

Antimikrobni učinak koloidnih otopina nanočestica elementarnih metala i metalnih oksida na MSSA i MRSA

Pokrovac, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:084225>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ivan Pokrovac

**Antimikrobni učinak koloidnih otopina
nanočestica elementarnih metala i metalnih
oksida na MSSA i MRSA**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina. 2018 .

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakultet pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivana Kosalca i suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ive Rezić sa Sveučilišta u Zagrebu, Tekstilno-tehnološkog fakulteta te neposrednim voditeljstvom asistentice Vanje Ljoljić Bilić, mag.pharm.

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Ivanu Kosalcu, komentorici izv. prof. dr. sc. Ivi Rezić, te asistentici Vanji Ljoljić-Bilić i cijelom osoblju Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta na svim savjetima, pomoći, kritici te korekcijama prilikom izrade ovoga rada te što su mi omogućili izvođenje ovog diplomskog rada.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Nanočestice | 1 |
| 1.1.1 Elementarno srebro..... | 3 |
| 1.1.2. Cinkov oksid..... | 4 |
| 1.1.3. Titanov dioksid..... | 4 |
| 1.2. Vrsta <i>Staphylococcus aureus</i> | 5 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 9 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 10 |
| 3.1. Bakterijske vrste | 10 |
| 3.2. Mikrobiološki i drugi materijal | 10 |
| 3.3. Nanočestice | 10 |
| 3.4. Uzgoj bakterijske vrste..... | 10 |
| 3.5. Priprava inokuluma | 10 |
| 3.6. Određivanje MIK i MBK vrijednosti koloidnih nanočestica | 11 |
| 3.7. Određivanje utjecaja medija na antimikrobnu aktivnost koloidnih nanočestica | 11 |
| 3.8. Ispitivanje postojanja sinergističkog učinka nanočestica | 12 |
| 3.9. Ispitivanje antimikrobnog učinka tkanine impregnirane slojem smjese koloidnih nanočestica u vremenu korištenjem „time-kill“ metode | 14 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 16 |
| 4.1. Minimalne inhibitorne (MIK) i baktericidne (MBK) koncentracije koloidnih nanočestica u fiziološkoj otopini..... | 16 |
| 4.2. Određivanje utjecaja medija na antimikrobnu aktivnost koloidnih nanočestica | 19 |
| 4.3. Ispitivanje postojanja sinergističkog učinka nanočestica | 20 |
| 4.4. Ispitivanje antimikrobnog učinka tkanine impregnirane slojem smjese koloidnih nanočestica u vremenu korištenjem „time-kill“ metode | 24 |
| 5. ZAKLJUČCI | 27 |
| 6. LITERATURA | 29 |
| 7. SAŽETAK/SUMMARY | 36 |

1. UVOD

1.1. Nanočestice

Nanoznanost se definira kao proučavanje čestica u rasponu od 1 do 100 nanometara, te predstavlja vrlo obećavajuće polje znanosti, posebice biotehnologije. Korištenje metalnih čestica manjih od 100 nanometara za dekorativne učinke crkvenih vitraja i ukrasnog lončarstva datiraju nanotehnologiju već od Srednjeg vijeka (Barber i Freestone, 2018). Materijali pripremljeni u obliku vrlo malih čestica mijenjaju svoja fizikalna i kemijska svojstva, ponekad do te granice da ispoljavaju sasvim nove učinke (Shah i Tokeer, 2010). Jedan primjer drastične promjene fizikalnih svojstva nanomaterijala je crvena boja nanočestica zlata, velika razlika od standardne žute boje zlata u gomili što je već 1857. godine proučavao Michael Faraday (Faraday, 1857). Međutim, tek je nedavni razvoj širokog spektra oruđa za proučavanje sustava na atomskoj razini doveo do povećanog zanimanja za nanotehnologiju. Jedan primjer od iznimne važnosti za polje nanotehnologije je skenirajući tunnelski mikroskop (STM), vrlo moćna tehnologija za snimanje površine i karakterizaciju materijala s mogućom rezolucijom od desetinke nanometara (Feenstra, 1994). Posebno je zanimljiva primjena nanotehnologije u području biomedicine.

Uklještenje kemoterapeutika u kompleks sa nanočesticama, te povezivanje nanočestica sa molekularnim ligandima koji bi ciljali kancerogene stanice nudi mogućnost oblika kemoterapije povećane učinkovitosti i smanjenih nuspojava (Brigger i sur., 2002).

Alternativna strategija uporabe nanočestica u terapiji novotvorina je tzv. foto-termalna ablacija tumora (Hirsch i sur., 2003). Nanočestice absorbiraju lasersko svjetlo karakteristične valne duljine te rezultirajuće zagrijavanje može biti korišteno za uništavanje čvrstih tumora s ciljem naštimavanja čestice na frekvenciju pri kojoj je tkivna apsorpcija laserskog svjetla niska, odnosno neštetna.

Ljekovite formulacije u obliku nanosuspenzija mogu biti korištenje u poboljšavanju topljivosti teško topljivih lijekova. Velik broj potencijalnih kandidata za nove lijekove biva izbačeno iz ispitivanja zbog loše topljivosti u vodi (te stoga loše bioraspoloživosti) te kristalne nanosuspenzije predstavljaju način spašavanja tih lijekova kandidata (Recharla i sur., 2017), a poznato je da je smanjivanje veličine čestica učinkovit i pouzdan način poboljšavanja biokompatibilnosti (Mirkin i Taton, 2000; Kim i sur., 2001). Osim relativno jednostavnijih formulacija, nanotehnologija otvara mogućnosti i tzv. „pametne dostave lijekova“ te jedan takav primjer predstavlja oblaganje membrane čestica mikroskopskog polimera (tzv. „dostavno-vozilo“), napunjenog željenim lijekom, nanočesticama zlata (Radt i sur., 2004). Obasjavajući „dostavno-vozilo“ laserom, membrane se mogu otvoriti i sadržaj (primjerice

enzimi ili određeni lijek) se može dostaviti na željeno mjesto. Dok je uobičajeni pristup za otpuštanje lijeka diktiran promjenama u lokalnom mikrookolišu, navedena tehnologija omogućava vanjsku kontrolu otpuštanja lijeka primjenom pulsa lasera u trajanju od nanosekunde s minimalnim rizikom apsorpcije laserske energije.

Također postoje pouzdana izvješća u literaturi o obećavajućim antimikrobnim rezultatima o aktivnosti različitih lijekova i antimikrobnih formulacija u obliku nanočestica (Fresta i sur., 1995; Forestier i sur., 1992). Pokazano je da i nanočestice metalnih oksida i elementarnih metala ispoljavaju povoljan biocidni učinak protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (Stoimenov i sur., 2002). Uzevši u obzir rastuću rezistenciju bakterija na dosad korištene antibiotike, nanočestice metalnih oksida i elementarnih metala predstavljaju obećavajući smjer razvoja novih pristupa antimikrobne terapije. Glavne grupe antibiotika trenutno u uporabi generalno ciljaju tri bakterijske mete : sintezu stanične membrane, translacijsku mašineriju, te DNA replikaciju (Magiorakos i sur., 2012). Nažalost, bakterijska rezistencija se može razviti na svaki od tih načina antimikrobnih učinaka. Međutim, glavni način učinka nanočestica je izravni kontakt s membranom bakterije, bez potrebe za penetracijom membrane te stijenke, te to pobuđuje nadu da će nanočestice biti manje sklone izazivanju rezistencije nego dosad korišteni antibiotici.

Zbog složenosti interakcija nanočestica i različitih sustava, literatura je često nedosljedna i kontradiktorna, međutim djelovanje nanočestica se ugrubo može podijeliti na dva glavna ubojita načina, koji su međusobno povezani te se nerijetko odvijaju istovremeno : (1) narušavanje membranskog potencijala i integriteta te (2) proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta (engl. ROS), gdje se nanočestice ponašaju kao nanokatalizatori (Blecher i sur., 2011; Huh i Kwon, 2011). Oštećenje mikrobne membrane događa se kada se nanočestice elektrostatski vežu na površinu bakterije, što dovodi do promjena u membranskom potencijalu stijenke i membrane te gubitka integriteta. Reaktivne kisikove vrste (engl. ROS), smatrane najučinkovitijom odrednicom citotoksičnosti nanočestica u *in vivo* i *in vitro* uvjetima, odvija se na površini nanočestica te dovodi do oksidacijskog stresa koji narušava integritet mikrobne membrana putem lipidne peroksidacije, nadalje narušava funkciju proteina i enzima, te oštećuju DNA i RNA. U nekim je slučajevima ROS induciran vidljivim ili UV svjetlom te je toksičnost nanočestica fotokatalitična, kao što je primjer nanočestica TiO₂ koje pod UV svjetlom dovode do lipidne peroksidacije, respiratorne disfunkcije, te smrti stanica meticilin-rezistentne vrste *Staphylococcus aureus* (Shah i sur., 2008). Ostali mehanizmi toksičnog djelovanja nanočestica na bakterijsku stanicu uključuju direktnu inhibiciju specifičnih esencijalnih enzima, indukciju dušikovih reaktivnih vrsta (engl. NRS) (Pelgrift i

Friedman, 2013), te indukciju programirane stanične smrti, odnosno apoptoze (Abramovitz i sur., 2015).

1.1.1 Elementarno srebro

Antimikrobni učinci srebra poznati su još od antičkih vremena. Slično sa drugim neantibiotskim tretmanima, uporaba srebra u smislu antimikrobnog tretmana je napuštena sa otkrićem penicilina i drugih antibiotika. Ali porastom mikrobnih sojeva rezistentnih na antibiotike, ponovno se razvio interes za srebro (Chopra, 2007). U medicini, spojevi srebra nerijetko se koriste u prevenciji ili liječenju opekline, rana, i niza infektivnih bolesti (Elliott, 2010). Također se čini da su bakterije manje sklone razvitku rezistencije naspram srebra nego naspram konvencionalnih antibiotika (Svitlana i Matthias, 2012).

Međutim, srebrovi ioni imaju nedostatak u smislu formiranja kompleksa koji ispoljavaju manju antimikrobnu učinkovitost te stoga srebrovi ioni imaju ograničeni rok djelovanja. Ovaj nedostatak se nadoknadio uporabom nanočestica srebra koje su inertne, ali zadržavaju antimikrobni učinak.

Prema literaturnim podacima, nanočestice srebra su najpopularnije anorganske nanočestice korištene kao antimikrobni agensi (Zinjarde, 2012). Kateteri obloženi nanokristaliničnim srebrom su aktivni protiv većine bolničkih (nozokomijalnih) infekcija vezanih uz uporabu katetera, te se pretežito akumuliraju na mjestu insercije. Stoga, srebrove nanočestice nalaze uporabu kao protektivni agens protiv infekcije s minimalnim rizikom sistemske toksičnosti (Roe i sur., 2008).

Antimikrobni učinak nanočestica srebra, kao i nanočestica drugih metala i metalnih oksida ovisan je o veličini čestica (Poulose i sur., 2014). Iako nije jasno zašto, nanočestice srebra manjeg promjera imaju bolji antimikrobni učinak nego one većeg promjera (Panáček i sur., 2006).

Antimikrobni mehanizam nanočestica srebra je nespecifičan, ali i raznolik. Na primjeru vrste *Escherichia coli*, kao predstavniku gram-negativnih bakterija, utvrđeno je da nanočestice srebra uzrokuju napukline u staničnoj stijenci pojačavajući permeabilnost membrane i time inaktiviraju respiratorni lanac (Sondi i Salopek-Sondi, 2004; Abramovitz i sur., 2015). Druga istraživanja pokazuju da nanočestice srebra i srebrovi ioni, koji posjeduju afinitet za sumpor i dušik, mogu inhibirati i narušiti strukturu i funkciju proteina vezujući se za tiolnu i amino skupinu, a postoje dokazi da su nanočestice srebra fotokatalitične te mogu stvarati ROS (Choi i sur., 2008). I konačno, nanočestice srebra pokazale su sinergistički antimikrobni učinak nad

gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama kada su primjenjene u kombinaciji s antibioticima (Shahverdi i sur., 2007).

1.1.2. Cinkov oksid

Sigurnost primjene cinkovog oksida (ZnO) i njegova kompatibilnost s ljudskom kožom čine ga prikladnim aditivom za tekstile i površine koje dolaze u kontakt s ljudskim tijelom (Liu i sur., 2014). Nanočestice ZnO pokazuju baktericidni učinak na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije te njihove spore koje su inače otporne na visoke temperature i tlak (Liu i sur., 2014). Dokazano je da nanočestice ZnO inhibiraju rast meticilin-osjetljive i meticilin-rezistentne vrste *S. aureus* (MSSA i MRSA), te meticilin-rezistentne vrste *S. epidermidis* (MRSE) te da mehanizmi rezistencije MRSA i MRSE ne djeluju na njih (Ansari i sur., 2012). Povećanja antimikrobna učinkovitost nanočestica ZnO u usporedbi s mikročesticama dovedena je u svezu s povećanjem njihove površine te, slično s ostalim nanočesticama, baktericidna efikasnost ZnO nanočestica povećava se smanjivanjem njihova promjera (Xie i sur., 2011).

Nanočestice ZnO smanjuju bakterijsku vijabilnost, međutim točni mehanizmi antibakterijske aktivnosti još uvijek nisu shvaćeni. Prihvaćeno je da akumulacija čestica na površini bakterija zbog elektrostatskih sila, te posljedična tvorba ROS na površini bakterije predstavlja glavni mehanizam baktericidnog učinka (Zhang i sur., 2008), a nanočestice ZnO pokazuju i visoka fotokatalitična svojstva koja poboljšavaju njihovu antimikrobnu učinkovitost (Rasmussen i sur., 2010). Uz navedena potentna antimikrobna svojstva, njihova bijela boja, blokiranje UV-svjetla, i sposobnost prevencije stvaranja biofilma čini ih prikladnima za tekstilnu (Dastjerdi i Montazer, 2010) i staklenu (Ashajyothi i sur., 2016) industriju u svrhu oblagajućeg materijala za medicinske i ostale uređaje.

1.1.3. Titanov dioksid

Titanov dioksid (TiO₂) je dugo poznat po svojoj sposobnosti sprečavanja gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (Wei i sur., 1994), te nedavna istraživanja pokazuju da je učinkovit i protiv raznih virusa i parazita (Brady-Estevez i sur., 2008). Antimikrobni učinak TiO₂ je povezan sa njegovom veličinom, oblikom, te kristalnom strukturom (Paik i sur., 2015), te je tako dokazano da su anatase TiO₂ nanočestice antimikrobno potentnije od rutilnog oblika (Planchon i sur., 2013). Jedno istraživanje pokazalo je da TiO₂ nanočestice povećavaju antimikrobni učinak raznih antibiotika kao što su amikacin i oksacilin, te da smanjuju

otpornost MRSA naspram istih (Roy i sur., 2010) dok drugo istraživanje pokazuje da TiO₂ nanočestice imaju sinergistički učinak sa nanočesticama srebra (Pratap Reddy i sur., 2007). Pretpostavljeno je da je posebno važan mehanizam TiO₂ nanočestica njihova sposobnost uzrokovanja oksidativnog stresa pomoću tvorbe ROS. Navedeni ROS tada uzrokuje mjesno-specifično DNA oštećenje (Roy i sur., 2010), lipidnu peroksidaciju koja uzrokuje promjenu permeabilnosti membrane i narušava integritet stanice. Tvorba ROS potpomognuta je fotokatalitičkim svojstvom TiO₂ nanočestica. Međutim, uporaba TiO₂ nanočestica pod UV svjetlom ograničena je zbog genetske štete u ljudskim stanicama i tkivima (Allahverdiyev i sur., 2011). Jedan način zaobilaznja ovog problema je dodatak metalnih iona koji pomiču apsorpcijski raspon TiO₂ nanočestica u vidljivo svjetlo (Allahverdiyev i sur., 2011). Drugi način nadilaženja problema toksičnosti je konjugacija sa netoksičnim polimerima, te jedno istraživanje pokazuje da takvi konjugati nisu opasni za kulturu fibroblasta (Allahverdiyev i sur., 2011).

1.2. Vrsta *Staphylococcus aureus*

Vrsta *Staphylococcus aureus* pripadnik je porodice Staphylococcaceae, gram-pozitivnih bakterija sferičnog oblika grupirane u grozdastom obliku te je medicinski značajna vrsta. Vrsta *S. aureus* je, kao i svi ostali stafilokoki, katalaza pozitivan, što znači da može katalizirati razgradnju vodikova peroksida u kisik i vodu. Test na katalazu je razlučni test za stafilokoke te se izvodi dodavajući 3% vodikov peroksid a pozitivnu reakciju predstavlja tvorbu mjehurića kisika. Iako nisu svi sojevi vrste *S. aureus* pozitivni na koagulazu, protein koji potiče zgrušavanje krvne plazme, ona se smatra markerom *S. aureusa* među kliničkim mikrobiolozima. Na krutoj podlozi raste u obliku zlatno-žutih kolonija, dok na krvnom agaru dovodi do β-hemolize. *S. aureus* je halofil, što znači da raste čak i u NaCl-bogatom mediju, i fermentira manitol. Navedeno svojstvo se može iskoristiti za identifikaciju na manitol-slanom agaru. Proizvodi termostabilnu deoksiribonukleazu, što je još jedan brzi test prisutnosti vrste *S. aureus*.

Vrsta *S. aureus* je normalni komenzal dušnih sluznica, međutim nerijetko se može pronaći u drugim anatomskim mjestima ljudskog tijela, uključujući kožu, usnu šupljinu, te gastrointestinalni sustav (Coates i sur., 2013). Usprkos tome, vrsta *S. aureus* je potentan oportunistički patogen s brojnim čimbenicima toksičnosti i virulencije (Tong i sur., 2015). Da infekcija uopće započne, patogen prvo mora dobiti pristup domaćinu te se pričvrstiti na tkivo ili stanice domaćina. Tako *S. aureus* na svojoj površini ispoljava proteine koji promoviraju prianjanje na proteine domaćina, kao što su lamin i fibronektin, koji sačinjavaju

vanstanični matriks. Sposobnost adherencije predstavlja veliki rizik pri uporabi medicinskih naprava kao što su kateteri ili prostetski zglobovi. Pokazano je da je glavni ligand koji promovira adherenciju između vrste *S. aureus* i krvi fibrinogen, dok je s materijalom koji je u tijelu duži period (kao što su kateteri) glavni ligand fibronektin (Patti i sur., 1994).

U organizmu, vrsta *S. aureus*, ispoljava nekoliko mehanizama kojima izbjegava imuni sustav. Jedan takav mehanizam je ekspresija površinskog proteina A. Protein A vezuje Fc regiju imunoglobulina G, što remeti opsonizaciju i fagocitozu. Mutanti koji nemaju protein A učinkovitije su fagocitirani u in vitro modelima. Dodatni protein koji remeti funkciju imunog sustava jest leukocidin, koji u kombinaciji s γ toksinom oštećuje membrane polimorfonuklearnih leukocita (Cribier i sur., 1992).

Vrsta *S. aureus* oštećuje domaćina preko nekoliko proteinskih toksina. Toksini koji oštećuju membranu mogu se podijeliti na α , β , i δ toksin, dok γ -toksin svoje djelovanje ispoljava u kombinaciji s prethodno navedenim leukocidinom. Najbolje opisan je α toksin, koji je ujedno i najjače oštećuje membranu stanica domaćina (Berube i Wardenburg, 2013). Osim njih, vrsta *S. aureus* ispoljava i nekoliko superantigena, bioloških spojeva koji uzrokuju nespecifičnu aktivaciju T-limfocita te masivan imuni odgovor. Superantigeni vrste *S. aureus* su enterotoksini, te toksin sindroma toksičnog šoka (TSST). Enterotoksini vrste *S. aureus* dijele se u šest tipova, prikazani slovima A do F. Uzrokuju simptome akutnog trovanja (povraćanje i mučnina), a povezuju se sa reumatoidnim artritismom i atopičkim ekcemima. Toksin sindroma toksičnog šoka (TSST-1) nema emetičku aktivnost enterotoksina, ali je odgovoran za 75% svih slučajeva sindroma toksičnog šoka (Musser i sur., 1990). Još jedan važan toksin *S. aureus* je eksfoliativni toksin, podijeljen u dvije antigenski različita oblika: ETA i ETB. On uzrokuje odvajanje epidermisa i dovodi do sindroma opečene kože (eng. *scalded skin syndrome*).

Vrsta *S. aureus* može izazvati brojne vrste infekcija (Tong i sur., 2015) kao što su :

- Kožne infekcije, ujedno i najčešća su vrsta infekcije vrstom *S. aureus* (McCaig i sur., 2006).
- Trovanje hranom. Glavna odrednica su prethodno opisani enterotoksini (Wieneke i sur., 1993).
- Infekcije kosti i zglobova. Manifestiraju se u tri glavna oblika : osteomijelitis, septički artritis, i infekcija zbog operacije zamjene zgloba (Sheehy i sur., 2010).
- Bakterijemije, odnosno infekcije krvi. Netretirana bakterijemija vrste *S. aureus* ima stopu smrtnosti od 80% (Khatib i sur., 2009).
- Infektivni endokarditis. Vrsta *S. aureus* je trenutno najčešći uzrok infektivnog endokarditisa u industrijaliziranom svijetu (Fowler i sur., 2005).
- Pleuropulmonalne infekcije kao što je pneumonija.

Veliki problem s epidemiologijom vrste i klonova vrste *S. aureus* je pojava rezistencije na antibiotike. Prvi val rezistencije predstavlja rezistenciju na peniciline, te je počeo sredinom 1940.-ih. Penicilini su podvrsta β -laktama, antibiotika koji se vežu na transpeptidazu, enzim koji katalizira poprečno povezivanje peptidoglikana koji formiraju staničnu stijenku, što daje stijenci čvrstoću i rigidnost. Penicilin-rezistentni sojevi produciraju plazmidno-kodiranu penicilinazu, enzim koji hidrolizira β -laktamski prsten nužan za antimikrobnu učinkovitost (Kirby, 1944). Modifikacijom strukture penicilina, tako da je manje osjetljiv na enzim β -laktamazu, riješio se problem rezistencije na peniciline. Glavni predstavnik tako modificiranih penicilina je meticilin. Međutim, gotovo trenutno nakon uvođenja β -laktamaza rezistentnih penicilina, pojavila se rezistencija na njih. Ti su sojevi prozvani meticilin-rezistentni *S. aureus*, skraćeno MRSA (Barber, 1961). MRSA sojevi, od njihovog otkrića početkom 1961. godine do danas, predstavljaju značajan javnozdravstveni problem te se vrsta *S. aureus* može podijeliti u u sojeve rezistentne (MRSA) i osjetljive (MSSA) na meticilin. Za razliku od penicilinazom-posredovane rezistencije koja je uskog spektra, meticilin rezistencija predstavlja rezistenciju na sve β -laktamske antibiotike (penicilini, cefalosporini, karbapenemi i monobaktami) te nema inaktivacije, odnosno razgradnje β -laktama. Razlog tome je što je rezistencija na meticilin posredovana varijantom penicilin vezujućeg proteina 2a (PBP2a) koja se razlikuje od ostalih varijanti penicilin vezujućih proteina po nižem afinitetu za vezivanje β -laktamskih antibiotika. Tada PBP2a neometano dovršiti katalizu prethodno opisane reakciju transpeptidacije usprkos prisutnosti β -laktama (Lowy, 2003). Rezistencija na β -laktame ostavlja mogućnost uporabe glikopeptidnih antibiotika, kao što su vankomicin i

teikoplanin. Međutim, sve veća incidencija MRSA infekcija u bolnicama dovela je do veće uporabe vankomicina, te se razvila i rezistencija na vankomicin, a rezistentni sojevi prozvani su vankomicin-rezistentni *S. aureus* (VRSA). Prvi takav slučaj opisan je u Japanu 1996. godine (Hiramatsu i sur., 1997), ali su potvrđene infekcije VRSA-om u bolnicama u Engleskoj, Francuskoj i SAD-u.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nanotehnologija i nanoznanost s pravom postaju sve propulzivnija područja znanstvenih istraživanja, te polako pronalaze primjenu u svim sferama ljudske aktivnosti, naročito u biomedicini. Naime, mijenjanjem veličine aktivne (djelatne) mijenjaju se njena fizikalno-kemijska svojstva, te to otvara mogućnost pronalaska njihovih novih bioloških učinaka. Jedna od takvih novih aktivnih tvari su nanočestice, naročito nanočestice metala i metalnih oksida. Svrha ovog rada je ispitati antimikrobni učinak koloidnih otopina nanočestica metala i metalnih oksida u uvjetima *in vitro*. Ispitivanje antimikrobnog učinka u ovom radu može se podijeliti na nekoliko postupaka i posljedičnih ciljeva :

1. Utvrđivanje najmanjih inhibitornih (MIK) te baktericidnih (MBK) koncentracija pomoću modificirane metode serijalne mikrodilucije na mikrobnj vrsti *Staphylococcus aureus*, sojeva MSSA i MRSA
2. Ispitivanje postojanje sinergizma između različitih vrsta koloida nanočestica preko utvrđivanja frakcionarnih baktericidnih (FBK) i inhibitornih (FIK) indeksa na sojevima MSSA i MRSA za tri različite računalno optimizirane smjese triju vrsta nanočestica.
3. Ispitivanje antimikrobnog učinka u vremenu primjenjenog sloja računalno optimizirane smjese nanočestica na tekstilu koristeći tzv. *time-kill* metodu.
4. Ispitivanje utjecaja pojedinih medija (goveđeg seruma i albumina pri dvije različite koncentracije) na *in vitro* antimikrobnu učinkovitost navedenih koloidnih otopina nanočestica na soju *S. aureus* temeljem utvrđivanja MIK i MBK vrijednosti koloida elementarnog srebra (promjera 10 nm) u različitim medijima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Bakterijske vrste

Ispitivane bakterijska vrsta je *Staphylococcus aureus*, sojevi ATCC (American Type Culture Collection, SAD) 29213 (u daljnjem tekstu MSSA) i meticilin-rezistentni soj MFBBF 10679 (u daljnjem tekstu MRSA) uzeti su iz Zbirke mikrobnih kultura Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Mikrobiološki i drugi materijal

Od mikrobioloških hranjivih podloga, u radu je korišten triptikaza-sojin agar (TSA).

Fiziološka otopina pH 7.0 (0.9 % m/m NaCl) priređena je „in house“, te fetalni goveđi serum (eng. fetal bovine serum – FBS, Santa Cruz Biotechnology Inc., SAD). Sav mikrobiološki materijal bio je sterilan (steriliziran autoklaviranjem – 15 min pri 121 C, 1.2 bar).

Otopine albumina određenih koncentracija pripravljene su otapanjem liofiliziranog albumina (Santa Cruz Biotechnology Inc., SAD) u fiziološkoj otopini te filtriranjem kroz membranski filter (Sarstedt, 0.22 µm) kako bi se osigurala sterilnost otopine albumina.

Otopine mucina pripravljene su otapanjem mucina tipa dva (M2378, Sigma Aldrich, Njemačka) u sterilnoj fiziološkoj otopini. Fizikalna svojstva otopine mucina onemogućuju filtraciju kroz adekvatan sterilni filter, te se sterilnost otopina mucina provjeravala *post hoc* nasadnjom na mikrobiološki hranjivi agar.

3.3. Nanočestice

Nanočestice korištene u radu su koloidne otopine nanočestica elementarnog srebra promjera 10 i 40 nanometara, elementarne platine promjera 3 nanometara, titanova dioksida promjera 150 nanometara, cinkova oksida promjera 100 nanometara, itrijeva (III) oksida promjera 100 nanometara te cirkonijeva dioksida promjera 100 nanometara, proizvođača Sigma Aldrich, SAD. Navedene koloidne otopine nanočestica čuvale su se na +4°C do izvođenja pokusa.

3.4. Uzgoj bakterijske vrste

Sojevi MSSA i MRSA vrste *S. aureus* nasadeni su na TSA te inkubirani 18 – 24 sata na 37°C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Japan).

3.5. Priprava inokuluma

Inokulumi sojeva pripremljeni su suspendiranjem navedenih sojeva u fiziološkoj otopini tako da optička gustoća konačne suspenzije bude nefelometrijski pri 565 nm (DEN-1, Kisker

Biotech GmbH i Co. KG, Njemačka) kao 0,5 McFarlandovih jedinica što odgovara $1,5 \times 10^8$ CFU/mL te je navedena suspenzija razrijeđna fiziološkom otopinom u omjeru 1 naprema 9 volumnih jedinica.

3.6. Određivanje MIK i MBK vrijednosti koloidnih nanočestica

Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije na vrsti *S.aureus*, sojeve MSSA i MRSA, određivale su se pomoću modificirane metode dvostruke serijalne mikrodilucije prema EUCAST smjernicama (www.eucast.org). Metoda je „modificirana“ jer se umjesto standardnog Mueller-Hinton bujona koristila fiziološka otopina. Razrijeđenja ispitivanih koloida nanočestica vršila su se pomoću navedene fiziološke otopine u mikrotitarskim pločicama od polistirena ravnog dna s 96 mjesta (DeltaLab, Španjolska) tako da je konačni volumen svake jažice bio 100 μ L, a koncentracija ispitivane nanočestice u određenoj jažici bila upola manja od koncentracije ispitivane nanočestice u prethodnoj jažici. U svaku jažicu uneseno je 100 μ L inokuluma opisanog u poglavlju 3.5., dok je kao pozitivna kontrola služila smjesa 100 μ L fiziološke otopine i 100 μ L navedenog inokuluma. Mikrotitarske pločice inkubirane su 18 – 24 sata na 37°C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Japan). Nakon inkubacije, 10 μ L pojedinog razrijeđenja nanosilo se na sektore krute hranjive podloge TS agara pomoću sterilne eze te inkubiralo pri navedenim uvjetima. MBK je određena kao najmanja koncentracija pri kojem nije bilo porasta bakterija na krutoj hranjivoj podlozi, dok je MIK određen kao najmanja koncentracija pri kojem je gustoća bakterija na krutoj hranjivoj podlozi upola smanjena s obzirom na kontrolu.

3.7. Određivanje utjecaja medija na antimikrobnu aktivnost koloidnih nanočestica

Utjecaj medija na antimikrobnu aktivnost koloidne otopine nanočestica određivao se utvrđivanjem MIK i MBK vrijednosti koloidne otopine nanočestica elementarnog srebra promjera 10 nm metodom modificirane serijalne mikrodilucije kao što je navedeno u poglavlju 3.6 na bakterijskom modelu *S. aureus*, soj MSSA. Razrijeđenja koloida nanočestica pripravljena su u fiziološkoj otopini tako da je konačni volumen svake jažice bio 50 μ L, te automatskom pipetom dodalo 50 μ L medija i 100 μ L inokuluma soja MSSA vrste *S.aureus* opisanog u poglavlju 3.5. Mikrotitarske pločice inkubirane 18 – 24 sata na 37°C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Japan) te se iz pojedinog razrijeđenja sterilnom mikrobiološkom ezom uzimalo 10 μ L koje je nanoseno na krutu hranjivu podlogu (TS agar) te inkubiralo pri navedenim uvjetima. MIK i MBK vrijednosti određivane su na isti način kao i u 3.6.

Kao mediji su korištene prethodno navedeni fetalni goveđi serum (FBS) koncentracija 25.0% i 2.5%, 4.0% i 0.4% otopine albumina i 1.0% i 0.1% otopine mucina u fiziološkoj.

Koncentracija seruma od 25% maksimalna je koncentracija koju je moguće koristiti u navedenoj metodi. Koncentracija albumina u krvi je između 3.5% i 5.0% te je zbog toga odabrana navedena koncentracija od 4.0%. Koncentracija mucina u mukoznom sloju želuca je između 1% i 5%, te je zbog netopljivosti mucina u fiziološkoj otopini odabrana koncentracija od 1%.

Kao „kontrola“ utjecaja medija na antimikrobnu učinkovitost koloidnog Ag korištena je sterilna fiziološka otopina te su se dobivene MIK i MBK vrijednosti koloidnog Ag u različitim medijima uspoređivale sa MIK i MBK vrijednosti koloidnog Ag u sterilnoj fiziološkoj otopini. U svrhu detaljnijeg utvrđivanja utjecaja medija, pripravljene su deserostruko manje koncentracije navedenih medija te su se uspoređivale MBK i MIK vrijednosti koloidnog Ag u obe koncentracije

3.8. Ispitivanje postojanja sinergističkog učinka nanočestica

Za ispitivanje postojanja sinergističkog učinka pripravile su se tri smjese triju različitih koloida nanočestica (elementarno srebro promjera 10 nm, titanov dioksid promjera 150 nm, cinkov dioksid promjera 100 nm). Predviđanje optimalnih koncentracija nanočestica u smjesi provodilo se u računalnom programu Design Expert® (State-Ease, Inc., v. 9.1).

Smjesa 1 sadržavala je 2,8 ppm-a koloidnog srebra (10 nm), 220 ppm-a titanova dioksida, i 210 ppm-a cinkova oksida. Smjesa 2 sadržavala je 3,4 ppm-a koloidnog srebra (10 nm), 330 ppm-a titanova dioksida, i 70 ppm-a cinkova oksida. Smjesa 3 sadržavala je 3,9 ppm-a elementarnog srebra, 330 ppm-a titanova dioksida, i 70 ppm-a cinkova oksida. Sadržaji pojedine smjese prikazani su u tablici 1.

**Tablica 1. Sastav smjesa optimiziranih putem računalnog programa Design Expert®
(State-Ease, Inc., v. 9.1)**

| | Ag (10 nm) /ppm | TiO₂ (150 nm) /ppm | ZnO (100 nm) /ppm | Ukupno /ppm |
|-----------------|----------------------------|--|------------------------------|--------------------|
| Smjesa 1 | 2.8 | 220 | 210 | 432.8 |
| Smjesa 2 | 3.4 | 330 | 70 | 403.4 |
| Smjesa 3 | 3.9 | 330 | 70 | 403.9 |

MIK i MBK vrijednosti smjesa na bakterijskom modelu vrste *S.aureus*, sojevima ATCC 29213 (MSSA) i MFBF 10679 (MRSA) određivale su se postupkom dvostruke serijalne mikrodilucije opisane u poglavlju 3.6.

U svrhu utvrđivanja sinergističkog učinka računat je indeks frakcionarne inhibitorne koncentracije (FIK_{indeks}) za pojedinu smjesu. FIK_{indeks} računat je po formuli :

$$FIK_{\text{indeks}}(\text{smjesa}) = \sum_{i=1}^n \frac{MIK_{\text{kombinacija}}(i)}{MIK_{\text{samostalno}}(i)}$$

Gdje $MIK_{\text{kombinacija}}(i)$ predstavlja MIK (odnosno MBK) i.-te nanočestice u smjesi nanočestica dok $MIK_{\text{samostalno}}(i)$ predstavlja MIK (odnosno MBK) i.-te nanočestice u fiziološkoj otopini.

FIK indeks temeljen je na Loeweovoj teoriji aditivnosti (Berenbaum, 1989). Teorija je utemeljena na hipotezi da aktivna tvar ne može stupiti u interakciju sama sa sobom te će stoga učinak samo-kombinacije uvijek biti aditivan, sa FIK indeksom od 1. FIK indeks niži od 1 indicira sinergizam, a viši antagonizam, jer bi u tom slučaju trebalo više, odnosno niže, lijeka da se postigne isti učinak kao lijekovi samostalno.

FIK indeks proširen je i na utvrđivanje sinergizma, odnosno antagonizma, i baktericidnog djelovanja nanočestica.

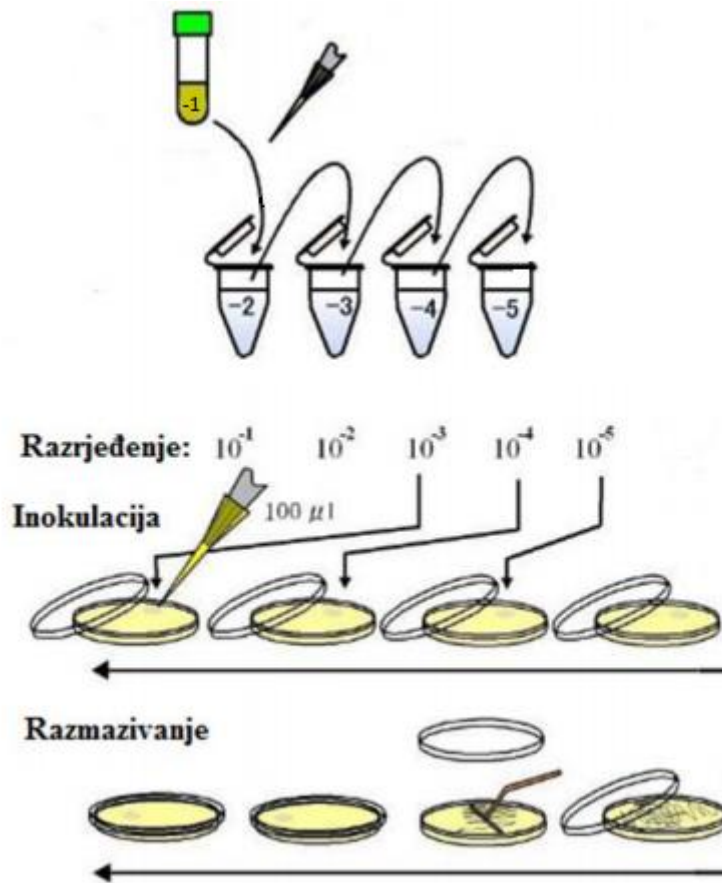
3.9. Ispitivanje antimikrobnog učinka tkanine impregnirane slojem smjese koloidnih nanočestica u vremenu korištenjem „time-kill“ metode

Tkanina dimenzija 1cm² impregnirana je slojem prethodno navedene smjese 1 koristeći sol-gel postupak. Postupak obuhvaća reakciju hidrolize i kondenzacije metalnih alkoksida pri čemu nastaje neprekinuta trodimenzijska metaloksidna mreža, odnosno iz koloidne se otopine (sol) dobiva mreža u kontinuiranoj tekućoj fazi (gel).

U svrhu ispitivanja antimikrobnog učinka tkanine impregnirane slojem smjese koloidnih nanočestica u ovisnosti o vremenu korištena je „time-kill“ metoda (Peran i sur., 2017). Na navedene tkanine nanoseno je 100 µL inokuluma MRSA, odnosno MSSA u sterilnim Petrijevim zdjelicama, dok je kao negativna kontrola služila tkanina bez impregniranog sloja smjese koloida nanočestica. Antimikrobna učinkovitost ispitivana je u trenutku kontakta tkanine sa mikroorganizmima (t₀), te nakon 1 (t₁), 3 (t₃), 6 (t₆), 12 (t₁₂), 18 (t₁₈), i 24 (t₂₄) satne inkubacije na 37°C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Japan). Nakon navedenih vremena inkubacije, tkanina je prenešena pomoću sterilne pincete u staklenu epruvetu u koju se potom dodalo 1 mL fiziološke otopine. Sadržaj epruvete miješao se na tresilici (proizvođač IKA, Sigma Aldrich, Njemačka) točno 30 sekundi te se 100 µL otopine razrijedilo serijalno i deseterostruko 1:9 (V/V) sterilnom fiziološkom otopinom u sterilnoj Eppendorf epruvetici. Postupak je ponovljen još tri puta tako da ukupno bude četiri serijalna deseterostruka razrijeđenja. Sva razrijeđenja su se pripremala u duplikatu. Iz staklenih i Eppendorf epruveta uzelo se 100 µL alikvota te se ravnomjerno razmazalo pomoću L-štapića na površinu TSA i inkubiralo 18 – 24 sata na 37°C pri aerobnim uvjetima u mraku (Sanyo MIR-533, Japan). Proces je prikazan shematski na slici 1. Broj kolonija izražen u logaritmu broja CFU (eng. *Colony forming units*) po mililitru otopine računao se prema sljedećoj jednadžbi :

$$\log_{10} \left[\text{broj kolonija} \left(\frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \right) \right] = \log_{10} (\text{broj izbrojanih kolonija} \times 10^{\text{broj razrijeđenja}+1})$$

Konačni rezultat izražen je kao graf ovisnosti broja kolonija (izraženih kao logaritam baze 10 broja CFU/mL) o vremenu (u satima) te kao grafikon ovisnosti postotka redukcije broja kolonije naspram maksimalnog broja mikroorganizma u vremenu.



Slika 1. Shematski prikaz „time-kill“ metode, preuzeto i prilagođeno sa www.openwetware.org

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Minimalne inhibitorne (MIK) i baktericidne (MBK) koncentracije koloidnih nanočestica u fiziološkoj otopini

Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije koloidnih nanočestica u fiziološkoj otopini za sojeve MSSA i MRSA prikazane su u tablicama 2 i 3. Na MSSA soju najniže MBK i MIK vrijednosti pokazuje koloidni ZnO, a najviše MBK i MIK vrijednosti ima koloidni TiO₂ dok na soju MRSA najniže MBK i MIK vrijednosti pokazuje koloidno Ag (promjera 10 nm), a najviše MBK i MIK vrijednosti ima koloidni TiO₂. Međutim, razlika između MBK i MIK vrijednosti koloidnih nanočestica nije statistički značajna (Kruskal-Wallis test, $\alpha=0.05$, $p>0.05$). Zanimljivo je istaknuti da nanočestice koloidnog ZnO pri koncentraciji od 5.25% i 2.63% uzrokuju porast soja MRSA (ali ne i soja MSSA) dok pri nižim koncentracijama tog porasta nema. MBK vrijednosti za koloidni ZrO₂ na soju MSSA nisu uočene u ispitivanom rasponu koncentracija (50 000 ppm – 6 ppm), međutim koloidni ZrO₂ pokazuje bakteriostatski učinak kroz cijeli raspon navedenih koncentracija.

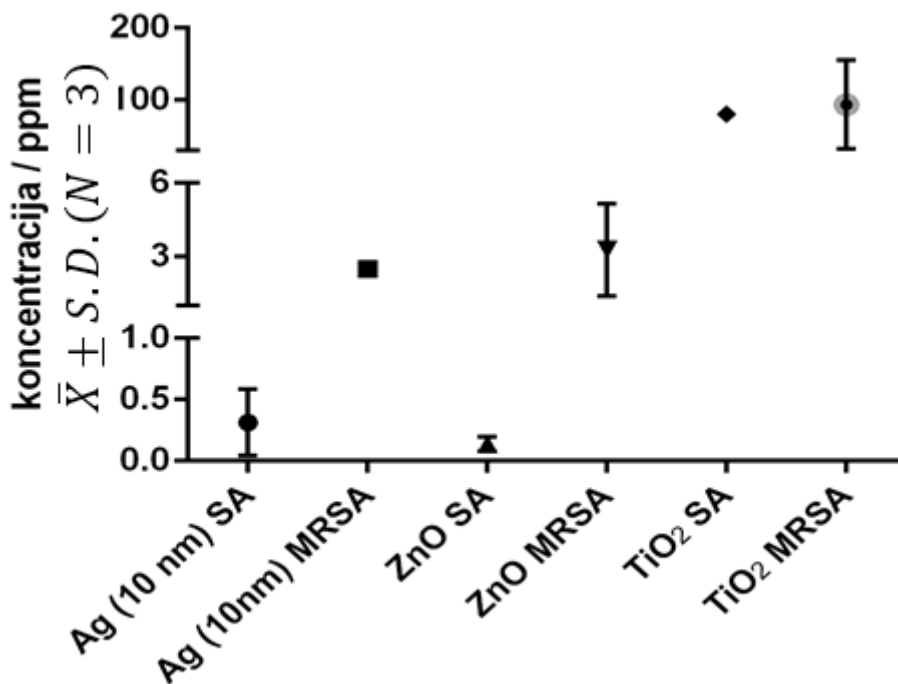
Tablica 2. MBK i MIK vrijednosti koloidnih otopina nanočestica za MSSA soj vrste *S. aureus*

| | MBK / ppm | MIK / ppm |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | $\bar{X} \pm S. D. (N = 3)$ | $\bar{X} \pm S. D. (N = 3)$ |
| Ag (10 nm) | 0,313 ± 0,271 | 0,085 ± 0,069 |
| Ag (40 nm) | 1,042 ± 1,263 | 0,021 ± 0,017 |
| Pt | 0,195 ± 0,169 | 0,057 ± 0,037 |
| TiO₂ | 80,566 ± 0,000 | 40,283 ± 0,000 |
| Y₂O₃ | 12,207 ± 0,000 | <12,207 |
| ZnO | 0,137 ± 0,059 | 0,026 ± 0,000 |
| ZrO₂ | >12500 | <0,061 |

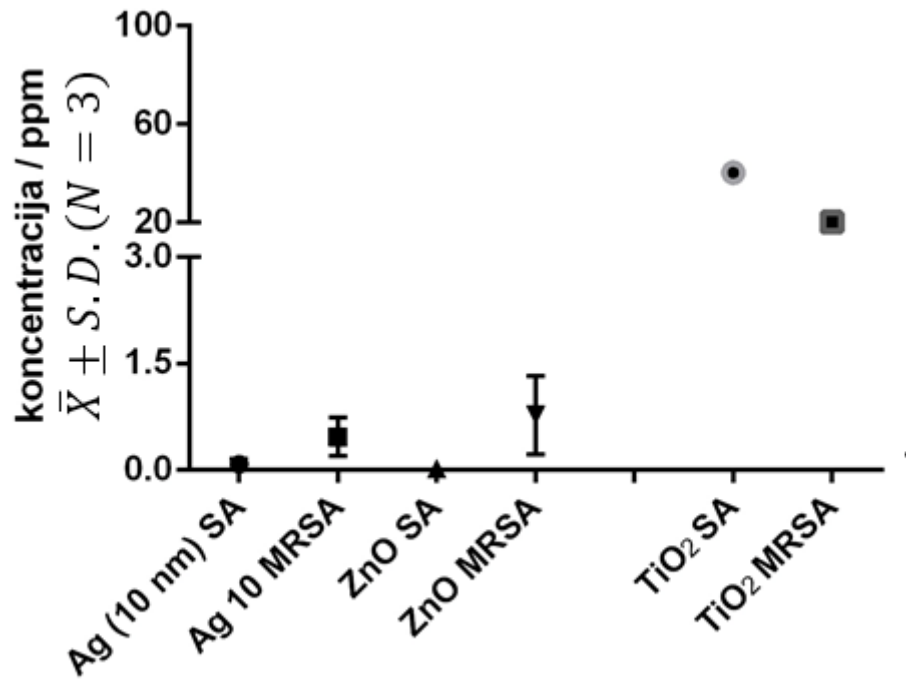
Tablica 3. MBK i MIK vrijednosti koloidnih otopina nanočestica za MRSA soj vrste *S. aureus*

| | MBK / ppm | MIK / ppm |
|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | $\bar{X} \pm S. D. (N = 3)$ | $\bar{X} \pm S. D. (N = 3)$ |
| Ag (10 nm) | 2,500 ± 0,000 | 0,469 ± 0,271 |
| TiO₂ | 93,994 ± 61,534 | 20,142 ± 0,000 |
| ZnO | 3,281 ± 1,894 | 3,281 ± 0,553 |

Baktericidne koncentracije koloidnog Ag i ZnO su otprilike deset puta niže na MSSA nego na MRSA soju MRSA, međutim razlike između istih nanočestica na različitim sojevima nisu statistički značajne (Mann Whitney test, $\alpha=0.05$). Usporedba antimikrobnog učinka istih koloidnih nanočestica na različitim sojevima prikazana je na slikama 2 i 3.



Slika 2. Usporedba MBK vrijednosti koloidnih otopina nanočestica za sojeve MRSA (u grafu kao MRSA) i MSSA (u grafu SA) vrste *S.aureus*



Slika 3. Usporedba MIK vrijednosti koloidnih otopina nanočestica za sojeve MRSA (u grafu kao MRSA) i MSSA (u grafu SA) vrste *S.aureus*

4.2. Određivanje utjecaja medija na antimikrobnu aktivnost koloidnih nanočestica

U svrhu ispitivanja utjecaja medija na antimikrobnu aktivnost koloidnih nanočestica određivala se minimalna inhibitorna (MIK) i baktericidna (MBK) koncentracija unutar različitih medija pri različitim koncentracijama. Kao mikrobni model uzet je MSSA soj vrste *S. aureus*, a kao model koloidne nanočestice uzeto je koloidno elementarno srebro promjera 10 nanometara (Ag 10 nm) koje je metodom dvostruke serijalne dilucije pripravljeno u rasponu koncentracija 5.0000 do 0.0024 ppm. Mediji korišteni su 4.0% i 0.4% fiziološka otopina liofiliziranog albumina sterilizirana filtracijom, 25.0% i 0.25% fetalni goveđi serum (FBS), te 1.0% i 0.1% otopina liofiliziranog mucina tipa dva čija se sterilnost provjeravala *post hoc*. Baktericidna aktivnost nanočestica koloidnog Ag u ispitivanom rasponu nije uočena u 25.0% FBS-u te 4.0% i 0.4% otopini albumina, dok inhibitorna aktivnost nije uočena u 4.0% otopini albumina. Štoviše, MBK vrijednost koloidnog Ag u 1.0% otopini mucina i 2.5% otopini seruma je statistički značajno viša od MBK vrijednosti srebra u fiziološkoj otopini (Mann Whitney test, $\alpha=0.05$, $p=0.05$). U skladu s hipotezom da kompleksini medij ometa antimikrobni učinak nanočestica, MIK vrijednosti koloidnog Ag u serumu pri koncentracijama od 25.0% i 2.5% je značajno viša (Mann Whitney test, $\alpha=0.05$, $p=0.05$) od one u fiziološkoj otopini. Kontrarno toj hipotezi je činjenica da su MIK vrijednosti koloidnog Ag u 0.1% otopini mucina i 0.4% otopini albumina, a u slučaju albumina i statistički značajno (Mann Whitney test, $\alpha=0.05$, $p=0.05$) niže od one u fiziološkoj otopini. Također postoji statistički značajna razlika između MBK vrijednostima koloidnog Ag između 25.0% i 2.5% otopine seruma, te između MIK vrijednostima koloidnog Ag u 25.0% i 2.5% otopini seruma, te 1.0% i 0.1% otopini mucina (Mann Whitney test, $\alpha=0.05$, $p=0.05$). MIK i MBK vrijednosti nanočestica koloidnog Ag (10 nm) u različitim medijima prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. MBK i MIK vrijednosti nanočestica koloidnog Ag (10 nm) u pri različitim koncentracijama različitih za soj MSSA vrste *S.aureus*, * označava statistički značajnu razliku u usporedbi s kontrolom, fiziološkom otopinom (Mann Whitney test, $\alpha=0.05$, $p=0.05$)

| | MBK (ppm) | MIK (ppm) |
|---------------------------|-----------------------------|--------------------|
| | $\bar{X} \pm S. D. (N = 3)$ | |
| FBS (25.0%) | >5 | 1,667 \pm 0,722* |
| FBS (2.5%) | 1,667 \pm 0,722* | 0,521 \pm 0,180* |
| Albumin (4.0%) | >5 | >5. |
| Albumin (0.4%) | >5 | 0,003 \pm 0,001* |
| Mucin (1.0%) | 1,250 \pm 0,000* | 0,156 \pm 0,000 |
| Mucin (0.1%) | 0,313 \pm 0,271 | 0,008 \pm 0,003 |
| Fiziološka otopina | 0,313 \pm 0,271 | 0,085 \pm 0,069 |

4.3. Ispitivanje postojanja sinergističkog učinka nanočestica

U svrhu ispitivanja sinergističkog učinka nanočestica, pripremljene su tri smjese koloidnih nanočestica. Sastav smjesa nanočestica naveden je u tablici 5. Optimalna koncentracija pojedinih nanočestica u smjesi pripremljena je u računalnom programu Design Expert® (State-Ease, Inc., v. 9.1) koristeći podatke o antimikrobnim svojstvima dobivene u prethodnim istraživanjima u sklopu projekta STARS. Kao mikrobnih modeli uzeti su sojevi MSSA i MRSA vrste *S.aureus*.

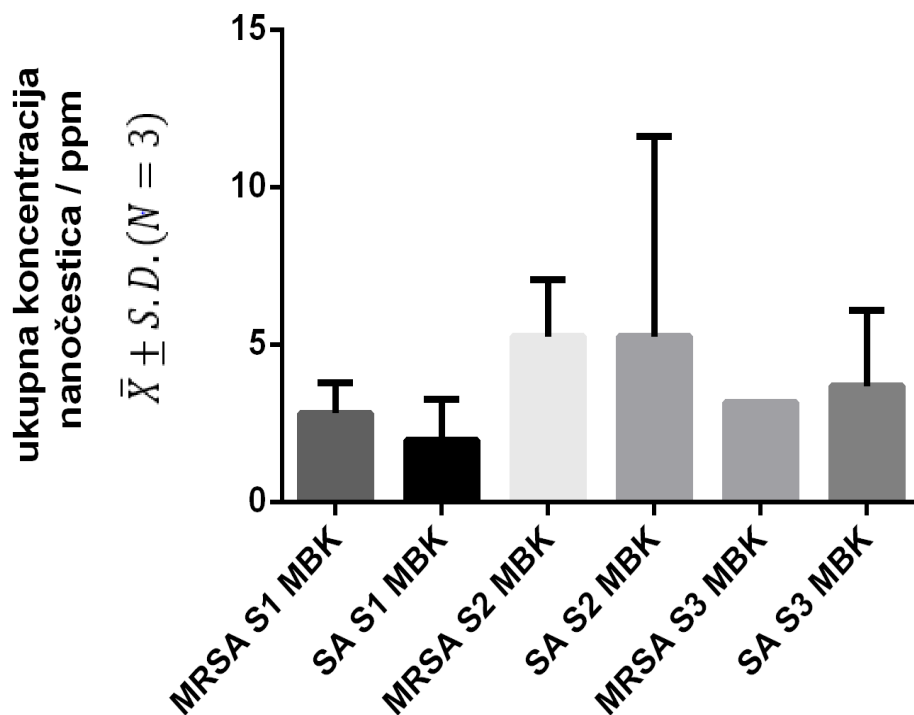
Tablica 5. Sastav smjesa

| | Ag (10 nm) /ppm | TiO₂ (nm) /ppm | ZnO (nm) /ppm | Ukupno / ppm |
|-----------------|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| Smjesa 1 | 2.8 | 220 | 210 | 432.8 |
| Smjesa 2 | 3.4 | 330 | 70 | 403.4 |
| Smjesa 3 | 3.9 | 330 | 70 | 403.9 |

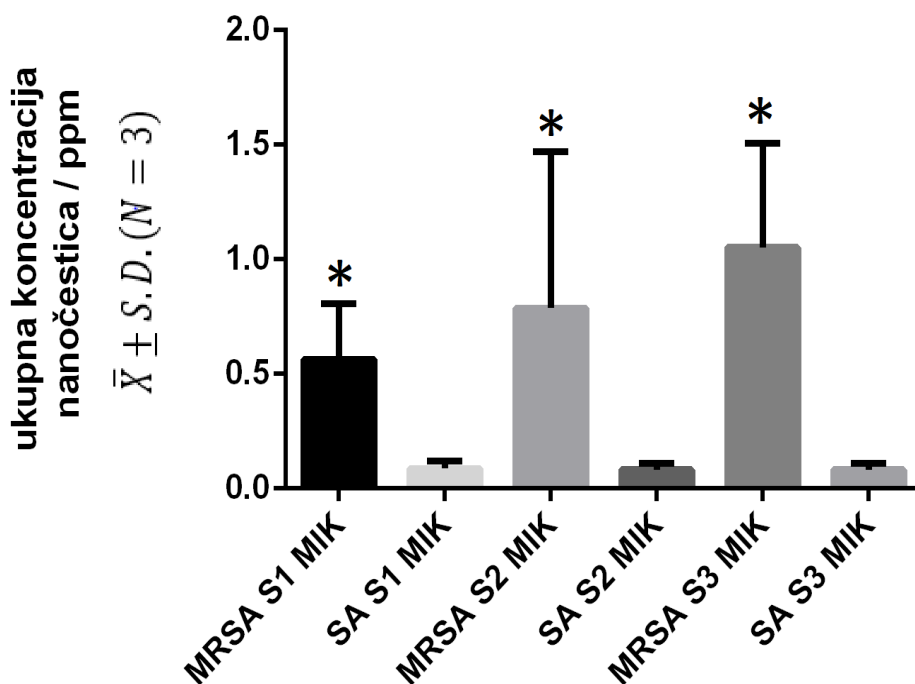
Navedenim se smjesama utvrđivala minimalna baktericidna (MBK) i inhibitorna (MIK) koncentracija prethodno opisanom metodom dvostruke serijalne mikrodilucije. Rezultati su izraženi kao ppm-i ukupne koncentracije nanočestica u pojedinoj smjesi te su navedeni u tablici 6 i prikazani na slikama 4 i 5. Nije bilo statistički značajnih razlika između MBK i MIK vrijednosti smjesa unutar sojeva (Kruskal-Wallis test, $\alpha=0.05$), te niti MBK vrijednosti istih smjesa između dva soja (Mann-Whitney, $\alpha=0.05$, $p=0.05$). Međutim, postoji statistički značajna razlika u MIK vrijednostima istih smjesa između dva soja (Mann-Whitney, $\alpha=0.05$, $p=0.05$) te ta značajnost postoji za sve tri smjese.

Tablica 6. MBK i MIK vrijednosti smjesa koloidnih nanočestica kao ukupna koncentracija nanočestica u smjesi za sojeve MRSA (u grafu kao MRSA) i MSSA (u grafu SA) vrste *S.aureus*

| | MSSA | | MRSA | |
|-----------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| | $\bar{X} \pm S. D. (N = 3)$ | | $\bar{X} \pm S. D. (N = 3)$ | |
| | MBK / ppm | MIK / ppm | MBK / ppm | MIK / ppm |
| Smjesa 1 | 1.972 ± 1.291 | 0.088 ± 0.031 | 2.818 ± 0.976 | 0.564 ± 0.244 |
| Smjesa 2 | 5.253 ± 6.368 | 0.082 ± 0.028 | 5.253 ± 1.820 | 0.788 ± 0.682 |
| Smjesa 3 | 3.682 ± 2.410 | 0.082 ± 0.029 | 3.156 ± 0.000 | 1.052 ± 0.456 |



Slika 4. MBK vrijednosti smjesa koloidnih nanočestica kao ukupna koncentracija svih nanočestica u smjesi sojeve MRSA (u grafu kao MRSA) i MSSA (u grafu SA) vrste *S.aureus*



Slika 5. MIK vrijednosti smjesa koloidnih nanočestica kao ukupna koncentracija svih nanočestica u smjesi sojeve MRSA (u grafu kao MRSA) i MSSA (u grafu SA) vrste *S.aureus*

U svrhu utvrđivanja prisutnosti (ili odsutnosti) antagonizma, računat je FIC indeks prema navedenoj formuli :

$$FIC_{index}(smjesa) = \sum_{i=1}^n \frac{MIK_{kombinacija}(i)}{MIK_{samostalna}(i)}$$

Gdje $MIK_{kombinacija}(i)$ predstavlja MIK (odnosno MBK) i.-te nanočestice u smjesi nanočestica dok $MIK_{samostalno}(i)$ predstavlja MIK (odnosno MBK) i.-te nanočestice u fiziološkoj otopini. FIK (odnosno FBK) indeks niži od 1 indicira sinergizam, a viši antagonizam. Rezultati su prikazani u tablicama 7 i 8.

Tablica 7. FIK indeksi pojedinih smjesa za sojeve MSSA i MRSA vrste *S.aureus*

| | FBK (MSSA) | FIK (MSSA) | FBK (MRSA) | FIK (MRSA) |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Smjesa 1 | 7,05 | 1,67 | 0,44 | 0,36 |
| Smjesa 2 | 6,86 | 0,57 | 0,34 | 0,20 |
| Smjesa 3 | 4,82 | 0,57 | 0,21 | 0,27 |

Tablica 8. Interpretacija FIC indeksa pojedinih smjesa za sojeve MSSA i MRSA vrste *S.aureus*

| | MBK (MSSA) | MIK (MSSA) | MBK (MRSA) | MIK (MRSA) |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Smjesa 1 | antagonizam | antagonizam | sinergizam | sinergizam |
| Smjesa 2 | antagonizam | sinergizam | sinergizam | sinergizam |
| Smjesa 3 | antagonizam | sinergizam | sinergizam | sinergizam |

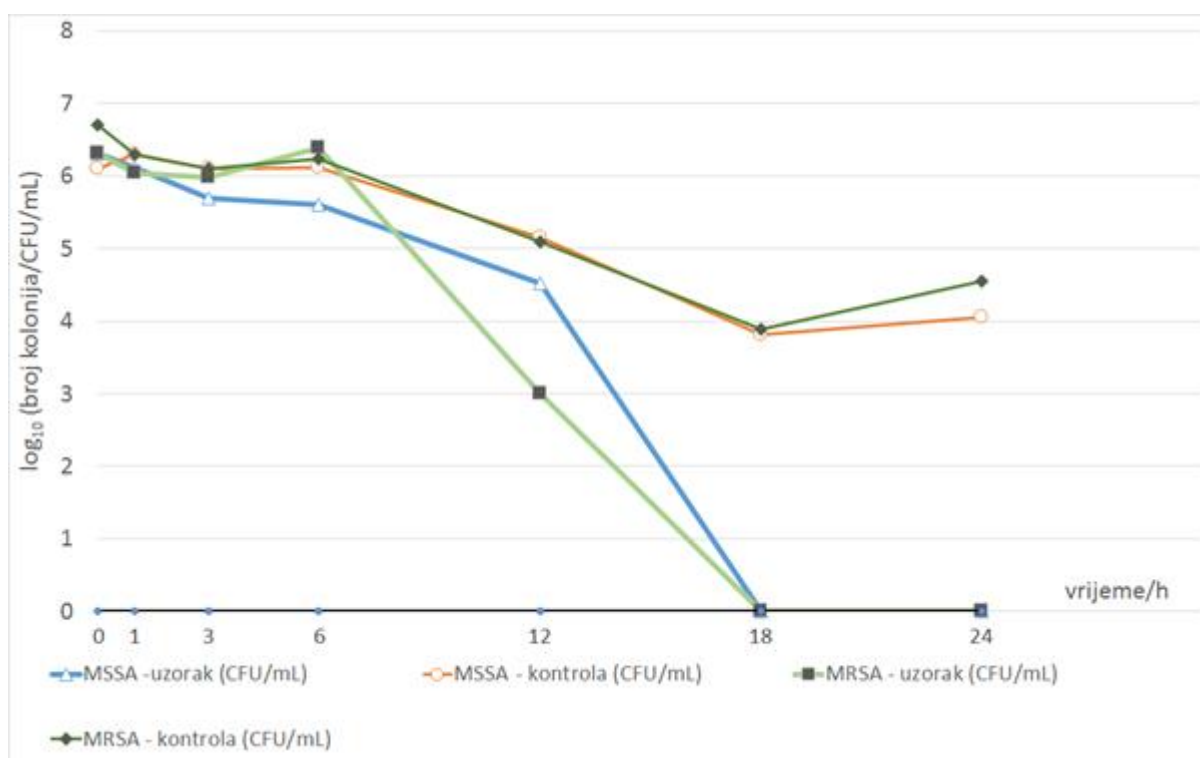
Postoji značajna razlika između dva soja što se tiče postojanja sinergizma koloida nanočestica unutar smjesa. Nanočestice u sve tri smjese imaju sinergističko djelovanje i u smislu baktericidne i bakteriostatske aktivnosti nad MRSA sojem. Nanočestice u samo dvije od tri (smjesa 2 i smjesa 3) smjese pokazuju sinergističko djelovanje, dok u smjesi 1 imaju znatno antagonističko djelovanje u smislu bakteriostatskog djelovanja nad MSSA sojem, dok su FBK indeksi nad sojem MSSA drastično viši od 1, što implicira antagonizam u smislu baktericidne aktivnosti.

4.4. Ispitivanje antimikrobnog učinka tkanine impregnirane slojem smjese koloidnih nanočestica u vremenu korištenjem „time-kill“ metode

U tablici 9 prikazani su podaci o smanjenju broja kolonija sojeva MSSA i MRSA vrste *S.aureus* nakon inkubacije na ispitivanoj tkanini te pozitivnoj kontroli (tkanina bez sloja nanočestica). Podaci su izraženi kao \log_{10} (broj kolonija/ CFU/mL) i stavljeni u ovisnost o vremenu inkubacije. Uzorkovanje je provedeno odmah nakon kontakta tkanine sa mikroorganizmima (t_0), te nakon 1 (t_1), 3 (t_3), 6 (t_6), 12 (t_{12}), 18 (t_{18}), i 24 (t_{24}) satne inkubacije. Statistički značajna razlika broja kolonija u usporedbi s kontrolom soja (Mann Whitney test, $\alpha=0.05$, $p<0.05$) za soj MSSA očituje se nakon 18 sati, a za soj MRSA nakon 12 sati. Grafički prikaz pada broja kolonija navedenih sojeva prikazan je na slici 6.

Tablica 9. Vrijednosti \log_{10} (broj kolonija/ CFU/mL) za sojeve MSSA i MRSA inokulirane na ispitivanu tkaninu te njihovih kontrola o vremenu izraženom u satima, * označava statistički značajnu razliku u usporedbi s kontrolom (Mann Whitney test, $\alpha=0.05$, $p<0.05$)

| | Vrijeme (sati) vs broj kolonija (\log_{10} (broj kolonija/CFU/ml)) | | | | | | |
|------------------------|---|------|------|------|-------|-------|-------|
| | 0 | 1 h | 3 h | 6 h | 12 h | 18 h | 24 h |
| MSSA (uzorak) | 6.32 | 6.11 | 5.70 | 5.60 | 4.52 | 0.00* | 0.00* |
| MSSA (kontrola) | 6.10 | 6.29 | 6.10 | 6.12 | 5.15 | 3.81 | 4.05 |
| MRSA (uzorak) | 6.31 | 6.04 | 5.98 | 6.38 | 3.00* | 0.00* | 0.00* |
| MRSA (kontrola) | 6.71 | 6.30 | 6.10 | 6.24 | 5.09 | 3.88 | 4.55 |



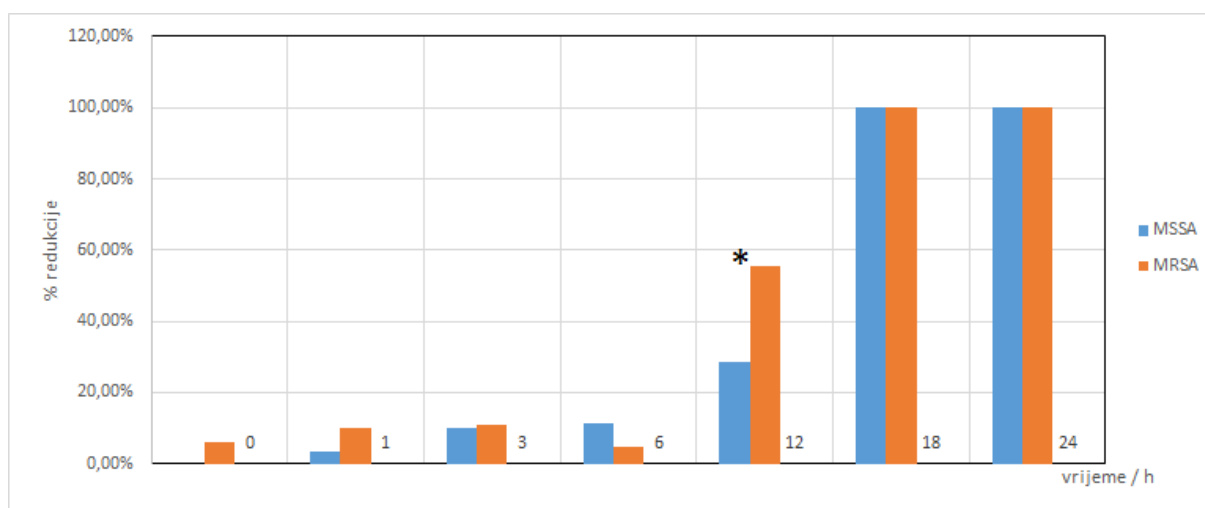
Slika 6. Vrijednosti \log_{10} (broj kolonija/ CFU/mL) za sojeve MSSA i MRSA inokulirane na ispitivanu tkaninu te njihovih kontrola o vremenu izraženom u satima

Problem koji se pojavio je pad broja kolonija kontrolnog uzorka nakon 12 sati te je taj pad za otprilike 2 logaritamske jedinice perzistirao čak i nakon ponavljanja. Kako sojevi nisu inkubirani unutar tekućeg medija, već je 100 μ L inokuluma kapnuto na tkaninu, moguće je da je dio mikroorganizama ili ispario sa tkanine ili se prejako fiksirao unutar matriksa tkanine pa ga nije bilo moguće izvući za uzorkovanje vorteksiranjem, ili pak da sama tkanina posjeduje slab antimikrobni učinak.

U tablici 10 i na slici 7 prikazan je postotak redukcije broja kolonija u odnosu na maksimalan broj mikroba pojedinog soja (nulto vrijeme inkubacije). Redukcija broja kolonija je potpuna nakon 18 sati, s time da postoji statistički značajna razlika između postotka redukcije (Mann Whitney test, $\alpha=0.05$, $p<0.05$) između dva ispitivana soja u 12. satu inkubacije. Navedeni podaci navode na zaključak da je MRSA soj osjetljiviji na djelovanje tkanine impregniranem slojem nanočestica u smislu da navedena tkanina uzrokuje bržu redukciju nakon 12 sati. Međutim, treba napomenuti da je redukcija oba soja potpuna, odnosno stopostotna, već nakon 18 sati.

Tablica 10. Postotak redukcije za sojeve MSSA i MRSA inokulirane na ispitivanu tkaninu u usporedbi s maksimalnim brojem mikroba određenog soja o vremenu izraženom u satima, * označava statistički značajnu razliku između dva soja (Mann-Whitney test, $\alpha=0.05$, $p<0.05$)

| | Vrijeme (sati) vs postotak redukcije kolonija | | | | | | |
|-------------|---|-------|--------|--------|--------|---------|---------|
| | 0 | 1 h | 3 h | 6 h | 12 h* | 18 h | 24 h |
| MSSA | 0.00% | 3.24% | 9.82% | 11.36% | 28.47% | 100.00% | 100.00% |
| MRSA | 5.87% | 9.90% | 10.85% | 4.85% | 55.26% | 100.00% | 100.00% |



Slika 7. Postotak redukcije za sojeve MSSA i MRSA inokulirane na ispitivanu tkaninu u usporedbi s maksimalnim brojem mikroba određenog soja o vremenu izraženom u satima, * označava statistički značajnu razliku između dva soja (Mann Whitney test, $\alpha=0.05$, $p<0.05$)

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu hipoteze, provedenih istraživanja te diskusije, može se zaključiti nekoliko činjenica. Koloidni oblici nanočestica metala i metalnih oksida pokazali su se kao potentni baktericidni i bakteriostatski agensi. Njihove minimalne inhibitorne (MIK) i baktericidne (MBK) koncentracije nalaze se od 0,01 do 10,00 ppm-a. Iznimka su nanočestice titanova dioksida koje svoje MBK i MIK vrijednosti nalaze u rasponu od 40 do 80 ppma. Nema statistički značajne razlike između ispitivanih nanočestica, međutim to je vjerojatno funkcija ograničenog broja uzoraka. Posebice je zanimljivo istaknuti da nanočestice cirkonijeva dioksida koje u ispitivanom rasponu ne pokazuju baktericidni učinak (odnosno MBK je viši od 12500 ppm-a), ali kroz čitav raspon pokazuju bakteriostatski učinak te posljedično MIK vrijednosti nisu uočene (odnosno MIK je niži od 0,061 ppm-a). Iako postoji razlika u antimikrobnom učinku, odnosno MBK i MIK vrijednostima za dva ispitivana soja (MRSA i MSSA) vrste *S. aureus* u smislu da su MBK i MIK vrijednosti za MRSA više, ta razlika nije statistički značajna, što se opet može pripisati ograničenom broju uzoraka. Dodatna točka koja pridonosi postojanju razlike između dva soja jest činjenica da nanočestice koloidnog ZnO pri koncentraciji od 5.25% i 2.63% uzrokuju porast soja MRSA (ali ne i soja MSSA) dok pri nižim koncentracijama tog porasta nema.

Pokazano je da kompleksnost medija igra ulogu u antimikrobnoj učinkovitosti koloida nanočestica. Tako veće koncentracije kompleksnijih medija, kao što su goveđi serum i albumin, povećavaju MBK i MIK vrijednosti koloidnih nanočestica srebra (promjera 10 nm). Iznimka od navedenog zapažanje je medij albumin pri 0.4% gdje je MIK, ali ne i MBK, vrijednost nanočestica koloidnog srebra značajno niža negoli u fiziološkoj otopini.

U svrhu ispitivanja postojanja sinergizma, pripravile su se tri smjese triju različitih vrsta nanočestica, čije su se koncentracije optimizirale pomoću računalnog programa Design Expert® (State-Ease, Inc., v. 9.1) koristeći podatke o antimikrobnim svojstvima dobivene u prethodnim istraživanjima u sklopu projekta STARS. Nije bilo nikakvih razlika između smjesa, te između dva navedena soja. Iz dobivenih MBK i MIK vrijednosti smjesa, te prethodno dobivenih podataka o MBK i MIK vrijednostima nanočestica računat je FBK, odnosno FIK indeks. Iako intuitivan i informativan, FIK, odnosno FBK, indeks nije validirana metoda za utvrđivanje sinergizma, no on je trenutno najbolja procjena sinergizma. FIK, odnosno FBK, indeks iznad 1 indicira antagonizam, a ispod 1 sinergizam. Postojala je značajna razlika između sojevima. Nanočestice u sve tri smjese pokazuju sinergizam u smislu baktericidne i bakteriostatske aktivnosti nad sojem MRSA, no nad sojem MSSA pokazuju antagonizam.

U svrhu ispitivanja primjene nanočestica, sloj tkanine impregniran je smjesom nanočestica pomoću sol-gel postupka. Antimikrobni učinak te tkanine ispitivao se primjenom tzv. *time-kill* metode koja daje ovisnost redukcije broja mikroba u vremenu. Oko 12. sata pojavila se statistički značajna razlika u redukciji MRSA (55%) naspram MSSA (28%). Usprkos tome, redukcija nad oba soja, MRSA i MSSA bila je potpuna, odnosno stopostotna, nakon 18 sati. Iako je stopostotna redukcija nakon 18 sati dojmljiva, to i dalje nije dovoljno brzo za praktičnu primjenu u smislu prevlaka medicinskih uređaja i sportske odjeće/obuće. Kako nanočestice imaju nespecifičan način djelovanja, kroz stimulaciju proizvodnje reaktivnih kisikovih specija (ROS) i narušavanja membranskog integriteta, očekivano bi bilo ne vidjeti značajne razlike između dva soja iste bakterijske vrste, iako je jedan rezistentan na konvencionalne antibiotike. Međutim, postoje razlike između sojeva MSSA (odnosno MSSA) i MRSA. Ispitivana antimikrobna tkanina brže uzrokuje redukciju bakterija, te nanočestice ispoljavaju sinergizam, za razliku od antagonizma.

6. LITERATURA

1. Abramovitz I, Wisblech D, Zaltsman N, Weiss E, Beyth N. Intratubular Antibacterial Effect of Polyethyleneimine Nanoparticles: An Ex Vivo Study in Human Teeth. *J Nanomater*, 2015, 2015 1-5.
2. Allahverdiyev A, Sefik Abamor E, Bagirova M, Rafailovich M. Antimicrobial effects of TiO₂ and Ag₂O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. *Future Microbiol*, 2011, 6, 933-940.
3. Ansari M, Khan H, Khan A, Sultan A, Azam A. Characterization of clinical strains of MSSA, MRSA and MRSE isolated from skin and soft tissue infections and the antibacterial activity of ZnO nanoparticles. *World J Microb Biot*, 2012, 28, 1605-1613.
4. Ashajyothi C, Harish KH, Dubey N, Chandrakanth RK. Antibiofilm activity of biogenic copper and zinc oxide nanoparticles-antimicrobials collegiate against multiple drug resistant bacteria: a nanoscale approach. *J Nanostruct Chem*, 2016. 6(4), 329–341.
5. Barber JD, Freestone CI. An investigation of the origin of the colour of the Lycurgus cup by analytical transmission electron microscopy. *Archaeometry*, 2018, 32(1), 33–45.
6. Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol*, 1961, 14(4), 385–393.
7. Berenbaum MC. What is synergy?. *Pharmacol Rev*, 1989, 41(2), 93-129.
8. Berube JB, Wardenburg BJ. Staphylococcus aureus α -Toxin: Nearly a Century of Intrigue. *Toxins*, 2013, 5(6), 1140–1166 .
9. Blecher K, Nasir A, Friedman A. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. *Virulence*, 2011, 2(5), 395-401.

10. Brady-Estevez AS, Kang S, Elimelech M. A singlewalled-carbon-nanotube filter for removal of viral and bacterial pathogens. *Small*, 2008, 4(4), 481-484
11. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv Drug Deliver Rev*, 2002, 54(5), 631–651.
12. Choi O, Deng KK, Kim NJ, Ross L, Surampalli RY, Hu Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res*, 2008, 42(12), 3066–3074.
13. Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?. *J Antimicrob Chemoth*, 2007, 59(4), 587–590.
14. Coates R, Moran J, Horsburgh MJ. Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. *Future Microbiol*, 2013, 9(1), 75–91.
15. Cribier B, Prévost G, Couppie P, Finck-Barbançon V, Grosshans E, Piémont Y. Staphylococcus aureus Leukocidin: A New Virulence Factor in Cutaneous Infections?. *Dermatology*, 1992, 185(3), 175–180.
16. Dastjerdi R, Montazer M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. *Colloid Surface B*, 2010, 79(1), 5–18.
17. Elliott C. The effects of silver dressings on chronic and burns wound healing. *British Journal of Nursing*, 2010, 19(Sup5), S32–S36
18. Faraday M. X. The Bakerian Lecture. —Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philos T R Soc Lond*, 1857, 147, 145–181.
19. Feenstra RM. Scanning tunneling spectroscopy. *Surf Sci*, 1994, 299–300, 965–979.

20. Forestier F. Effect of Nanoparticle-Bound Ampicillin on the Survival of *Listeria-Monocytogenes* in Mouse Peritoneal-Macrophages. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 1992, 30, 173-179.
21. Fowler VG, Miro JM, Hoen B. *Staphylococcus aureus* endocarditis: A consequence of medical progress. *J Amer Med Assoc*, 2005, 293(24), 3012–3021.
22. Fresta M. Pefloxacin mesilate-loaded and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles characterization of the colloidal drug carrier formulation. *J Pharm Sci*, 1995, 84, 895-902.
23. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Kobayashi I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *The Lancet*, 1997, 350(9092), 1670–1673.
24. Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, Hazle JD, Halas NJ, West JL. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(23), 13549–13554.
25. Huh AJ, Kwon YJ. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release*, 2011, 156(2), 128–145.
26. IGEM:IMPERIAL/2009/M3/Assays/ColonyFormingUnits, 2009., openwetware.org, pristupljeno 23.8.2018.
27. Khatib R, Johnson LB, Sharma M, Fakih MG, Ganga R, Riederer K. Persistent *Staphylococcus aureus* bacteremia: Incidence and outcome trends over time. *Scand J Infect Dis*, 2009, 41(1), 4–9.
28. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, SJ Park. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine UK*, 2001, 1, 95-101.

29. Kirby WMM. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science*, 1944, 99(2579), 452-453.
30. Liu Q, Zhang M, Fang ZX, Rong X. Effects of ZnO nanoparticles and microwave heating on the sterilization and product quality of vacuum-packaged Caixin. *J Sci Food Agr*, 2014, 94(12), 2547–2554
31. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*, 2003, 111(9), 1265–1273.
32. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB ,Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18(3), 268–281.
33. McCaig LF, McDonald LC, Mandal S, Jernigan DB. *Staphylococcus aureus*–associated Skin and Soft Tissue Infections in Ambulatory Care. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(11), 1715–1723.
34. MIC- and Inhibition zone diameter distributions of microorganisms without and with resistance mechanisms, 2007, eucast.org, pristupljeno 23.8.2018
35. Mirkin CA, Taton TA. Semiconductors meet biology. *Nature*, 2000, 40, 626-27.
36. Musser JM, Schlievert PM, Chow AW, Ewan P, Kreiswirth BN, Rosdahl VT, Selander RK. A single clone of *Staphylococcus aureus* causes the majority of cases of toxic shock syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(1), 225 LP-229.
37. Nathan C, Cunningham-Bussel A. Beyond oxidative stress : an immunologist’s guide to reactive oxygen species. *Nature reviews Immunology*, 2013, 13(5), 349-361.

38. Paik SYR, Kim JS, Shin SJ, Ko S. Characterization, Quantification, and Determination of the Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles to the Bone Marrow Cells. *Int J Mol Sci.* 2015;16(9):22243-22257.
39. Panáček A, Kvítek L, Pucek R, Kolář M, Večeřová R, Pizúrová N, Zbořil R. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J Phys Chem B*, 2006, 110(33), 16248–16253.
40. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. *Annu Rev Microbiol*, 1994, 48(1), 585–617.
41. Pelgrift R, Friedman A. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliver Rev*, 2013, 65(13), 1803-1815.
42. Peran J, Ražić Ercegović S, Kosalec I, Ziberi F. Antimicrobial Effectiveness of Cellulose based Fabrics treated with Silver Nitrate Solution using Plasma Processes. *Tekstilec*, 2017, 60(4), 247-253.
43. Planchon M, Ferrari R, Guyot F, Ge´labertb A, Menguy N. Interaction between Escherichia coli and TiO₂ nanoparticles in natural and artificial waters. *Colloid Surface B*, 2013, 102, 158–164.
44. Poulouse S, Panda T, Nair PP, Theodore T. Biosynthesis of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechno*, 2014, 14(2), 2038–2049.
45. Pratap Reddy M, Venugopal A, Subrahmanyam M. Hydroxyapatite-supported Ag-TiO₂ as Escherichia coli disinfection photocatalyst. *Water Res*, 2007, 41(2), 379-386.
46. Radt B, Smith TA, Caruso F. Optically Addressable Nanostructured Capsules. *Adv Mater*, 2004, 16(23-24), 2184–2189.

47. Rasmussen WJ, Martinez E, Louka P, Wingett GD. Zinc Oxide Nanoparticles for Selective Destruction of Tumor Cells and Potential for Drug Delivery Applications. *Expert Opin Drug Del*, 2010, 7, 1063-1077.
48. Recharla N, Riaz M, Ko S, Park S. Novel technologies to enhance solubility of food-derived bioactive compounds: A review. *J Funct Food*, 2017, 39, 63–73.
49. Roe D, Karandikar B, Bonn-Savage N, Gibbins B, Rouillet JB (2008) Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J Antimicrob Chemother* 61(4), 869–876.
50. Roy A, Parveen A, Koppalkar A, Ambika Prasad M. Effect of Nano - Titanium Dioxide with Different Antibiotics against Methicillin- Resistant Staphylococcus Aureus. *J Biomat Nanobiotech*, 2010, 1, 37.
51. Shah MA, Tokeer A. Principles of nanoscience and nanotechnology. London, Alpha Science International, Oxford, 2010, str. 10-20.
52. Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Nanomed-Nanotechnol*, 2007, 3(2), 168–171.
53. Sheehy SH, Atkins BA, Bejon P, Byren I, Wyllie D, Athanasou NA, McNally MA. The microbiology of chronic osteomyelitis: Prevalence of resistance to common empirical anti-microbial regimens. *J Infection*, 2010, 60(5), 338–343.
54. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interf Sci*, 2004, 275(1), 177–182.
55. Stoimenov PK, Klinger RL, Marchin GL, Klabunde KJ, 2002. Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. *Langmuir*, 2002, 18, 6679-6686.

56. Svitlana C, Matthias E. Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal. *Angew Chem Int Edit*, 2012, 52(6), 1636–1653.
57. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(3), 603–661.
58. Wei C, Lin WY, Zalnal Z. Bactericidal activity of TiO₂ photocatalyst in aqueous media: toward a solar-assisted water disinfection system. *Envir Sci Tech*, 1994, 28 (5) 934–938, 1994.
59. Wieneke AA, Roberts D, Gilbert RJ. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiol Infect*, 1993, 110(3), 519–531.
60. Xie Y, He Y, Irwin P, Jin T, Shi X. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microb*, 2011, 77, 2325-2311.
61. Zinjarde S. Bio-inspired nanomaterials and their applications as antimicrobial agents. *Chronicles Young Sci*, 2012. 3. 1-74.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Smanjivanjem veličine čestica vrlo često se mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva, pogotovo ako se veličina čestica smanji na dimenzije ispod 1 μm . Smanjivanjem veličine čestica ispod 1 μm otvara se mogućnost pronalaska novih biološki aktivnih tvari. Jedne od takvih biološki aktivnih tvari su nanočestice metala i metalnih oksida (MNP), te je cilj ovog rada istražiti antimikrobna svojstva MNP u koloidnom obliku. Koloidni MNP pokazuju vrijednosti minimalne baktericidne (MBK) i inhibitorne (MIK) koncentracije u rasponima od 0,01 do 100 ppm-a. Najniže MIK i MBK vrijednosti pokazuju nanočestica koloidnog ZnO, dok najviše pokazuju nanočestice koloidnog TiO₂, međutim koloidne nanočestice ZrO₂ pokazuju bakteriostatski učinak u cijelom rasponu ispitivanih koncentracija, dok baktericidni učinak izostaje. Pokazano je da i antimikrobnu učinkovitost koloida Ag mogu smanjivati kompleksni mediji, kao što su serum te otopine proteina. Iako MNP djeluju uglavnom na nespecifičan način, preko tvorbe reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i penetracija membrane, odnosno stijenke, postoje značajne razlike među meticilin-rezistentnom (MRSA) i meticilin-osjetljivom (MSSA) soju vrste *Staphylococcus aureus*. Sinergizam nanočestica se ispitivao putem indeksa frakcionarne baktericidne (FBK_I), odnosno inhibitorne (FIK_I) koncentracije, te tako kombinacije koloidnog Ag, ZnO, i TiO₂, na soju MRSA pokazuju sinergistički, a na soju MSSA antagonistički učinak. U svrhu ispitivanja praktične primjene MNP, tkanina od 1cm² impregnirala se slojem smjese koloida MNP te se ispitivala njena antimikrobna učinkovitost u vremenu pomoću „time-kill“ metode. Potpuna redukcija vijabilnih bakterija soja MSSA i MRSA postignuta je nakon 18 sati, s time da je redukcija soja MRSA brža nego soja MSSA.

Reducing the size of particles results in different physical and chemical properties, especially if the size is reduced below 1 μm . Reducing the size of particles below 1 μm opens up the possibility of finding new biologically active compounds. One of such biologically active compounds are nanoparticles of metals and metallic oxides (MNP), and therefore it is the cause of this paper to explore antimicrobial properties of MNP in colloid form. Colloid MNP show minimal bactericidal (MBC) and inhibitory (MIC) concentrations in ranges of 0,01 to 100 ppm. Lowest MIC and MBC values belong to colloid NP of ZnO, while highest values belong to colloid TiO₂, however, colloid nanoparticles of ZrO₂ demonstrate bacteriostatic effect in the entire range of tested concentrations, while bactericidal effect is absent. It has also been shown that antimicrobial efficacy of colloid Ag can be reduced by complex mediums, such as serum and protein solutions. Although MNP act through unspecific pathways, such as generations of reactive oxygen species (ROS) and penetration of cell membrane and wall, there are significant differences between methicillin-resistant (MRSA) and methicillin-sensitive (MSSA) strains of *Staphylococcus aureus*. Synergism of nanoparticles was tested through fractionary bactericidal (FBC₁) and inhibitory (FIC₁) concentration index, and combinations of colloid Ag, ZnO, and TiO₂ show synergistic effect on MRSA, and antagonistic effect on MSSA. In the effort to test practical usage of MNP, a fabric of 1cm² was impregnated with a layer of mixture of colloid MNP, and had its antimicrobial efficacy in time tested using „time-kill“ assay. Complete reduction of viable bacteria of strains MSSA and MRSA was achieved after 18 hours, with the fact that reduction of MRSA strain was faster than MSSA strain.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Mikrobiologiju
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Antimikrobni učinak koloidnih otopina nanočestica elementarnih metala i metalnih oksida na MSSA i MRSA

Ivan Pokrovac

SAŽETAK

Smanjivanjem veličine čestica vrlo često se mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva, pogotovo ako se veličina čestica smanji na dimenzije ispod 1 μm . Smanjivanjem veličine čestica ispod 1 μm otvara se mogućnost pronalaska novih biološki aktivnih tvari. Jedne od takvih biološki aktivnih tvari su nanočestice metala i metalnih oksida (MNP), te je cilj ovog rada istražiti antimikrobna svojstva MNP u koloidnom obliku. Koloidni MNP pokazuju vrijednosti minimalne baktericidne (MBK) i inhibitorne (MIK) koncentracije u rasponima od 0,01 do 100 ppm-a. Najniže MIK i MBK vrijednosti pokazuju nanočestica koloidnog ZnO, dok najviše pokazuju nanočestice koloidnog TiO₂, međutim koloidne nanočestice ZrO₂ pokazuju bakteriostatski učinak u cijelom rasponu ispitivanih koncentracija, dok baktericidni učinak izostaje. Pokazano je da i antimikrobnu učinkovitost koloida Ag mogu smanjivati kompleksni mediji, kao što su serum te otopine proteina. Iako MNP djeluju uglavnom na nespecifičan način, preko tvorbe reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i penetracija membrane, odnosno stijenke, postoje značajne razlike među meticilin-rezistentnom (MRSA) i meticilin-osjetljivom (MSSA) soju vrste *Staphylococcus aureus*. Sinergizam nanočestica se ispitivao putem indeksa frakcionarne baktericidne (FBK₁), odnosno inhibitorne (FIK₁) koncentracije, te tako kombinacije koloidnog Ag, ZnO, i TiO₂, na soju MRSA pokazuju sinergistički, a na soju MSSA antagonistički učinak. U svrhu ispitivanja praktične primjene MNP, tkanina od 1 cm² impregnirala se slojem smjese koloida MNP te se ispitivala njena antimikrobna učinkovitost u vremenu pomoću „time-kill“ metode. Potpuna redukcija vijabilnih bakterija soja MSSA i MRSA postignuta je nakon 18 sati, s time da je redukcija soja MRSA brža nego soja MSSA.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 37 stranica, 7 grafičkih prikaza, 10 tablica i 61 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanočestice, sinergizam, MRSA, MSSA

Mentor: **Dr. sc. Ivan Kosalec**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivan Kosalec**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Iva Rezić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Tekstilno-tehnološkog fakulteta.

Dr. sc. Irena Žuntar, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Microbiology
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Antimicrobial effect of colloid solutions of nanoparticles of elementary metals and metallic oxides on MSSA and MRSA

Ivan Pokrovac

SUMMARY

Reducing the size of particles results in different physical and chemical properties, especially if the size is reduced below 1 μm . Reducing the size of particles below 1 μm opens up the possibility of finding new biologically active compounds. One of such biologically active compounds are nanoparticles of metals and metallic oxides (MNP), and therefore it is the cause of this paper to explore antimicrobial properties of MNP in colloid form. Colloid MNP show minimal bactericidal (MBC) and inhibitory (MIC) concentrations in ranges of 0,01 to 100 ppm. Lowest MIC and MBC values belong to colloid NP of ZnO, while highest values belong to colloid TiO₂, however, colloid nanoparticles of ZrO₂ demonstrate bacteriostatic effect in the entire range of tested concentrations, while bactericidal effect is absent. It has also been shown that antimicrobial efficacy of colloid Ag can be reduced by complex mediums, such as serum and protein solutions. Although MNP act through unspecific pathways, such as generations of reactive oxygen species (ROS) and penetration of cell membrane and wall, there are significant differences between methicillin-resistant (MRSA) and methicillin-sensitive (MSSA) strains of *Staphylococcus aureus*. Synergism of nanoparticles was tested through fractionary bactericidal (FBC_i) and inhibitory (FIC₁) concentration index, and combinations of colloid Ag, ZnO, and TiO₂ show synergistic effect on MRSA, and antagonistic effect on MSSA. In the effort to test practical usage of MNP, a fabric of 1cm² was impregnated with a layer of mixture of colloid MNP, and had its antimicrobial efficacy in time tested using „time-kill“ assay. Complete reduction of viable bacteria of strains MSSA and MRSA was achieved after 18 hours, with the fact that reduction of MRSA strain was faster than MSSA strain.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 37 pages, 7 figures, 10 tables and 61 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nanoparticles, synergy, MRSA, MSSA

Mentor: **Ivan Kosalec, Ph.D. Associate Professor,** University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivan Kosalec, Ph.D. Associate Professor,** University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Iva Rezić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Textile Technology

Irena Žuntar, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2018.