

# Djelovanje apitoksina na višestruko otporne bakterije

---

Čukac, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:990818>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**DJELOVANJE APITOKSINA NA VIŠESTRUKO OTPORNE  
BAKTERIJE**

DIPLOMSKI RAD

Nikolina Čukac

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**DJELOVANJE APITOKSINA NA VIŠESTRUKO OTPORNE  
BAKTERIJE**

DIPLOMSKI RAD

Nikolina Čukac

Mentor:

Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka

Zagreb, rujan, 2022.

# SVEUČILIŠTE U ZAGREBU AGRONOMSKI FAKULTET

## IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Nikolina Čukac**, JMBAG 0178109107, rođena 14.06.1997. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

Djelovanje apitoksina na patogene bakterije otporne na više klasa antibiotika

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

*Potpis studenta / studentice*

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE  
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studentice **Nikolina Čukac**, JMBAG 0178109107, naslova

Djelovanje apitoksina na patogene bakterije otporne na više klasa antibiotika  
obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_ , dana

\_\_\_\_\_ .

Povjerenstvo:

potpisi:

- |    |                                    |        |       |
|----|------------------------------------|--------|-------|
| 1. | Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka  | mentor | _____ |
| 2. | Izv. prof. dr. sc. Lidija Svečnjak | član   | _____ |
| 3. | Prof. dr. sc. Marko Vinceković     | član   | _____ |

## Zahvala

Ovim putem zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Mirni Mrkonjić Fuki na ukazanoj prilici, svim smjernicama i savjetima te strpljenju i razumijevanju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također zahvaljujem mag. ing. agr. Irini Tanuwidjaji na pomoći s eksperimentalnim dijelom rada te svim savjetima i smjernicama koji su mi uvelike pomogli.

Zahvaljujem mojoj obitelji, prijateljima te dečku koji su mi bili velika podrška tijekom cijelog studiranja te su na taj način svakako doprinijeli mom uspjehu.

Hvala i mojim nadređenima te svim kolegama u Hrvatskom Telekomu koji zadnjih pet godina imaju razumijevanja za sve moje obveze na fakultetu te su mi omogućili uvjete u kojima sam mogla raditi uz redovan studij.

U konačnici hvala i kolegama koji su sa mnom studirali i na mnoge načine uljepšali moj studij, a posebno Antei Klarici koja je obilježila moje najljepše studentske dane.

# Sadržaj

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
1.1. Hipoteza i ciljevi rada .....	2
<b>2. Pregled literature .....</b>	<b>3</b>
2.1. Rezistencija na antibiotike kod bakterija .....	3
2.1.1. Inaktivacija ili izmjena lijeka .....	4
2.1.2. Modifikacija mjesta vezanja lijeka i smanjena intracelularna akumulacija lijeka .....	5
2.1.3. Gubitak porina.....	5
2.1.4. Efluks pumpe .....	6
2.1.5. Stvaranje biofilma .....	7
2.2. Bakterije iz ESKAPE skupine .....	8
2.2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	10
2.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	11
2.2.3. <i>Enterococcus faecium</i> .....	12
2.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
2.3. Apitoksin ili pčelinji otrov.....	14
2.3.1. Glavni spojevi u sastavu apitoksina .....	15
2.3.2. Antimikrobno djelovanje apitoksina.....	16
2.4. Metode za određivanje djelotvornosti antimikrobnog agensa .....	18
<b>3. Materijali i metode .....</b>	<b>19</b>
3.1. Laboratorijski uređaji .....	19
3.2. Puferi i indikatorske otopine .....	19
3.2.1. Fiziološka otopina (0,85%).....	19
3.2.2. Otopina resazurina (0,02%) .....	19
3.3. Hranjive podloge.....	19
3.3.1. Brain heart infusion (BHI) agar.....	19
3.3.2. Müller-Hinton (MH) tekuća hranjiva podloga.....	20
3.4. Podrijetlo i radne otopine apitoksina.....	20
3.5. Bakterijske kulture .....	20
3.6. Probir (engl. screening) antimikrobne aktivnosti apitoksina.....	21
3.6.1. Priprema bakterijske biomase.....	21

3.6.2.	Metoda difuzije agara u bunaru.....	21
3.7.	Određivanje minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije .	22
3.7.1.	Priprema bakterijske biomase.....	22
3.7.2.	Priprema koncentracijskog gradijenta apitoksina u mikrotitarskim pločama s 96 bunara i aplikacija sojeva (REMA) .....	22
3.7.3.	Provjera biomase .....	23
3.7.4.	Provjera MIK i MBK subkultivacijom .....	23
3.8.	Statistička obrada podataka .....	24
<b>4.</b>	<b>Rezultati.....</b>	<b>25</b>
4.1.	Antimikrobna aktivnost apitoksina .....	25
4.2.	Minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije apitoksina ....	27
<b>5.</b>	<b>Rasprava .....</b>	<b>32</b>
<b>6.</b>	<b>Zaključci .....</b>	<b>34</b>
<b>7.</b>	<b>Popis literature.....</b>	<b>35</b>
<b>8.</b>	<b>Životopis.....</b>	<b>39</b>



## Sažetak

Diplomskog rada studentice **Nikoline Čukac**, naslova

### **DJELOVANJE APITOKSINA NA VIŠESTRUKO OTPORNE BAKTERIJE**

Nekritička uporaba antibiotika uzrokovala je globalnu pojavu rezistencije bakterija na konvencionalne antibiotike. Stoga je potrebno pronaći alternativna rješenja za sprječavanje njihovog rasta. U ovom je radu ispitan inhibitorni utjecaj uzoraka apitoksina (n=3) na sojeve višestruko rezistentnih bakterija *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* i *Staphylococcus aureus* (n=20). Zone inhibicije rasta, određene metodom difuzije agara u bunaru, pokazuju da su Gram pozitivne bakterije osjetljivije (11,9 mm ± 0,7 mm) na djelovanje apitoksina od Gram negativnih bakterija (10,8 mm ± 4,1 mm; ANOVA, Bonferroni test:  $p = 0,03$ ). Minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna baktericidna (MBK) koncentracija uzoraka apitoksina iznosile su između 0,13 i 31,25 µg/ml. Utvrđeno je kako su uzorci apitoksina djelotvorni u inhibiciji rasta svih ispitivanih vrsta, ali pri različitim koncentracijama. Rezultati su pokazali i kako nema značajne razlike u inhibiciji različitih sojeva iste vrste, kao ni između djelotvornosti različitih uzoraka apitoksina.

**Ključne riječi:** antibiotski rezistentne bakterije, apitoksin, minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), minimalna baktericidna koncentracija (MBK)

## Summary

Of the master's thesis - student **Nikolina Čukac**, entitled

### **THE EFFECT OF APITOXINS ON MULTIDRUG-RESISTANT BACTERIA**

The uncritical use of antibiotics has caused the global emergence of bacterial resistance to conventional antibiotics. Therefore, it is necessary to find alternative solutions to prevent their growth. In this work, the inhibitory effect of apitoxin samples (n=3) on strains of multi-resistant bacteria *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* (n=20) was tested. Zones of growth inhibition, determined by the agar diffusion method in the well, show that Gram-positive bacteria are more sensitive ( $11.9 \text{ mm} \pm 0.7 \text{ mm}$ ) to the action of apitoxin than Gram-negative bacteria ( $10.8 \text{ mm} \pm 4.1 \text{ mm}$ ; ANOVA, Bonferroni test:  $p = 0.03$ ). The minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal (MBK) concentrations of apitoxin samples were between 0.13 and 31.25  $\mu\text{g/ml}$ . It was found that apitoxin samples are effective in inhibiting the growth of all tested species, but at different concentrations. The results showed that there is no significant difference in inhibition between different strains of the same species, as well as between the effectiveness of different samples of apitoxin.

**Keywords:** antibiotic-resistant bacteria, apitoxin, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC)

# 1. Uvod

Brojne, kroz povijest najčešće fatalne bakterijske infekcije, uspješno se liječe od 20. stoljeća primjenom antibiotika, a antibiotici i danas predstavljaju najvažniji lijek u tretiranju bolesti izazvanih patogenim bakterijama. Međutim, česta upotreba antibiotika dovela je do postupne prilagodbe bakterija, te je dio vrsta postao otporan na pojedine ili sve klase antibiotika. Tu se posebno ističu bakterije iz ESKAPE skupine (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp.) za koje je Svjetska zdravstvena organizacija izdala posebno upozorenje uz napomenu kako je potrebno pronaći nova antimikrobna sredstva kojima bi se suzbijale infekcije ovim patogenima. Ove bakterije razvile su efikasne mehanizme rezistencije koji predstavljaju sve veći problem, a posebice u bolničkom okruženju. Zbog njihove rezistencije na više klasa antibiotika, postaje sve veći problem pronaći djelatne tvari koje mogu inhibirati rast i širenje mikroorganizama iz ESKAPE skupine.

Potencijalna sredstvo za suzbijanje rasta ovih patogena je apitoksin ili pčelinji otrov. To je supstanca koju sintetizira otrovna žlijezda smještena u stražnjem dijelu šupljine zatka radilica i matica medonosne pčele (*Apis mellifera* L.), a pokazuje djelovanje prema raznim vrstama bakterija. Iako mehanizmi djelovanja apitoksina nisu još dovoljno poznati, pčelinji otrov se već sad koriste u liječenju raznih bolesti kao što je primjerice mutipla skleroza. Iako apitoksin ima veliki potencijal u inhibiciji rasta mikroorganizama, važno je utvrditi da li apitoksin inhibira bakterije iz ESKAPE skupine te koja je koncentracija potrebna kako bi se postigao željeni učinak.

U ovom su istraživanju korištene tri različita uzorka apitoksina prikupljena na području Republike Hrvatske. Korištene su i četiri vrste višestruko otpornih bakterija (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. faecium* i *S. aureus*), a od svake je korišteno po pet različitih sojeva. Bakterije su izolirane iz otpadnih voda te bolničkog okruženja s obzirom na to kako je problem njihove rezistencije najviše izražen u zdravstvenim ustanovama. Za svaki od sojeva određena je minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna baktericidna (MBK) koncentracija. Minimalna inhibitorna koncentracija predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobne tvari koja je potrebna kako bi vidljivo inhibirala rast određene bakterijske vrste dok minimalna baktericidna koncentracija predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobne tvari koja je potrebna kako bi djelovala letalno na određenu bakterijsku vrstu.

## 1.1. Hipoteza i ciljevi rada

Hipoteza ovog rada je da će sva tri uzorka apitoksina pokazati inhibitorno djelovanje na rast patogenih bakterija te kako će sojevi iste vrste biti različito osjetljivi na djelovanje apitoksina. Pretpostavka je i kako će Gram pozitivne bakterije biti osjetljivije na djelovanje apitoksina od Gram negativnih, zbog različite građe stanične stijenke.

Cilj ovog rada je utvrditi inhibitorni utjecaj apitoksina na sojeve bakterijskih vrsta *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* i *Staphylococcus aureus* (n=20) koje su izolirane iz otpadnih voda i bolničkog okruženja te ustupljene od strane Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ (KFM) i Instituta „Ruđer Bošković“ (IRB).

### Specifični ciljevi rada:

1. Kvalitativno ustanoviti djelovanje prikupljenih uzoraka apitoksina na sojeve *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* i *Staphylococcus aureus* (n=20) metodom difuzije bunara u agaru.
2. Odrediti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) apitoksina potrebne za inhibiciju bakterijskog rasta
3. Odrediti minimalne baktericidne koncentracije (MBK) apitoksina koje djeluju letalno na ispitivane bakterija.

## 2. Pregled literature

### 2.1. Rezistencija na antibiotike kod bakterija

Antibiotici predstavljaju jedan od najutjecajnijih izuma dvadesetog stoljeća jer su najznačajnija klasa lijekova u borbi protiv bakterija. Antibiotici su omogućili razvoj nekoliko područja medicine te spasili milijune života diljem svijeta. Osim za liječenje ljudi, koriste se i u veterini kao i fitomedicini te su stoga široko prisutni u našem okolišu već dugi niz godina. Česta uporaba antibiotika, kao i zlouporaba istih, doveli su do postupne prilagodbe nekih vrsta bakterija na njih. U današnje vrijeme sve je veća stopa infekcija uzrokovanih bakterijama koje su rezistentne na više klasa lijekova, a ovaj trend posebno je izražen od početka 21. stoljeća. Antimikrobna rezistencija neizbježna je posljedica korištenja antibakterijskih lijekova jer je prirodno da živi organizmi, a time i bakterije, genetskim mutacijama pokušavaju preživjeti i izbjeći fatalni ishod. To dovodi do velikog problema današnjice koji je posebno izražen u zdravstvenom sustavu (Mahtab Uddin i sur., 2021).

Mnoge bakterijske vrste razvile su sposobnost tolerancije na antibiotike i prije no što su ih ljudi počeli masovno proizvoditi za liječenje bolesti. Važan faktor pokretanja evolucije mehanizama rezistencije kod bakterija je njihova neprestana konkurencija za resurse. To primjerice uključuje prirodnu proizvodnju sekundarnih metabolita koji su svojim sastavom slični antibioticima koje danas koristimo. Kada je uz to krenula i uporaba antibiotika proizvedenih od strane ljudi, počinje radikalna evolucija i širenje rezistencije zbog visokih selekcijskih pritisaka koji su stavljeni na bakterije. To se posebno odnosi na one bakterije koje su sastavni dio mikrobiote ljudi i životinja, kao i na one u okolišima koji su zagađeni antibioticima. Posljedice tih evolucijskih događaja su sve veće poteškoće u sprječavanju i liječenju infekcija te sve veća stopa smrtnosti koju one uzrokuju (Larsson i Flach, 2022).

Višestruka rezistencija podijeljena je na više stupnjeva otpornosti. Razlikujemo višestruku rezistenciju (MDR, engl. multidrug resistance) koja uključuje one bakterije koje su otporne na najmanje jedan lijek u tri ili više klasa antibiotika. Proširena rezistencija je pak u pitanju kada je prisutna otpornost na najmanje jedan lijek u svim klasama antibiotika, a u nju su uključene i bakterije otporne na dvije ili manje klasa. Potpuna rezistencija (PDR, engl. pandrug-resistance) pak uključuje otpornost na sve agense u svim dostupnim klasama antibiotika. Bez obzira na stupanj njihove otpornosti, višestrukorezistentni mikroorganizmi predstavljaju veliki problem u zdravstvu (Abram i sur., 2018).

Geni za antimikrobnu rezistenciju mogu se nalaziti na bakterijskom kromosomu, plazmidu ili transpozonomima. Mehanizmi rezistencije na lijekove kod bakterija se mogu podijeliti u nekoliko kategorija, a u nastavku je opis najvažnijih mehanizama (Santajit i Indrawattana, 2016).

### 2.1.1. Inaktivacija ili izmjena lijeka

Mnoge bakterije proizvode enzime koji nepovratno modificiraju i inaktiviraju antibiotike. Kemijska modifikacija antibiotika katalizirana enzimima glavni je mehanizam rezistencije na lijekove. 1940.godine identificirana je prva penicilinaza (Beta laktamaza), a od tada je identificirano još tisuće različitih enzima koji mogu razgraditi i modificirati antibiotike (De Pascale i Wright, 2010).

Beta laktami su velika skupina antibiotika koja uključuje neke od najpoznatijih kao što su penicilini, cefalosporini, karbapenemi i monobaktami. Svaki od njih sadrži četveročlani laktamski prsten koji predstavlja osnovicu njihovih antimikrobnih svojstava. Ovi su antibiotici u uporabi već dugi niz godina te su sve više osjetljivi na hidrolitičke beta laktamaze kojih je sve veći broj, a daju visoku razinu otpornosti. Beta laktamaze inaktiviraju beta laktamske antibiotike hidrolizom kemijski reaktivnog beta laktamskog prstena, a djeluju uz pomoć jednog od dva kemijska mehanizma. Prema Ablerovoj klasifikaciji beta laktamaza na temelju homologije proteinske sekvence i osjetljivosti na lijekove, podijeljene su u četiri razreda (A, B, C i D) (De Pascale i Wright, 2010).

A grupa uključuje široko rasprostranjene enzime kao što su TEM, SHV (sulfhidrilni reagens varijabla) i CTX-M (cefotaksimaza, prvi put izoliran u Münchenu). TEM je rasprostranjen među bakterijama iz porodice *Enterobacteriaceae*, ali i u nefermetativnim bakterijama kao što je *P. aeruginosa*. SHV je klinički najrelevantniji enzim, a najčešće se može naći kod *K. pneumoniae*. Geni koji kodiraju TEM i SHV imaju visoku stopu mutacije što dovodi do visoke raznolikosti enzima, a time se povećava i opseg njihove rezistencije na antibiotike. CTX-M enzimi identificirani su kod više vrsta ESKAPE bakterija kao što su *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* i *Enterobacter* vrste (Santajit i Indrawattana, 2016).

Enzimi Amblerove klase B uključuju metalo-beta-laktamaze (MBL) koje zahtijevaju  $Zn^{+2}$  kao kofaktor. Bakterije koje proizvode ove enzime stekle su otpornost na sve beta laktame, uključujući i peniciline. Geni koji kodiraju MBL nalaze se na plazmidima stoga se lako prenose na druge mikroorganizme. Prisutni su kod *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* i mnogih drugih (Santajit i Indrawattana, 2016).

C grupa sadrži nekoliko važnih enzima, uključujući penicilinazu i cefalosporinazu, kao što je AmpC beta laktamaza. Ovaj je enzim najčešće detektiran kod *P.*

*aeruginosa* i bakterija iz obitelji *Enterobacteriaceae*. Kod vrste *Enterobacter* njihova je proizvodnja najčešće niska, ali može se inducirati tijekom terapije lijekovima (Santajit i Indrawattana, 2016).

Amberova grupa D sastoji se od niza enzima među kojima se ističu enzimi za hidrolizu oksacilina (OXA). Gotovo svi od ovih enzima otporni su na inhibitore  $\beta$  - laktamaze. Identificirani su često kod *P. aeruginosa*. *A. baumannii* sadrži specifične OXA enzime koji hidroliziraju karbapenem, imaju nisku katalitičku vrijednost i zajedno s drugim mehanizmima mogu uzrokovati otpornost na karbapeneme (Santajit i Indrawattana, 2016).

### **2.1.2. Modifikacija mjesta vezanja lijeka i smanjena intracelularna akumulacija lijeka**

Neke od rezistentnih bakterija modificiraju svoju staničnu stjenku na način da više ne sadrže mjesto vezivanja antimikrobnog sredstva. Mutacijom gena koji kodira proteine na koje se veže penicilin (PBP) dolazi do ekspresije unikatnih proteina. PBP (*eng. penicillin-binding protein*) su u funkciji enzima koji se tipično nalaze u citoplazmatskoj membrani bakterijske stanične stjenke i sudjeluju u sastavljanju i kontroli kasnijih faza izgradnje stanične stjenke. Kod *S. aureus* su to primjerice specifični proteini koji vežu penicilin (PBP2a). PBP2a ima nizak afinitet za sve beta laktamske antibiotike i djeluje kao zamjena za druge PBP-ove čime osigurava preživljavanje *S. aureusa* kada je u uvjetima visoke koncentracije beta laktamskih lijekova, uključujući meticilin (Santajit i Indrawattana, 2016).

Osjetljivost bakterija na određeni lijek određena je i ravnotežom unosa i eliminacije određenog antibiotika. Jedna od strategija koje bakterije koriste za razvoj otpornosti na antibiotike je smanjenje količine antibiotika koji može proći kroz staničnu membranu bakterije. To bakterije postižu mehanizmima koji uključuju pojavu smanjenih proteinskih kanala na bakterijskoj vanjskoj membrani, a kako bi se smanjio ulazak lijeka unutar stanice (Santajit i Indrawattana, 2016).

### **2.1.3. Gubitak porina**

Porini su najzastupljeniji proteini u vanjskoj membrani Gram negativnih bakterija. Iako bakterije posjeduju mnogo gena koji kodiraju porine, ekspresija nekih porina dominira ekspresijom drugih, ovisno o okolišnoj niši. Porini dopuštaju pasivnu difuziju hranjivih tvari i otpada kroz membranu, niz koncentracijski gradijent, bez trošenja ATP-a. Osim navedenog, imaju i druge funkcije kao što su održavanje osmolarnosti, transport soli i hranjivih tvari kroz membranu i drugo (Sharma i sur., 2022).

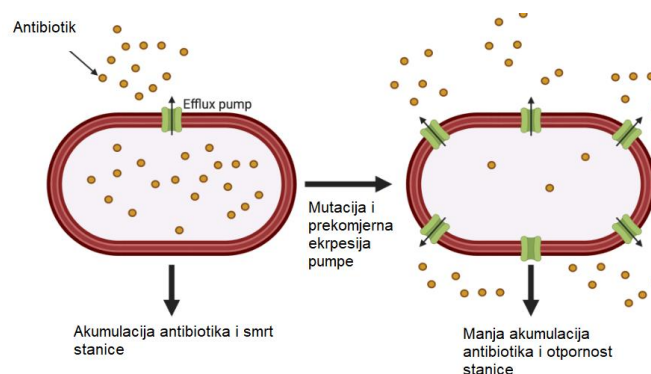
Porini tvore kanale koji omogućuju prolaz mnogim hidrofilnim tvarima, uključujući i antibiotike. *P. aeruginosa* primjerice smanjuje dotok lijeka u stanicu na način da

smanjuje količine ovih proteina, čime si omogućuje stvaranje otpornosti na lijekove kao što je imipenem. Kod *A. baumannii*, gubitak porina omogućuje da postane neosjetljiva na lijekove imipenem i meropenem, dok sojevi *K. pneumoniae* gubitkom proteina vanjske membrane, uz proizvodnju enzima otpornosti, osiguravaju rezistentnost na beta laktame (Santajit i Indrawattana, 2016).

#### 2.1.4. Efluks pumpe

Bakterijske efluks pumpe su proteini koji su ugrađeni u plazmatsku membranu bakterije. Njihova je funkcija prepoznati za bakteriju štetne agense koji su prošli kroz staničnu stjenku i dospjeli u citoplazmu te ih istisnuti prije no dosegnu svoje ciljeve. Uz navedeno, prepoznaju i toksične spojeve koji su produkti metabolizma bakterije stoga vrše i funkciju izlučivanja istih iz stanice. Spojeve prenose prema koncentracijskom gradijentu pri čemu koriste izvore energije (Amaral i sur., 2014). Dva su istaknuta neposredna izvora energije kojima se koriste, a to su ATP i protonska pokretačka sila (Amaral i sur., 2014).

Ove pumpe izbacuju lijek iz stanice (slika 2.1.) velikom brzinom, na način da koncentracija lijeka u stanici nikada nije dovoljno velika da bi izazvala antibakterijski učinak. Većina efluks pumpi učinkovito pumpaju širok raspon antibiotika čime se postiže rezistentnost na više vrsta antibiotika. Opisano je pet različitih vrsti pumpi, a najčešći tip kod Gram negativnih bakterija je poliselektivna efluksna pumpa. Ona igra ključnu ulogu u višestrukoj otpornosti na antibiotike. Ova vrsta pumpe izbacuje razne antibiotike i strukturno nepovezane molekule, kao što su boje i žučne soli (Santajit i Indrawattana, 2016). Kod kliničkih izolata *K. pneumoniae*, prekomjerna ekspresija efluks pumpi, dovela je do povećane prevalencije sojeva. *A. baumannii* izolati također pokazuju prekomjernu ekspresiju AdeABC efluks pumpe čime postižu multirezistentnost. Ovaj tip pumpe povezan je s otpornošću na širok raspon antibiotika kao što su fluorokinolone, beta laktami, tetraciklini, kloramfenikoli i drugi (Santajit i Indrawattana, 2016).



Slika 2.1. Shematski dijagram koji prikazuje kako efluksne pumpe izvoze spojeve iz bakterijskih stanica izvan njih (<https://blairlab.co.uk/what-we-do/>)



### 2.1.5. Stvaranje biofilma

Biofilmovi su složene mikrobne zajednice koje žive kao tanki sloj na biotičkim i abiotičkim površinama (Mah i O'Toole, 2001) Formiranje biofilma je proces u kojem se mikroorganizmi nepovratno pričvršćuju i rastu na površini te proizvode izvanstanične polimere koji olakšavaju pričvršćivanje i stvaranje matriksa. To rezultira promjenom fenotipa organizama. Stanice koje se pričvrste za površinu započinju diobu iz mikrokolonija i proizvode izvanstanične polimere koji definiraju biofilm (Donlan, 2001). Ti se izvanstanični polimeri uglavnom sastoje od polisaharida, proteina, lipida i izvanstanične DNA od mikroba, a zajednički ih nazivamo matriks. Mikroorganizmi unutar biofilma mogu komunicirati jedni s drugima, kao i s okolišem (Watnick i Kolter, 2000).

Tri su ključna koraka kod formiranja biofilma. Prvi je korak prianjanje, kada stanice dopiju na površinu i usidre se na željeno mjesto. Potom slijedi rast i sazrijevanje koji počinju kada mikroorganizmi krenu stvarati egzopolisaharide koji tvore matriks. Posljednji korak je odvajanje koje može biti aktivno ili pasivno. Aktivno je pokrenuto od strane samih bakterija, a pasivno je uzrokovano vanjskim silama (Santajit i Indrawattana, 2016).

Matriks biofilmova osigurava mehanički i biokemijski štit koji osigurava uvijete u kojima je smanjena aktivnost lijekova. Ti su uvjeti primjerice niska koncentracija kisika, nizak pH, visoka koncentracija CO<sub>2</sub> i niska dostupnost vode. U takvim je uvjetima teško ukloniti bakterije koristeći se konvencionalnim antibioticima. Očigledno veća otpornost stanica na antibiotike u dubokim slojevima biofilma vidljiva je jer bakterije ekstrahirane iz biofilma i uzgojene u bujonu vraćaju svoju punu osjetljivost. To nam ukazuje kako je ova otpornost fenotipski, a ne genotipski određena (Pozo i Patel, 2007). Najčešći patogeni pronađeni u biofilmovima, a koji su izolirani u zdravstvenom okruženju, su *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* i *K. pneumonia* (Santajit i Indrawattana, 2016).

## 2.2. Bakterije iz ESKAPE skupine

U veljači 2017.godine, svjetska zdravstvena organizacija (WHO) objavila je popis patogena (ESKAPE) za koje je hitno potreban razvoj novih antimikrobnih sredstava. Antimikrobno rezistentne ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter species*) patogene bakterije predstavljaju sve veću prijetnju po zdravlje ljudi na globalnoj razini. Radi se o bakterijama koje imaju jake mehanizme rezistencije na više vrsta antibiotika čime se smanjuju opcije za tretman infekcija uzrokovanih ovim patogenima. Osim otežanog liječenja, porasla je i stopa smrtnosti uzrokovana ovim bakterijama stoga su označeni kao prioritet u istraživanju rezistencije. ESKAPE patogeni uključuju Gram pozitivne i Gram negativne bakterije, a svaka vrsta sadrži jedinstvene mehanizme rezistencije na antibiotike (De Oliveira i sur., 2020). Višestruko rezistentnih bakterija koje se kriju pod akronimom ESKAPE, uzročnici su otprilike dvije trećine svih bakterijskih infekcija, a problem je posebno izražen u bolničkom okruženju. Osim prirodne rezistencije koju ove bakterije imaju, stečena rezistencija sve je izraženija prepreka u liječenju (Abram i sur., 2018)..

Bakterije imaju urođene mehanizme rezistencije koji uključuju primjerice proizvodnju enzima koji inaktiviraju antimikrobni lijek, nedostatak ciljnog mjesta za vezanje antibiotika i slično. Takva se rezistencija zove prirodna ili urođena rezistencija. Rezistencija koja nastaje naknadno, mutacijom postojećih ili stjecanjem novih gena nazivamo stečena rezistencija. Ona je najčešće posljedica pritiska antibiotika u slučaju stalne izloženosti istima (Abram i sur., 2018).

Najvažniji faktor u stvaranju stečene rezistencije je neodgovorno korištenje antibiotika te njihova zlouporaba. Mogućnost kupnje antibiotika bez recepta, preskakanje doza, ponovna uporaba ostataka antibiotika i slična ponašanja dovela su do selektivnog pritiska koji je potaknuo bakterije na postupnu prilagodbu te razvoj mehanizama rezistencije. Tome je svakako pridonio i slab razvoj novih antimikrobnih supstanci zbog čega je pronalazak novih lijekova prioritet (Abram i sur., 2018). Iako imamo opsežno znanje o mehanizmima otpornosti kod ESKAPE patogena, postoji mnogo neodgovorenih pitanja vezanih uz pojedine aspekte njihove otpornosti. Potrebno je potpuno razumjeti na koji način mehanizmi rezistencije zajedno djeluju te na koji način racionalno koristiti antimikrobne supstance tako da ne dođe do selekcijskog pritiska i stvaranja rezistencije kod bakterija. S obzirom na to kako se ne koriste samo u liječenju ljudi već i životinja te u poljoprivredi, prisutnost antibiotika u okolišu je velika. Izlaganje bakterija velikoj količini antibiotika i pojava rezistentnosti zahtijevaju kontrolu uporabe antimikrobnih tvari ne samo u zdravstvenom sustavu, već i u drugim područjima u kojima se koriste (Rice, 2010). Kako bi što više umanjili posljedice infekcije nekom od ESKAPE bakterija, važno je provesti što više istraživanja koja uključuju mehanizme rezistencije ovih patogena, kao i raditi na pronalaženju novih antimikrobnih tvari kojima bi se infekcije liječile (De Oliveira i sur., 2020).

*Enterococcus faecium* i *Staphylococcus aureus* Gram su pozitivne patogene bakterije, a danima mogu preživjeti na svim predmetima i površinama. Svuda su prisutne s obzirom na to kako su normalni dio mikrobiote kože i probavnog sustava čovjeka. Prenose se kontaminiranim rukama, odjećom ili medicinskim priborom, a uzrokuju najčešće infekcije u zdravstvenom sustavu (Abram i sur., 2018). *Klebsiella pneumoniae* i *Acinetobacter baumannii* Gram su negativne patogene bakterije često otporne na širok spektar antimikrobnih tvari. Najviše problema također stvaraju u zdravstvenom sustavu zbog svoje visoke sposobnosti širenja i nedostatka efektivnih antibiotika (Abram i sur., 2018). Detaljniji opis svake od ovih vrsta nalazi se u nastavku.

### 2.2.1. *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* (Slika 2.2.) je Gram negativan, aerobni, oportunistički patogen iz porodice *Moraxellaceae*. Ovaj patogen poznat je po infekcijama koje uzrokuje diljem svijeta, a posebice je zastupljen u zdravstvenom sustavu. Ove bakterije često su izolirane na odjelima za opekline te jedinicama za intenzivnu njegu (Paul i sur. 2019). *Acinetobacter baumannii* predstavlja problem zbog izražene rezistentnosti na više različitih antibiotika stoga je njegovo suzbijanje znatno otežano (Wahjoeprajitno i sur., 2015). Infekcije uzrokovane s *A. baumannii* ne manifestiraju se uvijek u obliku klasičnih simptoma vrućice i poremećaja svijesti, već i kao pseudomeningitis ili pseudoventrikulitis, infekcije mokraćnog sustava, infekcije rana, upala pluća, sekundarni meningitis i infekcije krvotoka. Ove su infekcije u porastu radi spomenutog svojstva rezistencije na više klasa antibiotika, a uočeno je i povećanje stope smrtnosti koja iznosi oko 15%. Predviđa se kako će u budućnosti ova brojka još rasti (Mahoney i sur., 2018). Kod *A. baumannii* mehanizmi rezistencije najčešće su podijeljeni na tri kategorije: antimikrobna inaktivacija enzimskim reakcijama, smanjeni pristup bakterijskim komponentama i promjene u staničnim funkcijama uzrokovane mutacijom. Pojava *A. baumannii* otporne na antimikrobne lijekove uzrokovana je upotrebom antibiotika širokog spektra i prijenosom sojeva među pojedincima u bolničkim i izvan bolničkom okruženju. U iranskoj bolnici, Rasoul Akram u Teheranu (Masoumi-Asl i sur., 2021), provedeno je ispitivanje rezistentnosti ove vrste na više klasa antibiotika. Uzet je uzorak od 195 pacijenata iz kojih su izolirani uzorci te su isti identificirani PCR metodom. Preko 80% izolata *A. baumannii* bili su rezistentni na cefaleksin, tetraciklin i cefiksim. Najefikasniji je bio imipenem koji je pokazao učinkovitost u 50% slučajeva. Ukupno 183 izolata, što je 93,84% od ukupnog broja uzoraka, pokazali su otpornost na minimalno tri ili više vrsta antibiotika (Masoumi-Asl i sur., 2021).



Slika 2.2. Prikaz stanica *Acinetobacter baumannii* pod elektronskim mikroskopom (<https://www.futurelearn.com/info/courses/antibiotic-resistance-non-fermenting-gram-negative-bacteria/0/steps/186971>)

### 2.2.2. *Klebsiella pneumoniae*

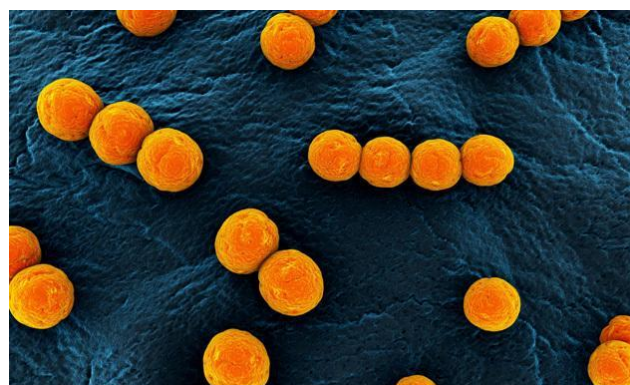
*Klebsiella pneumoniae* (slika 2.3.) je Gram negativan, fakultativno anaerobni, oportunistički patogen iz porodice *Enterobacteriaceae*. Ova je bakterija otporna na više klasa lijekova, a glavni je izvor bolničkih infekcija povezanih s visokim mortalitetom. Prirodni je stanovnik mikrobioma gastrointestinalnog trakta zdravih ljudi i životinja. Oportunistički je patogen, a uzrokuje gotovo trećinu infekcija Gram negativnim bakterijama u cjelini. Najčešće su infekcije urinarnog trakta, cistitis, pneumonija, infekcije kirurških rana te endokarditis i septikemija. Glavi problem kod liječenja infekcija uzrokovanih ovom bakterijom su ograničene mogućnosti liječenja zbog njihove rezistentnosti na lijekove (Navon-Venezia i sur., 2017). Dva su glavna tipa rezistencije na antibiotike koji su najčešće uočeni kod *K. pneumoniae*. Radi se o mehanizmu koji uključuje ekspresiju beta laktamaza proširenog spektra te drugi koji uključuje ekspresiju karbapenemaza pomoću *K. pneumoniae*. *K. pneumoniae* koristi razne strategije za rast i zaštitu od odgovora imunološkog sustava domaćina. Mnogi se mutanti *K. pneumoniae* iz pluća miševa uklanjaju brže nego sojevi divljeg tipa *K. pneumoniae*. To nam sugerira kako divlji tip koristi različite čimbenike da zaobiđe rane reakcije imunološkog sustava domaćina (Paczosa i Mecsas, 2016). Osim već spomenutih mehanizama, biofilmovi *K. pneumoniae* nastali *in vivo* također štite patogene od napada imunološkog odgovora domaćina i antibiotika. Hipervirulentna *K. pneumoniae* visoko je invazivna te može utjecati i na prethodno zdrave osobe uzrokujući životno opasne infekcije. Karakterizira je sposobnost metastatskog širenja s jednog organa na druge organe, a što je atipično za crijevne, Gram negativne bacile kada su u prisutnosti imunološke obrane domaćina. Najvažniji faktor virulencije *K. pneumoniae* je polisaharid kapsule koji igra važnu ulogu u otpornosti. Ostali faktori uključuju lipopolisaharide, fimbrije, proteine vanjske membrane i druge (Li i sur., 2014). Ove bakterije nastanjuju razne površine, ljude i životinje, a sposobne su i kontaminirati hranu. Njihova detekcija, izolacija i identifikacija trenutno nisu dobro integrirani u program mikrobiološkog nadzora hrane što predstavlja veliku opasnost, s obzirom na posljedice koje infekcije s *K. pneumoniae* mogu prouzročiti (Rodrigues i sur., 2022).



Slika 2.3. Prikaz stanica *Klebsiella pneumoniae* pod elektronskim mikroskopom (<https://nursesed.net/klebsiella-pneumoniae-and-healthcare-acquired-infections/>)

### 2.2.3. *Enterococcus faecium*

*Enterococcus faecium* (slika 2.4.) je Gram pozitivan, fakultativno anaerobni, oportunistički patogen iz porodice *Enterococcaceae*. Visoke je otpornosti na antibiotike i okolišne stresove te odlično preživljava u bolničkim okruženjima. Stalna uporaba antibiotika u medicini bila je važan pokretač u evoluciji *E. faecium*, bakterije koja je postala jedan od glavnih pokretača infekcija kod ljudi naročito stjecanje otpornosti na glikopeptide (Zhou i sur., 2020). Enterokoki također mogu biti tolerantni na niske koncentracije alkohola i klora. Često su izolirani s visoko kontaktnih mjesta kao što su ograde za krevet, ručke na vratima, toaleti, prekidači i slično. Kao posljedica toga, često se prenose i preko kontaminiranih površina u okolišu, a ne samo preko drugih ljudi (Zhou i sur., 2020). Ono što ih čini posebno rezistentnima je njihova velika otpornost na ekstremne uvjete okoliša, uključujući visoku koncentraciju NaCl-a, žučne soli, pH (4,5–10,0) i ekstremnu temperaturu (5–65 °C), što im omogućuje da opstanu, rastu i šire se pod nizom stresnih čimbenika. Dio su mikrobiote gastrointestinalnog trakta kod ljudi i životinja, no mogu prouzročiti i razne infekcije. Neke od njih su infekcije urinarnog trakta ili mjesta kirurškog zahvata, peritonitis, bakterijemija i u teškim slučajevima infekcije krvotoka te endokarditis (Trautmannsberger i sur., 2022). *E. faecium* znatno se diferencirao u ekotipove koji su prilagođeni određenim ekološkim nišama, a jedna od njih su bolnice gdje diljem svijeta predstavlja problem. Sojevi koji su se prilagodili bolničkim okruženjima akumulirali su višestruke gene otpornosti, uključujući operone gena *van*, koji daju otpornost na vankomicin. Vankomicin je glikopeptidni antibiotik namijenjen za liječenje teških, po život opasnih, infekcija. Slučajevi rezistencije enterokoka na vankomicin rastu diljem svijeta, čineći tako razvoj novih opcija liječenja ovih infekcija jednim od glavnih prioriteta (Boumasmoud i sur., 2022).



Slika 2.4. Prikaz stanica *Enterococcus faecium* pod elektronskim mikroskopom (<https://www.mmolecular.com/product/enterococcus-faecium/>)

#### 2.2.4. *Staphylococcus aureus*

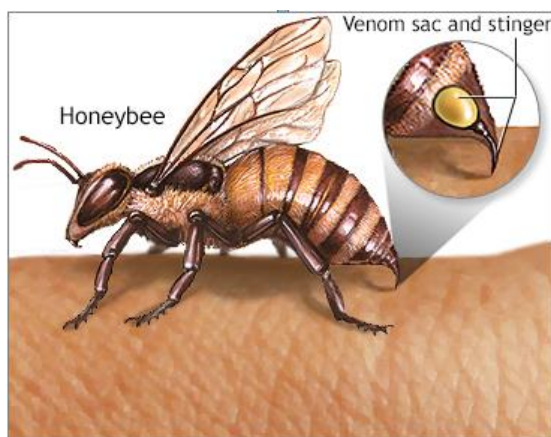
*Staphylococcus aureus* (slika 2.5.) je Gram pozitivan, fakultativno anaerobni, oportunistički patogen iz porodice *Staphylococcaceae*. Dio je mikrobiote ljudi i mnogih životinjskih vrsta, a najčešće se nalazi na površini kože ili u sluznici nosa. *Staphylococcus aureus* također je važan uzročnik bolesti ljudi i životinja. Često je uzrok kožnih bolesti, a infekcije uzrokuje u bolničkim i izvanbolničkim okruženjima. Kod životinja također izaziva bolesti kao što su kožne infekcije kod stoke, lezija kostiju i zglobova kod peradi te mastitis kod mliječnih životinja (Grace i Fetsch, 2018). Liječenje infekcija kod ljudi predstavlja sve veći problem, a posebice od pojave sojeva kao što je MRSA - *Staphylococcus aureus* otporan na meticilin (Taylor i Unakal, 2022). Osim otpornosti na meticilin, kod nekih sojeva javlja se otpornost na vankomicin. Takvi su sojevi poznati kao VRSA - *Staphylococcus aureus* otporan na vankomicin (Cong i sur. 2020). *S. aureus* najčešće ne uzrokuje infekcije na zdravoj koži, no ako mu se dopusti da uđe u unutarnja tkiva ili krvotok, ove bakterije mogu izazvati ozbiljne infekcije. Prijenos patogena najčešće je fizičkim kontaktom, no postoje i drugi načini prijenosa kao što je kontaminirana hrana. Procjenjuje se kako je polovica svih odraslih osoba kolonizirano ovom bakterijom, a otprilike 15% populacije trajno nosi *S. aureus* u prednjem nosu. Neke skupine kao što su zdravstveni radnici, osobe koje redovito koriste igle, hospitalizirani pacijenti i imunokompromitirane osobe, imaju veću stopu kolonizacije vrstom *S. aureus* (do 80%) (Taylor i Unakal, 2022). *S. aureus* izolati najčešće su otporni na beta laktame, a mnogi od njih također su otporni i na peniciline rezistentne na beta laktame. Nadalje, brzo širenje MRSA klonova često rezultira izbijanjem infekcija u bolničkim okruženjima, no to je moguće smanjiti provedbom odgovarajućih higijenskih mjera kontrole. Bolničke infekcije koje uzrokuje najčešće su one koje zahvaćaju krvotok, donji dišni sustav, kožu i mekša tkiva, kao i pneumonija te bakterijemija. Ove infekcije mogu dovesti do visokog morbiditeta, a uz to uzrokuju i visoke troškove zdravstvene zaštite. Situacija je dodatno pogoršana porastom broja sojeva koji su manje osjetljivi na razne antibiotike zbog čega je i samo liječenje otežano (Schito, 2006).



Slika 2.5. Prikaz stanica *Staphylococcus aureus* pod elektronskim mikroskopom (<https://fineartamerica.com/featured/staphylococcus-aureus-bacteria-science-photo-library.html>)

### 2.3. Pčelinji otrov (apitoksin)

Pčela je vrsta insekata iz reda opnokrilaca (*Hymenoptera*), a od kojih je najpoznatija medonosna pčela (*Apis mellifera* L.). Ona sudjeluje u nizu aktivnosti koje su usko vezane uz ljude. Neke od važnih aktivnosti su oprašivanje bilja te proizvodnja pčelinjih proizvoda (meda, pčelinjeg voska, propolisa, matične mliječi, pčelinje peludi i pčelinjeg otrova - apitoksina). Pčelinji su proizvodi opsežno istraživani zbog svojih terapijskih primjena. Apitoksini su jedni od najvažnijih supstanci koje pčele proizvode. Pčelinji se otrov sintetizira u otrovnoj žlijezdi koja se nalazi u stražnjem dijelu šupljine zatka, skuplja se u otrovnom mjehuru (smještenom u neposrednoj blizini otrovne žlijezde), a pčela ubada pomoću žalca naizmjeničnim pokretanjem dviju žalčanih iglica. (slika 2.6.). Apitoksin se sastoji od otprilike 88% vode, a ostalih 12% uključuje razne sastavnice kao što su melitin (najzastupljenija komponenta sastava pčelinjeg otrova), hijaluronidaza, fosfolipaza A<sub>2</sub>, histamin, apamin te druge manje zastupljene sastavnice (Leandro i sur., 2015). Bogat je izvor sekundarnih metabolita koji sadrži niz bioaktivnih sastojaka (El-Seedi i sur., 2020).



Slika 2.6. Ilustracija položaja otrovnog mjehura i žalca medonosne pčele (<https://www.mountsinai.org/health-library/poison/bee-poison>)

Smatra se kako apitoksini pokazuju djelovanje prema raznim vrstama bakterija, no mehanizam djelovanja na najveći broj bakterijskih vrsta još nije u potpunosti poznat. Apitoksin se koristi se u liječenju upalnih bolesti kao što su reumatoidni artritis ili multipla skleroza, a poznato je i kako može znatno poboljšati proces zacjeljivanja rana. Posjeduje protuupalna, antioksidativna, antifungalna, antivirusna, antimikrobna i analgetska svojstva, a sve navedeno pozitivno utječe na proces zacjeljivanja rana. To je posebno važno kod dijabetičara koji zbog hipoksije, stanja smanjene količine kisika u stanicama, imaju poremećen proces zacjeljivanja rana (Kurek-Górecka i sur., 2020).

Apiterapija je alternativna terapija koja se oslanja na korištenje pčelinjih proizvoda, a važna je za liječenje mnogih bolesti kod ljudi. Apitoksini se u ljudsko



tijelo mogu unijeti ručnom injekcijom ili izravnim ubodom pčele. Sadrži nekoliko aktivnih molekula kao što su peptidi i enzimi, a koji imaju povoljan potencijal u liječenju upale i bolesti središnjeg živčanog sustava, kao što su Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest i amiotrofična lateralna skleroza. Pčelinji je otrov pokazao potencijal i za antivirusno djelovanje te u borbi protiv zloćudnih tumorskih stanica. Mnoga provedena istraživanja predviđaju uporabu apitoksina i njegovih sastojaka kao sljedeće generacije lijekova (Wehbe i sur.,2019).

### **2.3.1. Glavni spojevi u sastavu apitoksina**

Apitoksin je prozirna tekućina bez mirisa, a sadrži hidrolitičku smjesu proteina s kiselinom čiji je pH 4,5 do 5,5 koju pčele često koriste kao obrambeno sredstvo pri napadu predatora (Wehbe i sur.,2019). Apitoksin sadrži 88% vode, te melitin, apamin, adolapin, fosfolipazu A<sub>2</sub>, hijaluronidaze, te peptide za degranulaciju mastocita. Ove komponente opisane su u nastavku.

Melitin je peptid sastavljen od 26 aminokiselina te je glavna komponenta pčelinjeg otrova. Njegovo amfipatsko svojstvo čini ga topivim u vodi te omogućuje jednostavno umetanje melitina u membrane poremećajem prirodnih i sintetskih fosfolipidnih dvoslojeva. Melitin se veže za membrane kao monomer, ali djeluje isključivo na membranu. Pokazalo se kako melitin uzrokuje neuralne plastične promjene duž signalnih putova boli aktivacijom i senzibilizacijom nociceptorskih stanica. Te su stanice senzorni neuroni koji reagiraju na štetne ili potencijalno štetne podražaje na način da šalju signale leđnoj moždini i mozgu. Zaključno, melitin je biološki aktivna tvar pčelinjeg otrova koja ima antinociceptivni, protuupalni i antiartritični učinak nakon primjene na pacijentu (Wehbe i sur.,2019).

Apamin je peptid sastavljen od 18 aminokiselina, a sastoji se od dva disulfidna mosta. On je najmanji neurotoksin u sastavu pčelinjeg otrova. Na različite načine djelovanja utječe na funkcioniranje središnjeg živčanog sustava jer je sposoban prijeći krvno-moždanu barijeru. Uzrokuje primjerice neurotoksične učinke kod leđne moždine sisavaca, što dovodi do hiperaktivnosti i napadaja. Može utjecati i na propusnost stanične membrane prema ionima kalija. Suhi pčelinji otrov sastoji se od 2 do 3% apamina, a koristi se u raznim biotehnološkim i medicinskim istraživanja zbog svojstava koje sadrži (Wehbe i sur.,2019).

Adolapin je polipeptid sastavljen od 103 aminokiseline. Čini oko 1% sastava suhog pčelinjeg otrova. Utvrđeno je kako ima protuupalne, antinociceptivne i antipiretičke učinke. Uz navedeno, sposoban je inhibirati enzim lipoksigenazu iz ljudskih trombocita (Wehbe i sur.,2019).

Fosfolipaza A<sub>2</sub> polipeptidni je lanac sastavljen od 128 aminokiselina, a sadrži četiri disulfidna mosta. To je najsmrtonosniji enzim u sastavu pčelinjeg otrova.

Predstavlja 12-15% sastava suhog apitoksina te je izrazito alkalna. Dokazano je kako tijekom procesa lize elektrocita, melitin poboljšava aktivnost fosfolipaze A<sub>2</sub> što utvrđuje prisutnost sinergističkog djelovanja između melitina i fosfolipaze A<sub>2</sub>. Istraživanja su pokazala kako fosfolipaza A<sub>2</sub> ima zaštitne imunološke odgovore protiv šireg spektra bolesti, kao što su Alzheimerova bolest i Parkinsonova bolest. Osim navedenog ima i neuroprotektivnu ulogu (Wehbe i sur.,2019).

Hijaluronidaza je enzim koji uzrokuje razgradnju hijalurona, a prirodno se nalazi i u ljudskom organizmu. Predstavlja 1,5 do 2% sastava suhog pčelinjeg otrova. Ovi enzimi omogućuju aktivnim komponentama apitoksina da učinkovito difundiraju u tkivo žrtve te utječu na njegov strukturni integritet i povećavaju protok krvi u tom području. Ove radnje služe kako bi se otrov što više proširio (Wehbe i sur.,2019).

Peptid za degranulaciju mastocita (MCD) je peptid koji sadrži 22 aminokiseline, a kao i apamin, sadrži dvije disulfidne veze. Čini oko 2 do 3% sastava suhog pčelinjeg otrova. To je epileptogeni neurotoksin, važan inhibitor K<sup>+</sup> kanala, a može uzrokovati i značajno smanjenje krvnog tlaka. Snažno je protuupalno sredstvo, a može poslužiti kao potencijalni kandidat za proučavanje sekretornih mehanizama upalnih stanica, kao što su mastociti, bazofili i leukociti (Wehbe i sur.,2019).

### **2.3.2. Antimikrobno djelovanje apitoksina**

Otrovi različitih životinja kao što su pčele, zmijske, ose i škorpioni predstavljaju obećavajuća antimikrobna sredstva koja su nužna s obzirom na gorući problem bakterijske antibiotičke rezistencije u svijetu. U istraživanju Lamas i sur. (2020), napravljena je procjena antimikrobnog djelovanja apitoksina, te minimalna inhibitorna koncentracija za pet apitoksina dobivenih iz pčelinjaka smještenih u različitim dijelovima Ekvadora. U studiju je bilo uključeno 50 sojeva *Salmonella enterica* te 8 sojeva bakterije *Listeria monocytogenes*. Minimalna inhibitorna koncentracija određena je mikrodilucijskom metodom pri čemu je najniža koncentracija antimikrobnog sredstva definirana kao ona koja je potpuno inhibirala vizualni rast organizama. Svih pet apitoksina pokazalo je inhibitorno djelovanje prema svim sojevima *S. enterica* i *L. monocytogenes* koji su bili uključeni u studiju. Kod *S. enterica*, minimalna inhibitorna koncentracija kretala se između 256 i 1024 µg/mL, no kod većine sojeva bila je 512 µg/mL. Kod *L. monocytogenes*, minimalna inhibitorna koncentracija kretala se između 16 i 32 µg/mL što su značajno niže koncentracije od onih potrebnih za inhibiciju sojeva *S. enterica*. Koncentracije su također varirale s obzirom na različite uzorke apitoksina te na različite sojeve. Zaključno je utvrđeno kako je apitoksin potencijalno alternativno sredstvo za inhibiciju rasta uobičajenih patogena koji se prenose hranom (Lamas i sur., 2020).

U istraživanju Han i sur. (2016), ispitana je antimikrobna aktivnost pčelinjeg otrova sakupljenog s područja Koreje, kao i njegovi sinergistički učinci u kombinaciji s

ampicilinom, penicilinom, gentamicinom ili vankomicinom prema meticilin rezistentnim *S. aureus* (MRSA) sojevima. Korištena su dva soja *S. aureus*, CCARM 3366 i CCARM 3708 iz zbirke kultura mikroorganizama otpornih na antibiotike koja se nalazi u Koreji. Za određivanje MIC-e korištena je metoda mikrodilucije. Određena je frakcijska inhibitorna koncentracija, putem formule  $FIC = (MIK \text{ lijeka A u kombinaciji} / MIK \text{ lijeka A samostalnog}) + (MIK \text{ lijeka B u kombinaciji} / MIK \text{ lijeka B samostalnog})$ . Temeljem FIC indeksa određena je razina sinergije. Apitoksin je inhibirao rast oba soja, a minimalne inhibitorne koncentracije iznosile su 0,085 µg/mL za soj CCARM 3366 te 0,11 µg/mL za soj CCARM 3708. Apitoksin imao je djelomične sinergističke učinke s penicilinom za oba soja MRSA, indiferentne sinergističke učinke s ampicilinom, a gentamicin i vankomicin pojačali su baktericidno djelovanje apitoksina na oba soja MRSA. Utvrđeno je kako ispitivani apitoksin ima antibakterijsko i sinergističko djelovanje s ampicilinom, penicilinom, gentamicinom ili vankomicinom (Han i sur., 2016).

U istraživanju provedenom na Agronomskom fakultetu u Zagrebu (Tanuwidjaja i sur., 2021). ispitano je antibakterijsko djelovanje pčelinjeg otrova prikupljenog na području Bjelovarsko-bilogorske županije 2018. godine te je uspoređeno s djelovanjem konvencionalnih antibiotika. U istraživanju su korištene različite biomase patogenih bakterija *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* i *Salmonella enterica* određivanjem minimalnih inhibitornih i baktericidnih koncentracija. Antibakterijski učinci apitoksina uspoređeni su s djelovanjem konvencionalnih antibiotika korištenjem testova difuzije diska u agaru. Utvrđeno je kako su i MIK i MIB vrijednosti u korelaciji s početnom biomasom patogena, odnosno kako se s povećanjem gustoće bakterija povećala i potrebna koncentracija apitoksina koja bi izazvala inhibitorni učinak. Nadalje, svi su patogeni pokazali osjetljivost na konvencionalne antibiotike te kako njihova osjetljivost na apitoksine raste s porastom koncentracije apitoksina. Metodom difuzije diska dokazano je kako je ispitivani apitoksin (400 µg) pokazao do 27,8% učinkovitosti tetraciklina (30 µg), 52,2% eritromicina (15 µg), 21,2% ciprofloksacina (5 µg) i 34,6% ampicilin sulbaktama (20 µg). Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako je ispitivani pčelinji otrov iznadprosječnih svojstava te je kako je odlično alternativno antimikrobno sredstvo (Tanuwidjaja i sur., 2021).

## 2.4. Metode za određivanje djelotvornosti antimikrobnog agensa

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobne tvari koja je potrebna kako bi vidljivo inhibirala rast određene bakterijske vrste. Minimalna baktericidna koncentracija (MBK) predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobne tvari koja je potrebna kako bi djelovala letalno na određenu bakterijsku vrstu. MIK i MBK se uglavnom određuju kako bi potvrdili rezistentnost neke bakterijske vrste na antibiotike ili kako bi *in vitro* odredili antimikrobnu aktivnost nekog agensa. MIK možemo odrediti s više metoda, a najčešće se koriste metoda razrjeđivanja u agaru ili tekućem mediju te metoda gradijenta (Kowalska-Krochmal i Dudek-Wicher, 2021).

Za određivanje MIK vrijednosti, najčešće se koristi Mueller-Hinton (MH) medij bilo u obliku agara (MHA) ili bujona (MHB). Kako bi odredili MIK metodom razrjeđivanja, antimikrobnu tvar najprije je potrebno otopiti, najčešće u sterilnoj vodi, kako bi dobili osnovnu otopinu koju je zatim potrebno razrijediti kako bi dobili odgovarajuću početnu koncentraciju. Neke antimikrobne tvari zahtijevaju alkohol kao otapalo dok je drugima potreban fosfatni pufer ili dimetil sulfoksid (DMSO). U metodi mikrodilucije bujona, pripremljene radne otopine raspoređuju se u odgovarajuće jažice mikrotitarskih ploča te se u tom obliku mogu izravno koristiti za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije. MIK vrijednost je najniža koncentracija djelatne tvari pri kojoj je rast bakterija potpuno inhibiran te se ne može utvrditi vizualnim pregledom ili spektrofotometrijskim određivanjem apsorbancije (Kowalska-Krochmal i Dudek-Wicher, 2021).

Metoda gradijenta jednostavnija je od metode razrjeđivanja te je brza i primjenjiva u rutinskoj mikrobiološkoj dijagnostici. Koriste se E-test trakice koje su impregnirane s unaprijed definiranim gradijentom koncentracije. Unatoč njenoj jednostavnosti, posljednjih se godina rjeđe koristi s obzirom na to da je utvrđeno kako kod sojeva *Staphylococcus* spp. daje nepouzdan rezultate određivanja osjetljivosti na neke od antibiotika (Kowalska-Krochmal i Dudek-Wicher, 2021).

Određivanje MBK vrijednosti se najčešće provodi prijenosom razrjeđenja iz jažica mikrotitarske ploče na krutu hranjivu podlogu. Prenose se razrjeđenja u kojima nije bilo vidljivog rasta bakterija. Nakon inkubacije određuje se broj naraslih kolonija (Bär i sur., 2009).

## **3. Materijali i metode**

### **3.1. Laboratorijski uređaji**

U nastavku su navedeni laboratorijski uređaji korišteni u ovom istraživanju:

- Brojač kolonija, Colony star (Funke Gerber, Njemačka)
- Denzitometar, DEN-1 Densitometer (Biosan, Latvija)
- Inkubator, Sanyo incubator (Sanyo Electronic CO. Ltd., Japan)
- Laboratorijska vaga (Santarius AG, Hrvatska)
- Orbitalna treskalica/inkubator, Orbital shaker – Incubator ES-20 (Biosan, Latvija)

### **3.2. Pufferi i indikatorske otopine**

#### **3.2.1. Fiziološka otopina (0,85%)**

Fiziološka otopina je pripravljena otapanjem 8,5 g natrij klorida (VWR Chemicals, Belgija) u 1000 ml destilirane vode. Otopina je sterilizirana u autoklavu tijekom 15 minuta na 121 °C. Sterilna fiziološka otopina je korištena za pripremu bakterijske biomase korištene za probir antimikrobne aktivnosti apitoksina, serijsko razrjeđenje potrebno za kontrolu biomase i MIK i MBK vrijednosti.

#### **3.2.2. Otopina resazurina (0,02%)**

Otopina resazurina je pripravljena otapanjem 0,02 g resazurin natrijeve soli (Santa Cruz Biotechnology, SAD) u 100 ml sterilne destilirane vode i filtrirana kroz membranski filter promjera pora 0,22 µm (VWR International, Belgija). Ovako pripravljena otopina korištena je za određivanje MIK vrijednosti.

### **3.3. Hranjive podloge**

#### **3.3.1. Brain heart infusion (BHI) agar**

Krute hranjive BHI podloge (Biolife, Italija) primljene su otapanjem 52,0 g dehidrirane BHI podloge u 1000 ml destilirane vode. Pripravljena podloga zatim je sterilizirana u autoklavu tijekom 15 min pri 121 °C. Nakon sterilizacije otpipetirano je po 20 ml podloge u petrijeve zdjelice i ostavljeno da polimeriziraju na sobnoj temperaturi. Ove podloge korištene su za iscrpljivanje ispitivanih sojeva, probir antimikrobnog djelovanja apitoksina te provjeru biomase, MIK i MBK vrijednosti apitoksina.

### 3.3.2. Müller-Hinton (MH) tekuća hranjiva podloga

Tekuća MH hranjiva podloga pripravljena je otapanjem 22,0 g dehidrirane MH podloge (Biolife, Italija) u 1000 ml destilirane vode. Podloga je potom sterilizirana u 1000 ml destilirane vode i sterilizirana autoklaviranjem tijekom 15 min pri 21 °C. Ova podloga je korištena za određivanje MIK i MBK vrijednosti apitoksina.

### 3.4. Podrijetlo i radne otopine apitoksina

U ovom istraživanju ispitana je antimikrobna aktivnost različitih apitoksina (n = 3) prikupljenih na području Republike Hrvatske u razdoblju od 2018. do 2021. Prvi apitoksin prikupljen je na području Bjelovarsko-bilogorske, drugi na području Krapinsko-zagorske, a treći Splitsko-dalmatinske županije. Oznake ispitivanih apitoksina navedene su u nastavku:

- Ap 1
- Ap 2
- Ap 3

Radne otopine apitoksina (1 mg/ml) pripravljene su otapanjem 0,01 g apitoksina u 10 ml sterilne destilirane vode i sterilno filtrirane kroz membranski filter promjera pora 0,22 µm (VWR International, Belgija).

### 3.5. Bakterijske kulture

U ovom je istraživanju korištene su četiri vrste višestruko otpornih bakterija (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. faecium* i *S. aureus*), a od svake je korišteno po pet različitih sojeva (n=20). Ispitane bakterije su izolirane iz otpadnih voda te bolničkog okruženja i ustupljene od strane Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ (KFM) i Instituta „Ruđer Bošković“ (IRB). Popis istih naveden je niže:

- *A. baumannii* AB\_6<sup>KFM</sup>
- *A. baumannii* AB\_7<sup>KFM</sup>
- *A. baumannii* AB\_8<sup>KFM</sup>
- *A. baumannii* AB\_9<sup>KFM</sup>
- *A. baumannii* AB\_10<sup>KFM</sup>
- *K. pneumoniae* SE\_SC\_COL\_46<sup>IRB</sup>
- *K. pneumoniae* SE\_SC\_COL\_68<sup>IRB</sup>
- *K. pneumoniae* SE\_SC\_COL\_96<sup>IRB</sup>
- *K. pneumoniae* SE\_SC\_COL\_173<sup>IRB</sup>
- *K. pneumoniae* H2\_COL\_79<sup>IRB</sup>
- *E. faecium* SE\_SC\_COL\_40<sup>IRB</sup>
- *E. faecium* SE\_SC\_COL\_73<sup>IRB</sup>
- *E. faecium* SE\_SC\_COL\_119<sup>IRB</sup>
- *E. faecium* 193/0<sup>KFM</sup>

- *E. faecium* 560/2<sup>KFM</sup>
- *S. aureus* SA\_6<sup>KFM</sup>
- *S. aureus* SA\_7<sup>KFM</sup>
- *S. aureus* SA\_8<sup>KFM</sup>
- *S. aureus* SA\_9<sup>KFM</sup>
- *S. aureus* SA\_14<sup>KFM</sup>

### 3.6. Probir (engl. screening) antimikrobne aktivnosti apitoksina

Probir antimikrobne aktivnosti apitoksina prema višestruko otpornim bakterijama određen je pomoću modificirane Kirby-Bauerove disk difuzijske metode (Bauer i sur., 1959.), odnosno pomoću metode difuzije iz bunara. Sama analiza uključuje niže navedene korake:

- Priprema biomase
- Metoda difuzije iz bunara

#### 3.6.1. Priprema bakterijske biomase

Svi sojevi su pročišćeni metodom iscrpljenja do monokulture na krutoj BHI podlozi. Potom su inkubirani u aerobnim uvjetima pri 37 °C preko noći (Sanyo MIR – 153, Sanyo electric, Japan).

Nakon inkubacije, pojedinačne kolonije za svaki soj dodavane su u sterilne staklene epruvete s 5 ml fiziološke otopine do postizanja turbiditeta koji odgovara turbiditetu McFarland standarda od 0;5 (odgovara bakterijskoj koncentraciji  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml). Turbiditet je izmjeren pomoću denzitometra (DEN – 1 Densitometar, Biosan, Latvija).

#### 3.6.2. Metoda difuzije agara u bunaru

Bakterijske suspenzije svakog soja koje su pripremljene kao što je opisano u poglavlju 3.6.1 su inokulirane sterilnim vatenim štapićem na krute BHI podloge točno određenog volumena (20 ml) u tri razmazivanja. Između svakog razmaza, BHI ploča je rotirana za 60°. Širim krajem sterilnog nastavka za mikropipete volumena 1 ml (promjer nastavka = 8 mm), izbušeni su bunari u BHI agaru. Bunari su ispunjeni sa 100 µl odgovarajućeg apitoksina (1 mg/ml) ili 100 µl 0,5%-tne otopine dimetil sulfoksida (DMSO, Sigma-Aldrich, SAD). Obzirom da DMSO u niskim koncentracijama (<1,0%) ne utječe na bakterijski rast, korišten je kao negativna kontrola za provjeru bakterijskog rasta. Antimikrobno djelovanje apitoksina i negativna kontrola za svaki soj su ispitani u duplikatima.

Ploče su potom ostavljene u hladnjaku na 4 °C tijekom 30 min, kako bi se izbjeglo isparavanje apitoksina i osigurala njegova difuzija u ploče. Ploče su zatim inkubirane 24 h na 37 °C. Nakon inkubacije izmjeren je promjer u kojem je izostao bakterijski rast, tzv. zone inhibicije rasta koje uključuju i promjer bunara, a izražene su u milimetrima (mm).

### **3.7. Određivanje minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije**

Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije apitoksina koje inhibiraju rast odnosno djeluju letalno na ispitivane sojeve određene su mikrodilucijskom metodom uz dodatak resazurina (engl. *resazurin microplate assay*, REMA; CLSI 2012; Coban, 2012). Sama analiza uključuje sljedeće korake:

- Priprema biomase
- Priprema koncentracijskog gradijenta apitoksina u mikrotitarskim pločama s 96 bunara metodom serijske mikrodilucije
- Inokulacija ispitivanih sojeva
- Provjera aplicirane biomase
- Provjera MIK i MBK vrijednosti subkultivacijom na krutim BHI pločama

#### **3.7.1. Priprema bakterijske biomase**

Ispitivani sojevi prvo su iscrpljeni na krutoj BHI podlozi te potom inkubirani na 37 °C tijekom 24 sata. Pojedinačne kolonije potom su dodane u 5 ml fiziološke otopine kako bi dobili bakterijsku suspenziju turbiditeta koji odgovara turbiditetu od 0.5 McFarland standarda (biomasa  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml).

Bakterijske suspenzije zatim su razrijeđene u omjeru 1:10 u sterilnoj fiziološkoj otopini do koncentracije  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml. Razrjeđenje je provedeno tako što su dvije sterilne epice napunjene s 900 µl sterilne fiziološke otopine. U prvu epicu dodano je 100 µl bakterijske suspenzije McFarland standarda 0.5, (biomasa  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml) te je epica vorteksirana. Zatim je iz prve u drugu epicu preneseno 100 µl te je suspenzija ponovno vorteksirana. Suspenzija u drugoj epici sadrži  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml te je korištena u daljnjoj analizi.

#### **3.7.2. Priprema koncentracijskog gradijenta apitoksina u mikrotitarskim pločama s 96 bunara i aplikacija sojeva (REMA)**

Radna otopina svakog apitoksina pripremljena je kao što je opisano u poglavlju 6.4. Kako bi se odredile MIK i MBK vrijednosti, prvo je ispitan raspon koncentracija apitoksina 7,81 do 500 µg/ml. Navedeni koncentracijski gradijent apitoksina u mikrotitarskoj ploči postignut je serijskim razrjeđenjem u omjeru 1:2.

Ukratko, u sve bunare u redovima A do H otpipetirano je po 140 µl tekuće Müller-Hinton podloge. U sve bunare u redu A dodano je 140 µl apitoksina koncentracije 1 mg/ml. Zatim je 140 µl iz bunara u redu A, multikanalnom pipetom prebačeno u bunare u redu B. Isti postupak je ponovljen do reda G odakle je uklonjeno suvišnih 140 µl te je na kraju volumen sadržaja u svim bunarima iznosio 140 µl. Bunari u redu H sadržavali su samo 140 µl tekuće Müller-Hinton podloge te su korišteni za kontrolu rasta ispitivanih sojeva. Na taj način je postignut sljedeći koncentracijski gradijent apitoksina: red A – 500 µg/ml; red B – 250 µg/ml, red C –



125 µg/ml, red D – 62,5 µg/ml, red E - 31,25 µg/ml; red F – 15,63 µg/ml; red G – 7,81 µg/ml; red H – 0,00 µg/ml.

U sve bunare u redovima do A do H dodano je 10 µl bakterijske suspenzije koja je sadržavala  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml (poglavlje 3.7.1.) i 15 µl resazurina (0,02% otopina). Konačna biomasa ispitivanih sojeva u mikrotitarskoj ploči iznosila je oko  $10^5$  CFU/ml. Ploče su zatim inkubirane 24 h pri 37 °C.

Nakon inkubacije vizualno su očitane MIK vrijednosti apitoksina. Najniža koncentracija kod koje izostaje bakterijski rast predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju. Bakterijski rast je praćen pomoću resazurina, indikatora plave boje. Žive stanice reduciraju resazurin u ružičasto obojani resofurin. Stoga, promjena plave u ružičastu boju indicira bakterijski rast.

Cijeli, gore opisani, postupak je ponovljen s nižim koncentracijama apitoksina u rasponu od 8,0 µg/mL (A red) do 0,13 µg/ml (G red) za one sojeve čiji rast je inhibiran koncentracijom apitoksina od 7,81 µg/ml.

### 3.7.3. Provjera biomase

Kako bi se provjerilo iznosi li stvarno biomasa sojeva apliciranih u mikrotitarsku ploču  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml, biomasa pripremljena kao što je opisano u poglavlju 6.7.1. je serijski razrijeđena u omjeru 1:10.

Uzeta je nova sterilna mikrotitarska ploča te je u red A otpipetirano 180 µl odgovarajuće bakterijske suspenzije biomase  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml. U sve ostale redove, od B do H, dodano je po 180 µl sterilne fiziološke otopine. Po 20 µl prebačeno iz reda A u red B pomoću multikanalne pipete. Potom je po 20 µl prebačeno iz bunara u redu B u bunare u redu C te je postupak ponovljen do reda H.

Za svaki soj, po 5 µl iz svakog bunara je prenešeno multikanalnom pipetom na krutu BHI podlogu u četiri ponavljanja. Ploče su inkubirane pri 37 °C tijekom 24 h te su prebrojane izrasle kolonije i izračunat je broj bakterija prisutan u korištenoj biomasi prema sljedećoj formuli:

$$\text{Broj bakterija} \left[ \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{Broj kolonija}}{V(\text{nacjepljeni uzorak})[\text{mL}]} \times \text{recipročno razrjeđenje uzorka}$$

Rezultati su izraženi kao jedinice koje formiraju kolonije/ml (engl. *colony forming units*, CFU/ml).

### 3.7.4. Provjera MIK i MBK subkultivacijom

Nakon što su vizualno očitane MIK vrijednosti, MIK i MBK vrijednosti su dodatno provjerene subkultivacijom na krutim BHI podlogama. U tu svrhu, po 5 µl iz svih bunara u mikrotitarskoj ploči za određivanje MIK (poglavlje 6.7.2.) je nacjepljeno na krute BHI podloge u duplikatima. Ploče su inkubirane 24 h pri 37 °C. Nakon inkubacije, prebrojane su kolonije, broj preživjelih bakterija izračunat je prema formuli u poglavlju 3.7.3. i izražen kao CFU/ml.

Broj umrlih bakterija prema niže navedenoj formuli i izražen je u postotcima (%):

$$\text{Umrle bakterijske stanice [\%]} = \left(1 - \frac{\text{CFU2}}{\text{CFU1}}\right) \times 100$$

gdje je:

CFU1 – broj bakterija korišten za određivanje MIK vrijednosti apitoksina

CFU2 – broj preživjelih bakterija nakon tretmana apitoksinom

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je koncentracija kod koje je postotak umrlih bakterija > 99,5%, a minimalna baktericidna (MBK) koncentracija kod koje je postotak umrlih bakterija > 99,9%.

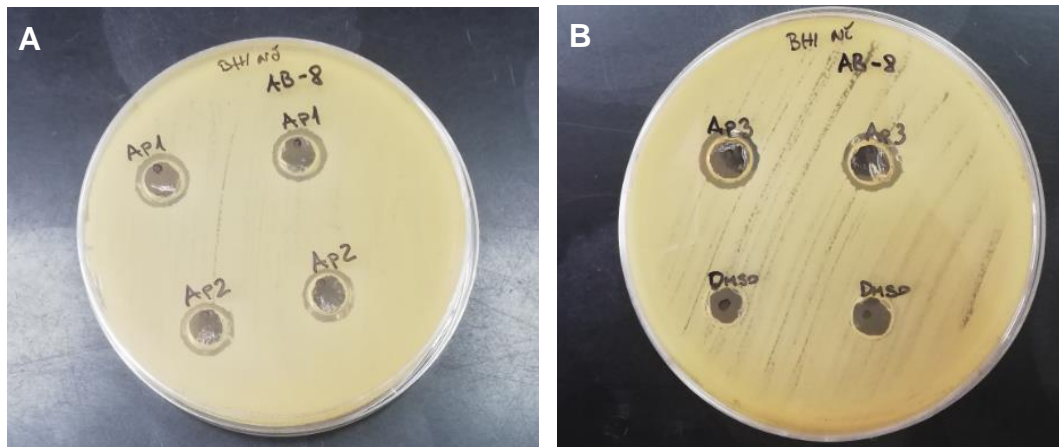
### **3.8. Statistička obrada podataka**

Zona inhibicije rasta, MIK i MBK vrijednosti u ovom istraživanju su prikazane kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajne razlike određene su jednosmjernom analizom varijance ANOVA (engl. one-way ANOVA). Srednje vrijednosti su međusobno višestruko uspoređene post-hoc Bonferroni testom. Razlike se smatraju značajnima ako je  $p < 0,05$ . Svi podatci i statističke analize provedene su u računalnom programu Microsoft Excel 2016 uz pomoć dodatka Analiza podataka (engl. Analysis ToolPak).

## 4. Rezultati

### 4.1. Antimikrobna aktivnost apitoksina

U ovom istraživanju, prvo je provjereno djeluju li ispitivani apitoksini inhibitorno na višestruko otporne Gram negativne (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*) i Gram pozitivne (*E. faecium*, *S. aureus*) bakterije metodom difuzije iz bunara. Inhibitorno djelovanje apitoksina očituje se kao prozirna zona oko bunara gdje izostaje bakterijski rast (Slika 4.1).

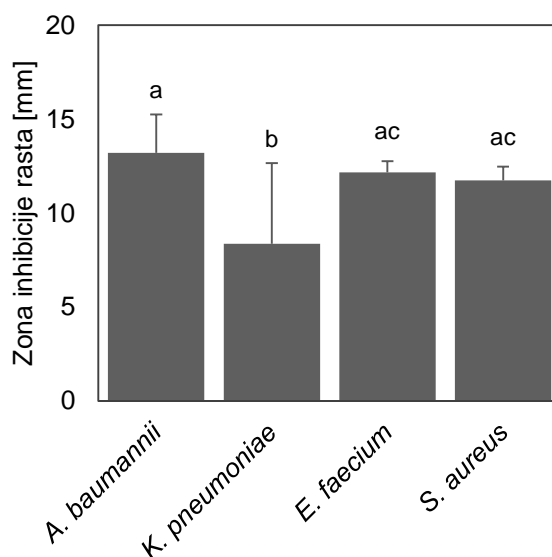


Slika 4.1. Primjer antimikrobne aktivnosti apitoksina Ap 1-Ap 3 prema soju AB\_8 vrste *A. baumannii*. A) Inhibicija rasta soja AB\_8 uzrokovana djelovanjem Ap 1 i Ap2. B) Inhibicija rasta soja AB\_8 uzrokovana djelovanjem Ap 3 i izostanak inhibicije rasta soja AB\_8 kod negativne kontrole DMSO (0,05%).

Osjetljivost ispitivanih bakterija na apitoksine se značajno razlikuje s obzirom na građu stanične stijenke i vrstu.

Generalno, Gram pozitivne bakterije su osjetljivije na djelovanje apitoksina (zona inhibicije rasta kod Gram pozitivnih bakterija  $11,9 \text{ mm} \pm 0,7 \text{ mm}$ ; Gram negativnih  $10,8 \text{ mm} \pm 4,1 \text{ mm}$ ; ANOVA, Bonferroni test:  $p = 0,03$ ).

Što se tiče vrsti, osjetljivost ne slijedi u potpunosti trend djelovanja s obzirom na građu stanične stijenke, pa tako Gram negativna vrsta *A. baumannii* ( $13,2 \text{ mm} \pm 2,0 \text{ mm}$ ) je osjetljivija od Gram pozitivnih vrsta (*E. faecium*,  $12,2 \text{ mm} \pm 0,6 \text{ mm}$ ; *S. aureus*,  $11,7 \text{ mm} \pm 0,7 \text{ mm}$ ) i identificirana kao najosjetljivija na djelovanje apitoksina, dok je vrsta *K. pneumoniae* ( $8,4 \text{ mm} \pm 4,3 \text{ mm}$ ) najotpornija na djelovanje apitoksina. Vrsta *K. pneumoniae* je značajno otpornija na djelovanje apitoksina od ostalih ispitanih vrsti (ANOVA, Bonferroni test:  $p < 0,001$ ). Osjetljivost *A. baumannii* se ne razlikuje značajno od osjetljivost vrsta *E. faecium* i *S. aureus* (Graf 4.1).



Graf 4.1. Osjetljivost ispitanih vrsta na djelovanje apitoksina. Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta u milimetrima za *A. baumannii* (n=5), *K. pneumoniae* (n=5), *E. faecium* (n=5) i *S. aureus* (n=5) s pripadajućim standardnim devijacijama. Slovicima a-c su označene statistički značajne razlike (jednosmjerna ANOVA, Bonferroni test:  $p < 0,05$ ) u osjetljivosti vrsta na djelovanje apitoksina.

U pravilu, sojevi iste vrste pokazuju sličnu osjetljivost na apitoksine. Iznimka su sojevi AB\_6 vrste *A. baumannii* koji je značajno osjetljiviji (ANOVA, Bonferroni test:  $p < 0,001$ ) na djelovanje svih apitoksina u usporedbi s ostalim sojevima unutar vrste i soj SE\_SC\_COL\_46 vrste *K. pneumoniae* (ANOVA, Bonferroni test:  $p < 0,001$ ) koji je u potpunosti otporan na djelovanje svih apitoksina (Tablica 4.1). Obzirom da apitoksini ne pokazuju nikakav učinak, soj SE\_SC\_COL\_46 je izostavljen iz daljnjih analiza.

Tablica 4.1. Antimikrobno djelovanje apitoksina Ap 1 – Ap 3 na Gram negativne i Gram pozitivne vrste. Prikazane su srednje vrijednosti zona inhibicije rasta s pripadajućim standardnim devijacijama.

Vrsta	Soj	Zona inhibicije rasta [mm]			$\bar{x} \pm sd$ (soj)
		Ap 1	Ap 2	Ap 3	
<i>A. baumannii</i>	AB_6	17,0 ± 0,0	16,0 ± 0,0	18,0 ± 0,0	17,0 ± 0,9 <sup>a</sup>
	AB_7	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
	AB_8	13,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	13,0 ± 0,0	12,7 ± 0,5 <sup>b</sup>
	AB_9	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	13,0 ± 0,0	12,3 ± 0,5 <sup>b</sup>
	AB_10	11,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	13,0 ± 0,0	12,0 ± 0,9 <sup>b</sup>
	$\bar{x} \pm sd$ (Ap)	13,0 ± 2,2 <sup>a</sup>	12,8 ± 1,7 <sup>a</sup>	13,8 ± 2,2 <sup>a</sup>	
<i>K. pneumoniae</i>	SE_SC_COL_46	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	SE_SC_COL_68	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	11,0 ± 0,0	10,3 ± 0,5 <sup>b</sup>
	SE_SC_COL_96	10,0 ± 0,0	11,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,3 ± 0,5 <sup>b</sup>
	SE_SC_COL_173	11,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,3 ± 0,5 <sup>b</sup>
	H2_COL_79	10,5 ± 0,7	11,0 ± 0,0	11,0 ± 0,0	10,8 ± 0,4 <sup>b</sup>

$\bar{x} \pm sd$  (Ap)                      8,3 ± 4,4<sup>a</sup>      8,4 ± 4,5<sup>a</sup>      8,4 ± 4,5<sup>a</sup>

Nastavak Tablice 1.

Vrsta	Soj	Zona inhibicije rasta [mm]			
		Ap 1	Ap 2	Ap 3	$\bar{x} \pm sd$ (soj)
<i>E. faecium</i>	SE_SC_COL_40	13,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	11,0 ± 0,0	12,0 ± 0,9 <sup>a</sup>
	SE_SC_COL_73	12,0 ± 0,0	13,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	12,3 ± 0,5 <sup>a</sup>
	SE_SC_COL_119	12,0 ± 0,0	12,5 ± 0,7	12,0 ± 0,0	12,2 ± 0,4 <sup>a</sup>
	193/0	12,5 ± 0,7	12,5 ± 0,7	12,5 ± 0,7	12,5 ± 0,5 <sup>a</sup>
	560/2	12,0 ± 0,0	11,5 ± 0,7	12,0 ± 0,0	11,8 ± 0,4 <sup>a</sup>
	$\bar{x} \pm sd$ (Ap)	12,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	12,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	11,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	
<i>S. aureus</i>	SA-6	11,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	11,6 ± 0,5 <sup>a</sup>
	SA-7	12,5 ± 0,7	10,5 ± 0,7	11,0 ± 0,0	11,7 ± 0,5 <sup>a</sup>
	SA-8	12,0 ± 0,0	12,0 ± 1,4	12,0 ± 0,0	11,3 ± 1,0 <sup>a</sup>
	SA-9	12,0 ± 0,0	11,0 ± 0,0	13,0 ± 0,0	12,0 ± 0,6 <sup>a</sup>
	SA-14	11,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,9 <sup>a</sup>
	$\bar{x} \pm sd$ (Ap)	11,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	11,5 ± 0,8 <sup>a</sup>	12,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	

$\bar{x} \pm sd$  (Ap) - srednja vrijednost zone inhibicije rasta izračunata na temelju izostanka rasta svih sojeva iste vrste uzrokovanog nekim od ispitivanih apitoksina (Ap 1, Ap 2 ili Ap 3) s pripadajućom standardnom devijacijom

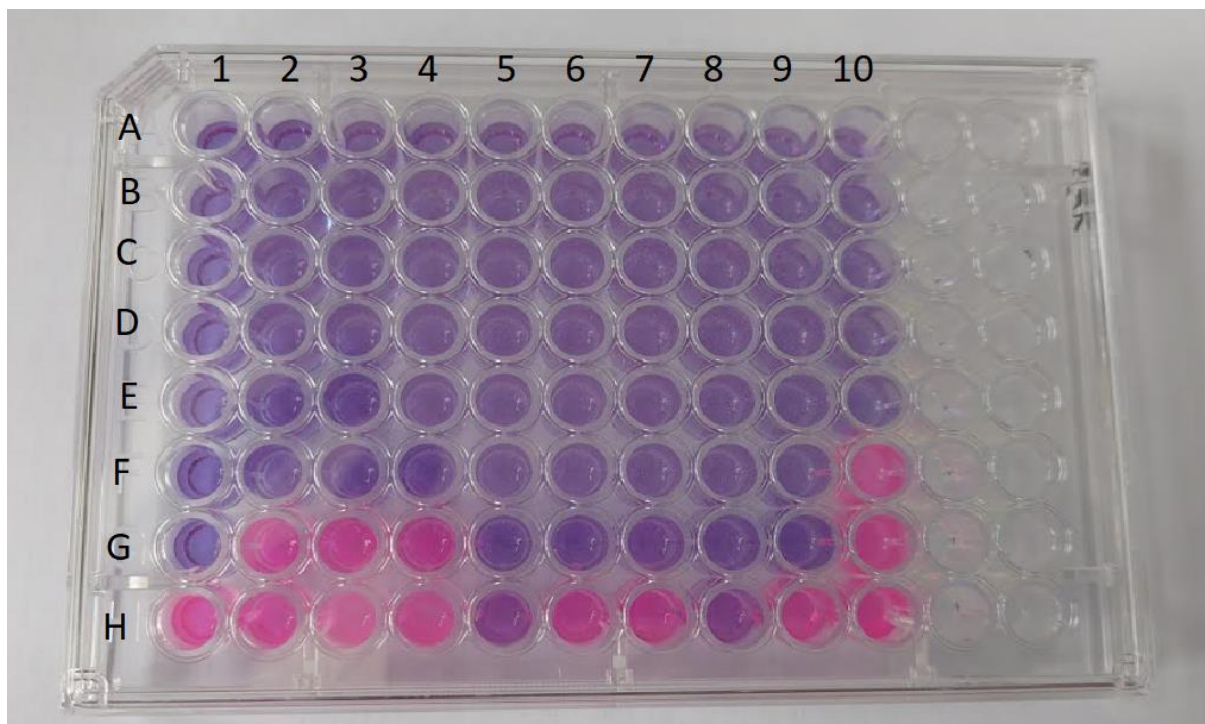
$\bar{x} \pm sd$  (soj) - srednja vrijednost zone inhibicije rasta izračunata na temelju izostanka rasta jednog soja uzrokovanog svim apitoksinima s pripadajućom standardnom devijacijom

<sup>a-b</sup>srednje vrijednosti zone inhibicije rasta unutar istog reda odnosno unutar istog stupca označeni s različitim slovima predstavljaju statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ )

Konačno, sami apitoksini međusobno se ne razlikuju značajno u antimikrobnom djelovanju na razini vrste, niti na razini soja (Tablica 1, ANOVA:  $p=0,915$ ).

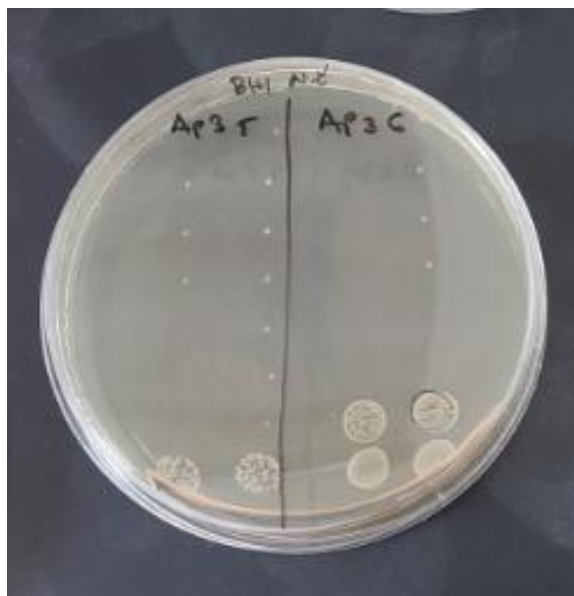
## 4.2. Minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije apitoksina

Za sve ispitivane sojeve na koje su apitoksini djelovali inhibitorno, određene su minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije metodom mikrodilucije uz dodatak resazurina (REMA). Kod vizualnog određivanja, najniža koncentracija kod koje izostaje bakterijski rast smatra se MIK-om. Kod REMA metode konverzija plave boje resazurina u ružičastu je indikacija bakterijskog rasta (Slika 4.2).



Slika 4.2. Određivanje MIK vrijednosti mikrodilucijskom metodom uz dodatak resazurina. Na slici je prikazana mikrotitarska ploča s 96 bunara u kojoj su mjerene MIK vrijednosti apitoksina Ap 3. Koncentracijski gradijent ispitnog apitoksina se smanjuje između svakog reda 2 puta, pa je najviša koncentracija apitoksina u redu A (500  $\mu\text{g/ml}$ ), a najniža u redu G (7,81  $\mu\text{g/ml}$ ). Redu H nije dodan apitoksin, već služi za kontrolu bakterijskog rasta. U svakom stupcu je inokuliran jedan soj (1 - AB-7<sup>KFM</sup>; 2 - AB-8<sup>KFM</sup>; 3 - AB-9<sup>KFM</sup>; 4 - AB-10<sup>KFM</sup>; 5 - SE\_SC\_COL\_40<sup>IRB</sup>; 6 - SE\_SC\_COL\_73<sup>IRB</sup>; 7 - SE\_SC\_COL\_119<sup>IRB</sup>; 8 - 193/0<sup>KFM</sup>; 9 - 560/2<sup>KFM</sup>; 10 - SE\_SC\_COL\_96<sup>IRB</sup> ;). Promjena plave boje u ružičastu indicira bakterijski rast.

Nakon vizualnog očitavanja MIK vrijednosti, MIK i MBK vrijednosti su dodatno provjerene subkultivacijom na krutim BHI podlogama (Slika 4.3) te su izračunate kao omjer umrlih bakterija i inokulirane biomase.

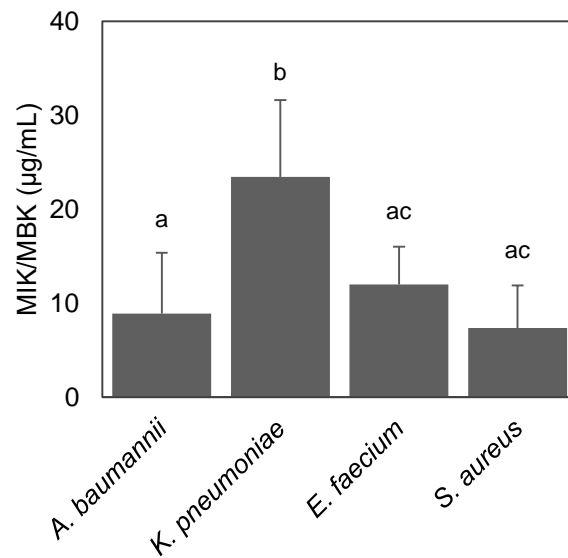


Slika 4.3. Provjera MIK i MBK vrijednosti subkultivacijom na krutim BHI podlogama na primjeru Ap3 i soja SE\_SC\_COL\_40<sup>IRB</sup> te soja SE\_SC\_COL\_73<sup>IRB</sup> vrste *E. faecium*. Subkultivacija na krutim BHI hranjivim podlogama.

Za sve ispitivane sojeve, MIK vrijednosti apitoksina su jednake MBK vrijednostima (Tablica 4.2).

Nadalje, MIK i MBK vrijednosti apitoksina pokazuju isti trend kao i zone inhibicije rasta (Poglavlje 4.1), tj. značajno se razlikuju s obzirom na građu stanične stijenke i vrstu. Značajno niže koncentracije apitoksina (ANOVA, Bonferroni test:  $p = 0,009$ ) inhibiraju odnosno djeluju baktericidno na Gram pozitivne ( $9,66 \mu\text{g/ml} \pm 4,84 \mu\text{g/ml}$ ) u odnosu na Gram negativne bakterije ( $15,38 \mu\text{g/ml} \pm 10,24 \mu\text{g/ml}$ )

Slično zonama inhibicije rasta (Poglavlje 4.1), MIK i MBK vrijednosti ne mogu se u potpunosti povezati sa građom stanične stijenke. Najniže koncentracije apitoksina potrebne za inhibiciju rasta, odnosno baktericidno djelovanje detektirane su kod vrste *S. aureus* ( $7,34 \mu\text{g/ml} \pm 4,55 \mu\text{g/ml}$ ), a najviše kod vrste *K. pneumoniae* ( $23,44 \mu\text{g/ml} \pm 8,16 \mu\text{g/ml}$ ). Slične MIK i MBK vrijednosti detektirane su kod vrsta *A. baumannii* ( $8,89 \mu\text{g/ml} \pm 6,47 \mu\text{g/ml}$ ) i *E. faecium* ( $11,98 \mu\text{g/ml} \pm 4,04 \mu\text{g/ml}$ ). MIK i MBK vrijednosti za vrstu *K. pneumoniae* se značajno razlikuju od koncentracija apitoksina pri kojima se postiže inhibicija rasta odnosno baktericidno djelovanje prema ostalim vrstama (ANOVA, Bonferroni test:  $p < 0,001$ ). MIK i MBK vrijednosti za ostale vrste (*A. baumannii*, *E. faecium* i *S. aureus*) se ne razlikuju značajno (Graf 4.2.)



Graf 4.2. MIK/MBK vrijednosti apitoksina prema ispitanim vrstama. Prikazane su srednje vrijednosti MIK/MBK u µg/ml za *A. baumannii* (n=5), *K. pneumoniae* (n=5), *E. faecium* (n=5) i *S. aureus* (n=5) s pripadajućim standardnim devijacijama. Slovim a-c su označene statistički značajne razlike (jednosmjerna ANOVA, Bonferroni test:  $p < 0,05$ ) između minimalnih koncentracija potrebnih za inhibiciju rasta odnosno baktericidno djelovanje prema ispitanim vrstama.



Slične koncentracije apitoksina inhibiraju i djeluju baktericidno na sojeve iste vrste. Općenito, najviše inhibitorne i baktericidne koncentracije detektirane su kod sojeva vrste *K. pneumoniae*, a najniže kod sojeva vrste *S. aureus*. Također, najotporniji sojevi (SE\_SC\_COL\_68, SE\_SC\_COL\_96 i SE\_SC\_COL\_173; MIK =MBK: 26,04 µg/ml ± 9,02 µg/ml) pripadaju vrsti *K. pneumoniae*, a najosjetljiviji (SA\_9 i SA\_14; MIK/MBK: 5,29 µg/ml ± 4,36 µg/ml) vrsti *S. aureus*, međutim detektirane razlike nisu značajne (Tablica 4.2).

Tablica 4.2. Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije apitoksina (Ap 1 - Ap 3).

Vrsta	Sojevi	MIK/MBK [µg/ml]			$\bar{x} \pm sd$ (soj)
		Ap 1	Ap 2	Ap 3	
<i>A. baumannii</i>	AB_6	7,81	7,81	7,81	7,81 ± 0,00 <sup>a</sup>
	AB_7	7,81	15,63	15,63	13,02 ± 4,51 <sup>a</sup>
	AB_8	0,13	7,81	15,63	7,85 ± 7,75 <sup>a</sup>
	AB_9	0,13	0,13	15,63	5,29 ± 8,95 <sup>a</sup>
	AB_10	15,63	0,13	15,63	10,46 ± 8,95 <sup>a</sup>
	$\bar{x} \pm sd$ (Ap)	6,30 ± 6,48 <sup>a</sup>	6,30 ± 6,48 <sup>a</sup>	14,07 ± 3,50 <sup>a</sup>	
<i>K. pneumoniae</i>	SE_SC_COL_68	15,63	31,25	31,25	26,04 ± 9,02 <sup>a</sup>
	SE_SC_COL_96	31,25	15,63	31,25	26,04 ± 9,02 <sup>a</sup>
	SE_SC_COL_173	15,63	31,25	31,25	26,04 ± 9,02 <sup>a</sup>
	H2_COL_79	15,63	15,63	15,63	15,63 ± 0,00 <sup>a</sup>
	$\bar{x} \pm sd$ (Ap)	19,53 ± 7,81 <sup>a</sup>	23,44 ± 9,02 <sup>a</sup>	27,34 ± 7,81 <sup>a</sup>	
<i>E. faecium</i>	SE_SC_COL_40	7,81	7,81	7,81	7,81 ± 0,00 <sup>a</sup>
	SE_SC_COL_73	7,81	7,81	15,63	10,42 ± 4,51 <sup>a</sup>
	SE_SC_COL_119	15,63	15,63	15,63	15,63 ± 0,00 <sup>a</sup>
	193/0	7,81	15,63	15,63	13,02 ± 4,51 <sup>a</sup>
	560/2	7,81	15,63	15,63	13,02 ± 4,51 <sup>a</sup>
	$\bar{x} \pm sd$ (Ap)	9,37 ± 3,50 <sup>a</sup>	12,50 ± 4,28 <sup>a</sup>	14,07 ± 3,50 <sup>a</sup>	
<i>S. aureus</i>	SA_6	15,63	7,81	7,81	10,42 ± 4,51 <sup>a</sup>
	SA_7	7,81	7,81	7,81	7,81 ± 0,00 <sup>a</sup>
	SA_8	15,63	0,25	7,81	7,90 ± 7,69 <sup>a</sup>
	SA_9	7,81	0,25	7,81	5,29 ± 4,36 <sup>a</sup>
	SA_14	7,81	0,25	7,81	5,29 ± 4,36 <sup>a</sup>
	$\bar{x} \pm sd$ (Ap)	10,94 ± 4,28 <sup>a</sup>	3,27 ± 4,14 <sup>b</sup>	7,81 ± 0,0 <sup>ab</sup>	

Općenito, slične koncentracije apitoksina djeluju inhibitorno i baktericidno na sve ispitane sojeve (Ap 1: MIK/MBK = 11,12 µg/ml ± 7,02 µg/ml; Ap 2: MIK/MBK = 10,74 µg/ml ± 9,40 µg/ml; Ap 3: MIK/MBK = 15,21 µg/ml ± 8,02 µg/ml; ANOVA:  $p=0,186$ ). Iako apitoksini Ap 1 i Ap 2 pokazuju inhibitorno i baktericidno djelovanje pri nižim koncentracijama od Ap 3 za vrste *A. baumannii*, *K. pneumoniae* i *E. faecium*, razlike nisu značajne. S druge, značajno niže koncentracije apitoksina Ap 2 djeluju inhibitorno i baktericidno na *S. aureus* je u odnosu na Ap 1 (ANOVA:  $p=0,014$ ; Bonferroni test:  $p=0,013$ ) (Tablica 4.2).

## 5. Rasprava

Metodom difuzije iz bunara utvrđeno je kako ispitivani apitoksini inhibitorno djeluju na višestruko otporne Gram negativne (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*) i Gram pozitivne (*E. faecium*, *S. aureus*) bakterije. Najotpornija na apitoksine pokazala se Gram negativna vrsta *K. pneumoniae*. Iako građa stanične stjenke utječe na otpornost bakterijskih vrsta (Rohde, 2019), iz čega možemo pretpostaviti kako su Gram negativne bakterije otpornije na djelovanje apitoksina, u ovom istraživanju najveću osjetljivost pokazala je Gram negativna vrsta *A. baumannii*. Unatoč drugačijoj građi stanične stjenke, osjetljivost *A. baumannii* ne razlikuje se značajno od Gram pozitivnih vrsta *E. faecium* i *S. aureus*.

Sojevi iste vrste u pravilu su pokazali sličnu osjetljivost na apitoksine, uz dvije iznimke. Prva je soj AB\_6 vrste *A. baumannii* koji je pokazao značajno veću osjetljivost na djelovanje apitoksina u usporedbi s ostalim sojevima te vrste. Druga iznimka je soj SE\_SC\_COL\_46 vrste *K. pneumoniae* koji je potpuno otporan na sve tri vrste apitoksina te je stoga isključen iz daljnjeg istraživanja. Antimikrobno djelovanje samih apitoksina ne razlikuje se međusobno značajno ni na razini vrsta niti na razini soja. Uzorci Ap1 i Ap2 pokazuju inhibitorno i baktericidno djelovanje pri nešto nižim koncentracijama od uzorka Ap 3.

Metodom mikrodilucije uz dodatak resazurina (REMA) određene su minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije za sve ispitivane sojeve te su dodatno provjerene subkultivacijom na krutim BHI podlogama. Za sve ispitivane sojeve, MIK vrijednosti apitoksina su jednake MBK vrijednostima.

Prema dobivenim rezultatima, utvrđeno je kako značajno manje koncentracije apitoksina djeluju inhibitorno na Gram pozitivne (9,66 µg/ml ± 4,84 µg/ml) u odnosu na Gram negativne bakterije (15,38 µg/ml ± 10,24 µg/ml). U studiji provedenoj 2021.godine (Haktanir i sur.2021). ispitano je antimikrobno djelovanje apitoksina na Gram negativne bakterijske vrste *Escherichia coli* i *Pseudomonas* spp. Kombinirano je više metoda kako bi se razjasnio način djelovanja apitoksina, a u istraživanje je uključena i procjena oštećenja stanica analizom protočne citometrije. Utvrđeno je kako poremećaji stanične stjenke i membrane utječu na lizu stanica, a time i antimikrobno djelovanje apitoksina. Također je utvrđeno kako mehanizmi djelovanja apitoksina na Gram negativne bakterije, ne mogu biti povezani s melitinom, glavnim spojem u sastavu apitoksina. Naime, dokazano je kako lipopolisaharidi, koje Gram negativne bakterije sadrže u vanjskoj membrani, sprečavaju prodor melitina u citoplazmatsku membranu, što nije slučaj kod Gram pozitivnih bakterijskih vrsta (Haktanir i sur.2021).

Nadalje, prema rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, MIK i MBK vrijednosti za vrste *A. baumannii*, *E. faecium* i *S. aureus* ne razlikuju se značajno dok je kod Gram negativne vrste *K. pneumoniae* potrebna znatno najveća koncentracija apitoksina pri kojoj se postiže inhibitorno, odnosno baktericidno djelovanje.

U ovom su radu najniže koncentracije potrebne za inhibiciju rasta utvrđene su kod Gram pozitivne vrste *S. aureus* ( $5,29 \pm 4,36 \mu\text{g/ml}$ ). U studiji provedenoj 2020.godine (Pereira i sur. 2020), metodom mikrodilucije uz dodatak resazurina (REMA), određene su minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije apitoksina medonosne pčele za devet različitih sojeva *S. aureus*. Prosječna MIK vrijednost iznosila je  $7,2 \mu\text{g/mL}$ , dok je prosječna MBK vrijednost bila  $28,7 \mu\text{g/mL}$ . Suprotno tome, u ovom su radu nije bilo razlika između MIK i MBK vrijednosti. U radu Pereira i sur. (2020) također je potvrđeno kako uzorci apitoksina inhibiraju rast svih devet sojeva *S. aureus*. Međutim, utvrđeno je i kako ni jedna od ispitanih koncentracija apitoksina nije utjecala na proizvodnju enterotoksina, kod ni jednog od ispitanih sojeva.

U istraživanju Sonmez i sur. (2022). ispitano je antimikrobno djelovanje apitoksina medonosne pčele na devet Gram pozitivnih i sedam Gram negativnih bakterijskih vrsta, kao i na četiri gljivice. Metodom mikrodilucije određena je minimalna inhibitorna koncentracija apitoksina potrebna za inhibiciju rasta bakterijskih vrsta. U navedenom istraživanju, ispitani apitoksini također su inhibirali rast i Gram pozitivnih, kao i Gram negativnih bakterija (Sonmez i sur. 2022). Rezultati MIC vrijednosti varirali su od  $3,06$  do  $50 \mu\text{g/mL}$  za ispitivane mikroorganizme. Utvrđeno je da su najosjetljivije bakterije *Mycobacterium smegmatis* i *Streptococcus pyogenes* ( $3,06 \mu\text{g/mL}$ ), zatim *Vibrio* spp., *Aeromonas sobria*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) i *Bacillus subtilis* s MIC koncentracijom od  $6,125 \mu\text{g/mL}$  (Sonmez i sur. 2022). *S. aureus* korišten u tom istraživanju također je visoko rezistentan, a MIK vrijednost od  $6,125 \mu\text{g/mL}$  ne razlikuje se značajno od prosječne MIK vrijednosti ( $5,29 \pm 4,36 \mu\text{g/ml}$ ) dobivene u ovom diplomskom radu.

Iz navedenog možemo zaključiti kako apitoksin ima veliki potencijal za primjenu u kontroli rasta višestruko otpornih bakterijskih vrsta Gram negativnih (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*) i Gram pozitivnih (*E. faecium*, *S. aureus*) bakterija te mogu poslužiti kao djelotvorno antimikrobno sredstvo. S obzirom na to kako se o antimikrobnim mehanizmima apitoksina ne zna dovoljno, potrebno je utvrditi detaljne mehanizme djelovanja apitoksina na bakterijske stanice kako bi se pronašao najučinkovitiji način primjene i odredile MIK i MBK vrijednosti, s obzirom na pojedine bakterijske vrste i sojeve.

Također, s obzirom na veliki problem rezistentnosti višestruko otpornih bakterija, važno je tražiti i nova antimikrobna sredstva kojima se može inhibirati njihov rast. Kako bi se spriječile nove mutacije kojima se bakterije prilagođavaju na antibiotike, potrebno ih je racionalno koristiti te pratiti promjene u otpornosti bakterija, i paralelno s njima, razvijati nove antimikrobne tvari kojima bi se ove infekcije kontrolirale.

## 6. Zaključci

Metodom difuzije iz bunara dokazano je kako uzorci apitoksina (Ap1-3; n=3) korišteni u ovom istraživanju djeluju inhibitorno na rast različitih sojeva Gram negativnih (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*) i Gram pozitivnih (*E. faecium*, *S. aureus*) bakterija (n=20).

Kao najotpornija vrsta pokazala se Gram negativna *K. pneumoniae* (8,4 mm ± 4,3 mm), dok je najosjetljivija, također Gram negativna *A. baumannii* (13,2 mm ± 2,0 mm). Osjetljivost *A. baumannii* ne razlikuje se značajno od Gram pozitivnih vrsta *E. faecium* (12,2 mm ± 0,6 mm) i *S. aureus* (11,7 mm ± 0,7 mm).

Metodom mikrodilucije utvrđeno je kako su značajno manje koncentracije apitoksina potrebne za inhibiciju Gram pozitivnih (9,66 µg/ml ± 4,84 µg/ml) od Gram negativnih bakterija (15,38 µg/ml ± 10,24 µg/ml), što potvrđuje hipotezu kako su Gram negativne bakterije otpornije zbog specifične građe stanične stjenke.

Metodom mikrodilucije potvrđeno je kako je bakterijska vrsta *K. pneumoniae*, najotpornija na djelovanje apitoksina od sve četiri ispitane vrste.

*S. aureus* pokazuje najveću osjetljivost, odnosno najmanja koncentracija apitoksina potrebna je kako bi inhibitorno djelovala na sojeve ove vrste, no vrijednosti MIK i MBK ne razlikuju se značajno od vrsta *A. baumannii* i *E. faecium*.

MIK i MBK vrijednosti ne razlikuju se značajno za različite uzorke apitoksina, no Ap3 pokazuje djelovanje pri nešto višim koncentracijama od Ap1 i Ap2.

Uzorci apitoksina sakupljeni s područja Republike Hrvatske imaju veliki potencijal za primjenu u kontroli rasta višestruko otpornih Gram negativnih (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*) i Gram pozitivnih (*E. faecium*, *S. aureus*) bakterija te se mogu koristiti kao efektivno antimikrobno sredstvo.

## 7. Popis literature

1. Abram M., Škrobonja I., Ambrožić D., Repac-Antić D., & Bubonja Šonje M. (2018), *ESKAPE* – bacteria that alert the world. *Medicina Fluminensis*, 54(3), 242–253. doi:10.21860/medflum2018\_203547
2. Amaral L, Martins A, Spengler G. and Molnar J. (2014), Efflux pumps of Gram-negative bacteria: what they do, how they do it, with what and how to deal with them, *Front Pharmacol* 4(1), 168. doi: 10.3389/fphar.2013.00168
3. Bär W., Både-Schumann U., Krebs A., & Cromme L. (2009), Rapid method for detection of minimal bactericidal concentration of antibiotics, *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 85–89. doi:10.1016/j.mimet.2009.01.010
4. Boumassoud M, Dengler Haunreiter V., Schweizer T. A., Meyer L., Chakrakodi B., Schreiber P. W., Seidl K., Kühnert D., Kouyos R. D., Zinkernagel A. S. (2022), Genomic Surveillance of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Reveals Spread of a Linear Plasmid Conferring a Nutrient Utilization Advantage, *ASM Journals*, 13(2), <https://doi.org/10.1128/mbio.03771-21>
5. Cong Y., Yang S., & Rao X. (2020), Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *Journal of Advanced Research*, 21(1), 169–176. doi:10.1016/j.jare.2019.10.005
6. De Oliveira D. M. P., Forde B. M., Kidd T. J., Harris P. N. A., Schembri M. A., Beatson S. A., Walker M. J. (2020), Antimicrobial Resistance in *ESKAPE* Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3). doi:10.1128/cmr.00181-19
7. De Pascale G., & Wright G. D. (2010), Antibiotic Resistance by Enzyme Inactivation; From Mechanisms to Solutions, *ChemBioChem*, 11(10), 1325–1334. doi:10.1002/cbic.201000067
8. De S Santo N. C., de L Scodro R. B., Leal D. C., do Prado S. M., Micheletti D. F., Sampiron E. G., Cardoso R. F. (2020), Determination of minimum bactericidal concentration, in single or combination drugs, against *Mycobacterium tuberculosis*, *Future Microbiology*, 15(2), 107–114. doi:10.2217/fmb-2019-0050
9. Donlan R. M. (2001), Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process, *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), 1387–1392. doi:10.1086/322972
10. El-Seedi H., Abd El-Wahed A., Yosri N., Musharraf S. G., Chen L., Moustafa M., Khalifa S. (2020), Antimicrobial Properties of *Apis mellifera*'s Bee Venom. *Toxins*, 12(7), 451. doi:10.3390/toxins12070451
11. Grace D., & Fetsch A. (2018), A Foodborne Pathogen. *Staphylococcus Aureus* 1, 3–10. doi:10.1016/b978-0-12-809671-0.00001-2
12. Haktanir I., Masoura M., Mantzouridou F. T. (2021), Mechanism of antimicrobial activity of honeybee (*Apis mellifera*) venom on Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* and *Pseudomonas spp.*. *AMB Express* 11, 54. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01214-8>

13. Han S., Kim J., Hong I., Woo S., Kim S., Jang H., & Pak S. (2016), Antibacterial Activity and Antibiotic-Enhancing Effects of Honeybee Venom against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 21(1), 79. doi:10.3390/molecules21010079
14. Kowalska-Krochmal B., & Dudek-Wicher R. (2021), The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance, *Pathogens*, 10(2), 165. doi:10.3390/pathogens10020165
15. Kurek-Górecka A., Komosinska-Vassev K., Rzepecka-Stojko A., & Olczyk P. (2020), Bee Venom in Wound Healing, *Molecules*, 26(1), 148. doi:10.3390/molecules26010148
16. Lamas A., Arteaga V., Regal P., Vázquez B., Miranda J. M., Cepeda A., & Franco C. M. (2020), Antimicrobial Activity of Five Apitoxins from *Apis mellifera* on Two Common Foodborne Pathogens, *Antibiotics*, 9(7), 367. doi:10.3390/antibiotics9070367
17. Larsson D.G.J., Flach CF. (2022), Antibiotic resistance in the environment, *Nature Reviews Microbiology* 20, 257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
18. Leandro L. F., Mendes C. A., Casemiro L. A., Vinholis A. H. C., Cunha W. R., Almeida R. de, & Martins C. H. G. (2015), Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A2 of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens, *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 87(1), 147–155. doi:10.1590/0001-3765201520130511
19. Liu Y. C., Chen Z., & Zhou D. (2014), Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*, *Future Microbiology*, 9(9), 1071–1081. doi:10.2217/fmb.14.48
20. Mahoney D., Porter D., & Albur M. (2018), Successful treatment of multicompartamental cerebral ventriculitis caused by *Acinetobacter baumannii*. *IDCases* 11, 1–2. doi:10.1016/j.idcr.2017.11.005
21. Mahtab Uddin T., Jyoti Chakraborty A., Khusro A., Matin Zidan R., Mitra S., Bin Emran T., Dhama K., Hossain Ripon K., Gajdács M., Khayam Sahibzada M. U., Hossain J, Koirala N. (2021), Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects, *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750-1766., <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>.
22. Masoumi-Asl H., Heravi F. S., Badamchi A., Khanaliha K., Farsimadan M., Naghadalipoor M., Tabatabaei A. (2021), Molecular characterization and antibiotic resistance pattern of isolated *Acinetobacter baumannii* in Iran, *Gene Reports* 24, 101-195. doi:10.1016/j.genrep.2021.101195
23. Navon-Venezia S., Kondratyeva K., & Carattoli A. (2017), *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 252–275. doi:10.1093/femsre/fux013
24. Paczosa M. K., & Mecsas J. (2016), *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629–661. doi:10.1128/mmbr.00078-15 ao,

25. Paul E., Shobowale E., Alzaydani I., Qasem M. & Mahfouz M. (2019), The prevalence of *Acintebacter baumannii* in the tertiary care set up and the rising indifference to the pathogen as a healthcare- associated infection among the healthcare personnel, *Journal of Infection and Public Health*, 12(1), 132. doi:10.1016/j.jiph.2018.10.086
26. Pereira Marques A. F., Albano M., Bérغامo Alves F. C., Murbach Teles Andrade B. F., Furlanetto A., Mores Rall V. L., Fernandes Júnior A. (2020), Influence of apitoxin and melittin from *Apis mellifera* bee on *Staphylococcus aureus* strains, *Microbial Pathogenesis* 141(1), 1-5. doi:10.1016/j.micpath.2020.104011
27. Rice L. B. (2010), Progress and Challenges in Implementing the Research on *ESKAPE* Pathogens. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 31(1), 7–10. doi:10.1086/655995
28. Rodrigues C., Hauser K., Cahill N., Ligowska-Marzeta M., Centorotola G., Cornacchia A., Fierro R. G., Haenni M., Møller Nielsen E., Piveteau P., Barbier E., Morris D., Pomilio F., Brisse S. (2022.), High Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* in European Food Products: a Multicentric Study Comparing Culture and Molecular Detection Methods, *ASM Journals Microbiology* 10(1), <https://doi.org/10.1128/spectrum.02376-21>
29. Rohde M. (2019), The Gram-Positive Bacterial Cell Wall, *Microbiology Spectrum*, 7(3), 1-20. doi:10.1128/microbiolspec.gpp3-0044-2018
30. Santajit S., & Indrawattana N. (2016), Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *ESKAPE* Pathogens. *BioMed Research International*, 1–8. doi:10.1155/2016/2475067
31. Schito G. C. (2006), The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*, *Clinical Microbiology and Infection*, 12(1), 3–8. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01343.x
32. Sharma A., Prakash Yadav S., Sarma D., Mukhopadhaya A., (2022), Chapter Two - Modulation of host cellular responses by gram-negative bacterial porins, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Academic Press 128, 35-77. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.09.004>
33. Sonmez E., Kekecoglu M., Bozdeveci A. , Karaoglu S. A. (2022), Chemical profiling and antimicrobial effect of Anatolian honey bee venom, *Toxicon* 213, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.04.006>
34. Tanuwidjaja I., Svečnjak L., Gugić D., Levanić M., Jurić S., Vinceković, M., Mrkonjić Fuka, M. (2021), Chemical Profiling and Antimicrobial Properties of Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Venom, *Molecules* 26, 3049. <https://doi.org/10.3390/molecules26103049>
35. Taylor T. A. i Unakal C.G. (2022), *Staphylococcus Aureus*, The University of the West Indies; Oakland University, StatPearls Publishing 2022, 1.
36. Trautmannsberger I., Kolberg L., Meyer-Buehn M. (2022), Epidemiological and genetic characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in a University Children's Hospital in Germany: 2019 to 2020.,

Antimicrob Resist Infect Control 11(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s13756-022-01081-3>

37. Wahjoeprajitno B., Wahyu Widodo A. D., Mustikawati B. I., Syitharini N., & Widyaningtyastuti S. (2015), Increasing hand hygiene compliance to reduce the incidence of multidrug resistant *acinetobacter baumannii* in ventilator associated pneumonia in ICU Siloam Hospitals Surabaya, Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 48(2), 107. doi:10.1016/j.jmii.2015.02.379
38. Wehbe R., Frangieh J., Rima M., El Obeid D., Sabatier J.-M., & Fajloun Z. (2019), Bee Venom: Overview of Main Compounds and Bioactivities for Therapeutic Interests. Molecules, 24(16), 2997. doi:10.3390/molecules24162997
39. Zhou X., Willems R.J.L., Friedrich A.W. (2020), *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics, Antimicrobial Resistance & Infection Control 9(1), 130. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00770-1>



## 8. Životopis

Nikolina Čukac rođena je dana 14.06.1997.godine u Zagrebu, Republika Hrvatska. Odrasla je i živi u Zaprešiću, gradu nedaleko od Zagreba.

Školovanje je započela 2004.godine u Osnovnoj školi Ljudevita Gaja u Zaprešiću te 2012. godine upisuje Gimnaziju Tituša Brezovačkog u Zagrebu. 2016.godine završava srednjoškolsko obrazovanje te iste godine upisuje Agronomski fakultet u Zagrebu, smjer Agroekologija. 2020. godine završava preddiplomski studij Agroekologije te iste godine upisuje diplomski studij Agroekologije, smjer Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi.

Od 2017. godine radi u Hrvatskom Telekomu kao vanjski suradnik za komercijalne upite poslovnih korisnika preko studentskog ugovora.

Dobro se služi engleskim jezikom, posjeduje znanja za rad na računalu te je 2021.godine stekla certifikat za tečaj „PSIHOLOGIJA LAGANJA: Detekcija laži i bihevioralno dekodiranje - PL1 nivo“.