IN VITRO ISPITIVANJE ANTIBAKTERIJSKIH UČINAKA PENTADEKAPEPTIDA BPC 157

Talapko, Jasminka

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:369512

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Jasminka Talapko

IN VITRO ISPITIVANJE ANTIBAKTERIJSKIH UČINAKA PENTADEKAPEPTIDA BPC 157

Doktorska disertacija

Osijek, 2018.

Mentor rada: doc.dr.sc. Domagoj Drenjančević, dr.med.

Komentor rada: prof.dr.sc. Predrag Sikirić, dr.med.

Rad ima 110 listova

PREDGOVOR RADU

Ova je disertacija izrađena u laboratoriju Katedre za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

Zahvale

Zadovoljstvo mi je zahvaliti mentoru doc.dr.sc. Domagoju Drenjančeviću, dr.med., koji mi je pružao bezrezervnu podršku tijekom izrade ove disertacije te omogućio samostalnost i kreativnu slobodu u radu.

Zahvaljujem komentoru prof.dr.sc. Predragu Sikiriću, dr.med. na ukazanom povjerenju, požrtvovnosti ,plemenitosti te svekolikoj podršci.

Hvala Svenu Burianu, inženjeru laboratorijske dijagnostike, na ekspertnoj tehničkoj pomoći.

Dr. sc. Ivani Škrlec, molekularnoj biologinji i studentu medicine Dini Beliću zahvaljujem za nesebičnu pomoć tijekom izrade ovog rada.

Prijateljici Vesni Kasač, profesorici Hrvatskog jezika na Medicinskoj školi Osijek, hvala za lektoriranje ovoga rada.

Posebnu zahvalnost dugujem mojoj obitelji, osobito suprugu Josipu čiji su znanstveni i stručni savjeti te stalni poticaj doveli do završetka ove doktorske disertacije.

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Prikaz problema 1

1.2. Pentadekapeptid BPC 157 2

1.2.1. Sastav i sinteza pentadekapeptida 2

1.3. Antimikrobni peptidi 4

1.3.1. Rasprostranjenost antimikrobnih peptida 4

1.3.2. Struktura antimikrobnih peptida 4

1.3.3. Mehanizam djelovanja antimikrobnih peptida 5

1.4. Antibiotici 5

1.4.1. Ampicilin 8

1.4.2. Ceftazidim 8

1.4.3. Imipenem 9

1.4.4. Vankomicin 11

1.4.5. Gentamicin 12

1.4.6. Amikacin 13

1.4.7. Ciprofloksacin 14

1.4.8. Eritromicin 15

1.5. Bakterijske vrste 16

1.5.1. *Staphylococcus aureus* 16

1.5.2. *Enterococcus faecalis* 17

1.5.3. *Escherichia coli* 17

1.5.4. *Klebsiella pneumoniae* 19

1.5.5. *Acinetobacter baumanii* 20

1.5.6. *Pseudomonas aeruginosa* 21

2. HIPOTEZA 23

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 24

4. MATERIJAL I METODE 25

4.1. Bakterijski sojevi 25

4.2. BPC 157 i antibiotici 25

4.3. Određivanje osjetljivosti izoliranih sojeva iz kliničkih materijala i ATCC sojeva na pentadekapeptid BPC 157 mikrodilucijskom metodom u bujonu 26

4.4. Ispitivanje sinergističkog djelovanja pentadekapeptida PBC 157 s antibioticima mikrodilucijskom metodom 28

4.5. Ispitivanje sinergističkog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 s antibioticima kombiniranim disk-difuzijskim testom 28

4.6. Statističke metode 30

5. REZULTATI 31

5.1. Prikaz standardnih vrijednosti ATCC sojeva 39

5.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti pentadekapeptida BPC 157 na *ATCC* sojeve *in vitro* metodom mikrodilucije u bujonu 47

5.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti pentadekapeptida BPC 157 na izoliranim bakterijskim vrstama iz kliničkih uzoraka 48

5.4. Ispitivanje sinergističkog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 s konvencionalnim antibioticima na ATCC sojeve *in vitro* metodom dilucije 51

5.5. Ispitivanje sinergističkog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 s konvencionalnim antibioticima na ATCC sojeve *in vitro* metodom disk difuzije 52

5.6. Ispitivanje sinergističkog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 s konvencionalnim antibioticima na izolirane bakterijske sojeve iz kliničkih uzoraka *in vitro* metodom dilucije 55

5.7. Ispitivanje djelovanja konvencionalnih antibiotika sa pentadekapeptidom BPC 157 na izoliranim bakterijskim sojevima iz kliničkih uzoraka *in vitro* metodom disk difuzije 63

6. RASPRAVA 69

7. ZAKLJUČAK 75

8. SAŽETAK 76
9. SUMMARY 77
10. LITERATURA 78
11. ŽIVOTOPIS 94

POPIS KRATICA

Ala	alanin
AM	ampicilin
AMP	antimikrobni peptidi
AN	Amikacin
ARBO	(engl.,arthropod-borne) virusi koje prenose člankonošci
Asp	asparagin
ATCC	(engl. American type Culture Collection) kontrolni soj poznate antimikrobne osjetljivosti
BD	Becton, Dickinson
BPC	(engl. Body Protective Compound)
CAZ	ceftazidim
CFU	colony-forming unit
CIP	ciprofloksacin
CLSI	engl. Clinical Laboratory Standard Institute
E	eritromicin
ECDC	(engl. European Centre for Disease Prevention and Control) Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti
EMA	(engl. European Medicines Agency) Europska medicinska agencija
Fmoc	fluoren-9-ilmetoksikarbonil
Glu	glutamin
Gly	glicin
GM	gentamicin
HPLC	(engl.,high pressure liquid chromatography) Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
IDSA	(engl. Infectious Diseases Society of America) Američko društvo za infektivne bolesti
IPM	imipenem
Leu	leucin
Lys	lizin
McF	McFarland Standard
mg	miligram
MH	Mueller-Hinton

MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
ml	mililitar
MRSA	Meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*
PBP	(eng. penicilin binding protein) penicilin vežući protein
Pro	prolin
Q	interkvartilno raspršenje
R	rezistant
S	sensitiv
VA	vankomicin
Val	valin
VRE	vankomicin rezistentni enterokok
µg	mikrogram

1. UVOD

1.1. Prikaz problema

Liječenje infektivnih bolesti započinje 1935. godine otkrićem prvih antimikrobnih kemoterapeutika. Bitan je mehanizam djelovanja antimikrobnih lijekova selektivna toksičnost, čija je značajka štetno djelovanje na patogen, ali ne i na domaćina. Neracionalna uporaba antibiotika dovodi do otpornosti mikroorganizama na antibiotike te antimikrobna rezistencija pripada među najznačajnije zdravstvene izazove današnjice (1 - 4).

Globalni je teret antimikrobne rezistencije u porastu i povezan je s povećanim morbiditetom i mortalitetom te čini jedan od najvažnijih kliničkih, epidemioloških i mikrobioloških problema današnjice i stoga zahtijeva multidisciplinaran pristup. Uz nužnu racionalizaciju potrošnje antibiotika, poboljšanje prevencije i kontrolu infekcija, potrebno je temeljito ispitati mehanizame rezistencije mikroorganizama, ali isto tako treba istražiti nove antimikrobne lijekove i aktivne supstance, a također i terapijske strategije, postupke i protokole (5, 6).

Posljednjih smo 20 godina suočeni sa stalnim padom u otkrivanju i registriranju novih antibiotika unatoč mnogostrukoj potpori glavnih svjetskih zdravstvenih institucija i vlada koji potiču otkrivanje novih lijekova. Američko društvo za infektivne bolesti (IDSA), Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti (ECDC) i Europska medicinska agencija (EMA) pokrenuli su inicijativu za otkrivanje i stvaranje 10 novih sistemskih antibiotika do 2020. godine (6).

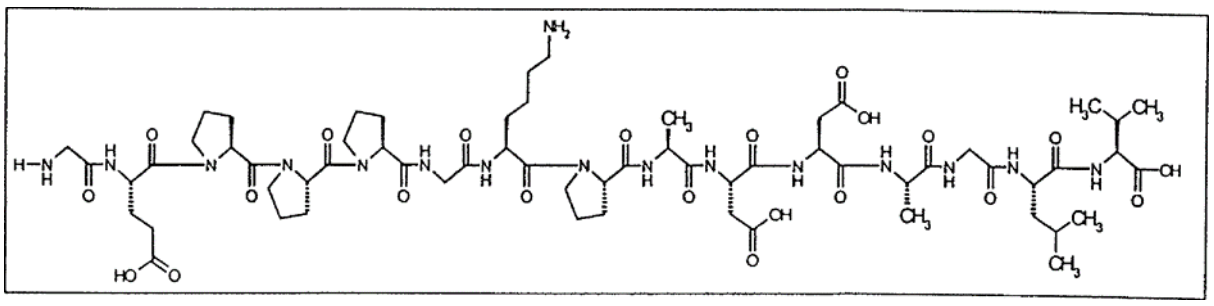
Svjetska je zdravstvena organizacija rapidno rastuću bakterijsku rezistenciju, osobito vidljivu u posljednjoj dekadi, svrstala među jednu od tri najvažnije ozbiljne globalne zdravstvene prijetnje čovječanstvu. Posebnu zabrinutost izazivaju “ESKAPE” patogeni: *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa*, i vrste iz porodice *Enterobacteriaceae*, koji su izbjegli postupcima kontrole širenja i liječenja te su odgovorni za većinu teških nozokomijalnih infekcija širom svijeta (6 - 8).

1.2. Pentadekapeptid BPC 157

Pentadekapeptid BPC 157 je pluripotentan organoprotektivni peptid. Konstitutivno se stvara u sluznici želuca i nalazi se u želučanom soku. Izoliran je iz ljudskog i životinjskog želučanog soka prije više od 20 godina. Nazvan je BPC 157 (Body Protecting Compound). Molekularna je masa ovog prirodnog peptida velika i iznosi oko 40 000 ± 5000 daltona. Struktura mu je samo djelomično određena. BPC 157 ima vrlo široki spektar bioloških aktivnosti za koje postoji mogućnost da su posljedica neodređene strukture, nedovoljne čistoće ili homogenosti izoliranog spoja BPC 157 (9 - 11).

BPC 157 koji je dobiven sintezom (Patent Sikirić P i sur, EP0 572688) ima biološku aktivnost prirodnog spoja BPC 157, ali sa povećanom selektivnošću. Aminokiselinski dio je sastavljen od 15 aminokiselina (Gly, Glu, Pro, Pro, Pro, Gly, Lys, Pro, Ala, Asp, Asp, Ala, Gly, Leu, Val) i glavni je nositelj njegove aktivnosti (12, 13).

Kemijsko je ime Glycyl-L-glutamyl-L-prolyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-lysyl-L-prolyl-L-alanyl L-aspartyl-L-aspartyl-L-alanyl-glycyl-L-leucyl-L-valine. Molekularna je formula $C_{62}H_{98}N_{16}0_{22}$ (slobodni peptid), a molekularna težina 1419, 55 Daltona (9).



Slika 1. Strukturna formula aminokiselinske sekvence BPC-157 (Patent Sikirić)

1.2.1. Sastav i sinteza pentadekapeptida

Sinteza se pentadekapeptida provodi postupkom stupnjevite kondenzacije pomoću “Fmoc” (fluoren-9-ilmetoksikarbonil) zaštićenih aminokiselina. Kondenzacija započinje prvom aminokiselinom, valinom koja je vezana uz polimerni nosač (benzildrilaminorezin). Vezujući

je reagens diisopropilkarodimid. Svakim stupnjem kondenzacije jedna protektivna "Fmoc" grupa zamijeni se piperidinom, a jedna se aminokiselina nadoveže. Isti se postupak primjenjuje za svaku narednu aminokiselinu sve dok se sinteza ne završi. Razdvajanje se obavlja pomoću trifluorooctene kiseline/trifluormetansulfonske kiseline/anizola u omjeru 2:17:52. Sirova se mješavina pentadekapeptida pročisti reverznom fazom HPLC (eng., high pressure liquid chromatography) pri čemu se koristi stupac 5x150 mm napunjen silikagelom RP-18, s gradijent eluiranjem u sustavu otapanja: 0,1 trifluorooctena kiselina u vodi/acetonitrilu. U svim se pokusima koristi pentadekapeptid 99-postotne čistoće (15).

Od izoliranja do danas nije uočeno postojanje podudarnosti ovog peptida s poznatim crijevnim peptidima. Prednosti se pentadekapeptida BPC 157 prema drugim peptidima očituju u tome što je stabilan i u uvjetima koji inače dovode do brze razgradnje peptida, te što se može redovito primjenjivati bez nosača i što je netoksičan (16 - 24).

Lako je topljiv u vodi i fiziološkoj otopini pri pH 7.0, pentadekapeptid BPC 157 se koristi u mikrogramskim i nanogramskim terapijskim dozama (25).

Produženo se citoprotektivno djelovanje ogleda u cijeljenju različitih rana. To je evaluirano u istraživanjima pentadekapeptida BPC 157, pa je tako u primjeru gastrointestinalnog sustava dokazan njegov terapijski učinak u cijeljenju gastrokutanih i kolokutanih fistula te anastomoza crijeva (ileoilealne, kolokolične, ileojejunalne) (26 - 33).

U procesu je cijeljenja istraživan i antiinflamatorni učinak ovog peptida. Uočeno je da primjena BPC-a 157 (pentadekapeptid BPC 157) smanjuje sekreciju upalnih medijatora, što značajno smanjuje eksudaciju polimorfonukleara uz istovremeno pojačanu eksudaciju mononukleara u područje ozljede, čime je reducirana aktivnost kolagenaza, a povećana produkcija citokina u mononuklearnim fagocitima bitnih za kvalitetan proces cijeljenja (25 - 34).

Učinak BPC 157 je dobro opisan u cijeljenju različitih ozljeda i rana poput: duboke opekotine, kožne rane, rane u dijabetičara, pseudoartroze, presječene tetive, presječene mišiće, presječene živce, otkidanje tetiva od kostiju, oštećenja rožnice, peritonitis, ileoilealne anastomoze, kolokolične anastomoze, plućne lezije (35).

U svim je ovim terapijskim djelovanjima pentadekapeptid efikasan bez obzira je li primijenjen lokalno ili sistemski. Budući su navedena stanja podložna infekcijama te su infekcije dio patofizioloških procesa u ishodima s komplikacijama, pretpostavljen je i antimikrobni učinak

ovog peptida. Antibakterijsko djelovanje pentadekapeptida BPC 157 kao i njegova interakcija s konvencionalnim antibioticima nedovoljno je poznata i istražena. Ova spoznaja potiče na daljnja istraživanja učinkovitosti pentadekapeptida BPC 157 na antibakterijsku aktivnost, što bi moglo rezultirati novom mogućnosti primjene u terapeutske svrhe (35).

1.3. Antimikrobni peptidi

1.3.1. Rasprostranjenost antimikrobnih peptida

Antimikrobni peptidi (AMP) su široko rasprostranjeni u prirodi. Oni čine prvu liniju obrane protiv patogena domaćina i uključeni su u urođenu imunost. Ovisno o njihovoj raspodjeli u tkivima, osiguravaju ili sistemsku ili lokalnu zaštitu organizma od patogena okoliša (36, 37).

1.3.2. Struktura antimikrobnih peptida

Antimikrobni peptidi su oligopeptidi, imaju različit broj aminokiselina, taj je broj najčešće od pet pa do 50 aminokiselina (2, 3).

Ključna je uloga u aktivnosti antimikrobnih peptida amfipatičnost. Mehanizmi djelovanja na mikroorganizme ovisni su o različitim fizikalno-kemijskim svojstvima: dužini sekvence, naboju, hidrofobnosti, strukturi, koncentraciji peptida i sastavu membrane. Klasificiraju se na temelju sekundarne strukture i sastava (5, 38 - 40).

AMP ribosomalno sintetizirani, koji sadrže samo prirodne aminokiseline, dijele se na linearne, α-helične peptide (kao što su cecropini, magainini i mellitini), peptide obilježene obogaćivanjem u jednoj ili dvije aminokiseline (prolin-arginin bogat PR 39, indolidin) te peptide koji sadrže disulfidne veze (npr., Defensini, protegrini) (41 - 43).

Isto tako, postoje peptidi s jakom antimikrobnom aktivnošću koji su sintetizirani ekstra-ribosomalno ili sadrže značajne post-translacijske modifikacije poput lipopeptida (polimixin, dermaseptin) i lantibiotici , koji sadrže ne-nativne aminokiseline (41 - 44).

1.3.3. Mehanizam djelovanja antimikrobnih peptida

Istraživanja upućuju na mišljenje kako antimikrobni peptidi imaju mehanizam djelovanja u potpunosti različit od antibiotika korištenih u kliničkoj praksi, stoga postoji veliki interes za njihov razvoj što bi omogućilo liječenje infekcija uzrokovanih mikroorganizmima rezistentnim na antibiotike (39, 40, 45).

Selektivnost se antimikrobnih peptida za prokariotske stanice, najvjerojatnije temelji na prepoznavanju općih svojstava stanične membrane. Pojedini AMP ostvaruju određenu interakciju sa staničnom membranom bakterija i na taj način ometaju izgradnju unutarnje ili vanjske bakterijske membrane što rezultira smrću stanice. Za razliku od njih, drugi peptidi mogu proći kroz staničnu membranu i djeluju na neki cilj unutar stanice. Interakcija ovih peptida s biološkim membranama, osim o građi peptida, ovisi i o lipidima koje sadržava sama stanična membrana. Sukladno tome, razumijevanje peptidne interakcije membrana izuzetno je važan čimbenik za poboljšanje dizajna i razvoja AMP antibiotika (5, 38, 46 - 48).

Za peptide sa amfipatskom α -uzvojnicom postoji više modela koji objašnjavaju način na koji djeluju: model bačvaste pore u kojem amfipatska α -uzvojnica stvara okomite pore kroz membranu, ili se stvaraju toroidalne pore (49, 50).

Aktivnost je peptida humanog porijekla višestruka, većina može inhibirati rast bakterija i to kako Gram-pozitivnih, tako i Gram-negativnih. I sasvim male varijacije u strukturi peptida mogu utjecati na njihovu aktivnost (51, 52).

1.4. Antibiotici

Moderna je terapija antimikrobnim lijekovima započela otkrićem β-laktama 1928. godine kada je Alexander Fleming objavio svoje istraživanje o inhibiciji rasta *Staphylococcus aureus* na ploči agara kontaminiranoj plijesnima *Penicillium notatum*. Iz kulture ove plijesni 1940. godine Chain i Florey proizveli su prvu veću količinu penicilina, a penicilin G je ušao u kliničku uporabu desetak godina kasnije kada je smatran „magičnim lijekom“ (53 - 55).

Glavno je obilježje antibakterijskih lijekova selektivna toksičnost što podrazumijeva toksičnost za bakterije, a netoksičnost, odnosno prihvatljivu toksičnost za ljudski organizam. Mogu biti

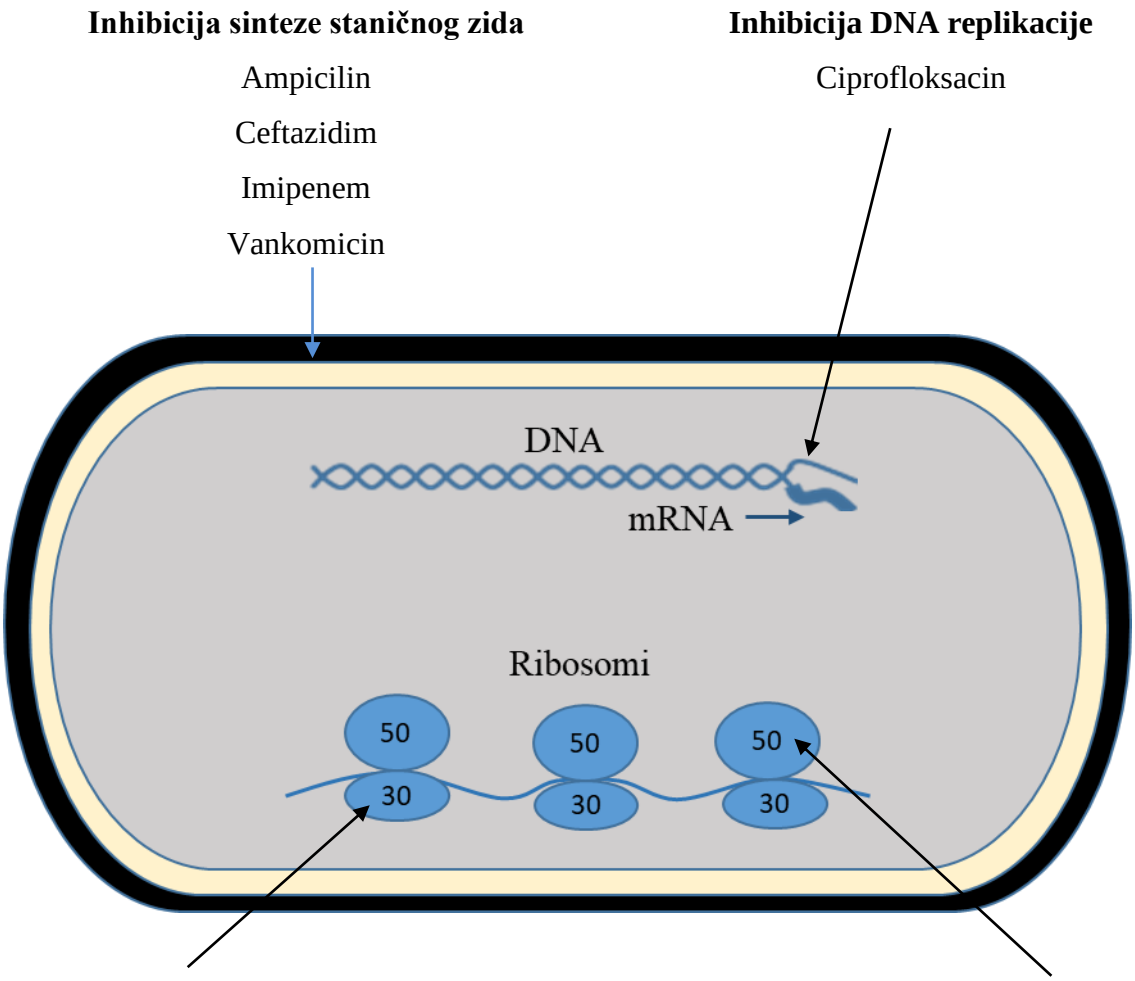
prirodni proizvodi nekih bakterija i gljiva, a isto tako mogu biti sintetički (kemoterapeutici). Prirodni antibiotici koji se dorađuju i/ili modificiraju u laboratoriju ili proizvodnom pogonu, nazivaju se „antibakterijski kemoterapeutici“. Prema mehanizmu djelovanja na bakterijsku stanicu, dijele se u nekoliko skupina (5).

Betalaktamski antibiotici imaju u svojoj strukturi β-laktamski prsten, na kojemu se temelji njihovo djelovanje. Oni ometaju sintezu peptidoglikana, a on je najvažniji sastavni dio stijenke bakterijske stanice, daje joj čvrstoću i otpornost na mehanička i osmotska oštećenja i tako ju štiti od nepovoljnih utjecaja iz okoliša. β-laktamski prsten u antibiotiku po strukturi je analogan alanil-alaninu, sastojku N acetilmuraminske kiseline, koja stvara poprečne veze između peptidnih lanaca i peptidoglikanskog sloja. Na taj način koče transpeptidaciju, odnosno, sintezu stanične stijenke blokirajući završno ukršteno povezivanje linearnih glikopeptida u složeni peptidoglikan (1, 5, 56).

Poremećena sinteza stijenke onemogućava bakteriji da održava osmotski gradijent između stanice i njene okolice, pa stanica bubri i puca. Budući da u stanicama sisavaca ne postoji peptidoglikan, koji je osnova selektivne toksičnosti β-laktama, ovi antibiotici uništavaju bakterije, a pri tome ne djeluju na ljudske stanice (1).

U humanoj se i veterinarskoj medicini u liječenju bakterijskih infekcija često koriste β - laktamski antimikrobni lijekovi zbog snažnog antimikrobnog djelovanja i vrlo niske toksičnosti (57).

Fizikalno kemijska svojstva β-laktama mogu se mijenjati supstitucijom vodika u karboksilnoj skupini penicilina, odnosno modifikacijom bočnog lanca cefalosporina. Proizvodnjom polusintetskih β-laktama postignuta su poboljšanja prirodnih inicijalnih molekula penicilina G i cefalosporina C te povećana otpornost na djelovanje β-laktamaze i proširenje spektra djelovanja. Tako je modifikacijom bočnog lanca cefamicina C dobiven cefoksitin koji, zahvaljujući izrazitoj otpornosti na djelovanje β-laktamaza, pokazuje najširi spektar aktivnosti od svih cefalosporina. Penicilini su važni za antibakterijsku kemoterapiju, i često se koriste u kombinaciji s drugim antimikrobnim lijekovima (58).



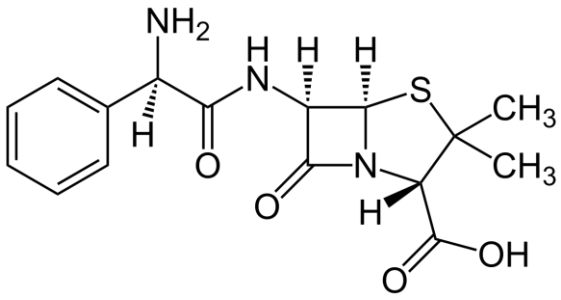
Slika 2. Ciljna mjesta djelovanja testiranih konvencionalnih antibiotika u bakterijskoj stanici (po uzoru na Bedenić, 2009.) (1).

1.4.1. Ampicilin

Ampicilin je uz amoksicilin glavni predstavnik skupine aminopenicilina. Njihova je djelotvornost naročito izražena protiv enterokoka i *Haemophilus influenzae* (1).

Ampicilin spada u penicilinsku skupinu beta-laktamskih antibiotika. Razlikuje se od penicilina G, ili benzilpenicilina, samo po amino skupini. Ta amino skupina, prisutna na ampicilinu i amoksicilinu, pomaže im prodrijeti kroz pore vanjske membrane Gram-negativnih bakterija (56).

Ampicilin djeluje kao ireverzibilan inhibitor enzima transpeptidaze, koji je potreban bakterijama za izgradnju staničnog zida. On inhibira treću i posljednju fazu sinteze bakterijskih staničnih stijenki u binarnoj fiziji, što u konačnici dovodi do stanične lize; stoga, ampicilin obično djeluje bakteriolitički (57).



Slika 3. Strukturna formula ampicilina (preuzeto iz wikipedia)

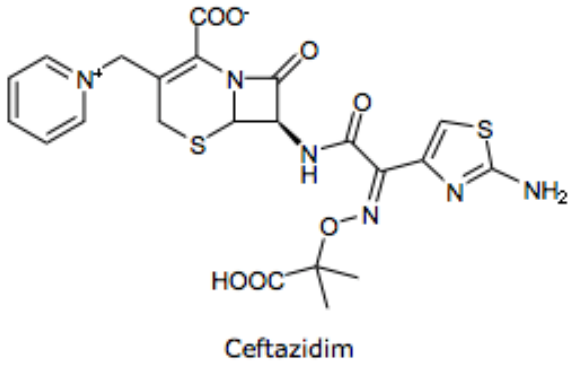
1.4.2. Ceftazidim

Ceftazidim pripada trećoj generaciji cefalosporina, koja za razliku od druge ima prošireni spektar na Gram-negativne bakterijske sojeve (1).

Cefalosporini su često korišteni za liječenje i profilaksu bakterijskih infekcija, uglavnom zbog širokog spektra djelovanja i niskog rizika od toksičnosti. Međutim, od njihovog se uvođenja, javlja rezistencija na β-laktamske antibiotike, odnosno, javlja se sve češća pojava

multiresistentnih bakterijskih sojeva. Iz toga su razloga, kliničari napustili rutinsku primjenu cefalosporina treće generacije (59, 60).

Cefalosporini se obično primjenjuju kao zamjena za peniciline u liječenju infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama te u profilaksi pri kirurškim zahvatima (57).



Ceftazidim

Slika 4. Strukturna formula ceftazidima (preuzeto iz wikipedia)

1.4.3. Imipenem

Imipenem pripada skupini karbapenema koja je među β-laktamskim antibioticima sa najširim spektrom djelovanja, efikasni su i protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (61).

Karbapenemi imaju penicilinu-sličan peteročlani prsten, ali je sumpor na C-1 poziciji u peteročlanom prstenu zamijenjen s ugljikovim atomom i uvedena je dvostruka veza između C-2 i C-3 . Različiti se karbapenemi razlikuju dominantno u konfiguraciji bočnih lanaca na C-2 i C-6 poziciji (62, 63).

Ovakva struktura omogućava izuzetnu stabilnost u odnosu na većinu β-laktamaza uključujući Amp C enzime i β-laktamaze proširenog spektra. Karbapenemi ulaze u Gram-negativne bakterije kroz porine, proteine vanjske membrane. Nakon ulaska u periplazmatski prostor karbapenemi se vežu za penicilin-vezujuće proteine, enzime koji kataliziraju sintezu peptidoglikana, centralne strukture bakterijskog staničnog zida. Krucijalno je za učinkovitost karbapenema što se mogu vezati za više različitih penicilin-vezujućih proteina. Slabljenje peptidoglikana i prskanje bakterijskog zida uslijed osmotskog pritiska posljedica je njihovog djelovanja (64).

Karbapenemi se vežu za PBP 1 i PBP 2 molekule Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija i uzrokuju elongaciju i lizu stanica. Stabilni su prema većini plazmidnih i kromosomskih β-laktamaza, otporni su na hidrolizu β-laktamaza proširenog spektra, ali su osjetljivi na karbapenemaze. *In vitro* djelotvornost je vrlo izražena zbog dobre penetracije kroz vanjsku membranu Gram-negativnih bakterija i visokog afiniteta za PBP-molekule. Imipenem ima dobru djelotvornost protiv mnogih Gram-negativnih štapićastih bakterija, uključujući i *Pseudomonas aeruginosa*, ali isto tako i protiv Gram pozitivnih te anaerobnih bakterija (1, 65).

S obzirom na široki spektar djelovanja i stabilnost u odnosu na mnoge determinante rezistencije, karbapenemi predstavljaju rezervne antibiotike, antibiotike druge linije, koji su predviđeni za liječenje teških bakterijskih infekcija. Pokazuju znatno manje neželjenih djelovanja u odnosu na druge rezervne antibiotike (61).

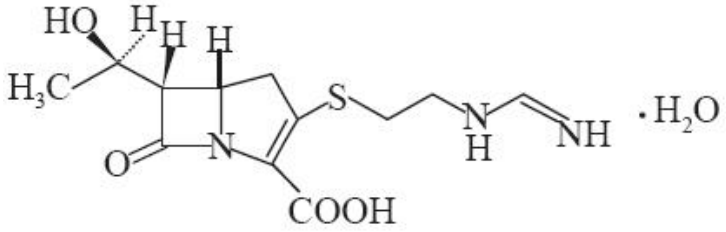
Mehanizmi su rezistencije na karbapeneme identični sa mehanizmima rezistencije na β-laktamske antibiotike, a to su:

- Produkcija β- laktamaza, dominantno karbapenemaza.
- Smanjenje produkcije ili izmjena proteina vanjske membrane kada se ovaj mehanizam kombinira sa drugim mehanizmima rezistencije poput produkcije β-laktamaza, najčešće se javljaju rezistentni fenotipovi.
- Efluks pumpe koje mogu eksportirati β-laktame iz stanice kroz vanjsku membranu, isto tako dovode do snižavanja koncentracije antibiotika u periplazmi.
- Produkciju penicilin-vezujućih proteina niskog afiniteta koji kataliziraju reakciju transpeptidacije, što predstavlja značajan mehanizam rezistencije nekih Gram-pozitivnih bakterija. Izmjena penicilin-vezujućih proteina ima mali značaj u nastanku rezistencije na β-laktame kod Gram-negativnih bakterija kao što su enterobakterije (63, 65).

Rezistencija na karbapeneme kod enterobakterija može nastati i kao posljedica smanjenog preuzimanja lijeka zbog gubitka ili izmjene porina zajedno sa prekomjernom ekspresijom Amp C cefalosporinaza ili β-laktamaza proširenog spektra (63).

Imipenem je prvi karbapenem uveden u kliničku praksu 1985. godine kao N-formimidoil derivat tienamicina. Zbog osjetljivosti na deaktivaciju bubrežnom dehidropeptidazom imipenemu je bilo neophodno dodati inhibitor cilastatin. Nakon otkrića imipenema došlo je do

otkrića drugih, stabilnijih karbapenema širega spektra djelovanja (meropenem, biapenem, ertapenem i doripenem) (66).



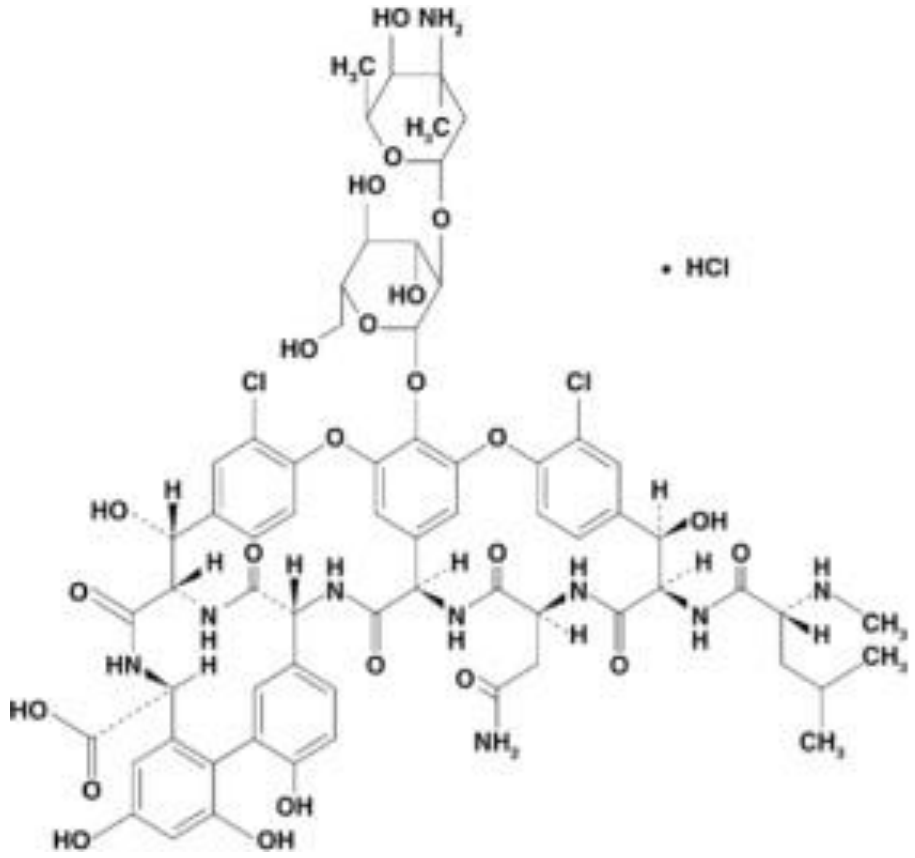
Slika 5. Strukturna formula imipenema (preuzeto iz wikipedia)

1.4.4. Vankomicin

Vankomicin je antibiotik koji proizvode *Streptococcus orientalis* i *Amycolatopsis orientalis*. Pripada skupini glikopeptida koji su u kliničkoj uporabi od 60-ih godina prošlog stoljeća. To je skupina antibiotika velike molekule. Zbog veličine, molekule ne mogu prolaziti kroz staničnu stijenku Gram-negativnih bakterija. Iz toga je razloga njihov spektar vrlo uzak i djeluju samo na Gram-pozitivne bakterije. Djeluju tako što sprječavaju stvaranje stanične stijenke na razini pentapeptida u citoplazmi: vežu se na završetak pentapeptida, na D-alanin-D-alanin te tako spriječavaju njegovu ugradnju u peptidoglikanski lanac (5).

Djelotvoran je samo na Gram-pozitivne bakterije, naročito na stafilokoke uz iznimku flavobakterija. Njegov je učinak baktericidan. Stafilokoke relativno sporo ubija i to samo ako su u fazi dijeljenja. *In vitro* s gentamicinom i streptomicinom djeluje sinergistički protiv *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* sojeva koji ne pokazuju visoku rezistenciju na aminoglikozide (67).

Vankomicin inhibira sintezu stanične stijenke tako što se čvrsto veže na D-alanil-D-alanin završetak peptidoglikanskog pentapeptida. Na taj način inhibira transglikozilazu, odnosno spriječava elongaciju peptidoglikana i njihovo ukrižavanje. Ovom je reakcijom oslabljen peptidoglikan što ima za posljedicu lizu stanice. Isto je tako oštećena stanična membrana, što pojačava antibakterijski učinak (67, 68).



Slika 6. Strukturna formula vankomicina (preuzeto iz wikipedia)

1.4.5. Gentamicin

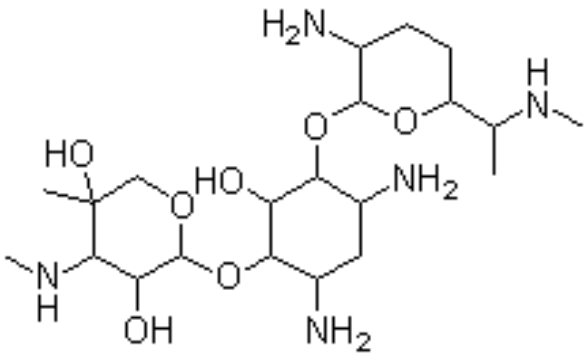
Gentamicin je aminoglikozid širokog spektra. Ima veoma slično djelovanje tobramicinu, s razlikom što gentamicin ima bolje djelovanje na *Serratia* spp, a tobramicin je učinkovitiji na *Pseudomonas aeruginosa*. Osjetljiv je na modificirajuće enzime koji su proizvod rezistentnih bakterija (6-acetiltransferaza, 4-adeniltransferaza) (1).

Prvi je aminoglikozid, streptomicin, otkriven 1943. godine. Aminoglikozidni su antibiotici dobiveni iz različitih vrsta Gram-pozitivnih bakterija roda *Streptomyces spp*., *Micromonospora spp*. i *Bacillus spp*.. U glavnom djeluju na Gram negativne aerobne bakterije. U skupinu antibiotika aminoglikozida također pripadaju gentamicin, kanamicin, neomicin, tobramicin i amikacin (69).

Aminoglikozidi se sastoje od aminociklitolskog prstena za koji su vezani amino-šećeri. Oni su bazični, izrazito polarni polikationski oligosaharidi koji se u bakterijskoj stanici vežu za 30S

podjedinicu ribosoma. Svi aminoglikozidi koče sintezu proteina u bakterija putem različitih mehanizama i remete translokaciju aminokiselina djelujući baktericidno, a istodobno oštećuju citoplazminu membranu. Za bazična svojstva aminoglikozida odgovorne su amino-skupine, dok su hidroksilne skupine na šećerima zaslužne za dobru topljivost u vodi, a slabu u mastima (teško prolaze kroz lipoproteinske membrane – aktivni transport) (56).

Inhibicija sinteze proteina je primarni mehanizam djelovanja aminoglikozida. Oni onemogućuju pravilno kodiranje mRNA(antikodon prepoznaje i veže krivi kodon), dolazi do ugradnje pogrešnih aminokiselina u rastući polipeptidni lanac i posljedične sinteze nefunkcionalnih ili toksičnih proteina. Drugi mehanizam nastaje kada ribosom za koji se vezao aminoglikozid ne može obavljati translaciju mRNA tijekom sinteze proteina, što dovodi do uginuća bakterijske stanice. Na žalost, brz je početak nastanka bakterijske rezistencije doveo do stalnog pada njihove kliničke uporabe. Sve je veći broj višestruko otpornih sojeva potaknuo zanimanje za istraživanje novih spojeva kako bi se onemogućila rezistencija(1, 69, 70).



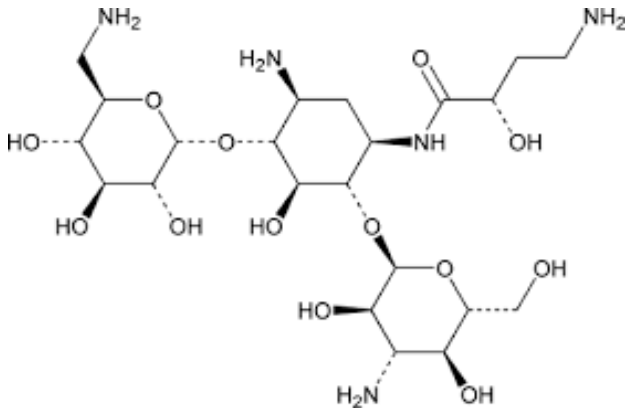
Slika 7. Strukturna formula gentamicina (preuzeto iz wikipedia)

1.4.6. Amikacin

Amikacin je polusintetički derivat kanamicina Upotrebljava se za liječenje infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama koje su rezistentne na ostale aminoglikozide (3, 4, 12).

Farmakokinetika amikacina je slična farmakokinetici prirodnog gentamicina i tobramicina. Koristi se sam ili u kombinaciji s drugim antibioticima za liječenje raznih ozbiljnih infekcija uzrokovanih aerobnim Gram-negativnim bakterijama, kao i mikobakterijama i nokardijama. Važan je u liječenju infekcija nastalih kod novorođenčadi. Amikacin pokazuje toksične učinke

koji su zajednički aminoglikozidima, a to su ototoksičnost i nefrotoksičnost. Na žalost, porast rezistencije na amikacin ograničava učinkovitost liječenja infekcija u novorođenčadi (71).



Slika 8. Strukturna formula amikacina (preuzeto iz wikipedia)

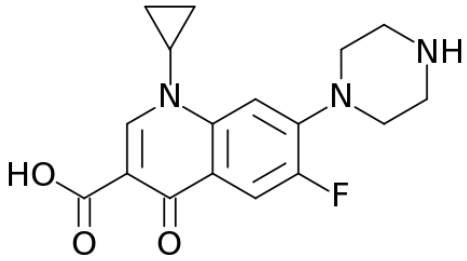
1.4.7. Ciprofloksacin

Ciprofloksacin pripada skupini kinolona. Kinoloni su velika skupina potpuno sintetičkih antibiotika koji djeluju na sintezu nukleinskih kiselina i na bakterijsku girazu te tako ne dopuštaju stvaranje potpune bakterijske DNA, što rezultira smrću bakterijske stanice. Njihovo je djelovanje brzo baktericidno (2).

Imaju snažno antibakterijsko djelovanje protiv enterobakterija, *P. aeruginosa, Acinetobacter* spp., *H. influenzae* i gram-negativnih koka, kao što su *N. gonorrhoeae, N. meningitidis i Moraxella catarrhalis*. Isto tako imaju izraženu aktivnost prema stafilokokima, uključujući i MRSA, ali je njihovo djelovanje slabije prema streptokokima i enterokokima. Nisu djelotvorni protiv anaerobnih bakterija, kao što su *B. fragilis* i *C. difficile*. Enteropatogeni Gram-negativni bacili su osjetljivi prema kinolonima (2).

Ciprofloksacin je najaktivniji od svih kinolona prema *P. aeruginosa,* dok su *B. cepacia i S. maltophilia* rezistentni na kinolone. Djeluju snažno baktericidno na izolate *Chlamydia trachomatis* i *Mycoplasma hominis,* a slabije na *Ureaplasma urealyticum.* Ciprofloksacin inhibira izolate *Rickettsia conori, Rickettsia rickettsii* i *Coxiella burneti*, a utvrđeno je da djeluju i na *Plasmodium falciparum* (2).

Kombinacija ovih antibiotika s β-laktamima ili aminoglikozidima ima aditivno ili sinergističko djelovanje. Baktericidni se učinak kinolona poništava u prisustvu rifampicina ili kloramfenikola (2).

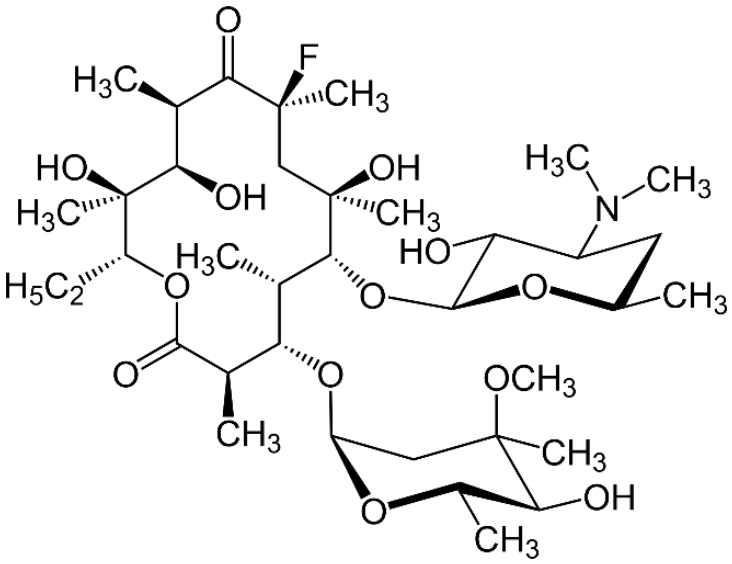


Slika 9. Strukturna formula ciprofloksacina (preuzeto iz wikipedia)

1.4.8. Eritromicin

Eritromicin je prototip makrolidne skupine lijekova. Makrolidi su velike molekule, karakterizira ih makrociklički laktonski prsten koji najčešće sadrži 14 do 16 ugljikovih atoma na koje su vezani deoksi šećeri (3, 15, 19).

Makrolidi su bakteriostatski antibiotici, koji se pričvrste na receptor (23S rRNA) na podskupini 50S bakterijskog ribosoma i sprječavaju kontakt tRNK na koju je vezana aminokiselina s mRNK, te na taj način ometaju sintezu bjelančevina.Oni inhibiraju sintezu proteina ometajući reakcije translokacije i formiranje inicijacijskih kompleksa (3, 4).



Slika 10. Strukturna formula eritromicina (preuzeto iz wikipedia)

Eritromicin je dobiven 1952.g. iz *Streptomyces erythreus*. Sastoji se od dvaju šećera vezanih na laktonski prsten s 14 ugljikovih atoma. Slabo je topljiv u vodi, ali se dobro otapa u organskim otapalima. Eritromicin ima antibakterijsku aktivnost koja može biti inhibicijska ili baktericidna, naročito pri višim koncentracijama. Alkalni pH pojačava aktivnost. Inhibicija sinteze proteina događa se vezanjem na 50 S podjedinicu ribosomske RNA, što blokira translokaciju aminoacila i formiranje početnog kompleksa (15).

1.5. Bakterijske vrste

1.5.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pripada rodu *Staphylococcus, porodici Staphylococcacceae* . To je Gram-pozitivan kok u nepravilnim nakupinama, poput grozdova. Nema sporu niti kapsulu i nepokretan je. Fakultativni je anaerob (72).

S. aureus je veoma rasprostranjen u prirodi i najvažniji je ljudski oportunistički patogen u okviru roda *Staphylococcus* (73). On predstavlja jednog od najzastupnijih mikroorganizama u čovjeka, koji ga može kolonizirati (kliconoštvo), ali isto tako, u određenim uvjetima, može izazvati vrlo teške infekcije (74).

S. aureus može adherirati na razne površine; medicinska sredstva i aparate. Zbog sposobnosti formiranja biofilma, predstavljaju veoma značajne uzročnike infekcija u bolnicama, koje se dovode u vezu sa uporabom medicinskih aparata i instrumenata.Formiranjem biofilma postaju slabije osetljivi na antibiotike i dezinficijense (75, 76).

Stanični zid stafilokoka sačinjen je pretežno od peptidoglikana koji se sastoji od β1,4 N-acetilglukozamin i N-acetilmuraminske kiseline koji su naizmjenično vezani. Lanci su acetiliranih glikana poprečno povezani tetrapeptidnim lancima kao i pentaglicinskim mostom koji je specifičan za *S. aureus* (77).

Meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) zauzima značajno mjesto u modernoj mikrobiologiji i postupcima kontrole infekcija (3). Broj infekcija, koje uzrokuje MRSA iznosi

171 200 godišnje, u zemljama Europske unije, Islandu i Norveškoj. Taj broj predstavlja 44% svih infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi u već spomenutim zemljama (78).

MRSA kolonizacije i infekcije nedavno su prenešene i na druge ekološke sustave, tako da danas postoje MRSA izolati u izvanbolničkoj populaciji (CA MRSA) te u uzorcima domaćih životinja (LA MRSA) (74).

1.5.2. *Enterococcus faecalis*

Enterokoki su Gram-pozitivne, katalaze-negativne bakterije. Ne stvaraju spore i fakultativni su anaerobi. Nastanjuju gastrointestinalni trakt, usnu šupljinu i vaginu ljudi i životinja (79,80). Iako se ranije smatralo da su enterokoki ne-virulentni, danas je poznato da su česti uzročnici nozokomijalnih infekcija (81).

U bolničkom okolišu mogu preživjeti i pri tome mogu kolonizirati pacijente.Česti su uzročnici infekcija mokraćnog sustava, endokarditisa, hepatobilijarne sepse, infekcija kirurških rana, bakteremija i neonatalne sepse. Crijevna je kolonizacija enterokokom značajan čimbenik rizika za enterokoknu bakteremiju, koja je povezana s povećanom smrtnošću, osobito kod imunokompromitiranih pacijenata (82 - 85).

Prisutan je sve veći broj enterokoka koji produciraju β-laktamazu, a isto tako je prisutna rezistencija na vankomicin. Promjene u prekursorima peptidoglikana i zadebljanja stanične stijenke, imaju za posljedicu rezistenciju na vankomicin. Infekcije izazvane vankomicin rezistentnim enterokokom (VRE) najčešće se javljaju u bolnicama, lako se prenose i sukladno tome, izazivaju epidemijske infekcije. U Republici Hrvatskoj u 2011. godini na vankomicin je bilo rezistentno 1% *E.faecalis* (86 - 88).

1.5.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli je Gram-negativan bacil koji pripada porodici *Enterobacteriaceae* i predstavlja najzastupljeniju fakultativno anaerobnu vrstu u gastrointestinalnom traktu čovjeka i nekih

životinja. Kao komesal crijevnog trakta živi u uzajamno korisnoj zajednici sa domaćinom i kao takva rijetko uzrokuje oboljenja. Pored komensalnih *Escherichia coli,* postoje sojevi koji su enterovirulentni i uzrokuju različite vrste dijarealnih sindroma. Neki sojevi *Escherichia coli* uzrokuju ekstraintestinalna oboljenja kod osoba kod kojih su prvobitno asimptomatski kolonizirali crijevni trakt. Takvi sojevi *Escherichia coli* su filogenetski i epidemiološki udaljeni u odnosu na komensalne i patogene sojeve. Na osnovu genetskih i kliničkih kriterija, sojeve *Escherichia coli* dijelimo na komensalne, enterovirulentne i ekstraintestinalne patogene *Escherichia coli* (89).

Ekstraintestinalne patogene *Escherichia coli* su značajan uzročnik bolničkih i vanbolničkih infekcija i mogu izazvati oboljenja različitih organa. Najčešće uzrokuju infekcije urinarnog trakta, izazivajući 85-95% nekompliciranih cistitisa i pijelonefritisa kod žena prije menopauze. *Escherichia coli je* čest uzročnik abdominalnih i pelvičnih infekcija, kao jedini uzročnik ili u okviru miješanih infekcija. Javlja se kao uzročnik infekcija operativnog polja, neonatalnog meningitisa i septikemije, a može uzrokovati i pneumoniju (90).

Virulentni potencijal ekstraintestinalne *Escherichia coli* zavisi od prisustva specijaliziranih čimbenika virulencije kao što su fimbrije, adhezini, toksini, siderofore, kapsula, hemolizini i invazini. Navedeni čimbenici virulencije omogućavaju bakteriji izbjegavanje mehanizama obrane domaćina, kolonizaciju značajnih anatomskih područja i poticanje inflamatornog odgovora, što sve zajedno doprinosi razvoju bolesti (91).

Escherichia coli je jedna od najprilagodljivijih bakterijskih vrsta a njezina je adaptabilnost posljedica visoke plastičnosti genoma, stjecanja ili gubitka gena preko horizontalnog genskog prijenosa (89).

Utjecaj *Escherichia coli* na mortalitet i morbiditet kod ljudi je sve veći uslijed rastuće rezistencije *Escherichia coli* na antimikrobne lijekove. Ista je prisutna diljem svijeta, sa prisutnim razlikama u odnosu na geografsko područje (89, 92).

Jedan od dominantnih čimbenika rizika za širenje rezistentnih sojeva *Escherichia coli* i gena rezistencije jeste selektivni pritisak koji nastaje kao posljedica prekomjerne uporabe antibakterijskih lijekova u humanoj medicini, veterini i poljoprivredi (93).

Do 90-tih godina prošlog stoljeća, sojevi *Escherichia coli* pokazivali su visoku razinu rezistencije prema penicilinu i trimetoprimu, a nisku u odnosu na treću generaciju cefalosporina i nitrofurantoin. Od kraja 90-tih godina sve je prisutnija rastuća rezistencija na fluorokinolone i produkcija β-laktamaza proširenog spektra multirezistentnih sojeva koja se javlja ne samo među bolničkim nego i vanbolničkim izolatima (94).

Multirezistentni sojevi nisu prisutni samo u bolničkom okruženju već se javljaju i kod zdrave populacije (95, 96).

Pojava sojeva sa produkcijom β-laktamaza proširenog spektra značajno je smanjila terapijske mogućnosti. Rezistencija na skoro sve cefalosporine u prvi plan stavlja karbapeneme, lijekove posljednje linije obrane. Novi problem predstavljaju sojevi *Escherichia coli* rezistentnih na karbapeneme koji se za sada javljaju uglavnom među bolničkim pacijentima (97, 98).

1.5.4. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae je Gram-negativan bacil koji pripada porodici *Enterobacteriaceae*. Spada u oportunističke patogene, prisutna je u crijevnom traktu, ustima i na koži ljudi, kao i na medicinskim uređajima i u bolničkoj sredini (99).

Oportunistički sojevi *Klebsiella pneumoniae* najčešće izazivaju oboljenja kod imunokompromitiranih osoba. Nekada je bila značajan uzročnik teške vanbolničke pneumonije, a danas je čest uzročnik infekcija urotrakta, bilijarnog trakta, osteomijelitisa i septikemije (100).

Postoji najmanje 78 kapsularnih serotipova *Klebsiella pneumoniae* od kojih naročito K1 i K2 pokazuju hipermukoidi (hiperviruletni) fenotip uslijed povećane produkcije kapsularnog polisaharida. Kapsularni se polisaharid smatra najznačajnijim čimbenikom virulencije. Hipervirulentni sojevi *Klebsiella pneumoniae* veoma su invazivni i mogu uzrokovati teška oboljenja kod prethodno zdravih osoba poput piogenog apscesa jetre, meningitisa, nekrotizirajućeg fascitisa, endoftalmitisa i teške pneumonije (101).

Epidemiologija infekcija izazvanih *Klebsiella pneumoniae*, promijenjena je uslijed primjene antimikrobne terapije, te su danas najčešće bolničke infekcije. Neposredno prije pojave

bolničkih infekcija dolazi do kolonizacije gastrointestinalnog trakta, ali i urinarnog trakta i respiratornog trakta pacijenta. Isto tako, *Klebsiella pneumoniae* može stvarati biofilm na medicinskim sredstvima kao što su endotrahealni tubusi ili kateteri što omogućava nastanak infekcije (102, 103).

Bolničke su infekcije uzrokovane sojevima *Klebsiella pneumoniae* često kronične zbog dva glavna razloga:biofilm koji *Klebsiella spp.* stvara, štiti bakteriju od imunološkog sustava domaćina i od djelovanja antibiotika, a i bolnički izolati često pokazuju multirezistentni fenotip (104, 105).

Klebsiella pneumoniae je svrstana u takozvanu "ESKAPE" grupu patogena (zajedno sa *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Acinetobacter baumannii , Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter spp*. koji zajedno predstavljaju najčešće uzročnike bolničkih infekcija jer "izbjegavaju" (eng. escape) antibakterijske lijekove zbog razvoja rezistencije na antimikrobne agense (106).

Sojevi *Klebsiella pneumoniae* često poseduju plazmide različite veličine koji nose gene rezistencije što doprinosi rastućoj rezistenciji na veliki broj antimikrobnih agenasa kao što su penicilini, cefalosporini, karbapenemi, aminoglikozidi i fluorokinoloni (107).

Međunarodno širenje *Klebsiella pneumoniae* koje produciraju karbapenemaze predstavlja jedno od najurgentnijih javnozdravstvenih pitanja (108).

1.5.5. *Acinetobacter baumanii*

Acinetobacter baumanii pripada rodu *Acinetobacter i* najčešće je izolirana vrsta. To su aerobni, Gram-negativni, nepokretni i nefermentativni kokobacili. Slobodnoživući su saprofiti, prisutni u tlu i vodi. Česti su uzročnici infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi, a značajno je da se radi o najrezistentnijoj vrsti među pripadnicima roda. Zbog slabe penetracije kroz membranu i velikog broja efluks pumpi, prirodno je rezistentan na mnoge antibiotike (109 - 111).

Ne producira difuzibilne toksine i citolizine, posjeduje polisaharidnu kapsulu, fimbrije i pile pomoću kojih adherira na ljudske epitelne stanice. Zbog stvaranja biofilma, uspješno izmiče obrambenim imunosnim mehanizmima. Za aktivaciju željeza i acinetobaktina koristi

siderofore. Lipopolisaharid sudjeluje u poticanju proinflamatornih citokina , sukladno tome, smatra se da sudjeluju u patogenezi infekcija (109).

Acinetobacter baumanii je uzročnik velikog broja infekcija, na različitim anatomskim mjestima i sa različitim intenzitetima-od asimptomatskih infekcija do fulminantnih sepsi. Osobito je važan patogen u jedinicama intenzivnog liječenja i sve je češći uzročnik pneumonija povezanih sa strojnom ventilacijom. Uzročnik je i infekcija krvne struje povezane s intravaskularnim kateterima (109).

Liječenje je infekcija uzrokovanih *A. baumanii* zahtijevno jer su ovi mikroorganizmi često rezistentni na većinu antibiotika iz prve linije (110).

Poseban problem predstavlja pojava multirezistentnih sojeva čija je značajka rezistencija u više od dvije skupine antibiotika, a naročito izražen terapijski problem predstavlja rezistencija na karbapeneme. U Republici Hrvatskoj je u 2011. godini bilo 64% rezistentnih sojeva *A. baumanii* na karbapeneme (109).

1.5.6. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je medicinski najznačajnija vrsta unutar roda *Pseudomonas. Bakterije* roda *Pseudomonas* su aerobni, asporogeni, Gram-negativni štapići. Posjeduju enzim katalazu i citokrom-oksidazu, pokretne su. Široko su rasprostranjene u prirodi, a imaju predilekciju prema vlažnom okolišu. To su ubikvitarne bakterije koje se mogu prilagoditi na različite životne uvjete, sukladno tome, mogu se naći u različitim okruženjima. Optimalna je temperatura rasta između 30 i 37^0C. Pigment koji stvaraju može biti pioverdin, piocijanin, piorubin i piomelanin (112) .

Pseudomonas aeruginosa uzrokuje oportunističke infekcije kod bolesnika s oštećenim imunitetom i mogu biti zahvaćeni svi organski sustavi. Jedan je od najčešćih uzročnika hospitalnih infekcija. Mogu uzrokovati bakterijemiju i sepsu, infekcije dišnog sustava, infekcije središnjeg živčanog sustava, infektivni endokarditis, infekcije mokraćnog sustava, uha, oka, kože i mekih tkiva (113, 114).

Pseudomonas aeruginosa je po svojoj prirodi vrlo rezistentna bakterija na antimikrobne kemoterapeutike te posjeduje različite mehanizme za stjecanje otpornosti na antibiotike.

Sukladno tome, postoji mogućnost nastanka izrazito rezistentnih sojeva, gotovo na sve klase antibiotika, naročito u bolničkom okruženju (111, 112).

2. HIPOTEZA

Stabilni peptidi koji opstaju u nepovoljnim gastrointestinalnim uvjetima, morali bi pripadati posebnoj fiziološkoj kategoriji od koje očekujemo zaštitna, antiupalna, antimikrobna i u cijeljenju promovirajuća, citoprotektivna svojstva. Na temelju dosadašnjih spoznaja o učincima pentadekapeptida BPC 157 na rane, postavljena je radna hipoteza:

1. da će pentadekapeptid u eksperimentima *in vitro* imati antibakterijsko djelovanje,
2. da će u kombinaciji s antibioticima imati sinergističko ili aditivno djelovanje.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na temelju radne hipoteze postavili smo ciljeve istraživanja:

1. ispitati antimikrobnu aktivnost pentadekapeptida BPC 157 na ATCC sojeve *in vitro,*
2. ispitati antimikrobnu aktivnost pentadekapeptida BPC 157 na izoliranim bakterijskim vrstama iz kliničkih uzoraka,
3. ispitati sinergističko djelovanje pentadekapeptida BPC 157 sa konvencionalnim antibioticima na ATCC sojeve *in vitro,*
4. ispitati sinergističko djelovanje pentadekapeptida BPC 157 sa konvencionalnim antibioticima na izolirane bakterijske sojeve iz kliničkih uzoraka *in vitro*.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Bakterijski sojevi

U ispitivanju su korišteni sojevi iz zbirke Katedre za mikrobiologiju i parazitologiju, Medicinskog fakulteta Osijek koji su skupljani tijekom razdoblja od 10 godina. Sojevi su izolirani iz uzoraka bolesnika iz Primarne zdravstvene zaštite te hospitaliziranih u Kliničkoj bolnici Osijek, i Općoj bolnici Slavonski Brod, kao dio redovitog rutinskog rada mikrobiološkog laboratorija. Nakon biokemijske identifikacije, sojevi su pohranjeni na Microbank TM kuglicama, PRO-LAB DIAGNOSTICS, na temperaturi od -80^{0}C.

Ispitivani su sojevi *Staphylococcus aureus* (n=20) , *Enterococcus faecalis* (n=20), *Pseudomonas aeurigonsa* (n=20), *Escherichia coli* (n=20), *Acinetobacter baumannii* (n=20), *Klebsiella pneumoniae* (n=20), te ATCC (American Type Culture Collection) sojevi: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 , *Pseudomonas aeurigonsa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Klebsiella pneumoniae* 700803, koji su korišteni kao kontrolni sojevi.

Bakterijski su sojevi, po potrebi, odmrzavani i presađivani na krvni agar te inkubirani 18-24 sata na 37^{0}C. Od poraslih kolonija, priređivane su suspenzije bakterijskog soja u fiziološkoj otopini.

4.2. BPC 157 i antibiotici

U istraživanju je korišten pentadekapeptid BPC 157 99%-tne čistoće (Diagen d.o.o., Ljubljana, Slovenija), otopljen u fiziološkoj otopini i primijenjen u koncentracijama od 512 μg/ml, sukladno protokolu CLCI standarda (115).

Antibiotici testirani metodom bujonske mikrodilucije glavni su predstavnici skupina beta-laktamskih, glikopeptidnih, aminoglikozidnih i kinolonskih antibiotika; ampicilin, eritromicin, gentamicin, vankomicin, amikacin, ceftazidim, ciprofloksacin i imipenem (1).

Odvagani su, otopljeni i diluirani prema važećim standardima CLSI-a do stok solucije 5120 μg/ml , nakon toga su razrjeđivani u Mueller-Hinton (MH) bujonu (Becton Dickinson and Co., Cockeysville MD, USA) te primjenjeni u koncentraciji od 512 μg/ml (115).

U određivanju osjetljivosti bakterijskih sojeva na konvencionalne antibiotike uz dodatak BPC-a metodom kombiniranog disk-difuzijskog testa, korišteni su diskovi ampicilina (10 μg) , eritromicina (15 μg), gentamicina (10 μg) , vankomicina (30 μg), amikacina (30 μg), ceftazidima (30 μg), ciprofloksacina (5 μg), imipenema (10μg), (Becton Dickinson and Co., Cockeysville MD, USA).

4.3. Određivanje osjetljivosti izoliranih sojeva iz kliničkih materijala i ATCC sojeva na pentadekapeptid BPC 157 mikrodilucijskom metodom u bujonu

Postupak je testiranja mikrodilucijskom metodom u cijelosti izveden prema preporukama CLSI standarda (115). Stock solucija pentadekapeptida BPC 157 priređena je sa 0,85% NaCl , a konvencionalnih antibiotika u otapalima, sukladno preporukama CLSI standarda i to u koncentraciji od 5120 μg/ml (36). Stock solucija je priređena prema formuli;

Volumen (ml) = Masa (mg) * Potentnost (μg/mg)/ Koncentracija (μg/mL) (115).

Početna koncentracija od 512 μg/ml , dobivena je razrjeđivanjem stock solucije u Mueller-Hinton bujonu (Becton Dickinson and Co., Cockeysville MD, USA u omjeru 1:10 (115).

Određivanje osjetljivosti sojeva izoliranih iz kliničkih uzoraka kao i kontrolnih sojeva na pentadekapeptid BPC, kao i na BPC uz dodatak konvencionalnih antibiotika izvedena je u mikrotitar pločicama sa U-dnom, 96 jažica (Cartel,Italija).

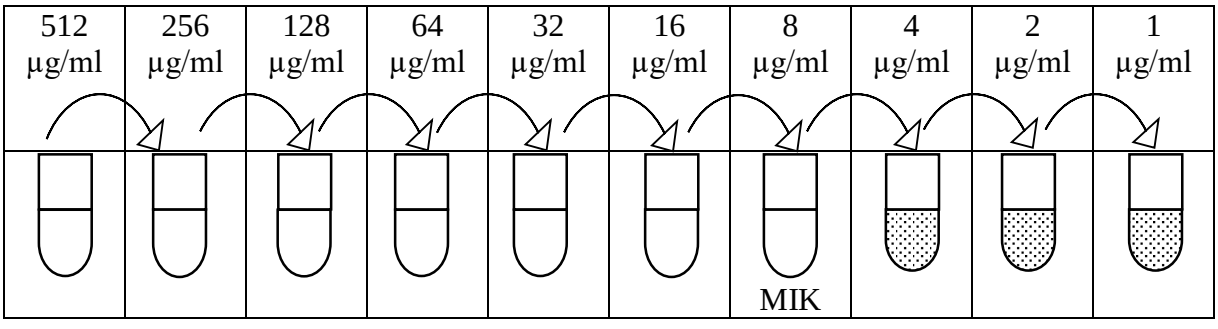
Prve su dvije jažice u redu ostati prazne, a u ostalih je deset stavljeno po 50 μl MH bujona. Prva je jažica (kontrola rasta) napunjena s 50 μl MH bujona, druga je jažica napunjena s 100 μl BPC-a u koncentraciji od 512 μg/ml. Pomoću mikropipete napravljena su dvostruka razrjeđenja, na način da se 50 μl iz druge jažice prebaci u treću, nekoliko puta promiješa i nastavi se prenositi 50 μl do zadnje jažice iz koje se 50 μl izbaci van.

Pomoću mikropipete napravljena su dvostruka serijska razrjeđenja istraživane supstance te je za svaki soj uključena i pozitivna (soj u MH bujonu bez dodatka antibakterijske supstance) i negativna kontrola (ne nasađen MH bujon) (115).

Za pripremu inokuluma metodom direktne suspenzije, ispitivane su bakterijske kulture nasađene na krvni agar (5% defibrinirane konjske krvi) i stavljene u aerobni inkubator (Bodalec, Zagreb, Hrvatska) na temperaturu od 35 ± 2 ºC tijekom 16 do 20 sati. Nakon toga je napravljena suspenzija bakterijskog soja gustoće od 0.5 McF (McFarlanda Standard) (1-2x 10^8 CFU/ml) u sterilnoj fiziološkoj otopini. Ista je određena turbidimetrom (Densimat, Biomerieux sa France). Nakon toga, 50 µl tako priređene suspenzije razrijeđeno je u 5 ml sterilnog MH bujona (1-2 x 10^6 CFU/ml), a po tom je homogenizirano vortexom (techno Kartel TK3S) (115).

Pripremljena suspenzija svakog soja, tj. 50 µl ,dodana je unutar 15 min od pripremanja u svaku jažicu mikrotitar pločice pripremeljene kako je gore opisano (5 x 10^5 CFU/ml u svakoj jažici).U svaku jažicu osim prve i to u prvih sedam redova, a u osmom redu prve ploče od treće do dvanaeste jažice. Inkubirano je na 35 ± 2 ºC tijekom 16 do 20 sati u inkubatoru u aerobnim uvjetima. Bakterijski sojevi *Staphylococcus aureus* testiran na vankomicin i *Enterococcus faecalis* testiran na vankomicin i gentamicin inkubirani su 24 h (115).

Nakon inkubacije očitani su rezultati. Antibakterijski su učinci iskazani minimalnom inhibitornom aktivnošću (MIK) koja je mjerena kvantitativno. MIK je najniža koncentracija antibiotika koja inhibira vidljivi porast mikroorganizama nakon prekonoćne inkubacije (115). U kontroli postupka korišten je ATCC soj *Pseudomonas aeurigonsa* ATCC 27853.



Slika 11. Prikaz dvostrukog serijskog razrjeđivanja antibiotika i određivanje MIK-a u metodi dilucije

4.4. Ispitivanje sinergističkog djelovanja pentadekapeptida PBC 157 s antibioticima mikrodilucijskom metodom

Mikrodilucijskom metodom u bujonu izvršeno je određivanje MIK-a konvencionalnih antibiotika uz dodatak pentadekapeptida BPC-157 a na predviđene bakterijske sojeve iz kliničkih materijala te predviđene ATCC sojeve. Na isti je način opisano određivanje osjetljivosti izoliranih sojeva iz kliničkih materijala i ATCC sojeva na pentadekapeptid BPC 157, u omjeru 1:1 (114).

4.5. Ispitivanje sinergističkog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 s antibioticima kombiniranim disk-difuzijskim testom

Ispitivan je sinergistički učinak pentadekapeptida BPC 157 sa konvencionalnim antibioticima glavnih predstavnika skupina β-laktamskih, glikopeptidnih, aminoglikozidnih i kinolonskih antibiotika.

Određivanje osjetljivosti izoliranih mikroorganizama na konvencionalne antibiotike (Becton Dickinson, Sensi-Disc,U.S.) izvedeno je standardnom disk difuzijskom metodom (Kirby-Bauer) u skladu sa Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI standardima) (114).

Na standardnu podlogu za ispitivanje osjetljivosti brzorastućih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija, Műeller-Hinton agar (Becton, Dickinson,U.S.), izliven u plastične ploče promjera 90 mm (Copan, Zagreb, Hrvatska), debljine 4 mm, nanesena je suspenzija bakterijskog soja s inokulumom gustoće 0,5 Mc Farlanda (10^8CFU/ml), priređenog u 5 ml sterilne FO.

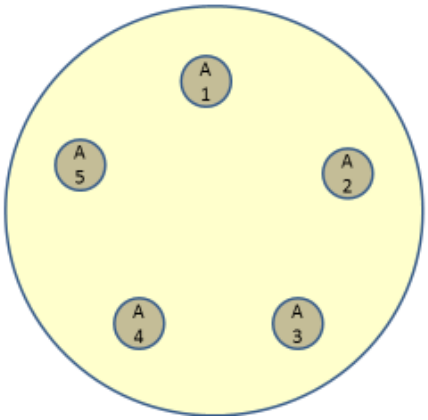
Suspenzija je priređena iz svježe, prekonoćne kulture porasle na krvnom agaru. Gustoća je određena turbidimetrom. U vorteksiranu suspenziju bakterijskog soja, u roku od 15 minuta od određivanja gustoće turbidimetrom, uronjen je sterilan bris koji je potom ocijeđen od suviška suspenzije na stijenci epruvete. Suspenzija je brisom ravnomjerno nanesena na priređeno MH hranilište, u tri smjera, rotirajući hranilište za 60^0.

Na tako priređeno hranilište, pomoću BD Sensi-Disc dozatora, postavljeni su diskovi konvencionalnih antibiotika:

a) za Gram-pozitivne bakterije ; ampicilin (10 µg) , eritromicin (15 µg), gentamicin (10 µg) , vankomicin (30 µg),

b) za Gram-negativne bakterije; amikacina (30 µg), ceftazidima (30 µg), ciprofloksacina (5 µg), imipenema (10µg).

Svaki je predviđeni bakterijski soj testiran na sve predviđene antibiotike pomoću konvencionalnih diskova antibiotika Becton, Dickinson, U.S. , te na predviđene antibiotike uz dodatak 20 µl pentadekapeptida BPC 157 u različitim koncentracijama od 512 µg/ml; 51,2 µg/ml; 5,12 te 0,5 µg/ml. Na konvencionalne je diskove pomoću mikropipete naneseno 20 µl navedenih koncentracija BPC 157. Svi diskovi imaju promjer 6 mm. Zone su inhibicije izmjerene ravnalom i izražene u mm. Razlike su u veličini zona prikazane statističkim metodama. U kontroli postupka korišten je ATCC soj *Pseudomonas aeurigonsa* ATCC 27853.



A1 = antibiotik + BPC 157 512 µg/ml
A2 = antibiotik + BPC 157 51,2 µg/ml
A3 = antibiotik + BPC 157 5,12 µg/ml
A4 = antibiotik + BPC 157 0,5 µg/ml
A5 = antibiotik + fiziološka otopina

Slika10. Određivanje sinergističkog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 s antibioticima kombiniranim disk-difuzijskim testom

4.6. Statističke metode

Dobiveni su rezultati obrađeni pomoću programskog paketa za statističku obradu – SPSS for Windows (inačica19.0,SPSS Inc.,Chicago,IL,SAD), a u samoj je obradi podataka provedena provjera normaliteta distribucija, izračun deskriptivnih podataka podrazumijevajući frekvencije, postotke, medijan i interkvartilni raspon te McNemarov hi-kvadrat test, Wilcoxonov test ekvivalentnih parova i Friedmanov test za testiranje značajnosti razlika između dvije ili više zavisnih skupina.

5. REZULTATI

Prikaz rezultata osjetljivosti Gram-pozitivnih izolata na različite antibiotike i na različite antibiotike uz dodatak BPC 157 utvrđena metodom bujonske mikrodilucije.

Tablica 5.1. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) (μg/ml) različitih antibiotika i različitih antibiotika uz dodatak pentadekapeptida BPC 157 (BPC 157*)

Bakterijska Vrsta	Oznaka soja	AM†	AM+ BPC	GM‡	GM+ BPC	VA§	VA+ BPC	E ‖	E+ BPC
S. aureus	3291	0,5	0,5	≥128	≥128	0,25	0,25	0,125	0,125
	3335	2	2	0,25	0,25	0,25	0,5	0,125	0,125
	2820	8	8	0,125	0,125	0,25	0,25	0,125	0,125
	3358	8	8	0,25	0,25	0,25	0,5	0,125	0,125
	2169	1	1	0,25	0,25	0,125	0,125	0,062	0,062
	4548	8	8	0,5	0,5	0,5	0,5	≥64	≥64
	2313	8	8	0,5	0,5	1	1	0,125	0,125
	3257	8	8	0,25	0,25	0,5	0,5	≥64	≥64
	2603	0,5	0,5	0,125	0,125	0,5	0,5	0,125	0,125
	2900	8	8	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125

*pentadekapeptid BPC 157; †ampicilin; ‡gentamicin; §vankomicin; ‖eritromicin

Tablica 5.2. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) (μg/ml) različitih antibiotika i različitih antibiotika uz dodatak BPC 157*

Bakterijska Vrsta	Oznaka soja	AM†	AM+ BPC	GM‡	GM+ BPC	VA§	VA+ BPC	E ‖	E+ BPC
MRSA	805	8	8	0,125	0,125	0,5	0,5	0,062	0,062
	591	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125
	606	1	1	0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25
	408	4	4	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125
	9540	8	8	4	4	1	1	0,5	0,5
	415	1	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	214	8	8	0,25	0,25	1	1	0,125	0,125
	357	8	8	0,25	0,25	0,5	0,5	≥64	≥64
	923	≥64	≥64	≥32	≥32	0,25	0,25	≥64	≥64
	369	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125

*pentadekapeptid BPC 157; †ampicilin; ‡gentamicin; §vankomicin; ‖eritromicin

Tablica 5.3. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) (μg/ml) različitih antibiotika i različitih antibiotika uz dodatak BPC 157*

Bakterijska Vrsta	Oznaka soja	AM†	AM+ BPC	GM‡	GM+ BPC	VA§	VA+ BPC	E ‖	E+ BPC
E. faecalis	4362	8	8	4	4	1	1	0,5	0,5
	5066	4	4	4	4	0,5	0,5	4	4
	5135	8	8	8	8	0,5	0,5	2	2
	5247	8	8	4	4	1	1	≥128	≥128
	5258	2	2	8	8	1	1	1	1
	4304	2	2	8	8	1	1	≥128	≥128
	4541	4	4	16	16	1	1	≥128	≥128
	5384	4	4	16	16	2	2	≥128	≥128
	5452	2	2	2	2	1	1	2	1
	4345	2	2	16	16	1	1	2	1

*pentadekapeptid BPC 157; †ampicilin; ‡gentamicin; §vankomicin; ‖eritromicin

Tablica 5.4. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) (μg/ml) različitih antibiotika i različitih antibiotika uz dodatak BPC 157*

Bakterijska Vrsta	Oznaka soja	AM†	AM+ BPC	GM‡	GM+ BPC	VA§	VA+ BPC	E ‖	E+ BPC
VRE	35890	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128
	3940	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128
	1861	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128
	2961	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128
	31728	≥128	≥128	4	4	≥128	≥128	≥128	≥128
	23656	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128
	10974	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128
	4191	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128
	13421	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128
	17965	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128

*pentadekapeptid BPC 157; †ampicilin; ‡gentamicin; §vankomicin; ‖eritromicin

Prikaz rezultata osjetljivosti Gram-negativnih izolata na različite antibiotike i na različite antibiotike uz dodatak BPC 157, utvrđena metodom mikrodilucije u bujonu.

Tablica 5.5. Minimalne inhibitorne koncentracije (μg/ml) različitih antibiotika i različitih antibiotika uz dodatak BPC 157*

Bakterijska Vrsta	Oznaka soja	CAZ‡	CAZ +BPC	CIP‡	CIP +BPC	IPM§	IPM +BPC	AN‖	AN +BPC
Escherichia coli – S¶	4351	1	1	0,031	0,015	1	0,5	2	4
	4364	1	1	0,031	0,015	1	0,5	2	4
	4405	1	1	0,031	0,015	0,5	0,25	2	2
	4347	2	2	0,063	0,031	0,5	0,5	2	2
	4316	2	2	0,031	0,031	1	0,5	2	2
	4914	1	1	0,016	0,016	1	0,5	2	1
	5151	2	2	0,016	0,007	0,5	0,25	4	4
	4339	4	4	≥32	≥32	1	0,5	16	16
	5152	1	1	0,031	0,031	1	1	2	2
	3329	2	2	128	128	0,5	0,25	8	4

*pentadekapeptid BPC157; †ceftazidim; ‡ciprofloksacin; §imipenem; ‖amikacin; ¶osjetljiv

Tablica 5.6. Minimalne inhibitorne koncentracije (μg/ml) različitih antibiotika i različitih antibiotika uz dodatak BPC 157*

Bakterijska Vrsta	Oznaka soja	CAZ‡	CAZ +BPC	CIP‡	CIP +BPC	IPM§	IPM +BPC	AN‖	AN +BPC
Escherichia coli – R ¶	4559	8	8	≥32	≥32	0,25	0,5	4	4
	4286	8	8	≥32	≥32	0,25	0,5	4	4
	4145	4	4	≥32	≥32	0,25	0,25	4	4
	4281	32	32	≥32	≥32	0,5	0,5	8	8
	4069	8	8	≥32	≥32	0,5	0,5	4	4
	14961	8	8	≥32	≥32	0,5	0,5	4	4
	3809	8	8	≥32	≥32	0,25	0,25	4	4
	2239	8	8	≥32	≥32	0,25	0,25	4	4
	3817	8	8	≥32	≥32	0,25	0,25	2	2
	3607	4	4	≥32	≥32	0,25	0,25	16	16

*pentadekapeptid BPC157; †ceftazidim; ‡ciprofloksacin; §imipenem; ‖amikacin; ¶rezistentan

Tablica 5.7. Minimalne inhibitorne koncentracije (μg/ml) različitih antibiotika i različitih antibiotika uz dodatak BPC 157*

Bakterijska Vrsta	Oznaka soja	CAZ‡	CAZ +BPC	CIP‡	CIP +BPC	IPM§	IPM +BPC	AN‖	AN +BPC
Klebsiella pneumoniae -*S*¶	26130	0,5	0,5	0,015	0,015	0,25	0,25	0,5	0,5
	26281	0,25	0,25	0,015	0,015	1	1	1	1
	26385	0,25	0,25	0,015	0,015	0,5	0,5	1	0,5
	26488	0,25	0,25	0,015	0,015	0,5	0,5	1	0,5
	26670	0,25	0,25	0,03	0,03	0,5	0,5	0,5	0,5
	27947	0,25	0,25	2	2	1	1	2	1
	28066	0,5	0,5	0,015	0,015	1	1	1	1
	28074	0,25	0,25	0,015	0,015	0,25	0,25	1	0,5
	25883	0,5	0,5	0,06	0,06	0,5	0,5	1	1
	25828	0,5	0,5	0,06	0,06	0,25	0,25	1	1

*pentadekapeptid BPC157; †ceftazidim; §imipenem; ‖amikacin; ¶osjetljiv

Tablica 5.8. Minimalne inhibitorne koncentracije (μg/ml) različitih antibiotika i različitih antibiotika uz dodatak BPC 157*

Bakterijska Vrsta	Oznaka soja	CAZ‡	CAZ +BPC	CIP‡	CIP +BPC	IPM§	IPM +BPC	AN‖	AN +BPC
Klebsiella pneumoniae R¶	5169	≥128	≥128	≥32	≥32	16	16	1	1
	3773	≥128	≥128	≥32	≥32	16	16	1	1
	4751	≥128	≥128	0,5	0,5	2	2	0,5	0,5
	5238	≥128	≥128	≥32	≥32	16	16	2	4
	5482	≥128	≥128	0,25	0,25	1	1	16	16
	9548	≥128	≥128	≥32	≥32	0,25	0,25	2	2
	11522	≥128	≥128	0,031	0,015	0,25	0,5	8	16
	9408	≥128	≥128	32	32	2	2	4	4
	11699	≥128	≥128	1	1	2	2	0,5	0,5
	12771	≥128	≥128	0,031	0,031	0,25	0,25	16	16

*pentadekapeptid BPC157; †ceftazidim; ‡ciprofloksacin; §imipenem; ‖amikacin;¶rezistentan

5.1. Prikaz standardnih vrijednosti ATCC sojeva

Tablica 5.9. Prikaz MIK*-a ATCC† sojeva korištenih u istraživanju i normativnih vrijednosti prema Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standardima

	Metoda dilucije (µg/ml)			
ATCC* sojevi	Ampicilin	Eritromicin	Gentamicin	Vankomicin
S.aureus 25923	-	-	-	-
E.faecalis 29212	0,5-2	1-4	4-16	1-4
ATCC* sojevi	Amikacin	Ceftazidim	Ciprofloksacin	Imipenem
E. coli 25922	0,5-4	0,06-0,5	0,004-0,016	0,06-0,25
K. pneumoniae 700803	-	16-64	-	-
P.aeruginosa 27853	1-4	1-4	0,25-1	1-4
A.baumanii 19606	-	-	-	-

*minimalna inhibitorna koncentracija;

†American Type Culture Collection

Tablica 5.10. Prikaz veličina zone inhibicije ATCC* sojeva korištenih u istraživanju i normativnih vrijednosti prema Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standardima

Metoda disk difuzije				
Dijametar zone inhibicije (mm)				
	Ampicilin	Eritromicin	Gentamicin	Vankomicin
ATCC* sojevi	10 µg	15 µg	10 µg	30 µg
S.aureus 25923	27-35	22-30	19-27	17-21
E.faecalis 29212	15-21	-	12-18	10-16
	Amikacin	Ceftazidim	Ciprofloksacin	Imipenem
ATCC sojevi	30 µg	30 µg	5 µg	10 µg
E. coli 25922	19-26	23-29	30-40	26-32
K. pneumoniae 700803	-	10-18	-	-
P.aeruginosa 27853	18-26	22-29	22-30	20-28
A.baumanii 19606	-	-	-	17-23

*American Type Culture Collection

Tablica 5.11. Učestalost za Gram-pozitivne sojeve u *metodi dilucije*

Gram pozitivni sojevi	**Frekvencija ukupno**	**% ukupno**
S.aureus	10	25
E.faecealis	10	25
MRSA*	10	25
VRE†	10	25

*Meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*;

†Vankomycin rezistentni *Enterococcus faecalis*

Tablica 5.12. Učestalost za Gram-negativne sojeve u *metodi dilucije*

Gram negativni sojevi	**Frekvencija ukupno**	**% ukupno**
E.coli-S*	10	12,5
E.coli-R†	10	12,5
Kl.pneumoniae-S*	10	12,5
Kl.pneumoniae-R†	10	12,5
Acinetobacter-S*	10	12,5
Acinetobacter-R†	10	12,5
Pseudomonas-S*	10	12,5
Pseudomonas-R†	10	12,5

*osjetljiv; †resistentan

Iz pregleda Tablice 5.11. i Tablice 5.12., može se vidjeti kako je kod Gram-pozitivnih sojeva i Gram-negativnih sojeva jednaka zastupljenost svake izolirane bakterijske vrste korištene u *metodi dilucije* te njihova pojavnost u postotcima iznosi 25% za Gram-pozitivne sojeve i 12.5% za Gram-negativne sojeve.

Tablica 5.13. Učestalost Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterijskih sojeva podijeljenih na osjetljive i rezistentne skupine

	Gram + ‡	Gram + %	Gram - §	Gram - %	Ukupno
S*	2	33,3	4	66,7	6
R†	2	33,3	4	66,7	6
Ukupno	4	33,3	8	66,7	12

*osjetljivi soj;

†rezistentni soj;

‡Gram - pozitivni soj;

§Gram - negativni soj

Prema Tablici 5.13. može se zaključiti kako je testirano više Gram-negativnih sojeva (66,7%), dok je Gram-pozitivnih sojeva testirano 33,3%. Razlika je vidljiva u tome što je u istraživanju korištena i podjela na osjetljive te rezistentne sojeve, kojih se pojavljuje više kod Gram- negativnih sojeva.

Tablica 5.14. Određivanje MIK za antibiotike ampicilin i gentamicin, samih i u kombinaciji sa BPC 157 , a na Gram-pozitivnim bakterijskim sojevima

	MIC (mg/L)							
Gram + bacteria	**AM**	**Medijan (IQR)***	**AM+ BPC**	**Medijan (IQR)***	**GM**	**Medijan (IQR)***	**GM+ BPC**	**Medijan (IQR)***
MSSA† (n=10)	0,5-8	8 (1-8)	0,5-8	8 (1-8)	0,12-128	0,25 (0,25-0,5)	0,125-128	0,25 (0,25-0,5)
MRSA‡ (n=10)	0,5-64	6 (1-8)	0,5-64	6 (1-8)	0,13-32	0,25 (0,25-0,25)	0,125-32	0,3 (0,25-0,25)
E. faecalis (n=10)	2-8	4 (2-8)	2-8	4 (2-8)	2-16	4 (2-8)	2-16	4 (2-8)
VRE§ (n=10)	128-128	128 (128-128)	128-128	128 (128-128)	4-128	128 (128-128)	4-128	128 (128-128)

*granice interkvartilnog raspona;

†Methicillin-sensitiv *Staphylococcus aureus*;

‡Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*;

§Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*

Tablica 5.15. Određivanje MIK za antibiotike vankomicin i eritromicin, samih i u kombinaciji sa BPC 157 , a na Gram-pozitivnim bakterijskim sojevima

	MIC (mg/L)							
Gram + bacteria	**VA**	**Medijan (IQR)***	**VA+ BPC**	**Medijan (IQR)***	**E**	**Medijan (IQR)***	**E+ BPC**	**Medijan (IQR)***
MSSA† (n=10)	0,125-1	0,5 (0,25-0,5)	0,125-1	0,5 (0,25-0,5)	0,06-64	0,12 (0,12-0,12)	0,062-64	0,125 (0,125-0,125)
MRSA‡ (n=10)	0,25-1	0,25 (0,25-0,5)	0,25-1	0.3 (0,25-0,5)	0,06-64	0,25 (0,12-0,5)	0,06-64	0,2 (0,13-0,5)
E. faecalis (n=10)	0,5-2	1 (1-1)	0,5-2	1 (1-1)	0,5-128	3 (1-128)	0,5-128	3 (1-128)
VRE§ (n=10)	128-128	128 (128-128)	128-128	128 (128-128)	128-128	128 128	128-128	128 (128-128)

*granice interkvartilnog raspona;

†Methicillin-sensitiv *Staphylococcus aureus*;

‡Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*;

§Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*

Tablica 5.16. Određivanje MIK za antibiotike ceftazidim i ciprofloksacin, samih i u kombinaciji sa BPC 157 , a na Gram-negativnim bakterijskim sojevima

	MIC (mg/L)							
Gram - bacteria	**CAZ†**	**Medijan (IQR)***	**CAZ+ BPC**	**Medijan (IQR)***	**CIP‡**	**Medijan (IQR)***	**CIP+ BPC**	**Medijan (IQR)***
E. coli S (n=10)	1-4	2 (1-2)	1-4	2 (1-2)	0,015-32	0,03 (0,03-32)	0,007-32	0,031 (0,015-32)
E. coli R (n=10)	4-32	8 (8-8)	4-32	8 (8-8)	32-32	32 (32-32)	32-32	32 (32-32)
K. pneumoniae S (n=10)	0,25-0,5	0,25 (0,25-0,5)	0,25-0,5	0,25 (0,25-0,5)	0,015-2	0,01 (0,01-0,06)	0,015-2	0,015 (0,015-0,06)
K. pneumoniae R (n=10)	128-128	128 (128-128)	128-128	128 (128-128)	0,031-32	16,5 (0,25-32)	0,015-32	16,5 (0,25-32)
A. baumanii S (n=10)	0,5-128	128 (8-128)	0,5-128	128 (8-128)	0,015-128	32 (32-32)	0,03-128	32 (32-32)
A. baumanii R (n=10)	128-128	128 (128-128)	128-128	128 (128-128)	32-32	32 (32-32)	32-32	32 (32-32)
P. aeruginosa S (n=10)	1-128	8 (4-16)	1-128	6 (4-16)	0,062-2	0,5 (0,125-1)	0,062-2	0,375 (0,125-1)
P. aeruginosa R (n=10)	2-128	8 (4-16)	2-128	8 (4-8)	0,25-2	0,75 (0,5-1)	0,25-2	0,75 (0,25-1)

*granice interkvartilnog raspona;

†ceftazidim;

‡ciprofloksacin

Tablica 5.17. Određivanje MIK za antibiotike imipenem i amikacin, samih i u kombinaciji sa BPC 157 , a na Gram-negativnim bakterijskim sojevima

	MIC (mg/L)							
Gram - bacteria	**IPM†**	**Medijan (IQR)**	**IPM+ BPC**	**Medijan (IQR)**	**AN‡**	**Medijan (IQR)**	**AN+ BPC**	**Medijan (IQR)**
E. coli S (n=10)	0,5-1	0,75 (0,5-1)	0,25-1*	0,5 (0,25-0,5)	2-16	2 (2-4)	1-16	3 (2-4)
E. coli R (n=10)	0,25-0,5	0,25 (0,25-0,5)	0,25-0,5	0,375 (0,25-0,5)	2-16	4 (4-4)	2-16	4 (4-4)
K. pneumoniae S (n=10)	0,25-1	0,5 (0,25-1)	0,25-1	0,5 (0,25-1)	0,5-2	1 (1-1)	0,5-1	0,75 (0,5-1)
K. pneumoniae R (n=10)	0,25-16	2 (0,25-16)	0,25-16	2 (0,5-16)	0,5-16	2 (1-8)	0,5-16	3 (1-16)
A. baumanii S (n=10)	0,5-128	4 (4-128)	1-128	6 (2-128)	0,5-128	2,5 (1-128)	0,5-128	2,5 (1-128)
A. baumanii R (n=10)	128-128	128 (128-128)	128-128	128 (128-128)	0,5-128	128 (4-128)	0,5-128	128 (4-128)
P. aeruginosa S (n=10)	1-4	4 (4-4)	1-4	2 (2-4)	1-8	2 (2-4)	1-8	2 (2-4)
P. aeruginosa R (n=10)	4-128	24 (8-64)	4-128	24 (8-64)	2-128	64 (32-128)	2-128	48 (32-128)

*granice interkvartilnog raspona; †imipenem; ‡amikacin

U Tablicama 5.14. i 5.15. su prikazani medijan i poluinterkvartilno raspršenje odvojeno za svako sinergističko djelovanje pojedinog antibiotika s pentadekapeptidom BPC 157 na svaki izolirani Gram-pozitivni bakterijski soj, a u Tablicama 5.16. i 5.17. na svaki izolirani Gram-negativni bakterijski soj.

5.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti pentadekapeptida BPC 157 na *ATCC* sojeve *in vitro* metodom mikrodilucije u bujonu

Korištenjem McNemarovog hi-kvadrat testa ispitivano je postoji li statistički značajna razlika između prvog i drugog određivanja antibakterijske aktivnosti na ATCC sojevima metodom mikrodilucije u bujonu, odnosno, prije i nakon dodavanja pentadekapeptida BPC 157. Dobivene frekvencije i rezultati testiranja ovih razlika McNemarovim hi-kvadrat testom vidljive su u Tablici 5.18 i Tablici 5.19.

Tablica 5.18. Prikaz kontingencijske tablice BPC*ATCC s dobivenim frekvencijama u metodi mikrodilucije u bujonu na ATCC sojeve prije i nakon dodavanja pentadekapeptida BPC 157

		ATCC*		**Ukupno**
		<256	**>256**	
BPC†	**<256**	**0**	**0**	**0**
	>256	**0**	**6**	**6**
Ukupno		**0**	**6**	**6**

*American Type Culture Collection;

†pentadekapeptid BPC 157

Tablica 5.19. Prikaz McNemarovog hi-kvadrat testa za zavisne uzorke pri testiranju značajnosti razlika između varijabli ATCC i BPC 157

	Vrijednost	p
McNemarov test ATCC*BPC†		> 0,99
N‡	6	

*pentadekapeptid BPC 157;

†American Type Culture Collection;

‡broj sojeva

Iz priloženih Tablica 5.18. i 5.19. vidljivo je kako nije dobivena statistički značajna razlika, odnosno, nije uočena antibakterijska aktivnost na ATCC sojevima u metodi mikrodilucije u bujonu nakon dodavanja pentadekapeptida BPC 157 te se može zaključiti kako prisustvo pentadekapeptida BPC 157 nema antibakterijski učinak na ispitivanim ATCC sojevima.

5.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti pentadekapeptida BPC 157 na izoliranim bakterijskim vrstama iz kliničkih uzoraka

Korištenjem McNemarovog hi-kvadrat testa testiralo se postoji li statistički značajna razlika u antimikrobnom djelovanju na pojedine bakterijske vrste izolirane iz kliničkih uzoraka prije i nakon dodavanja pentadekapeptida BPC 157. Dobivene su frekvencije i rezultati testiranja ovih razlika McNemarovim hi-kvadrat testom vidljive u Tablici 5.20., Tablici 5.21., Tablici 5.22. i Tablici 5.23..

Tablica 5.20. Prikaz kontingencijske tablice BPC*Gram+ s dobivenim frekvencijama Gram pozitivnih izoliranih bakterijskih vrsta prije i nakon dodavanja pentadekapeptida BPC 157

		Gram +†		Ukupno
		<256	**>256**	
BPC*	**<256**	**0**	**0**	**0**
	>256	**0**	**4**	**4**
Ukupno		**0**	**4**	**4**

*pentadekapeptid BPC 157;
†Gram-pozitivni sojevi

Tablica 5.21. Prikaz McNemarovog hi-kvadrat testa za zavisne uzorke pri testiranju Gram-pozitivnih izoliranih bakterijskih vrsta uz dodatak BPC 157*

McNemarov test	Vrijednost	p	N†
S. aureus	>256	> 0,99	10
E. faecalis	>256	> 0,99	10
MRSA‡	>256	> 0,99	10
VRE§	>256	> 0,99	10

*****pentadekapeptid BPC 157;
†broj sojeva;
‡*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*;
§*Vancomycin-Resistant Enterococcus faecalis*

Pregledom Tablice 5.20. i Tablice 5.21. može se uočiti kako nije dobivena statistički značajna razlika. Dakle, nije došlo do nikakvih promjena, odnosno, do antibakterijskog učinka na ispitivanim Gram-pozitivnim bakterijskim vrstama nakon dodavanja pentadekapeptida BPC

157 te se može zaključiti kako pentadekapeptid BPC 157 nema antibakterijski učinak na navedene Gram-pozitivne bakterijske vrste.

Tablica 5.22. Prikaz kontingencijske tablice BPC*Gram- s dobivenim frekvencijama Gram-negativnih izoliranih bakterijskih vrsta prije i nakon dodavanja pentadekapeptida BPC 157

		Gram -†		Ukupno
		<256	>256	
BPC*	<256	0	0	0
	>256	0	8	8
Ukupno		0	8	8

*pentadekapeptid BPC 157;

†Gram-negativni sojevi

Tablica 5.23. Prikaz McNemarovog hi-kvadrat testa za zavisne uzorke pri testiranju Gram-negativnih izoliranih bakterijskih vrsta uz dodatak BPC 157*

McNemarov test	vrijednost	p	N§
***E. coli*-S†**	>256	> 0,99	10
***E. coli*-R‡**	>256	> 0,99	10
***K. pneumoniae*- S†**	>256	> 0,99	10
***K. pneumoniae*- R‡**	>256	> 0,99	10
***A. baumanii*- S†**	>256	> 0,99	10
***A. baumanii* - R‡**	>256	> 0,99	10
***P. aeruginosa* - S†**	>256	> 0,99	10
***P. aeruginosa* - R‡**	>256	> 0,99	10

*pentadekapeptid BPC 157;

†osjetljivi soj;

‡rezistentni soj;

§broj sojeva

Iz Tablice 5.22. i Tablice 5.23. može se uočiti kako nije dobivena statistički značajna razlika, što znači da nije došlo do nikakvih promjena, odnosno do antibakterijske aktivnosti na testirane Gram-negativne bakterijske vrste, izolirane iz kliničkih uzoraka, nakon dodavanja pentadekapeptida BPC 157, stoga se može zaključiti kako prisustvo pentadekapeptida BPC 157 u ovim koncentracijama nema antibakterijski učink na navedene Gram-negativne bakterijske vrste.

5.4. Ispitivanje sinergističkog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 s konvencionalnim antibioticima na ATCC sojeve *in vitro* metodom dilucije

Ispitivanjem sinergističkog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 s konvencionalnim antibioticima na ATCC sojeve *in vitro* metodom dilucije dobiveni su brojčani podatci koji su u daljnjem tekstu prikazani u Tablici 5.24. S obzirom na vrstu i količinu podataka te zasebnost svakog sinergističkog djelovanja pojedinog konvencionalnog antibiotika s pentadekapeptidom BPC 157 na ATCC sojeve, nije opravdano statistički obrađivati dobivene podatke te su kao „sirovi“ podatci prikazani u niže navedenoj Tablici 5.24. i opisno interpretirani.

Tablica 5.24. Prikaz rezultata očitavanja MIK-a kod ispitivanja djelovanja pentadekapeptida BPC 157 s konvencionalnim antibioticima na ATCC sojeve *in vitro* metodom dilucije.

Antibiotik	***S. aureus* 25923**	***E. faecalis* 29212**
Ampicilin	1	2
Ampicilin+BPC	1	2
Gentamicin	0,125	8
Gentamicin+BPC	0,125	8
Vankomicin	1	2
Vankomicin+BPC	1	2
Eritromicin	0,5	4
Eritromicin+BPC	0,5	4

Antibiotik	*P.aeruginosa* 27853	*E. coli* 25922	*A. baumanii* 19606	*K. pneumoniae* 700803
Ceftazidim	4	0,5	64	128
Ceftazidim+BPC	4	0,5	64	128
Ciprofloksacin	0,5	0,004	0,06	0,06
Ciprofloksacin+BPC	0,5	0,004	0,06	0,06
Imipenem	4	0,25	0,5	1
Imipenem+BPC	4	0,25	0,5	1
Amikacin	4	1	2	1
Amikacin+BPC	4	1	2	1

Pregledom Tablice 5.24. može se uočiti kako nije došlo do promjena u prikazanim rezultatima pojedinog ATCC soja s obzirom na dodavanje pojedinog antibiotika te istog antibiotika i pentadekapeptida BPC 157. Nije došlo do sinegrističkog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 s konvencionalnim antibioticima na ATCC sojeve *in vitro* metodom dilucije u bujonu. Dobivene rezultate potrebno je dodatno ispitati u daljnjim istraživanjima te postojanje i značajnost promjene utvrditi statističkom obradom podataka. Za ATCC sojeve *S.aureus* 25923 i *E.faecalis* 29212, u kombinaciji s pentadekapeptidom BPC 157, dodavani su antibiotici eritromicin, vankomicin, ampicilin i gentamicin, dok su za ATCC sojeve *E.coli* 25922, *K.pneumoniae* 700803, *A.baumanii* 19606 i *P.* aeruginosa 27853, u kombinaciji s pentadekapeptidom BPC 157, dodavani antibiotici ciprofloksacin, ceftazidim, imipenem i amikacin.

5.5. Ispitivanje sinergističkog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 s konvencionalnim antibioticima na ATCC sojeve *in vitro* metodom disk difuzije

Mjerenjem sinergističkog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 s konvencionalnim antibioticima na ATCC sojeve *in vitro* metodom disk difuzije dobiveni su brojčani podatci koji su u daljnjem tekstu prikazani u Tablici 5.25. S obzirom na vrstu i količinu podataka te

zasebnost svakog sinergističkog djelovanja pojedinog konvencionalnog antibiotika s pentadekapeptidom BPC 157 na ATCC sojeve, nije opravdano statistički obrađivati dobivene podatke te su isti kao „sirovi“ podatci prikazani u navedenoj Tablici i opisno interpretirani.

Tablica 5.25. Prikaz veličina zona inhibicije nakon očitavanja rezultata djelovanja konvencionalnim antibioticima uz dodatak pentadekapeptida BPC 157*, u različitim koncentracijama a na ATCC sojeve *in vitro* metodom disk difuzije

	Konc atb +BPC†	**Eritromicin +BPC**	**Vankomicin + BPC**	**Ampicilin +BPC**	**Gentamicin +BPC**
***S.aureus* 25923**	512 µg/ml	26	19	29	23
	51,2 µg/ml	26	19	29	23
	5,1 µg/ml	26	19	29	23
	0,5 µg/ml	26	19	29	23
	FO‡	26	19	29	23

	Konc atb +BPC†	**Eritromicin + BPC**	**Vankomicin + BPC**	**Ampicilin + BPC**	**Gentamicin + BPC**
***E.faecalis* 29212**	512 µg/ml	21	16	21	18
	51,2 µg/ml	21	16	21	18
	5,1 µg/ml	21	16	21	18
	0,5 µg/ml	21	16	21	18
	FO‡	21	16	21	18

	Konc atb +BPC†	**Ciprofloksacin + BPC**	**Ceftazidim + BPC**	**Imipenem + BPC**	**Amikacin + BPC**
***E.coli* 25922**	512 µg/ml	32	29	30	23
	51,2 µg/ml	32	29	30	23
	5,1 µg/ml	32	29	30	23
	0,5 µg/ml	32	29	30	23
	FO‡	32	29	30	23

	Konc atb +BPC†	Ciprofloksacin + BPC	Ceftazidim + BPC	Imipenem + BPC	Amikacin + BPC
***K. pneumoniae* 700803**	512 µg/ml	27	18	28	25
	51,2 µg/ml	27	18	28	25
	5,1 µg/ml	27	18	28	25
	0,5 µg/ml	27	18	28	25
	FO‡	27	18	28	25
	Konc atb +BPC†	**Ciprofloksacin + BPC**	**Ceftazidim + BPC**	**Imipenem + BPC**	**Amikacin + BPC**
***A.baumanii* 19606**	512 µg/ml	21	11	28	20
	51,2 µg/ml	21	11	28	20
	5,1 µg/ml	21	11	28	20
	0,5 µg/ml	21	11	28	20
	FO‡	21	11	28	20
	Konc atb +BPC†	**Ciprofloksacin + BPC**	**Ceftazidim + BPC**	**Imipenem + BPC**	**Amikacin + BPC**
***P.aeruginosa* 27853**	512 µg/ml	29	26	25	22
	51,2 µg/ml	29	26	25	22
	5,1 µg/ml	29	26	25	22
	0,5 µg/ml	29	26	25	22
	FO‡	29	26	25	22

*pentadekapeptid BPC 157;

†različite koncentracije pojedinog antibiotika i pentadekapeptida BPC 157;

‡fiziološka otopina

Pregledom Tablice 5.25. može se uočiti kako nije došlo do nikakvih promjena u prikazanim rezultatima pojedinog ATCC soja s obzirom na dodavane koncentracije pentadekapeptida BPC 157. Možemo zaključiti kako na ovim ispitivanim ATCC sojevima, i sa ovim koncentracijama pentadekapeptida BPC 157 nije došlo do sinergističkog ili aditivnog djelovanja s konvencionalnim antibioticima u metodi disk difuzije. Dobivene je rezultate potrebno dodatno ispitati u daljnjim istraživanjima te postojanje i značajnost promjene utvrditi statističkom obradom podataka. Za ATCC sojeve *Staphylococcus aureus* 25923 i *Enterococcus faecalis*

29212, u kombinaciji s pentadekapeptidom BPC 157, dodavani su antibiotici eritromicin, vankomicin, ampicilin i gentamicin, dok su za ATCC sojeve *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 700803, *Acinetobacter baumanii* 19606 i *Pesudomonas aeruginosa* 27853, u kombinaciji s pentadekapeptidom BPC 157, dodavani antibiotici ciprofloksacin, ceftazidim, imipenem i amikacin.

5.6. Ispitivanje sinergističkog djelovanja pentadekapeptida BPC 157 s konvencionalnim antibioticima na izolirane bakterijske sojeve iz kliničkih uzoraka *in vitro* metodom dilucije

Korištenjem Wilcoxonovog testa ekvivalentnih parova ispitivano je postojanje statistički značajnih razlika između djelovanja samog konvencionalnog antibiotika i sinergističkog djelovanja pojedinih antibiotika s pentadekapeptidom BPC 157 na različite bakterijske sojeve izolirane iz kliničkih materijala. Rezultati su prikazani u Tablicama 5.26. i 5.27. podijeljenim prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim sojevima, zasebno za svaku bakterijsku vrstu. U tablicama koje prikazuju Gram-negativne sojeve (Tablica 5.27.) rađena je statistička obrada Wilcoxonovim testom ekvivalentnih parova odvojeno za osjetljive i rezistentne sojeve te također obrada koja je podrazumijevala spajanje osjetljivih i rezistentnih sojeva za pojedinu izoliranu bakterijsku vrstu (Tablica 5.28.).

Tablica 5.26. Prikaz rezultata Wilcoxonovog testa za zavisne uzorke pri testiranju značajnosti razlika između djelovanja konvencionalnih antibiotika i djelovanja konvencionalnih antibiotika uz dodatak pentadekapeptida BPC 157* na Gram-pozitivne osjetljive i rezistentne bakterijske sojeve

Staphylococcus aureus

Wilcoxonov test	Z vrijednost	p	N†
ampicilin*BPC_ampicilin	0,000	> 0,99	10
gentamicin* BPC_gentamicin	0,000	> 0,99	10
vankomicin*BPC_vankomicin	-1,414	0,16	10
eritromicin*BPC_eritromicin	0,000	> 0,99	10

Enterococcus faecalis

Wilcoxonov test	Z vrijednost	p	N†
ampicilin*BPC_ampicilin	0,000	> 0,99	10
gentamicin* BPC_gentamicin	0,000	> 0,99	10
vankomicin*BPC_vankomicin	0,000	> 0,99	10
eritromicin*BPC_eritromicin	-1,414	0,50	10

MRSA‡

Wilcoxonov test	Z vrijednost	p	N†
ampicilin*BPC_ampicilin	-1,000	> 0,99	10
gentamicin* BPC_gentamicin	0,000	> 0,99	10
vankomicin*BPC_vankomicin	-1,000	> 0,99	10
eritromicin*BPC_eritromicin	0,000	> 0,99	10

	VRE[§]		
Wilcoxonov test	**Z vrijednost**	**p**	**N[†]**
ampicilin*BPC_ampicilin	0,000	> 0,99	10
gentamicin* BPC_gentamicin	0,000	> 0,99	10
vankomicin*BPC_vankomicin	0,000	> 0,99	10
eritromicin*BPC_eritromicin	0,000	> 0,99	10

*pentadekapeptid BPC 157;

[†]broj sojeva:

[‡]*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*;

[§]*Vancomycin-Resistant Enterococci*

Pregledom Tablice 5.26. može se uočiti kako nisu dobivene statistički značajne razlike između djelovanja korištenih konvencionalnih antibiotika (ampicilin, gentamicin, vankomicin, eritromicin) i djelovanja istih antibiotika uz dodatak pentadekapeptida BPC 157, odnosno, BPC 157 nema utjecaja na antibakterijsku aktivnost konvencionalnih antibiotika na ispitivanim Gram-pozitivnim bakterijskim sojevima kojima pripadaju *S.aureus, E.faecalis*, MRSA i VRE.

Tablica 5.27. Prikaz rezultata Wilcoxonovog testa za zavisne uzorke pri testiranju značajnosti razlika između djelovanja konvencionalnih antibiotika i djelovanja konvencionalnih antibiotika uz dodatak pentadekapeptida BPC 157 na Gram-negativne izolirane bakterijske sojeve, sa zasebnim rezultatima za osjetljive i rezistentne sojeve

Escherichia coli*-S

Wilcoxonov test	Z vrijednost	p	N‡
ceftazidim*BPC_ceftazidim	0,000	> 0,99	10
ciprofloksacin*BPC_ciprofloksacin	0,051	0,96	10
imipenem*BPC_imipenem	-1,2428	**0,02**	10
amikacin*BPC_amikacin	-0,535	0,75	10

***Escherichia coli*-R†**

Wilcoxonov test	Z vrijednost	p	N‡
ceftazidim*BPC_ceftazidim	0,000	> 0,99	10
ciprofloksacin*BPC_ciprofloksacin	0,000	> 0,99	10
imipenem*BPC_imipenem	-1,414	0,50	10
amikacin*BPC_amikacin	0,000	> 0,99	10

Klebsiella pneumoniae*-S

Wilcoxonov test	Z vrijednost	p	N‡
ceftazidim*BPC_ceftazidim	0,000	> 0,99	10
ciprofloksacin*BPC_ciprofloksacin	0,000	> 0,99	10
imipenem*BPC_imipenem	0,000	> 0,99	10
amikacin*BPC_amikacin	-1,890	0,13	10

***Klebsiella pneumoniae*-R†**

Wilcoxonov test	Z vrijednost	p	N‡
ceftazidim*BPC_ceftazidim	0,000	> 0,99	10
ciprofloksacin*BPC_ciprofloksacin	-1,000	> 0,99	10
imipenem*BPC_imipenem	-1,000	> 0,99	10
amikacin*BPC_amikacin	-1,342	0,50	10

Acinetobacter baumanii*-S

Wilcoxonov test	Z vrijednost	p	N‡
ceftazidim*BPC_ceftazidim	0,000	> 0,99	10
ciprofloksacin*BPC_ciprofloksacin	-1,000	> 0,99	10
imipenem*BPC_imipenem	-0,324	0,813	10
amikacin*BPC_amikacin	-1,000	> 0,99	10

***Acinetobacter baumanii*-R†**

Wilcoxonov test	Z vrijednost	p	N‡
ceftazidim*BPC_ceftazidim	0,000	> 0,99	10
ciprofloksacin*BPC_ciprofloksacin	-1,000	> 0,99	10
imipenem*BPC_imipenem	0,000	> 0,99	10
amikacin*BPC_amikacin	-1,000	> 0,99	10

Pseudomonas aeruginosa*-S

Wilcoxonov test	Z vrijednost	p	N‡
ceftazidim*BPC_ceftazidim	-0,535	0,75	10
ciprofloksacin*BPC_ciprofloksacin	-1,000	> 0,99	10
imipenem*BPC_imipenem	-2,070	0,06	10
amikacin*BPC_amikacin	0,000	> 0,99	10

***Pseudomonas aeruginosa*-R[†]**

Wilcoxonov test	Z vrijednost	p	N[‡]
ceftazidim*BPC_ceftazidim	-1,633	0,25	10
ciprofloksacin*BPC_ciprofloksacin	-1,000	> 0,99	10
imipenem*BPC_imipenem	0,000	> 0,99	10
amikacin*BPC_amikacin	-1,000	> 0,99	10

*S – osjetljivi soj;

[†]R – rezistentni soj;

[‡]broj sojeva

Pregledom Tablice 5.27. može se vidjeti kako je dobivena statistički značajna razlika između korištenog konvencionalnog antibiotika imipenema i djelovanja istog antibiotika s pentadekapeptidom BPC 157 u nastanku antibakterijske aktivnosti kod izolirane bakterijske vrste *E.coli*-S. Dakle, pentadekapeptid BPC 157 je pojačao djelovanje konvencionalnog antibiotika imipenema na testiranim bakterijskim sojevima *E.coli*-S (osjetljivi oblik). Dodatnim testiranjem veličine efekta ove statistički značajne razlike dobiven je visoki efekt (r=-0,77).

Nisu dobivene statistički značajne razlike za zajedničke rezultate osjetljivih i rezistentnih sojeva za izolirane bakterijske vrste kojima pripadaju *Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanii,* i *Pseudomonas aeruginosa* između korištenih konvencionalnih antibiotika (ceftazidim, ciprofloksacin, imipenem, amikacin) i djelovanja istih antibiotika s pentadekapeptidom BPC 157 na istim izoliranim bakterijskim vrstama, odnosno, pokazalo se da nema sinergističkog djelovanja ovih ispitivanih konvencionalnih antibiotika i pentadekapeptida BPC 157 na navedenim Gram-negativnim sojevima.

Tablica 5.28. Prikaz rezultata Wilcoxonovog testa za zavisne uzorke pri testiranju značajnosti razlika između djelovanja konvencionalnih antibiotika i djelovanja konvencionalnih antibioticika sa pentadekapeptidom BPC 157 s na Gram-negativne testirane bakterijske sojeve, sa zajedničkim rezultatima za osjetljive i rezistentne sojeve.

***Escherichia coli* S*+R†**

Wilcoxonov test	Z vrijednost	p	N‡
ceftazidim*BPC_ceftazidim	0,000	> 0,99	20
ciprofloksacin*BPC_ciprofloksacin	-0,051	> 0,99	20
imipenem*BPC_imipenem	-2,451	0,03*	20
amikacin*BPC_amikacin	-0,535	0,75	20

***Klebsiella pneumoniae* S*+R†**

Wilcoxonov test	Z vrijednost	p	N‡
ceftazidim*BPC_ceftazidim	0,000	> 0,99	20
ciprofloksacin*BPC_ciprofloksacin	-1,000	> 0,99	20
imipenem*BPC_imipenem	-1,000	> 0,99	20
amikacin*BPC_amikacin	-0,406	0,75	20

***Acinetobacter baumanii* S*+R†**

Wilcoxonov test	Z vrijednost	p	N‡
ceftazidim*BPC_ceftazidim	0,000	> 0,99	20
ciprofloksacin*BPC_ciprofloksacin	-1,342	0,56	20
imipenem*BPC_imipenem	-0,324	0,81	20
amikacin*BPC_amikacin	-1,342	0,50	20

Pseudomonas aeruginosa S*+R†			
Wilcoxonov test	**Z vrijednost**	**p**	**N‡**
ceftazidim*BPC_ceftazidim	-1,461	0,25	20
ciprofloksacin*BPC_ciprofloksacin	-0,447	> 0,99	20
imipenem*BPC_imipenem	-2,070	0,06	20
amikacin*BPC_amikacin	-1,000	p > 0,99	20

*S – osjetljivi soj;

†R – rezistentni soj;

‡broj sojeva

Pregledom Tablice 5.28. može se vidjeti kako je dobivena statistički značajna razlika između korištenog konvencionalnog antibiotika imipenema i sinergističkog djelovanja istog antibiotika s pentadekapeptidom BPC 157 u nastanku antibakterijske aktivnosti kod izolirane bakterijske vrste *E.coli*. Dakle, sinergističko je djelovanje antibiotika imipenema s pentadekapeptidom BPC 157 pokazalo utjecaj na stvaranje antibakterijske aktivnosti kod izolirane bakterijske vrste *E.coli*. Ipak, treba uzeti u obzir da su ovdje testirane razlike na zajedničkim podatcima za osjetljivi i rezistenti oblik izolirane bakterijske vrste *E.coli* te se zapravo statistički značajna razlika pojavljuje *samo* kod testiranja razlika između sinergističkog djelovanja imipenema i pentadekapeptida BPC 157 kod *E.coli*-S (osjetljivog oblika), dok kod *E.coli*-R (rezistentni oblik) te razlike nisu dobivene, što je vidljivo iz Tablice 5.16. Iz istoga razloga, za dobivenu statistički značajnu razliku nije računata veličina efekta. Nisu dobivene statistički značajne razlike za zajedničke rezultate osjetljivih i rezistentnih sojeva za izolirane bakterijske vrste kojima pripadaju *Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanii* i *Pseudomonas aeruginosa* između korištenih konvencionalnih antibiotika (ceftazidim, ciprofloksacin, imipenem, amikacin) i djelovanja istih antibiotika s pentadekapeptidom BPC 157 ovih izoliranih bakterijskih vrsta, odnosno, pokazalo se da pentadekapeptid BPC 157 nema utjecaj na djelovanje pojedinog antibiotika u odnosu na pojedini izolirani bakterijski soj za navedene gram negativne sojeve.

5.7. Ispitivanje djelovanja konvencionalnih antibiotika sa pentadekapeptidom BPC 157 na izoliranim bakterijskim sojevima iz kliničkih uzoraka *in vitro* metodom disk difuzije

Korištenjem se Friedmanovog testa za zavisne uzorke ispitivalo postojanje statistički značajnih razlika između različitih koncentracija pentadekapeptida BPC 157 s konvencionalnim antibioticima (512 µg/ml, 51,2 µg/ml, 5,12 µg/ml, 0,51 µg/ml) i i fiziološke otopine kao kontrole, te njihovog djelovanja na pojedini izolirani bakterijski soj dobiven iz kliničkih uzoraka. Rezultati su prikazani u Tablicama 5.28. i 5.29. podijeljenim prema Gram- pozitivnim i Gram-negativnim sojevima, zasebno za svaki soj. U tablicama koje prikazuju Gram-negativne sojeve (Tablica 5.29.) rađena je statistička obrada Friedmanovim testom za zavisne uzorke, odvojeno za osjetljive i rezistentne sojeve te isto tako obrada koja je podrazumijevala spajanje osjetljivih i rezistentnih sojeva za pojedinu izoliranu bakterijsku vrstu (Tablica 5.30.).

Tablica 5.29. Prikaz rezultata Friedmanovog testa za zavisne uzorke pri testiranju značajnosti razlika između različitih koncentracija konvencionalnih antibiotika i pentadekapeptida BPC 157 na izolirani bakterijski soj za Gram-pozitivne sojeve

S. aureus	**χ^2 test***	**Df†**	**p**	**N‡**
Ampicilin	4,000	4	> 0,99	10
Gentamicin	4,000	4	> 0,99	10
Vankomicin	7,871	4	> 0,99	10
Eritromicin	0,000	4	> 0,99	10

E. faecalis	**χ^2 test***	**Df†**	**p**	**N‡**
Ampicilin	0,000	4	> 0,99	10
Gentamicin	0,000	4	> 0,99	10
Vankomicin	8,000	4	0,20	10
Eritromicin	0,000	4	> 0,99	10

MRSA[§]	χ^2 test*	Df[†]	p	N[‡]
Ampicilin	0,000	4	> 0,99	10
Gentamicin	0,000	4	> 0,99	10
Vankomicin	4,000	4	> 0,99	10
Eritromicin	0,000	4	> 0,99	10

VRE[‖]	χ^2 test*	Df[†]	p	N[‡]
Ampicilin	0,000	4	> 0,99	10
Gentamicin	0,000	4	> 0,99	10
Vankomicin	0,000	4	> 0,99	10
Eritromicin	0,000	4	> 0,99	10

*Friedmanov χ^2 test; [†]stupnjevi slobode; [‡]broj sojeva; [§]*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; [‖]*Vancomycin-Resistant Enterococcus*

Pregledom Tablice 5.29. može se uočiti kako nisu dobivene statistički značajne razlike u antimikrobnom djelovanju na izolirani bakterijski soj, s obzirom na korištene koncentracije pojedinih antibiotika (ampicilin, gentamicin, vankomicin, eritromicin) i pentadekapeptida BPC 157 (512µg/ml, 51,2 µg/ml, 5,12 µg/ml, 0,51 µg/ml), uz fiziološku otopinu kao kontrolu, odnosno, pokazalo se da različite koncentracije pentadekapeptida BPC 157 nemaju utjecaja na antimikrobnu učinkovitost pojedinog antibiotika na pojedini izolirani bakterijski soj za Gram-pozitivne sojeve koje podrazumijevaju *S.aureus*, *E.faecalis*, MRSA i VRE.

Tablica 5.30. Prikaz rezultata Friedmanovog testa za zavisne uzorke pri testiranju značajnosti razlika između različitih koncentracija konvencionalnih antibiotika i pentadekapeptida BPC 157 na izolirani bakterijski soj za Gram-negativne, osjetljive i rezistentne sojeve

E.coli-S*	χ^2 test[†]	Df[‡]	p	N[§]
Ceftazidim	0,00	4	> 0,99	10
Ciprofloksacin	0,00	4	> 0,99	10
Imipenem	0,00	4	> 0,99	10
Amikacin	0,00	4	> 0,99	10

***E.coli*-R**‖	**χ^2 test**†	**Df**‡	**p**	**N**§
Ceftazidim	0,00	4	> 0,99	10
Ciprofloksacin	0,00	4	> 0,99	10
Imipenem	0,00	4	> 0,99	10
Amikacin	0,00	4	> 0,99	10

***Kl.pneumoniae*-S**	**χ^2 test**†	**Df**‡	**p**	**N**§
Ceftazidim	0,00	4	> 0,99	10
Ciprofloksacin	0,00	4	> 0,99	10
Imipenem	0,00	4	> 0,99	10
Amikacin	0,00	4	> 0,99	10

***K.pneumoniae*-R**‖	**χ^2 test**†	**Df**‡	**p**	**N**§
Ceftazidim	4,00	4	> 0,99	10
Ciprofloksacin	0,00	4	> 0,99	10
Imipenem	0,00	4	> 0,99	10
Amikacin	0,00	4	> 0,99	10

***A.baumanii*-S**	**χ^2 test**†	**Df**‡	**p**	**N**§
Ceftazidim	3,33	4	0.90	10
Ciprofloksacin	4,00	4	> 0,99	10
Imipenem	4,00	4	> 0,99	10
Amikacin	4,00	4	> 0,99	10

***A.baumanii*-R**‖	**χ^2 test**†	**Df**‡	**p**	**N**§
Ceftazidim	4,00	4	> 0,99	10
Ciprofloksacin	0,00	4	> 0,99	10
Imipenem	0,00	4	> 0,99	10
Amikacin	2,86	4	0.92	10

***P.aeruginosa*-S**	**χ^2 test†**	**Df‡**	**p**	**N§**
Ceftazidim	4,00	4	> 0,99	10
Ciprofloksacin	0,00	4	> 0,99	10
Imipenem	0,00	4	> 0,99	10
Amikacin	0,00	4	> 0,99	10
***P.aeruginosa*-R‖**	**χ^2 test†**	**Df‡**	**p**	**N§**
Ceftazidim	0,00	4	> 0,99	10
Ciprofloksacin	0,00	4	> 0,99	10
Imipenem	0,00	4	> 0,99	10
Amikacin	0,00	4	> 0,99	10

*osjetljivi soj;

†Friedmanov χ^2 test;

‡stupnjevi slobode;

§broj sojeva;

‖rezistentni soj

Pregledom Tablice 5.30. može se uočiti kako nisu dobivene statistički značajne razlike u djelovanju na izolirani bakterijski soj, s obzirom na korištene koncentracije pentadekapeptida BPC 157 (512µg/ml, 51,2 µg/ml, 5,12 µg/ml, 0,51 µg/ml) u kombinaciji sa pojedinim antibioticima (ceftazidim, ciprofloksacin, imipenem, amikacin) i uz fiziološku otopinu kao kontrolu, odnosno, pokazalo se da različite koncentracije pentadekapeptida BPC 157 nemaju utjecaja na antibakterijsko djelovanje pojedinog antibiotika na pojedini izolirani bakterijski soj za Gram-negativne sojeve koje podrazumijevaju *E.coli*-S (p>0,5), *E.coli*-R (p>0,5), *Kl.pneumoniae*-S (p>0,5), *Kl.pneumoniae*-R (p>0,5), *Acinetobacter*-S (p>0,5), *Acinetobacter*-R, Pseudomonas-S i *Pseudomonas*-R.

Tablica 5.31. Prikaz rezultata Friedmanovog testa za zavisne uzorke pri testiranju značajnosti razlika između različitih koncentracija konvencionalnih antibiotika i pentadekapeptida BPC 157 na Gram-negativne izolirane bakterijske sojeve sa zajedničkim rezultatima za osjetljive i rezistentne sojeve

***E. coli* S*+R†**	**χ^2 test‡**	**Df§**	**p**	**N‖**
Ceftazidim	0,00	4	> 0,99	20
Ciprofloksacin	0,00	4	> 0,99	20
Imipenem	0,00	4	> 0,99	20
Amikacin	0,00	4	> 0,99	20
***K.pneumoniae* S*+R†**	**χ^2 test‡**	**Df§**	**p**	**N‖**
Ceftazidim	4,00	4	> 0,99	20
Ciprofloksacin	0,00	4	> 0,99	20
Imipenem	0,00	4	> 0,99	20
Amikacin	0,00	4	> 0,99	20
***A.baumanii* S*+R†**	**χ^2 test‡**	**Df§**	**p**	**N‖**
Ceftazidim	0,00	4	> 0,99	20
Ciprofloksacin	0,00	4	> 0,99	20
Imipenem	0,00	4	> 0,99	20
Amikacin	0,00	4	> 0,99	20
***P.aeruginosa* S*+R†**	**χ^2 test‡**	**Df§**	**p**	**N‖**
Ceftazidim	4,00	4	> 0,99	20
Ciprofloksacin	0,00	4	> 0,99	20
Imipenem	0,00	4	> 0,99	20
Amikacin	0,00	4	> 0,99	20

*osjetljivi soj;

†rezistentni soj;

‡Friedmanov χ^2 test;

§stupnjevi slobode;

‖broj sojeva

Pregledom Tablice 5.31. može se uočiti kako nisu dobivene statistički značajne razlike u nastanku antibakterijske aktivnosti na iz kliničkih uzoraka izolirane bakterijske sojeve s obzirom na korištene koncentracije pojedinih antibiotika (ceftazidim, ciprofloksacin, imipenem, amikacin) i pentadekapeptida BPC 157 (512µg/ml, 51,2 µg/ml, 5,12 µg/ml, 0,51 µg/ml), uz fiziološku otopinu kao kontrolu, odnosno, pokazalo se da različite koncentracije pojedinog antibiotika i pentadekapeptida BPC 157, nemaju utjecaja na antibakterijsku aktivnost pojedinog izoliranog bakterijskog soja za Gram-negativne sojeve koje podrazumijevaju *E.coli*, *Kl.pneumoniae*, *Acinetobacter baumanii* i *Pseudomonas aeruginosa* .

6. RASPRAVA

Na temelju rezultata *in vitro* istraživanja mikrodilucijskom metodom, na 120 bakterijskih sojeva, izoliranih iz različitih kliničkih uzoraka, među kojima su zastupljeni i Gram-pozitivni i Gram-negativni bakterijski sojevi i to iz skupina osjetljivih i rezistentnih sojeva, nije dokazana direktna antimikrobna aktivnost.

Sinergistički ili aditivni učinci, između BPC 157 i izabranih antibiotika, ispitivani su pomoću dvije standardne metode, prema CLSI (115), metode mikrodilucije i disk-difuzijske metode.

Metodom mikrodilucije nisu utvrđeni antimikrobni učinci niti za jednu ispitivanu koncentraciju testiranih konvencionalnih antibiotika uz dodatak BPC 157 ili ispitivanu bakterijsku vrstu s izuzetkom malog, ali statistički značajnog antimikrobnog učinka u kombinaciji imipenema i BPC 157 kod osjetljivih sojeva *E. coli*.

Postoji mogućnost da je BPC 157 svojim fizikalno-kemijskim osobinama potpomogao *in vitro* djelotvornost imipenema (karbapenem) koja je vrlo izražena zbog dobre penetracije kroz vanjsku membranu Gram-negativnih bakterija i visokog afiniteta za PBP (penicilin binding protein)-molekule što u konačnici uzrokuje elongaciju i lizu stanica. Za karbapeneme je ključno što se mogu vezati za više različitih penicilin-vezujućih proteina. (116, 64).

Takav učinak nije primijećen kod djelovanja ostalih testiranih antibiotika na njihove mehanizme djelovanja: ampicilin (aminopenicilin) i ceftazidim (cefalosporin), inhibiraju sintezu peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiraju aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana. Vankomicin (glikopeptid) inhibira sintezu peptidoglikana u staničnoj stijenci bakterije stvaranjem kompleksa s D-alanil-D alaninom, koji je prekursor staničnog zida. Ciprofloksacin (kinolon) inhibira sintezu bakterijske DNK blokiranjem enzima DNK-giraze. Eritromicin (makrolid) inhibira sintezu proteina vezanjem na 50S podjedinicu ribosoma, a mjesto vezanja je 23S rRNK (ribosomske RNK). Amikacin i gentamicin (aminoglikozidi) imaju tri mehanizma djelovanja na bakterijsku stanicu: vežu se na receptore na 30S podjedinici ribosoma i sprječavaju vezanje glasničke RNK (mRNK) na ribosom i stvaranje inicijacijskog kompleksa, pogrešno očitavanje genetskog koda što dovodi do ugrađivanja „krivih“ aminokiselina u polipeptidni lanac i sinteze nefunkcionalnih bjelančevina koje ne mogu vršiti svoju ulogu kao enzimi ili strukturni elementi bakterijske

stanice, vezanje aminoglikozida dovodi do pucanja polisoma i nastanka monosoma koji ne mogu vršiti sintezu bjelančevina.
Od stotina različitih β-laktama, karbapenemi posjeduju najširi spektar aktivnosti i najveću potenciju protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (1, 64, 116).

Ta razlika nije utvrđena kombiniranom metodom disk-difuzijskog ispitivanja sinergističkog ili aditivnog učinka istih konvencionalnih antibiotika uz dodatak 4 različite koncentracije BPC 157, na istim ispitivanim bakterijskim sojevima.

Uzmemo li tu činjenicu u obzir kao i činjenicu da se u testiranju antimikrobne osjetljivosti mikrodilucijskom metodom prema CLSI (117), može dogoditi pomicanje za jedno razrjeđenje naviše ili naniže pri određivanju MIK-a, što je moglo rezultirati pronađenom statističkom značajnošću (p=0,02), nameće se zaključak da je krajnji rezultat kombinirane primjene ovih ispitivanih konvencionalnih antibiotika i BPC 157 indiferentan učinak.

Za razliku od opažanja u ovom istraživanju, već prije su dobro opisani brojni drugi antimikrobni učinci BPC 157, primijenjeni u različitim modelima (9, 16). Značajno je napomenuti da je u ispitivanjima antiviralne aktivnosti BPC 157 *in vivo* uočen antivirusni učinak na herpes viruse, citomegalovirus, influence tip A virus i virus krpeljnog encefalitisa (9, 16, 17). Primjerice, primjena BPC 157 u modelu ARBO-virusne infekcije pokusnih životinja (miševa) omogućila je potpni izostanak ili odgođenu pojavu simptoma i smrtnog ishoda u ovisnosti o načinu primjene BPC 157 - pretretman prije virusnog izlaganja ili primjena BPC 157 istovremeno s aplikacijom virusa u usporedbi s ne tretiranim miševima. Još je važnije opažanje da je primjena BPC 157 u miševa s teškom i uznapredovalom bolešću dovodila do zančajanog prolongiranja preživljenja (9,17). Sličan je učinak opažen i primjenom BPC 157 u *in vitro* modelu HSV (Herpes simplex virus) infekcije u VERO staničnoj kulturi gdje je opažena inhibicija virusne reprodukcije kao i onemogućavanje citopatičnih učinaka virusa (9, 17).

Sukladno ovom podatku, BPC 157 pokazuje osobine antimikrobnog peptida, a što potvrđuju i fizikalno kemijska svojstva koja BPC 157 posjeduje. Aminokiselinski je dio sastavljen od 15 aminokiselina (16 - 24) , topljiv je u vodi i fiziološkoj otopini (15, 118) što se smatra iznimno značajnim za antimikrobne peptide jer im to svojstvo omogućava prolazak kroz lipidne membrane (119). Za razliku od većine drugih peptida, djeluje sam, bez nosača (15) te se njegova učinkovitost odnosi samo na njega (120). Otopljen u vodi ili vodi/alkoholu, ponaša se

kao kation i netoksičan je (9, 121, 122), za razliku od problema toksičnosti koji prati već prve otkrivene antimikrobne peptide poput gramicidina, tyrocidina (38).
Ovo je ispitivanje uz postavljenu hipotezu, rezultat potrebe iznalaženja novih antimikrobnih lijekova.

Pojava prvih antibiotika značila je revolucionaran preokret u liječenju bolesti uzrokovanih mikroorganizmima, na prvom mjestu bakterijama. Paul Ehrlich je 1904. godine otkrio salvarzan, a potom su kemičari Klarer i Mietzsch sintetizirali, a Gerhardt Domagk je testirao sulfonamide koji su i uvedeni u uporabu. Penicilin je otkrio Alexander Fleming 1928. godine, a njegova je proizvodnja i uporaba počela 1945. godine (1).

Od 1945. do 1955. godine tijekom razvoja penicilina, streptomicina, kloramfenikola i tetraciklina, potaknuto je antibiotsko doba. Značilo je to pravi začetak razvoja i primjene antibiotika. Iza ovih su otkrića uslijedila brojna otkrića antibiotika, naročito u periodu od pedesetih do sedamdesetih godina, stoga se ovaj period naziva „zlatnim dobom“ u otkrivanju antibiotika (123).

Ubrzo nakon stavljanja penicilina u uporabu, Fleming je upozorio na potencijalnu mogućnost razvoja rezistencije na isti (2).

Tijekom „zlatnog doba“ antibiotika, mogućnost se razvoja rezistencije bitno povećala uslijed neracionalne uporabe antibiotskih lijekova u medicinskoj i veterinarskoj praksi, prehrambenoj industriji te poljoprivredi na globalnoj razini. Taj se problem komplicira uslijed neprimjerenog marketinškog promicanja tih lijekova farmaceutskih tvrtki čime se povećava njihova dostupnost u javnosti i time njihova neprikladna uporaba (124).

Uspješna uporaba protumikrobnih lijekova koji se koriste u liječenju bakterijskih, gljivičnih, parazitskih i virusnih infekcija, ugrožena je potencijalnim razvojem otpornosti na te lijekove od trenutka kada se prvi put koriste. Za to može biti odgovoran široki raspon biokemijskih i fizioloških mehanizama (125).

Uporabu antibiotika prati brza pojava otpornih, prije svega, bakterijskih sojeva. Znanstvenici upozoravaju na povratak u „pred antibiotsko doba“, naime, nedavna baza podataka navodi postojanje više od 20.000 potencijalno otpornih gena (r gena) od gotovo 400 različitih tipova, pronađenih u glavnim od raspoloživih sekvenci bakterijskih genoma (126).

Dakle, treba stalno imati na umu da je „sustav“ potencijalno otpornih gena trenutačno stanje sukladno evolucijskoj stečevini pa treba očekivati sve složenije genske modele i sustave jer rezultat takvih stečevina potvrđuje imperativ održavanja života kao nepresušnog izvora novih saznanja.

Povećana antimikrobna rezistencija je uzrok teških infekcija, produženog bolničkog liječenja i povećanog mortaliteta. Jedan od bitnih čimbenika za rješavanje ovoga problema, uz racionalnu uporabu antibiotika i prevenciju infekcija, postoji ogromna potreba za razvojem novih terapijskih sredstava (127, 128).

Novi bi antibakterijski lijekovi trebali zadovoljiti nekoliko zahtjeva: da na njih nema razvijene rezistencije, trebaju biti širokog spektra djelovanja, ne pokazivati unakrižnu nepodudarnost s drugim lijekovima i pratiti trenutne potrebe čovjeka (129).

Osamdesetih su godina prošloga stoljeća meta istraživanja, sa ciljem iznalaženja novih antimikrobnih lijekova, antimikrobni peptidi (130).

Peptidi za zaštitu domaćina nude jedinstvenu alternativu mnogim postojećim odobrenim antibioticima. Djelujući na domaćina, a ne na patogen, peptidi nude više prednosti u odnosu na tradicionalne tretmane lijekovima, kao što je sporija sklonost ka razvoju antimikrobne rezistencije, široki spektar aktivnosti i niži rizik za pacijenate (128).
Brojna su istraživanja različitih antimikrobnih peptida rezultirala posebno obećavajućim rezultatima za uporabu protiv infekcija uzrokovanih multirezistentnim mikroorganizmima (131 - 133).

Antibakterijski peptidi su među najbolje istraženim antimikrobnim peptidima. Većina su kationi i njihov je mehanizam djelovanja na lipidni dvosloj bakterijske stanične membrane (133, 134). Razaranju bakterijske stanice prethodi narušavanje negativno nabijenog integriteta stanične membrane; inhibicija sinteze proteina i nukleinskih kiselina kao i interakcija s intracelularnim elementima (38).

Rezultati ovog *in vitro* istraživanja antibakterijskog učinka BPC 157 ne potvrđuju postavljenu hipotezu koja se zasnivala na predkliničkim ispitivanjima *in vivo* u kojima je BPC 157 pokazao visoku učinkovitost, bez obzira je li primijenjen lokalno ili sistemski (35).

Učinak BPC 157 je dobro opisan u cijeljenju različitih ozljeda i rana poput: dubokih opekotina, rana na koži, rana kod dijabetičara, pseudoartroza, presječenih tetiva, presječenih mišića, presječene živce, otkidanje tetiva od kostiju, oštećenja rožnice, peritonitis, ileoilealne anastomoze, kolokolične anastomoze, plućne lezije (34, 135 - 142).

U svim je ovim terapijskim djelovanjima pentadekapeptid efikasan bez obzira da li je primijenjen lokalno ili sistemski (34, 35). S obzriom na značajanu kolonizaciju sluznica bakterijama u navedenim stanjima te podložnost za nastanak infekcija, postavljena je hipoteza o antibakterijskom učinku BPC. Ipak, *in vitro* učinak nije nužno sukladan s *in vivo* učinkom antimikrobnih peptida (118). Osim izravnih učinaka također su opisana svojstva antimikrobnih peptida koji su polučili značajan sinergizam s primjenom antibiotika u *in vitro* istraživanju. Opisano je 13-155 puta smanjenje MIC β-laktamksih antibiotika u testiranju osjetljivosti *Pseudomonas fluorescens* na penicilin i ampicilina u kombinaciji s antibakterijsim peptidima u usporedbi s primjenom antibiotika samostalno (143).

Ovakav je konzistentan učinak izostao u testiranju BPC 157 i konvencionalnih antibiotika te se ne može zaključiti da pentadekapeptid ima sinregistički ili aditivni učinak s testiranim antibioticima i bakterijskim vrstama *in vitro*.

Literaturni podatci govore da antimikrobni peptidi imaju značajnu ulogu u imunomodulaciji i kontroli upale (144-146). Dokazano je da je davanje humanih peptida imalo višestruko zaštitni učinak u *in vivo* modelu infekcije (147).

Uzmemo li u obzir činjenicu da neki antimikrbni peptidi mogu djelovati kao regulatorne molekule što dokazuje *in vitro* studija u kojoj je vidljivo da defenzini imaju sposobnost privući fagocite i limfocite na mjesto infekcije, izazvati proliferaciju fibroblasta te modificirati jonsko protjecanje u epitelnim stanicama (52), ranije opisani blagotvorni i citoprotektivni učinci BPC 157 mogli bi se pripisati upravo takvom imunomodulatornom djelovanju.

U zaključku, antibakterijsko djelovanje BPC 157 *in vitro* kao i njegova interakcija s konvencionalnim antibioticima nedovoljno je poznata i istražena te ne postoje literaturni podatci. U ovom istraživanju nije vidljiv izravan antibakterijski učinak BPC 157 kao niti sinergistički ili aditivni učinak s izabranim antibioticima na testiranim bakterijskim vrstama.

Zaključujući, nalaz iz ovoga pokusa ukazuje da se BPC 157 može sigurno koristiti s antibioticima korištenim u ovoj studiji i da ne može utjecati na učinke antibiotika jer nisu uočeni antagonistički učinci. S druge strane, budući da nikakva posebna antibiotska aktivnost, za razliku od redovitih antimikrobnih peptida, prethodno opisani blagotvorni učinci zasigurno neće biti povezani s bilo kakvom bakterijskom rezistencijom.

Ograničenja i daljnje mogućnosti istraživanja.

Ova je studija tek početak ispitivanja antibakterijske aktivnosti BPC 157, provedena je na šest bakterijskih vrsta i svakako treba nastaviti daljnjim ispitivanjima, između ostalih ispitivanjima na anaerobnim bakterijama.

Zahvaljujući tehnološkom razvoju, sada postoji mogućnost multidisciplinarnog pristupa ispitivanju antimikrobne aktivnosti novosintetiziranih spojeva, uključujući simulaciju molekularne dinamike u kombinaciji s biofizikom i mikrobiologijom što bi pružilo vrijedne uvide u interakcije BPC 157 s bakterijskim membranama na molekularnoj razini (148).

Smatram da dinamički molekularni modeli jamačno jesu prva razina na kojoj nalazimo odgovore kojih su načela istaknuta u ovoj raspravi (imunomodulatorni modeli), pa se mogu očekivati odgovori na ovdje nedovoljno rasvjetljena pitanja, pa i odgovori na za sada još „nepostavljena“ pitanja.

7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenih *in vitro* istraživanja u okviru ove disertacije može se zaključiti:

- da pentadekapeptid BPC 157 nema direktnu antibakterijsku aktivnost na ispitivanim ATCC sojevima i u primjenjenim koncentracijama u ovome istraživanju,

- da pentadekapeptid BPC 157 nema direktnu antibakterijsku aktivnost na ispitivanim sojevima izoliranim iz kliničkih uzoraka i u primjenjenim koncentracijama u ovome istraživanju,

- da na ispitivanim ATCC sojevima, u kombinaciji s testiranim antibioticima u navedenim koncentracijama, nije uočen sinergistički učinak,

- da na ispitivanim sojevima, izoliranim iz kliničkih uzoraka, u kombinaciji s testiranim antibioticima u navedenim koncentracijama, nije uočen sinergistički učinak, osim manjeg, ali statistički značajnog učinka s imipenemom na osjetljivim sojevima *Escherichiae coli.*

- S obzirom da nije uočena pojava antagonizma između BPC 157 i testiranih antibiotika, može se zaključiti da se isti mogu koristiti zajedno bez bojazni o neželjenim posljedicama.

8. SAŽETAK

Cilj: Cilj je ovog istraživanja bio ispitati efekte pentadekapeptida BPC 157 samoga i u kombinaciji s uobičajenim antibioticima *in vitro* mikrodiluacijskom i disk difuzijskom metodom.

Materijali i metode: Za ispitivanje su antibakterijskih učinaka BPC 157 i njegove interakcije s antibioticima odabrani standardni sojevi i klinički izolati najznačajnijih bakterijskih infektivnih patogena. Istraživanje je obuhvatilo ukupno 120 osjetljivih i otpornih bakterijskih sojeva izoliranih iz kliničkih uzoraka: *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*; kao i ATCC sojevi: *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterococcus faecalis* 29212, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Escherichia coli* 25922, *Acinetobacter baumannii* 19606, *Klebsiella pneumoniae* 700803. Za ispitivanje sinergističkog ili antagonističkog učinka korišteni su za Gram pozitivne sojeve: ampicilin, eritromicin , gentamicin, vankomicin, dok su amikacin, ceftazidim, ciprofloksacin i imipenem korišteni za testiranje Gram negativnih bakterijskih sojeva.

Rezultati: Sinergističke ili antagonističke učinke između BPC 157 i odabranih testiranih antibiotika metodom difuzne diska nisu otkrivene za bilo koju testiranu koncentraciju i za ispitane bakterijske sojeve ispitivanjem razrjeđivanja osim iz kombinacije imipenema i BPC 157 u osjetljivim sojevima *E.coli*.

Zaključak: BPC 157 može se sigurno koristiti s antibiotikom korištenim u ovoj studiji i ne može ometati učinke antibiotika. Budući da nije otkrivena nikakva posebna antibiotska aktivnost, za razliku od redovitih antimikrobnih peptida, prethodno opisani korisni učinci zasigurno neće biti povezani s bilo kojom vrstom otpornosti na bakterije.

Ključne riječi: BPC 157, antibiotici, antibakterijski učinak, sinergistički antibakterijski učinak

9. SUMMARY

In vitro evaluation of antibacterial activity of pentadecapeptide BPC 157

Aim: The aim of this study was to examine the effects of pentadecapeptide BPC 157 independently and in combination with conventional antibiotics *in vitro* microdilution and disc-diffusion sensitivity testing.

Materials and Methods: For testing antibacterial effects of BPC 157 and its interaction with antibiotics, standard as well as clinical isolates of the most significant bacterial infection pathogens have been selected. The study included a total of 120 susceptible and resistant bacterial strains isolated from clinical specimens: *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*; as well as ATCC strains: *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterococcus faecalis* 29212, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Escherichia coli* 25922, *Acinetobacter baumannii* 19606, *Klebsiella pneumoniae* 700803. For testing of synergistic or antagonistic effect the antibiotics for Gram positive strains were used such as ampicillin, erythromycin, gentamicin, vancomycin, while amikacin, ceftazidime, ciprofloxacin and imipenem were used for Gram negative strains.

Results: The synergistic or antagonistic effects between the BPC 157 and the selected tested antibiotics by the disc diffusion method are not detected for any tested concentration and for investigated bacterial strains by the dilution test within the exception of the combination of imipenem and BPC 157 in susceptible strains of *E. coli.*

Conclusion: BPC 157 could be safely used with the antibiotic used in the present study and it cannot interfere with the antibiotic effects. Since no particular antibiotic activity was detected, unlike regular antimicrobial peptides, the beneficial effects previously described would certainly be unrelated to any kind of bacterial resistance.

Keywords: BPC 157, antibiotics, antibacterial effect, synergistic antibacterial effect

10. LITERATURA

1. Bedenić,B Antibakterijski lijekovi // Medicinska mikrobiologija / Uzunović-Kamberović, Selma (ur.).Zenica : Štamparija Fojnica d.o.o, 2009. Str. 221-252.
2. Aminov R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. Biochem Pharmacol. 2017;133:4-19.
3. Brown KL, Hancock RE. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. Curr Opin Immunol. 2006;18(1):24–30.
4. Yount NY, Yeaman MR. Emerging Themes and Therapeutic Prospects for Anti-Infective Peptides. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2012;52(1):337–60.
5. Kalenić S, Bedenić B. Antibakterijski lijekovi. U: Kalenić S (ur). Medicinska mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb, 2013. str. 97-116.
6. WHO. World Health Day 2011: Policy Briefs. Available online: http:// www. who. int/ worldhealth -day/2011/policybriefs/en/ (accessed on 15 June 2015).
7. Uchil, Rajesh R et al. Strategies to Combat Antimicrobial Resistance. J Clin Diagn Res. 2014;(7): ME01–ME04.
8. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J Infect Dis 2009;197:1079-81.
9. Patent Sikirić P i sur, EP0 572688.
10. Grabarevic Z, Tisljar M, Artukovic B, Bratulic M, Dzaja P, Seiwerth S, Sikiric P, Peric J, Geres D, Kos J. The influence of BPC 157 on nitric-oxide agonists and antagonist induced lesions in broiler chicks. J Physiol 1997; 91:139-49.
11. Kalogjera L, Ries N, Baudoin T, Ferencic Z, Protic R, Pegan B. Dose dependent protective effect of BPC 157 in capasaicin induced rhinitis in rats. Eur Arch Otorhynolaringol 1997; 254: 9-11.

12. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Stancic Rokotov D, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, Drmic D, Ilic S, Kolenc D, Aralica G, Safic H, Suran J, Rak R, Dzidic S, Vrcic H and Sebecic B. Toxicity by NSAIDs. Counteraction by Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157. Curr Pharm Des. 2013;19(1):76-83.

13. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Stancic Rokotov D, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, Drmic D, Ilic S, Kolenc D, Aralica G, Stupnisek M, Suran J, Barisic I, Dzidic S, Vrcic H, Sebecic B. Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157-NO-system Relation. Curr Pharm Des. 2014; 20,1126-1135.

14. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L et all. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. Curr Pharm Des. 2011;17(16):1612-32.

15. Seiwerth S, Sikirić P, Grabarević Z, et al. BPC 157 effect on healing. J. Physiol (Paris). 1997; 91:173-178.

16. Sikiric P, Seiwerth S, Deškovic S et all. New model of cytoprotection/adaptive cytoprotection in rats: endogenous small irritants, antiulcer agents and indomethacin.European J Pharmacology. 1999;364;23-31.

17. Sikiric P, Petek M, Rucman R et all. A new gastric juice peptide BPC. An overwiev of stomach– stress – organoprotection hypothesis and beneficial effects of BPC. J Physiol Paris. 1993;87:313-27.

18. Sikiric P, Banic M, Brkic Tet all. Effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 and methylprednisolone in a murine model of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1993;104:A782.

19. Veljaca M, Pllana R, Lesch CA, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. Protective effect of BPC-157 on a rat model of colitis. Gastroenterology 1994;106:789.

20. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic Let all. Stable gastric pentadecapeptid BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva, Croatia). Full and distended stomach, and vascular response. Inflammopharmacology 2006;14:214-21.

21. Pare W, Klucyznski JM.The effect of new gastric juice peptide BPC on classic stress triad in stress procedure. Exp Clin Gastroenterol. 1992; 2:234-6.

22. Xue XC, Wu YJ, Gao MT et all. Protective effects of pentadecapeptide BPC 157 on gastric ulcer in rats. World J Gastroenterol 2004;10:1032-6.

23. Pflaum Z, Rucman R. Solid phase peptide synthesis of the fragment BPC 157 of human gastric juice protein BPC and its analogues. Acta Chim Slov. 2005;52:34-9.

24. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z et all. Salutary and profilactic effect of pentadecapeptide BPC 157 on acute pancreatitis and concomitant gastroduodenal lesions in rats. Dig Dis Sci. 1996; 41:1518-26.

25. Sikiric P, Seiwert S, Grabarevic Ž et all. The influence of a novel pentadecapeptide BPC 157, on NG-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. European J Pharmacology. 1997; 332:23-33.

26. Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z, Zoricic I, Hanzevacki M, Ljubanovic D, Coric V, Konjevoda P, Petek M, Rucman R, Turkovic B, Perovic D, Mikus D, Jandrijevic S, Medvidovic M, Tadic T, Romac B, Kos J, Peric J, Kolega Z. BPC 157's effect on healing. J Physiol Paris. 1997; 91(3-5):173-8.

27. Sikiric P, Seiwerth S, Deškovic S et all. New model of cytoprotection/adaptive cytoprotection in rats: endogenous small irritants, antiulcer agents and indomethacin. European J Pharmacology. 1999;364;23-31.

28. Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z et all. BPC 157's effect on healing. J Physiol Paris. 1997;91(3-5):173-8.

29. Skorjanec S, Dolovski Z, Kocman I et all. Therapy for unhealed gastrocutaneous fistulas in rats as a model for analogous healing of persistent skin wounds and persistent gastric ulcers: stable gastric pentadecapeptide BPC 157, atropine, ranitidine, and omeprazole. Dig Dis Sci. 2009;54(1):46-56.

30. Klicek R, Sever M, Radic B et all. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in the healing of colocutaneous fistulas in rats: role of the nitric oxide-system. JPharmacol Sci. 2008;108(1):7-17.

31. Klicek R, Kolenc D, Suran J et all. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 heals cysteamine-colitis and colon-colon-anastomosis and counteracts cuprizone brain injuries and motor disability. J Physiol Pharmacol. 2013;64(5):597-612.

32. Vuksic T, Zoricic I, Brcic L et all. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL14736, Pliva, Croatia) heals ileoileal anastomosis in the rat. Surg Today. 2007;37(9):768-77.

33. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, Blagaic AB, Zoricic I, Sever M, Klicek R, Radic B, Keller N, Sipos K, Jakir A, Udovicic M, Tonkic A, Kokic N, Turkovic B, Mise S, Anic T. Stable 88 gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva, Croatia). Full and distended stomach, and vascular response. Inflammopharmacology. 2006;14(5-6):214-21.

34. Lucas MG, Bosch RJ, Burkhard FC et all. EAU guidelines on assessment and nonsurgical management of urinary incontinence. Eur Urol. 2012;62(6):1130-4.

35. Veljaca M, Lesch CA, Pllana R et all. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. J Pharmacol. 1995;272(1):417-22.

36. Infectious Diseases Society of America. The 10 x '20 Initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. Clin Infect Dis. 2010; 50(8):1081-3.

37. Hassan M, Kjos M, Nes If, Diep D, Lotfipour F. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. J Appl Microbiol. 2012;113:723–736.

38. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. Pharmaceuticals (Basel). 2013; 6(12):1543-75.

39. Hancock RE. Peptide antibiotics. Lancet. 1997;349, 418–422.

40. M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, Nature.2002; 415: 389–395.

41. Xie L, Miller LM, Chatterjee C, Averin O, Kelleher NL, Donk WA. Lacticin 481: in vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity Science. 2004; 303:679–681.

42. Maloy WL, Kari UP. Structure–activity studies on magainins and other host defense peptides. Biopolymers.1995;37:105–122.

43. Fernandez-Lopez S, Kim HS, Choi EC, Delgado M, Granja JR, Khasanov A, Kraehenbuehl K, Long G, Weinberger DA, Wilcoxen KM, Ghadiri MR. Antibacterial agents based on the cyclic D, l-alpha-peptide architecture. Nature. 2001;412:452–455.

44. Thennarasu S, Lee DK, Tan A, Prasad Kari U, Ramamoorthy A. Antimicrobial activity and membrane selective interactions of a synthetic lipopeptide MSI-843.Biochim Biophys Acta. 2005; 1711: 49–58.

45. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?.Nat. Rev., Microbiol. 2005; 3:238–250.

46. Seo MD, Won HS, Kim JH, Mishig-Ochir T, Lee BJ, Molecules.2012; 17: 12276-12286.

47. R. M. Epand RM, Vogel HJ. Biochim Biophys Acta.1999;1462: 11-28.

48. Sato H, Feix JB. Biochim Biophys Acta. 2006; 1758:1245–1256.

49. Li J, Koh JJ, Liu S, R Lakshminarayanan, Verma CS, Beuerman RW. Membrane Active Antimicrobial Peptides:Translating Mechanistic Insights to Design. Front Neurosci. 2017; 14:11: 73.

50. Reinhardt, Andre, Ines Neundorf. “Design and Application of Antimicrobial Peptide Conjugates.” Int J Mol Sci. 2016 ; 17(5): 701.

51. Bulet P, Stöcklin R, MeninL: Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunol Rev. 2004;198:169-84.

52. Ganz T. The role of antimicrobial Peptide sin Innate Immuniti. Integr Comp Biol 2003; 43(2):300-304.

53. Šeol B, Matanović K, Terzić S. (2010): Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini. Herak-Perković, V.(ur.), Zagreb, HR, Medicinska naklada, str.45-49.

54. Tan SY, Tatsumura Y. Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. Singapore Med J, 2015; 56(7): 366-367.

55. Bhattacharjee MK. Chemistry of Antibiotics and Related Drugs. Basel, Springer, 2016; 1-9

56. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology. (23. izd.) New York, Chicaco, San Francisco, London, Lisbon: Lange MedicalBooks/McGraw-Hill, 2004. 161-195.

57. European Medicines Agency (2008): Penicillins, summary report. Committee for veterinary medicinal products, EMEA, Revision 1, London.

58. Božica Solomun Kolanović, Nina Bilandžić, Maja Đokić, Ivana Varenina, Marija Sedak. Mehanizam djelovanja, biosinteza i identifikacija beta-laktamskih antimikrobnih lijekova. Croat. J. Food Sci. Technol. 2011; 3(2):65-75.

59. Schmitt-Hoffmann A, Roos B, Schleimer M, et al. Single-Dose Pharmacokinetics and Safety of a Novel Broad-Spectrum Cephalosporin (BAL5788) in Healthy Volunteers. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(7):2570-5.

60. Andes DS. Cephalosporins. U:Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, ur.Mandell, Douglas and Bennett' s Principles and Practice of Infectious Disease, 7. izd. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2010;323-340.

61. Meletis G. Carbapenem resistance: over view of the problem and future perspectives. Ther Adv Infect Dis. 2016;3(1):15–21.

62. Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, Lee CR, et all. Structuralbasis for carbapenem hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. Int J Mol Sci. 2015; 16(5): 9654–9692.

63. Moellering RC, Eliopoulos GM, Sentochnik DE. The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics. J AntimicrobChemother. 1989; A:1–7.

64. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. AntimicrobAgents Chemother. 2011;55(11):4943–60.

65. Henry F. Chambers, and Daniel H. Deck (2009): Beta-lactam and other cell wall and membrane active antibiotics. In (Bertram G. Katzung. Basic and Clinical Pharmacology).11ed. McGraw-Hill Medical; 8 (43): 773-793.

66. Zervosen A, Sauvage E, Frere JM, Charlier P, Luxen A. Development ofnewdrugs for anoldtarget - thepenicillinbindingproteins. Molecules. 2012;17(11):12478–505.

67. Hudak JE, Bertozzi CR. Glycotherapy: new advances inspire a reemergence of glycans in medicine. Chem Biol. 2014;21(1):16-37.

68. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 774-898.

69. Becker B, Cooper MA, Aminoglycoside antibiotics in the 21st century.ACS Chem Biol, 2013; 8: 105-15.

70. Joseph D.C. Yao and Robert C. Moellering, JR.(2003):Antibacterial Agents. In (Yao J, Moellering R. 2011. Antibacterial Agents, p 1043-1081. *In* Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D (ed), *Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition.* ASM Press, Washington, DC.

71. Ramirez MS, Tolmasky ME. Amikacin:Uses, Resistance, and Prospects fof Inhibition. Molecules. 2017; 22(12): 2267.

72. Rasigade JP, Vandenesch F. Staphylococcus aureus: a pathogen with still unresolved issues. Infect. Genet. Evol. 2014;21:510-4.

73. Kalenić S. The importance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in human medicine. Medical Sciences. 2012;37:61-71.

74. Budimir A, Bošnjak Z, Kalenić S. Meticilin rezistentni Staphylococcus aureus(MRSA) u Hrvatskoj.Infektološki glasniik. 2012;32(2):59-66.

75. Arciola, C.R., Campoccia, D., Speziale , P., Montanaro, L. & Costerton, J. W. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms i implications for biofilm-resistant materials. Biomaterials. 2012; 33**:** 5967-82.

76. Farran C E, Sekar A, Balakrishnan A, Shanmugam S, Arumugam P, Gopalswamy J. Prevalence of biofilm-producing Staphylococcus epidermidis in the healthy skin of individuals in Tamil Nadu, India. Indian J Med Microbiol. 2013; (1):19-23.

77. Lowy F D. Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med. 1998;339(8):520-32.

78. Köck R, Becker K, Cookson B i sur. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. Euro Surveill 2010; 15: 19688.

79. Arias CA, Murray BE. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008;6:637–55.

80. Murray BE. The life and times of the Enterococcus. Clin Microbiol Rev.1990;3:46–65.

81. Wang Q-Q, Zhang C-F, Chu C-H, Zhu X-F. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *International Journal of Oral Science*. 2012;4(1):19-23.

82. Mikulska M, Del Bono V, Prinapori R, Boni L, Raiola AM, Gualandi F, et al. Risk factors for enterococcal bacteremia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. Transpl Infect Dis. 2010;12:505–12.

83. Weinstock DM, Conlon M, Iovino C, Aubrey T, Gudiol C, Riedel E, et al. Colonization, bloodstream infection, and mortality caused by vancomycin-resistant enterococcus early after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. Biol Blood Marrow Transplant. 2007;13:615–21.

84. Alp S, Akova M. Antibacterial Resistance in Patients with Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases. 2017;9(1):e2017002.

85. Vydra J, Shanley RM, George I, Ustun C, Smith AR, Weisdorf DJ, et al. Enterococcal bacteremia is associated with increased risk of mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Clin Infect Dis. 2012;55:764–70.

86. Budimir A. Enterokoki i ostali gram pozitivni koki u: Medicinska mikrobiologija. Smilja Kalenić i suradnici, Zagreb,Medicinska naklada, 2013. Str.140-143.

87. Ford, C.D., Lopansri, B.K., Haydoura, S., Snow, G., Dascomb, K.K., Asch, J. et al, Frequency, risk factors, and outcomes of vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization and infection in patients with newly diagnosed acute leukemia: different patterns in patients with acute myelogenous and acute lymphoblastic leukemia. Infect Control Hosp Epidemiol. 2015;36:47–53.

88. Kang, Y., Vicente, M., Parsad, B., Brielmeier, B., Pisano, J., Landon, E. et al, Evaluation of risk factors for vancomycin-resistant *Enterococcus* bacteremia among previously colonized hematopoietic stem cell transplant patients. Transpl Infect Dis. 2013;15:466–473.

89. Da Silva GJ, Mendonça N, Silva G Da. Association between antimicrobial resistance and Virulence in Escherichia coli. Virulence. 2012;3(1):18–28.

90. Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli. Foodborne Pathog Dis. 2007;4(2):134–63.

91. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. Nat Rev Microbiol. 2010;8(1):26–38.

92. Von Baum H, Marre R. Antimicrobial resistance of Escherichia coli and therapeutic implications. Int J Med Microbiol. 2005;295(6-7):503–11.

93. Szmolka A, Nagy B. Multidrug resistant commensal Escherichia coli inanimal sandits impact for publichealth. Front Microbiol. 2013;4(9):1–13.

94. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in Escherichia coli and Salmonella: Recent developments. Int J Antimicrob Agents. 2005;25(5):358–73.

95. Sáenz Y, Zarazaga M, Briñas L, Lantero M, Ruiz-Larrea F, Torres C. Antibiotic resistance in Escherichia coli isolates obtained from animals, foods and humansin Spain. Int J AntimicrobAgents. 2001;18(4):353–8.

96. Jelesic Z, Gusman V, Mihajlovic-Ukropina M, Kulauzov M, Medic D. Resistance of Escherichia coli from healthy donors and from food: anindicator of antimicrobial resistance levelin the population. Med Pregl. 2011;64(7-8):397–402.

97. Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouvelekis LS. Escherichia coli with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(1):395–7.

98. Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid Evolution and spread of carbapenemase samong Enterobacteriaceaein Europe. Clin Microbiol Infect. 2012;18(5):413–31.

99. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of Klebsiella pneumoniae. Future Microbiol. 2014;9(9):1071–81.

100. Gupta A. Hospital-acquired infection sinthen eonatal intensive care unit-Klebsiella pneumoniae. Semin Perinatol. 2002;26(5):340–5.

101. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) Klebsiella pneumoniae: anewanddangerousbreed. Virulence. 2013;4(2):107–18.

102. Xia J, Gao J, Tang W. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. Bio sci Trends. 2016;10(1):14–21.

103. Schroll C, Barken KB, Krogfelt K a, Struve C. Role oftype 1 and type 3 fimbriae in Klebsiella pneumoniae biofilm formation. BMC Microbiol. 2010;10:179.

104. Jagnow J, Clegg S. Klebsiella pneumoniae MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix – and collagen – coated surfaces. Microbiology. 2003; 149 (9) :2397–405.

105. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M. Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases. Lancet Infect Dis. 2013;13(9):785-96.

106. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE!. Clin Infect Dis. 2009;48(1):1–12.

107. Ramirez MS, Traglia GM, Lin DL, Tran T, Tolmasky ME. Plasmid-mediated antibiotic resistance and virulence in gram-negatives: theparadigm. Microbiol Spectr. 2014;2(5):1–15.

108. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clonesin the dissemination of antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 2011;35(5):736–55.

109. Drenjančević, D, Vraneš, J, Pseudomonas, acinetobacter i srodne bakterije u: Medicinska mikrobiologija. Smilja Kalenić i suradnici, Zagreb, Medicinska naklada, 2013; 222-225.

110. Howard, Aoife et al. Acinetobacter Baumannii: An Emerging Opportunistic Pathogen. Virulence. 2012; 3.3 243–250.

111. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. Perspect Medicin Chem. 2014; 6:25-64.

112. Cabot G, Zamorano L, Moyà B, et al. Evolution of Pseudomonas aeruginosa Antimicrobial Resistance and Fitness under Low and High Mutation Rates. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(3):1767-78.

113. Drenjančević D, Vraneš J. Pseudomonas, acinetobacter i srodne bakterije u: Medicinska mikrobiologija. Smilja Kalenić i suradnici, Zagreb,Medicinska naklada, 2013; 214-220.

114. Yeung ATY, Janot L, Pena OM, et al. Requirement of the Pseudomonas aeruginosa CbrA Sensor Kinase for Full Virulence in a Murine Acute Lung Infection Model. Payne SM, ed. Infection and Immunity. 2014;82(3):1256-1267.

115. Clinical and Laboratory Standards Institute 2015, CLSI methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-tenth edition, CLCI document M07-A10, Wayne PA.

116. Chambers H F, Deck, D H. (2009): Beta-lactam and other cell wall and membrane active antibiotics. In (Bertram G. Katzung. Basic and Clinical Pharmacology).11ed. McGraw-Hill Medical; 8 (43): 773-793.

117. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2001. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters; approved guideline 2nd ed. CLSI document M23-A2. CLSI, Wayne, PA.

118. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, et al. Focus on ulcerative colitis:stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Curr Med Chem.2012;19: 126-32.

119. Chen Y et al. Rational Design of α-Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity/Therapeutic Index. J Biol Chem. 2005; 280(13): 12316–12329.

120. Urist MR. The first three decades of bone morphogenetic protein. Osteologie. 1996;4:207–233.

121. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Kolenc D, Batelja Vuletic L, Drmic D et all. Brain-gut axis and pentadecapeptide BPC 157: Theoretical and practical implications. Curr Neuropharmacol. 2016; 14(8):857-865.

122. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Drmic D, Stupnisek M, Kokot A et all. Stress in gastrointestinal tract and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Finally, do we have a solution? Curr Pharma Des. 2017; 23(27):4012-4028.

123. Clardy J, Fischbach M, Currie C. The natural history of antibiotics. Curr Biol. 2009;19(11):R437-41.

124. Godfrey S. Bbosa, Norah Mwebaza, John Odda, David B. Kyegombe, Muhammad Ntale , Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. Health. 2014;6(5):410-425.

125. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010;74(3):417-33.

126. Liu B, Pop M. ARDB—Antibiotic Resistance Genes Database. Nucleic Acids Res. 2009;37(Database issue):D443-7.

127. Simonsen SG, Tapsall WJ, Allegranzi B, Talbot EA, Lazzari S. The antimicrobial resistance containment and surveillance approach – a public health tool. Bulletin of the World Health Organisation. 2004; 82 (12).

128. Zerfas BL, Gao J. Recent Advances in Peptide Immunomodulators. Curr Top Med Chem. 2015;16(2):187-205.

129. Laxminarayan R, Powers J. Antibacterial R&D incentives. Nat Rev Drug Discov 2011; 10 (10): 727-8.

130. Wimley WC. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. ACS Chem Biol. 2010; 5(10): 905–917.

131. Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nat Biotechnol. 2006;24(12):1551-7.

132. Haney EF, Mansour SC, Hancock RE. Antimicrobial peptides: an introduction Methods Mol. Biol. 2017;1548:3-22.

133. Shai Y Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. Biopolymers. 2002;66:236-248.

134. Zhang L, Rozek A, Hancock R E 2001; Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. J. Biol. Chem. 276, 35714-35722.

135. Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S et al ; Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuatesburn-gastric lesions in mice. Burns 27: 817-27.23, 2001

136. Sikiric P, Seiwerth S, Mise S, Staresinic M, Bedekovic V, Zarkovic N et al (2003). Corticosteroid-impairment of healing and gastric pentadecapeptide BPC-157creams in burned mice. Burns 29:323-34.

137. Klicek R, Kolenc D, Suran J et al (2013). Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 heals cysteamine-colitis and colon-colon-anastomosis and counteracts cuprizone brain injuries and motor disability. J Physiol Pharmacol 64(5):597-612.

138. Skorjanec S, Kokot A, Drmić D, Radić B, Sever M, Kličeк R, Kolenc D, Zenko A, Lovrić Benčić M, Belosic Halle Z, Šitum A, Zivanović Posilović G, Masnec S, Šuran J, Aralica G, Seiwerth S, Sikirić P. Duodenocutaneous fistula in rats as a model for "wound healing- therapy" in ulcer healing: the effect of pentadecapeptide BPC 157, L-nitro-arginine methyl ester and L-arginine. J Physiol Pharmacol. 2016; 66:581-590.

139. Lojo N, Rašić Ž, Zenko Sever A, Kolenc D, Vukušić D, Drmić D et all. Effects of Diclofenac, L-NAME, L-Arginine, and Pentadecapeptide BPC 157 on Gastrointestinal, Liver, and Brain Lesions, Failed Anastomosis, and Intestinal Adaptation Deterioration in 24 Hour-Short-Bowel Rats. PLoS ONE. 2016;11(9): e0162590.

140. Grgić T, Grgić D, Drmić D, Zenko Sever A, Petrović I, Sučić M, Kokot A, Kličeк R, Sever M, Seiwerth S, Sikirić P. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 heals rat colovesical fistula. Eur J Pharmacol. 2016; 780: 1-7.

141. Cesarec V, Bečejac T, Mišić M, Djaković Ž, Olujić D, Drmić D, Brčić L, Stančić Rokotov D, Seiwerth S, Sikirić P. Pentadecapeptide BPC 157 and the esophagocutaneous fistula healing therapy. Eur J Pharmacol. 2013;701(1-3): 203–212.

142. Barić M, Zenko Sever, A, Batelja Vuletić L, Rašić Ž, Sever M, Drmić D, Pavelić-Turudić T, Sučić M, Vrčić H, Seiwerth S, Sikirić, P. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 heals rectovaginal fistula in rats. Life Sci. 2016; 148: 63-70.

143. Naghmouchi K, le Lay C, Baah, J, Drider D (2012) Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: Synergistic inhibition of Pseudomonas fluorescens and antibiotic-resistant variants. Res. Microbiol. 163, 101–108

144. Hilchie A, Wuerth K, Hancock REW. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. Nat. Chem. Biol. 2013; 9:761–768.

145. Veldhuizen EJA, Schneider VAF, Agustiandari H, Dijk A, Tjeerdsma-van Bokhoven JLM, Bikker FJ, Haagsman HP. Antimicrobial and Immunomodulatory Activities of PR-39. Derived Peptides. 2014; 9: e95939.

146. Haney EF, Hancock REW. Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. Biopolymers. 2013; 100:572–583.

147. Bommineni, Y. R., G. H. Pham, L. T. Sunkara, M. Achanta, and G. Zhang. 2014.Immune regulatory activities of fowlicidin-1, a cathelicidin host defense peptide.Mol. Immunol.**59: 55–63**

148. Li J, Koh JJ, Liu S, Lakshminarayanan R, Verma CS, Beuerman RW. Membrane Active Antimicrobial Peptides:Translating Mechanistic Insights to Design. Front Neurosci. 2017;11:73.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Jasminka Talapko

Zvanje: viši predavač

Adresa: Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo,Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Crkvena 21, Osijek

E-mail: jtalapko@mefos.hr

Država: Republika Hrvatska

Datum i mjesto rođenja: 7. ožujka 1960.,Tenja

Obrazovanje:

od 2012. Poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayer u Osijeku

2011. Pedagoško - psihološka i didaktičko - metodička naobrazba, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Učiteljski fakultet Osijek

2008. Diplomirani inženjer med. lab. dijagnostike, Fakultet zdravstvenih studija Sarajevo

2006. Prvostupnica (Baccalaurea) medicinsko laboratorijske dijagnostike, Zdravstveno veleučilište Zagreb

1993. Medicinsko-laboratorijski inženjer, Viša medicinska škola Medicinskog fakulteta sveučilišta u Zagrebu

1979. Medicinska škola Osijek, smjer Farmaceutski tehničar

Zaposlenje:

2017. Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo Sveučilišta J.J. Strossmayera Osijek

1998. Medicinski fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera Osijek, Katedra za mikrobiologiju i parazitologiju

1982. Medicinski fakultet Zagreb, dislocirani Studij medicine Osijek, Katedra za mikrobiologiju i parazitologiju

1982. Opća bolnica Osijek (za potrebe dislociranog Studija medicine u Osijeku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu- Katedra za mikrobiologiju i parazitologiju)

Stručno usavršavanje:

2017. Poslijediplomski tečaj trajnog usavršavanja 1. kategorije: Multirezistentne nefermentativne bakterije, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, Zagreb

2015. Tečaj „Osnovni principi i primjena protočne citometrije u istraživanju i dijagnostici“, Hrvatsko društvo fiziologa, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera Osijek

2015. Poslijediplomski tečaj trajnog usavršavanja 1. kategorije: Suvremene spoznaje o epidemiologiji, kliničkoj slici, dijagnostici, terapiji i prevenciji TORCH i drugih infekcija trudnica i novorođenčadi, Škola narodnog zdravlja „Andrija Štampar“, Zagreb
2013. Poslijediplomski tečaj trajnog usavršavanja 1. kategorije: Infekcije u putnika: epidemiologija, klinička slika, dijagnostika i prevencija, Škola narodnog zdravlja „Andrija Štampar“, Zagreb
2012. Poslijediplomski tečaj trajnog usavršavanja 1. kategorije: Bolničke infekcije: nove spoznaje o dezinfekciji odjela visokog rizika, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, Zagreb
2011. Pedagoško-psihološka i didaktičko-metodička naobrazba, Sveučilište J. J. Strossmayera, Učiteljski fakultet Osijek,
2007. Zaštita zdravstvenih djelatnika pri radu s uzročnicima infektivnih bolesti, Hrvatska laboratorijska udruga, Klinika za infektivne bolesti, Zagreb

Znanstveni i stručni projekti:

Od 2015. Ispitivanje antibakterijskih učinaka novosintetiziranih spojeva na bazi kumarina i pentadekapeptida BPC 157; Medicinski fakultet Osijek, voditelj doc. dr. sc. Domagoj Drenjančević

Od 2002. do 2005. znanstveno-istraživački projekt «Djelovanje subinhibicijskih koncentracija antibiotika», broj: 0219281, Ministarstvo znanosti i tehnologije Republike Hrvatske,voditelj prof. dr. sc. Jasmina Vraneš;

Nastavna djelatnost: U svojstvu predavača sudjelovala u nastavi 12 kolegija koji su se održavali u Katedri za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Osijek:

- Sveučilišni integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine: Med. mikrobiologija i parazitologija (3. god), Klinička mikrobiologija (4. god), Multirezistentne bakterije – što možemo učiniti? (5. god izborni predmet)
- Sveučilišni preddiplomski studij sestrinstva u Osijeku, Novoj Gradišci, Pregradi i Puli (ak. god. 2014/15): Mikrobiologija i parazitologija (1. god) i
- Sveučilišni diplomski studij sestrinstva: Intrahospitalne infekcije (2. god)
- Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska dijagnostika: Med. mikrobiologija s lab. tehnologijama I, Med. mikrobiologija s lab. tehnologijama II, Klinička mikrobiologija (3. godina)

- Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska dijagnostika: Klinička mikrobiologija i epidemiologija (1 god.)

Od 2000. do 2016.godine radila kao vanjska suradnica u Medicinskoj školi Osijek gdje sudjeluje u izvođenju nastave iz predmeta „Mikrobiologija“. Osim navedenog od 2005. do 2015. godine u sedam mandata je bila državni povjerenik za nadzor natjecanja u Medicinskim školama, smjer Zdravstveno-laboratorijski tehničar. Koautor je interne skripte iz Mikrobiologije za Medicinsku školu za smjerove zdravstveno-laboratorijski tehničar i farmaceutski tehničar. Također je koautor nastavnog materijala “Zbirka radnih zadataka za vježbe, kolegij Mikrobiologija s parazitologijom“, namijenjen studentima Studija sestrinstva na preddiplomskom sveučilišnom studiju sestrinstva MF Osijek.Od 2007. godine sudjeluje u organizaciji „Festivala znanosti“ te je mentor studentskih radionica.

Članstvo u znanstvenim i stručnim društvima: Hrvatsko društvo za mikrobiologiju

Znanstvena i stručna aktivnost:

a) radovi u CC časopisima

1. Bogdan, Maja; Drenjančević, Domagoj; Harsanji Drenjančević, Ivana; Bedenić, Branka; Zujić Atalić, Vlasta; **Talapko, Jasminka**; Vuković, Dubravka. In vitro effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on the biofilm formation ability of Acinetobacter baumannii clinical isolates. // *Journal of chemotherapy*. **30** (2018) , 1; 16-24 (članak, znanstveni).
2. Gazivoda Kraljević, Tatjana; Harej, Anja; Sedić, Mirela; Kraljević Pavelić, Sandra; Stepanić, Višnja; Drenjančević, Domagoj; **Talapko, Jasminka**; Raić-Malić, Silvana. Synthesis, in vitro anticancer and antibacterial activities and in silico studies of new 4-substituted 1, 2, 3-triazole–coumarin hybrids. // *European journal of medicinal chemistry*. 124 (2016) ; 794-808 (članak, znanstveni)

b) Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. Belić, Dino; Ilinić, Martina; Burian, Sven; **Talapko, Jasminka**; Drenjančević, Domagoj.Dirty Croatian Money: How Big is the Threat?. // *Southeastern European Medical Journal*. 1 (2017.) , 1; 5-10 (članak, znanstveni).
2. Kotris, Ivan; Drenjančević, Domagoj; **Talapko, Jasminka**; Bukovski, Suzana. Identification of microorganisms on mobile phones of intensive care unit health care

workers and medical students in the tertiary hospital.. // *Medicinski glasnik : official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina*.. 14 (2017) , 1; 85-90 (članak, znanstveni)

3. Kotris, Ivan; **Talapko, Jasminka**; Drenjančević, Domagoj. Evaluation of Antibacterial Activity of Two Different Honeys against Clinical Isolates of β-hemolytic Streptococci Group A. // *Southeastern European Medical Journal*. 1 (2017.) , 1; 67-73 (članak, znanstveni).
4. Pastuović, Tajana; Perić, Magdalena; Bošnjak, Zinka; Ružman, Nataša; Reisz Majić, Patricia; **Talapko, Jasminka**; Atalić, Vlasta; Loci-Zvocak, Snježana; Vuković, Dubravka.Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in North-east Croatia. // *Acta Medica Academica*. 44 (2015) , 1; 10-17 (članak, znanstveni).

c) Radovi u drugim časopisima

1. Tomić Paradžik, Maja; Andrić, Dijana; Drenjančević, Domagoj; **Talapko, Jasminka**. The First Evidence of Epidemic Strain Clostridium Difficile (027/NAP1/BI) in Eastern Croatia. // *Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology*. 3 (2017) ; 014-016 (case report, stručni)
2. Drenjančević D, **Talapko J**. Trihineloza - uvijek aktualna bolest. Glasilo Medicinara Osijek 2008;3:56-58.
3. Vraneš J, Horonitz M, Gmajnički B, **Talapko J**. Epidemiološke odlike sojeva *Pseudomonas aeruginosa* izoliranih iz različitih kliničkih materijala. Med. Vjesnik 1999;31:63-66

d) Sudjelovanje na znanstvenim i stručnim skupovima

1. **Talapko, Jasminka**; Drenjančević, Domagoj; Tomić Paradžik, Maja. Biofilm-značaj i metode detekcije // *Knjiga sažetaka 7. HRVATSKI KONGRES LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE (s međunarodnim sudjelovanjem)/Book of Abstracts from 7th CROATIAN CONGRESS OF LABORATORY DIAGNOSTICS (with international participation)* / Stupnišek, Mirjana (ur.). Zagreb : Croatian Laboratory Association-CLA, 2017. 23-23 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
2. **Talapko, Jasminka**; Drenjančević, Domagoj; Tomić Paradžik, Maja; Sikirić, Predrag. In vitro interaction of pentadecapeptide BPC 157 with standard antibiotics

against ATCC strains // *Knjiga sažetaka 7. HRVATSKI KONGRES LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE (s međunarodnim sudjelovanjem)/Book of Abstracts from 7th CROATIAN CONGRESS OF LABORATORY DIAGNOSTICS (with international participation)*.2017.(poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

3. Bogdan, Maja; Drenjančević, Domagoj; **Talapko, Jasminka**; Antolovic Amidzic, Aurora; Vukovic, Dubravka.The enhanced sensitivity of Acinetobacter baumannii strains resistant to bactericidal activity of normal human serum after exposure to the subminimal inhibitory concentrations of antibiotics // *ESCMID eLibrary - 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* / ESCMID (ur.).online : ESCMID, 2016. (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).
4. Kotris, Ivan; **Talapko, Jasminka**; Drenjančević, Domagoj. In vitro antibacterial activity of honey against clinical isolates of beta-hemolytic streptococci group A // *Knjiga sažetaka s 9. međunarodnog znanstveno- stručnog skupa / Book of abstracts of the 9th Interantional Scientific andf Professional Conference*. Osijek, 2016. 57-57 (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).
5. Kotris, Ivan; **Talapko, Jasminka**; Drenjančević, Domagoj. Staphylococcus aureus nasal carriers among first-year student of medicine // *Abstract Book, International Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria*. Sofia, 2016. 110-110 (poster, međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).
6. **Talapko, Jasminka**; Drenjančević, Domagoj. Mikrobiološke metode ispitivanja antibakterijske aktivnosti novosintetiziranih spojeva // *Knjiga sažetaka, 15.Konferencija o laboratorijskoj dijagnostici (s međunarodnim sudjelovanjem)"Osnovne i napredne tehnologije u službi sigurnosti i kvalitete laboratorijske medicine", Osijek, HLU ; 2016.* / Stupnišek, Mirjana (ur.). Zagreb, 2016. 15-15 (predavanje,međunarodna recenzija,sažetak).
7. **Talapko, Jasminka**; Drenjančević, Domagoj; Sikirić, Predrag; Kotris, Ivan; Kovačević, Tatjana; Bogdan, Maja.In vitro antibacterial activity of pentadecapeptide BPC 157 on Staphylococcus aureus and Escherichia coli // *Abstract book IUPHAR GI Section Symposium on Drug Development and New Frontiers in Gastrointestinal Diseases* / IUPHAR GI Section Symposium on Drug Development (ur.).Novigrad, Croatia : IUPHAR GI Section Symposium on Drug Development, 2016. 72-73 (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

8. **Talapko, Jasminka**; Drenjančević, Domagoj; Stupnišek, Mirjana; Sikirić, Predrag. In vitro interaction of pentadecapeptide BPC 157 with vancomycin against Enterococcus faecalis strains // *8th Croatian Congress of Pharmacology with international participation - Final programme and Abstract book*. Split, Croatia : Croatian Pharmacological Society, 2016. 100-100 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).
9. Drenjancevic, Domagoj; **Talapko, Jasminka**. Effect of subminimal inhibitory concentrations of selected antibiotics on a serum sensitivity, phagocytosis and bacterial morphology of Pseudomonas aeruginosa strains // *Workshop/Programme and Abstracts Novel antimicrobial agents and strategies for pathogen control/25-26 July 2014* / Knežević, Petar (ur.).Novi Sad, Srbija : Faculty of Sciences, University of Novi Sad, 2014. 38 (poster,međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
10. **Talapko, Jasminka**; Drenjančević, Domagoj; Kotris, Ivan. Bakteriofagi - dobri virusi? // *Knjiga sažetaka- 14. Konferencija o laboratorijskoj dijagnostici (s međunarodnim sudjelovanjem)* / Mirjana Stupnišek (ur.).Zagreb, Hrvatska : Hrvatska laboratorijska udruga - HLU, 2014. 17 (predavanje,sažetak).
11. Ćosić, Anita; **Talapko, Jasminka**; Drenjančević, Domagoj. Molekularna dijagnostika hepatitisa // *Knjiga sažetaka: Krvlju prenosive bolesti- prevencija, dijagnostika, liječnje* / Mirjana Stupnišek (ur.). Zagreb, studeni 2013. : Hrvatska laboratorijska udruga - HLU, 2013. 2 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
12. Kotris, Ivan; Bucanovic, Ana; **Talapko, Jasminka**; Bukovski, Suzana. What kind of bacteria is obtained from medical students' mobile phones? // *Guide & Abstractbook, International Student Congres 2013, Medical University Graz*. Graz, 2013. 99-100 (predavanje,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).
13. Kotris, Ivan; **Talapko, Jasminka**; Bukovski, Suzana. Isolation and Identification of Microorganisms on icu Health Care Workers, And Students, Mobilephones in the University Hospital Centre Osijek, Croatia // *Abstract Book, XII International Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria*. Sofia, 2013. 190-190 (predavanje, međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).
14. **Talapko, Jasminka**; Drenjančević, Domagoj.Oralna kandidijaza u HIV bolesnika // *Knjiga sažetaka: Krvlju prenosive bolesti- prevencija, dijagnostika, liječnje* / Mirjana Stupnišek (ur.). Zagreb, studeni 2013. : Hrvatska laboratorijska udruga - HLU, 2013. 5 (predavanje,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

15. **Talapko, Jasminka**; Drenjančević, Domagoj; Burian, Sven; Pastuović, Tajana. Rezistencija na makrolide sojeva Streptococcus pneumoniae izoliranih u bolničkoj i vanbolničkoj populaciji pacijenata u Osječko- baranjskoj županiji u desetogodišnjem periodu // *Knjiga sažetaka 5. HRVATSKI KONGRES LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE (s međunarodnim sudjelovanjem)/Book of Abstracts from 5th CROATIAN CONGRESS OF LABORATORY DIAGNOSTICS (with international participation)* / Stupnišek, Mirjana (ur.). Zagreb : Hrvatska laboratorijska udruga, 2013. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
16. Drenjančević, Domagoj; **Talapko, Jasminka**. Uloga kemokinskih receptora u patogenezi i liječenju HIV infekcija // *Knjiga sažetaka Simpozija povodom obilježavanja Svjetskog dana borbe protiv AIDS-a s međunarodnim sudjelovanjem pod pokroviteljstvom Internacionalne federacije za biomedicinsko laboratorijske znanosti, Osijek, 06.12.2011.* / Stupnišek, Mirjana (ur.).Osijek : Hrvatska laboratorijska udruga, 2011. 2-2 (pozvano predavanje,domaća recenzija, sažetak, stručni).
17. Drenjančević, Domagoj; **Talapko, Jasminka**. HIV – 25 godina poslije // *Knjiga sažetaka Simpozija povodom obilježavanja Svjetskog dana borbe protiv AIDS-a pod pokroviteljstvom Internacinalne federacije za biomedicinsko-laboratorijske znanosti, Osijek 08.12.2010.* / Stupnišek, Mirjana (ur.).Zagreb, Hrvatska : Hrvatska laboratorijska udruga - HLU, 2010. 2-3 (pozvano predavanje,domaća recenzija, sažetak, stručni).
18. Drenjančević, Domagoj; **Talapko, Jasminka**; Grdić, Ljiljana; Miklić, Jasna; Kopić, Marija; Benko, Ivan. Ubodni incidenti u KBC Osijek u razdoblju od 2006. do 2009. godine – prevencija, prijavljivanje i zbrinjavanje profesionalne ekspozicije zdravstvenih djelatnika infekcijama koje se prenose krvlju // *Knjiga sažetaka Simpozija povodom obilježavanja Svjetskog dana borbe protiv AIDS-a s međunarodnim sudjelovanjem, Osijek 04.12.2009.* / Stupnišek, Mirjana (ur.). Zagreb, Hrvatska : Hrvatska laboratorijska udruga - HLU, 2009. 5-7 (pozvano predavanje,domaća recenzija,sažetak,stručni).
19. **Talapko, Jasminka**; Drenjančević, Domagoj. Postupci u slučaju kontaminacije površina i predmeta infektivnim materijalom u laboratoriju // *Knjiga sažetaka Simpozija povodom obilježavanja Svjetskog dana borbe protiv AIDS-a s međunarodnim sudjelovanjem, 04. 12. 2009. Osijek* / Stupnišek, Mirjana (ur.).

Zagreb, Hrvatska : Hrvatska laboratorijska udruga - HLU, 2009. 8-9 (predavanje,domaća recenzija,sažetak,stručni).

e) Neobjavljena sudjelovanja na skupovima

1. Tomić Paradžik, Maja; Samardžić, Kristian; Janjetović, Željka; Živičnjak, Tatjana; Vuković Arar, Željka; Martinković, Franjo; Drenjančević, Domagoj; **Talapko, Jasminka**. PRVI SLUČAJ HUMANE OKULARNE TELAZIOZE U HRVATSKOJ: PRIKAZ BOLESNIKA // *82. ZNANSTVENO-STRUČNI SIMPOZIJ "ZOONOZE", 28.–30. 05. 2015. Slavonski Brod, Hrvatska*.(pozvano predavanje,domaća recenzija, neobjavljeni rad)