ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE EKSTRAKTA I MEDA OBIČNE PLANIKE (Arbutus unedo L.) NA UROPATOGENE BAKTERIJE

Sadiku, Dalila

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:146446

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dalila Sadiku

ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE EKSTRAKTA I MEDA OBIČNE PLANIKE (*Arbutus unedo* L.) NA UROPATOGENE BAKTERIJE

Završni rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Dalila Sadiku

ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE EKSTRAKTA I MEDA OBIČNE PLANIKE (*Arbutus unedo* L.) NA UROPATOGENE BAKTERIJE

Završni rad

Rijeka, 2019.

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

komentor rada: prof.dr.sc. Darinka Vučković, dr.med.

Završni rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima __27__ stranica, ___7__slika, __5___tablica, ___68___literaturnih

navoda.

Sažetak

Infekcije mokraćnog sustava su jedne od najčešćih bakterijskih infekcija kod ljudi. Liječenje antibioticima je učinkovito u većini slučajeva, ali se bolest često vraća i tu se javlja potreba za blažim riješenjem u vidu biljnih pripravaka koji će držati infekcije pod kontrolom i tako smanjiti upotrebu antibiotika. Jedna od biljaka koja se pokazala učinkovitom u liječenju i prevenciji urinarnih infekcija jest obična planika ili *Arbutus unedo L.* Obična planika je vrsta planike koja se većinski nalazi na prostoru južne Europe, u kojoj prevladava Mediteranska klima. Utvrđeno je da lišće obiluje raznim biokemijskim tvarima koje djeluju antiagregacijsko, antidijarealno, antidijabetičko, protuupalno te djeluje antiseptički na urinarni sustav. Glavni sastojak biljke je arbutin koji se u organizmu čovjeka pretvara u hidrokinon, bioaktivnu molekulu koja zapravo djeluje antiseptički na urinarni sustav.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi antibakterijska svojstva ekstrakta lišća i meda planike na odabrane sojeve bakterija koje su najčešći uzročnici urinarnih infekcija, a to su *Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae.* Metode koje su upotrebljavane su metoda difuzije bušenjem rupica u agaru i metoda dvostruke mikrodilucije. Najjača antibakterijska aktivnost se pokazala kod sojeva *Enterococcus faecalis* gdje MIK iznosi 1,6 mg/mL dok je med u kombinaciji s ekstraktom pokazao aditivni učinak.

Zaključno, obična planika pokazuje značajne rezultate u antimikrobnom djelovanju na uropatogene bakterije, posebice *Enterococcus faecalis* te samim time posjeduje veliki potencijal kao pomoćno sredstvo u liječenju urinarnih bakterijskih infekcija.

Ključne riječi

infekcije mokraćnog sustava, obična planika, antibakterijski učinak, med planike

Summary

Urinary tract infections are one of the most common bacterial infections in humans. Antibiotic treatment is effective in most cases, but disease often returns and there is a need for a milder solution in the form of herbal preparations that will keep the infections under control and thus reduce antibiotic use. One of the plants that has proven effective in the treatment and prevention of urinary infections is *Arbutus unedo* L. Strawberry tree is mostly found in southern Europe, dominated by Mediterranean climate. The leaves have been found to be abundant in various biochemical substances that have anti-aggregation, antidiarrheal, antidiabetic, anti-inflammatory and antiseptic effects on the urinary system. The main ingredient of the plant is arbutin, which, in the human body, is converted into hydroquinone, a bioactive molecule that actually has an antiseptic effect on the urinary system.

The aim of this study was to determine the antibacterial properties of honey and leaf extracts of strawberry tree on selected bacterial strains that are most common cause of urinary infections, namely *Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. The methods used were a diffusion method by drilling holes in agar and double microdilution method. The strongest antibacterial activity was shown in *Enterococcus faecalis* where the MIC was 1.6 mg / mL while honey in combination with the extract showed an additive effect.

In conclusion, *Arbutus unedo* L. has shown significant results in antimicrobial action on uropathogenic bacteria, especially *Enterococcus faecalis*, and thus has great potential as an natural remedy in the treatment of urinary bacterial infections.

Key words

urinary tract infections, strawberry tree, antibacterial effect, strawberry tree honey

Sadržaj

1. Uvod ... 1
1.1. Obična planika (*Arbutus unedo* L.) ... 1
1.2. Učinci na zdravlje ... 2
1.3. Kemijski sastav obične planike ... 3
1.4. Polifenoli i flavonoidi ... 4
1.5. Arbutin ... 5
1.6. Hidrokinon ... 6
1.7. Med planike ... 7
1.8. Uropatogene bakterije ... 8
1.8.1. *Escherichia coli* ... 8
1.8.2. *Pseudomonas aeruginosa* ... 10
1.8.3. *Klebsiella pneumoniae* ... 11
1.8.4. *Enterococcus faecalis* ... 11
2. Cilj istraživanja ... 12
3. Materijali i metode ... 13
3.1. Biljni materijal i njegova priprema ... 13
3.2. Određivanje antimikrobnog učinka obične planike ... 13
3.2.1. Mikroorganizmi ... 13
3.2.2. Priprema bakterijske suspenzije ... 14
3.2.3. Metoda difuzije u agar iz rupica – orijentacijska metoda osjetljivosti mikroorganizama ... 14
3.2.4. Metoda dvostruke mikrodilucije ... 16
3.2.5. Metoda Chekerboard assay (metoda šahovnice) ... 18
4. Rezultati ... 21
4.1. Antibakterijsko djelovanje ekstrakta obične planike ... 21
4.2. Antibakterijski učinak sinergije meda i ekstrakta obične planike ... 23
5. Rasprava ... 26
6. Zaključak ... 28
7. Literatura ... 29
8. Životopis ... 32

1. Uvod

U narodnoj, odnosno tradicionalnoj medicini oduvijek su se koristile biljke i biljni pripravci kako bi se ljudi liječili, odnosno kako bi se spriječila sama bolest. Bez obzira na strijeloviti napredak moderne medicine, zadnjih godina se znanost sve više okreće ka istraživanjima i pronalasku biljnih pripravaka koji će štiti zdravlje, poboljšati kvalitetu života pa čak i zamijeniti antibiotike u slučajevima gdje je to potrebno i moguće. Naglasak je stavljen na biljne antioksidanse i njihov značaj u medicini, prehrambenoj industriji i ljudskoj prehrani.

1.1. Obična planika (*Arbutus unedo* L.)

Obična planika (*Arbutus unedo* L.) je zimzelena grmolika biljka koja pripada porodici *Ericaceae.* Prirodno raste na području Mediterana. U Europi je to područje u kojem prevladava mediteranska klima (Portugal, Španjolska, Francuska, Italija, Albanija, Grčka, Bosna i Hercegovina, Hrvatska, Makedonija, Crna Gora, Srbija i Slovenija), uključujući i neke otoke (Korzika, Sicilija, Sardinija, Kreta, Balearski otoci). Uobičajeno doseže visinu od 1,5 m do 3 m, ali iznimno može narasti i do 12 m. Plodovi su okrugli, kada su zreli crveno-narančaste su boje, promjera do 2 cm. Plod biljke je jestiv, ali u umjerenim količinama jer može uzrokovati probavne smetnje i ošamućenost, odakle i dolazi ime *unedo.* Naziv potječe od latinskog izraza *Unum edo*, što bi značilo *jedem samo jedan* te je tako nastala skraćenica *unedo.* (3) Cvijeće je zvonoliko, kremaste rozo-bijele boje skupljeno u cvatove. Biljka nije zahtjevna za uzgoj, no najbolje uspjeva na kamenjaru i na pukotinama stijena te su pogodnija kisela tla. (2) Ima vrlo važnu ulogu i s ekološkog stajališta. Pomaže održavanju raznolikosti faune, izbjegava eroziju tla, vrlo brzo se regenerira nakon požara, može rasti i na siromašnom tlu te se može koristiti u fitoremedijaciji, poglavito u onečišćenjima uzrokovanim arsenom (1). Danas se plod koristi u razne svrhe, poglavito u proizvodnji alkoholnih pića, džemova i meda. U narodnoj medicini se koristi za proizvodnju pripravaka protiv raznih upala, zubobolje, nadutosti, dijabetesa, ateroskleroze, tromboze, hipertenzije te u borbi protiv gastrointestinalnih, urinarnih i bubrežnih bolesti (3).



Slika 1. List i plod obične planike (preuzeto s http://www.herbateka.eu/content/planika-arbutus-unedo)

1.2. Učinci na zdravlje

Obična planika pokazuje mnoge pozitivne učinke na zdravlje. Razlog tome je što u svom sastavu sadrži razne biokemijski aktivne komponente, a neke od njih su fenoli, flavonoidi, vitamini te eterična ulja. (1,2) Naravno, antioksidacijsko djelovanje nije jedino pozitivno svojstvo. Fenolni spojevi iz biljke djeluju protuupalno, vazodilatacijski i antitrombotski što doprinosi spriječavanju nastanak plaka u krvnim žilama. Fenoli također djeluju antikancerogeno tako što djeluje na enzimatske sustave koji inhibiraju proliferaciju tumora (2).

S obzirom na pokazane povoljne učinke, u narodnoj medicine se koriste različiti djelovi biljke (korijen, list, kora, plod) (1). Pripravci korjena i kore koriste se kod ublažavanja gastrointestinalnih, kardiovaskularnih, dermatoloških i uroloških problema, odnosno poremećaja (2). Plod i ekstrakt koriste se u liječenju, tj. ublažavanju gastrointestinalnih i uroloških problema jer pokazuju diuretska, laksativna i uroantiseptična svojstva (1,2). Med obične planike pokazuje antioksidativna i antiradikalna svojstva zbog toga što u svom sastavu sadrži brojne polifenole (2). Preporuča se i primjena ekstrakta listova kod urinarnih infekcija zbog dokazanog antibakterijskog učinka.

Tablica 1. Primjena različitih dijelova planike u tradicionalnoj medicine (preuzeto od Oliveira i sur. 2011)

Dio biljke	Medicinska upotreba
List	Gastrointestinali poremećaji, urološki problem, dermatološki problemi, kardiovaskularni poremećaji, bolesti bubrega, visoki krvni tlak, bolesti srca, dijabetes, hemeroidi, diuretsko i protuupalnoi antidijaroično djelovanje
Plod	Gastrointestinalni poremećaji, urološki problem, dermatološki problemi, bolesti bubrega, kardiovaskularna primjena
Kora	Gastrointestinalni poremećaji, urološki i dermatološki problemi, kardiovaskularni poremećaji
Korijen	Gastrointestinalni poremećaji, urološki problemi, dermatološki problemi, kardiovaskularni poremećaji, visoki krvni tlak, bolesti srca, dijabetes, diuretsko, protuupalno i antidijarioično djelovanje

1.3. Kemijski sastav obične planike

Učinci obične planike najviše ovise o njezinom kemijskom sastavu. Bioaktivne kemijske komponente koje se nalaze u biljci su vitamini, fenoli, organske kiseline i terpenoidi. Također je utvrđeno da se u planici nalaze i velike količine šećera (42% do 52% suhe tvari) i minerala, kao što su kalij i kalcij. U nešto manjim koncentracijama nalazi se eterično ulje, vitamini i fenolni spojevi te galna kiselina. List planike sadrži nekoliko od navedenih spojeva, a to su masne kiseline, terpenoidi, neki vitamini, eterično ulje i fenolni spojevi. Masne kiseline koje su prisutne u listu su palmitinska, oleinska, linolenska, laurinska, miristinska, stearinska, pentadekanoična, trideciklična, behenična, margarinska te arahidinska kiselina. Terpenoidi koji su utvrđeni su α-amirin acetat, betulinska kiselina i lupeol, a

utvrđeni vitamin je α-tokoferol. Također su izolirani razni fenolni spojevi kao što su tanini, fenolni glikozidi te flavonoidi. (3)

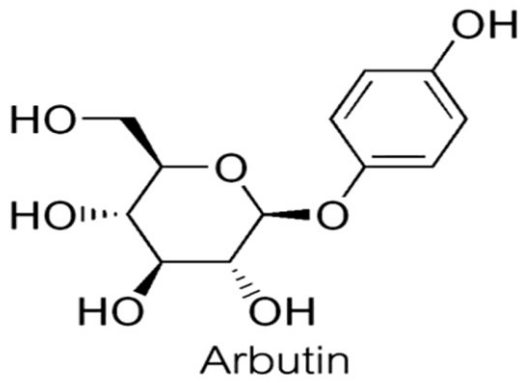
1.4. Polifenoli i flavonoidi

Fenolni spojevi su vrsta kemijskih spojeva koji u svojoj strukturi sadrže jedan ili više aromatskih prstenova na koje je vezana hidroksilna skupina. Do danas je poznato više od 8 000 strukturnih inačica ovih spojeva. Općenito su podijeljeni na fenolne kiseline i analoge, a to su: tanini, flavonoidi, stilbeni, kurkumonoidi, kumarini, lignani, kinoni i ostali, a sve ovisi o broju aromatskih prstenova i vezanih funkcionalnih skupina. U biljnom svijetu, glavninu zauzimaju fenolne kiseline, a pojavljuju se, slobodne ili konjugirane, u obliku amida ili estera. Polifenolni spojevi u biljkama su rezultat sekundarnog metabolizma te im omogućavaju rast i razmnožavanje, ali imaju i defenzivnu ulogu, a to je obrana od patogena, parazita, ptica grabežljivica te mogu doprinjeti njihovoj boji. (2)

Učinak polifenola vidljiv je i na staničnoj razini u vidu indukcije enzimskih sustava u borbi protiv reaktivnih metabolita kisika (glutation peroksidaza, katalaza, dizmutaza) ili inhibicije njihove ekspresije (ksantin oksidaza). Bioaktivnost spojeva je, uz sve ostalo, i u njihovom antioksidacijskom djelovanju (antikancerogeno, antimutageno, protuupalno) koji opet ovisi o samoj strukturi spoja, pozicijama hidroksilnih skupina ili eventualno drugim vezanim funkcionalnim skupinama te o njihovoj glikozilaciji. Veliku skupinu bioaktivnih spojeva zauzimaju i flavonoidi. Kao i kod polifenola, ključnu ulogu ima sama kemijska struktura. Najčešće se nalaze u obliku difenilpropana (C6-C3-C6), a mogu se naći i u obliku aglikona i kao derivati glikozida. Flavonoidi se dijele u nekoliko glavnih skupina: flavoni, izoflavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, antocijanini koji uključuju i antocijanidine. Naravno, fenoli nisu jedini s antioksidativnim svojstvima, tu se javljaju flavonoidi čiji antioksidativni kapacitet izravno djeluje antimikrobno i antiviralno, ali i antikancerogeno. Kod biljaka, flavonoidi većinski imaju obrambenu ulogu štiteći ih od patogena i UV zračenja. (2)

1.5. Arbutin

Arbutin (hidrokinon-β-D-glukopiranozid) je spoj koj se prirodno može pronaći u nekoliko različitih biljaka, uglavnom su to biljke roda Ericaceae (*Arctostphylos spp*.), Betulaceae (*Betula alba*) i Rosaceae (*Pyrus communis* L.) (2). Arbutin je zapravo derivat hidrokinona, 4-hidroksifenil–β-glukopiranozida, koji se može pronaći u kori, listu i plodu biljaka kao što su obična planika i medvjetka (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) te je kao takav jedan od najvažnijih fenolnih spojeva u biljkama (2, 4). Jedna od glavnih uloga arbutina, zbog koje ga biljke sintetiziraju, jest obrana biljke od infekcija i stresnih uvjeta kao što su izrazito visoka ili niska temperatura. Arbutin kao spoj pokazuje antimikrobna svojstva i tako pomaže biljci u obrani od mikroorganizama. Nakon konzumacije, arbutin se apsorbira u debelom crijevu nosačima glukoze β-glukozidazu, a zatim se pomoću crijevne bakterijske flore metabolizira u aktivne tvari, glukuronide i sulfatne konjugate koji se potom izlučuju putem urina. (2) U intestinalnoj mikroflori se nalaze bakterije kao što su *Eubacterium ramulus, Enterococcus casseliflavus, Bacteroides distasonis* i *Bifidobacterium adolescentis* koje prevode arbutin u hidrokinon koji pokazuje hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, mutagenost i kancerogenost. Potpuni prijelaz iz arbutina u hidrokinon, unutar crijevnih resica, događa se tijekom 24 sata, a proces je najefikasniji u alkalnom mediju. (2) Hidroksilne skupine vezane za arbutin, odnosno hidrokinon, odgovorne su za njihovo antioksidacijsko djelovanje. Biljni pripravci koji sadrže arbutin koriste se prvenstveno kao diuretici, antiseptici kod urinarnih infekcija te kod bubrežnih kamenaca. S obzirom da pokazuje nisku citotoksičnost, arbutin se koristi i u kozmetici kao izbjeljivač kože kod hiperpigmentacije. (2)

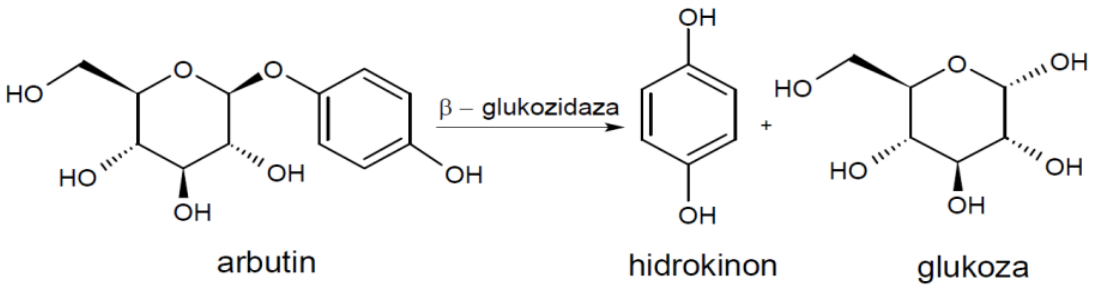


Slika 2. Kemijska struktura arbutina (preuzeto s https://complexi-light.com/alpha-arbutin/)

1.6. Hidrokinon

Hidrokinon je aromatski organski spoj, fenol. U tijelu nastaje razgradnjom arbutina pod djelovanjem enzima β-glukozidaze, a razgradnja se odvija u enterocitima crijevnih resica (2,3). Osim nastanka prirodnim putem, hidrokinon se proizvodi i u komercijalne svrhe gdje služi kao antioksidans za masti i ulja, u proizvodnji boje, kao inhibitor polimerizacije te kao izbjeljivač kože u kozmetičkoj industriji (7). Hidrokinon se također može naći u hrani koja je biljnog porijekla, odnosno dobiva se preradom biljnih sirovina, kao što su vino, kava, proizvodi od žitarica, brokula te određeno voće gdje se nalazi u glikoliziranoj formi, a to je arbutin. Kao što je već prije spomenuto, arbutin pokazuje baktericidnu aktivnost, a to je zapravo svojstvo koje obnaša hidrokinon nakon pretvorbe. Oralno konzumirani arbutin se u ljudskom tijelu metabolizira te se zatim 64 – 75% tvari izluči iz organizma putem urina u obliku konjugata sulfo i glukuronske kiseline. (7) Hidrokinon također pokazuje svojstvo inhibicije humane topoizomeraze II, može uspostaviti i mehanizam koji inducira leukemiju u čovjeka te poremetiti proteine koji su uključeni u skupu mikrotubula i u formaciju diobenog vretena. Kako bi proizveo ovakve toksične učinke, hidrokinon treba proći proces autooksidacije ili treba biti aktiviran enzimom. Na primjer, prostaglandin H sintetaza, mijeloperoksidaza i citokrom P450 2E1 mogu povećati stvaranje adukata DNA i mutaciju, a sve je to inducirano hidrokinonom. Hidrokinon je glavni metabolit benzena i jedan od prvih spojeva koje je Međunarodna agencija za istraživanje raka

(International agency for research on cancer, IARC) svrstala u skupinu I (agensi koji su karcinogeni za ljude). Povećana učestalost leukemija kod radnika izloženih benzenu bila je ključna za ovu klasifikaciju. Iako mehanizam karcinogenosti benzena i mijelotoksičnosti nije u potpunosti izazvan od strane hidrokinona čini se da je ipak važan aktivni metabolit, ali koji ipak zahtjeva toksokinetičke i toksodinamske interakcije sa ostalim metabolitima benzena. (7) Kod ljudi u većim količinama može izazvati vrtoglavice, glavobolje, mučnine, povraćanje, edem unutarnjih organa, cijanozu, konvulzije, delirij i kolaps (2). Epidemiološki podaci nisu dovoljni kako bi procijenili je li direktna izloženost hidrokinonu predstavlja karcinogeni rizik za ljude (IARC, 1999.). S druge strane, dvije dugoročne studije na životinjama (NTP, 1989) (8) predlažu da je hidrokinon ipak karcinogen, ali se organotropizam razlikuje od onog kod benzena (2, 7).



Slika 3. Biotransformacija arbutina u hidrokinon (12)

1.7. Med planike

Med obične planike je jednocvijetni med te je kao takav tipičan proizvod Mediteranske regije. Proizvod je tipičan za Italiju, Španjolsku, Portugal i Hrvatsku, dok je otok Sardinija vjerojatno najveći proizvođač meda u svijetu. (6) Zbog svojih svojstava, slabije proizvodnje i specifičnog gorkog okusa, cijena na tržištu je nešto viša od uobičajene cijene meda, čak 4 do 8 puta. Senzorska svojstva meda su lako prepoznatljiva: u tekućem stanju je jantarne boje dok je smeđe – bež boje kada je kristaliziran. Miris je intenzivan, karakterističan i sliči mirisu kave; okus je u početku slatkast, a kasnije izrazito gorak. S obzirom na veliku vrijednost meda, rijetko je istraživan, trenutno postoji nekoliko članaka

koji se fokusiraju na botaničku klasifikaciju, fizikalno – kemijsku karakterizaciju i antioksidacijska svojstva. Med od planike pokazuje najviši sadržaj fenola te najjaču antioksidacijsku aktivnost usporedivši ga s medom različitog botaničkog porijekla. Njegova antioksidacijska aktivnost se pripisuje velikoj količini fenola, u kojem prednjači homogentisična kiselina (HMG) te je ona kao takva najpouzdaniji marker botaničkog porijekla. Osim polifenolnih svojstava, pozitivnu prehrambenu značajku meda predstavlja i prisutnost esencijalnih elemenata. (5)

1.8. Uropatogene bakterije

Urinarni trakt je normalno sterilan, uz izuzetak kožne flore koja se nalazi uz prednju uretru oba spola te se takvi mikroorganizmi nalaze u uzorku urina (9). Unatoč prisutnosti raznih antibakterijskih faktora kao što su pH, koncentracija uree, osmolarnost, razne organske kiseline, koncentracija soli urina, urinarni inhibitori bakterijske adherencije, bakterije uspiju adherirati, rasti i kolonizirati tkivo te tako uzrokovati infekciju. Rizični faktori koji utječu na nastanak urinarnih infekcija su spol (dužina uretre – duža je u muškaraca, nego u žena pa su kod žena češće infekcije), genetska predispozicija (npr. krvna grupa), antibakterijska aktivnost tekućine koju luči prostata (kod muškaraca), ponašanje (seksualna aktivnost, korištenje kontracepcijskih pilula, spermicidnih gelova, higijena, učestalost mokrenja i slično), niska koncentracija laktobacila kod starijih žena, moguće strukturalne urinarne abnormalnosti, dijabetes, hipertenzija, trudnoća, nozokomijalne infekcije te moguća kateterizacija. (10) Neke od bakterija koje uzrokuju infekcije mokraćnih puteva su *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae* i *Enterococcus faecalis.*

1.8.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli je bakterija koja pripada porodici *Enterobacteriacae* te je kao takva najzastupljeniji gram negativni štapić crijevne flore i može uzrokovati mokraćne, crijevne i sustavne infekcije. *E.coli* je gram negativni štapić, fakultativni anaerob te je nesporogena. Pokretna je, a neki sojevi stvaraju i kapsulu. (11)

Što se tiče metabolizma, *E. coli* je fermentativna što znači da razgrađuje glukozu, ali i laktozu te pritom stvara plin. Razgradnjom ugljikohidrata nastaju organske kiseline koje snižavaju pH i time mjenjaju boju indikatora, a također *E. coli* proizvodi indol iz triptofana, dekarboksilira lizin, ne posjeduje enzim ureazu i ne stvara sumporovodik. (11)

E. coli sadrži tri antigena: K, O i H. K – antigen je kapsularni antigen i većina sojeva ga posjeduje. O – antigen je polisaharid i proizlazi iz stanične stjenke te to omogućujue tipizaciju sojeva *E. coli* u O – skupine. H – antigen je termolabilan i to je protein od kojih su građeni bičevi bakterija, a u zadnje vrijeme se koristi kako bi se dokazala enterohemoragična *E. coli* (H7) ili (H11). (11)

E. coli je osjetljiva na većinu dezinficijensa i antibiotika, no bolnički sojevi mogu pokazati rezistenciju i to najčešće zbog mutacije kromosomskih gena koji su odgovorni za izgradnju porina – mjesto gdje ulaze antibiotici. *E. coli* se normalno nalazi u crijevima ljudi i životinja pa su samim time rezervoar feces ljudi i životinja koji, ako dođe u prirodnu okolinu, može zagaditi vodu, hranu, ruke i predmete opće upotrebe. (11) Upravo zbog toga *E. coli* je indikator fekalnog zagađenja u vodiu . Kod proljeva, infekcije su češće sezonskog karaktera i to u ljetnim mjesecima, a osim probavnog sustava također uzrokuje i infekcije mokraćnog sustava, bakterijemije i ostalo (11).

Postoji nekoliko različitih sojeva koji uzrokuju razne proljeve i povraćanje te putničke proljeve, a to su: Enteropatogeni sojevi – EPEC najčešće uzrokuje proljeve kod djece do 3 godine. (11) Enterotoksični sojevi – ETEC stvaraju toksin koji uzrokuje proljev sličan kao kod kolere. Ovakvi proljevi se još i nazivaju ‘’putnički proljevi’’ (11).

Enteroinvazivni sojevi – EIEC ulaze u epitel crijevnih stanica i uzrokuju upalni proljev kao kod šigele (11).

Enterohemoragični sojevi – EHEC, još se naziva i VTEC ili verotoksična *E. coli* i STEC ili shiga – toksična *E. coli*. Uzrokuje krvave proljeve koji se mogu zakomplicirati i dovesti do zatajenja bubrega (uremija) i do hemolitičko – uremičkog sindroma (HUS). Najčešći uzročnik je *E. coli* O157:H7 (11).

Enteroagregacijski sojevi – EAEC ili enteroadhezivni sojevi su dobili naziv po tome što na kulturi stanica pokazuju karakterističnо slaganje u obliku ograde. Uzrokuje vodene proljeve, povraćanje i dehidraciju kod male djece (11).

Escherichia coli je jedan od najčešćih uzročnika infekcija mokraćnog sustava i za to su zaslužni određeni uropatogeni sojevi koji posjeduju O – antigen koji je po strukturi lipopolisaharid. O – antigen zaustavlja peristaltiku uretera i tako omogućava bakteriji da zaostaje tamo i namnoži se uzrokujući infekciju. Također posjedovanje adhezina (fimbriji) dobrinosi infekciji jer ju je teže otplaviti, a i posjedovanje kapsule također povoljno djeluje jer štiti bakteriju od fagocitoze i ostalih obrambenih mehanizama. (11)

1.8.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je gram – negativni štapić, ne stvara spore i ubikvitaran je. Pokretan je zbog monotrihe flagele, sadrži fimbrije i mukozni omotač. Vrlo je otporan na vanjske čimbenike kao i na antimikrobne lijekove. Aerobna je bakterija te razgrađuje samo glukozu i ksilozu bez stvaranja plina, a anaerobno mogu rasti samo uz prisutnost nitrata. (11) *P.* aeruginosa je oportunistička bakterija i vrlo rijetko izaziva bolest kod zdravih ljudi, ali je svejedno kod njih moguća izolacija. Zbog svoje invazivnosti mogući je prodor u tkivo i krvotok, a činitelji patogenosti su bakterijska adherencija zbog fimbrija i glikokaliksa, lokalno invazivno djelovanje i rasap bakterija i sustavna bolest. (11)

Kao što je već spomenuto, *P. aeruginosa* je ubikvitarna bakterija i može se naći u tlu, vodi i probavnom sustavu životinja, ali i ljudi. Također je jedan od glavnih uzročnika bolničkih infekcija, a izvor su endoskopi, kateteri, respiratori i slično. (11) Nakon kolonizacije slijedi infekcija i to kod imunokomprimitiranih osoba i onih osoba kod kojih već postoji bolest, a moguće infekcije su upale dišnog sustava, infekcije kirurških rana i opeklina, infekcije mokraćnog sustava, meningitisi, endokarditisi, upale uha i oka, septički sindrom te ostemjelitisi i artritisi. Prema podacima CDC-a u SAD-u, *P.aeruginosa* je na 2.mjestu u intrahospitalnim pneumonijama te na 3. mjestu kao uzročnik urinarnih infekcija. (11)

1.8.3. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae pripada porodici *Enterobacteriacae*, gram – negativni su bacilli, nesporogeni i nepokretni te posjeduju kapsulu (11). Za rast im je potrebna glukoza i laktoza i njihovom razgradnjom stvaraju plin. Također još razgrađuje lizin, ureju i koristi ugljik iz citrata. *K. pneumoniae* pokazuje otpornost prema antibioticima. Primarno je otporna na ampicillin i karbenicilin, dok za ostale antibiotike vrlo brzo stječe otpornost. (11) Što se tiče antigenske građe, posjeduje polisaharidnu kapsulu zbog koje su joj kolonije sluzave i zbog kapsule se razlikuje od ostalih enterobakterija te to doprinosi identifikaciji soja. (11) Općenito klebsijele su ubikvitarni mikroorganizmi što znači da se mogu naći svugdje, u vodi, tlu i probavnom sustavu ljudi i životinja kao normalna flora. Uvjetni su patogeni i s obzirom da su otporni na antibiotike, čest je uzročnik bolničkih infekcija. Izaziva upalu mokraćnog sustava, sepsu i meningitis u novorođenčadi. (11)

1.8.4. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis pripada porodici *Enterococcaceae*, gram – pozitivni je, a katalaza – negativan koki. Na mikroskopskom preparatu se pojavljuje pojedinačno, ali može i u paru ili kratkim lancima. Do nedavno je bio svrstan u rod streptokoka (do 1984.) zato što najčešće vrste enterokoka dijele neke od karakteristika sa streptokokima. Enterokoki su dio normalne crijevne flore čovjeka, a mogu se naći i sluznici ždrijela i usta i u spolnom sustavu žene. Mogu preživjeti visoke koncentracije žuči i soli (natrijevog klorida) te pokazuju termorezistentnost (rast na 42ºC). (9)

Kao i dosad navedene bakterije, i enterokok je ubikvitaran i prepoznat je kao uzročnik bolničkih infekcija zbog svoje rezistencije na antibiotike koja može biti primarna ili stečena. Kao najvažniji čimbenik virulencije izdvaja se sposobnost stvaranja biofilma što igra veliku ulogu kod infekcija endokarda, urinarnih infekcija ili bilo kojih infekcija koje mogu biti posljedica ugradnje ili upotrebe umjetnog materijala prilikom liječenja. (9)

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti i ustvrditi djelovanje ektrakta lišća planike, te sinergiju ekstrakta i meda planike na urinarne infekcije izazvane bakterijama koje su najčešći uzročnici. Istraživanje je provedeno u *in vitro* uvjetima te je ispitivana minimalna baktericidna (MBK), minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) te antibakterijski učinak sinergije ekstrakta i meda na *Pseudomonas aeruginosa*, od svih sojeva, *Enterococcus faecalis* pokazuje najveću osjetljivost na ekstrakt, dok kombinacija meda i ekstrakta djeluje aditivno.

3. Materijali i metode

3.1. Biljni materijal i njegova priprema

Za provedbu pokusa korišten je list obične planike (*Arbutus unedo* L.), a uzorci odnosno listovi su nasumično odabrani te ubrani na tri lokacije, Malom Lošinju, Ugljanu te na Koločepu. Listovi su ubrani tijekom studenog 2018. Listovi su čuvani na sobnoj temperature u tamnoj posudi, a zatim su osušeni, samljeveni te se iz tako samljevenih listova vršila ekstrakcija (12). Samljeveni listovi su ekstrahirani metanolom (Kemika) (12). Pripremljeni ekstrakt obične planike se, zbog svoje izražene higroskopnosti, čuvao u eksikatoru do daljnje upotrebe u istraživanju (12).



Slika 4. Ekstrakti planike sterilizirani membranskom filtracijom

3.2. Određivanje antimikrobnog učinka obične planike

3.2.1. Mikroorganizmi

U provedbi pokusa korišteni su klinički izolati bakterijskih vrsta *K. pneumoniae 39772/14* (KBC Rijeka); *P. aeruginosa 1931 2017* i *62 420 2016*; *E. faecalis 59801 2016* i *59739 2016* koji su izolirani iz urina, a svi su čuvani u Zbirci mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Bakterije su nasađene na Müeller – Hinton agar (MHA) te su stavljene na inkubaciju 18-24 h na 35±2ºC (12).

3.2.2. Priprema bakterijske suspenzije

Nakon što su porasle kolonije na MHA, 1-5 kolonija je pikirano ezom i inokulirano u 2 mL Müeller – Hinton bujona (MHB) (Biolife). Nakon inokulacije izmjeren je turbiditet suspenzije kako bi se odredila količina bakterija. Turbiditet se mjeri spektrofotometrijom na 500 nm (može i 450 nm), a apsorbancija određuje gustoću, odnosno količinu bakterija u suspenziji. Konačna suspenzija mora biti 10^6 bakterija, a ta količina je potrebna za mjerenje MIK – a i MBK – a (minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije). Konačna suspenzija od 10^6 bakterija dobila se mješanjem 990 μL MHB i 10 μL primarne suspenzije. Takva suspenzija se dalje koristi u metodi difuzije u agar iz rupica i u dvostrukoj mikrodiluciji.

3.2.3. Metoda difuzije u agar iz rupica – orijentacijska metoda osjetljivosti mikroorganizama

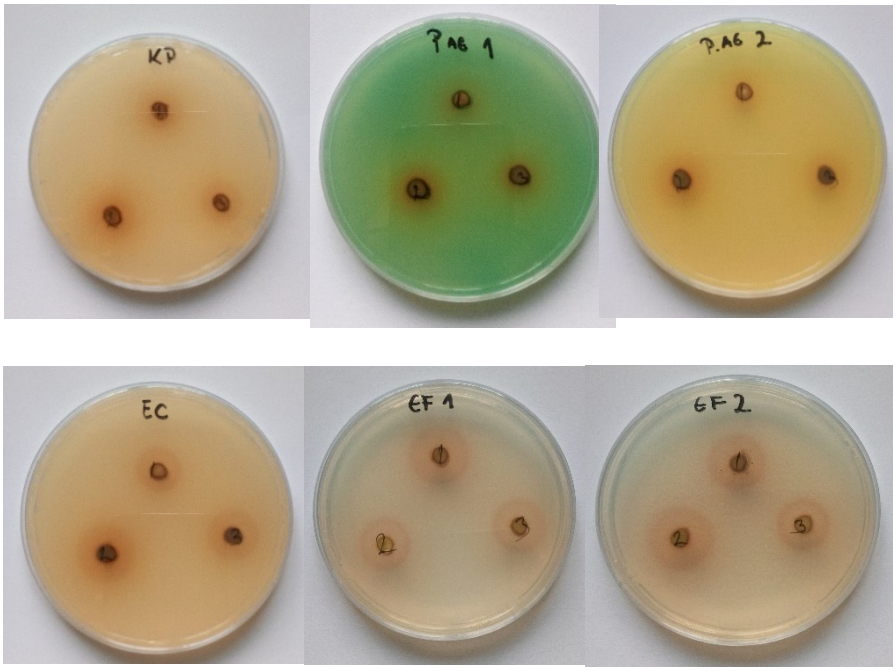
Princip

Metoda difuzije u agar iz rupica temelji se na metodi disk difuzije čiji je princip otkrivanje osjetljivsti bakterija na pojedine antibiotike, a postupak se naziva Kirby – Bauerov postupak.Na MHA se nasadi bakterijska kultura pomoću sterilnog vatenog štapića, a zatim se na površinu agara postave diskovi impregnirani antimikrobnom tvari. Spomenuta tvar zatim iz diska dufundira u agar i ako je mikroorganizam osjetljiv, nakon 18-24h inkubacije, pojavljuje se zona inhibicije čiji se promjer zatim očitava. Rezultati se izražavaju prema kriterijima koji su određeni od strane CLSI (engl. Clinical and Laboratory Standard Institute) (CLSI, 2007). (12)

U našem slučaju koristila se inačica metode gdje se umjesto diskova buše rupe u agaru, a zatim se u otvore stavlja ispitivana tvar koja isto tako difundira u agar. Rezultati su kvalitativni, a služe samo kako bi vidjeli pokazuje li mikroorganizam osjetljivost ili otpornost na ispitivanu tvar.

Postupak

Rupice na agaru su napravljene metalnim cilindrom koji je prethodno steriliziran na plamenu (promjer 5mm), a zatim je u njih dodan ekstrakt obične planike. Ekstrakt je difundirao u okolni agar i djelovao na nasađene mikroorganizme. Bakterijska suspenzija (približno 10^8 CFU/mL) je nasađena na MHA sterilnim brisnim štapićem neposredno prije bušenja rupica te je agar pušten kako bi se suspenzija malo upila. U svaku rupicu je stavljeno 30 µL ekstrakta, a koncentracija radne otopine je bila 51,2 mg/mL. Nakon što je postupak proveden, ploče idu u hladnjak kako bi se sve upilo u podlogu, a zatim u inkubator na 35±2ºC tijekom 24 sata. Rezultati se očitavaju tako što se mjeri zona inhibicije oko rupice s ekstraktom (slika 5).



Slika 5. Metoda difuzije *K. pneumoniae* 39772, *P. aeruginosa* 1931 i 62 420, *E. coli, E. faecalis* 59801 i 59 739

3.2.4. Metoda dvostruke mikrodilucije

Dilucijske metode se koriste kako bi se odredila minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) i minimalna baktericidna koncentracija (MBK). MIK je vrijednost koja označava najnižu koncentraciju ispitivane tvari koja je dovoljna da spriječi rast mikroorganizma, odnosno da zamućenje u jažicama nije vidljivo nakon 24 sata inkubacije na 37ºC. MBK je vrijednost koja označava najnižu koncentraciju ispitivane tvari koja je dovoljna da uništi mikroorganizam i da spriječi njegov rast, očitava se nakon MIK-a tako što se nacjepljuje na hranjivu podlogu (MHA). (12)

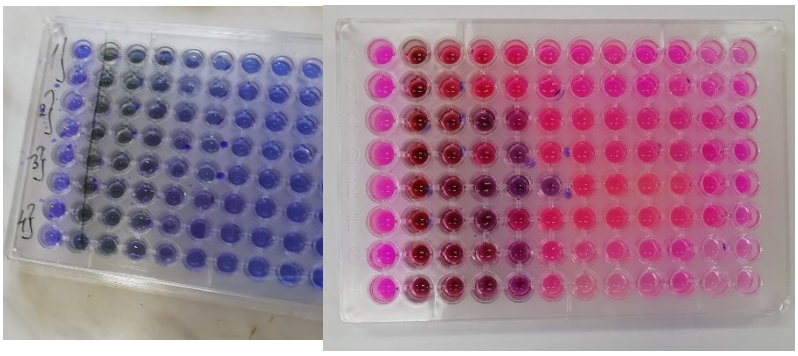
Princip

Metoda mikrodilucije se temelji na seriji razrijeđenja ispitivane tvari u krutoj ili tekućoj hranjivoj podlozi te se prati rast mikroorganizama u nizu različitih koncentracija. Spomenuta metoda zapravo opisuje izlaganje točno određenog broja mikroorganizama točno određenom nizu koncentracija tvari koja se ispituje te se nakon inkubacije očitava MIK vrijednost koja se očituje izostankom zamućenja u jažici mikrotitarske pločice. Nakon toga slijedi nasađivanje uzoraka iz jažica na hranjivu podlogu (MHA) te i ona ide na inkubaciju, a nakon inkubacije se očitava i MBK vrijednost. Najniža koncentracija ispitivane antimikrobne tvari, u ovom slučaju ekstrakt planike, u kojoj se ne pojavljue zamućenje, odnosno inhibiran je rast mikroorganizma, predstavlja MIK, a izražena je u mg/mL. (12)

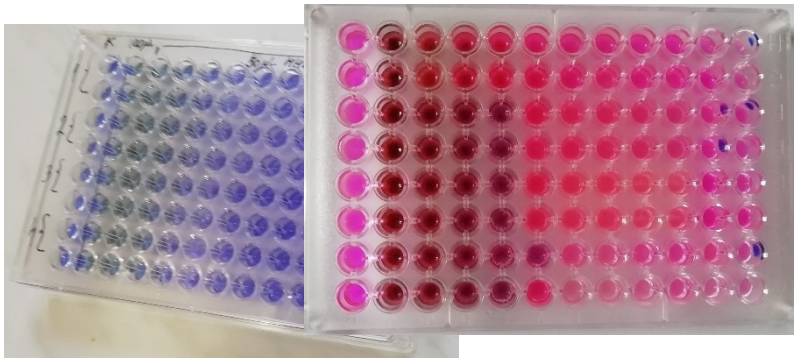
Postupak

Nakon što su bakterije koje se ispituju uzgojene na hranjivim podlogama, priprema se bakterijska suspenzija koja konačno mora biti 10^6 CFU/mL. Turbiditet takve suspenzije mjeri se spektrofotometrom na 500 nm (može i 450 nm). Nakon što je suspenzija spremna, slijedi priprema mikrotitarskih pločica. U svaku (osim uz prvi red) jažicu ide 100 µL MHB, zatim u 1. red koji je prazan ide 200 µL ispitivane tvari (u ovom slučaju ektrakt planike) te se počinju raditi razrijeđenja. Nakon što je pločica pripremljena i razrijeđenja su napravljena, dodaju se sojevi bakterija (70 µL). Zadnji korak je dodatak boje, resazurin, koji je početno plave boje, lagano fluorescira, a nakon što bakterije porastu, ireverzibilno mijenja boju u

ružičastu te tako služi kao indikator porasta mikroorganizama (13). Nakon što su sve potrebne tvari dodane u mikrotitarsku pločicu, ona ide u inkubator na 24 sata na 35±2ºC. Slijedeći dan je vidljiva MIK vrijednost, ali se još uvijek ne očitava. Sadržaj iz jažica nasađuje se na MHA ploču i stavlja se u inkubator, a nakon 24 sata konačno se točno može očitati MBK i MIK vrijednost. MIK vrijednost je ona koja je spriječila porast do 90%, dok je MBK ona koncentracija koja je viša od MIK-a ispitivane tvari i ubila je sve mikroorganizme u tom razrijeđenju (12).



Slika 6. Metoda dvostruke mikrodilucije s ekstraktom planike s Lošinja prije i poslije inkubacije s resuzarinom



Slika 7. Metoda dvostruke mikrodilucije s ekstraktom planike s Ugljana prije i poslije inkubacije s resuzarinom

3.2.5. Metoda Chekerboard assay (metoda šahovnice)

Metoda šahovnice je jedna od *in vitro* metoda koja se koristi kako bi se ispitala sinergijska aktivnost dviju tvari koje pokazuju antimikrobna svojstva. Kod spomenute metode koristi se mikrotitarska pločica gdje se vertikalno nanosi tvar A, a horizontalno tvar B. Koncentracije koje se dodaju u jažice su u rasponu oko željene minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Rezultati koji se dobiju ovom metodom izražavaju se izradom izobolograma ili izračunavanjem FIC indeksa. Ako je FIC indeks manji od 0,5 tada se radi o sinergiji, ako je između 0,5 i 4 riječ je o aditivnom učinku ili pak o indiferentnosti, a ako je FIC veći od 4 onda se radi o antagonizmu. (14)

Princip

Nakon što su određene pojedinačne MIK vrijednosti ekstrakata planike te je svakoj bakteriji određena njena MIK vrijednost, u ovom slučaju samo *Pseudomonas*. Ekstrakt iz kombinacije je razrijeđen uzduž apscise, a med je razrijeđen uzduž ordinate. Dodan je bakterijski inokulum te resuzarin kako bi promjena bila vizualizirana te je pločica stavljena na inkubaciju. Dobivene vrijednosti MIK-a u kombinaciji uvrštene su u formulu za izračun frakcijske inhibitorne koncentracije (engl. Fractional Inhibitory Concentration, FIC):

FIC(A) = MIK(A) u kombinaciji s (B) / MIK(A);
FIC(B) = MIK(B) u kombinaciji s (A) / MIK(B).

FIC vrijednosti potom su uvrštene u formulu za izračun frakcijskog inhibitornog indeksa (engl. Fractional Inhibitory Concentration Index, FICi): FICi = FIC(A) + FIC(B) = MIK(A)(B) / MIK(A) + MIK(B)(A) / MIK(B).

Postupak

Kako bi se ispitala interakcija meda i ekstrakta na bakterijski rast korištena je metoda šahovnice (engl. checherboard method). Najviše ispitivane otopine meda i ekstrakta bile su dvostruko veće od MIK-a. Pripremljene su dvije sterilne mikrotitatske ploče. U ploču 1 dodano je 50 µL MH bujona osim u 11. stupac u koji se dodaje 100 µL radne otopine meda te se potom 50 µL meda prenijelo u sve stupce osim u 1. i 2. stupac. U ploču 2 dodano je 100 µL MH bujona u sve redove osim u G red u koji se dodaje 200 µL radne otopine ekstrakta. Potom je 100 µL otopine ekstrakta preneseno u sve redove osim u A i B red. Nakon toga izvšen je transfer iz ploče 2 u ploču 1 prebacivanjem 50 µL sadržaja u sve redove osim u B i A red. Potom je u sve jažice ploče 1 dodano 100 µL bakterijske suspenzije od 1 x 10^6 CFU/mL. Ploča 2 je služila samo za pripremu, a ploča 1 je analizirana. Pripremom na navedeni način dobiveno je 36 kombinacija različitih koncentracija meda i ekstrakta. Koncentracija meda pada po redovima, od reda G prema redu C, dok koncentracija ekstrakta pada po stupcima, od stupca 11 do stupca 3. Stupac 2 je korišten kao kontrola ekstrakta, a red B kao kontrola za med. U rubne redove (A i H) i stupce (1 i 12) dodano je 200 µL destilirane vode kako bi se spriječilo isušivanje rubnih ispitivanih jažica. Ploče su potom stavljene na 24-satnu inkubaciju. Nakon inkubacije se vizualno očitala prisutnost ili odsutnost bakterijskog rasta uz pomoć resazurina. Interakcija između različitih koncentracija ekstrakta i meda određena je Frakcijskom inhibitornom koncentracijom - FIK (engl. Fractionary Inhibitory Concentration, FIC). MIK spoja u kombinaciji označava minimalnu inhibitornu koncentraciju toga spoja kada je u kombinaciji sa drugim spojem.

Rezultati sumarnog FIK-a se interpretiraju na sljedeći način:

- sinergična kada je $\Sigma FIK < 0,5$
- aditivna kada je $0.5 \leq \Sigma FIK \leq 1$
- indiferentna kada je $1 < \Sigma FIK \leq 4$

- antagonistični učinak kada je ΣFIK>4

4. Rezultati

4.1. Antibakterijsko djelovanje ekstrakta obične planike

U istraživanju antimikrobnih svojstava ekstrakta lista obične planike, ekstrakti listova su otopljeni u prikladnom otapalu, metanolu. Orijentacijsko antimikrobno djelovanje ekstrakta napravljeno je metodom difuzije u agar iz rupica, a ispitane su četiri bakterijske vrste, no nijedna bakterijska vrsta nije polučila nikakvu zapaženu zonu inhibicije. Po tome sudeći, planika nije pokazivala nikakav antimikrobni učinak, ali to nije tako, što će pokazati test dvostruke mikrodilucije. Slijedeći dio pokusa bio je istražiti kvantitativna antimikrobna svojstva ekstrakta lišća, a to je odrediti MIK i MBK vrijednosti. Sve vrijednosti su prikazane u tablici 2, a izražene su u mg/mL. S obzirom da su u pokusu korišteni ekstrakti s tri različita mjesta (Lošinj, Ugljan, Koločep), sva tri pokazuju slične rezultate. (Tablica 2.)

Ekstrak s Lošinja pokazuje najjače antibakterijsko svojstvo prema kliničkim sojevima *E. faecalis 59801* i *E. faecalis 59739* gdje MIK za oboje iznosi 0,8 mg/mL. Najslabiju osjetljivost prema ekstraktu pokazuje *K. pneumoniae 397722* (MIK je 12,8 mg/mL).

Ekstrakt s Koločepa također pokazuje najbolju antibakterijsku aktivnost prema sojevima *E. faecalis 59801* i *E. faecalis 59739* i kod njih MIK isto tako iznoso 0,8 mg/mL, a *K. pneumoniae 397722* je najneosjetljivija (MIK je 12,8).

Ekstrakt s Ugljana isto tako najbolje djeluje na kliničke sojeve *E. faecalis (59801 i 59739*) te je kod njih MIK 1,6 mg/mL, a *K. pneumoniae 397722* je i dalje najmanje osjetljiva (MIK je 12,8 mg/mL).

Tablica 2. Antibakterijsko djelovanje ekstrakta planike na bakterijske sojeve

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) i minimalna baktericidna koncentracija (MBK) testiranih bakterijskih sojeva (mg/mL)

	***Klebsiella pneumoniae 397722/14* (KBC)**		***Pseudmonas aeruginosa 1931 2017***		***Pseudomonas aeruginosa 62 420 2016***		***Enterococcus faecalis 59801 2016***		***Enterococcus faecalis 59739 2016***	
Ekstrakti planike										
	MIK	**MBK**	**MIK**	**MBK**	**MIK**	**MBK**	**MIK**	**MBK**	**MIK**	**MBK**
Lošinj	12,8	12,8	1,6	3,2	1,6	3,2	0,8	1,6	0,8	1,6
Ugljan	12,8	12,8	3,2	3,2	1,6	3,2	1,6	1,6	1,6	1,6
Koločep	12,8	12,8	1,6	3,2	1,6	3,2	0,8	1,6	0,8	1,6
Med	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400

4.2. Antibakterijski učinak sinergije meda i ekstrakta obične planike

Nakon što je ispitano djelovanje svakog esktrakta posebno, slijedeći korak bio je utvrditi postoji li sinergija između meda planike i njenog ekstrakta. Provedeno je ispitivanje kombinacije meda sa svakim ekstraktom posebno (Koločep, Ugljan, Lošinj), a dobiveni rezultati su pokazali kako kombinacija meda i ekstrakta ne daje sinergistički učinak već aditivni. To se može vidjeti iz FIC indeksa koji za Koločep iznosi 0,64 i 0,52, a i za Ugljan i za Lošinj iznosi 0,64 što je vidljivo u tablicama 3, 4 i 5.

Tablica 3. Antibakterijski učinak sinergije meda i ekstrakta planike s Koločepa na *Pseudomonas*

Arbutus unedo L. ekstrakt	MIK=3,125	
Arbutus unedo L. ekstrakt	MIK=3,125	
Arbutus unedo L. med	MIK=0,5	
$FIC_{ekstr.}$		0,24
FIC_{med}		0,4
FIC_i		0,64
Interakcija		AD

***aeruginosa* (g/mL)**

Tablica 4. Antibakterijski učinak sinergije meda i ekstrakta s Ugljana planike na *Pseudomonas aeruginosa* (g/mL)

Arbutus unedo L. med	MIK=0,5		
$FIC_{ekstr.}$		0,24	0,12
FIC_{med}		0,4	0,4
FIC_i		0,64	0,52
Interakcija		AD	AD

Tablica 5. Antibakterijski učinak sinergije meda i ekstrakta planike s Lošinja na *Pseudomonas aeruginosa* (g/mL)

Arbutus unedo L. ekstrakt	MIK=3,125	
Arbutus unedo L. med	MIK=0,5	
$FIC_{ekstr.}$		0,24
FIC_{med}		0,4
FIC_i		0,64
Interakcija		AD

5. Rasprava

Razni pripravci planike koriste se već jako dugo u narodnoj medicini s obzirom da je pokazala povoljne učinke na razne poteškoće kao što su gastrointestinalni, kardiovaskularni, dermatološki i urološki problemi, odnosno poremećaji. Plodovi planike danas se koriste u razne svrhe kao i u raznim industrijama kao što su proizvodnja alkoholnih pića, meda i džemova. Zbog njezinih brojnih pozitivnih učinaka na zdravlje, planika je predmetom brojnih istraživanja, a njezin biokemijski sastav je odgovoran za to. Naime, prepuna je fenola, flavonoida, vitamina i eteričnih ulja. Djeluje antioksidacijski, protuupalno i antikancerogeno zahvaljući fenolima. Različiti dijelovi biljke su u upotrebi za različite vrste problema, primjerice pripravci kore i korijena se koriste za ublažavanje gastrointestinalnih, kardiovaskularnih i dermatoloških problema dok se plod i ekstrakt koriste se u ublažavanju gastrointestinalnih i uroloških problema jer pokazuju diuretska, laksativna i uroantiseptična svojstva. Med je također jedan od proizvoda koji djeluje blagotvorno u vidu antioksidativnih i antiradikalnih svojstava. Upravo zbog toga cilj ovog istraživanja bio je istražiti i utvrditi antibakterijsko djelovanje ekstrakta obične planike i njegovo sinergističko djelovanje s medom planike. Antibakterijski učinak bio je usmjeren na uropatogene bakterije koje se većinski javljaju kod imunokomprimitiranih te u vidu bolničkih infekcija. Ispitane su četiri vrste bakterije, klinički izolati, i tri ekstrakta obične planike. Istraživanje je provedeno u *in vitro* uvjetima, a korištene metode su metode difuzije u agar iz rupica, metoda dvostruke mikrodilucije i metoda šahovnice. Metoda difuzije u agar iz rupica je orijentacijska metoda kako bi se provjerila osjetljivost bakterija na ispitivanu tvar, a rezultati su kvalitativni. Nijedna od ispitivanih bakterijskih vrsta nije pokazala primjetnu zonu inhibicije te se pokus dalje nastavlja na kvantitativna antimikrobna svojstva, a to je odrediti minimalnu inhibitornu i minimalnu baktericidnu koncentraciju metodom dvostruke mikrodilucije. To je metoda koja se temelji na seriji razrijeđenja ispitivane tvari te se prati rast mikroorganizama u nizu različitih koncentracija te se nakon inkubacije očitavaju MIK i MBK vrijednosti. Kao što je već spomenuto, ekstrakti su s tri različite lokacije, no svejdno su dali vrlo slične

rezultate. U sva tri slučaja *E. facelis* (sojevi 59801 i 59739) je pokazao najveću osjetljivost s MIK vrijednošću od 0,8 mg/mL za ekstrakte s Koločepa i Lošinja i 1,6 mg/mL za ekstrakt s Ugljana (tablica 2), a razlog tome može biti povećano djelovanje β-glukozidaze koju luči *E. facelis. P. aeruginosa* 1931 je također pokazao osjetljivost prema ekstraktu s Lošinja i Koločepa s MIK vrijednošću od 1,6 mg/mL, a *P. aeruginosa* 62 420 daje MIK rezultate 1,6 mg/mL za sva tri ekstrakta (tablica 2). Uzeći u obzir da MIK vrijednosti iznad 1,6 mg/mL znače slab antibakterijski učinak, da se zaključiti kako ostale bakterije nisu povoljno reagirale na antibakterijska svojstva ekstrakta te pokazuju otpornost prema istome. Mogući razlog takvog rezultate jest neadekvatna metoda ekstrakcije što znači da se nisu dovoljno ekstrahirale aktivne tvari s antimikrobnim svojstvima kao što u svojoj disertaciji navodi Jurica K. Nadalje, metoda šahovnice koja se korištena kako bi se ispitalo antibakterijsko svojstvo meda i ekstrakta u kombinaciji nije dalo željene, sinergističke rezultate, već aditivne. Sinergija je pojam koji objašnjava kako dvije tvari zajedno djeluju jače nego svaka tvar zasebno dok aditivnost jednostavno govori o zbroju učinka obje tvari. Kao što je bio slučaj sa ekstraktima, i njihova kombinacija s medom je polučila slične rezultate. U pokusu su korišteni prije spomenuti ekstrakti s tri različite lokacije, ali je za razliku od prijašnjih metoda u ovoj korištena samo jedna bakterijska vrsta, *P. aeruginosa*. Indeks frakcijske inhibitorne koncentracije ili FIC_i u sva tri slučaja iznosi 0,64 što je rezultat koji govori o aditivnom učinku (tablice 3, 4, 5). Bez obzira, konzumacija meda planike je i dalje itekako preporučljiva zbog njegovih ostalih korisnih sastojaka i povoljnih učinaka. Do danas med planike nije bio predmet mnogih istraživanja upravo zbog svoje cijene i kompliciranе proizvodnje, ali u budućnosti bi se upravo time trebalo zaokupiti kako bi potvrdili i u potpunosti istražili njegova ljekovita svojstva.

6. Zaključak

Na osnovi provedenog istraživanja može se zaključiti kako su sva tri ekstrakta planike pokazala najjači bakterijski učinak na kliničke sojeve *E. faecalis* 59801 i 59739 te su malo slabije djelovali na *P. aeruginosa,* ali svejedno učinkovito. Dobivenim rezultatima može se potvrditi antimikrobni potencijal za liječenje asimptomatskih infekcija mokraćnih puteva. To, naravno ovisi o količini fenolnih spojeva u listu, odnosno ekstraktu. Što se tiče samog meda, njegova MIK vrijednost nije dovoljno niska da bi se njegov samostalni antimikrobni učinak mogao uzeti u obzir, a u kombinaciji sa ekstraktom nije pokazao sinergistički učinak, već aditivni. Samim time kombinacija meda i ekstrakta prilikom liječenja urinarnih infekcija neće doprinjeti boljem antimikrobnom učinku, ali je preporučljiva zbog njegovih drugih učinaka.

7. Literatura

1. Oliveira I., Baptista P., Bento A., Pereira J.A. *Arbutus unedo L.* and its benefits on human health. Journal of Food an Nutrition Research. 2011;50(2):73-85
2. Tkalčec I. Učinak ekstrakta listova obične planike (Arbutus unedo L.), arbutin i hidrokinona na stanice PK-15 i HEPG-2 u uvijetima *in vitro.* Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2018.
3. Sikirić S. Učinak ekstrakta lista obične planike (Arbutus unedo L.), arbutina i hidrokinona na hematološke parametre krvi u štakora soja Lewis. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2017.
4. U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information: PubChem, Arbutin; pristupljeno 9.6.2019. Dostupno na https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/arbutin
5. Tariba Lovaković B., Lazarusa M, Brčić Karačonji I., Jurica K, Živković Semren T., Lušić D. i sur. Multi-elemental composition and antioxidant properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey from the coastal region of Croatia: Risk-benefit analysis. 2017 Sept 22; doi: 10.1016/j.jtemb.2017.09.022
6. Tuberoso C. I. G., Bifulco E., Caboni P., Cottiglia F., Cabras P., Floris I. Floral Markers of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Honey. Journal of agricultural and food chemistry. 2010, 58, 384-389; doi: 10.1021/jf9024147
7. Blaut M., Braune A., Wunderlich S., Sauer P., Schneider H., Glatt H. Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria. Food and Chemical Toxicology 44 (2006) 1940–1947
8. Shibata M., Hirose M., Tanaka H., Asakawa E., Shirai T., Ito N. Induction of renal cell tumors in rats and mice, and enhancement of hepatocellular tumor development in mice after long-term hydroquinone treatment. Jpn. J. Cancer Res. 82, 1211-1219, November 1991

9. Kalenić S. i sur. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. Str. 140-142, 314-315
10. Behzadi P., Behzadi E., Yazdanbod H., Aghapour R., Akbari Cheshmeh M., Salehian Omran D. A survey on urinary tract infections associated with the three most common uropathogenic bacteria. 2010 Apr; 5(2): 111–115
11. Mlinarić Galinović G. i sur. Specijalna medicinska mikrobiologija i parazitologija. Zagreb: Merkur A.B.D.; 2003. Str. 10-12, 38-45, 67-70
12. Jurica K. Fenolne tvari iz obične planike (*Arbutus unedo* L.) i njihovi biološki učinci [doktorski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, biološki odsjek; 2016.
13. Stemcell technologies, Resazurin (Sodium Salt); cell proliferation and viability dye; pristupljeno 21.8.2019. Dostupno na https://www.stemcell.com/resazurin-sodium-salt.html
14. Štefanac D. Kemijski sastav i biološka aktivnost eteričnih ulja. Split: Sveučilište u Splitu, kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet; 2018.
15. Herbateka, Planika – Arbutus unedo L.; pristupljeno 26.8.2019. Dostupno na http://www.herbateka.eu/content/planika-arbutus-unedo
16. Complexi Light, Alpha arbutin; pristupljeno 26.8.2019. Dostupno na http://www.herbateka.eu/content/planika-arbutus-unedo

POPIS KRATICA

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MBK – minimalna baktericidna koncentracija

FIK – frakcijska inhibitorna koncentracija

MHA – Müeller – Hinton agar

MHB – Müeller – Hinton bujon

8. Životopis

Osobni podatci

Ime / Prezime Dalila Sadiku

Adresa Stubište Juliusa Glaxa 8, 51410 Opatija

Telefonski broj+385 91 112 6110

Državljanstvo Hrvatsko

Datum rođenja08. prosinca 1996.

Spol ženski

Obrazovanje i osposobljavanje

2016. – 2019. Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Ul. Braće Branchetta 20/1, 51000, Rijeka

2011. – 2015. Medicinska škola u Rijeci, Ul. Braće Branchetta 11a, 51000 Rijeka

2002. – 2010. Osnovna škola Rikard Katalinić Jeretov, Opatija

Studentski poslovi – H&M Rijeka

Osobne i komunikacijske vještine

Materinski jezik: hrvatski Strani jezik: engleski

Izražen timski duh, odlične komunikacijske vještine, organiziranost i točnost.

Digitalna kompetencija - Microsoft Office paket (Word, Excel, PowerPoint) na svakodnevnoj bazi Internet(e-mail, google+, društvene mreže)

Dodatne informacije

Dio organizacijskog odbora i sudionik 1. i 2. studentskog kongresa zaštite zdravlja - Sanitas

Sudjelovanje na 2. studentskom kongresu Okolišnog zdravlja s međunarodnim sudjelovanjem kao pasivni sudionik.