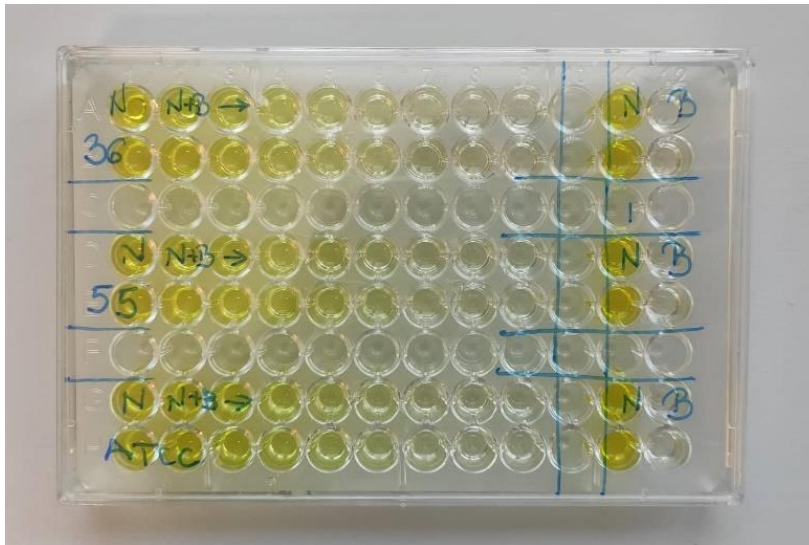
Slika 8. Pripremljena mikrotitarska ploča metodom šahovnice.

3.6. Mjerenje OD (engl. *optical density*)

Optička gustoća mjerena je uređajem Hidex Sense Microplate Reader (Hidex, Finska). Mikrotitarska ploča izvađena je iz aluminijske folije i s nje je skinut ljepljiv biofilm te je na ispravan način položena u uređaj. Na računalu koje je spojeno s uređajem odabran je esej *Kinetic OD(600)* za mikrotitarsku ploču za 96 uzoraka. Vrijeme analize podešeno je na 24 sata, temperatura je namještena na 37°C, a za opciju tresenja (engl. *shaking*) je odabrano linearno tresenje tijekom 24 sata. Sljedeći dan nakon završetka analize, rezultati su preneseni u MS Excel i spremljeni.

3.7. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)

U redove A, B, D, E, G i H mikrotitarske ploče do stupca 9 dodano je 200 µL antimikrobne tvari (gentamicin, hidrokinon, nitroksolin), a u stupce 11 i 12 (izuzev redova C i F) dodano je 100 µL antimikrobne tvari. U sve stupce (osim stupaca 1, 10, 11 i redova C i F) dodano je 100 µL MHB-a. Automatskom pipetom napravljena su serijska razrijeđena od 100 µL od stupca 1 do stupca 9, a prilikom prelaska iz većeg razrijeđena u manje, sadržaj jažica je resuspendiran pipetom. U sve jažice dodano je 100 µL prethodno napravljene bakterijske suspenzije. Odnosno, u redove A i B dodana je bakterijska suspenzija soja 36, u redove D i E bakterijska suspenzija soja 55, a u redove G i H bakterijska suspenzija standardnog soja ATCC29212. Mikrotitarska ploča (Slika 9.) analizirana je esejom *Kinetic OD(600)* tijekom 24 sata na 37°C pomoću uređaja Hidex Sense Microplate Reader. Nakon 24 sata, rezultati su očitani, analizirani i prikazani grafički u MS Excel-u.



Slika 9. Pripremljena i označena mikrotitarska ploča spremna za analizu.

4. Rezultati

4.1. Određivanje MIK vrijednosti za antimikrobne tvari

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobnog sredstva izraženog u mg/mL (ili µg/mL) koja u *in vitro* uvjetima u potpunosti sprječava vidljivi rast testiranog soja bakterija, tj. dolazi do potpune inhibicije bakterijskog rasta. Također, određivanje MIKa je bitno jer upravo te vrijednosti služe kao baza za procjenu osjetljivosti i rezistencije patogena na određeno antimikrobno sredstvo (37).

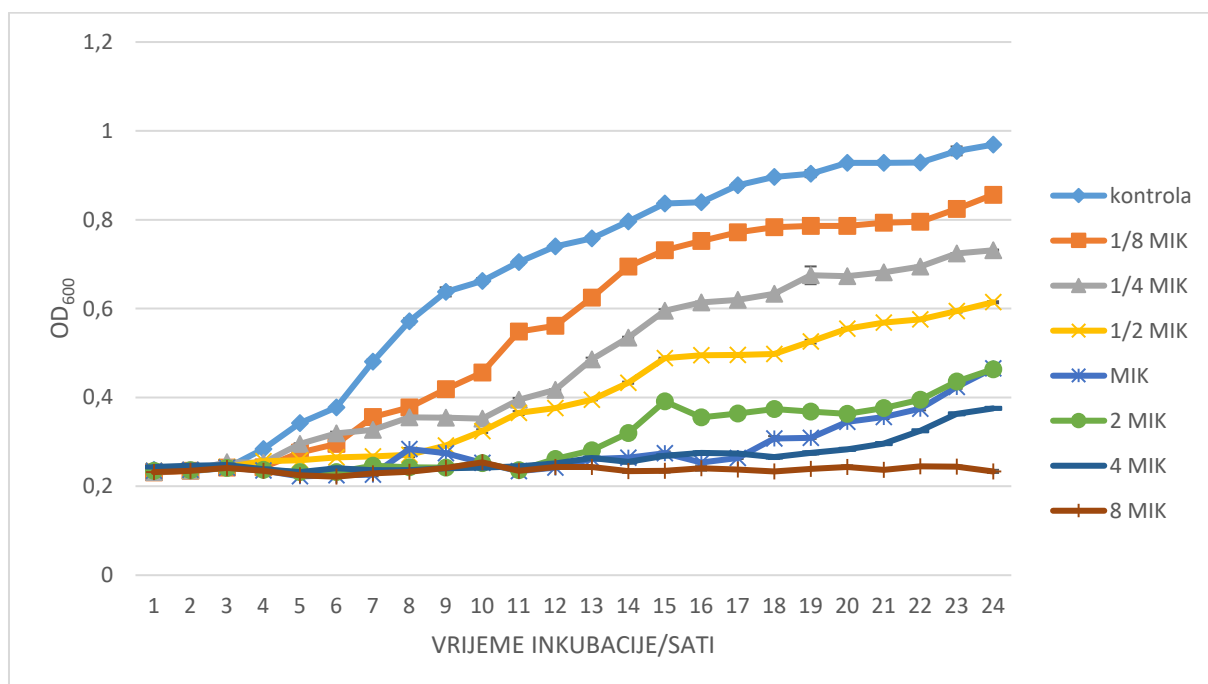
Za svaki od upotrijebljenih sojeva utvrđene su vrijednosti MIK (Tablica 3.), a te su koncentracije dovoljne da zamućenje, koje označava rast patogena, nije vidljivo nakon inkubacije na $35 \pm 2^\circ\text{C}$ tijekom 24 sata.

Tablica 3. MIK vrijednosti za gentamicin, nitroksolin i hidrokinon ovisno o soju *E. faecalis*

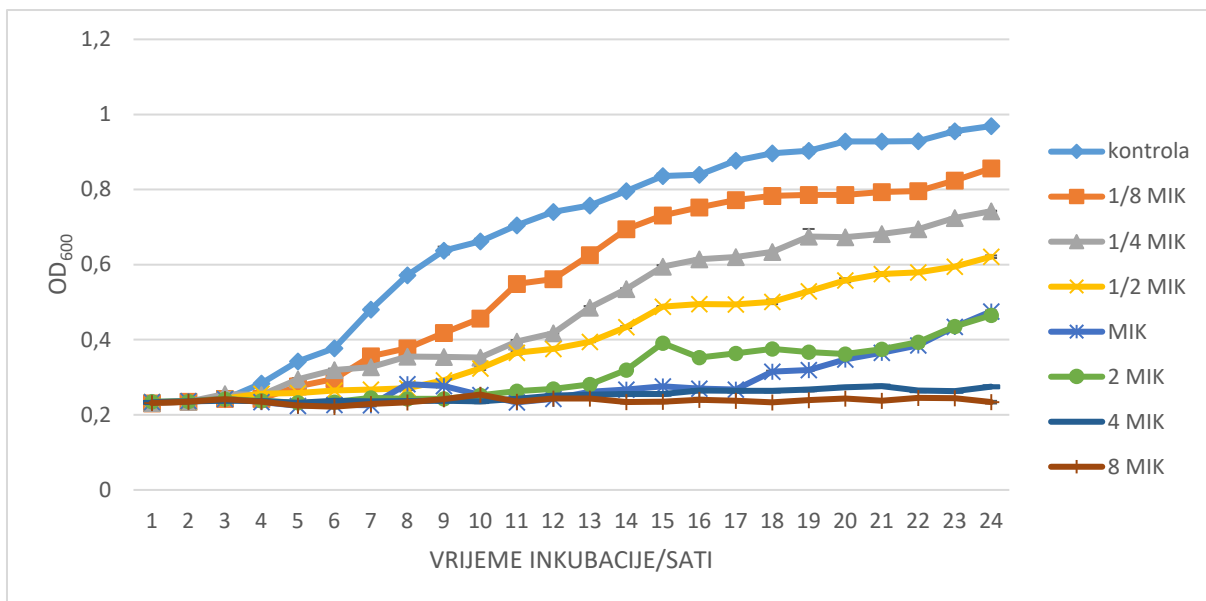
<i>E. faecalis</i> soj	Spoj		
	Nitroksolin	Gentamicin	Hidrokinon
	MIK/µg/mL		MIK/mg/mL
36	4	8	0,78
ATCC29212	8	8	1,56

Metoda mjerenja optičke gustoće rasta bakterija je jedna od najčešćih tehnika koje se upotrebljavaju u mikrobiologiji. Spomenuta metoda koristi se prvenstveno za istraživanje učinkovitosti antibiotika, ispitivanje rasta patogena u različitim uvjetima i karakterizaciju mutiranih sojeva. Mjerenje optičke gustoće provodi se na temelju hipoteze da je dobivena vrijednost optičke gustoće proporcionalna broju stanica, odnosno koncentraciji uzorka (38).

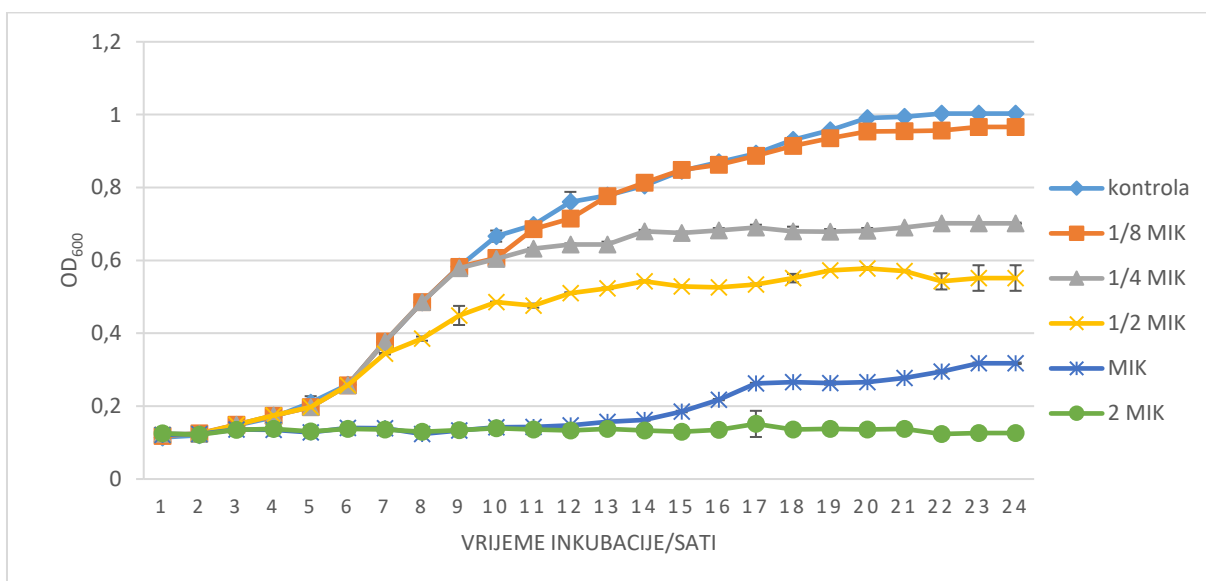
Mjerenjem optičke gustoće, dobivene su krivulje rasta enterokoka nakon tretmana različitim antimikrobnim sredstvima različitim koncentracija u vremenu od 24 sata (Slika 10., 11., 12., 13., 14., 15.). U usporedbi s krivuljama kontrole, krivulje rasta enterokoka opadaju kako se povećava koncentracija primijenjenog antimikrobnog sredstva. Na osnovi toga, najveća koncentracija antimikrobnog sredstva predstavlja krivulje koje su najbliže apscisi.



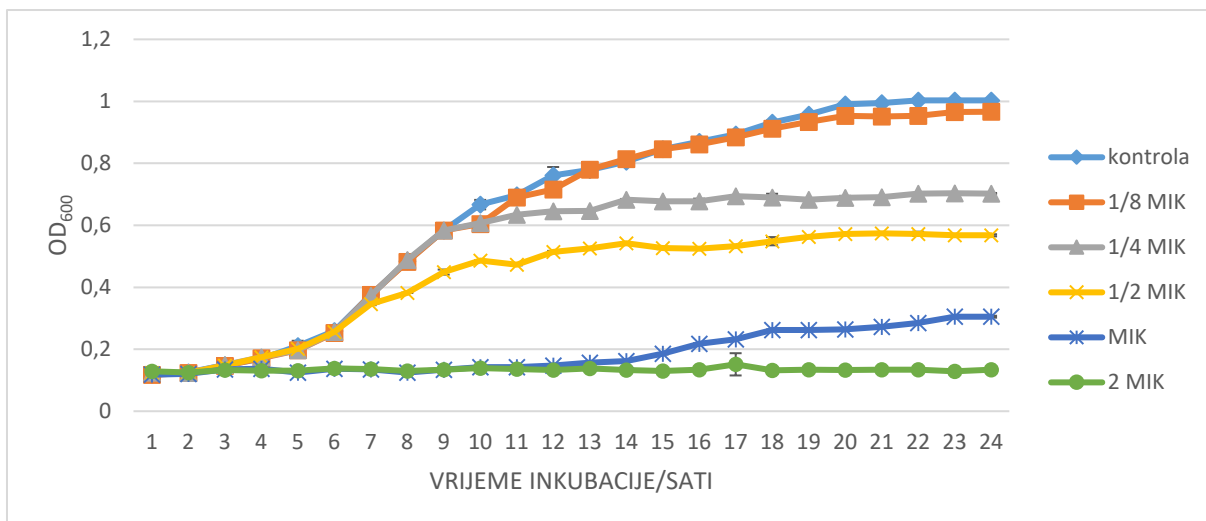
Slika 10. Krivulja rasta enterokoka (soj 36) nakon primjene različitih koncentracija nitroksolina. Krivulje rasta prikazane su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija, a pokus je ponovljen tri puta.



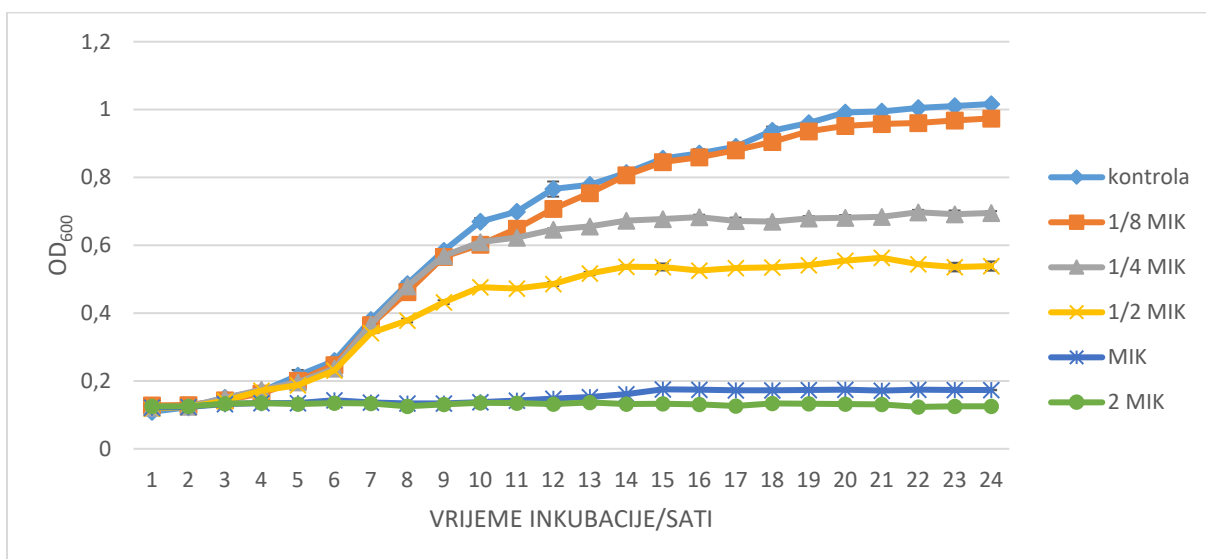
Slika 11. Krivulja rasta enterokoka (soj ATCC29212) nakon primjene različitih koncentracija nitroksolina. Krivulje rasta prikazane su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija, a pokus je ponovljen tri puta.



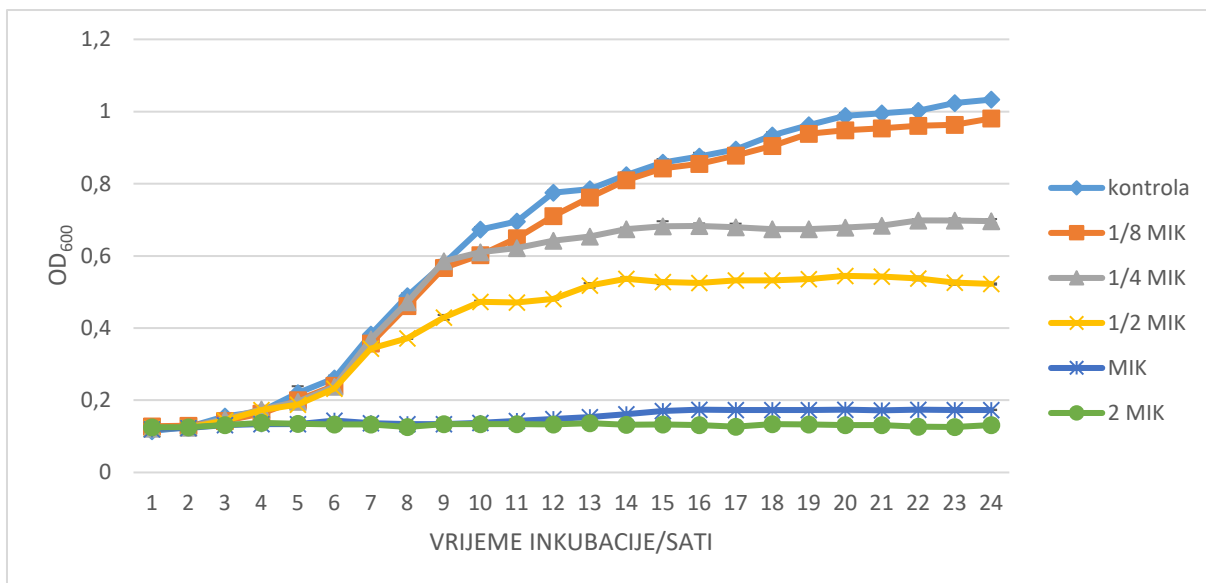
Slika 12. Krivulja rasta enterokoka (soj 36) nakon primjene različitih koncentracija gentamicina. Krivulje rasta prikazane su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija, a pokus je ponovljen tri puta.



Slika 13. Krivulja rasta enterokoka (soj ATCC29212) nakon primjene različitih koncentracija gentamicina. Krivulje rasta prikazane su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija, a pokus je ponovljen tri puta.



Slika 14. Krivulja rasta enterokoka (soj 36) nakon primjene različitih koncentracija hidrokinona. Krivulje rasta prikazane su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija, a pokus je ponovljen tri puta.



Slika 15. Krivulja rasta enterokoka (soj ATCC29212) nakon primjene različitih koncentracija hidrokina. Krivulje rasta prikazane su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija, a pokus je ponovljen tri puta.

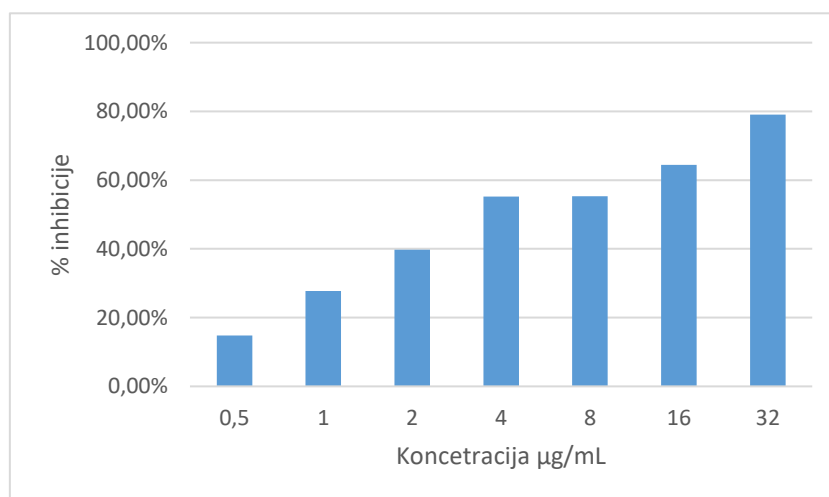
4.2. Izračun postotka inhibicije

Temeljem dobivenih rezultata apsorbancije uzoraka, izračunati su postoci inhibicije za nitroksolin, gentamicin i hidrokinon za 24. sat inkubacije. Za izračunavanje postotka inhibicije upotrebljavala se donja formula gdje A_t predstavlja apsorbanciju uzorka 24. sat, a A_{cont} predstavlja apsorbanciju kontrole:

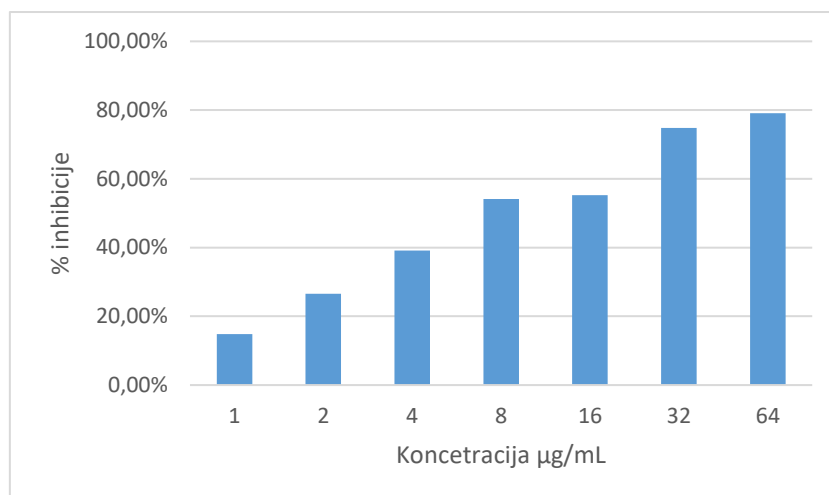
$$\% \text{ inhibicije} = \left(\frac{1 - A_t}{A_{cont}} \right) \times 100$$

4.2.1. Postotak inhibicije nitroksolina

Uvrštavanjem dobivenih rezultata u gornju formulu dobiveni su grafovi postotaka inhibicije nitroksolina (Slika 16., 17.), a na temelju Tablice 3. uočava se da MIK nitroksolina za soj 36 iznosi 4 $\mu\text{g/mL}$. Prema tome, pri koncentraciji od 4 $\mu\text{g/mL}$ postotak inhibicije iznosi 55,18%. MIK nitroksolina za soj ATCC29212 iznosi 8 $\mu\text{g/mL}$, dok je postotak inhibicije za tu vrijednost koncentracije jednak 54,14%. Nitroksolin djeluje bakteriostatski pa je došlo inhibicije rasta i razmnožavanja soja 36 i soja ATCC29212 *E. faecalis*.



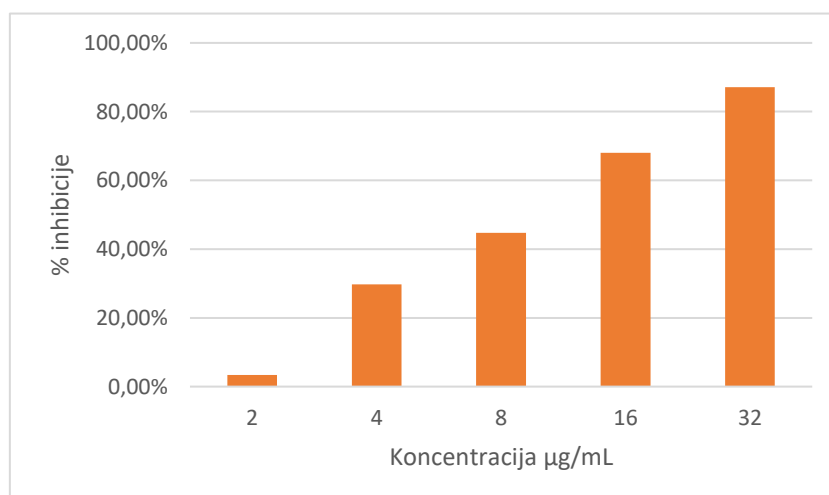
Slika 16. Grafički prikaz postotka inhibicije soja 36 ovisno o primijenjenoj koncentraciji nitroksolina.



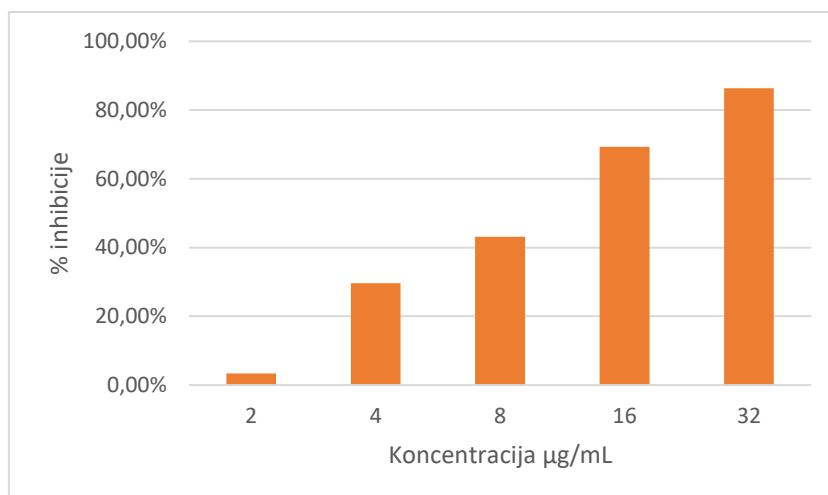
Slika 17. Grafički prikaz postotka inhibicije soja ATCC29212 ovisno o primijenjenoj koncentraciji nitroksolina.

4.2.2. Postotak inhibicije gentamicina

Izračunom su dobiveni grafovi postotaka inhibicije gentamicina (Slika 18., 19.), a temeljem rezultata, MIK gentamicina za soj 36 i soj ATCC29212 je jednak i iznosi 8 $\mu\text{g/mL}$. Sukladno tome, postotak inhibicije za navedenu koncentraciju iznosi 44,7% za soj 36, a za soj ATCC29212 43,1%. Stoga se može pretpostaviti da gentamicin ne djeluje baktericidno u dozi od 1MIK-a, nego svoj učinak postiže tek u dozi od 2MIK-a gdje je inhibirano 68,03% soja 36 i 69,29% soja ATCC29212.



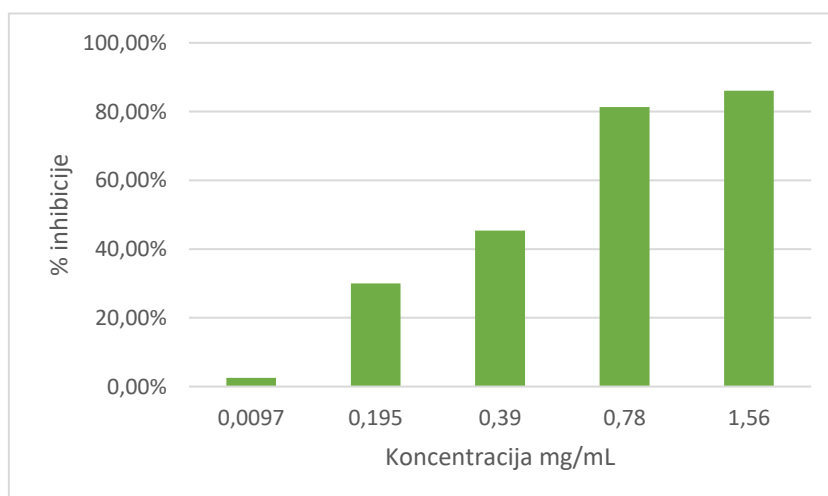
Slika 18. Grafički prikaz postotka inhibicije soja 36 ovisno o primijenjenoj koncentraciji gentamicina.



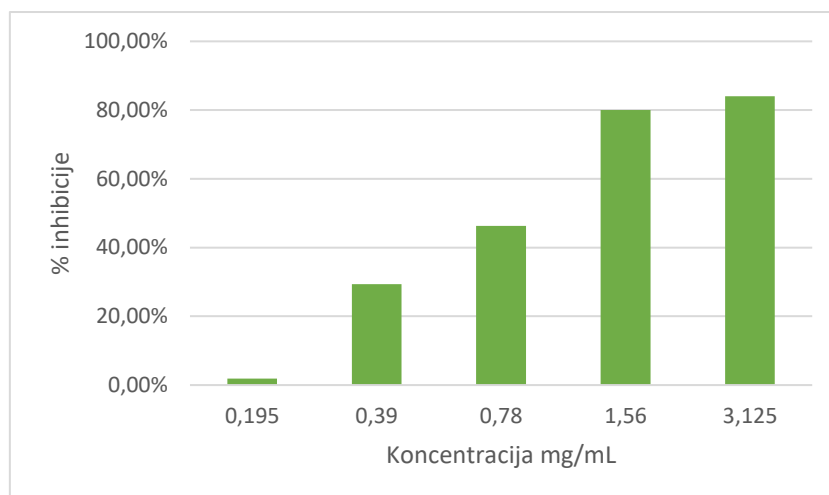
Slika 19. Grafički prikaz postotka inhibicije soja ATCC29212 ovisno o primijenjenoj koncentraciji gentamicina.

4.2.3. Postotak inhibicije hidrokinona

Uvrštavanjem rezultata dobivenih apsorbancija u formulu za izračun postotka inhibicije, dobiveni su grafovi postotka inhibicije hidrokinona za sojeve 36 i ATCC29212. MIK vrijednost hidrokinona za soj 36 iznosi 0,78 mg/mL, a za soj ATCC29212 1,56 mg/mL. Temeljem tih vrijednosti koncentracije, postotak inhibicije za soj 36 iznosi 81,34%, dok je za soj ATCC29212 taj iznos jednak 80,03%. Može se utvrditi da hidrokinon u dozi od 1MIK-a djeluje baktericidno, odnosno dolazi do blokiranja sinteze stanične stijenke.



Slika 20. Grafički prikaz postotka inhibicije soja 36 ovisno o primijenjenoj koncentraciji hidrokinona.



Slika 21. Grafički prikaz postotka inhibicije soja ATCC29212 ovisno o primijenjenoj koncentraciji hidrokinona.

4.3. Određivanje interakcija između nitroksolina i gentamicina metodom šahovnice

Metodom šahovnice ispitane su i određene interakcije između dva antibiotika – nitroksolina i gentamicina. Najniža koncentracija koja sprječava rast bakterija, odnosno MIK vrijednost, za nitroksolin iznosi 4 µg/mL za soj 36, 8 µg/mL za soj ATCC29212, a za hidrokinon 8 µg/mL za sojeve 36 i ATCC29212. Te su vrijednosti korištene tijekom izračuna FIC (A) i FIC (B), a općenito FIC (engl. *Fractional Inhibitory Concentration*) predstavlja test procjene interakcije između dva ili više lijeka koje se namjeravaju upotrijebiti u kombinaciji. Glavni cilj ispitivanja FIC koncentracija kombiniranih antimikrobnih sredstava je definiranje sinergističkog, aditivnog, indiferentnog ili antagonističkog učinka. Sinergija pritom predstavlja različite simultane reakcije pojedinih agensa koji imaju veći efekt zajedničkim djelovanjem nego suma njihovih pojedinačnih djelovanja. FIC je izračunat na sljedeći način:

$$\Sigma FIC = FIC A + FIC B$$

$$FIC A = \frac{MIK (spoja A u kombinaciji sa spojem B)}{MIK (spoja A)}$$

$$FIC B = \frac{MIK (spoja B u kombinaciji sa spojem A)}{MIK (spoja B)}$$

Pritom, kombinacija se karakterizira:

SINERGIJSKOM ako je $\Sigma FIC \leq 0.5$,

ADITIVNOM ako je $\Sigma FIC > 0.5$ i < 1.0

INDIFERENTNOM ako je $\Sigma FIC > 1.0$ i < 4.0

ANTAGONISTIČKOM ako je $\Sigma FIC > 4.0$

Uvrštavanjem dobivenih rezultata u gornje formule, dobivene su FIC vrijednosti te su na temelju njih određene interakcije između nitroksolina i gentamicina za *Enterococcus faecalis* soj 36 i soj ATCC29212 (Tablica 4., 5.). Sve kombinacije MIK vrijednosti nitroksolina i gentamicina pokazuju aditivan učinak za soj 36, dok kombinacije MIK vrijednosti za soj ATCC29212 pokazuju sinergistički i aditivan učinak.

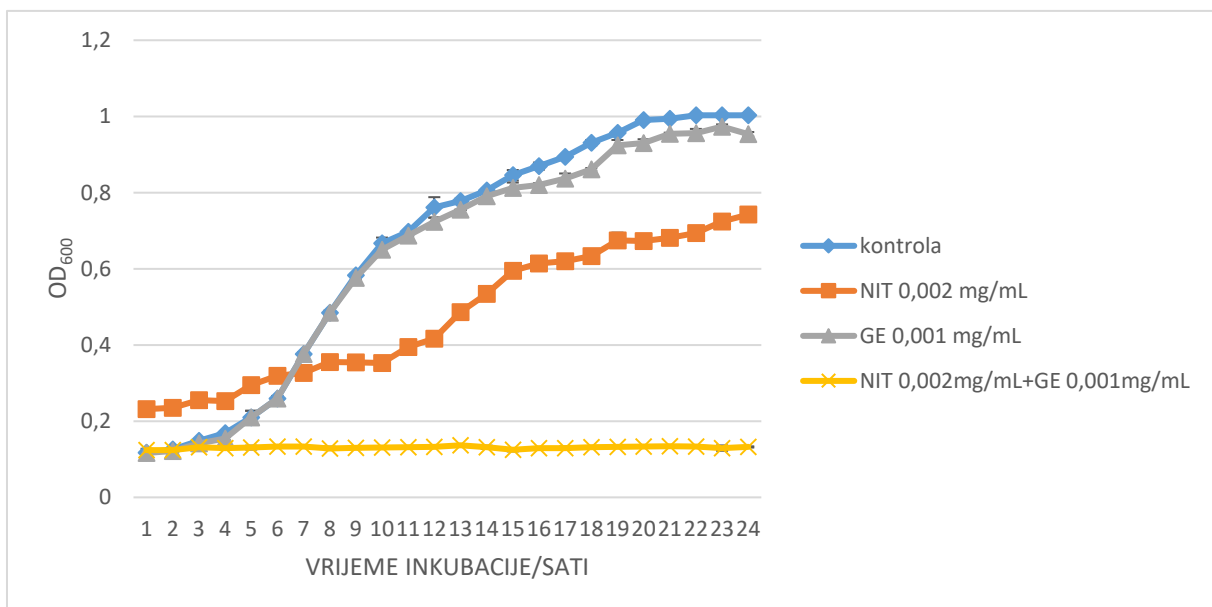
Tablica 4. FIC vrijednosti na temelju dobivenih rezultata te vrsta interakcije između nitroksolina i gentamicina za *E. faecalis* soj 36

Soj <i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Enterococcus faecalis</i> soj 36				
Pojedinačni MIK NIT/GE (mg/mL)	Kombinacija MIK vrijednosti NIT+GE (mg/mL)					
0,004/0,08	0,002/0,0005	0,002/0,001	0,002/0,002	0,002/0,004	0,001/0,004	
FIC _{NIT}	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	
FIC _{GE}	0,0625	0,125	0,25	0,5	0,5	
FIC _i	0,562	0,625	0,75	1	0,75	
INTERAKCIJA	A	A	A	A	A	

Tablica 5. FIC vrijednosti na temelju dobivenih rezultata te vrsta interakcije između nitroksolina i gentamicina za *E. faecalis* soj ATCC29212

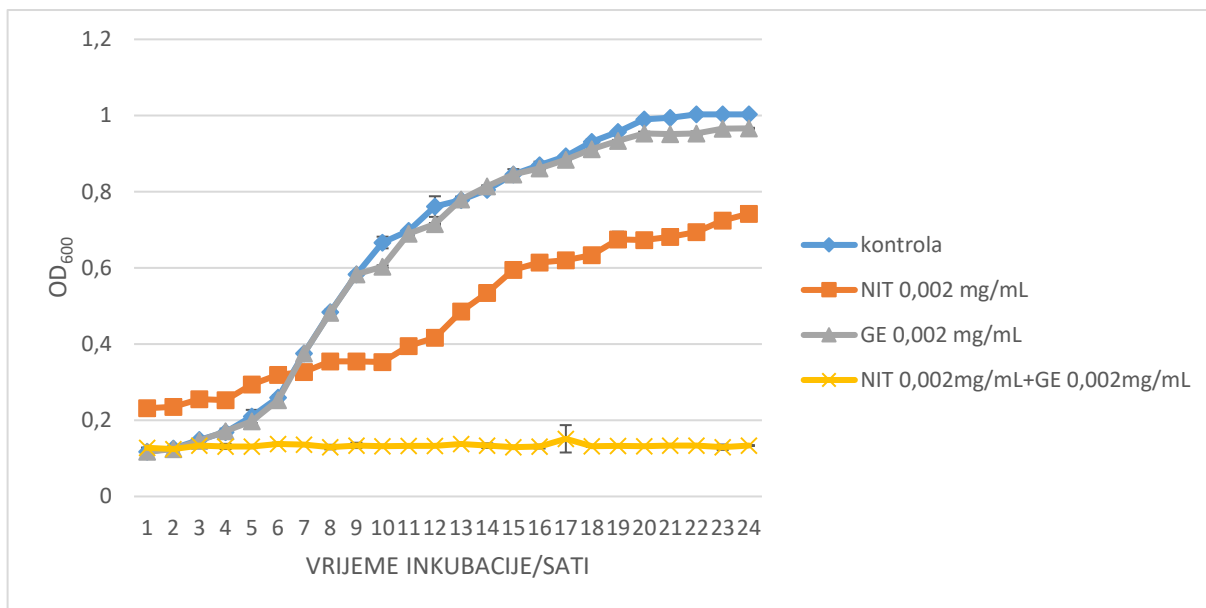
Soj <i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212						
Pojedinačne MIK vrijednosti NIT/GE (mg/mL)	Kombinacija MIK vrijednosti NIT+GE (mg/mL)							
0,008/0,008	0,002/0,0005	0,002/0,001	0,002/0,002	0,004/0,0005	0,004/0,001	0,004/0,002	0,004/0,004	0,002/0,004
FIC _{NIT}	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
FIC _{GE}	0,0625	0,125	0,25	0,0625	0,125	0,25	0,5	0,5
FIC _i	0,312	0,375	0,5	0,562	0,625	0,75	1	0,75
INTERAKCIJA	S	S	S	A	A	A	A	A

Pažnja se obratila na kombinacije MIK vrijednosti nitroksolina i gentamicina za soj ATCC29212 koje su pokazale sinergiju pa su iz tog razloga napravljene krivulje rasta (Slika 22., 23.). Mjerenjem optičke gustoće, dobivene su krivulje rasta pojedinačnih tretmana nitroksolinom i gentamicinom (koncentracija nitroksolina = 0,002 mg/mL, koncentracija gentamicina = 0,001 mg/mL; 0,002 mg/mL) te kombinacije navedenih koncentracija. Krivulja rasta prilikom tretmana gentamicinom vrlo je slična krivulji kontrole jer se radi o vrlo niskoj koncentraciji gentamicina pa nije došlo do inhibicije rasta. S druge strane, iako je krivulja rasta tijekom tretmana nitroksolinom niža od krivulja kontrole i gentamicina, ni ovdje pojedinačna koncentracija nije uzrokovala inhibiciju. Kombinacije koncentracija nitroksolina i gentamicina uzrokovale su inhibiciju što je vidljivo na oba prikaza.



Slika 22. Krivulja rasta *E. faecalis* (soj ATCC29212) nakon primjene pojedinačnih koncentracija i kombinacija nitroksolina i gentamicina.

Krivulje rasta prikazane su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija, a pokus je ponovljen tri puta.



Slika 23. Krivulja rasta *E. faecalis* (soj ATCC29212) nakon primjene pojedinačnih koncentracija i kombinacija nitroksolina i gentamicina.

Krivulje rasta prikazane su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija, a pokus je ponovljen tri puta.

4.4. Određivanje interakcija između nitroksolina i hidrokinona metodom šahovnice

Metodom šahovnice analizirane su i određene interakcije između antibiotika nitroksolina i spoja hidrokinona. Najniža koncentracija koja sprječava rast bakterija, odnosno MIK vrijednost, za nitroksolin iznosi 4 µg/mL za soj 36, 8 µg/mL za soj ATCC29212, a za hidrokinon iznosi 0,78 mg/mL za soj 36 i 1,56 mg/mL za ATCC29212.

Rezultati su uvršteni u formule za izračun FIC-a pa su na taj način dobivene FIC vrijednosti pomoću kojih su utvrđene interakcije između nitroksolina i hidrokinona (Tablica 6., 7.). Kod kombinacije MIK vrijednosti nitroksolina i gentamicina za soj 36, tri kombinacije pokazuju aditivan učinak, dok jedna kombinacija pokazuje sinergiju. Istovremeno, sve kombinacije MIK vrijednosti nitroksolina i hidrokinona za soj ATCC29212 pokazale su sinergiju.

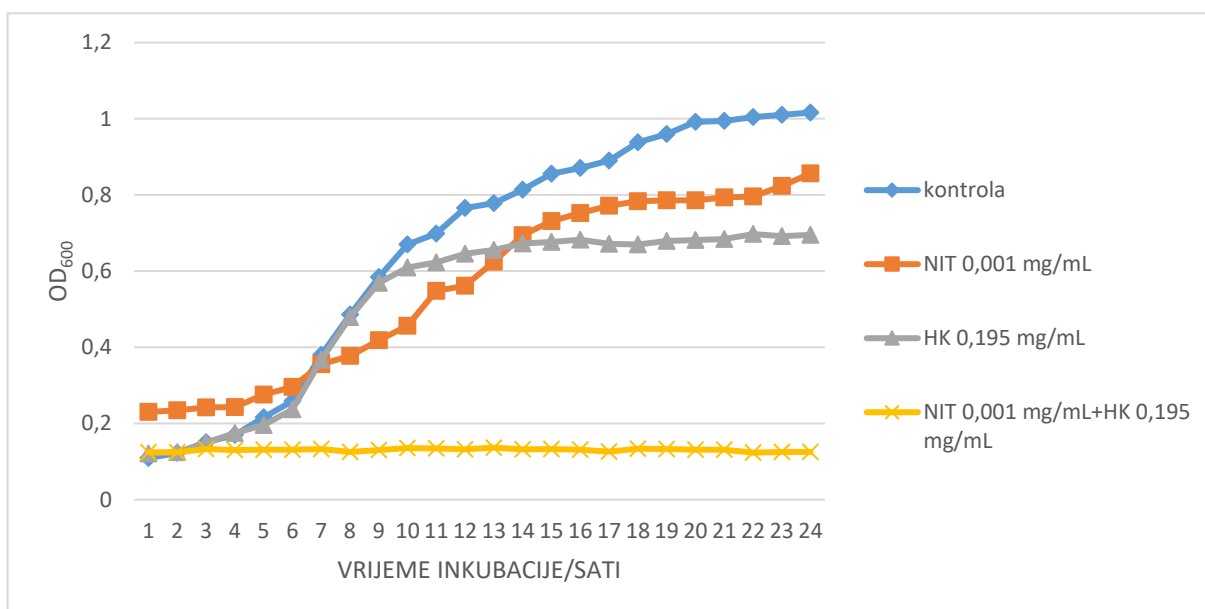
Tablica 6. FIC vrijednosti na temelju dobivenih rezultata te vrsta interakcije između nitroksolina i hidrokinona za *E. faecalis* soj 36

Soj <i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> soj 36			
Pojedinačni MIK vrijednosti NIT/HK (mg/mL)	Kombinacija MIK vrijednosti NIT+HK (mg/mL)			
0,004/0,78	0,001/0,195	0,002/0,097	0,002/0,195	0,001/0,39
FIC _{NIT}	0,25	0,5	0,5	0,25
FIC _{HK}	0,25	0,124	0,25	0,5
FIC _i	0,5	0,624	0,75	0,75
INTERAKCIJA	S	A	A	A

Tablica 7. FIC vrijednosti na temelju dobivenih rezultata te vrsta interakcije između nitroksolina i hidrokinona za *E. faecalis* soj ATCC29212

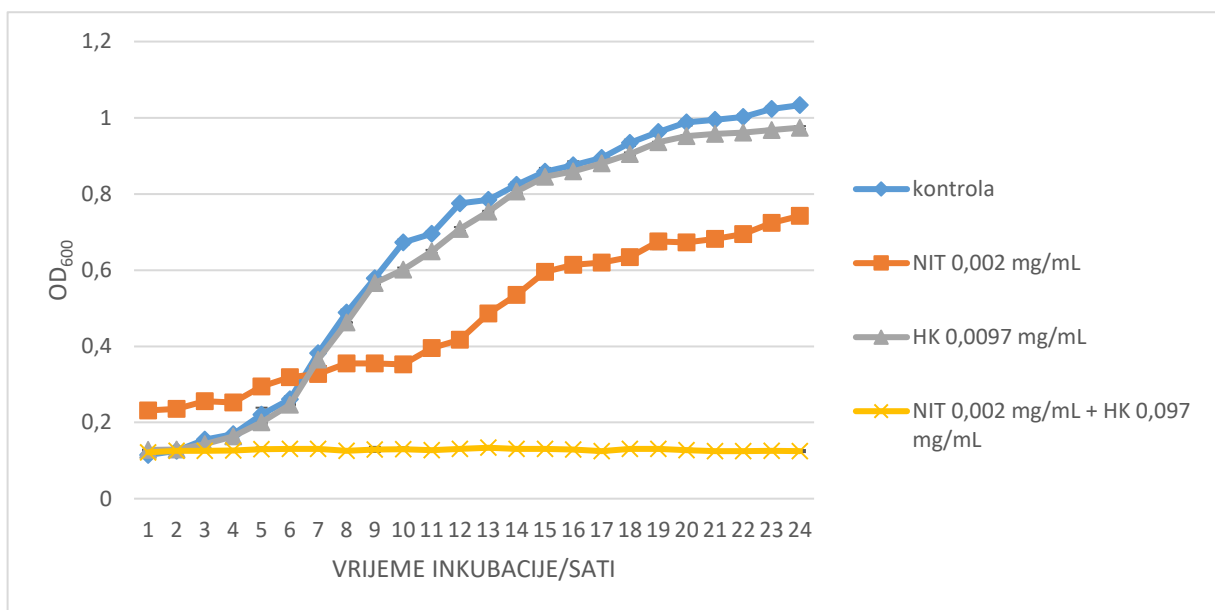
Soj <i>E. faecalis</i>		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212			
Pojedinačni MIK NIT/HK (mg/mL)	Kombinacija MIK vrijednosti NIT+HK (mg/mL)				
0,008/1,56	0,002/0,097	0,002/0,195	0,002/0,39	0,001/0,39	
FIC_{NIT}	0,25	0,25	0,25	0,125	
FIC_{HK}	0,0621	0,125	0,25	0,25	
FIC_i	0,312	0,375	0,5	0,375	
INTERAKCIJA	S	S	S	S	

Kao i za primjer kombinacija nitroksolina i gentamicina, i u ovom se slučaju pažnja obratila na kombinacije MIK vrijednosti nitroksolina i hidrokinona koje su pokazale sinergiju. Mjerenjem optičke gustoće, dobivene su krivulje rasta (Slika 24.) pojedinačnih tretmana nitroksolinom i hidrokinonom za soj 36 (koncentracija nitroksolina = 0,001 mg/mL, koncentracija hidrokinona = 0,195 mg/mL) te kombinacija navedenih koncentracija. Krivulje rasta tijekom pojedinačnog tretmana i nitroksolinom i hidrokinonom približno su slične te se vidi odstupanje od krivulje kontrole, ali te koncentracije nisu uzrokovale inhibiciju. Istodobno, kombinacija koncentracija nitroksolina i hidrokinona uzrokovala je inhibiciju rasta i razmnožavanja bakterija.



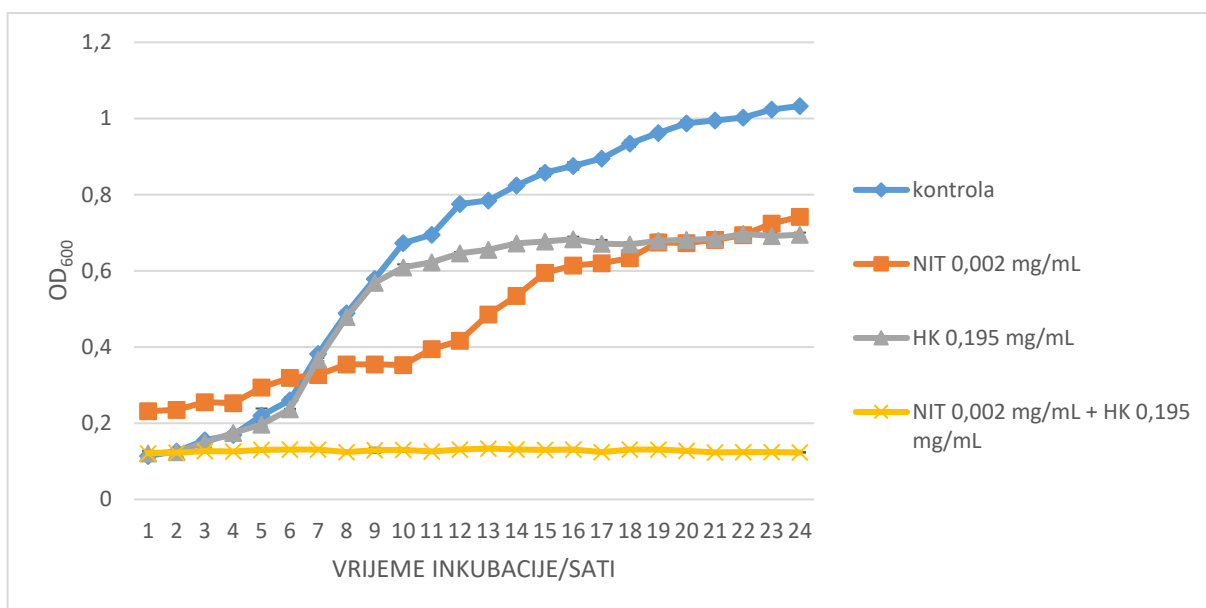
Slika 24. Krivulja rasta *E. faecalis* (soj 36) nakon primjene pojedinačnih koncentracija i kombinacija nitroksolina i hidrokinona. Krivulje rasta prikazane su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija, a pokus je ponavljen tri puta.

Na temelju mjerenja optičke gustoće, dobivene su krivulje rasta (Slika 25., 26., 27., 28.) pojedinačnih tretmana nitroksolinom i hidrokinonom za *E. faecalis* soj ATCC29212 te kombinacija koncentracija koje su pokazale sinergiju. Pritom su koncentracije nitroksolina bile 0,002 mg/mL i 0,001 mg/mL, dok su koncentracije hidrokinona iznosile 0,097 mg/mL, 0,195 mg/mL i 0,39 mg/mL. Pojedinačno, nijedna koncentracija ni nitroksolina ni hidrokinona nije uzrokovala inhibiciju rasta i razmnožavanja *E. faecalis*, no sve kombinacije nitroksolina i hidrokinona u različitim koncentracijama, uzrokovale su inhibiciju bakterija.

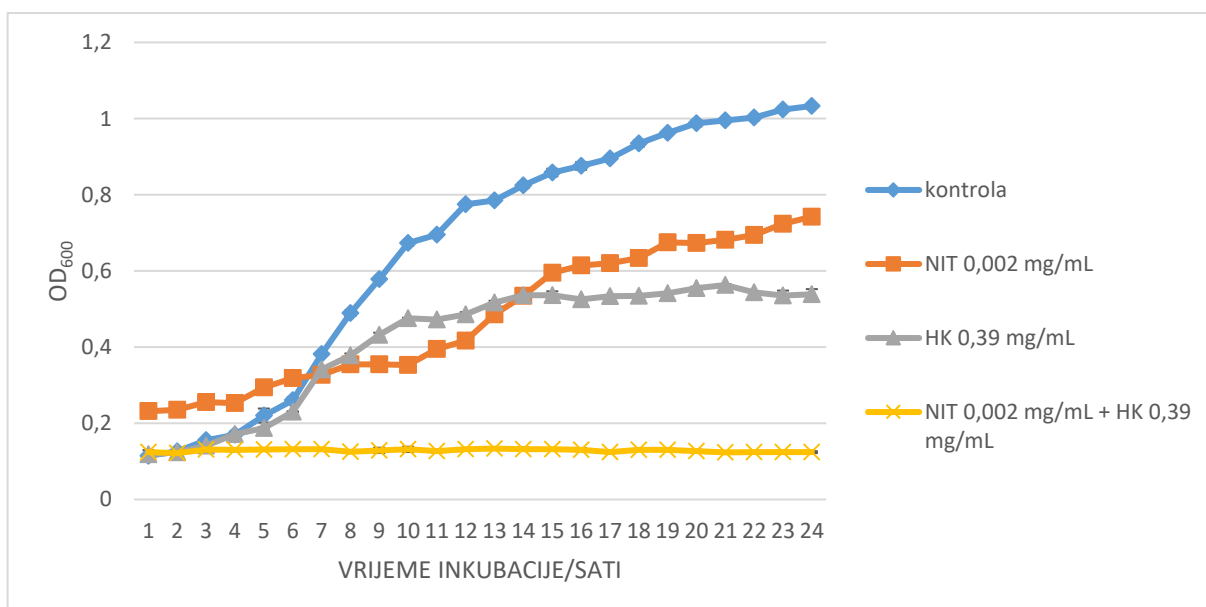


Slika 25. Krivulja rasta *E. faecalis* (soj ATCC29212) nakon primjene pojedinačnih koncentracija i kombinacija nitroksolina i hidrokinona.

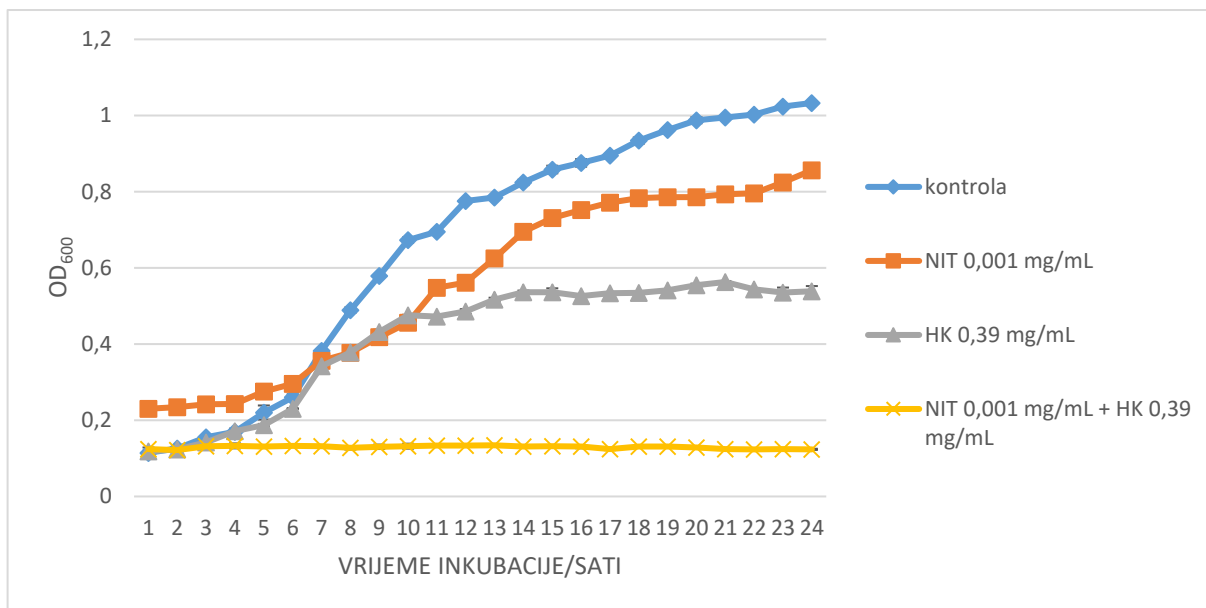
Krivulje rasta prikazane su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija, a pokus je ponavljen tri puta.



Slika 26. Krivulja rasta *E. faecalis* (soj ATCC29212) nakon primjene pojedinačnih koncentracija i kombinacija nitroksolina i hidrokinona. Krivulje rasta prikazane su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija, a pokus je ponovljen tri puta.



Slika 27. Krivulja rasta *E. faecalis* (soj ATCC29212) nakon primjene pojedinačnih koncentracija i kombinacija nitroksolina i hidrokinona. Krivulje rasta prikazane su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija, a pokus je ponovljen tri puta.



Slika 28. Krivulja rasta *E. faecalis* (soj ATCC29212) nakon primjene pojedinačnih koncentracija i kombinacija nitroksolina i hidrokinona. Krivulje rasta prikazane su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija, a pokus je ponovljen tri puta.

5. Rasprava

Urinarne infekcije su jedne od najčešćih bakterijskih infekcija, a njihovo liječenje i profilaksa uzrokuju troškove od nekoliko milijardi dolara godišnje. Uz brojne uzročnike urinarnih infekcija koji kodiraju širok spektar čimbenika virulencije te sve veće izraženosti i prisutnosti antimikrobne rezistencije, najveća prijetnja učinkovitom liječenju postaje sve manja dostupnost jedine efikasne opcije liječenja – antibiotika. Međutim, u posljednje vrijeme, sve veći broj rekurentnih urinarnih infekcija implicira da antibiotici nisu potpuno učinkovita terapija za urinarne infekcije. Nedavne su studije postavile osnove za provedbu translacijskih istraživanja koja bi bila u mogućnosti u potpunosti identificirati mehanizme virulencije i poboljšati liječenje koje je prilagođeno specifičnom patogenu, a da pritom ne mijenja crijevnu mikrofloru. Također, u razvoju je i ciljna terapija koja je orijentirana na početne korake infekcije i to putem kemijskih spojeva (npr. manozidi) ili cijepljenjem adhezinima. Oba pristupa imaju zajednički cilj – spriječiti uropatogene bakterije da ostvare uporište u urinarnom traktu (8).

U ovom radu ispitane su vrijednosti MIK *E. faecalis* sojeva 36 i ATCC29212 za tri različite antimikrobne tvari. Tako je vrijednost MIK za nitroksolin iznosila 4 µg/mL za soj 36, 8 µg/mL za soj ATCC29212, za gentamicin ta je vrijednost bila jednaka 8 µg/mL za oba soja, dok je MIK vrijednost za hidrokinon iznosila 0,78 mg/mL za soj 36 i 1,56 mg/mL za soj ATCC29212.

Metodom mjerenja optičke gustoće uzoraka, dobiveni su rezultati vrijednosti apsorbancije nakon tretmana različitim koncentracijama antimikrobnih tvari tijekom 24 sata. Ti su rezultati prikazani linijskim grafikonima koji su predstavljali krivulje rasta enetrokoka. Iako su korištene različite koncentracije različitih antimikrobnih tvari, sve su krivulje bakterijskog rasta opadale kako se povećavala koncentracija pojedine antimikrobne tvari. Odnosno, kod najmanje koncentracije antimikrobne tvari, krivulja rasta bila je malo ispod krivulje kontrole (ili se čak i preklapala

s njom), dok je kod najveće koncentracije krivulja rasta uočeno da je usporedna s apscisom te da dolazi do potpune inhibicije rasta i razmnožavanja *E. faecalis* sojeva 36 i ATCC29212.

Izračunati su postoci inhibicije rasta na temelju rezultata apsorbancije za 24. sat. Tako je nitroksolin pokazao bakteriostatsko djelovanje i uzrokovao je inhibiciju rasta i razmnožavanja *E. faecalis*. Nitroksolin svoja antibakterijska svojstva temelji na sposobnosti keliranja, a pojam „kelat“ označava skupinu složenih spojeva koji sadrže polidentatne ligande. Polidentatni ligandi su molekule ili ioni koji okružuju središnji metalni kation i za njega se vežu s najmanje dvije koordinatne veze. Kelacijska terapija u medicini predstavlja eliminaciju metala iz organizma pomoću transformacije kompleksa toksičnih metala u nove, netoksične kelate koji se izlučuju putem jetre i bubrega. Veza između antimikrobnog djelovanja nitroksolina i keliranja zasniva se na činjenici da su kationi prijelaznih metala važni za preživljavanje bakterija. Kao što je već prije spomenuto, jezgra nitroksolina sadrži fenol, pirimidinski prsten i hidroksi skupinu koja se nalazi u blizini dušika pirimidina. Postoje dvije pozicije keliranja – prva gdje je fenolat kisika atom koji kelira metalne katione i druga gdje je dušik pirimidinskog prstena atom koji kelira. Vjeruje se da je djelovanje nitroksolina indirektno, tj. nitroksolin djeluje bakteriostatski na način da kelira katione koji su nužni za rast bakterija. Dokazano je i da je bakteriostatsko djelovanje smanjeno u prisutnosti Mg^{2+} , Mn^{2+} i Zn^{2+} zbog prezasićenosti na pozicijama keliranja. Uz djelovanje na antibakterijsku aktivnost, keliranje u ovom slučaju definira i antikancerogenu, antifugalnu i neuroprotektivnu aktivnost (30).

Iz izračuna postotka inhibicije na gentamicin za *E. faecalis* soj 36 i soj ATCC29212 proizlazi da gentamicin u dozi od 1MIK-a ne djeluje baktericidno, nego svoj učinak postiže tek u dozi od 2MIK-a. Razlog smanjene osjetljivosti enterokoka na primijenjeni antibiotik gentamicin vjerojatno leži u sve većoj rezistenciji enterokoka na aminoglikozidne antibiotike. Nedavnim istraživanjem koje je proučavalo utjecaj na zdravlje zbog visoke rezistencije enterokoka na gentamicin i vankomicin, utvrđeno

je da je najrašireniji mehanizam visoke rezistencije na aminoglikozide enzimska modifikacija enterokoka. Tako su istaknute tri skupine enzima koje modificiraju aminoglikozidne antibiotike: acetiltransferaze (AAC), nukleotidiltransferaze (ANT) i fosfotransferaze (APH) (39).

Na temelju dobivenih vrijednosti postotka inhibicije hidrokinona za sojeve 36 i ATCC29212, zapaža se da, baš poput nitroksolina, i hidrokinon djeluje baktericidno na rast i razmnožavanje sojeva. Hidrokinon potječe iz arbutina, koji osim što nastaje djelovanjem β – glukozidaze u enterocitima crijevnih resica, mogu ga i proizvesti i bakterije urinarnog sustava. Zbog prisustva hidroksilnih skupina u kemijskoj građi, hidrokinon posjeduje antioksidativno djelovanje koje mu osigurava protuupalna i antikancerogena svojstva, a za inhibiciju proliferacije, zaslužan je oksidativan potencijal arbutina.

Prilikom ispitivanja interakcija između različitih antimikrobnih sredstava – nitroksolina, gentamicina i hidrokinona, uočeno je da na temelju FIC vrijednosti ispitivana antimikrobna sredstva mogu imati različiti učinak. Prema tome, razlikuje se aditivno, indiferentno, antagonističko i sinergističko djelovanje. Aditivan učinak postiže se kada kombinacija antimikrobnih sredstava ima aktivnost koja je jednaka zbroju pojedinačnih antimikrobnih sredstava. Indiferentan učinak se javlja ako korišteno antimikrobno sredstvo posjeduje jednak efekt i samostalno i u kombinaciji s nekim drugim antimikrobnim sredstvom. Do antagonističkog djelovanja dolazi kada se kombinacijom dvaju antimikrobnih sredstava dobije manja aktivnost od one s najjačim efektom. I na kraju, sinergističko djelovanje nastaje kad se kombinacijom antimikrobnih sredstava dobiva veći efekt od zbroja pojedinačnih efekata antimikrobnih sredstava.

U ovom radu, ispitane su interakcije dviju kombinacija antimikrobnih sredstava: nitroksolina i gentamicina te nitroksolina i hidrokinona za dva soja *E.faecalis*. Spomenute su interakcije ispitane metodom šahovnice koja je jedna od *in vitro* metoda gdje se iskazuje sinergističko djelovanje dva spoja koja pokazuju antimikrobna svojstva.

Prilikom ispitivanja interakcija između nitroksolina i gentamicina, određena MIK vrijednost nitroksolina iznosi 4 µg/mL za soj 36, 8 µg/mL za soj ATCC29212, a za gentamicin 8 µg/mL za sojeve 36 i ATCC29212. Na temelju MIK vrijednosti, izračunate su vrijednosti FIC, ali i frakcijski inhibitorni indeks (engl. *Fractional Inhibitory Concentration Index*, FIC_i) na temelju kojeg se utvrdilo djelovanje dva antimikrobna sredstva. Uočeno je da sve kombinacije MIK vrijednosti nitroksolina i gentamicina za soj 36 pokazuju aditivan efekt što znači da kombinacija nitroksolina i gentamicina ima aktivnost koja je jednaka zbroju pojedinačnih antimikrobnih sredstava.

S druge strane, kombinacije MIK vrijednosti nitroksolina i gentamicina za soj ATCC29212 pokazale su ili aditivan učinak ili sinergiju. Do sinergije je došlo prilikom kombinacija sljedećih koncentracija nitroksolina i gentamicina: 0,002/0,0005 mg/mL, 0,002/0,001 mg/mL, 0,002/0,002 mg/mL. Važno je istaknuti da pojedinačne koncentracije nitroksolina i gentamicina nisu uzrokovale inhibiciju rasta i razmnožavanja bakterija, dok su kombinacije tih istih koncentracija uzrokovale inhibiciju. Potrebno je još dodatno istražiti različite kombinacije nitroksolina i gentamicina čije bi djelovanje bilo sinergističko, a da pritom dolazi do potpune inhibicije rasta i razmnožavanja svih sojeva *E. faecalis*.

Ispitivanjem interakcija između nitroksolina i hidrokinona, određena MIK vrijednost nitroksolina iznosi 4 µg/mL za soj 36, 8 µg/mL za soj ATCC29212, a za hidrokinon 0,78 mg/mL za soj 36 i 1,56 mg/mL za ATCC29212. Na temelju MIK vrijednosti, izračunate su vrijednosti FIC na temelju kojih se utvrdilo djelovanje nitroksolina i hidrokinona za dva soja *E. faecalis*. Opaža se da kombinacija koncentracija od 0,001 mg/mL za nitroksolin i 0,195 mg/mL za hidrokinon pokazuje sinergističko djelovanje pa je u ovom slučaju došlo do inhibicije rasta i razmnožavanja *E. faecalis* soja 36.

Nadalje, sve kombinacije MIK vrijednosti nitroksolina i hidrokinona za soj ATCC29212 pokazale su sinergiju. Do sinergije je došlo prilikom kombinacija sljedećih koncentracija nitroksolina i hidrokinona: 0,002/0,097 mg/mL, 0,002/0,195 mg/mL, 0,002/0,39 mg/mL, 0,001/0,39 mg/mL. Ni ovdje, kao ni u slučaju kombinacije nitroksolina i gentamicina, pojedinačne primijenjene koncentracije nisu uzrokovale inhibiciju, dok su sve kombinacije izazvale inhibiciju soja ATCC29212. Poželjne su dodatne studije koje bi obuhvatile različite kombinacije koncentracija nitroksolina i hidrokinona jer je u ovom slučaju potvrđen velik potencijal u kombiniranju spomenutih spojeva.

Temeljem navedenih rezultata, može se pretpostaviti da je kombinacija antibiotika nitroksolina i derivata benzena hidrokinona uzrokovala više sinergija koje su rezultirale potpunom inhibicijom rasta i razmnožavanja bakterija. Također, uočava se i razlika između sojeva 36 i ATCC29212 *E. faecalis* gdje je vjerojatno soj 36 djelomično genetski mutirao pa tako više ne reagira na određene koncentracije primijenjenih antimikrobnih spojeva, dok je s druge strane bakterijski soj ATCC29212 pokazao veću osjetljivost na primijenjene antimikrobne tvari.

Najnovije studije pokazuju da se nitroksolin sve više upotrebljava prilikom liječenja urinarnih infekcija. Dobrindt i suradnici su 2021. godine napravili usporedbu kotrimoksazola i nitroksolina protiv multirezistentnih uropatogenih bakterija. Polazeći od dokazane činjenice da je kotrimoksazol često neučinkovit na uropatogene bakterije, ispitala se opcija nitroksolina kao moguće terapije urinarnih infekcija uzrokovanih multirezistentnim bakterijama. Nitroksolin je efikasan i protiv uropatogenih bakterija koje stvaraju biofilmove pa bi mogao biti učinkovit i kod pacijenata s kateterom. Temeljem podataka fenotipske rezistencije velikog broja izolata u urinu, dostupnih podataka o genomu rezistentnih uropatogenih bakterija i strukturnoj karakterizaciji MDR (engl. *multidrug – resistant*) plazmida uropatogene *E. coli*, dokazala se početna hipoteza da bi se nitroksolin mogao upotrebljavati umjesto kotrimoksazola za liječenje i prevenciju

urinarnih infekcija. Na kraju, autori sugeriraju nitroksolin kao učinkovitu alternativu liječenja urinarnih infekcija zbog niske rezistencije uropatogenih enterobakterija. Također, predlaže se i praćenje globalnih stopa moguće rezistencije na nitroksolin, ali i molekularni mehanizmi uključeni u eventualnu povećanu osjetljivost uropatogenih bakterija.

Pretraživanjem literature, za sada nije pronađen ni jedan znanstveni članak koji bi upućivao na moguća terapijska svojstva hidrokinona za liječenje urinarnih infekcija. Ipak, kako hidrokinon nastaje metaboliziranjem arbutina u crijevnim resicama, moguće je da bi se arbutin mogao upotrebljavati prilikom liječenja. Repac Antić i sur. su 2021. godine ispitali antibakterijski učinak biljnih ekstrakata lišća medvjetke, čaja od medvjetke, jagode i peršina u svrhu pronalaska alternativnih opcija za liječenje urinarnih infekcija uzrokovanih *Enterococcus faecium*. Utvrđeno je da su biljni ekstrakti bogati jakim antioksidansima – galnom kiselinom, katehinom, kvercetinom i spomenutim arbutinom. Istraživanje je pokazalo da čaj medvjetke posjeduje najjači pojedinačni učinak na stvaranje bakterijskog biofilma i izniman antimikrobni potencijal, a sinergija čaja medvjetke i čaja jagode uzrokovala je impresivnu inhibiciju biofilmova za sve testirane kombinacije. Predlaže se, da bi u kombinaciji s antibioticima, biljni ekstrakti bogati fenolima mogli imati pozitivan učinak na liječenje i prevenciju urinarnih infekcija. Također, predlažu se i buduća istraživanja koja bi još više proučila sinergije biljnih ekstrakata, a naročito sinergiju čaja medvjetke i čaja jagode.

Pretraživanjem baze podataka biomedicinskih i znanstvenih tema *PubMed*, nisu pronađeni znanstveni radovi koji obuhvaćaju proučavanje utjecaja kombiniranih antimikrobnih tvari (koje su primijenjene u ovom radu) na sojeve *E. faecalis*.

Potencijalni budući eksperimenti morali bi obuhvaćati više različitih sojeva *E. faecalis*, ali i upotrebu različitih antibiotika i fenola koji bi u kombinaciji s nitroksolinom eventualno mogli dati zadovoljavajuće rezultate. Također, pažnja bi se trebala obratiti i na istraživanje točnih i

detaljno objašnjenih mehanizama zbog kojih, prilikom upotrebe nitroksolina, gentamicina, hidrokinona ili njihovih kombinacija, dolazi do inhibicije rasta i razmnožavanja bakterijskih sojeva.

6. Zaključak

Rod *Enterococcus* jedan je od glavnih uzročnika urinarnih infekcija, međutim sve veća rezistencija bakterija roda *Enterococcus* na antimikrobna sredstva, postaje globalan zdravstveni problem. Zbog tog razloga, fenolni spojevi poput hidrokinona mogli bi uvelike poboljšati terapijske izgleda kada bi se upotrebljavali u kombinaciji s različitim antibioticima. Sinergija koja je postignuta kombiniranjem nitroksolina s gentamicinom ili hidrokinonom vrlo je značajna u pogledu inhibicije rasta i razmnožavanja *E. faecalis*, ali i u pogledu potencijalnih istraživanja.

Također, u nadi suzbijanja porasta bakterijskih infekcija otpornih na antimikrobna sredstva, nužno je bolje shvatiti izvor i posljedice spomenutog problema. Pritom je potrebno i promijeniti proizvodnju, propisivanje i upotrebu antibiotika jer će u protivnom posljedice biti pogubne za cijeli svijet.

7. Literatura

- 1 Komala M, Bhowmik D. URINARY TRACT INFECTION: CAUSES, SYMPTOMS, DIAGNOSIS AND IT'S MANAGEMENT. *J Chem Pharm Sci* 2013; **6**: 8.
- 2 Begovac J, Baršić B, Kuzman I, Tešović G, Vince A. Klinička infektologija. Prvo izdanje. Medicinska naklada: Zagreb, 2019.
- 3 McLellan LK, Hunstad DA. Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends Mol Med* 2016; **22**: 946–957.
- 4 Flores-Mireles A, Hreha TN, Hunstad DA. Pathophysiology, Treatment, and Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infection. *Top Spinal Cord Inj Rehabil* 2019; **25**: 228–240.
- 5 Czajkowski K, Broś-Konopielko M, Teliga-Czajkowska J. Urinary tract infection in women. *Menopausal Rev* 2021; **20**: 40–47.
- 6 Jung C, Brubaker L. The etiology and management of recurrent urinary tract infections in postmenopausal women. *Climacteric* 2019; **22**: 242–249.
- 7 Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* 2015; **13**: 269–284.
- 8 Shah C, Baral R, Bartaula B, Shrestha LB. Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC Microbiol* 2019; **19**: 204.
- 9 Vrhovac B. i suradnici. Interna medicina. Četvrto izdanje. Naklada Ljevak: Zagreb, 2018.
- 10 Andrašević S. Rekurirajuće infekcije mokraćnog sustava. *Medicus* 2012; **21**: 7.
- 11 Wawrysiuk S, Naber K, Rechberger T, Miotla P. Prevention and treatment of uncomplicated lower urinary tract infections in the era of

increasing antimicrobial resistance—non-antibiotic approaches: a systemic review. *Arch Gynecol Obstet* 2019; **300**: 821–828.

12 Domenici L, Monti M, Bracchi C, Giorgini M, Colagiovanni V, Muzii L *et al.* D-mannose: a promising support for acute urinary tract infections in women. *Eur Rev Medicaland Pharmacol Sci* 2016; **20**: 2920–2925.

13 Ramos S, Silva V, Dapkevicius M, Igrejas G, Poeta P. Enterococci, from Harmless Bacteria to a Pathogen. *Microorganisms* 2020; **8**: 1118.

14 Selleck EM, Van Tyne D, Gilmore MS. Pathogenicity of Enterococci. *Microbiol Spectr* 2019; **7**: 38.

15 Krawczyk B, Wityk P, Gałęcka M, Michalik M. The Many Faces of Enterococcus spp.—Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. *Microorganisms* 2021; **9**: 1900.

16 Kline KA, Lewis AL. Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. *Microbiol Spectr* 2016; **4**: 54.

17 Studies IJ of B Physical and Chemical. Biofilm forming Enterococci and their Status as Emerging Multidrug Resistant Bacteria. *Int J Biol Phys Chem Stud* 2022; **4**: 1–6.

18 Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiol Read Engl* 2009; **155**: 1749–1757.

19 Singh KV, Nallapareddy SR, Sillanpää J, Murray BE. Importance of the Collagen Adhesin Ace in Pathogenesis and Protection against Enterococcus faecalis. *PLoS Pathog* 2010; **6**: 13.

20 Guerardel Y, Sadovskaya I, Maes E, Furlan S, Chapot-Chartier M-P, Mesnage S *et al.* Complete Structure of the Enterococcal Polysaccharide Antigen (EPA) of Vancomycin-Resistant Enterococcus faecalis V583 Reveals that EPA Decorations Are Teichoic Acids Covalently Linked to a Rhamnopolysaccharide Backbone. *mBio* 2020; **11**: 15.

- 21 Kalenić S. Medicinska mikrobiologija. Prvo izdanje. Medicinska naklada: Zagreb, 2013.
- 22 Miller WR, Murray BE, Rice LB, Arias CA. Resistance in Vancomycin-Resistant Enterococci. *Infect Dis Clin North Am* 2020; **34**: 751–771.
- 23 Hutchings M, Truman A, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* 2019; **51**: 72–80.
- 24 Spagnolo F, Trujillo M, Dennehy JJ. Why Do Antibiotics Exist? *mBio* 2021; **12**: 15.
- 25 Etebu E, Arikekpar I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int J Appl Microbiol Biotechnol Res*; **4**: 90–101.
- 26 Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 2022; **399**: 629–655.
- 27 Gautam A. Antimicrobial Resistance: The Next Probable Pandemic. *JNMA J Nepal Med Assoc* 2022; **60**: 225–228.
- 28 Škerk V, Tambić Andrašević A, Andrašević S, Sušić E, Mlinarić Džepina A, Mađarić V *et al.* ISKRA SMJERNICE ANTIMIKROBNOG LIJEČENJA I PROFILAKSE INFEKCIJA MOKRAĆNOG SUSTAVA – HRVATSKE NACIONALNE SMJERNICE. *Liječnički Vjesn* 2019; **131**: 105–118.
- 29 Chaves BJ, Tadi P. Gentamicin. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2022<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557550/> (accessed 26 Sep2022).
- 30 Repac Antić D, Parčina M, Gobin I, Petković Didović M. Chelation in Antibacterial Drugs: From Nitroxoline to Cefiderocol and Beyond. *Antibiotics* 2022; **11**: 1105.

- 31 HALMED.Nitroxolin-forte-SPC.
<https://halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Nitroxolin-forte-SPC.pdf>
- 32 Jurica K, Brčić Karačonji I, Gobin I. Medicinal herbs and herbal preparations for the treatment of urinary infections. *Med Flum* 2018; **54**: 262–267.
- 33 Tkalčec I. Učinak ekstrakta listova obične planike (*Arbutus unedo* L.), arbutin i hidrokinona na stanice PK-15 i HEPG-2 u uvjetima in vitro. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovnomatematički fakultet; 2018.
- 34 Boo YC. Arbutin as a Skin Depigmenting Agent with Antimelanogenic and Antioxidant Properties. *Antioxidants* 2021; **10**: 1129.
- 35 Enguita FJ, Leitão AL. Hydroquinone: Environmental Pollution, Toxicity, and Microbial Answers. *BioMed Res Int* 2013; **2013**: 542168.
- 36 Blaut M, Braune A, Wunderlich S, Sauer P, Schneider H, Glatt H. Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria. *Food Chem Toxicol* 2006; **44**: 1940–1947.
- 37 Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens* 2021; **10**: 165.
- 38 Stevenson K, McVey AF, Clark IBN, Swain PS, Pilizota T. General calibration of microbial growth in microplate readers. *Sci Rep* 2016; **6**: 38828.
- 39 Sparo M, Delpech G, García Allende N. Impact on Public Health of the Spread of High-Level Resistance to Gentamicin and Vancomycin in Enterococci. *Front Microbiol* 2018; **9**: 3073.

8. Životopis

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Martina Ljubić

Adresa: Karlović Vinka 12, 40 305 Nedelišće

Datum rođenja: 11.11.1998.

Mobitel: 098 911 4063

E-mail: ljubic.martina3@gmail.com

OBRAZOVANJE

Magistrica istraživanja i razvoja lijekova

Sveučilište u Rijeci - Odjel za biotehnologiju [2020 –
trenutačno]

Prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova

Sveučilište u Rijeci - Odjel za biotehnologiju [2017 – 2020]

Učenica

Gimnazija Josipa Slavenskog Čakovec [2013 – 2017]

RADNO ISKUSTVO

Stručna praksa – Bioinstitut Čakovec [09/2020 – 10/2020]

Studentski poslovi [2018 – 2021]

Volontiranje – Udruga slijepih Međimurske županije [2014 – 2017]

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: hrvatski

Drugi jezici:

- engleski (slušanje: C1, čitanje: C1, pisanje: C1, govorna produkcija: B2, govorna interakcija: B2)
- njemački (slušanje: B2, čitanje: B2, pisanje: B1, govorna produkcija: B2, govorna interakcija: B2)

OSTALE VJEŠTINE

- Microsoft Office: korištenje i upotreba Worda, Excela i Powerpointa
- Upotreba softvera za molekularni dizajn (PyMol, Avogadro, Marvin)
- Sposobnost brzog prilagođavanja na nove ljude, izazove i način rada
- Samoinicijativnost, motiviranost i želja za napredovanjem
- Vozačka dozvola B kategorije