

# Ispitivanje interakcije hidrokinaona i antibiotika na adheziju uropatogenih izolata enterokoka

---

Špeh, Gabriela

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:654202>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Gabriela Špeh

ISPITIVANJE INTERAKCIJE HIDROKINONA I ANTIBIOTIKA NA ADHEZIJU  
UROPATHOGENIH IZOLATA ENTEROKOKA

Završni rad

Rijeka 2022.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl. sanit. ing

Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ na sveučilištu u Rijeci, Medicinski fakultet,  
pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Dijana Tomić Linšak, dipl. sanit. ing
2. izv. prof. dr.sc. Vanja Vasiljev. dipl.sanit.ing
3. izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl. sanit. ing

Rad sadrži 27 stranica, 4 slike, 6 tablica, 17 literaturnih navoda.

## SAŽETAK

Bakterije roda *Enterococcus* poznati su uzročnici infekcija mokraćnog sustava. Vrlo su otporni na razne faktore iz okoline što je glavni razlog njihova opstanka u nepovoljnim okruženjima. Otporni su na brojne antibiotike zbog nekoliko čimbenika virulencije, od kojih je najvažnija sposobnost stvaranja biofilma. Najčešći uzročnici intrahospitalnih infekcija, *E. faecium* i *E. faecalis*, smatraju se sekundarnim uropatogenima, a najčešće izazivaju komplicirane infekcije i infekcije mokraćnog sustava stečenih za vrijeme bolničke skrbi. U prisutnosti urinarnog katetera bitan je čimbenik stvaranja biofilma. Mogući su uzročnici infekcija urinarnog trakta, septikemije, abdominalnih infekcija, endokarditisa i infekcija povezanih s intravaskularnim kateterima.

Zbog prirodne otpornosti enterokoka na antibiotike, potrebno je istražiti druge načine liječenja urinarnih infekcija, odnosno vratiti se prirodnom načinu liječenja infekcija mokraćnog sustava. Biljni pripravci obične planike, zimzelene medvjette te uvin čaja sadrže prirodne tvari poput arbutina i hidrokinona koji pridonose uklanjanju ili smanjenju simptoma urinarnih infekcija. Osim prirodnih tvari, u ovom se radu ispituje i nitroksolin, učinkoviti uroseptik čije se antibakterijsko djelovanje te inhibicija stvaranja biofilma temelji na svojstvima keliranja.

Cilj je ovog istraživanja ispitivanje interakcije hidrokinona i nitroksolina na adheziju uropatogenih izolata enterokoka u *in vitro* uvjetima metodom šahovnice. Najprije se određuje minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) kako bi se odredila vrsta interakcije ispitivanih tvari, a nakon određivanja adhezije ispitat će se i svojstvo anti- adhezije. Najjača antimikrobna aktivnost pokazala se na vrijednostima gdje je MIK za Nitroxolin pri 8 µg/mL, dok je za hidrokinon 1,56 µg/mL. Kombinacija hidrokinona izoliranog iz biljnih pripravaka sa antibiotikom Nitroxolinom pokazuje potencijal primjene u liječenju urinarnih bakterijskih infekcija protiv bakterijskih sojeva *E. Faecalis*.

**Ključne riječi:** hidrokinon, nitroksolin, bakterijske infekcija mokraćnog sustava, adhezija

## SUMMARY

Bacteria of the genus *Enterococcus* are well-known pathogens of urinary tract infections. They are very resistant to various environmental factors, which is the main reason for their survival in unfavorable environments. They are resistant to numerous antibiotics due to several virulence factors, the most important of which is the ability to form biofilms. The most common causes of intrahospital infections, *E. faecium* and *E. faecalis*, are considered secondary uropathogens, and most often cause complicated infections and urinary tract infections acquired during hospital care. In the presence of a urinary catheter, it is an important factor in the formation of biofilm. Possible causes are urinary tract infections, septicemia, abdominal infections, and infections associated with intravascular catheters.

Due to the natural resistance of enterococci to antibiotics, it is necessary to investigate other ways of treating urinary infections, that is, to return to the natural way of treating urinary tract infections. Herbal preparations of common plantain, evergreen bearberry, and uvin tea contain natural substances such as arbutin and hydroquinone, which contribute to the elimination or reduction of symptoms of urinary infections. In the alkaline medium of the gastrointestinal tract, *E. ramulus*, *E. casseliflavus*, *B. distasonis* and *B. adolescentis* metabolize arbutin to hydroquinone. The entire process of bioactivation takes place on the intestinal villi with the help of the  $\beta$ -glucosidase enzyme and intestinal bacteria. The stronger antimicrobial and antioxidant action of hydroquinone contributes to the treatment of urinary infections. Urinary tract bacteria can also create hydroquinone from arbutin. In addition to natural substances, this work also examines nitroxoline, an effective uroseptic whose antibacterial action and inhibition of biofilm formation is based on chelating properties.

The aim of this research is to examine the interaction of hydroquinone and Nitroxolin on the adhesion of uropathogenic isolates of enterococci in in vitro conditions using the Checkerboard assay method. First, the minimum inhibitory concentration (MIC) is determined in order to determine the type of interaction of the tested substances, and after determining the adhesion, the anti-adhesion property will also be tested. The strongest antimicrobial activity was shown at values where the MIC for Nitroxolin is 8  $\mu\text{g/mL}$ , while for hydroquinone it is 1.56  $\mu\text{g/mL}$ . The combination of hydroquinone isolated from herbal preparations with the antibiotic Nitroxolin shows the potential of application in the treatment of urinary intrahospital bacterial infections against bacterial strains of *E. faecalis*.

**Key words:** hydroquinone, nitroxoline, bacterial infection of the urinary tract, adhesion

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. Uvod .....  | 1  |
| 1.1. Enterokoki – opće karakteristike .....  | 1  |
| 1.2. Infekcije mokraćnog sustava .....   | 2  |
| 1.3. Prirodne tvari za liječenje infekcija mokraćnog sustava .....                     | 3  |
| 1.3.1. Obična planika ( <i>Arbutus unedo L.</i> ) .....                                | 4  |
| 1.3.2. Zimzelena medvjетка ( <i>Arctostaphylos uva ursi (L.) Spreng</i> ) .....        | 4  |
| 1.3.3. Uvin čaj .....  | 5  |
| 1.4. Arbutin (Hidrokinon- $\beta$ -D-glukopiranozid) .....                             | 5  |
| 1.5. Hidrokinon .....  | 6  |
| 1.6. Antibiotici .....   | 7  |
| 1.7. Nitroksolin (5-nitro-8-hidroksikinolin) .....                                     | 8  |
| 2. Cilj istraživanja .....   | 10 |
| 3. Materijali i metode .....   | 11 |
| 3.1. Materijali .....  | 11 |
| 3.1.1. Laboratorijski pribor i uređaji .....   | 11 |
| 3.1.2. Kemikalije .....  | 11 |
| 3.1.3. Mikroorganizmi .....  | 11 |
| 3.2. Postupci .....  | 12 |
| 3.2.1. Priprema bakterijskog inokuluma .....   | 12 |
| 3.2.2. Priprema štok otopine hidrokinona .....   | 12 |
| 3.2.3. Priprema štok otopine Nitroksolina .....  | 12 |
| 3.2.4. Metoda dvostruke mikrodilucije .....  | 12 |
| 3.2.5. Metoda šahovnice (metoda Chekerboard assay) .....                               | 14 |
| 3.2.6. Metoda anti- adhezije .....   | 16 |
| 4. Rezultati .....   | 17 |
| 4.1. Antibakterijsko djelovanje hidrokinona i Nitroksolina na <i>E. faecalis</i> ..... | 17 |
| 4.2. Metoda anti-adhezije .....  | 18 |
| 5. Rasprava .....  | 21 |
| 6. Zaključak .....   | 23 |
| 7. Literatura .....  | 24 |
| 8. Životopis .....   | 26 |

## 1. Uvod

### 1.1. Enterokoki – opće karakteristike

Rod *Enterococcus* karakteriziraju gram- pozitivne, okrugle stanice koje se pojavljuju pojedinačno, u parovima ili manjim, lančanim skupinama. Prethodno se smatralo da pripadaju rodu *Streptococcus* jer najčešće vrste enterokoka dijele karakteristike sa streptokokima, no zbog veće otpornosti na fizikalne i kemijske agense te zbog prisutnosti antigena grupe D, danas se smatra kao zaseban rod. Postoji 37 vrsta enterokoka, no najznačajniji predstavnici roda su *E. faecium* i *E. faecalis*. Najbrojnija je bakterijska vrsta izolirana iz crijeva čovjeka, od kojih je najbrojnija *E. faecalis*. (1)

Enterokoki su ubikvitarni mikroorganizmi. Prirodni su stanovnici tla, vode, hrane i probavnog trakta sisavaca i ptica. Normalna su mikrobna flora probavnog sustava, ženskog spolovila te usne šupljine. (1, 2) Oportunistički su patogeni, a probavnim sustavom dospijevaju u okoliš - tlo, voda, biljke, insekti. (3, 4) Često koloniziraju i periuterino područje zbog čega su poznati uzročnici uroinfekcija. Donedavno se smatralo da su bezazleni, no postali su višestrukootporni intrahospitalni patogeni. U humanoj su medicini poznati kao najčešći uzročnici bolničkih, odnosno nosokomijalnih infekcija te je primijećena povećana rezistencija na antibiotike. (1) Mogući su uzročnici infekcija urinarnog trakta, septicemije, abdominalnih infekcija, endokarditisa i infekcija povezanih s intravaskularnim kateterima. (2)

Otpornost na niz faktora iz okoline glavni je razlog njihova uspješnog opstanka u raznolikim, nepovoljnim okruženjima, izvan i u organizmu domaćina. Otporni su na sušenje i različita sredstva za dezinfekciju te su termorezistentni. Rastu u temperaturnom rasponu od 10°C do 45°C te preživljavaju zagrijavanje na 62,8°C 30 minuta. Preživljavaju u pH rasponu od 4,0 do 9,6. (2, 5) Rastu uz prisutnost visokih koncentracija natrijevog klorida i žuči. Katalaza su negativni te žuč – eskulin pozitivni što znači da im je jedna od glavnih karakteristika hidroliza eskulina uz prisutnost žučnih soli. Tim se karakteristikama enterokoki uspješno natječu za hranjive tvari i prostor. (1)

Dobra prilagoba na rigorozne crijevne uvjete daje enterokokima priliku za stvaranje nepovoljnih, ali i korisnih aktivnosti. Pripadaju skupini organizama poznatih kao bakterije mliječne kiseline (BMK) jer im je glavni krajnji proizvod anaerobnog metabolizma mliječna kiselina. Time utječu na senzorska, nutritivna i tehnološka svojstva fermentiranih prehrambenih proizvoda zbog čega se koriste kao probiotici, starter kulture te dodatci

prehrani. Probiotičkom se funkcijom enterokoka održava normalna crijevna mikroflora, simulira se imunološki sustav te se povećava nutritivna vrijednost hrane. Enterokoki također posjeduju i korisna biotehnološka svojstva, kao što je proizvodnja bakteriocina, točnije enterocina. Opisani su kao antibiološki peptidi aktivni protiv srodnih bakterija mliječne kiseline, klostridija i listerije, zbog čega pokazuju potencijal u strategiji kontrole hrane. (5)

Prirodno su otporni na brojne antibiotike, a tomu pridonosi nekoliko potencijalnih čimbenika virulencije te povezivanje svojstava virulencije s adhezijom, translokacijom i izbjegavanjem imunološkog odgovora. Poznata svojstva virulencije enterokoka uključuju prijanjanje na tkiva domaćina gdje Esp (engl. *enterococcal surface protein*) i agregacijska tvar igraju važnu ulogu, proteinska želatinaza i serinska proteaza, izlučivanje citolizin/hemolizin toksina, adhezina za kolagen (MSCRAMM Ace) i antigen A kod *E. faecalis*, kapsula, polisaharidi stanične stijenke te ekstracelularni superoksid. Citolizin je odgovoran za lizu širokog spektra stanica, dok želatinaza djeluje na kolagenski materijal u tkivima. No, jedan od najvažnijih čimbenika virulencije je sposobnost stvaranja biofilma. (1, 5)

## **1.2. Infekcije mokraćnog sustava**

Mokraćni je sustav sterilan prostor čime se i sam urin može smatrati sterilnom tjelesnom tekućinom. Izuzetak sterilnosti je prostor distalne uretre koja je kolonizirana saprofitnom mikrobiotom susjednih regija koja uključuje mikroorganizme poput *Staphylococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Enterobacteriaceae* i dr. Uzorak urina lako se kontaminira navedenim mikroorganizmima susjednih prostora zbog čega se uzorak ne smatra primarno sterilnim. (6)

Infekcije mokraćnog sustava najčešći je oblik intrahospitalnih infekcija, a drugi najčešći oblik izvanbolničkih infekcija. Podrazumjeva prisutnost kliničkih znakova i simptoma iz genitourinarnog trakta uz prisutnost jednog ili više mikroorganizama. Obično su lokalizirane na mokraćnom mjehuru (cistitis), bubregu (pielonefritis) ili prostati (akutni ili kronični bakterijski prostatitis). Bakterije preko mokraćne cijevi ulaze u mokraćni mjehur nakon čega mogu dalje napredovati prema bubrezima. (6)

Prema Europskom udruženju kliničke mikrobiologije i infektivnih bolesti dijele se u pet kategorija: akutne nekomplikirane urinarne infekcije donjeg dijela mokraćnog sustava u žena, akutni nekomplikirani pielonefritis, komplikirane urinarne infekcije koje uključuju sve infekcija u muškaraca, asimptomatska bakteriurija te rekurentne urinarne infekcije.



Rekurentne infekcije mokraćnog sustava odnose se samo na mlade žene s akutnim nekompliciranim infekcijama mokraćnog sustava. Pojavljuju se dva ili više puta u šest mjeseci ili tri ili više puta u jednoj godini. (7) Incidencija infekcija mokraćnog sustava ovisi o dobi, spolu i o različitim čimenicima rizika. Kod djece se najčešće pojavljuju kod dječaka do tri mjeseci starosti, a u odrasloj dobi najčešće kod mladih žena. Žene imaju veću incidenciju infekcija mokraćnog sustava iz anatomskih razloga - kraća i šira mokraćna cijev. Kod muškaraca je cistitis rijetka pojava. Učestalost raste u oba spola u starjoj dobi. Trudnoća, dijabetes, neuromuskularni poremećaji, transplatacija bubrega, imunosupresija te bolničko liječenje čimbenici su rizika koji povećavaju šansu za nastanak urinarnih infekcija. Smetnje koje se javljaju su bolno i učestalo mokrenje malih količina mokraće, jaki nagon za mokrenjem te pečenje tijekom mokrenja. (8)

Među uzročnicima infekcija razlikujemo primarne, sekundarne i dvojbene patogene te one koji čine fiziološku mikrobiotu i rijetko uzrokuju infekcije. Primarni patogeni imaju jake čimbenike virulencije koji su dovoljni da uzrokuju infekciju mokraćnog sustava kod anatomski i funkcionalno normalnog urinarnog trakta. Sekundarni patogeni rijetko izazivaju infekcije u zdravih osoba. Infekciju uzrokuju ako postoji još predisponirajućih čimbenika za nastanak infekcije mokraćnog sustava. *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* sekundarni su uropatogeni. Čest su uzrok kompliciranih i infekcija mokraćnog sustava stečenih za vrijeme zdravstvene skrbi. Jedan od glavnih čimbenika bitnih za nastanak infekcije u prisutnosti urinarnog katetera je stvaranje biofilma. Enterokoki se smatraju uspješnim intrahospitalnim patogenima zbog prirodene otpornosti na antibiotike i sposobnosti stvaranja biofilma na umjetnim materijalima. (8)

### **1.3.Prirodne tvari za liječenje infekcija mokraćnog sustava**

Biljke i biljni pripravci sadrže brojne tvari koje pridonose njihovom antimikrobnom učinku. Glavna skupina spojeva odgovornih za antimikrobni učinak biljka su polifenoli, sekundarni metaboliti biljaka, koji doprinose boji, okusu, oksidativnoj stabilnosti biljaka, gorčini i mirisu. Pokazuju široki spektar bioloških učinaka, uključujući protuupalni, antioksidativni, antikancerogeni, kardioprotektivni te antimikrobni. Antimikrobne tvari djeluju na bakterijsku stanicu poremećavajući transmembranski transport, inhibiciju anaboličkih i kataboličkih funkcija te aktivnog transporta kroz membranu, gubitak strukture stanične membrane, ometanje procesa stvaranja energije respiratornim lancem te liza stanice. U liječenju se urinarnih infekcija koriste biljni pripravci obične planike, zimzelene medvjette te uvin čaj. (7)

### 1.3.1. Obična planika (*Arbutus unedo L.*)

Obična je planika vazdazeleno grmolika biljka rasprostranjena duž Europe i obale Hrvatske. Koristi se u tradicionalnoj medicini za izradu pripravaka protiv različitih oboljenja poput hipertenzije, dijabetesa, nadutosti, različitih upala te gastrointestinalnih, bubrežnih i urinarnih bolesti. Zbog velike količine fenolnih sastojaka, vitamina i eteričnih ulja, obična planika ima niz pozitivnih učinaka u koje se mogu ubrojati i antibakterijska i antimikrobna svojstva. (9) U mediteranskim se zemljama kao pomoć kod navedenih oboljenja, pa i urinarnih infekcija, koriste korijen i osušeni list planike. Najbrojniji spojevi u listu su polifenoli, točnije fenolni glikozid arbutin. Na crijevnim recicama pomoću crijevnih bakterija i enzima  $\beta$ -glukozidaze, arbutin se metabolizira u hidrokinon. Pri tomu se smatra da je arbutin svojevrsni prekursor antimikrobnog učinka jer on nema zapažena antimikrobna svojstva, no hidrokinon, koji nastaje metabolizmom arbutina, ima. Osim arbutina, u običnoj su planiki pronađeni polifenoli poput elaginske kiseline s antibakterijskim, antivirusnim i antifungalnim djelovanjem, galna kiselina, miricetin, tanini s antibakterijskim i antivirusnim djelovanjem te betulinska kiselina s antibakterijskim, antimalarijskim i antivirusnim djelovanjem. (7, 10)

### 1.3.2. Zimzelena medvjетка (*Arctostaphylos uva ursi (L.) Spreng*)

Zimzelena je medvjетка niski grm kratke stabljike sa sjajnim, slatkim, crvenim bobičastim plodom. Može se pronaći u Sjevernoj Americi, sjeveru Europe i Azije te na našim vapnenačkim planinama. Osušeni se listovi medvjette upotrebljavaju u ljekovite svrhe. U Hrvatskoj i Europskoj farmakopeji, medvjettin je list opisan kao tamnozeleno droga, bez mirisa i gorak okusa. Najvažnije su terapijske sastavnice medvjettina lista  $\beta$ -O-glikozid hidrokinona, odnosno arbutin te  $\beta$ -O-glikozid metilhidrokinona, odnosno metilarbutin, koji je prisutan u znatnim količinama (5- 10%). Osim arbutina i metilarbutina, medvjettin list sadrži i spoj koji pripada skupini galotanina- trjeslovine (10- 15%), flavonoidi (1- 2%) od kojih su najzastupljeniji hiperozid, glikozidi kvarcetina i miricetina. Zbog prisutnosti arbutina, odnosno zbog produkta njegove hidrolize hidrokinona, medvjettin list djeluje antimikrobno te se koristi kod bakterijskih infekcija mokraćnog sustava. Biotransformacijom arbutina u hidrokinon u lužnatoj sredini mokraćnog sustava dobiva se snažan antimikrobni učinak zbog čega je medvjettin list važna komponenta mnogih uroloških čajeva. (7, 11)

### 1.3.3. Uvin čaj

Uvin čaj mješavina je različitih biljnih vrsta, među kojima je dominantna biljka medjetka ili Uva ursi. Koristi se za smanjenje upale te olakšavanje simptoma poput povećanog nagona za mokrenjem, peckanja, žarenja i osjećaja nelagode. Najčešće sastavnice uvin čaja su list medvjetke (*Arctostaphylos uva-ursi*), zelen vrijeska (*Calluna vulgaris*), korijen zečjeg trna (*Ononis spinosa*), list breze (*Betula spp.*), kukuruzna svila (*Zea mays*), zelen preslice (*Equisetum arvense*), a mogu još sadržavati i zelen zlatice () i zelen koprive. (Naturavita, Urosal Uvin čaj). S obzirom da sadrži medjetku kojoj je glavna aktivna tvar arbutin, čiji je produkt biotransformacije hidrokinon, uvin čaj primarno se koristi za liječenje infekcija mokraćnog sustava poput cistitisa, nefritisa i uretritisa. Osim arbutina, uvin čaj je bogat alantoinom čija je uloga smanjenje iritacije, upale i crvenila. Pri korištenju uvin čaja, pH mokraće ne smije biti manji od 7, odnosno ne smije biti kiseo. Iz tog se razloga ne smije konzumirati s vitaminom C te kiselim namirnicama poput čaja od brusnice, citrusa, octa i slično. Uvin čaj pomaže i kod upale jajnika, kod problema s prostatom otežanog mokrenja. Dnevna je doza do tri šalice te se nakon tjedan dana treba napraviti pauza. Žene ga ne smiju piti duže od mjesec dana tijekom jedne godine. Dugotrajna primjena velikih doza može biti opasna zbog čega se smatra sigurnim kada se konzumira kratkotrajno. Nuspojave uključuju mučninu, povraćanje, bol u želucu, nesanicu, promjena boje urina u zelenkasto- smeđu te razdražljivost. Trudnice i dojilje ne smiju konzumirati uvin čaj jer može potaknuti preuranjene trudove zbog čega može doći do spontanog ili preuranjenog porođaja. (12)

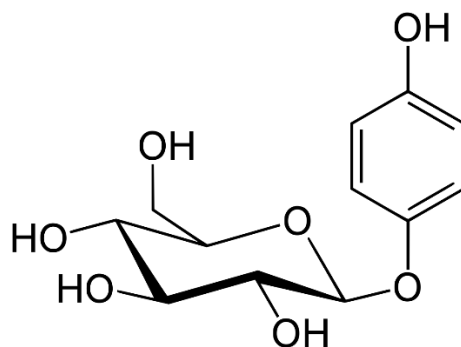
### 1.4. Arbutin (Hidrokinon-β-D-glukopiranozid)

Prirodni spoj biljnih vrsta *Ericaceae* (*Arctostaphylos spp.*), *Rosaceae* (*Pyrus communis L.*) i *Betulaceae* (*Betula alba*), arbutin, biljke prvenstveno sintetiziraju u stresnim uvjetima kao što su iznimno visoke i iznimno niske temperature te u obrani protiv bakterijskih infekcija kao što je plamenjača koju uzorkuje *Erwinia amylovora*. (9, 13) Može se pronaći u listu, kori i plodu biljnih vrsta poput obične planike i medvjetke, a smatra se jednim od najvažnijih fenolnih spojeva koje sadrže. Potvrđen je antioksidativan učinak arbutina povezan sa kemijskom građom, odnosno sa prisutstvom hidroksilne skupine. Oksidativni potencijal arbutina omogućuje inhibiciju proliferacije patogena. Antikancerogena i proutupalna svojstva povezana su sa antioksidativnim učinkom arbutina. (9)

Preko nosača glukoze apsorbira se u intestinumu, tj. u debelom crijevu, gdje se metabolizira u glukuronide i sulfatne konjugate pod utjecajem crijevne mikrobne flore. Glukoronidi i

sulfatni konjugati većim se dijelom izlučuju urinom, (9) točnije 64 – 75% arbutina izlučuje se urinom u obliku konjugata. (13) S druge se strane, arbutin pomoću crijevne bakterijske flore metabolizira u hidrokinon, aktivniji oblik arbutina. Prelazak arbutina u hidrokinon dešava se u crijevnim resicama unutar 24 sata u alkalnom mediju. (9)

Nalazi se u hrani, biljnim dodatcima prehrani te OTC (engl. *Over the counter*) lijekovima. Upotrebljava se za liječenje bubrežnih kamenaca i infekcija urinarnog trakta. Aktivni je sastojak u proizvodima za njegu kože i kozmetičkim proizvodima kao sredstvo za posvjetljivanje kože kako bi se spriječilo stvaranje melanina u kožnim stanjima poput hiperpigmentacije kože ili hiperaktivnu funkciju melanocita. (14)



Slika 1. Struktura arbutina (preuzeto: <https://en.wikipedia.org/wiki/Arbutin>)

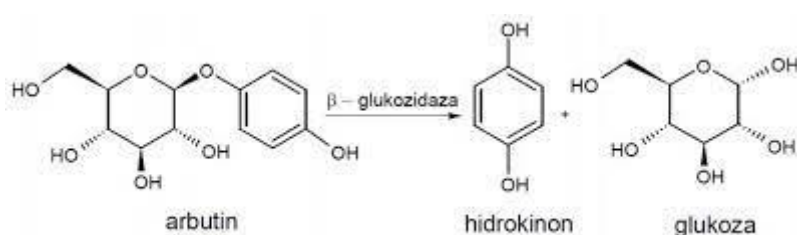
### 1.5. Hidrokinon

Hidrokinon je aromatski, fenolni spoj nastao razgradnjom arbutina pomoću enzima  $\beta$ -glukozidaze u enterocitima crijevnih resica debelog crijeva. Prirodno se nalazi u biljkama stoga ga nalazimo u nizu namirnica biljnog podrijetla: brokula, vino, kruške, kava, pšenični proizvodi, voće. Pojavljuje se u glikoliziranom obliku, odnosno u obliku spoja arbutina, hidrokinon- $\beta$ -D-glukopiranozid. Osim u prirodi, koristi se kao antioksidans za masti i ulja, u proizvodnji motornih goriva i boja, izbjeljivač kože u kozmetici te polimerizacijski inhibitor. (13)

U alkalnom mediju gastrointestinalnog trakta *Eubacterium ramulus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Bacteroides distasonis* i *Bifidobacterium adolescentis* metaboliziraju arbutin do hidrokinona koji ima poznate pozitivne i negativne učinke. Antimikrobno, antioksidacijsko, antimutageno i antikancerogeno svojstvo hidrokinona pozitivni su učinci zbog koji se koriste u liječenju mokraćnih infekcija. Negativni učinci hidrokinona očituju se njegovom autooksidacijom ili enzimima potpomognutom aktivacijom. Oksidacijom nastaje p-

benzokinon koji je klasificiran kao kancerogen. Također su, pod djelovanjem crijevne mikrobne flore, potvrđeni hepatotoksični, kancerogeni, nefrotoksični i mutageni učinci. (9)

Osim što nastaje djelovanjem enzima  $\beta$ -glukozidaze u enterocitima crijevnih resica, hidrokinon iz arbutina mogu stvoriti i bakterije mokraćnog sustava. S obzirom da hidrokinon djeluje antiseptički u lužnatom mediju, ne preporučuje se konzumacija kiselih namirnica za vrijeme primjene terapije na bazi medvjete ili obične planike. (7) Zbog poznatih citotoksičnih, mutagenih i kancerogenih svojstava, Europska agencija za lijekove propisala je da je 400 do 800 mg arbutina dovoljna količina da zadovolji terapijski dnevni unos tijekom dva tjedna. (15)



Slika 2. Razgradnja arbutina do hidrokinona (preuzeto:

<https://repozitorij.pmf.unizg.hr/en/islandora/object/pmf%3A3249/datastream/PDF/view>)

## 1.6. Antibiotici

Antibiotici su lijekovi koji se primjenjuju za liječenje zaraznih bakterijskih bolesti. Selektivno su toksični za bakterije te prihvatljivo toksični za organizam domaćina. U užem smislu su tvari koje proizvode mikroorganizmi te sprječavaju ili inhibiraju rast drugih mikroorganizama u niskim koncentracijama, no definicija je proširena i na derivate koji se u potpunosti ili djelomično proizvode sintetskim putem. Stoga se po podrijetlu dijele se na prirodne, polusintetske i sintetske spojeve. Prirodni spojevi proizvod su metabolizma gljivica, plijesni i bakterija, no sve se više modificiraju i proizvode u laboratorijima i proizvodnim pogonima. (16). Dijele se prema spektru djelovanja, prema učinku, prema kemijskoj strukturi te prema mehanizmu djelovanja. Po stupnju djelotvornosti, odnosno prema učinku, antibiotici se mogu podijeliti na baktericide i bakteriostatike. Baktericidi ubijaju, dok bakteriostatici inhibiraju rast bakterija. Granica koja određuje razliku između baktericida i bakteriostatika vrlo je tanka jer neki antibiotici u manjim koncentracijama bakteriostaticim a u većim baktericidi. Također se mogu podijeliti i na osnovi antimikrobnog spektra. Uskom antibakterijskom spektru pripadaju bakterijske vrste koje djeluju samo na jednu bakterijsku vrstu ili na nekoliko bakterijskih vrsta kao penicilin. Širokom antibakterijskom spektru

pripadaju antibiotici koji djeluju na većinu gram- negativnih i gram- pozitivnih bakterija. Prema mehanizmu djelovanja, antibiotici se dijele na one koji utječu na staničnu stijenk bakterije, inhibiciju sinteze proteina, utjecaj na metabolizam folne kiseline, ometanje funkcije citoplazmatske membrane te inhibiciju sinteze nukleinskih kiselina (16) Najznačajnije klase antibiotika su beta- laktamski antibiotici (penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami), glikopeptidi, aminoglikozidi, makrolidi, kinoloni, tetraciklini, sulfonamidi, ketolidi, streptogramini te oksazolidinoni.

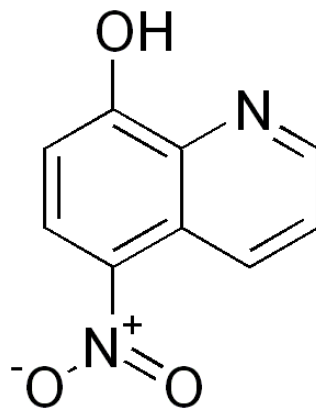
Rezistencija enterokoka na antibiotike može biti urođena i stečena. Urođena otpornost karakteristika je pojedine vrste, a prisutna je u većini sojeva vrste. Geni koji su odgovorni za urođenu rezistenciju prisutni su na bakterijskom kromosomu. Stečena je otpornost, za razliku od urođene sposobnosti, pojavljuje se samo u nekih sojeva unutar vrste. Posljedica je mutacija postojećih gena ili stjecanja novih genetskih materijala. Enterokoki su u humanoj medicini česti uzročnici bolničkih infekcija, točnije infekcija mokraćnog i spolnog sustava, infekcije kože i rana, meningitisa, endokarditisa i enteritisa. Kao dio fiziološke crijevne flore često su izloženi djelovanju različitih antibiotika što, nenamjerno, uzoruje selekciju stanica otpornih na određene antibiotike. Urođeno su rezistentni na cefalosporine, klindamicin i kombinaciju trimetoprima i sulfametoksazola. Nekontrolirana i česta upotreba antibiotika, osobito onih širokog spektra, te sposobnost stjecanja novih mehanizama rezistencije dovodi do pojave rezistentnih i multirezistentnih sojeva. Izbor antibiotika za liječenje multirezistentnih sojeva, poput enterokoka, iznimno je malen. (3,4)

Identifikacija vrste enterokoka ovisi o težini bolesti. Ako pacijent boluje od utoinfekcije ili infekcije rana, određivanje roda enterokoka te određivanje osjetljivosti na antibiotike, u većini je slučajeva dovoljna. No, za ozbiljnije bolesti poput endokarditisa ili meningitisa, identifikacija vrste enterokoka je nužna. Razlog tomu je što između vrsta postoje razlike u osjetljivosti na antibiotike te u stjecanjima novih mehanizama rezistencije. (3, 4)

### **1.7. Nitroksolin (5-nitro-8-hidroksikinolin)**

Nitroksolin pripada skupini heterocikličkih aromatskih spojeva iz obitelji derivata 8- hidroksikinolina. Aktivan je protiv širokog spektra različitih gram- pozitivnih i gram- negativnih bakterija. Poznati je učinkoviti uroantiseptik, točnije, koristi se za liječenje akutnih i kroničnih infekcija mokraćnih puteva te za sprječavanje ponovne pojave infekcija izazvanim bakterijama i gljivicama. Prema klasifikaciji, ne pripada niti jednoj klasičnoj klasi

antibiotika zbog čega se koristi za liječenje infekcija uzorkovanih uropatogenima koji su rezistentni na većinu antibakterijskih lijekova. Njegovo antibakterijsko djelovanje, inhibicija stvaranja bakterijskog biofilma te bioaktivnost očituju se u njegovim svojstvima keliranja. Struktura jezgre nitroksolina je mala i jednostavna. Sastoji se od fenola i piridinskog prstena te hidroksi skupine o kojoj ovise svojstva kelacije nitroksolina. p- položaj nitro skupine, -NO<sub>2</sub>, smatra se ključnim za antibakterijsko djelovanje nitroksolina zbog pojačavanja kiselosti hidroksilne skupine čime se povećava sposobnost keliranja. Izlučuje se putem bubrega, stoga se ne preporučuje konzumacija ako postoji teški poremećaji funkcije bubrega ili jetre. Ne pokazuje toksične učinke, no tijekom konzumacije su zabilježene blage nuspojave poput gastrointestinalnih poremećaja te alergijskih reakcija. Ne preporučuje se za primjenu kod djece. (17)



Slika 3. Struktura nitroksolina (preuzeto: <https://sh.wikipedia.org/wiki/Nitroksolin>)

## **2. Cilj istraživanja**

Cilj ovog istraživanja bio je ispitivanje interakcije hidrokinona i antibiotika Nitroksolina na adheziju uropatogenih izolata enterokoka pomoću metode šahovnice (engl. *Chekerboard assay*) u *in vitro* uvjetima. Ispitana je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) te je potrebno odrediti točke sinergije odnosno tip interakcije između različitih koncentracija hidrokinona i antibiotika Nitroksolina na različite sojeve uropatogenog izolata enterokoka.



### **3. Materijali i metode**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Laboratorijski pribor i uređaji**

- Plastična šprica
- Epruvete
- Plastični L štapić
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Tresilica
- Multikolonijalna pipeta s nastavcima
- Automatske pipete 10-1000  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L i odgovarajući nastavci
- Inkubator
- Bunsenov plamenik
- Mikrotitarska pločica s ravnim i zaobljenim dnom
- Krvni agar

##### **3.1.2. Kemikalije**

- Müller – Hinton agar (MHA)
- Müller – Hinton bujona (MHB)
- Radna otopina hidrokinona
- Radna otopina Nitroksolina

##### **3.1.3. Mikroorganizmi**

Za provedbu istraživanja korišteni su sojevi kliničkih uroizolata *Enterococcus faecalis* izoliranih iz uzoraka pacijenata liječenih u Kliničkom zavodu za kliničku mikrobiologiju KBC Rijeka. Čuvani su u Zbirnici mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju i paeazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Korišten je i ATCC (engl. *American Type Culture Collection*) 29212 soj *E. faecalis*. Bakterije su nasadene na krvnom agru te su stavljene na inkubaciju 18 – 24 sata na  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## **3.2. Postupci**

### **3.2.1. Priprema bakterijskog inokuluma**

Prije negli se pokus krenuo odvijati, potrebno je pripremiti bakterijsku suspenziju enterokoka. U 2 mL Müeller –Hinton bujona (MHB) inokulirano je 1- 5 kolonija. Broj bakterija u suspenziji određuje se spektrofotometrijski na 600 nm. Apsorbancija određuje količinu bakterija u suspenziji, odnosno označava  $10^8$  CFU/mL (engl. *colony- forming unit*- CFU). Nakon određivanja  $10^8$  CFU/ mL provode se desetorostruka razrijeđenja. Iz epruvete  $10^8$  CFU/ mL prenese se 200  $\mu$ L primarne suspenzije u 1,8 mL MHB da bismo dobili suspenziju koncentracije  $10^7$  CFU/ mL. Zatim iz te epruvete prenesemo 1 mL suspenzije u 9 mL MHB. Konačna suspenzija od  $10^6$  bakterija koristi se u daljnjem istraživanju.

### **3.2.2. Priprema štok otopine hidrokinona**

Kako bi se dobila koncentracija početne otopine od 59mg/ mL, potrebno je dodati 5,9g hidrokinona u 100 mL vode. U 16,9 mL pripremljene početne otopine doda se 3,1 mL Müeller – Hinton bujona (MHB) te se dobila otopina koncentracije 12,5 mg/mL.

### **3.2.3. Priprema štok otopine Nitroksolina**

Za pripremu 20 mL otopine Nitroksolina koncentracije 256  $\mu$ g/ mL potrebno je 5 mL štok otopine koncentracije 1,024 mg/ mL te 15 mL MHB.

### **3.2.4. Metoda dvostruke mikrodilucije**

Metoda dvostruke mikrodilucije koristi se kako bi se odredila minimalna inhibitorna koncentracija(MIK) te minimalna baktericidna koncentracija (MBK). MIK vrijednost najniža je koncentracija ispitivane tvari koja sprječava rast mikroorganizama. Drugim riječima, ta je koncentracija dovoljna da zamućenje, koje predstavlja rast mikroorganizama, nije vidljivo nakon inkubacije na  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . MBK označava vrijednost koncentracije ispitivane tvar da spriječi rast mikroorganizama, odnosno da ga uništi.

## **Princip**

Dvostruka mikrodilucijska metoda temelji se na seriji razrijeđenja ispitivanih tvari u tekućoj ili krutoj hranjivoj podlozi. Prati se rast mikroorganizama u nizu različitih koncentracija pri čemu se određuje izlaganje točno određenog broja mikroorganizama točno određenom nizu razrijeđenih koncentracija ispitivanih tvari. Nakon inkubacije određuje se MIK vrijednost koja je izražena u mg/mL. Rastom koncentracije tvari opada broj bakterija u jažicama i obrnuto. Izostanak zamućenja u jažicama označava smanjeni broj ili izostranak mikroorganizama u jažici. Nasađivanjem uzorka iz jažica na hranjivu podlogu te inkubacijom iste hranjive podloge, određuje se MBK vrijednost. Najniža koncentracija ispitivane tvari pri kojoj je inhibiran rast mikroorganizama, odnosno ne pojavljuje se zamućenje, označava MIK vrijednost.

## **Postupak**

Kako bi se odredila MIK vrijednost ispitivane tvari potrebno je pripremiti bakterijsku suspenziju koja konačno mora biti  $10^6$  CFU/mL. Spektrofotometrom se odredi turbiditet suspenzije na 250 do 400 nm. Nakon pripreme suspenzije, potrebno je pripremiti pločice. U svaku jažicu od A2 do A9 dodaje se 100  $\mu$ L MHB. U prvu, praznu, jažicu, dodaje se 200  $\mu$ L ispitivane tvari te se provode razrijeđenja. Nakon postupka razrijeđenja, u svakoj bi jažici trebalo biti 100  $\mu$ L otopine različitih koncentracija. Jažice A11 i A12 služe kao kontrole MHB i otopine ispitane tvari. Kada je pločica spremna, dodaje se 100  $\mu$ L bakterijske suspenzije u sve jažice. Pločica se inkubira na  $35\pm 2^\circ\text{C}$  tijekom 24 sata. MIK vrijednost vidljiva je u jažicama sljedećeg dana, no MIK i MBK vrijednost očitavaju se tek nakon što se sadržaj iz jažica presadio na Müller – Hinton agar (MHA) te inkubirao dodatnih 24 sata. MIK vrijednost smatra se ona koncentracija koja je spriječila porast bakterija za 90%, dok je MBK vrijednost ona koja je uništila sve mikroorganizme. MBK vrijednost viša je od MIK vrijednosti ispitane tvari.

### 3.2.5. Metoda šahovnice (metoda Chekerboard assay)

Metoda šahovnice jedna je od *in vitro* metoda kojom se iskazuje sinergistički učinak dviju tvari koje pokazuju antimikrobna svojstva. Prilikom izvođenja spomenute metode koriste se mikrotitarske pločice. Tvar A nanosi se vertikalno, a tvar B horizontalno, a dodane koncentracije tvari dodaju se u rasponu oko minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Dobiveni se rezultati izražavaju izračunavanjem frakcijske inhibitorne koncentracije (engl. *Fractional Inhibitory Concentration*, FIC), odnosno frakcijskog inhibitornog indeksa (engl. *Fractional Inhibitory Concentration Index*, FIC<sub>i</sub>) ili izradom izobolograma. Interpretacijom rezultata FIC- a određuje se sinergistički, aditivni, indiferentan ili antagonistički učinak dviju ispitanih tvari.

#### Princip

Otopina Nitroksolina razrijeđena je uzduž apscise, dok je uzduž ordinate razrijeđena otopina hidrokinona. Dodana je bakterijska suspenzija 10<sup>6</sup> CFU/ m. Dodane vrijednosti MIK- a hidrokinona i Nitroksolina u kombinaciji uvrštene su u formulu frakcijske inhibitorne koncentracije (FIC):

$$FIC(A) = \frac{MIK(A) \text{ u kombinaciji s } (B)}{MIK(A)}$$

$$FIC(B) = \frac{MIK(B) \text{ u kombinaciji s } (A)}{MIK(B)}$$

Dobivene se FIC vrijednosti potom uvrštavaju u formulu za izračun frakcijskog inhibitornog indeksa (FIC<sub>i</sub>):

$$FIC_i = FIC(A) + FIC(B) = \frac{MIK(A) \text{ u kombinaciji s } (B)}{MIK(A)} + \frac{MIK(B) \text{ u kombinaciji s } (A)}{MIK(B)}$$

#### Postupak

Ispitivanje interakcije otopina hidrokinona i Nitroksolina provodilo se korištenjem metode šahovnice. Otopine hidrokinona i Nitroksolina dodaju se u dvije sterilne mikrotitarske pločice, za svaku tvar jedna, koje su na kraju spojene. Izrada se pokusa provodila u nekoliko koraka. U prvu se mikrotitarsku pločicu s ravnim dnom, u sve jažice, dodalo 50 μL MHB osim u stupac 12. U red A dodalo se još dodatnih 50 μL MHB. U stupac 12 dodaje se 100 μL Nitroksolina koncentracije 256 μL/ mL. Pomoću multikolonijalne pipete serijski se razrijeđuje od 12. stupca do 2. stupca, a višak od 50 μL se izbacuje.

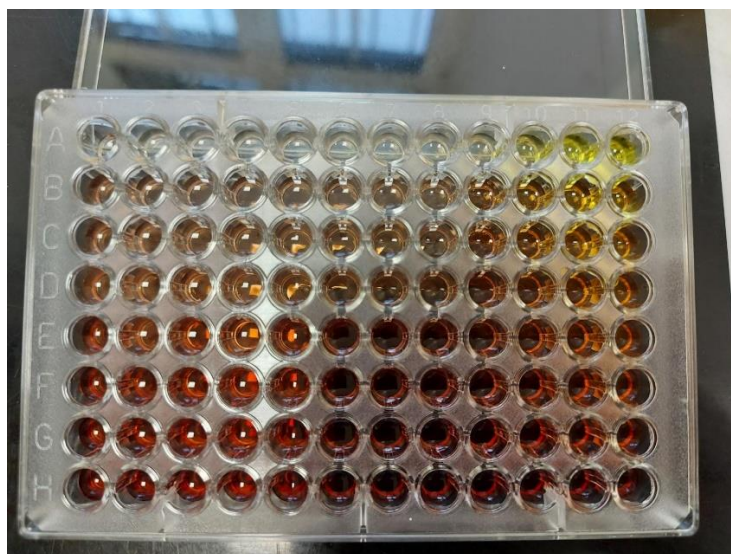
U drugu se mikrotitarsku pločicu sa zaobljenim dnom dodaje 100 $\mu$ L MHB u sve redove osim u red A i H. U red se H (H1 – H12) dodaje 200 $\mu$ L otopine hidrokinona od koje se 100 $\mu$ L serijski razrijeđuje do reda B.

Nakon pripreme dviju mikrotitarskih pločica, one se spajaju. 50  $\mu$ L iz reda B (B1- B12) pločice 2 prenese se u odgovarajući red pločice 1 (B red ploče 2 prenese se u B red ploče 1). Postupak se ponovi sa ostalim odgovarajućim redovima. Dakle, ploča 2 služila je za pripremu, a ploča 1 za analizu. Na kraju postupka spajanja u svim bi jažicama pločice 1 trebalo biti 100  $\mu$ L. 100 $\mu$ L pripremljene bakterijske suspenzije od  $1 \times 10^6$  CFU/mL dodaje se u sve jažice osim u jažicu A1. Pločica 1 stavlja se na inkubaciju 24 sata na  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Nakon inkubacije očitava se prisutnost, tj. odsutnost bakterijskog rasta pomoću zamućenja otopine u jažicama. Interakcija između različitih koncentracija Nitroksolina i hidrokinona određena je frakcijskom inhibitornom koncentracijom (FIK, engl. FIC). Rezultati sumarnog FIC- a interpretiraju se na sljedeći način:

- $\Sigma\text{FIK} < 0,5$  označava sinergizam
- $0,5 \leq \Sigma\text{FIK} \leq 1$  označava aditivni učinak
- $1 < \Sigma\text{FIK} \leq 4$  označava indiferentan učinak
- $\Sigma\text{FIK} > 4$  označava antagonistički učinak

Sintergija je pojam koji objašnjava kako dvije tvari djeluju učinkovitije, odnosno jače nego kada bi djelovale zasebno. Aditivni je učinak zbroj učinka obje tvari, dok je indiferentno područje neutralno područje djelovanja.



Slika 4. Metoda šahovnice (metoda Checkerboard assay)

### **3.2.6. Metoda anti- adhezije**

Sposobnost stvaranja biofilma jedan je od najvažnijih čimbenika virulencije enterokoka koji im omogućava preživljavanje u vrlo nepovoljnim uvjetima. Metodom anti- adhezije ispituje se inhibicija nastanka biofilma nakon tretiranja otopinama hidrokinona i Nitroksolina u različitim koncentracijama.

#### **Princip**

Metoda anti- adhezije temelji se na uzastopnim razrijeđenjima ispitivane tvari u tekućoj hranjivoj podlozi. U ovom se slučaju prati koncentracija ispitane tvari koja će djelovati anti- adhezivno, točnije koncentracija koja će spriječiti stvaranje bakterijskog biofilma. Nakon inkubacije mikrotirarske pločice sa serijom razrjeđenja ispitivanih tvari, ona se ispire fiziološkom otopinom te se postavlja u ultrazvučnu kupelj. Sadržaj jažica nasadi se na Müller – Hinton agar (MHA) koji potom ide na inkubaciju. Slijedi očitavanje koncentracija koje su djelovale anti- adhezivno te se traži MAK vrijednost (minimalna antiadhenzivna koncentracija).

#### **Postupak**

Metoda anti- adhezije provodila se nakon metode šahovnice kojom je ispitana prisutnost bakterija u razrijeđenjima otopine hidrokinona i Nitroksolina. Iz jažica se izbacuje supernatant nakon čega slijedi ispiranje istih fiziološkom otopinom. Nakon dvostrukog ispitivanja u svaku se jažicu dodaje 200  $\mu$ L fiziološke otopine. Mikrotitarsku pločicu postavi se u ultrazvučnu kupelj na jednu minutu kako bi se biofilm odvojio od jažica. Nakon grubog struganja jažica, nasađivanja na MHA te inkubacijom agra na  $35 \pm 2$  °C, slijedi očitavanje ploča.

## 4. Rezultati




### 4.1. Antibakterijsko djelovanje hidrokinona i Nitroksolina na *E. faecalis*

Tijekom ispitivanja interakcije hidrokinona i antibiotika Nitroksolina pomoću metode dvostruke dilucije i metode šahovnice utvrđen je učinak ova dvaju spoja koji su se jasno mogli očitati na MH agru nakon inkubacije od 24 sata na  $35 \pm 2$  °C. Najniža koncentracija koja sprječava rast mikroorganizama, točnije MIK vrijednost, u slučaju hidrokinona bila je 1,56  $\mu\text{g/mL}$ , dok je MIK za Nitroxolin 8  $\mu\text{g/mL}$ . Dobivene su MIK vrijednosti iskorištene tijekom računanja FIC (A) i FIC (B). Sumom dobivenih FIC vrijednosti dobio se rezultat kojim se mogla odrediti vrsta učinka dviju ispitivanih tvari, hidrokinona i Nitroksolina, na *E. faecalis* prikazanih u Tablici 1. Jasno se vide granice sinergističkog, aditivnog, indiferentnog te antagonističkog učinka. Sinergistički učinak najjače je izražen unutar koncentracija 0,78  $\mu\text{g/mL}$  hidrokinona i 4  $\mu\text{g/mL}$  Nitroksolina.

Tablica 1. Interakcije hidrokinona i Nitroxolina za bakterijske sojeve *E. Faecalis* 45, 16 i ATCC 29212

| SOJ<br>45<br>16<br>ATCC 29212   | Koncentracija NITROXOLINA $\mu\text{g/mL}$ MIK 8 FIC (A) |       |       |         |        |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---|--|-------|-------|---------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|   | /  | 0,008 | 0,016 | 0,03125 | 0,0625 | 0,125 | 0,25  | 0,5   | 1     | 2     | 4     | 8     | 16    |
| Koncentracija<br>HIDROKINONA<br>$\mu\text{g/mL}$<br>MIK 1,56<br>FIC (B) | 0,0485   |       |       |         |        |       |       |       |       |       | 0.531 | 1.031 | 2.031 |
|   | 0,097  |       |       |         |        |       |       |       |       |       | 0.562 | 1.062 | 2.062 |
|   | 0,195  |       |       |         |        |       |       |       |       |       | 0.625 | 1.125 | 2.125 |
|   | 0,34   |       |       |         |        |       |       |       |       |       | 0.75  | 1.25  | 2.25  |
|   | 0,78   | 0.501 | 0.502 | 0.504   | 0.508  | 0.516 | 0.532 | 0.564 | 0.625 | 0.75  | 1     | 1.5   | 2.5   |
|   | 1,56   | 1.001 | 1.002 | 1.004   | 1.008  | 1.016 | 1.032 | 1.064 | 1.125 | 1.25  | 1.5   | 2     | 3     |
|   | 3,125  | 2.001 | 2.002 | 2.004   | 2.008  | 2.016 | 2.032 | 2.064 | 2.125 | 2.281 | 2.5   | 3     | 4     |
|   | 6,25   | 4.001 | 4.002 | 4.004   | 4.008  | 4.016 | 4.032 | 4.064 | 4.125 | 4.312 | 4.5   | 5     | 6     |

Tablica 2. Legenda boja Tablice 1.

|   |                     |
|---|---------------------|
|  | Aditivan učinak     |
|  | Indiferentan učinak |
|  | Antagonistički      |

#### 4.2. Metoda anti-adhezije

Nakon što je ispitano djelovanje dviju antimikrobnih tvari na *E. Faecalis*, potrebno je ispitati i svojstvo sprječavanja nastanka biofilma, odnosno učinak "anti -adhezije". U tablici 2. vidljivo je da je vrijednost minimalne antiadhenzivne koncentracije (MAK) hidrokinona 1,56 µg/mL, a Nitroxolina 4 µg/mL. Očitane koncentracije vrijede za sve ispitane sojeve.

Tablica 3. Prikaz rezultata djelovanja hidrokinona i nitroksolina na razaranje biofilma soj 45

| Broj kolonija<br>CFU / mL | Koncentracija NITROXOINA µg/mL |                     |                    |                    |                     |                 |                 |                      |                     |                 |                      |   |    |
|---------------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-----------------|-----------------|----------------------|---------------------|-----------------|----------------------|---|----|
|                           | /                              | 0,008               | 0,016              | 0,03125            | 0,0625              | 0,125           | 0,25            | 0,5                  | 1                   | 2               | 4                    | 8 | 16 |
| 0,0485                    | Kontrola                       | 10 <sup>6</sup>     | 10 <sup>6</sup>    | 10 <sup>6</sup>    | 10 <sup>6</sup>     | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup>      | 10 <sup>6</sup>     | 10 <sup>6</sup> | 14 x 10 <sup>6</sup> | 0 | 0  |
| 0,097                     | 10 <sup>6</sup>                | 10 <sup>6</sup>     | 10 <sup>6</sup>    | 10 <sup>6</sup>    | 10 <sup>6</sup>     | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup>      | 10 <sup>6</sup>     | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup>      | 0 | 0  |
| 0,195                     | 10 <sup>6</sup>                | 10 <sup>6</sup>     | 10 <sup>6</sup>    | 10 <sup>6</sup>    | 10 <sup>6</sup>     | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup>      | 10 <sup>6</sup>     | 10 <sup>6</sup> | 0                    | 0 | 0  |
| 0,34                      | 10 <sup>6</sup>                | 10 <sup>6</sup>     | 10 <sup>6</sup>    | 10 <sup>6</sup>    | 10 <sup>6</sup>     | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup>      | 1 x 10 <sup>6</sup> | 0               | 0                    | 0 | 0  |
| 0,78                      | 10 <sup>6</sup>                | 6x 10 <sup>6</sup>  | 10 <sup>6</sup>    | 10 <sup>6</sup>    | 10 <sup>6</sup>     | 10 <sup>6</sup> | 10 <sup>6</sup> | 15 x 10 <sup>6</sup> | 1 x 10 <sup>6</sup> | 0               | 0                    | 0 | 0  |
| 1,56                      | 3x 10 <sup>6</sup>             | 12x 10 <sup>6</sup> | 8x 10 <sup>6</sup> | 6x 10 <sup>6</sup> | 4 x 10 <sup>6</sup> | 0               | 0               | 1 x 10 <sup>6</sup>  | 0                   | 0               | 0                    | 0 | 0  |
| 3,125                     | 0                              | 0                   | 0                  | 0                  | 0                   | 0               | 0               | 0                    | 0                   | 0               | 0                    | 0 | 0  |
| 6,25                      | 0                              | 0                   | 0                  | 0                  | 0                   | 0               | 0               | 0                    | 0                   | 0               | 0                    | 0 | 0  |





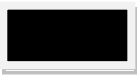
Tablica 4. Prikaz rezultata djelovanja hidrokinona i nitroksolina na razaranje biofilma soj 16

| Broj kolonija<br>CFU / mL | Koncentracija NITROXOINA $\mu\text{g/mL}$ |                 |                 |                 |                 |        |                 |                 |                 |        |   |   |    |
|---------------------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|---|---|----|
|                           | /   | 0,008           | 0,016           | 0,03125         | 0,0625          | 0,125  | 0,25            | 0,5             | 1               | 2      | 4 | 8 | 16 |
| 0,0485                    | Kontrola                                  | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$ | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$ | 0 | 0 | 0  |
| 0,097                     | $10^6$                                    | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$ | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$ | 0 | 0 | 0  |
| 0,195                     | $10^6$                                    | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$ | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$ | 0 | 0 | 0  |
| 0,34                      | $10^6$                                    | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$          | $10^6$ | $10^6$          | $10^6$          | $3 \times 10^6$ | 0      | 0 | 0 | 0  |
| 0,78                      | $10^6$                                    | $4 \times 10^6$ | $6 \times 10^6$ | $5 \times 10^6$ | $1 \times 10^6$ | $10^6$ | $5 \times 10^6$ | $2 \times 10^6$ | 0               | 0      | 0 | 0 | 0  |
| 1,56                      | 0   | 0               | 0               | 0               | 0               | 0      | 0               | 0               | 0               | 0      | 0 | 0 | 0  |
| 3,125                     | 0   | 0               | 0               | 0               | 0               | 0      | 0               | 0               | 0               | 0      | 0 | 0 | 0  |
| 6,25                      | 0   | 0               | 0               | 0               | 0               | 0      | 0               | 0               | 0               | 0      | 0 | 0 | 0  |

Tablica 5. Prikaz rezultata djelovanja hidrokinona i nitroksolina na razaranje biofilma soj ATCC 29212

| Broj kolonija<br>CFU / mL | Koncentracija NITROXOINA $\mu\text{g/mL}$ |        |                 |         |                 |        |        |        |                 |                 |   |   |    |
|---------------------------|---|--------|-----------------|---------|-----------------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|---|---|----|
|                           | /   | 0,008  | 0,016           | 0,03125 | 0,0625          | 0,125  | 0,25   | 0,5    | 1               | 2               | 4 | 8 | 16 |
| 0,0485                    | Kontrola                                  | $10^6$ | $10^6$          | $10^6$  | $10^6$          | $10^6$ | $10^6$ | $10^6$ | $10^6$          | $10^6$          | 0 | 0 | 0  |
| 0,097                     | $10^6$                                    | $10^6$ | $10^6$          | $10^6$  | $10^6$          | $10^6$ | $10^6$ | $10^6$ | $10^6$          | 0               | 0 | 0 | 0  |
| 0,195                     | $10^6$                                    | $10^6$ | $10^6$          | $10^6$  | $10^6$          | $10^6$ | $10^6$ | $10^6$ | $10^6$          | $3 \times 10^6$ | 0 | 0 | 0  |
| 0,34                      | $10^6$                                    | $10^6$ | $10^6$          | $10^6$  | $10^6$          | $10^6$ | $10^6$ | $10^6$ | $2 \times 10^6$ | 0               | 0 | 0 | 0  |
| 0,78                      | $10^6$                                    | $10^6$ | $10^6$          | $10^6$  | $10^6$          | $10^6$ | $10^6$ | $10^6$ | 0               | 0               | 0 | 0 | 0  |
| 1,56                      | $2 \times 10^6$                           | $10^6$ | $6 \times 10^6$ | 0       | $5 \times 10^6$ | 0      | 0      | 0      | 0               | 0               | 0 | 0 | 0  |
| 3,125                     | 0   | 0      | 0               | 0       | 0               | 0      | 0      | 0      | 0               | 0               | 0 | 0 | 0  |
| 6,25                      | 0   | 0      | 0               | 0       | 0               | 0      | 0      | 0      | 0               | 0               | 0 | 0 | 0  |

Tablica 6. Legenda boja Tablice 3., 4., 5.

|   |  |
|---|--|
|  | Porast bakterija   |
|  | Antiadhezijsko<br>djelovnje- smanjen<br>porast bakterija |
|  | Nema porasta<br>bakterija                                |

## 5. Rasprava

Sve se većom upotrebom antibiotika povećava i rezistencija bakterija na njih, što je i razlog istraživanju novih načina liječenja bakterijskih infekcija, osobito onih unutar bolnica. Biljni pripravci poput obične planike i zimzelene medvjetke odavno su se koristili u narodnoj medicini, pogotovo zbog svojih povoljnih učinaka na urološke poremećaje. Osim te dvije biljke, za liječenje urinarnih poremećaja poput cistitisa, nefritisa i uretritisa, koristi se i mješavina različitih biljnih vrsta, uvin čaj, među kojima je dominantna biljna vrsta list medvjetke. Glavna skupina odgovorna za antimikrobna svojstva biljnih pripravaka su polifenoli, odnosno sekundarni metaboliti biljaka. Glavni su učinci polifenola protuupalni, antioksidativni, antikancerogeni, kardioprotektivni te, najbitniji, antimikrobni. Polifenol koji pridonosi antimikrobnim svojstvima biljaka obične planike i medvjetke je fenolni glikozid arbutin, čiji je glavni produkt bioaktivacije hidrokinon. Arbutin prvenstveno sintetiziraju biljke u stresnim uvjetima, poput iznimno visokih i niskih temperatura te u obrani protiv bakterijskih infekcija. Pomoću crijevne mikroflore i enzima na crijevnim resicama arbutin se unutar 24 sata u alkalnom mediju prevodi u aktivan oblik hidrokinon. Osim što hidrokinon nastaje iz arbutina djelovanjem enzima u enterocitima crijevnih resica, njega mogu stvoriti i bakterije mokraćnog sustava. Glavnim mehanizam djelovanja arbutina, odnosno hidrokinona, pripisuje se antioksidativnom djelovanju zbog kemijske građe, odnosno zbog prisutstva hidroksilnih skupina. Oksidativan potencijal arbutina omogućuje inhibiciju proliferacije, odnosno umnažanja stanica patogena. Iz samog antioksidativnog učinka proizlaze i antikancerogena i protuupalna svojstva. Ovim se radom istražuju novi načini liječenja infekcija mokraćnog sustava zbog sve veće rezistencije enterokoka na antibiotike. Nitroksolin, poznati uroantiseptik, koristi se za liječenje akutnih i kroničnih urinarnih infekcija. Prema klasifikaciji ne pripada niti jednoj klasičnoj skupini antibiotika zbog čega se koristi u liječenju visoko rezistentnih sojeva poput enterokoka. Antibakterijska svojstva temelje se na svojstvima keliranja. Navedene karakteristike hidrokinona i nitroksolina potaknule su znatiželju o sinergističkom djelovanju ova dvaju spoja. Antibakterijski je učinak bio usmjeren na bakterijske sojeve *E. faecalis*, jednog od najčešćeg uropatogena te uzročnika bolničkih infekcija. Ispitana su tri klinička izolata bakterije, a istraživanje je provedeno u in vitro uvjetima. Korištene metode su metoda dvostruke mikrodilucije, metoda šahovnice te metoda anti- adhezije. Istraživanje započinje s određivanjem kvantitativnih antimikrobnih svojstava, odnosno određivanjem minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije metodom dvostruke mikrodilucije. Metoda se temelji na seriji razrijeđenja ispitivanih tvari u tekućoj ili krutoj hranjivoj podlozi. Prati se rast mikroorganizama u

različitim koncentracijama ispitivanih tvari, odnosno točno određen broj mikroorganizama izlaže se točno određenom nizu razrijeđenih koncentracija ispitivanih tvari. Metoda šahovnice koristi se kako bi se iskazao sinergistički učinak dviju tvari koje pokazuju antimikrobna svojstva. Pojam sintergističkog učinka označava jače djelovanje dviju tvari zajedno nego svake zasebno. Prilikom ispitivanja interakcije hidrokinona i Nitroksolina utvrđena je MIK vrijednost hidrokinona 1,56  $\mu\text{g/mL}$ , dok je za Nitroksolin MIK vrijednost iznosila 8  $\mu\text{g/mL}$ . Sinergistički je učinak bio najizraženiji unutar koncentracija 0,78  $\mu\text{g/mL}$  hidrokinona i 4  $\mu\text{g/mL}$  Nitroksolina. Jedan od najbitnijih čimbenika virulencije enterokoka je sposobnost stvaranja biofilma, stoga je u ovo istraživanje uključeno i ispitivanje sprječavanja nastanka biofilma, točnije učinak anti- adhezije. Minimalna antiadhezivna koncentracija za hidrokinon je iznosila 1,56  $\mu\text{g/mL}$ , dok je za Nitroksolin 4 $\mu\text{g/mL}$  za sve ispitane sojeve enterokoka. Prevelika upotreba antibiotika dovela je do rezistencije bakterija stoga se moramo okrenuti novim - starim načinima liječenja bolesti. Istraživanjem aktivnih tvari biljaka pridonosimo većem znanju koje se može koristiti za razvoj novih lijekova u liječenju bolesti uzorokovanih bakterijama.

## **6. Zaključak**

Na osnovi provedenog istraživanja može se zaključiti antimikroban potencijal hidrokinona i antibiotika Nitroksolina. Dobivenim se rezultatima može uvidjeti potencijal u liječenju urinarnih poremećaja, no to ovisi o koncentracijama obje tvari. Anti- adhezivan učinak na enterokoka pokazao je pozitivne rezultate.

## 7. Literatura

1. Kalenić S. i sur. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. Str. 140-142, 314-315
2. Repac Antić D., Gobin I., Begić G., Štifter S., Abram M. Fenotipska karakterizacija I antimikrobni profil uropatogenih enterokoka. medicina fluminensis 2018, Vol. 54, No. 3, p. 304-311. Dostupno na: [Phenotypic characterization and antimicrobial profile of uropathogenic enterococci \(srce.hr\)](#)
3. Murray E. The life and times of the Enterococcus. Clin. Microbiol. Rev. 3, 46-65. Dostupno na: [The life and times of the Enterococcus - PubMed \(nih.gov\)](#)
4. Pinratić S., Šoel Martinec B. Rezistencija enterokoka na antibiotike i preporuke za liječenje. Veterinarska stanica 49 (2), 105-116, 2018. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/223025>
5. Čanžek Majhenič A. Emterococci: yin- xang microbes. Mljekarstvo : časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka, Vol. 56 No. 1, 2006.
6. Guay D. Cranberry and Urinary Tract Infections. Drugs. 2009;69(7):775-807. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19441868/>
7. Jurica K., Karsčonji I., Gobin I. Ljekovito bilje I biljni pripravci u liječenju urinarnih infekcija. medicina fluminensis 2018, Vol. 54, No. 3, p. 262-267. Dostupno na: [Medicinal herbs and herbal preparations for the treatment of urinary infections \(srce.hr\)](#)
8. Andrašević A. T. Etiologija urogenitalnih infekcija. MEDICUS 2012. Vol. 21, No. 1, 15 – 21
9. 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
10. Dr Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases [Internet]. Agricultural Research Service of the US Department of Agriculture. Available from: <http://www.ars-grin.gov/duke/>
11. Kosalec I i sur. Antimikrobni učinak medvjetskina lista (Uvae ursi folium) na kliničke izolate urogenitalnih patogena. Farmaceutski glasnik, 2008, 64, 357 – 364.
12. Uvin čaj [internet] N1. Dostupno na: <https://hr.n1info.com/zdravlje/uvina-caj-lijeci-infekcije-mokracnog-sustava-ali-na-jednu-stvar-morate-paziti/>

13. 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 and Chemical Toxicology* 44 (2006) 1940–1947
14. National Library of Medicine [Internet]. National Center for Biotechnology Information . Dostupno na: [Arbutin | C12H16O7 - PubChem \(nih.gov\)](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Arbutin)
15. European Medicines agency [internet] Science medicines health. Dostupno na: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/draft-assessment-report-arctostaphylos-uva-ursi-l-spreng-folium\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/draft-assessment-report-arctostaphylos-uva-ursi-l-spreng-folium_en.pdf)
16. Linčir I. *Farmakologija za stomatologe*. 3 ed. Zagreb Medicinska naklada; 2011.
17. Repac Antić D. I sur. Chelation in Antibacterial Drugs: From Nitroxoline to Cefiderocol and Beyond. *Antibiotics* 2022, 11(8), 1105.

## **8. Životopis**

### Osobni podaci

Ime i prezime: Gabriela Špeh  
Adresa: žabjak 54  
Telefon:  
(kućni) – 043/ 878-626  
(mobitel) – 099/822-7121  
E-mail adresa: ga.speh22@gmail.com  
Datum rođenja: 22.09.2000.

### **RADNO ISKUSTVO**

Završna praksa u Gradskoj ljekarni Bjelovar

### **OBRAZOVANJE**

Medicinska škola Bjelovar, Farmaceutski tehničar

Medicinski fakultet u Rijeci, Sanitarno inženjerstvo

### **CILJ U KARIJERI**

Mogućnost daljnjeg školovanja te napredovanja.

### **VJEŠTINE/OSOBI NE LIČNOSTI**

- Odgovorna sam osoba, brzo učim i mogu se lako prilagoditi novim situacijama. Posjedujem dobre komunikacijske vještine. Posao mi je važno obaviti kvalitetno i na vrijeme, a što je najvažnije, motivirana sam za rad.



## POSEBNA ZNANJA I VJEŠTINE

- Završena osnovna i srednja glazbena škola Vatroslava Lisinskog u Bjelovaru
- Uspješno završen Centar izvrsnosti za program kemija
- Sudjelovanje u programu Vršnjaci pomagači
- Sudjelovanje na smotri stvaralaštva Lidrano
- Sudjelovanje na kongresu Sanitas na Medicinskom fakultetu u Rijeci
- Predstavnik godine u studentskom zboru Medicinskog fakulteta
- Strani jezik – Engleski jezik
- Vozačka dozvola – Posjedujem vozačku dozvolu B kategorije

Gabriela Špeh