

# Antibakterijska aktivnost hidroksiapatita obogaćenog ionima srebra

---

**Turk, Helena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:719437>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-28**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Helena Turk

**Antibakterijska aktivnost hidroksiapatita  
obogaćenog ionima srebra**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Helena Turk

**Antibacterial activity of silver-doped  
hydroxyapatite**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za bakteriologiju na Mikrobiološkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Tomislava Ivankovića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre edukacije biologije i kemije.

## ZAHVALA

Iskreno zahvaljujem svom mentoru izv. prof. dr. sc. Tomislavu Ivankoviću na prenesenom znanju i vještinama, svakom objašnjenju, strpljivosti, savjetima i pomoći tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada. Drago mi je što ste upravo Vi bili moj mentor i olakšali završetak mog školovanja.

Hvala mom prijatelju Goranu na pomoći oko statističke obrade podataka.

Hvala curama koje su mi nesebično pomogle sa svojim savjetima oko studiranja.

Hvala i mojim Međimurkama, Patriciji i Viktoriji, koje su učinile ovo studiranje ljepšim i ugodnijim iskustvom. Hvala vam na razgovoru, smijehu, pomoći i stvorenim uspomenama.

Veliko hvala mojoj obitelji na pruženoj prilici za nastavak školovanja. Hvala vam što ste strpljivo slušali sve moje probleme, nedoumice, davali mi savjete i iskreno se veselili i ponosili svakim mojim uspjehom.

I zadnje hvala mom dečku Leu, što je bio strpljivi suputnik na cijelom ovom putovanju. Hvala ti što si bio moja potpora, bodrio me i vjerovao u mene. Hvala ti što si moj najveći obožavatelj i što ti moji uspjesi znače jednako kao da su tvoji.

*Još jedanput, iskreno od srca, veliko hvala svima!*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Antibakterijska aktivnost hidroksiapatita obogaćenog ionima srebra

Helena Turk

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Hidroksiapatit je obećavajući biomaterijal u regeneraciji kostiju zbog svojih bioaktivnih svojstva te strukturne i kemijske sličnosti s anorganskom fazom koštanog tkiva. Zbog nedostatka antibakterijskih svojstva, supstituira se ionom srebra za postizanje antibakterijske aktivnosti. Srebro posjeduje antibakterijska svojstva, no može biti citotoksično u većim koncentracijama. Za smanjenje citotoksičnosti srebrova iona, kosupstituira se stroncijevim ionom. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti antibakterijsku aktivnost uzoraka hidroksiapatita obogaćenog ionima srebra i hidroksiapatita obogaćenog ionima srebra i stroncija metodom disk difuzije i određivanjem brojnosti bakterija u suspenziji. Testirane bakterije bile su *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* kao predstavnici najčešćih patogena u infekcijama kostiju. Nesupstituirani hidroksiapatit nije pokazao antibakterijsku aktivnost. Svi uzorci hidroksiapatita supstituirani srebrovim ionom i uzorci hidroksiapatita supstituirani srebrovim i stroncijevim ionom pokazali su antibakterijsku aktivnost u obje metode što je vidljivo iz pojave zone inhibicije i analizom broja živih bakterija u bakterijskoj suspenziji nakon kontakta s uzorcima u određenom vremenu. Antibakterijska aktivnost uzoraka hidroksiapatita supstituiranih ionima srebra bila je ovisna o vremenu kontakta i količini supstituiranog srebrova iona.

Ključne riječi: antibakterijsko djelovanje, hidroksiapatit, ion srebra, ion stroncija, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

(52 stranica, 32 slika, 3 tablica, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković  
doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić  
izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Rad prihvaćen: 8. rujna 2022.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

## Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite

Helena Turk

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Hydroxyapatite is a promising biomaterial in bone regeneration due to its bioactive properties as well as its structural and chemical similarities to the inorganic phase of bone tissue. Due to lack of antibacterial properties, it is substituted with a silver ion to achieve antibacterial activity. Silver has antibacterial properties, but can be cytotoxic in higher concentrations. To reduce the cytotoxicity of silver ions, it is co-substituted with strontium ion. The aim of this study was to determine the antibacterial activity of samples of hydroxyapatite enriched with silver ions and hydroxyapatite enriched with silver and strontium ions using the disk diffusion method and determining the number of bacteria in suspension. The tested bacteria were *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as representatives of the most common pathogens in bone infections. Unsubstituted hydroxyapatite did not show antibacterial activity. All hydroxyapatite samples substituted with silver ion and hydroxyapatite samples substituted with silver and strontium ions showed antibacterial activity in both methods, which is evident from the appearance of the inhibition zone and the analysis of the number of living bacteria in the bacterial suspension after contact with the samples for a certain amount of time. The antibacterial activity of hydroxyapatite samples substituted with silver ions was dependent on the contact time and the amount of substituted silver ions.

Keywords: antibacterial activity, hydroxyapatite, silver ion, strontium ion, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

(52 pages, 32 figures, 3 tables, 57 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Tomislav Ivanković

Reviewers: Dr. Tomislav Ivanković, Associate Professor

Dr. Mirela Sertić Perić, Professor

Dr. Draginja Mrvoš-Sermek, Associate Professor

Thesis accepted: 8<sup>th</sup> September 2022

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Bolesti kostiju.....	1
1.2. Inženjerstvo koštanog tkiva.....	1
1.3. Biologija kostiju .....	2
1.4. Okosnice.....	3
1.5. Biomaterijali.....	4
1.6. Biokeramika .....	5
1.7. Hidroksiapatit.....	5
1.8. Srebro .....	7
1.9. Stroncij .....	8
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>10</b>
3.1. Materijali .....	10
3.1.2. Testirani uzorci.....	10
3.1.3. Kemikalije i hranjiva podloga .....	10
3.1.4. Uređaji i pribor .....	11
<b>3.2. Metode .....</b>	<b>12</b>
3.2.1. Sinteza uzoraka hidroksiapatita.....	12
3.2.2. Bojenje po Gramu .....	13
3.2.3. Priprema bakterijskih suspenzija.....	13
3.2.4. Metoda disk difuzije u agaru .....	14
3.2.5. Ispitivanje morfologije površine uzoraka.....	15
3.2.6. Određivanje broja bakterija u suspenziji (CFU metoda).....	15
3.2.7. Mjerenje pH i određivanje broja imobiliziranih bakterija .....	16
3.2.8. Statistika .....	17
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>18</b>
4.1. Bojenje po Gramu .....	18
4.2. Metoda disk difuzije u agaru .....	18
4.3. Ispitivanje morfologije površine uzoraka.....	25
4.4. Određivanje broja bakterija u suspenziji (CFU metoda).....	29
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>39</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>46</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>47</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>53</b>



## POPIS KRATICA

HAp	nesupstituirani hidroksiapatit
HAp_1Ag	hidroksiapatit supstituiran 1 mol % Ag <sup>+</sup> ionom
HAp_2,5Ag	hidroksiapatit supstituiran 2,5 mol % Ag <sup>+</sup> ionom
HAp_5Ag	hidroksiapatit supstituiran 5 mol % Ag <sup>+</sup> ionom
HAp_1Ag/Sr	hidroksiapatit supstituiran 0,5 mol % Ag <sup>+</sup> i Sr <sup>2+</sup> ionom
HAp_2,5Ag/Sr	hidroksiapatit supstituiran 1,25 mol % Ag <sup>+</sup> i Sr <sup>2+</sup> ionom
HAp_5Ag/Sr	hidroksiapatit supstituiran 2,5 mol % Ag <sup>+</sup> i Sr <sup>2+</sup> ionom
HAp_1Sr	hidroksiapatit supstituiran 1 mol % Sr <sup>2+</sup> ionom
HAp_2,5Sr	hidroksiapatit supstituiran 2,5 mol % Sr <sup>2+</sup> ionom
HAp_5Sr	hidroksiapatit supstituiran 5 mol % Sr <sup>2+</sup> ionom
CFU	broj jedinica koje formiraju kolonije (engl. <i>Colony Forming Units</i> )
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. <i>Scanning Electrone Microscopy</i> )
EUCAST	engl. <i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease</i>

# 1. UVOD

## 1.1. Bolesti kostiju

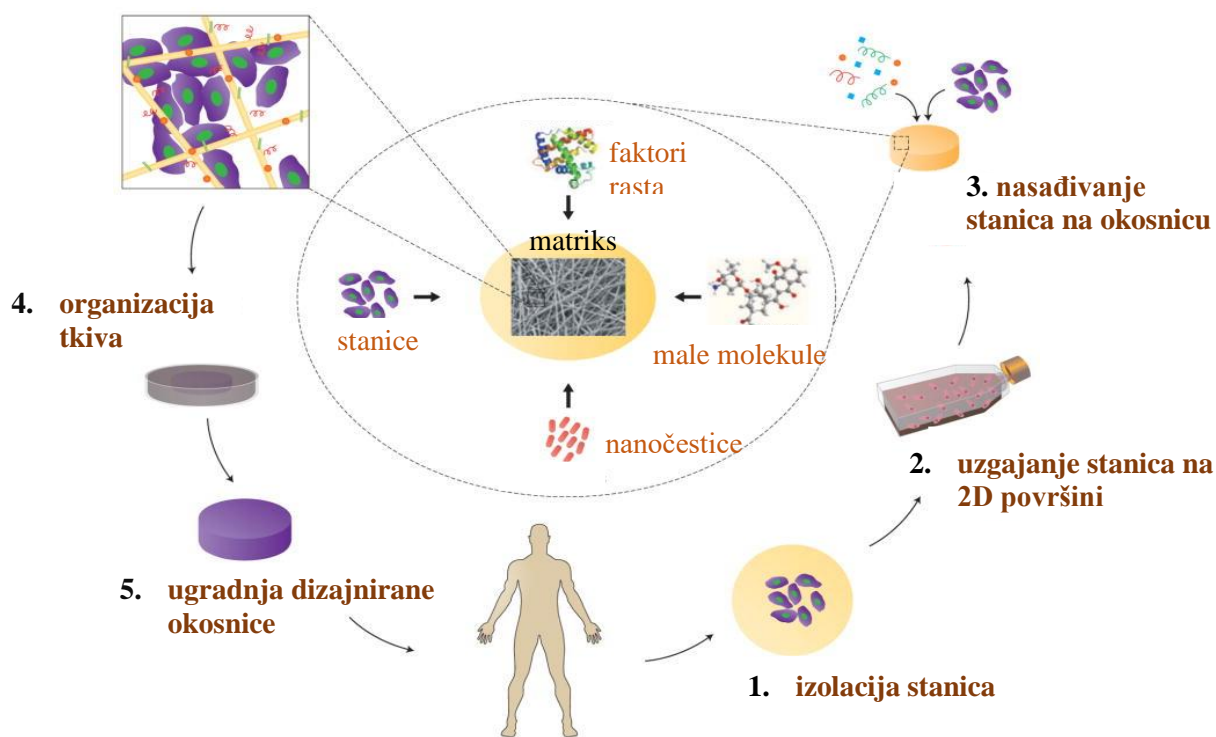
Danas je u svijetu sve veća pojava koštanih nedostataka nastalih kao posljedica ozljeda, bolesti ili teških trauma. Do naglog porasta bolesti i poremećaja mišićno-koštanog sustava dolazi zbog produljenja životnog vijeka i povećanja brojnosti starije populacije (Agarwal i Garcia 2015). Upravo kod osoba starijih od 50 godina, bolesti kostiju predstavljaju polovicu kroničnih bolesti. Neke od najčešćih bolesti i prijeloma koji se javljaju su: križbolje, skolioza, osteoporoza, infekcije kostiju, tumori, urođeni defekti, osteoartritis (Ghassemi i sur. 2018). Gubitak koštane mase znatno utječe na kvalitetu života i zdravlje pacijenta te je to razlog zbog čega su medicinski troškovi liječenja povezani s bolestima kostiju stalno u porastu (Agarwal i Garcia 2015).

Kost ima odličnu sposobnost regeneracije zahvaljujući svojoj dinamičkoj strukturi. Veći i kompliciraniji nedostaci mogu odgoditi zacjeljenje, zato im je potreban dodatan tretman. Tijekom godina razvijeno je nekoliko različitih metoda liječenja bolesti kostiju (Agarwal i Garcia 2015). Nakon krvi, koštano tkivo je najčešće transplantirano tkivo. Autotransplantacija (samopresađivanje) predstavlja danas „zlatni standard“ jer sadrži osteogene stanice koje diferenciraju i ubrzavaju formiranje koštanog tkiva i osteoinduktivne faktore koji pružaju podršku za koštani rast. No, ova metoda ima i nedostataka, a to su: dodatna kirurška intervencija, ograničena opskrba transplantatom u slučaju većih koštanih oštećenja, postoperativna bol (Čadež 2011). Postoji i alogeni i ksenogeni presadak. Alogeni presadak je koštano tkivo koje potječe od donora, a njegova uporaba je rizična zbog mogućnosti imunološkog odbacivanja i prijenosa zaraznih bolesti. Ksenogeni presadak potječe od kosti drugih sisavaca (Noori i sur. 2017). Kako bi se zaobišle ove komplikacije, razvila se nova grana biomedicine, tzv. inženjerstvo koštanog tkiva.

## 1.2. Inženjerstvo koštanog tkiva

Jednu od prvih definicija inženjerstva tkiva dali su Langer i Vacanti (1993) kao interdisciplinarnog područja koje primjenjuje principe inženjerstva i znanosti za razvoj bioloških nadomjestaka koji mogu održati, poboljšati ili obnoviti funkciju tkiva. Inženjerstvo koštanog tkiva počiva na temeljima inženjerstva tkiva. Cilj inženjerstva koštanog tkiva je inducirati popravak i regeneraciju

oštećenih dijelova koštanog tkiva kombinacijom okosnica, stanica i bioloških aktivnih molekula (Qi i sur. 2021). Koncept inženjerstva koštanog tkiva je da se najprije koštane stanice izoliraju biopsijom iz prirodnog koštanog tkiva pacijenta te se uzgajaju na dvodimenzionalnoj površini. Zatim se stanice nasađuju na okosnicu uz faktore rasta, male molekule i nanočestice zbog poticanja stanične proliferacije. Okosnica je predložak za stvaranje tkiva. Ovakvo dizajnirano tkivo se uzgaja u bioreaktoru zbog osiguravanja optimalnih uvjeta za dobivanje tkiva koje ima karakteristike prirodnog tkiva. Nakraju slijedi ugradnja dizajnirane okosnice u oštećeno koštano tkivo pacijenta gdje dolazi do regeneracije tkiva (Dvir i sur. 2011). Posljednjih godina sve je više istraživanja usmjerenih na razvoj okosnica koje sadrže terapijske lijekove, čime se želi ostvariti dvostruka funkcija okosnice: okosnica za rast novog tkiva i okosnica kao nosač za isporuku lijekova. Za liječenje koštanih nedostataka, važno je poznavati i razumjeti biologiju kostiju (Willerth i Sakiyama-Elbert 2007).



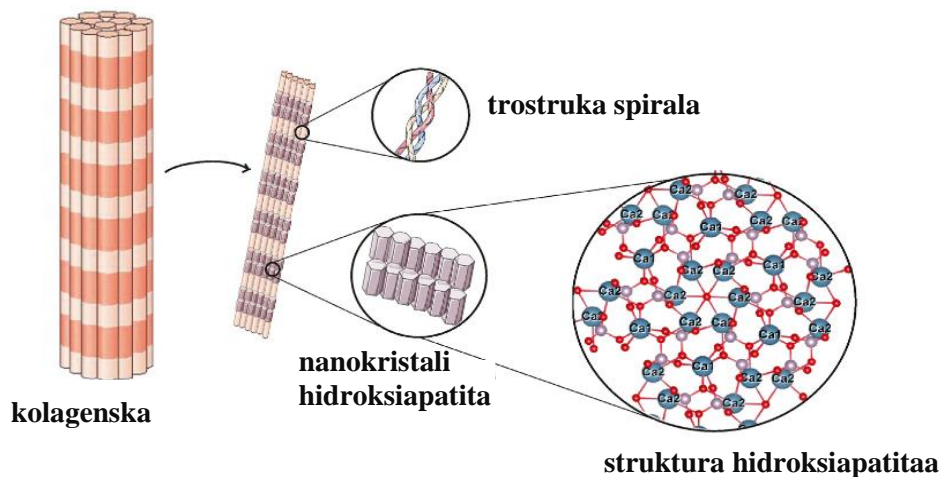
**Slika 1.** Koncept inženjerstva koštanog tkiva (preuzeto i prilagođeno prema Dvir i sur. 2011)

### 1.3. Biologija kostiju

Kost ili koštano tkivo je dinamično, mineralizirano vezivno tkivo koje ima odlična fizikalna i mehanička svojstva. Nekoliko je uloga kostiju, a to su: osnova za kretanje, potpora tijelu, zaštita

unutarnjih organa i skladištenje kalcijevih i fosfatnih iona. Kost ima vanjski sloj (kompaktna kost) koji daje vanjski potporanj tijelu i unutarnji sloj (spongiozna kost) u čijim šupljinama dolazi do izmjene hranjivih tvari (Florencio-Silva i sur. 2015).

Koštano tkivo sastoji se od specifičnih koštanih stanica i organske koštane matrice. Stanice su osteoblasti, osteociti i osteoklasti. Osteoblasti proizvode, odlažu i mineraliziraju matricu. Osteociti su zreli osteoblasti zarobljeni unutar mineralne faze, a osteoklasti sudjeluju u razgradnji koštanog tkiva (Amini i sur. 2012). Organska koštana matrica sastoji se od organske (25 %) i anorganske (75 %) faze. Približno 90 % organske faze formira kolagen tipa I, a ostatak čine proteini, lipidi, polisaharidi i druge makromolekule. U anorgansku fazu ubrajaju se voda (između 5 i 10 %) i mineralni dio (između 60 i 70 %) koji je zapravo kalcijev fosfat u obliku karbonatnog hidroksiapatita s manjkom kalcijeva iona. Molekule kolagena tvore vlakna i daju kostima fleksibilnost, a između njih se nalaze ravnomjerno raspoređeni kristali hidroksiapatita nanometarske veličine koji pružaju kostima čvrstoću (Sommerfeldt i Rubin 2001).



**Slika 2.** Hijerarhijska struktura kolagena i hidroksiapatita (preuzeto i prilagođeno prema Ressler i sur. 2021)

## 1.4. Okosnice

Okosnice imaju veliko značenje u inženjerstvu koštanog tkiva. Njihova uloga je oponašanje građe i funkcije koštane matrice i time omogućavaju trodimenzionalni prostor za adheziju, staničnu

proliferaciju i diferencijaciju tako dugo dok se koštano tkivo ne oporavi (Qu i sur. 2019). Prilikom dizajniranja samih okosnica treba uzeti u obzir nekoliko varijabli: biokompatibilnost, biorazgradivost, biofunktionalnost, biaktivnost, mehanička svojstva okosnice, poroznost i osteogena svojstva okosnice (Ghassemi i sur. 2018).

Biokompatibilnost okosnice je sposobnost podržavanja normalne stanične aktivnosti uključujući molekularne signalne puteve bez izazivanja štetnih utjecaja na domaćina, poput toksičnosti, kancerogenosti, pojava upala ili alergija. Biorazgradivost je sposobnost okosnice da se razgradi kontroliranom brzinom kroz vrijeme kako bi se stvorio prostor za rast novog tkiva. Biofunktionalnost okosnice podrazumijeva da okosnica tijekom određenog vremenskog perioda obavlja predviđenu funkciju (Velasco i sur. 2015). Biaktivnost okosnice je u stvaranju direktne veze sa svojom okolinom kako bih omogućila pokretanje specifične reakcije na mjestu gdje je postavljena. Mehanička svojstva se odnose na podnošenje težine hidrostatskih tlakova medija u kojima se okosnica nalazi tijekom razdoblja regeneracije. Poroznost je postojanje međusobno povezanih pora koje omogućuju vaskularizaciju okosnice, prijenos hranjivih tvari, kisika i otpadnih metaboličkih tvari. Prosječna veličina pora je 300 nm (Brown i sur. 2009). Osteogena svojstva obuhvaćaju osteoindukciju i osteokonduktivnost (Velasco i sur. 2015). Prilikom izrade okosnica važna komponenta je upravo odabir prikladnog biomaterijala.

## **1.5. Biomaterijali**

Pronađeni arheološki nalazi pokazali su da su ljudi kao nadomjestak za zube ili kosti koristili koralje, školjke, drvo te neke metale (zlato, srebro, amalgam). U Kini se već 659. godine amalgam koristio za popravak zuba, što je prvo zabilježeno korištenje amalgama u tu svrhu. Općenito govoreći, materijali koji su se prvotno koristili su inertni, tj. ne stupaju u interakciju s okolnim tkivom. Ograničenja navedenih nadomjesnih materijala dovela su do razvoja biomaterijala (Dorozhkin 2013). Biomaterijali su osnovni dijelovi okosnica. Pojavili su se 1960. godine. Biomaterijali su tvari ili kombinacije tvari, bilo prirodnog ili sintetskog podrijetla, koje se određeni period koriste za liječenje, popravak ili zamjenu tkiva ili organa. Za izradu okosnica koriste se sljedeći biomaterijali: metali, polimeri i biokeramika. Kompozitni materijali nastaju spajanjem dvaju ili više materijala, stoga kombinacija polimera i bioaktivne keramike ima široku primjenu u

inženjerstvu koštanog tkiva zbog dobrih induktivnih svojstava (Qu i sur. 2019).

## 1.6. Biokeramika

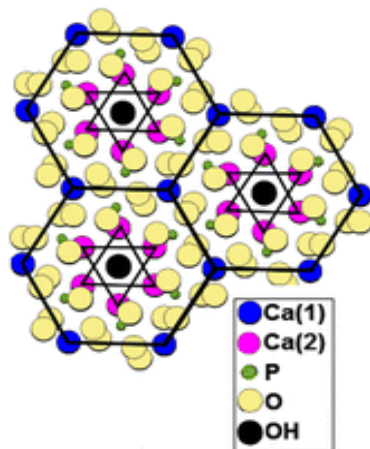
Biokeramika se koristi kao zamjenski materijal za pojedina tkiva u tijelu čovjeka. Biokeramika koja se koristi u inženjerstvu koštanog tkiva može se na temelju interakcije s domaćinom podijeliti na bioinertnu i bioaktivnu keramiku. Bioinertna keramika daje fizičku potporu, ali bez interakcije s okolnim prirodnim tkivom (glinica, cirkonij). S druge strane, bioaktivna keramika ima sposobnost komuniciranja i vezanja s okolnim koštanim tkivom s ciljem stvaranja novih kostiju. U bioaktivnu keramiku ubrajaju se kalcijev fosfat, staklokeramika i određeni kompoziti stakla (Baino i sur. 2015). Kalcijev fosfat najčešće se koristi u inženjerstvu koštanog tkiva kao nadomjestak za kosti ili zube te za nadogradnju ili regeneraciju kostiju zbog sličnosti svojeg sastava s mineralima kostiju (Bose i Solaiman 2012).

## 1.7. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (u daljnjem tekstu HAp) mineral je kalcijeva fosfata koji se nalazi u kostima i zubima kralježnjaka. HAp je obećavajući materijal za izradu okosnica zbog svoje kemijske i strukturne sličnosti s anorganskom apatitnom fazom koštanog tkiva (Palmer i sur. 2008). Koristi se u inženjerstvu koštanog tkiva kao punilo, kao sustav za dostavu lijekova, kao prah, granula, porozni materijal ili kao prevlaka na metalnim implantatima s ciljem poticanja rasta kostiju na njihovim površinama. Ima primjenu u medicini i stomatologiji zbog svoje izvrsne bioaktivnosti, biokompatibilnosti i osteokonduktivnosti (Dehghanghadikolaei i Fotovvati 2019).

Hidroksiapatit ima formulu  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ , no obično se koristi formula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  kako bi se istaknulo da se jedinična ćelija sastoji od dvaju strukturnih entiteta. HAp ima heksagonsku kristalnu strukturu s prostornom skupinom  $P6_3/m$  i parametrima rešetke  $a = b = 9,432 \text{ \AA}$  i  $c = 6,9 \text{ \AA}$ . U strukturi se nalazi deset atoma kalcija smještenih u dva simetrijski različita kristalografska položaja, Ca(I) i Ca(II). Za stehiometrijski HAp molarni omjer Ca/P iznosi 1,67, dok je omjer Ca/P niži kod biološkog apatita (Eliaz i Metoki 2017). Istraživanja su pokazala da je molarni omjer Ca/P u biomineraliziranom koštanom tkivu niži od 1,67 zbog čestih izmjena kalcijevih i fosfatnih iona

u procesu održavanja homeostaze (Palmer sur. 2008). Osim u stehiometriji HAp se od bioloških apatita razlikuje po strukturi, kristaliničnosti, fizikalno-kemijskim i mehaničkim svojstvima. Niži Ca/P omjer uzrokuje veću topljivost, stoga je topljivost biološkog apatita veća (Duta i sur. 2021).



**Slika 3.** Kristalna heksagonska struktura hidroksiapatita (preuzeto i prilagođeno prema Zougrou i sur. 2016)

Fizikalno-kemijska i mehanička svojstva hidroksiapatita mogu se poboljšati zahvaljujući kristalnoj strukturi HAp-a. Struktura HAp-a je stabilna, ali njezina fleksibilnost omogućuje velik broj kationskih i anionskih izmjena (O'Neill 2007). Ideja dolazi od toga što prirodni karbonatni hidroksiapatit uz kalcijeve, fosfatne i hidroksidne ione sadrži i druge ione poput  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  te  $\text{Si}^{4+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  ione u tragovima. Dodavanje ovih iona u kristalnu strukturu HAp-a može dovesti do kontrolirane razgradnje, povećane mehaničke čvrstoće i bolje bioaktivnosti materijala (Bose i sur. 2013). Ionske supstitucije mogu se provesti na mjestu kalcijevih iona te fosfatnih ili hidroksidnih skupina. Kalcij se može supstituirati ionima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  i drugima, fosfatni ion se supstituira  $\text{CO}_3^{2-}$  ili  $\text{SiO}_4^{4-}$  ionima, a hidroksidni ion supstituiraju  $\text{F}^-$  i  $\text{Cl}^-$  ioni. Ove supstitucije dovode do promjena u parametrima ćelije, kristaliničnosti i topljivosti HAp-a, a HAp sastavom postaje sve sličniji prirodnom karbonatnom hidroksiapatitu (Dorozhkin 2011).

Izbor prikladnih metoda za sintezu HAp-a od velike je važnosti kako bi se uspjela dobiti što bolja mehanička i strukturna svojstva za pripremu okosnica (Mouriño i sur. 2012). Neke od metoda koje su razvijene za sintezu HAp-a jesu kemijska precipitacija, sol-gel metoda, hidrotermalna metoda

te emulzijska metoda (Ressler i sur. 2020). Ove metode zahtijevaju puno vremena, a troškovi pripreme ponekad su veliki. Ove metode kemijske sinteze ne mogu u potpunosti reproducirati sastav mineralne faze kostiju jer sintetiziranim hidroksiapatitima nedostaju elementi u tragovima (Duta i sur. 2021). Posljednjih se nekoliko godina istraživanja usmjeravaju na metode koje se temelje na prirodnim biogenim izvorima koji u sebi sadrže kalcijeve fosfate. Prirodni izvori kalcija su ljuske jaja, školjke, kosti sipe, riblje kosti, koralji. Korištenje ovih biogenih izvora ujedno dovodi i do smanjenja i recikliranja biološkog otpada (Ressler i sur. 2020).

Čak i ako je sterilnost tijekom operacije ugradnje okosnice zadovoljena, svejedno može doći do pojave infekcija na mjestu implantacije. Upravo je razvoj infekcija nedostatak hidroksiapatita kao biomaterijala (Rodríguez-Merchán i sur. 2021). Infekcija se javlja kada na površini implantata dođe do razvoja mikrobnih kolonija i biofilma. One usporavaju i ometaju proces zacjeljivanja, a može doći i do odbacivanja implantata. Iz tog su razloga često potrebni dodatni kirurški zahvati, troškovi liječenja su sve veći, a oporavak pacijenta sve duži (Gokcekaya i sur. 2021). Kako bi se rizik od nastanka bakterijske infekcije smanjio, na hidroksiapatitu na spoju kosti i implantata koriste se antibiotici (Riaz i sur. 2018). Danas je jedan od svjetskih zdravstvenih problema sve veća otpornost bakterija na antibiotike. Zato je sve više istraživanja usmjereno na razvoj biomaterijala koji imaju antibakterijsku aktivnost bez primjene antibiotika. Uvođenje metalnih nanočestica (npr. Au, Ag) kao antimikrobnih sredstava ili supstitucija kalcijevih fosfata s ciljnim ionima (npr.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ) predstavljaju nove strategije za dobivanje biomaterijala s antibakterijskom aktivnošću (De Santis i sur. 2021).

## **1.8. Srebro**

Srebro je plemeniti metal koji se još u davnoj prošlosti i u svakodnevicu i u medicini koristio zbog svojih antibakterijskih svojstava (Abdul Halim i sur. 2021). Jedan je od najpoznatijih antibakterijskih sredstava za dezinfekciju rana i za liječenje brojnih bakterijskih infekcija (Ueno i sur. 2016). Njegova uporaba je zabilježena već u antičkome dobu kada su Rimljani i Grci srebro koristili za dezinfekciju vode, a srebrno posuđe za čuvanje hrane. Danas se srebro intenzivno koristi u biomedicini, uglavnom kod regeneracije koštanog tkiva (Abdul Halim i sur. 2021).



Srebro je pokazalo baktericidna svojstva protiv širokog spektra mikroorganizama (bakterija, virusa, gljiva) (Humberto i sur. 2011). Učinkovito inhibira rast gram-pozitivnih (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*...) i gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*...) (Siddiqi i sur. 2018). Bakterije pokazuju nisku stopu otpornosti na srebro koje je ugrađeno u hidroksiapatit (Morimoto i sur. 2022). Nekoliko je predloženih baktericidnih mehanizama kojim  $\text{Ag}^+$  ioni uzrokuju oštećenja mikroorganizama, poput narušavanja funkcije proteina, nukleinskih kiselina te oštećenja stanične membrane (Ressler i sur. 2021).

Osim što ubija bakterije i inhibira njihov rast, srebro je citotoksično za ljudske stanice kada njegova koncentracija prijeđe određenu granicu (Shi i sur. 2015). Srebro pokazuje svoju antibakterijsku aktivnost pri minimalnoj koncentraciji od 35 ppb bez ikakve toksičnosti za stanice sisavaca (Bose i Solaiman 2012). Mjere za smanjenje citotoksičnosti uključuju smanjenje veličine čestica srebra, optimizaciju njegove koncentracije u biomaterijalu (HAp-u) i otpuštanje njegovih iona (Shi i sur. 2015). Određivanje optimalne koncentracije dodanog srebra u hidroksiapatit predmet je proučavanja znanstvenika kako bi se uspjelo osigurati antimikrobno djelovanje uz održavanje bioaktivnosti implantata te spriječile bakterijske infekcije, a da ne dođe do toksičnog učinka na obližnje stanice tkiva (Gokcekaya i sur. 2021). Također, toksičnost srebra može se ublažiti koadsorpcijom raznim kationskim i anionskim vrstama koje neutraliziraju toksičnost srebra (Arcos i Vallet-Regí 2020).

## 1.9. Stroncij

Stroncij je neesencijalni element koji se u koštanom tkivu nalazi u tragovima. Pokazalo se da ugradnjom  $\text{Sr}^{2+}$  iona u hidroksiapatit dolazi do jače regeneracije kostiju. Vrlo je sličan kalcijevom ionu u naboju i veličini, stoga zamjenjuje kalcijeve ione u kristalnoj strukturi hidroksiapatita (Bose i sur. 2013). Stroncijevi ioni u hidroksiapatitu imaju stimulatornu ulogu na stanice osteoblasta, a inhibitornu ulogu na stanice osteoklasta, odnosno potiču stvaranje kostiju, a inhibiraju resorpciju kostiju (Geng i sur. 2015). Uvođenjem  $\text{Sr}^{2+}$  iona u hidroksiapatit dolazi do povećane ekspresije osteogenih gena. Stroncij je sekundarna kemikalija koja se može koristiti u ublažavanju toksičnosti samog srebra, a da se pritom ne smanje njegova antimikrobna svojstva (Ressler i sur. 2021).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je:

1. odrediti antibakterijsku aktivnost uzoraka hidroksiapatita obogaćenog ionima srebra i hidroksiapatita obogaćenog ionima srebra i stroncija metodom disk difuzije i određivanjem brojnosti bakterija u suspenziji (CFU metoda)
2. vizualno odrediti prisutnost i morfologiju bakterijskih stanica na uzorcima hidroksiapatita metodom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM – *Scanning Electrone Microscopy*)

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Bakterijski sojevi

Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti različitih uzoraka hidroksiapatita koristila sam dva bakterijska soja. Gram-negativna bakterija *Escherichia coli* (soj DSM 498) nabavljena je iz banke mikroorganizama Deutsche Sammlung von Microorganismen, a gram-pozitivna bakterija *Staphylococcus aureus* (soj ATCC 25923) iz banke mikroorganizama American Type Culture Collection.

#### 3.1.2. Testirani uzorci

Određivala sam antibakterijsku aktivnost deset različitih uzoraka hidroksiapatita sintetiziranih na Fakultetu kemijskog inženjerstva u Zagrebu. Uzorci hidroksiapatita se međusobno razlikuju u tome ako jesu ili nisu supstituirani određenim ionom/ima (ionom srebra i/ili ionom stroncija), a uzorci hidroksiapatita koji jesu supstituirani određenim ionom/ima se dodatno razlikuju u molarnom omjeru pojedinih iona. U metodi disk difuzije u agaru koristila sam Aquacel®, komercijalno dostupni materijal za zavoje obogaćen srebrom, koji je predstavljao pozitivnu kontrolu.

#### 3.1.3. Kemikalije i hranjiva podloga

##### **Kemikalije:**

- za decimalna razrjeđenja: sterilna fiziološka otopina (0,9 % - tna otopina natrijeva klorida)
- Bojenje po Gramu: kristal violet, Lugolova otopina, etanol, karbol-fuksin
- mikroskopiranje obojenih preparata: imerzijsko ulje
- priprema uzoraka za skenirajuću elektronsku mikroskopiju (SEM): PBS pufer, 2 % - tna otopina paraformaldehida, otopine etanola različitih volumnih udjela etanola (30 %, 50 %, 70 %, 96 %, 99,9 %),
- za flambiranje: 96 % - tni etanol

### **Hranjiva podloga:**

- **Lysogeny Broth (LB)** sljedećeg sastava: 10 g/L triptona, 5 g/L kvašćevog ekstrakta, 5 g/L natrijeva klorida, 15 g/L čistog agara

### **3.1.4. Uredaji i pribor**

- plamenik
- plastične i staklene epruvete
- staklene čaše i boce
- plastične Petrijeve zdjelice
- mikroepuvete
- stalak za epruvete i mikroepuvete
- mikropipete
- bakteriološka uzica (eza)
- sterilni bris štapić
- pinceta
- Drygalski štapić
- flomaster
- vaga
- rotaciona miješalica
- vortex
- brojač kolonija
- inkubator
- mikroskop
- predmetna i pokrovna stakalca

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Sinteza uzoraka hidroksiapatita

Gotove uzorke dobila sam od strane Fakulteta kemijskog inženjerstva u Zagrebu na kojemu je bila provedena njihova sinteza. Ressler i sur. (2022) su različite uzorke hidroksiapatita sintetizirali metodom mokrog taloženja iz kosti sipe. U nastavku slijedi način pripreme uzoraka koju su izvršili Ressler i sur. (2022). Kao izvor kalcijevih iona ( $\text{Ca}^{2+}$ ) korišten je kalcijev oksid dobiven iz kostiju sipe. Kost sipe se toplinski tretirala na  $800\text{ }^\circ\text{C}$  tri sata radi uklanjanja organskog materijala i dobivanja kalcijeva oksida iz strukture aragonita ( $\text{CaCO}_3$ ) iz kosti sipe. Otapanjem odgovarajućih količina kalcijeva oksida ( $\text{CaO}$ ), stroncijeva nitrata ( $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ , Sigma-Aldrich) i/ili srebrova nitrata ( $\text{AgNO}_3$ , VWR Chemicals) u vodenoj otopini dobiju se nesupstituirani hidroksiapatit (HAp), Sr- i Ag-supstituirani hidroksiapatit prahovi. Odabrani molarni omjeri  $\text{Sr}/(\text{Ca} + \text{Sr})$  i  $\text{Ag}/(\text{Ca} + \text{Ag})$  bili su 0, 1, 2.5, 5 mol %. Za određivanje sinergijskog učinka  $\text{Sr}^{2+}$  i  $\text{Ag}^+$  iona, kosupstituirani uzorci su pripremljeni istom metodom. Odabrani molarni omjeri  $(\text{Sr} + \text{Ag})/(\text{Ca} + \text{Sr} + \text{Ag})$  bili su 0, 1, 2.5, 5 mol %. Urea fosfat ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$ , Sigma-Aldrich) dodan je u otopinu da se dobije molarni omjer  $(\text{Ca} + \text{M})/\text{P}$  od 1,67 koji je potreban za taloženje stehiometrijskog hidroksiapatita. Miješanje je nastavljeno na  $50\text{ }^\circ\text{C}$  tijekom pet dana nakon čega slijedi odležavanje preko noći na sobnoj temperaturi  $23.0 \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$ . Supernatant i hidroksiapatit čestice su odvojeni filtracijom bez ispiranja (Ressler i sur. 2022). Uzorci sa svojim kraticama i njihova značenja prikazana su u Tablici 1 te će se koristiti u daljnjem tekstu.

**Tablica 1.** Sintetizirani različiti uzorci hidroksiapatita sa njihovim kraticama i značenjem

UZORAK	ZNAČENJE
HAp	nesupstituirani hidroksiapatit
HAp_1Ag	hidroksiapatit supstituiran 1 mol % $\text{Ag}^+$ ionom
HAp_2,5Ag	hidroksiapatit supstituiran 2,5 mol % $\text{Ag}^+$ ionom
HAp_5Ag	hidroksiapatit supstituiran 5 mol % $\text{Ag}^+$ ionom
HAp_1Sr	hidroksiapatit supstituiran 1 mol % $\text{Sr}^{2+}$ ionom

**Tablica 1.** nastavak

HAp_2,5Sr	hidroksiapatit supstituiran 2,5 mol % $\text{Sr}^{2+}$ ionom
HAp_5Sr	hidroksiapatit supstituiran 5 mol % $\text{Sr}^{2+}$ ionom
HAp_1Ag/Sr	hidroksiapatit supstituiran 0,5 mol % $\text{Ag}^+$ i $\text{Sr}^{2+}$ ionom
HAp_2,5Ag/Sr	hidroksiapatit supstituiran 1,25 mol % $\text{Ag}^+$ i $\text{Sr}^{2+}$ ionom
HAp_5Ag/Sr	hidroksiapatit supstituiran 2,5 mol % $\text{Ag}^+$ i $\text{Sr}^{2+}$ ionom

### 3.2.2. Bojenje po Gramu

Kako bih provjerila jesu li kulture bakterija *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* zaista čiste kulture, napravila sam bojenje po Gramu. Najprije sam predmetno stakalce očistila prolaskom kroz plamen. Na to isto stakalce stavila sam par kapi vodovodne vode te u uz pomoć sterilne eze u nju stavila malo bakterija s ploče koja sadrži bakterijsku kulturu *E. coli*. Bakterije sam razmutila u vodi i napravila široki razmaz. Ostavila sam preparat da se kratko osuši na zraku. Preparat sam fiksirala prolaskom tri puta iznad plamena. Slijedi postupak bojenja po Gramu. Na preparat sam izlila boju kristal violet, ostavila je jednu minutu, a zatim je odlila. Zatim sam stavila Lugolovu otopinu, držala minutu vremena, odlila, isprala 96 % - tnim etanolom, a onda vodom. Na kraju sam dodala boju karbol-fuksin koju sam prelila preko preparata, držala minutu vremena, odlila i obilato isprala vodom. Preparat sam osušila između filter papira. Obojeni preparat sam poklopila pokrovnicom, stavila imerzijsko ulje i gledala pod mikroskopom imerzionim objektivom. Isti postupak sam ponovila za bakterijsku kulturu *S. aureus*.

### 3.2.3. Priprema bakterijskih suspenzija

Početna suspenzija koja mi je bila potrebna za metodu disk difuzije u agaru je koncentracije  $\sim 10^8$  CFU. Kako laboratorij nema denzitometar pomoću kojeg se određuje točna koncentracija bakterijske suspenzije, koncentracija se može odrediti samo približno, stoga sam suspenziju priredila na način da sam najprije u sterilnu plastičnu epruvetu ulila 9 mL sterilne fiziološke otopine. Zatim sam uzela ezu koju sam spalila u plamenu kako bih ju sterilizirala. Uzela sam pripadajuću ploču s bakterijskom kulturom *E. coli*, ohladila ezu na dijelu ploče gdje nema bakterija, napunila ušicu eze bakterijama i prenijela u plastičnu epruvetu prethodno napunjenu sterilnom

fiziološkom otopinom. Ovim postupkom se na temelju iskustva pokazalo da se dobije koncentracija  $\sim 10^8$  CFU. Epruvetu sam stavila na vortex kako bih dobila homogenu suspenziju bakterija. Postupak sam ponovila za bakteriju *S. aureus*.

Za metodu određivanja brojnosti bakterija u suspenziji (CFU metodu), koncentracija bakterijske suspenzije treba biti  $\sim 10^5$  CFU. Nju sam dobila tako što sam radila seriju decimalnih razrjeđenja s bakterijskom suspenzijom početne koncentracije  $\sim 10^8$  CFU koju sam prethodno pripremila. Uzela sam 1 mL iz pripremljene suspenzije i stavila u sterilnu plastičnu epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine. Time sam dobila koncentraciju od  $\sim 10^7$  CFU. Nakon što sam sadržaj epruvete dobro izmiješala, uzela sam novi nastavak mikropipete i isti postupak ponovila još dva puta kako bih dobila suspenziju željene koncentracije  $\sim 10^5$  CFU. Kako bih provjerila koncentraciju, odredila sam brojnost bakterija u suspenziji metodom CFU.

#### **3.2.4. Metoda disk difuzije u agaru**

Uronila sam sterilni bris štapić u pripremljenu bakterijsku suspenziju koncentracije  $\sim 10^8$  CFU. Uzela sam LB ploče i rotirala štapić natopljen suspenzijom po ploči četiri puta po  $90^\circ$  kako bih stvorila bakterijsku livadu na kojoj bi rasle bakterije. Pincetu sam flambirala tako što sam ju umočila u 96 % - tni alkohol i prošla njome jedanput kroz plamen. Pincetom sam uzela po jedan uzorak hidroksiapatita i stavila ga na sredinu površine hranjive podloge s bakterijama. Kako sam na raspolaganju imala deset različitih uzoraka hidroksiapatita, a dva bakterijska soja, ukupan broj priređenih ploča je bio dvadeset. Još su bile pripremljene dodatne dvije ploče s uzorkom Aquacela kojeg sam prethodno izrezala u mraku (jedan komadić uzorka za *E. coli*, a drugi za *S. aureus*). Podloge sam stavila inkubirati 24 sata na  $37^\circ\text{C}$ . Nakon inkubacije, izmjerila sam promjer zone inhibicije (zona bez vidljivog rasta bakterija) ravnalom oko uzorka i dobivene rezultate poslikala mobilnim uređajem. Za izračunavanje zone inhibicije koristila sam se sljedećom formulom:

$$H = (D-d) / 2$$

u kojoj oznaka H predstavlja zonu inhibicije izraženu u mm, D je ukupan promjer samog uzorka i zone inhibicije u mm, a d promjer samog uzorka u mm.

### 3.2.5. Ispitivanje morfologije površine uzoraka

Nakon što sam provela metodu disk difuzije u agaru i uzorcima izmjerila promjere zone inhibicije, uzorke sam pažljivo isprala u PBS puferu kako bi se bakterije koje se nisu čvrsto vezale, odlijepile. Zatim sam uzorke stavila u sterilne Petrijeve zdjelice na način da je strana uzoraka koja je bila u doticaju s inokuliranim agarom okrenuta prema gore. Uzorke sam prekrila 2 % - tnom otopinom paraformalaldehida (Sigma Aldrich) kako bi se bakterijske stanice mogle fiksirati 24 sata na 4 °C. Zatim sam uzorke isprala sterilnim PBS-om i uronila ih u niz otopina etanola (Sigma Aldrich) prema sljedećem redoslijedu: 2 min u 30 % etanol, 2 min u 50 % etanol, 5 min u 70 % etanol, 5 min u 96 % etanol i 10 min u 99,9 % etanol. Uzorke sam stavila na sušenje u sterilizator na 50 °C trideset minuta. Daljnji postupak za skenirajuću elektronsku mikroskopiju proveli su Ressler i sur. (2022). Diskovi od pripremljenih uzoraka presvučeni su plazmom zlata i paladija tijekom 180 s. Morfologija površine je analizirana pomoću SEM (eng. *scanning electron microscopy*) (TESCAN Vega3 EasyProbe) pri energiji elektronskog snopa od 7 keV. Bakterije i uzorak supstrata su obojeni u Adobe Photoshop CC 2018 (Ressler i sur. 2022).

### 3.2.6. Određivanje broja bakterija u suspenziji (CFU metoda)

Za ovu metodu koristila sam prethodno pripremljenu bakterijsku suspenziju koncentracije  $\sim 10^5$  CFU. Bakterijsku suspenziju sam razdijelila u dvije sterilne plastične epruvete na način da je svaka epruveta sadržavala 5 mL bakterijske suspenzije. U obje epruvete dodala sam prethodno izvaganih 0,25 grama različitih uzoraka hidroksiapatita u prahu. Plastične epruvete s bakterijskom suspenzijom i praškastim uzorcima hidroksiapatita inkubirala sam na sobnoj temperaturi na rotacionoj miješalici (4 okretaja u minuti) tijekom 3 dana. Nakon 3, 6, 24, 48 i 72 sata kontakta bakterijske suspenzije s uzorcima hidroksiapatita u prahu, mikropipetom sam uzela 0,1 mL uzorka iz sterilne plastične epruvete i serijski razrijedila tisuću puta u 0,9 mL sterilne fiziološke otopine. Iz svakoga razrjeđenja uzela sam 0,1 mL suspenzije i inokulirala na hranjivu podlogu. Drygalski štapić sam flambirala i njime razmazala suspenziju po čitavoj površini hranjive podloge. Podloge sam stavila inkubirati 24 sata na 37 °C. Nakon 24 sata narasle kolonije sam prebrojala pomoću brojača kolonija i odredila CFU prema formuli:

$$\text{CFU (CFU/mL)} = \frac{\text{broj naraslih kolonija}}{\text{volumen inkoluma}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja}$$



Kontrola je bila bakterijska suspenzija koncentracije  $\sim 10^5$  CFU koja je također išla na inkubaciju na sobnoj temperaturi i u njoj sam isto pratila broj živih bakterija nakon 3, 6, 24, 48 i 72 sata. Pozitivnu kontrolu predstavlja bakterijska suspenzija koncentracije  $\sim 10^5$  CFU s praškastim uzorkom nesupstituiranog hidroksiapatita.

Redukciju bakterijskog rasta računala sam prema formuli:

$$R/\% = \frac{C_t - S_t}{C_t} \times 100 \%$$

gdje se  $C_t$  odnosi na prosječan broj živih bakterija u kontrolnoj skupini nakon nekog vremena, a  $S_t$  na prosječan broj živih bakterija u bakterijskoj suspenziji s određenim praškastim uzorkom hidroksiapatita nakon nekog vremena.

### 3.2.7. Mjerenje pH i određivanje broja imobiliziranih bakterija

Prilikom provedbe eksperimenta, vidjela sam kako nesupstituirani hidroksiapatit smanjuje broj bakterija *E. coli* kroz vrijeme, što je bilo neočekivano, stoga sam:

- a) izmjerila pH-vrijednost bakterijske suspenzije u kojoj je bio uzorak HAp-a pomoću pH-metra kako bih provjerila ako je možda došlo do promjene pH-vrijednosti suspenzije koja je ključna za smrt bakterija.
- b) iz plastične epruvete s bakterijskom suspenzijom koncentracije  $\sim 10^5$  CFU i 0,25 grama praškastim uzorka HAp odlila supernatant, a preostali uzorak sam isprala s 9 mL sterilne fiziološke otopine kako bih uklonila bakterije koje se nisu zalijepile za uzorak. Na uzorak sam nalila novih 9 mL sterilne fiziološke otopine i vorteksirala 3 minute kako bi se raspršile bakterije koje su eventualno vezane na uzorak i ostale lebdjeti u supernatantu. Supernatant sam serijski razrijedila tisuću puta, a zatim 0,1 mL iz svakog razrjeđenja inokulirala na hranjivu podlogu i razmazala po čitavoj površini Drygalskim štapićem koji sam prethodno flambirala. Podloge sam stavila inkubirati 24 sata na  $37^\circ\text{C}$ , a nakon toga sam odredila CFU.
- c) provela bojenje po Gramu po prethodnom opisanom postupku.

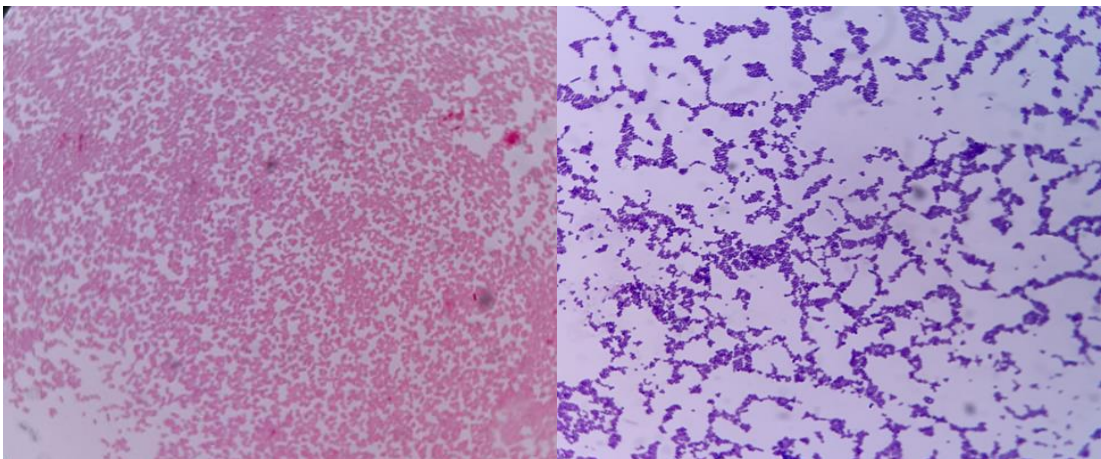
### **3.2.8. Statistika**

Kvantitativni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Statističku analizu sam provela pomoću jednosmjerne analize u kojoj se razlike smatraju statističkim značajnim kada je  $p < 0,01$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Bojenje po Gramu

Metodom bojanja po Gramu, gram-negativna bakterija *E. coli* obojila se ružičasto, a gram-pozitivna bakterija *S. aureus* ljubičasto (Slika 4). Obje bakterijske kulture su čiste, odnosno nije pronađeno nikakvo zagađenje.



**Slika 4.** Mikroskopski prikaz gram-negativne bakterije *E. coli* (lijevo) i gram-pozitivne bakterije *S. aureus* (desno)

### 4.2. Metoda disk difuzije u agaru

Nakon inkubacije od 24 sata na 37 °C, promotrila sam uzorke i pratila ima li ili nema pojave zone inhibicije oko uzoraka. Dobivene zone inhibicije izmjerila sam ravnalom. Što je izmjerena zona inhibicije veća, to je antibakterijska učinkovitost uzoraka veća.

Uzorak materijala Aquacel, koji je korišten kao pozitivna kontrola, pokazuje zonu inhibicije i iznosi 1 mm za bakteriju *E. coli* (Slika 5). Kod nesupstituiranog uzorka hidroksiapatita (HAp) i kod uzoraka hidroksiapatita s različitim stupnjevima supstitucije  $\text{Sr}^{2+}$  ionima (HAp\_1Sr, HAp\_2,5Sr, HAp\_5Sr) nisu detektirane zone inhibicije za bakteriju *E. coli* (Slika 6; Slika 7) Antibakterijska aktivnost za bakteriju *E. coli* uočena je kod svih Ag-supstituiranih uzoraka jer kod svakog uzoraka, bez obzira na stupanj supstitucije  $\text{Ag}^+$  ionima, vidljive su zone inhibicije (Slika 8).

Zona inhibicije za uzorak HAp\_1Ag iznosi 0,5 mm, za uzorak HAp\_2,5Ag 1,5 mm te za uzorak HAp\_5Ag 2 mm.

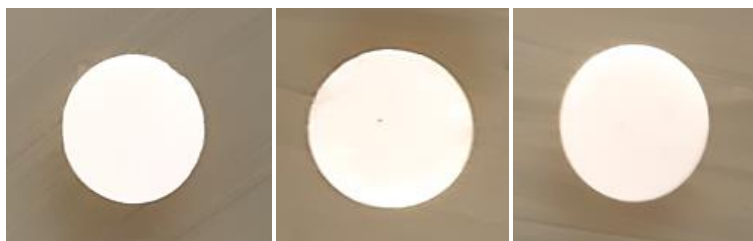
Najveću antibakterijsku aktivnost na bakteriju *E. coli* ima uzorak HAp\_5Ag. Iza njega slijede uzorci HAp\_2,5Ag i HAp\_1Ag. Zone inhibicije vidljive su i kod Ag/Sr-kosupstituiranih uzoraka hidroksiapatita za bakteriju *E. coli* (Slika 9) i iznose 1,5 mm za HAp\_1Ag/Sr, 0,5 mm za HAp\_2,5Ag/Sr odnosno 1 mm za HAp\_5Ag/Sr. Po jačini antibakterijske aktivnosti (od najjače do najslabije) na bakteriju *E. coli*, uzorci čine ovaj niz: HAp\_1Ag/Sr > HAp\_5Ag/Sr > HAp\_2,5Ag/Sr. U Tablici 2 prikazani su svi rezultati disk difuzije u agaru za Aquacel i ispitivane uzorke hidroksiapatita na bakteriju *E. coli*.



**Slika 5.** Uzorak Aquacel® s zonom inhibicije za bakteriju *E. coli*



**Slika 6.** Uzorak nesupstituiranog hidroksiapatita bez zone inhibicije za bakteriju *E. coli*



**a)** **b)** **c)**

**Slika 7.** Uzorak hidroksiapatita supstituiran 1 mol % Sr<sup>2+</sup> ionom (a), 2,5 mol % Sr<sup>2+</sup> ionom (b) i 5 mol % Sr<sup>2+</sup> ionom (c) bez zone inhibicije za bakteriju *E. coli*



**a)** **b)** **c)**

**Slika 8.** Uzorak hidroksiapatita supstituiran 1 mol % Ag<sup>+</sup> ionom (a), 2,5 mol % Ag<sup>+</sup> ionom (b) i 5 mol % Ag<sup>+</sup> ionom (c) s zonom inhibicije za bakteriju *E. coli*



**a)** **b)** **c)**

**Slika 9.** Uzorak hidroksiapatita supstituiran 0,5 mol % Ag<sup>+</sup> i Sr<sup>2+</sup> ionom (a), 1,25 mol % Ag<sup>+</sup> i Sr<sup>2+</sup> ionom (b) i 2,5 mol % Ag<sup>+</sup> i Sr<sup>2+</sup> ionom (c) s zonom inhibicije za bakteriju *E. coli*

**Tablica 2.** Rezultati disk difuzije u agaru za bakteriju *Escherichia coli*

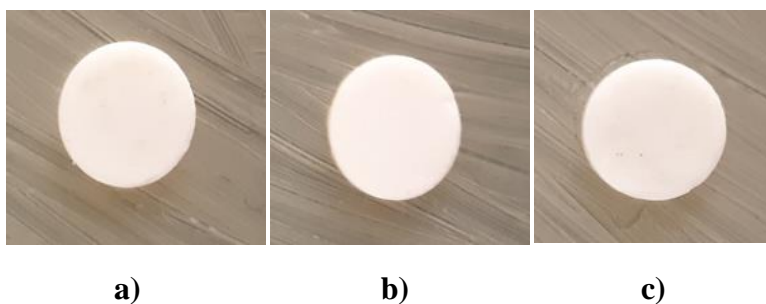
<i>Escherichia coli</i>		
Uzorak	Zona inhibicije	Zona inhibicije/mm
Aquacel®	da	1
HAp	ne	/
HAp_1Sr	ne	/
HAp_2,5Sr	ne	/
HAp_5Sr	ne	/
HAp_1Ag	da	0,5
HAp_2,5Ag	da	1,5
HAp_5Ag	da	2
HAp_1Ag/Sr	da	1,5
HAp_2,5Ag/Sr	da	0,5
HAp_5Ag/Sr	da	1

Slični rezultati metode disk difuzije u agaru dobiveni su i za bakteriju *S. aureus*. Uzorak nesupstituiranog hidroksiapatita (HAp) i svi uzorci hidroksiapatita supstituirani Sr<sup>2+</sup> ionima (HAp\_1Sr, HAp\_2,5Sr, HAp\_5Sr) ne pokazuju zone inhibicije (Slika 10; Slika 11). Pozitivna kontrola tj. materijal Aquacel, svi Ag-supstituirani uzorci bez obzira na stupanj supstitucije Ag<sup>+</sup> ionima kao i svi Ag/Sr-kosupstituirani uzorci bez obzira na stupanj supstitucije Ag<sup>+</sup> i Sr<sup>2+</sup> ionima pokazuju inhibiciju podijeljenu u dvije zone i imaju antibakterijsku aktivnost (Slika 13; Slika 14; Slika 15). Prema EUCAST metodologiji ispitivanje difuzije diska i njenom vodiču za čitanje promjera zona inhibicija za *S. aureus* (EUCAST 2022), u slučaju „fuzzy zone edge“, maglice ili slabog rasta, čita se unutarnja zona inhibicije odnosno „sharp zone edge“ (Slika 12). Stoga, dobiveni rezultati zona inhibicija odnose se upravo na tu unutarnju zonu inhibicije. Za Aquacel zona inhibicije iznosi 2 mm. Za Ag-supstituirane uzorke hidroksiapatita zona inhibicije je 1 mm za

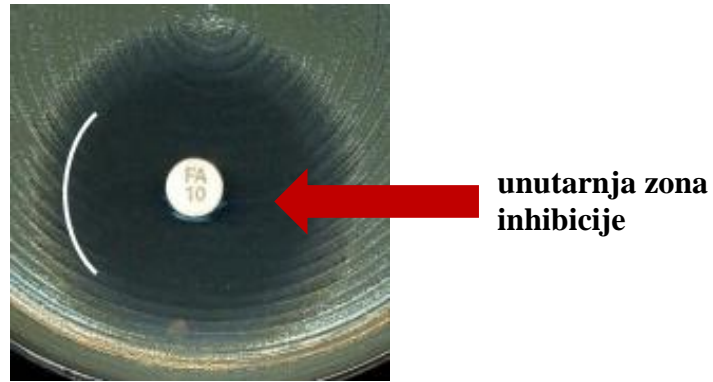
uzorak HAp\_1Ag, 1,5 mm za uzorak HAp\_2,5Ag i 2 mm za uzorak HAp\_5Ag. Uzorak HAp\_5Ag ima najveću antibakterijsku aktivnost na bakteriju *S. aureus*, zatim slijedi uzorak HAp\_2,5Ag, a iza njega uzorak HAp\_1Ag. Za Ag/Sr-kosupstituirane uzorke hidroksiapatita zona inhibicije je 0,5 mm za uzorak HAp\_1Ag/Sr, 1,5 mm za uzorak HAp\_2,5Ag/Sr i 2 mm za uzorak HAp\_5Ag/Sr. Uzorak HAp\_5Ag/Sr ima najveću antibakterijsku aktivnost na bakteriju *S. aureus*, a najmanju uzorak HAp\_1Ag/Sr. U Tablici 3 prikazani su svi rezultati disk difuzije u agaru za Aquacel i ispitivane uzorke hidroksiapatita na bakteriju *S. aureus*.



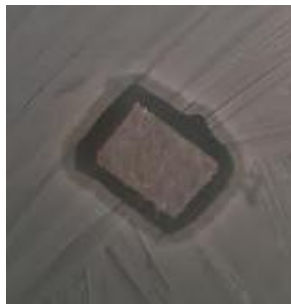
**Slika 10.** Uzorak nesupstituiranog hidroksiapatita bez zone inhibicije za bakteriju *S. aureus*



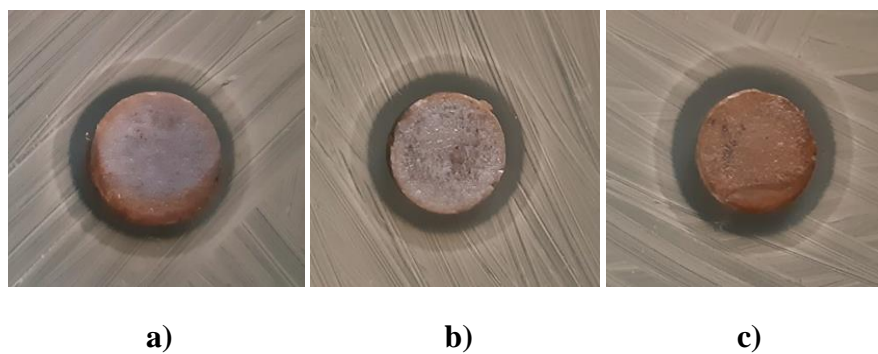
**Slika 11.** Uzorak hidroksiapatita supstituiran 1 mol %  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (a), 2,5 mol %  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (b) i 5 mol %  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (c) bez zone inhibicije za bakteriju *S. aureus*



**Slika 12.** Čitanje zona u slučaju „fuzzy zone edge“ za bakterije Staphylococci (preuzeto i prilagođeno prema EUCAST 2022)

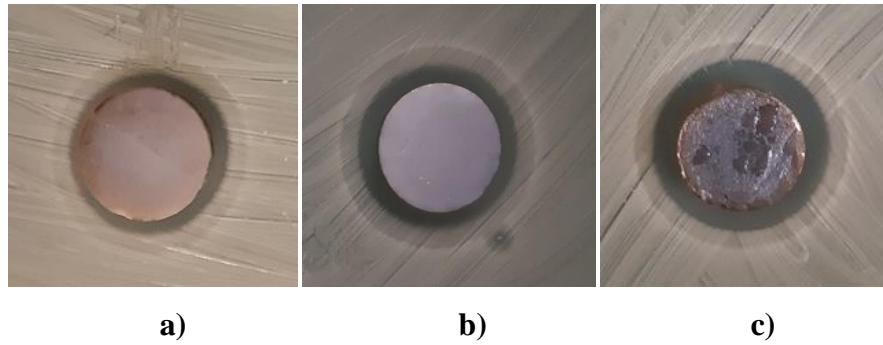


**Slika 13.** Uzorak Aquacel® s dvjema zonama inhibicije za bakteriju *S. aureus*



**Slika 14.** Uzorak hidroksiapatita supstituiran 1 mol %  $\text{Ag}^+$  ionom (a), 2,5 mol %  $\text{Ag}^+$  ionom (b) i 5 mol %  $\text{Ag}^+$  ionom (c) s dvjema zonama inhibicije za bakteriju *S. aureus*





**Slika 15.** Uzorak hidroksiapatita supstituiran 0,5 mol %  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (a), 1,25 mol %  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (b) i 2,5 mol %  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (c) s dvjema zonama inhibicije za bakteriju *S. aureus*

**Tablica 3.** Rezultati disk difuzije u agaru za bakteriju *Staphylococcus aureus*

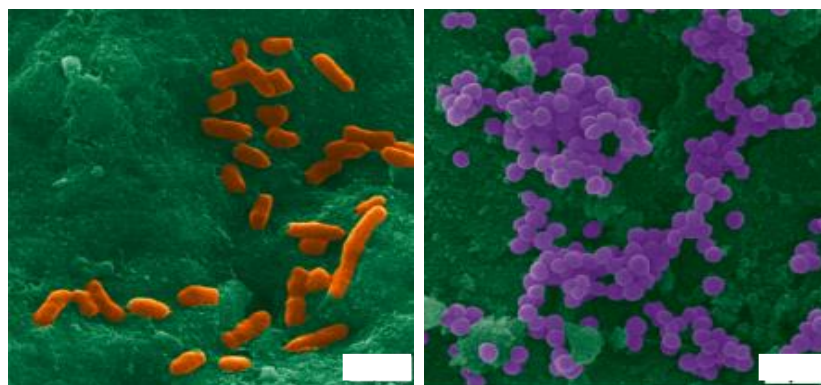
<i>Staphylococcus aureus</i>		
Uzorak	Zona inhibicije	Unutarnja zona inhibicije/mm
Aquacel®	da	2
HAp	ne	/
HAp_1Sr	ne	/
HAp_2,5Sr	ne	/
HAp_5Sr	ne	/
HAp_1Ag	da	1
HAp_2,5Ag	da	1,5
HAp_5Ag	da	2
HAp_1Ag/Sr	da	0,5
HAp_2,5Ag/Sr	da	1,5
HAp_5Ag/Sr	da	2

Uspoređujući rezultate za antibakterijsku aktivnost različitih uzoraka hidroksiapatita putem metode disk difuzije u agaru na bakterije *E. coli* i *S. aureus*, može se vidjeti kako uzorci nesupstituiranog hidroksiapatita i uzorci Sr-supstituiranih hidroksiapatita ne pokazuju zonu inhibicije pa tako niti antibakterijsku aktivnost na obje testirane bakterije, dok Aquacel, Ag-supstituirani uzorci hidroksiapatita i Ag/Sr-kosupstituirani uzorci hidroksiapatita imaju vidljive zone inhibicije i antibakteriju aktivnost na obje testirane bakterije. Veličina zone inhibicije za bakteriju *S. aureus* su u pravilu veće kod Ag-supstituiranih i kod Ag/Sr-kosupstituiranih uzoraka hidroksiapatita nego za bakteriju *E. coli*. Sve zone inhibicije Ag-supstituiranih uzoraka za obje bakterije su bile slične zonama inhibicije Aquacela.

### **4.3. Ispitivanje morfologije površine uzoraka**

Nakon analize zona inhibicija, provedena je SEM mikroskopija kako bi se procijenila površina analiziranih uzoraka hidroksiapatita. Kod svih slika u nastavku, narančastom su obojene bakterije *E. coli*, a ljubičasto bakterije *S. aureus*. Zelena boja odnosi se na površinu uzoraka hidroksiapatita.

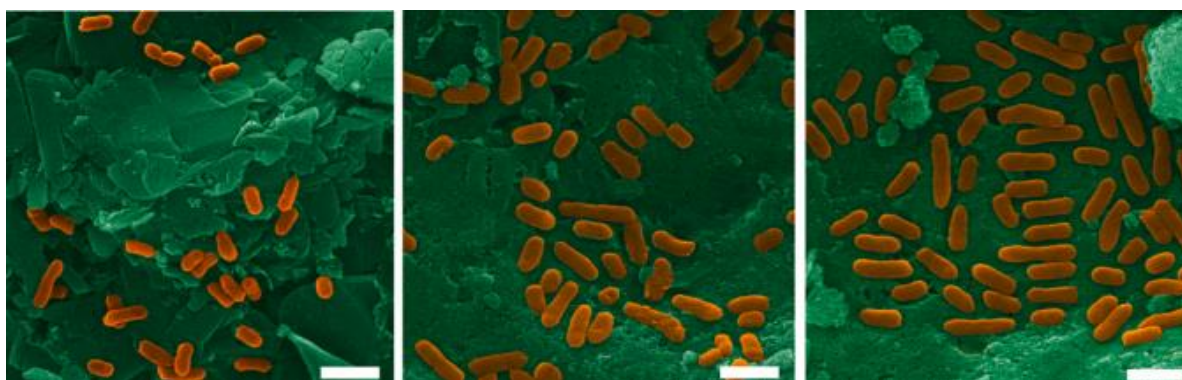
Na uzorku nesupstituiranog hidroksiapatita vidljiva je veća gustoća bakterija *E. coli* i *S. aureus* (Slika 16). Na uzorcima hidroksiapatita supstituiranog različitim količinama  $Sr^{2+}$  iona vidljiva je veća gustoća bakterija *E. coli* i *S. aureus* (Slika 17; Slika 18). Na uzorku HAp\_1Ag kod obje testirane bakterije otkriveno je tek nekoliko bakterijskih stanica *E. coli* i *S. aureus* (Slika 19). Na uzorcima HAp\_2,5Ag i HAp\_5Ag nema vidljiv stanica bakterija *E. coli* i *S. aureus* (Slika 20). Na svim Ag/Sr-kosupstituiranim uzorcima hidroksiapatita nema pronađenih održivih bakterija *E. coli* i *S. aureus* (Slika 21; Slika 22).



**a)**

**b)**

**Slika 16.** SEM slika uzorka nesupstituiranog hidroksiapatita za bakteriju *E. coli* (a) i bakteriju *S. aureus* (b) (preuzeto i prilagođeno iz Ressler i sur. 2022)

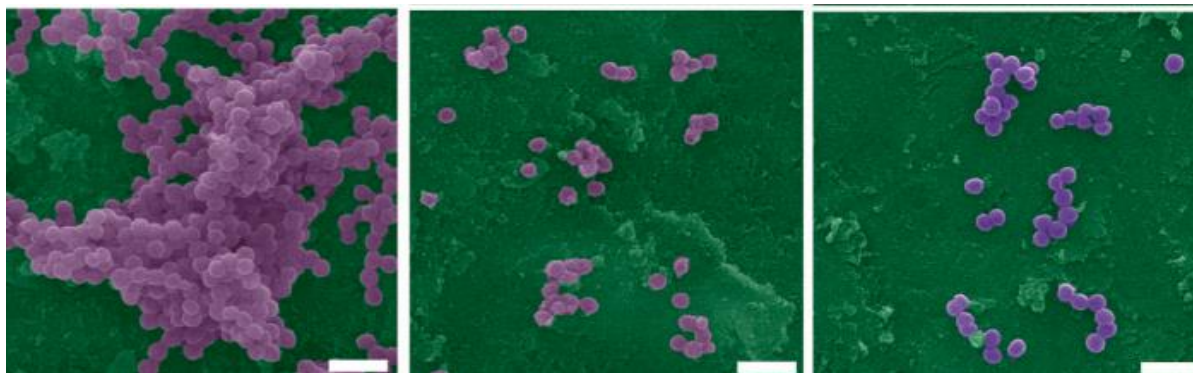


**a)**

**b)**

**c)**

**Slika 17.** SEM slika uzorka hidroksiapatita supstituiranog 1 mol %  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (a), 2,5 mol %  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (b) i 5 mol %  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (c) za bakteriju *E. coli* (preuzeto i prilagođeno iz Ressler i sur. 2022)

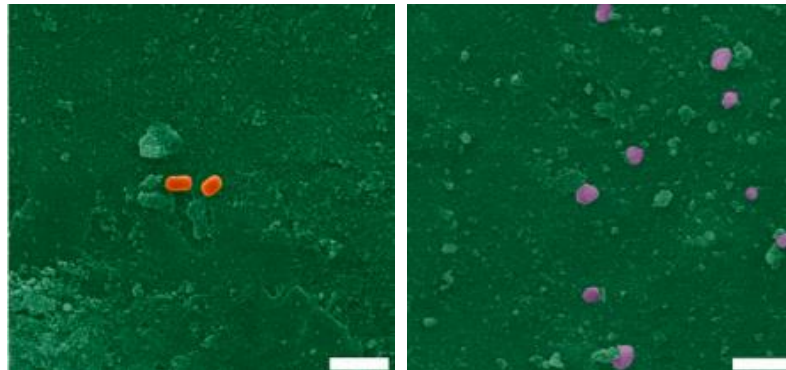


a)

b)

c)

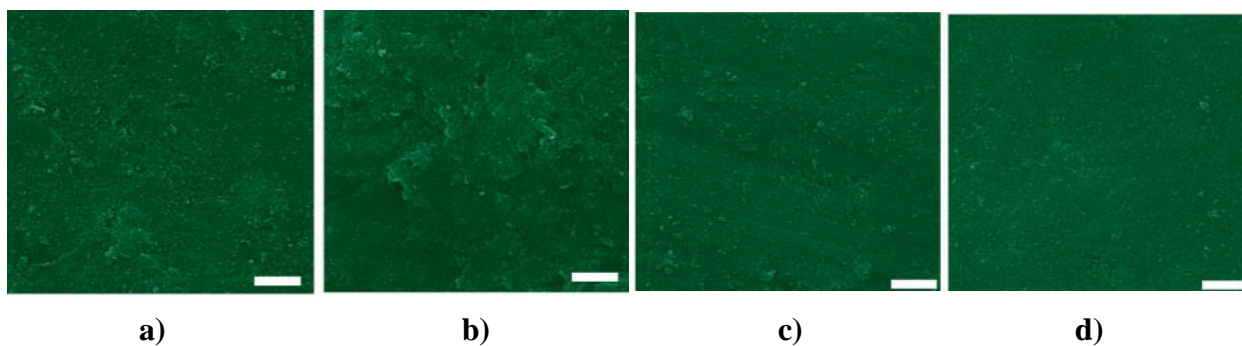
**Slika 18.** SEM slika uzorka hidroksiapatita supstituiranog 1 mol % Sr<sup>2+</sup> ionom (a), 2,5 mol % Sr<sup>2+</sup> ionom (b) i 5 mol % Sr<sup>2+</sup> ionom (c) za bakteriju *S. aureus* (preuzeto i prilagođeno iz Ressler i sur. 2022)



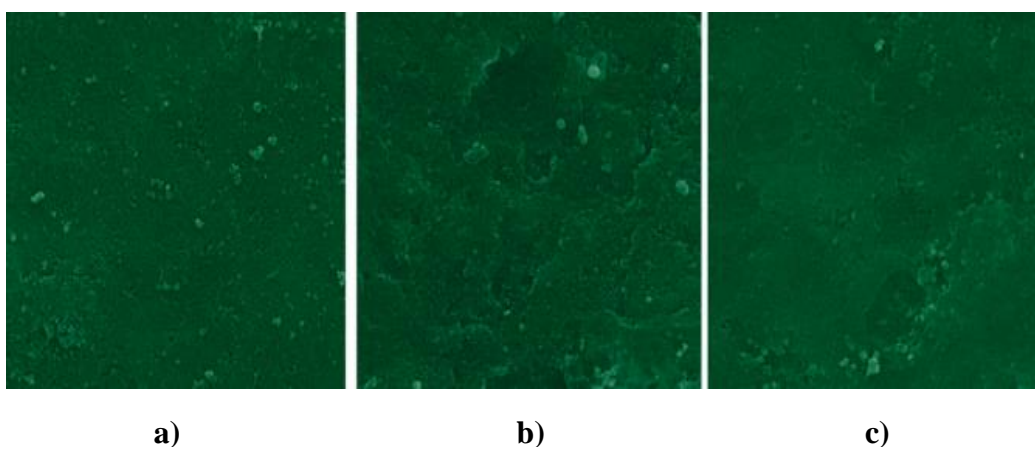
a)

b)

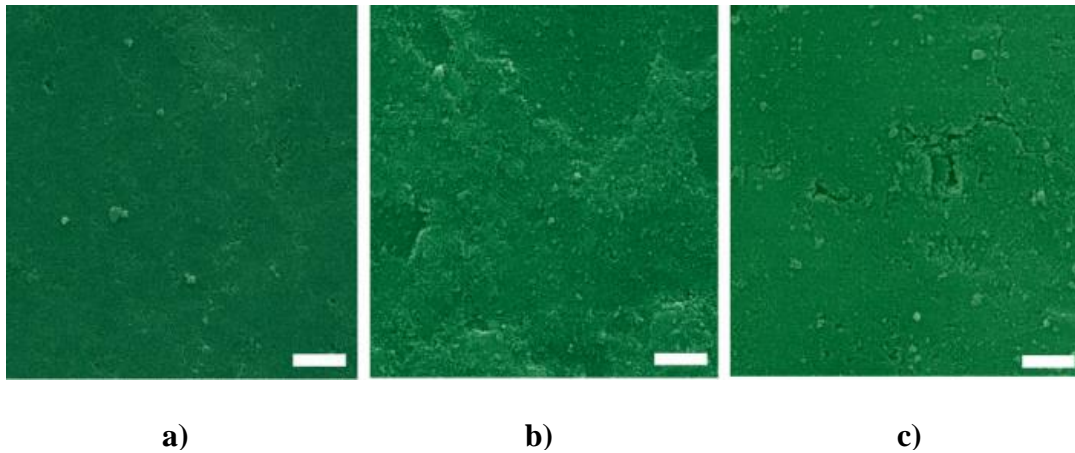
**Slika 19.** SEM slika uzorka hidroksiapatita supstituiranog 1 mol % Ag<sup>+</sup> ionom za bakteriju *E. coli* (a) i bakteriju *S. aureus* (b) (preuzeto i prilagođeno iz Ressler i sur. 2022)



**Slika 20.** SEM slika uzorka hidroksiapatita supstituiranog 2,5 mol %  $\text{Ag}^+$  ionom za bakteriju *E. coli* (a) i bakteriju *S. aureus* (c), 5 mol %  $\text{Ag}^+$  ionom za bakteriju *E. coli* (b) i bakteriju *S. aureus* (d) (preuzeto i prilagođeno iz Ressler i sur. 2022)



**Slika 21.** SEM slika uzorka hidroksiapatita supstituiranog 0,5 mol %  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (a), 1,25 mol %  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (b) i 2,5 mol%  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (c) za bakteriju *E. coli* (preuzeto i prilagođeno iz Ressler i sur. 2022)



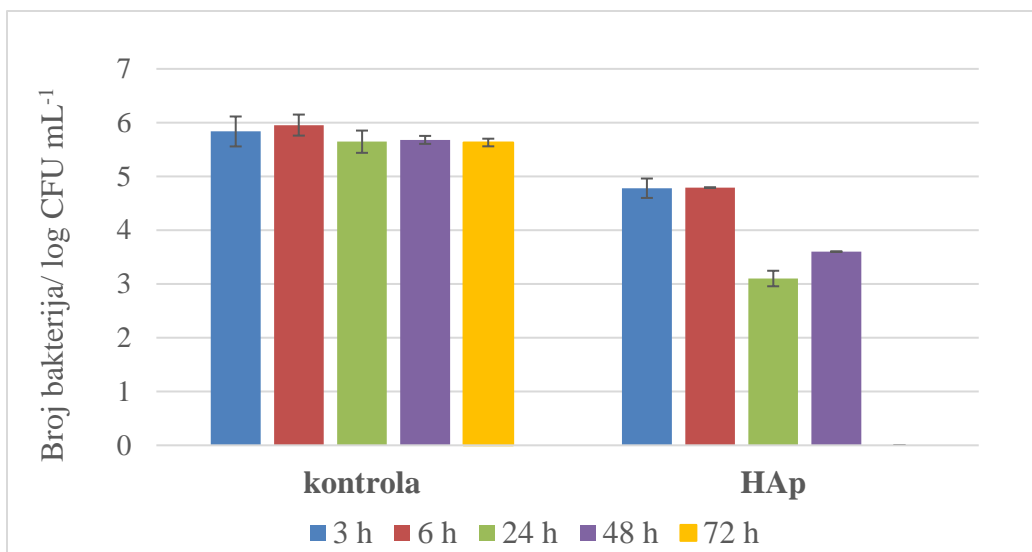
**Slika 22.** SEM slika uzorka hidroksiapatita supstituiranog 0,5 mol %  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (a), 1,25 mol %  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (b) i 2,5 mol %  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (c) za bakteriju *S. aureus* (preuzeto i prilagođeno iz Ressler i sur. 2022)

#### 4.4. Određivanje broja bakterija u suspenziji (CFU metoda)

Antibakterijsku učinkovitost sintetiziranih uzoraka hidroksiapatita u prahu odredila sam brojanjem naraslih bakterijskih kolonija nakon što su uzorci bili u kontaktu s bakterijskom suspenzijom u vremenskom periodu od 3, 6, 24, 48 i 72 sata. Rezultate sam izrazila u obliku log CFU/mL.

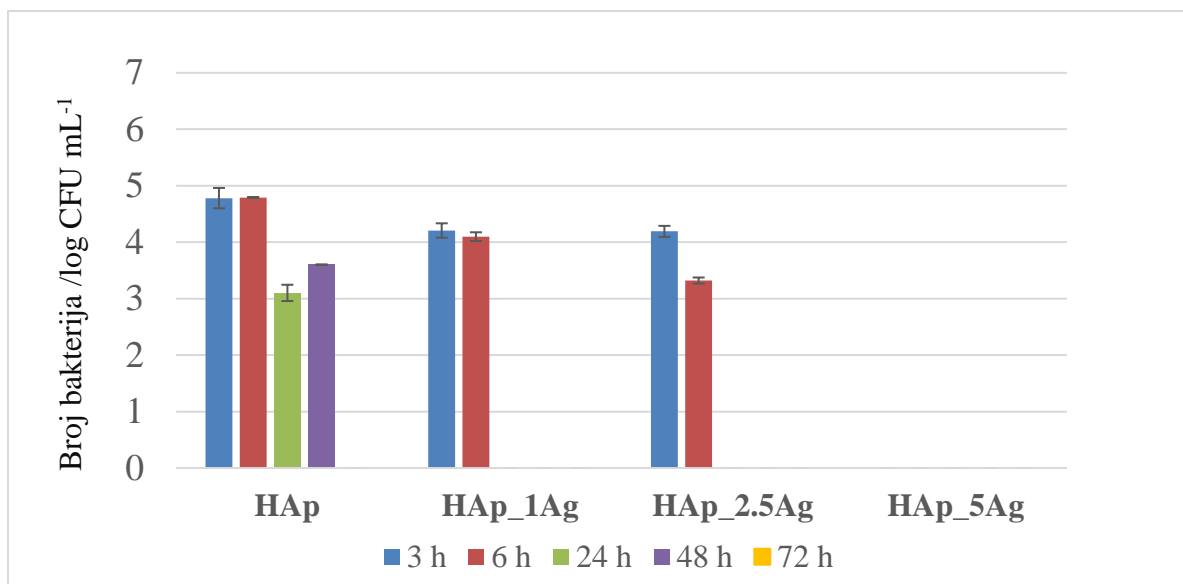
Kroz sve sate, postoje statistički značajne razlike u broju živih bakterija između kontrole i nesupstituiranog hidroksiapatita za bakteriju *E. coli*. Nesupstituirani hidroksiapatit smanjuje broj bakterija kroz sve sate s obzirom na kontrolu. Došlo je i do smanjenja broja bakterija do nule nakon 72 sati kontakta uzorka s bakterijskom suspenzijom *E. coli* (Slika 23).





**Slika 23.** Broj živih bakterijskih stanica *E. coli* u suspenziji  $\pm$  standardna devijacija nakon 3, 6, 24, 48 i 72 sata kontakta s praškastim uzorkom nesupstituiranog hidroksiapatita

Svi Ag-supstituirani uzori hidroksiapatita, bez obzira na stupanj supstitucije  $Ag^+$  ionima, pokazuju antibakterijsku aktivnost (smanjenje broja bakterija) u nekom vremenu na bakteriju *E. coli* u usporedbi s HAp (pozitivna kontrola). Između HAp i uzorka HAp\_5Ag ima statističkih značajnih razlika u broju živih bakterija nakon 3, 6, 24 i 48 sati, dok između HAp i uzoraka HAp\_1Ag i HAp\_2,5Ag nema statističkih značajnih razlika nakon 3 sata, a nakon 6, 24 i 48 sati, statistički značajne razlike postoje. Antibakterijsku aktivnost uzorak HAp\_5Ag pokazuje već nakon 3 sata kontakta, a uzorci HAp\_1Ag i HAp\_2,5Ag pokazuju nakon 6 sati. Između svih Ag-supstituiranih uzoraka i HAp-a nema statističkih značajnih razlika nakon 72 sata. Uzorak HAp\_5Ag je smanjio broj bakterija do nule nakon 3 sata, a uzorci HAp\_1Ag i HAp\_2,5Ag nakon 24 sata kontakta. Ag-supstituirani uzorci se međusobno statistički razlikuju u jačini antibakterijske aktivnosti. Nakon 3 sata, ima statističkih značajnih razlika u broju živih bakterija između HAp\_1Ag i HAp\_5Ag i između HAp\_2,5Ag i HAp\_5Ag, ali nema statističkih značajnih razlika između HAp\_1Ag i HAp\_2,5Ag. Nakon 6 sati, ima statističkih značajnih razlika u broju živih bakterija između HAp\_1Ag i HAp\_2,5Ag te između HAp\_5Ag s HAp\_2,5Ag i HAp\_1Ag. Nakon 24, 48 i 72 sata, između Ag-supstituiranih uzoraka nema statističkih značajnih razlika u broju živih bakterija (Slika 24).

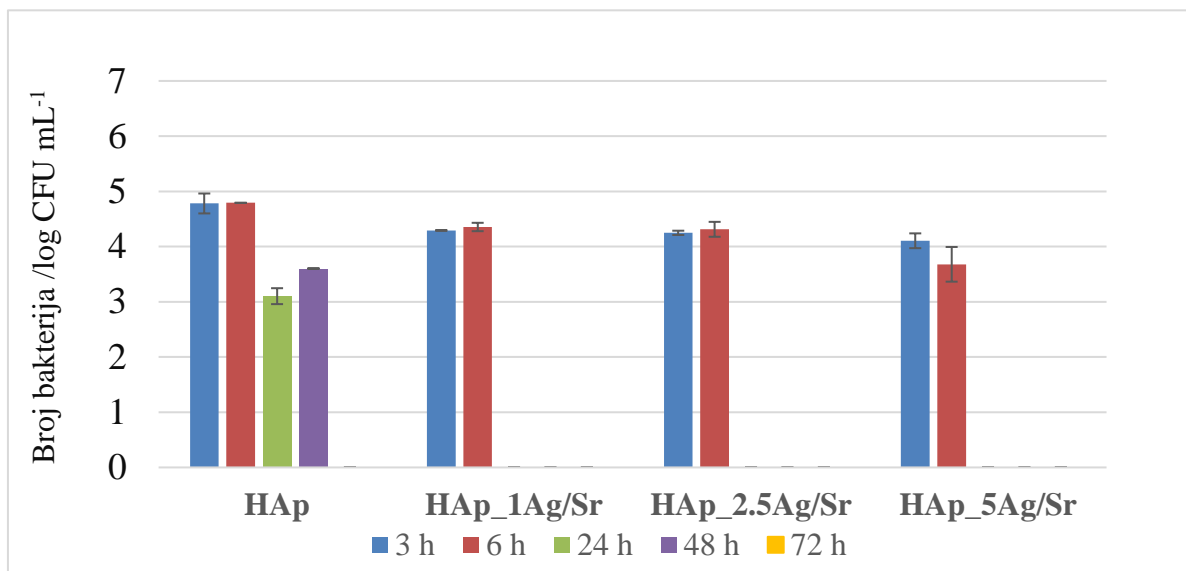


**Slika 24.** Broj živih bakterijskih stanica *E. coli* u suspenziji  $\pm$  standardna devijacija nakon 3, 6, 24, 48 i 72 sata kontakta s praškastim uzorcima hidroksiapatita supstituiranih 1 mol %  $\text{Ag}^+$  ionom (HAp\_1Ag), 2,5 mol %  $\text{Ag}^+$  ionom (HAp\_2,5Ag) i 5 mol%  $\text{Ag}^+$  ionom (HAp\_5Ag)

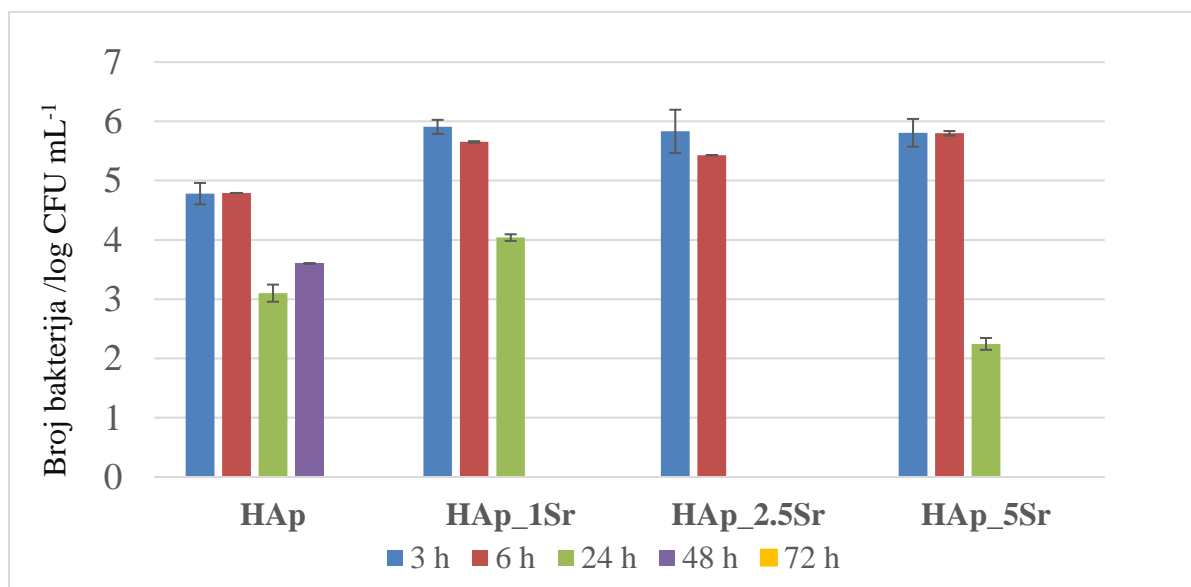
Svi Ag/Sr-kosupstituirani uzorci hidroksiapatita, bez obzira na stupanj supstitucije  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionima, pokazuju antibakterijsku aktivnost u nekom vremenu na bakteriju *E. coli* u usporedbi s HAp. Između HAp i uzorka HAp\_5Ag/Sr ima statističkih značajnih razlika u broju živih bakterija nakon 3, 6, 24 i 48 sati, dok između HAp i uzorka HAp\_1Ag/Sr i HAp\_2,5Ag/Sr nema statističkih značajnih razlika nakon 3 i 6 sati, a nakon 24 i 48 sati ima. Antibakterijsku aktivnost uzorak HAp\_5Ag/Sr pokazuje već nakon 3 sata kontakta, a uzorci HAp\_1Ag/Sr i HAp\_2,5Ag/Sr pokazuju nakon 24 sata. Između svih Ag/Sr-kosupstituiranih uzoraka i HAp-a nema statističkih značajnih razlika nakon 72 sata. Svi Ag/Sr-kosupstituirani uzorci smanjuju broj bakterija *E. coli* do nule nakon 24 sata kontakta uzorka i bakterijske suspenzije. Između Ag/Sr-kosupstituiranih uzoraka nema značajnih statističkih razlika u antibakterijskoj aktivnosti kroz sve sate kontakta uzorka i bakterijske suspenzije (Slika 25).

Sr-supstituirani uzorci hidroksiapatita ne pokazuju smanjenje broja bakterija *E. coli* nakon 3 i 6 sati s obzirom na HAp. Blago smanjenje broja bakterija vidljivo je nakon 24 sata kontakta, no nije statistički značajno s obzirom na HAp. Uzorak HAp\_2,5Sr smanjuje broj bakterija do nule nakon 24 sata kontakta, a uzorci HAp\_1Sr i HAp\_5Sr smanjuju nakon 48 sati (Slika 26).



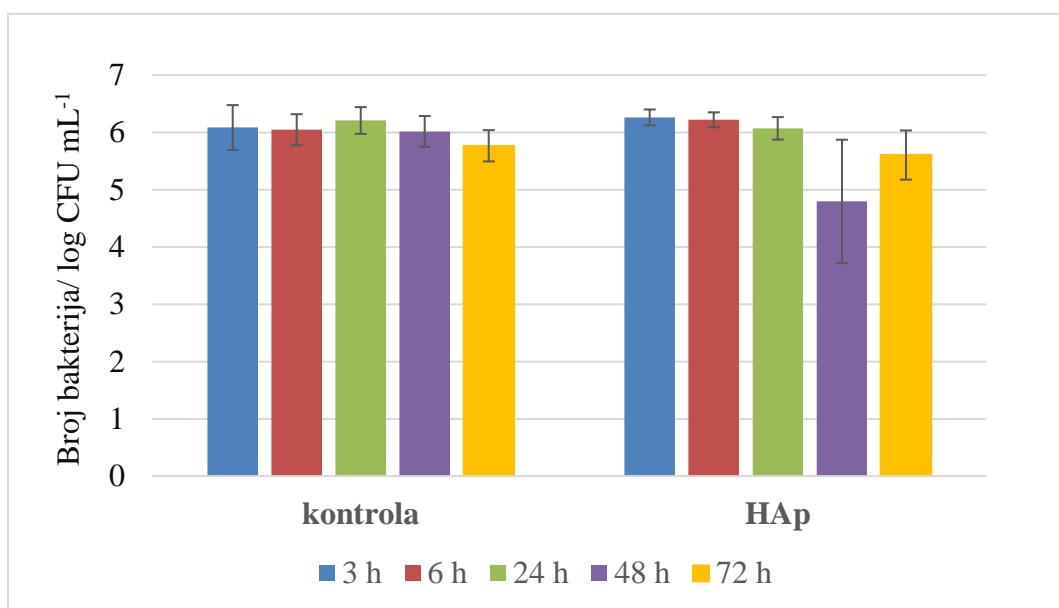


**Slika 25.** Broj živih bakterijskih stanica *E. coli* u suspenziji  $\pm$  standardna devijacija nakon 3, 6, 24, 48 i 72 sata kontakta s praškastim uzorcima hidroksiapatita supstituiranih 0,5 mol %  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (HAp\_1Ag/Sr), 1,25 mol %  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (HAp\_2,5Ag/Sr) i 2,5 mol %  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (HAp\_5Ag/Sr)



**Slika 26.** Broj živih bakterijskih stanica *E. coli* u suspenziji  $\pm$  standardna devijacija nakon 3, 6, 24, 48 i 72 sata kontakta s praškastim uzorcima hidroksiapatita supstituiranih 1 mol %  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (HAp\_1Sr), 2,5 mol %  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (HAp\_2,5Sr) i 5 mol%  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (HAp\_5Sr)

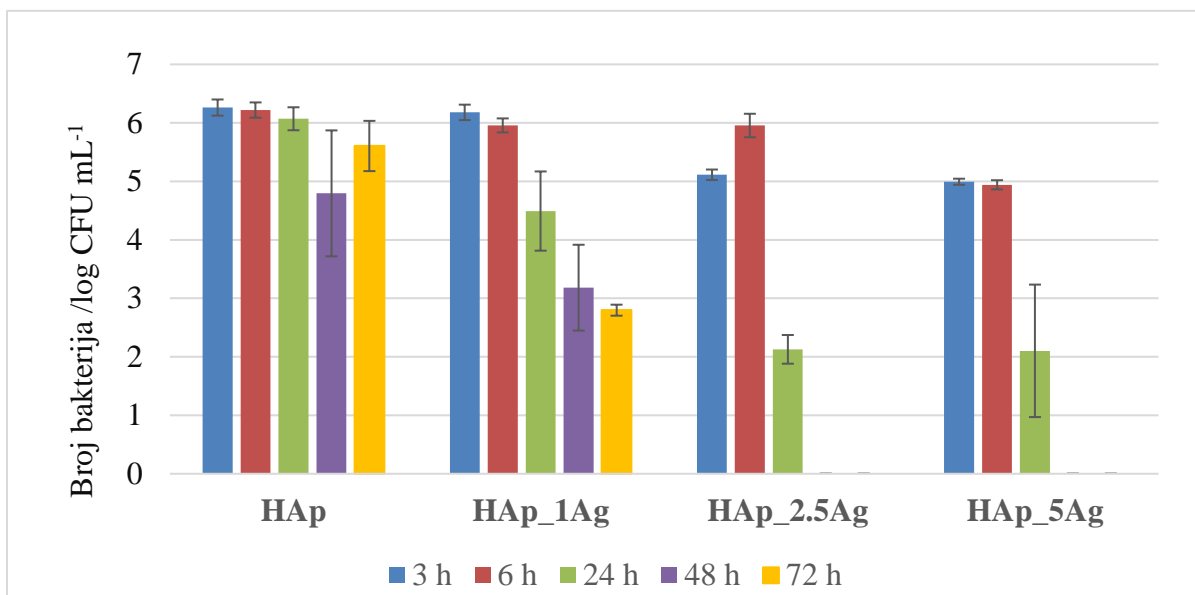
Između kontrole i nesupstituiranog hidroksiapatita nema značajnih statističkih razlika u broju živih bakterija *S. aureus* za sve sate kontakta bakterijske suspenzije i praškastog uzorka nesupstituiranog hidroksiapatita. Kod nesupstituiranog hidroksiapatita vidljivo je povećanje broja bakterija *S. aureus* nakon 3 i 6 sati kontakta s obzirom na kontrolu te smanjenje broja bakterija nakon 24, 48 i 72 sata s obzirom na kontrolu (Slika 27).



**Slika 27.** Broj živih bakterijskih stanica *S. aureus* u suspenziji  $\pm$  standardna devijacija nakon 3, 6, 24, 48 i 72 sata kontakta s praškastim uzorkom nesupstituiranog hidroksiapatita

Svi Ag-supstituirani uzori hidroksiapatita, bez obzira na stupanj supstitucije  $\text{Ag}^+$  ionima, pokazuju antibakterijsku aktivnost u nekom vremenu na bakteriju *S. aureus* u usporedbi s HAp-om. Između HAp i uzorka HAp\_1Ag nema statističkih značajnih razlika u broju živih bakterija nakon 3, 6, 24 i 48 sata kontakta, a nakon 72 sata ima statističkih značajnih razlika. Između HAp i uzoraka HAp\_2,5Ag i HAp\_5Ag nema statičkih značajnih razlika u broju živih bakterija nakon 3 i 6 sati, a ima nakon 24, 48 i 72 sata. Antibakterijsku aktivnost uzorci HAp\_5Ag i HAp\_2,5Ag pokazuju nakon 24 sata kontakta, a uzorak HAp\_1Ag tek nakon 72 sati kontakta. Uzorci HAp\_2,5Ag i HAp\_5Ag smanjuju broj bakterija *S. aureus* do nule nakon 48 sata kontakta bakterijske suspenzije i navedenih uzoraka. Ag-supstituirani uzorci se međusobno statistički razlikuju u jačini antibakterijske aktivnosti. Nakon 3 i 6 sata nema statističkih značajnih razlika u broju živih bakterija između Ag-supstituiranih uzoraka. Nakon 24, 48 i 72 sata kontakta ima statističkih

značajnih razlika između uzoraka HAp\_1Ag i HAp\_5Ag i između HAp\_1Ag i HAp\_5Ag i nema statističkih značajnih razlika između HAp\_2,5Ag i HAp\_5Ag (Slika 28).

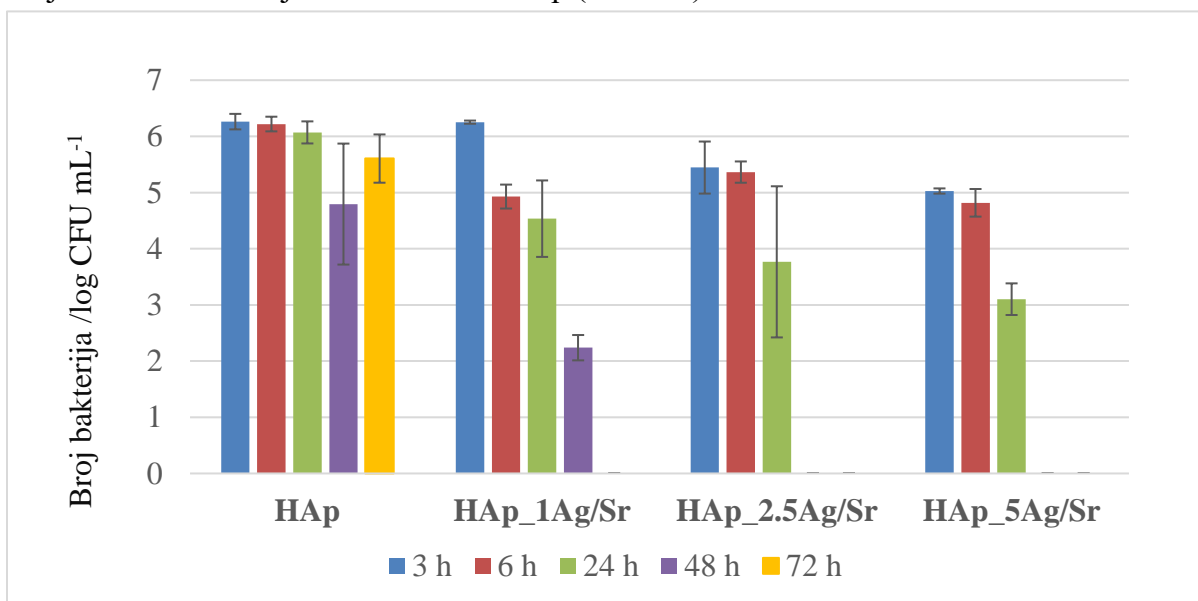


**Slika 28.** Broj živih bakterijskih stanica *S. aureus* u suspenziji  $\pm$  standardna devijacija nakon 3, 6, 24, 48 i 72 sata kontakta s praškastim uzorcima hidroksiapatita supstituiranih 1 mol %  $\text{Ag}^+$  ionom (HAp\_1Ag), 2,5 mol %  $\text{Ag}^+$  ionom (HAp\_2,5Ag) i 5 mol%  $\text{Ag}^+$  ionom (HAp\_5Ag)

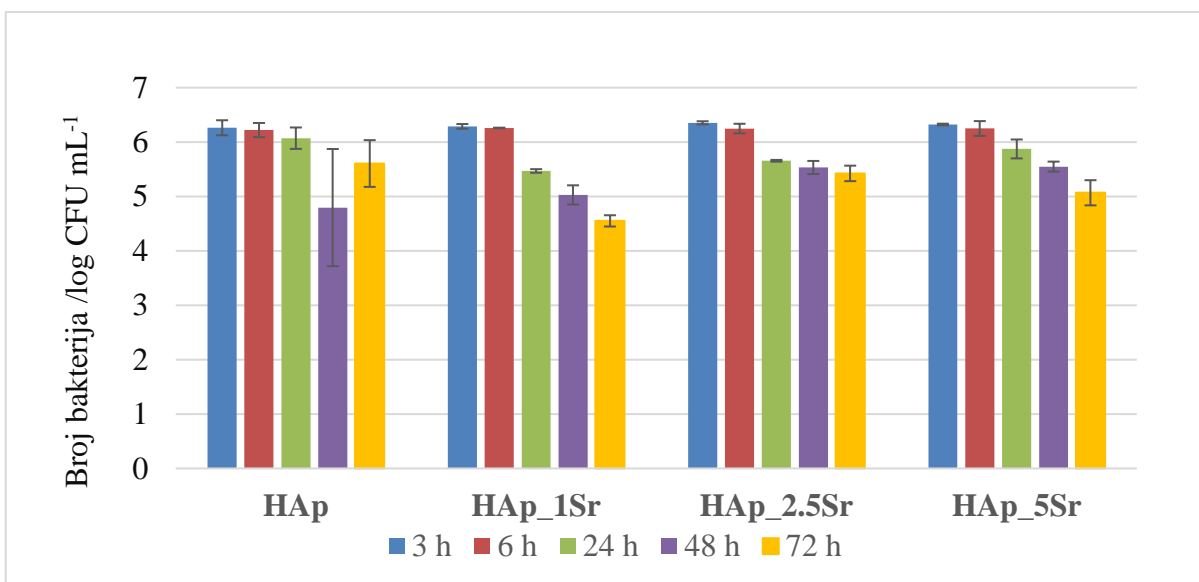
Svi Ag/Sr-kosupstituirani uzorci hidroksiapatita, bez obzira na stupanj supstitucije  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionima, pokazuju antibakterijsku aktivnost u nekom vremenu na bakteriju *S. aureus* u usporedbi s HAp. Između HAp i uzorka HAp\_5Ag/Sr ima statističkih značajnih razlika u broju živih bakterija nakon 3, 6, 24, 48 i 72 sata, dok između HAp i uzorka HAp\_1Ag/Sr i HAp\_2,5Ag/Sr nema statističkih značajnih razlika nakon 3, 6 i 24 sata, a nakon 48 i 72 sata ima. Antibakterijsku aktivnost uzorak HAp\_5Ag/Sr pokazuje već nakon 3 sata kontakta, a uzorci HAp\_1Ag/Sr i HAp\_2,5Ag/Sr pokazuju nakon 48 sata. Uzorak HAp\_1Ag/Sr smanjuje broj bakterije do nule nakon 72 sata kontakta, a uzorci HAp\_2,5Ag/Sr i HAp\_5Ag/Sr nakon 48 sati kontakta. Između Ag/Sr-kosupstituiranih uzoraka nema značajnih statističkih razlika u antibakterijskoj aktivnosti nakon 3, 6 i 24 sata, a nakon 48 i 72 sata ima značajnih statističkih razlika između HAp\_1Ag/Sr i HAp\_2,5Ag/Sr i HAp\_1Ag/Sr i HAp\_5Ag/Sr. Između HAp\_2,5Ag/Sr i HAp\_5Ag/Sr nema značajnih statističkih razlika u antibakterijskoj aktivnosti kroz sve sate kontakta (Slika 29).

Sr-supstituirani uzorci hidroksiapatita pokazuju smanjenje broja bakterija nakon 24 sata kontakta,

no nije statistički značajno s obzirom na HAp (Slika 30).

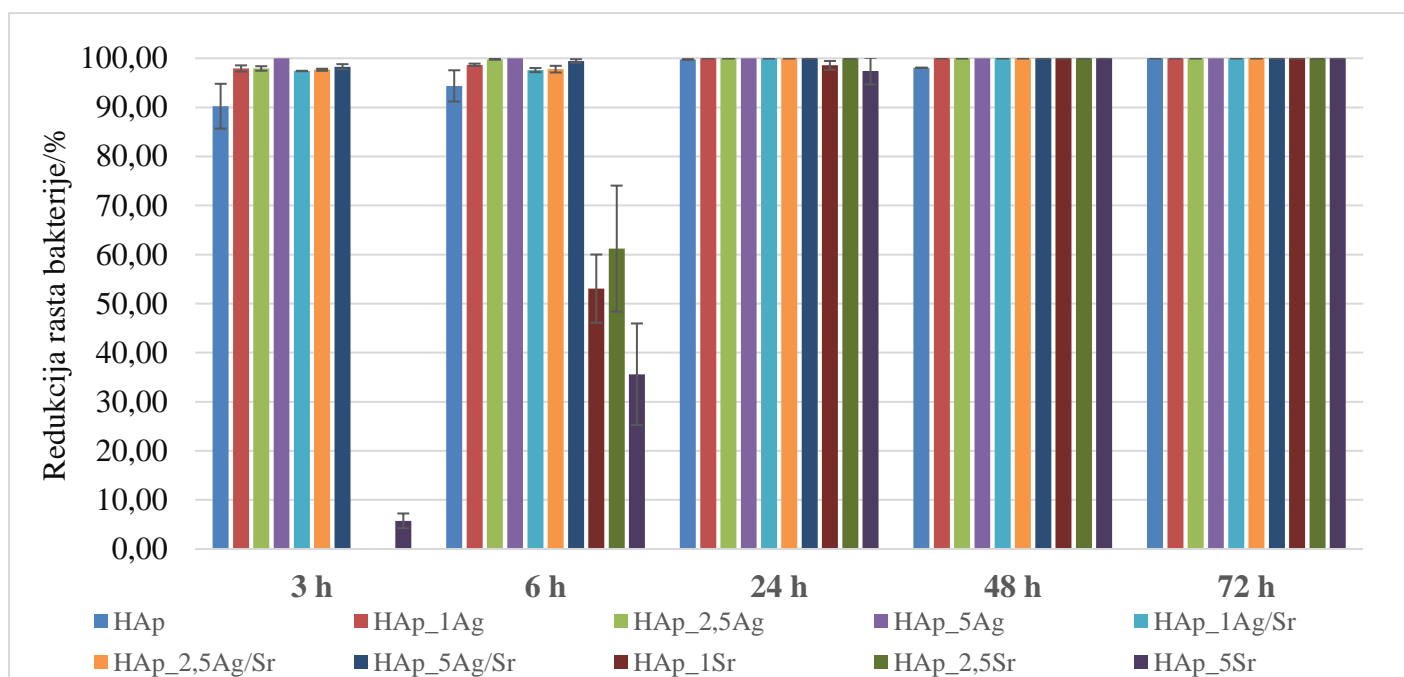


**Slika 29.** Broj živih bakterijskih stanica *S. aureus* u suspenziji  $\pm$  standardna devijacija nakon 3, 6, 24, 48 i 72 sata kontakta s praškastim uzorcima hidroksiapatita supstituiranih 0,5 mol %  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (HAp\_1Ag/Sr), 1,25 mol %  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (HAp\_2,5Ag/Sr) i 2,5 mol%  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (HAp\_5Ag/Sr)



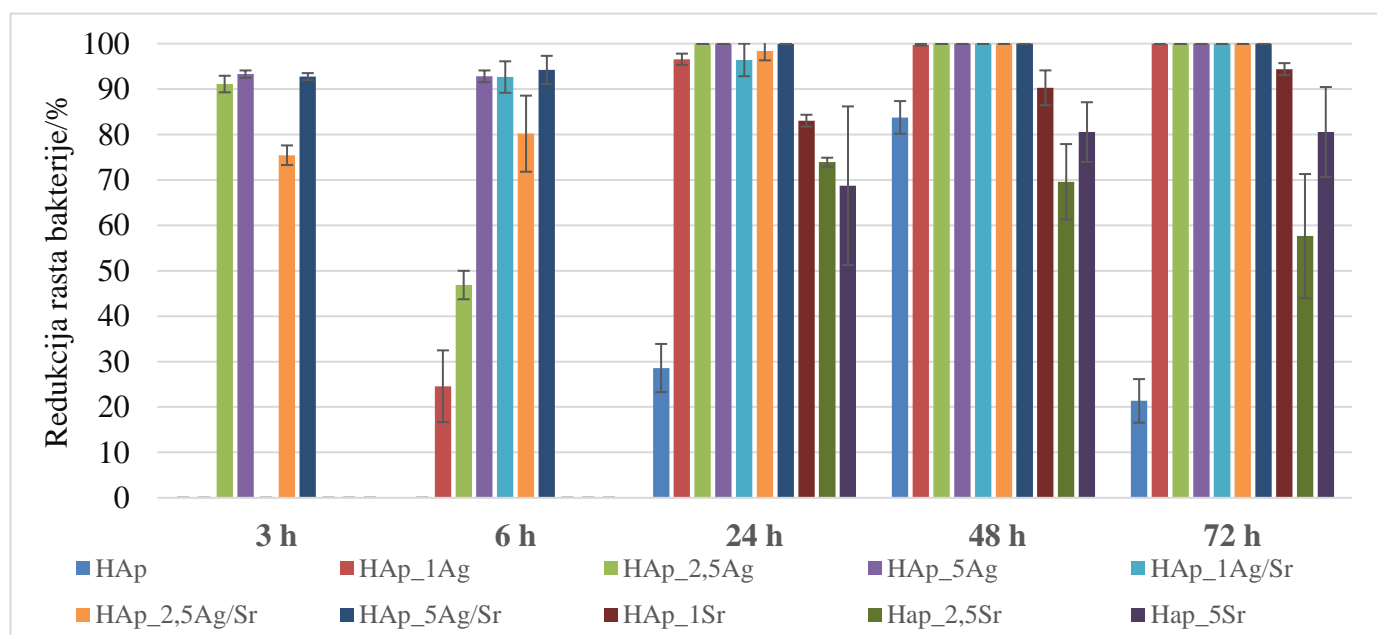
**Slika 30.** Broj živih bakterijskih stanica *S. aureus* u suspenziji  $\pm$  standardna devijacija nakon 3, 6, 24, 48 i 72 sata kontakta s praškastim uzorcima hidroksiapatita supstituiranih 1 mol %  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (HAp\_1Sr), 2,5 mol %  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (HAp\_2,5Sr) i 5 mol%  $\text{Sr}^{2+}$  ionom (HAp\_5Sr)

Nesupstituirani hidroksiapatit je pokazao visoki stupanj redukcije broja bakterijskih stanica (više od 90 %) nakon 3, 6, 24 i 48 sata kontakta prema bakteriji *E. coli* te je prisutna 100 % - tna redukcija bakterijskog rasta nakon 72 sata kontakta. Uzorci HAp\_1Ag, HAp\_2,5Ag, HAp\_1Ag/Sr, HAp\_2,5Ag/Sr i HAp\_5Ag/Sr nakon prvih 6 sati kontakta pokazuju redukciju višu od 97 % prema bakteriji *E. coli*, a nakon 24 sata kontakta redukcija je 100 % - tna. Jedino uzorak HAp\_5Ag pokazuje 100 % - tnu redukciju bakterijskog rasta već nakon 3 sata kontakta. Uzorci HAp\_1Sr i HAp\_2,5Sr ne pokazuju redukciju bakterijskog rasta nakon 3 sata kontakta, nakon 6 sata redukcija je 53,06 % za HAp\_1Sr i 61,21 % za HAp\_2,5Sr odnosno 98,56 % i 100% nakon 24 sata. Za uzorak HAp\_5Sr redukcija bakterijskog rasta je 5,74 % nakon 3 sata, 35,60 % nakon 6 sata i 97,38 % nakon 24 sata. Svi Sr-supstituirani uzorci pokazuju 100 % - tnu redukciju nakon 48 sata kontakta uzorka i bakterijske suspenzije *E. coli* (Slika 31).



**Slika 31.** Postotak redukcije rasta bakterije *E. coli* ± standardna devijacija nakon 3, 6, 24, 48 i 72 sata kontakta s praškastim uzorcima nesupstituiranog hidroksiapatita, hidroksiapatita supstituiranih različitim stupnjevima Ag<sup>+</sup> ionom, hidroksiapatita supstituiranog različitim stupnjevima Ag<sup>+</sup> i Sr<sup>2+</sup> ionom i hidroksiapatita supstituiranih različitim stupnjevima Sr<sup>2+</sup> ionom

Nakon 3 i 6 sati kontakta uzoraka nesupstituiranog hidroksiapatita i bakterijske suspenzije *S. aureus* nije prisutna redukcija bakterijskog rasta, a nakon 24, 48 i 72 sata kontakta dolazi do bakterijske redukcije. Uzorak HAp\_1Ag ne pokazuje redukciju prema bakteriji *S. aureus* nakon 3 sata kontakta, a nakon 6 sati dolazi do slabe redukcije od 24,57 % koja nakon 24 sata kontakta je viša od 95 %. Uzorci HAp\_2,5Ag i HAp\_5Ag pokazuju redukciju višu od 90 % već nakon 3 sata kontakta. Redukcija je 100 % - tna za uzorke HAp\_2,5Ag i HAp\_5Ag nakon 48 sata kontakta. Uzorak HAp\_1Ag/Sr ne pokazuje redukciju nakon 3 sata kontakta, ali već nakon 6 sati redukcija bakterijskog rasta je veća od 90%, a nakon 72 sata iznosi 100 %. Uzorak HAp\_2,5Ag/Sr pokazuje redukciju od 75,43 % nakon 3 sata kontakta, a 80,17 % nakon 6 sati kontakta. Uzorak HAp\_5Ag/Sr pokazuje redukciju veću od 90 % već nakon 3 sata kontakta. Uzorci HAp\_2,5Ag/Sr i HAp\_5Ag/Sr pokazuju redukciju od 100 % nakon 48 sati kontakta bakterijske suspenzije i navedenih uzoraka. Svi Sr-supstituirani uzorci ne pokazuju redukciju bakterijskog rasta prema bakteriji *S. aureus* nakon 3 i 6 sati kontakta, a nakon 24 sata kontakta je prisutna bakterijska redukcija od 83,03 % za HAp\_1Sr, 73,90 % za HAp\_2,5Sr i 55,20 % za HAp\_5Sr. Najveću redukciju od 94,39 % pokazuje uzorak HAp\_1Sr nakon 72 sati kontakta (Slika 32).



**Slika 32.** Postotak redukcije rasta bakterije *S. aureus* ± standardna devijacija nakon 3, 6, 24, 48 i 72 sata kontakta s praškastim uzorcima nesupstituiranog hidroksiapatita, hidroksiapatita supstituiranih različitim stupnjevima Ag<sup>+</sup> ionom, hidroksiapatita supstituiranog različitim stupnjevima Ag<sup>+</sup> i Sr<sup>2+</sup> ionom i hidroksiapatita supstituiranih različitim stupnjevima Sr<sup>2+</sup> ionom

#### **4.5. Mjerenje pH i određivanje imobiliziranih bakterija**

- a) Prije provedbe istraživanja, pH vrijednost bakterijske suspenzije koncentracije  $\sim 10^5$  CFU je iznosila 8,4. Nakon 3 dana, odnosno 72 sata kontakta, pH vrijednost bakterijske suspenzije s praškastim uzorkom hidroksiapatita je iznosila 8,38.
  
- b) Nema naraslih bakterijskih kolonija na podlogama.
  
- c) Nema bakterijskih stanica na mikroskopskom preparatu.

## 5. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je putem dviju metoda, metode disk difuzije i metode određivanja brojnosti bakterija u suspenziji, odrediti antibakterijsku aktivnost uzoraka hidroksiapatita obogaćenog ionima srebra i uzoraka hidroksiapatita obogaćenog ionima srebra i stroncija.

Rezultati metode disk difuzije u agaru pokazali su da uzorak nesupstituiranog hidroksiapatita ne posjeduje antibakterijsku aktivnost na obje testirane bakterije što je vidljivo iz odsustva zone inhibicije. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturnima. Geng i sur. (2016, 2017) i Paterson i sur. (2020) su koristili istu metodu i nije bilo pojave zone inhibicije oko uzorka čistog hidroksiapatita na pločama s bakterijama *E. coli* i *S. aureus*. Wilcock i sur. (2017) i Iqbal i sur. (2013) su koristili istu metodu u kojoj su antibakterijsko djelovanje hidroksiapatita ispitali i na neke druge bakterijske vrste (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*) koje su također česti patogeni prilikom infekcije kostiju. Njihovi rezultati su pokazali da hidroksiapatit nema antibakterijsku aktivnost na niti jednu prethodnu navedenu bakterijsku vrstu. Hidroksiapatit kao biomaterijal koristi se u inženjerstvu koštanog tkiva zbog svoje strukturne sličnosti s prirodnom mineralnom fazom kostiju. Ugradnjom u ljudsko tijelo, hidroksiapatit se smatra stranim materijalom. Iz tog razloga, imunosni sustav domaćina ne može ugrađeni hidroksiapatit zaštititi protiv bakterija koje naseljavaju mjesto ozljede (Morimoto i sur. 2022). Bakterije imaju sposobnost prianjanja na površine materijala i stvaranja biofilma. Zbog nedostatka antibakterijskih svojstava hidroksiapatita, infekcije koje se javljaju nakon implantacije potrebno je liječiti antibioticima. Danas su bakterije razvile sve veću otpornost na antibiotike. Srebro kao antimikrobno sredstvo je pokazalo odgovarajuća antibakterijska svojstva protiv raznih bakterija, stoga se koristi za postizanje antimikrobnih svojstava hidroksiapatita (Paterson i sur. 2020). Antibakterijska sposobnost srebra dolazi od njegovih iona. Samo srebro je inertno, ali dolaskom u vlažnu okolinu dolazi do otpuštanja srebrovih iona u medij.

Rezultati metode disk difuzije u agaru pokazali su da uzorci hidroksiapatita supstituirani različitim koncentracijama stroncijeva iona nemaju antibakterijsku aktivnosti na obje testirane bakterije. Jednake rezultate korištenjem iste metode dobili su Geng i sur. (2016, 2017) za uzorak Sr-supstituiranog hidroksiapatita oznake 10Sr gdje također nije bilo vidljive zone inhibicije nakon



difuzije u agaru. Pokazano je da stroncij ima sposobnost poticanja stvaranja kostiju i inhibicije osteoklasta.  $\text{Sr}^{2+}$  ioni unutar hidroksiapatita povećavaju proliferaciju stanica, diferencijaciju osteoblasta, ekspresiju koštanih staničnih markera. Istraživanja su izvijestila o učincima i mehanizmima stroncijem potaknute osteogene diferencijacije matičnih stanica, a nedostaci kostiju su popravljani hidroksiapatitom supstituiranim ionima stroncija (Yang i sur. 2011). Rezultati istraživanja Li i sur. (2019) su pokazali da stroncij može inducirati osteogenezu, a Sr-supstituirani HAp može pospješiti osteogenezu.

Rezultati metode disk difuzije u agaru pokazali su da svi uzorci hidroksiapatita supstituirani srebrovim ionom, bez obzira na stupanj supstitucije  $\text{Ag}^+$  ionom, imaju antibakterijsku aktivnost i na bakteriju *E. coli* i na bakteriju *S. aureus*. Iste rezultate korištenjem iste metode, dobili su Geng i sur. (2016, 2017) i Paterson i sur. (2020) za srebrom supstituirane uzorke hidroksiapatita gdje su oko uzoraka bile detektirane zone inhibicije pa zaključujemo da uzorci posjeduju antibakterijsko djelovanje. Uočene su razlike u antibakterijskoj aktivnosti Ag-supstituiranih HAp-ova na bakteriju *E. coli* i *S. aureus* s obzirom na količinu supstituiranog  $\text{Ag}^+$  iona u uzorcima hidroksiapatita. Što je veća količina supstituiranog  $\text{Ag}^+$  iona, to je zona inhibicije veća i antibakterijska aktivnost uzoraka na testirane bakterije snažnija. Istraživanja koja su proveli Geng i sur. (2016) i Paterson i sur. (2020) dobili su drugačije rezultate za bakteriju *E. coli*. Kod njih ne vrijedi da što je veća koncentracija supstituiranog  $\text{Ag}^+$  iona u hidroksiapatitu, da je time antibakterijska aktivnost Ag-supstituiranih uzoraka na bakteriju *E. coli* veća. Od testiranih uzoraka (uzorak s 2 mol % Ag, uzorak s 5 mol % Ag, uzorak s 10 mol % Ag), upravo je uzorak s 5 mol % Ag pokazao najveću antibakterijsku aktivnost s najvećom zonom inhibicije na *E. coli*, iako količina dodanog srebra u uzorku nije bila najveća (Paterson i sur. 2020). Antibakterijski učinak uzoraka Ag0,05 i Ag0,1 je bio veći nego kod Ag0,3 (Geng i sur. 2016). Zona inhibicije za uzorak supstituiran 5 mol %  $\text{Ag}^+$  ionom iznosi 2 mm za bakteriju *E. coli*, a kod Paterson i sur. (2020) izmjerena zona inhibicije za taj isti uzorak iznosi 1,8 mm. Rezultati za bakteriju *S. aureus* su u skladu s Paterson i sur. (2020) gdje je uzorak s najvećim stupnjem supstitucije  $\text{Ag}^+$  ionom imao najveću zonu inhibicije. Drugačije rezultate za *S. aureus* je dobio Bee i sur. (2021) gdje uzorak Ag-3 pokazuje veću antibakterijsku učinkovitost od uzorka Ag-5 koji ima veću koncentraciju supstituiranog  $\text{Ag}^+$  iona.

Rezultati metode disk difuzije u agaru pokazali su da svi uzorci hidroksiapatita supstituirani srebrovim i stroncijevim ionom, bez obzira na stupanj supstitucije  $\text{Ag}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionom, imaju antibakterijsku aktivnost i na bakteriju *E. coli* i na bakteriju *S. aureus*. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturnima. Geng i sur. (2016) su istom metodom pokazali da uzorak hidroksiapatita supstituiran i stroncijevim i srebrovim ionom, oznake 10SrAg0,3, ima antibakterijski učinak. Isto su pokazali Geng i sur. (2017) gdje uzorak Sr/Ag pokazuje antibakterijsku aktivnost. U literaturi nisam pronašla vrijednosti za zone inhibicije kod Ag/Sr-kosupstituiranih uzoraka hidroksiapatita. Dodatkom  $\text{Sr}^{2+}$  iona u uzorke Ag-supstituiranih HAp, kod nekih uzoraka došlo je do smanjenja ili povećanja antibakterijske aktivnosti dok je kod nekih antibakterijska aktivnost ostala ista. Za više uzoraka je ipak detektirano smanjenje antibakterijske aktivnosti dodatkom  $\text{Sr}^{2+}$  iona. Geng i sur. (2017) su izvijestili o laganom smanjenju antibakterijske aktivnosti dodatak stroncijeva iona u Ag-supstituirane uzorke hidroksiapatita. Utvrđeno je da dodatak  $\text{Sr}^{2+}$  iona smanjuje i uravnotežuje potencijalnu citotoksičnost  $\text{Ag}^+$  iona (Ressler i sur. 2021).

U većini slučajeva su kod Ag-supstituiranih i kod Ag/Sr-kosupstituiranih uzoraka hidroksiapatita izmjerene zone inhibicije za bakteriju *S. aureus* bile veće nego za bakteriju *E. coli*. Dobiveni rezultati su iznenađujući jer Geng i sur. (2016, 2017) su izvijestili o manjim promjerima zona inhibicija dobivenih za bakteriju *S. aureus* nego za bakteriju *E. coli*, što kod nas nije slučaj. Objašnjeno je da gram-pozitivne bakterije zbog posjedovanja debele stanične stijenke izgrađene od peptidoglikana čine rigidniju strukturu koja može usporiti djelovanje srebrovih iona i tako zaštititi bakterijsku stanicu od influksa srebrovih iona (Dakal i sur. 2016; Ibrahim 2015; Jung i sur. 2008). Antibakterijska aktivnost supstituiranih i kosupstituiranih uzorka hidroksiapatita koji sadrže  $\text{Ag}^+$  ion određena je ukupnim oslobađanjem  $\text{Ag}^+$  iona. Rezultati su pokazali da se prisutnost  $\text{Ag}^+$  iona u agaru povećava s povećanjem razine koncentracije srebrova iona u uzorcima HAp-a (Wilcock i sur. 2017), a posljedično tome raste antibakterijski učinak (Geng i sur. 2016). Za antimikrobno djelovanje  $\text{Ag}^+$  iona predloženo je četiri mehanizama. Prvi uključuje adheziju  $\text{Ag}^+$  iona na površinu stanične membrane i stanične stijenke bakterija (Dakal i sur. 2016). Pozitivan naboj  $\text{Ag}^+$  iona je ključan za adheziju (Abbaszadegan i sur. 2015). Pozitivan naboj omogućuje elektrostatsko privlačenje s negativno nabijenom membranom bakterija, čime se olakšava pričvršćivanje  $\text{Ag}^+$  iona na staničnu membranu. Posljedica tome su strukturne promjene i oštećenja membrane (Nalwade i Jadhav 2013). Drugi mehanizam uključuje ulazak  $\text{Ag}^+$  iona u bakterijsku stanicu i oštećenje

biomolekula i unutarstaničnih struktura (Dakal i sur. 2016). U stanici  $\text{Ag}^+$  ion uzrokuje transformaciju DNA u kondenzirani oblik i dovodi do zaustavljanja replikacije DNA (Moreira i sur. 2016). Također, u stanici  $\text{Ag}^+$  ion reagira s tiolnim skupinama čime dolazi do inaktivacije proteina (Moreira i sur. 2016). Treći mehanizam odnosi se na prisustvo  $\text{Ag}^+$  iona u stanici koje dovodi do povećanja oksidativnog stresa (Dakal i sur. 2016) jer dolazi do proizvodnje reaktivnih vrsta kisika i radikala koji oštećuju unutarstanične komponente i dovode do smrti bakterijske stanice (Bee i sur. 2021). Četvrti mehanizam je modulacija putova prijenosa signala (Dakal i sur. 2016).

Za razumijevanje djelovanja uzoraka hidroksiapatita na bakterije, površina uzoraka promatrana je uz pomoć SEM mikroskopije nakon analize zone inhibicije. Velika gustoća bakterija *E. coli* prisutna je na površini uzoraka nesupstituiranog hidroksiapatita i Sr-supstituiranih hidroksiapatita bez obzira na stupanj supstitucije  $\text{Sr}^{2+}$  ionom. Isti rezultat u svom istraživanju dobili su Geng i sur. (2016, 2017) gdje su na površini 10Sr uzorka i HAp uzorka pronađene bakterije koje su dobro rasle u velikom broju. Između navedenih uzoraka, nije vidljiva razlika u gustoći naseljenosti bakterija *E. coli* na površini uzoraka. Veća gustoća naseljenosti bakterija *S. aureus* vidljiva je na uzorcima nesupstituiranog hidroksiapatita i uzorka HAp\_1Sr. Nešto manji broj bakterija *S. aureus* vidljiv je kod ostalih Sr-supstituiranih uzoraka hidroksiapatita. Ovo je bilo iznenađujuće jer u metodi disk difuzije u agaru  $\text{Sr}^{2+}$  ioni iz Sr-supstituiranih uzoraka hidroksiapatita nisu pokazivali zonu inhibicije. Ovaj učinak nije vidljiv kod *E. coli*. Rezultati su u skladu istraživanju kojeg su proveli Kumara i sur. (2015) gdje Sr-supstituirani hidroksiapatit je pokazao slabo antibakterijsko djelovanje na *S. aureus*, dok nije bilo uočeno antibakterijsko djelovanje na *E. coli*. Nekoliko bakterijskih stanica *S. aureus* i *E. coli* može se vidjeti na površini uzorka HAp\_1Ag. Bakterije *S. aureus* i *E. coli* nisu zamijećene na slijedećim uzorcima: HAp\_2,5Ag, HAp\_5Ag, HAp\_1Ag/Sr, HAp\_2,5Ag/Sr i HAp\_5Ag/Sr. Geng i sur. (2016, 2017) su pokazali inhibiran rast i smanjen broj *S. aureus* i *E. coli* na površini uzoraka Ag-supstituiranog HAp-a. Lim i sur. (2013) su izvijestili o većoj gustoći bakterija na jednom uzorku Ag-supstituiranog hidroksiapatita, točnije na uzorku 0,2 wt % Ag\_HAp, dok na preostalim Ag-supstituiranim uzorcima hidroksiapatita zamijećen je manji broj bakterija. Na površini uzoraka hidroksiapatita supstituiranog  $\text{Ag}^+$  ionom bakterije *S. aureus* nisu više pokazivale okrugli oblik. Geng i sur. (2017) su uočili konkavnost i velika oštećenja u bakterijskoj membrani i kod bakterija *E. coli* i *S. aureus* na uzorcima hidroksiapatita u kojima je

dodan  $\text{Ag}^+$  ion. Mirzaee i sur. (2016) su uočili značajne morfološke promjene bakterije *S. aureus* tretirane  $\text{Ag}^+$  ionom iz hidroksiapatita. Pokazali su bakterijske stanice koje imaju polomljene stanične stijenke i membrane. Vidjelo se potpuno ili lokalizirano odvajanje stanične membrane od stanične stijenke. Bakterijske stanice *E. coli* bile su napuknute (Mirzaee i sur. 2016).

Rezultati CFU metode pokazali su da nesupstituirani hidroksiapatit ima određenu antibakterijsku aktivnost jer smanjuje broj bakterija s obzirom na kontrolu. Ovaj rezultat je iznenađujući jer hidroksiapatit ne pokazuje antibakterijsku aktivnost što sam potvrdila u metodi disk difuzije u agaru. Provjerom pH-vrijednosti bakterijske suspenzije prije provedbe istraživanja i nakon 72 sata bakterijske suspenzije *E. coli* s praškastim uzorkom hidroksiapatita dobivene su slične vrijednosti, oko 8,4. Izmjerena pH-vrijednost ne utječe negativno na rast bakterije *E. coli* stoga smanjenje bakterija *E. coli* kod nesupstituiranog hidroksiapatita nije povezano s promjenom pH-vrijednosti bakterijske suspenzije. Bojenjem po Gramu utvrđeno je da nema vezanja bakterijskih stanica *E. coli* na uzorak nesupstituiranog hidroksiapatita što bi eventualno moglo smanjiti broj bakterijskih stanica u bakterijskoj suspenziji. Objašnjenje ovog rezultata je u tome da nanokristali hidroksiapatita oštećuju bakterijske stanice *E. coli*, pa se redukcija bakterija prepisuje izravnom kontaktu bakterija s nanokristalima hidroksiapatita (Shi i sur. 2015). Ovaj učinak nije vidljiv kod bakterije *S. aureus*. Dobiveni rezultati su dosljedni istraživanju kojeg su proveli Shi i sur. (2015) gdje nema značajnog smanjenja bakterije *S. aureus* tijekom kontakta s nesupstituiranim hidroksiapatitom. Wilcock i sur. (2017) su pokazali da hidroksiapatit bez dopiranog srebra smanjuje rast bakterija *E. coli* i *S. aureus*. Mirzaee i sur. (2016) su u svom istraživanju pokazali da hidroksiapatit bez iona srebra određeno smanjuje broj bakterijskih stanica *S. aureus*.

Rezultati CFU metode pokazali su da Sr-supstituirani uzorci hidroksiapatita bez obzira na stupanj supstitucije  $\text{Sr}^{2+}$  ionom ne pokazuju antibakterijsku aktivnost što je u skladu s dobivenim rezultatima u metodi disk difuzije u agaru. Huang i sur. su (2016) su izvijestili o malom inhibitornom učinku na rast *S. aureus* s bakterijskom redukcijom od 37,2 %. Ravi i sur. (2012) su izvijestili o smanjenju bakterije *E. coli* za 56 % i 35 % za *S. aureus*.

Rezultati CFU metode pokazali su da svi Ag-supstituirani uzorci hidroksiapatita bez obzira na stupanj supstitucije Ag<sup>+</sup> ionom pokazuju antibakterijsku aktivnost prema bakterijama *E. coli* i *S. aureus* u nekom vremenu. Iste rezultate korištenjem iste metode dobili su Shi i sur. (2015) gdje u svim skupinama hidroksiapatita dopiranih srebrom dolazi do naglog smanjenja bakterija *E. coli* i *S. aureus*. Svi uzorci hidroksiapatita dopiranih ionom srebra pokazuju smanjenje održivih stanica bakterijskih vrsta *E. coli* i *S. aureus* (Mirzaee i sur. 2016). Smanjenje bakterija *E. coli* ili *S. aureus* ovisi o količini supstituiranog Ag<sup>+</sup> iona i vremenu. O ovome su izvijestili Shi i sur. (2015) i Wilcock i sur. (2017). Što je veća količina supstituiranog Ag<sup>+</sup> iona u uzorku hidroksiapatita, to je postizanje antibakterijske aktivnosti brže i antibakterijska aktivnost je veća (bakterijska redukcija je veća). Uzorak HAp\_5Ag koji ima najveću količinu Ag<sup>+</sup> iona pokazuje najizraženije smanjenje broja bakterije *E. coli*. Isto su u svom istraživanju dobili Shi i sur. (2015) kod kojih je došlo do potpunog i najizraženijeg smanjenja bakterije *E. coli* unutar 3 sata kontakta s uzorkom hidroksiapatita koji sadrži najveću količinu iona srebra. Iako uzorak HAp\_1Ag sadrži najmanju količinu supstituiranog Ag<sup>+</sup> iona, svejedno pokazuje visoki stupanj redukcije bakterijskog rasta. Mirzaee i sur. (2016) izvijestili su da hidroksiapatit s najmanjim udjelom srebra pokazuje isto izvrsnu antibakterijsku aktivnost s bakterijskom redukcijom od 98,7 % za bakteriju *E. coli*. Nakon 6 sati kontakta, redukcija bakterijskog rasta za uzorak HAp\_1Ag iznosi 98,67%, a 100 % za uzorak HAp\_5Ag. Isto su pokazali Shi i sur. (2015) kada se koncentracija dopiranog srebrova iona povećala s 0,04 ppm (najmanja količina srebrova iona) na 197 ppm (najveća količina srebrova iona), došlo je do povećanja bakterijske redukcije s 63 % na 99 %. Što je vrijeme kontakta bakterijske suspenzije i Ag-supstituiranih uzoraka dulje, to je antibakterijska aktivnost veća (redukcija bakterijskog rasta je veća). Shi i sur. (2015) su isto pokazali u svom istraživanju gdje produljenjem vremena kontakta bakterijske suspenzije i uzorka s 3 sata na 72 sata, redukcija bakterijskog rasta je povećana s 40 % na 63 % za bakteriju *E. coli*.

Rezultati CFU metode pokazali su da svi Ag/Sr-kosupstituirani uzorci hidroksiapatita bez obzira na stupanj supstitucije Ag<sup>+</sup> i Sr<sup>2+</sup> ionom pokazuju antibakterijsku aktivnost prema bakterijama *E. coli* i *S. aureus* u nekom vremenu. Chambard i sur. (2020) su izvijestili o učinkovitosti Ag/Sr-kosupstituiranih uzoraka HAp-a. i značajnom smanjenju bakterija *S. aureus* nakon 24 sata kontakta. Huang i sur. (2016) su izvijestili kako Ag/Sr uzorci hidroksiapatita imaju znatnu antibakterijsku učinkovitost protiv *S. aureus* s bakterijskom redukcijom od 99,7 % do 100 %.

Svi Ag-supstituirani i Ag/Sr-kosupstituirani uzorci hidroksiapatita u CFU metodi pokazuju izraženiji antibakterijski učinak na bakteriju *E. coli* nego prema bakteriji *S. aureus*. Ovi rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima koji ukazuju da je antibakterijski učinak iona srebra bolji protiv gram-negativnih nego gram-pozitivnih bakterija. To je zbog debljine peptidoglikanskog sloja koji posjeduju gram-pozitivne bakterije i on može spriječiti djelovanje iona srebra kroz staničnu stijenku bakterija (Dakal i sur. 2016). Ovi rezultati su drugačiji nego što sam dobila kod metode disk difuzije u agaru gdje su Ag i Ag/Sr-kosupstituirani uzorci pokazivali veći antibakterijski učinak prema *S. aureus*. Do pogreške u metodi disk difuzije u agaru može doći zbog toga što je metoda dosta subjektivna, rezultati se dobivaju vizualno mjerenjem zone inhibicija ravnalom, stoga nepreciznost u mjerenju nas može navesti na pogrešne zaključke. Prema tome, bitno je izvoditi više određenih metoda za dobivanje ispravnih rezultata o tome ako sam materijal posjeduje ili ne posjeduje antibakterijsku aktivnost i ako ju posjeduje je li ona slabija ili jača.

## 6. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata ispitivanja antibakterijske aktivnosti uzoraka hidroksiapatita obogaćenog ionima srebra i hidroksiapatita obogaćenog ionima srebra i stroncija metodom disk difuzije i određivanjem brojnosti bakterija u suspenziji (CFU metoda) prema bakterijama *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* može se zaključiti sljedeće:

- nesupstituirani hidroksiapatit ne pokazuje antibakterijsku aktivnost prema obje testirane bakterije u metodi disk difuzije u agaru i na bakteriju *S. aureus* u CFU metodi, s izuzetkom na bakteriju *E. coli* gdje u CFU metodi pokazuje antibakterijsku aktivnost
- svi uzorci hidroksiapatita supstituirani srebrovim ionom pokazuju antibakterijsku aktivnost na obje testirane bakterije u obje metode
- antibakterijska aktivnost uzoraka hidroksiapatita supstituiranih srebrovim ionom u CFU metodi ovisi o količini supstituiranog  $\text{Ag}^+$  iona i o vremenu (što je veća količina supstituiranog  $\text{Ag}^+$  iona u hidroksiapatitu i vrijeme kontakta bakterijske suspenzije i uzoraka dulje, to je antibakterijska aktivnost izraženija)
- svi uzorci hidroksiapatita supstituirani srebrovim i stroncijevim ionima pokazuju antibakterijsku aktivnost na obje testirane bakterije u obje metode
- antibakterijska aktivnost uzoraka hidroksiapatita supstituiranih srebrovim ionom i hidroksiapatita supstituiranih srebrovim i stroncijem ionom je izraženija na gram-negativnu bakteriju *E. coli* nego na gram-pozitivnu bakteriju *S. aureus* u CFU metodi

## 7. LITERATURA

Abbaszadegan, A., Ghahramani, Y., Gholami, A., Hemmateenejad, B., Dorostkar, S., Nabavizadeh, M., Sharghi, H. (2015): The effect of Charge at the Surface of Silver Nanoparticles on Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: A preliminary Study. *Journal of Nanomaterials* 2015: 8

Abdul Halim, N. A., Hussein, M. Z., Kandar, M. K. (2021): Nanomaterials-Upconverted Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering and a Platform for Drug Delivery. *International journal of nanomedicine* 16: 6477–6496.

Agarwal, R., Garcia, A. J. (2015): Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. *Advanced drug delivery reviews* 94: 53–62.

Amini, A. R., Laurencin, C. T., Nukavarapu, S. P. (2012): Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical reviews in biomedical engineering* 40: 363–408.

Arcos, D., Vallet-Regí, M. (2020): Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants. *Journal of materials chemistry. B* 8: 1781–1800.

Bee, S. L., Bustami, Y., Ul-Hamid, A., Lim, K., Abdul Hamid, Z. A. (2021): Synthesis of silver nanoparticle-decorated hydroxyapatite nanocomposite with combined bioactivity and antibacterial properties. *Journal of materials science. Materials in medicine* 32: 106.

Bose, S., Fielding, G., Tarafder, S., Bandyopadhyay, A. (2013): Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends in biotechnology* 31: 594–605.

Brown, B. N., Valentin, J. E., Stewart-Akers, A. M., McCabe, G. P., Badylak, S. F. (2009): Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials* 30: 1482–1491.

Chambard, M., Remache, D., Balcaen, Y., Dalverny, O., Alexis, J., Siadous, R., Bareille, R., Catros, S., Fort, P., Grossin, D., Gitzhofer, F., Bertrand, G. (2020): Effect of silver and strontium incorporation route on hydroxyapatite coatings elaborated by rf-SPS. *Material* 12: 2589-1529

Čadež, V. (2011): Nove metode priprave bioimplantata: značaj istraživanja biomineralne strukture morskih beskralješnjaka za razumijevanje procesa mineralizacije kralješnjaka. *Medicinski vjesnik* 43: 91-101.

Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., Yadav, V. (2016): Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Frontiers in microbiology* 7: 1831.



De Santis, R., Russo, T., Rau, J. V., Papallo, I., Martorelli, M., Gloria, A. (2021): Design of 3D Additively Manufactured Hybrid Structures for Cranioplasty. *Materials* (Basel, Switzerland) 14: 181.

Dehghanghadikolaei, A., Fotovvati, B. (2019): Coating Techniques for Functional Enhancement of Metal Implants for Bone Replacement: A Review. *Materials* (Basel, Switzerland) 12: 1795.

Dorozhkin, S. V. (2011): Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. *Biomatter 1*: 121–164.

Duta, L., Dorcioman, G., Grumezescu, V. (2021): A Review on Biphasic Calcium Phosphate Materials Derived from Fish Discards. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland) 11: 2856.

Dvir, T., Timko, B. P., Kohane, D. S., Langer, R. (2011): Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature nanotechnology* 6: 13–22.

Eliaz, N., Metoki, N. (2017): Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials* (Basel, Switzerland) 10:334.

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (2022) [https://www.eucast.org/links\\_and\\_contacts/](https://www.eucast.org/links_and_contacts/) (pristupljeno: 25.8.2022).

Florencio-Silva, R., Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., Cerri, P. S. (2015): Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed research international* 2015: 421746.

Geng, Z., Cui, Z., Li, Z., Zhu, S., Liang, Y., Liu, Y., Li, X., He, X., Yu, X., Wang, R., Yang, X. (2016): Strontium incorporation to optimize the antibacterial and biological characteristics of silver-substituted hydroxyapatite coating. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 58: 467–477.

Geng, Z., Wang, R., Zhuo, X., Li, Z., Huang, Y., Ma, L., Cui, Z., Zhu, S., Liang, Y., Liu, Y., Bao, H., Li, X., Huo, Q., Liu, Z., Yang, X. (2017). Incorporation of silver and strontium in hydroxyapatite coating on titanium surface for enhanced antibacterial and biological properties. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 71: 852–861.

Ghassemi, T., Shahroodi, A., Ebrahimzadeh, M. H., Mousavian, A., Movaffagh, J., Moradi, A. (2018): Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *The archives of bone and joint surgery* 6: 90–99.

Gokcekaya, O., Ergun, C., Webster, T. J., Bahadir, A., Ueda, K., Narushima, T., Nakano, T. (2021): Effect of Precursor Deficiency Induced Ca/P Ratio on Antibacterial and Osteoblast Adhesion Properties of Ag-Incorporated Hydroxyapatite: Reducing Ag Toxicity. *Materials (Basel, Switzerland)* 14: 3158.

Huang, Y., Zhang, Zhang, X., Qiao, H., X. Zhang X., , Jia, T., Han, S., Gao, Y., Xiao, H., Yang, H. (2016): Fabrication of silver- and strontium-doped hydroxyapatite/TiO<sub>2</sub> nanotube bilayer coatings for enhancing bactericidal effect and osteoinductivity. *Cermics International* 43: 992–1007

Ibrahim, M. M. (2015): Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Science* 8: 265-275.

Jung, W. K., Koo, H. C., Kim, K. W., Shin, S., Kim, S. H., Park, Y. H. (2008): Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* 74: 2171–2178.

Langer, R., Vacanti, J. P. (1993): Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260: 920–926.

Lara, H. H., Garza-Treviño, E. N., Ixtapan-Turrent, L., Singh, D. K. (2011): Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of nanobiotechnology* 9: 30.

Li, J., Liu, X., Park, S., Miller, A. L., 2nd, Terzic, A., Lu, L. (2019): Strontium-substituted hydroxyapatite stimulates osteogenesis on poly(propylene fumarate) nanocomposite scaffolds. *Journal of biomedical materials research. Part A* 107: 631–642.

Lim, P. N., Teo, E. Y., Ho, B., Tay, B. Y., Thian, E. S. (2013): Effect of silver content on the antibacterial and bioactive properties of silver-substituted hydroxyapatite. *Journal of biomedical materials research. Part A* 101: 2456–2464.

Mirzaee, M., Vaezi, M., Palizdar, Y. (2016): Synthesis and characterization of silver doped hydroxyapatite nanocomposite coatings and evaluation of their antibacterial and corrosion resistance properties in simulated body fluid. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 69: 675–684.

Moreira, M. P., de Almeida Soares, G. D., Dentzer, J., Anselme, K., de Sena, L. Á., Kuznetsov, A., Dos Santos, E. A. (2016): Synthesis of magnesium- and manganese-doped hydroxyapatite structures assisted by the simultaneous incorporation of strontium. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 61: 736–743.

Morimoto, T., Hirata, H., Eto, S., Hashimoto, A., Kii, S., Kobayashi, T., Tsukamoto, M., Yoshihara, T., Toda, Y., Mawatari, M. (2022): Development of Silver-Containing Hydroxyapatite-Coated Antimicrobial Implants for Orthopaedic and Spinal Surgery. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 58: 519.

Mouriño, V., Cattalini, J. P., Boccaccini, A. R. (2012): Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments. *Journal of the Royal Society, Interface* 9: 401–419.

Nalwade, A. R., Jadhav, A. A. (2015): Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Daturaalba* Nees. and evaluation of their antibacterial activity. *Archives of Applied Science Research* 5:45-49

Noori, A., Ashrafi, S. J., Vaez-Ghaemi, R., Hatamian-Zaremi, A., Webster, T. J. (2017). A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *International journal of nanomedicine* 12: 4937-4961.

O'Neill, W. C. (2007). The fallacy of the calcium-phosphorus product. *Kidney international* 72: 792–796.

Palmer, L. C., Newcomb, C. J., Kaltz, S. R., Spoerke, E. D., Stupp, S. I. (2008): Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chemical reviews* 108: 4754-4783.

Paterson, T. E., Shi, R., Tian, J., Harrison, C. J., De Sousa Mendes, M., Hatton, P. V., Li, Z., Ortega, I. (2020): Electrospun Scaffolds Containing Silver-Doped Hydroxyapatite with Antimicrobial Properties for Applications in Orthopedic and Dental Bone Surgery. *Journal of functional biomaterials* 11: 58.

Qi, J., Yu, T., Hu, B., Wu, H., Ouyang, H. (2021): Current Biomaterial-Based Bone Tissue Engineering and Translational Medicine. *International journal of molecular sciences* 22: 10233.

Qu, H., Fu, H., Han, Z., Sun, Y. (2019): Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. *RSC advances* 9: 26252–26262.

Ravi, N. D., Balu, R., Sampath Kumar, T. S. (2012): Strontium-Substituted Calcium Deficient Hydroxyapatite Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Antibacterial Properties. *Journal of the American Ceramic Society* 95: 2700-2708

Ressler, A., Gudelj, A., Zadro, K., Antunović, M., Cvetnić, M., Ivanković, M., Ivanković, H. (2020): From Bio-waste to Bone Substitute: Synthesis of Biomimetic Hydroxyapatite and Its Use in Chitosan-based Composite Scaffold Preparation. *Chemical and biochemical engineering quarterly* 34: 59-71.

Ressler, A., Žužić, A., Ivanišević, I., Kamboj, N., Ivanković, H. (2021): Ionic substituted hydroxyapatite for bone regeneration applications: A review. *Open Ceramics* 6:2666-5395

Ressler, A., Ivanković, T., Polak, B., Ivanišević, I., Kovačić, M., Urlić, I., Hussainova, I., Ivanković, H. (2022): A multifunctional strontium/silver-co-substituted hydroxyapatite derived from biogenic source as antibacterial biomaterial. *Ceramics International* 48: 18361–18373

Riaz, M., Zia, R., Ijaz, A., Hussain, T., Mohsin, M., Malik, A. (2018): Synthesis of monophasic Ag doped hydroxyapatite and evaluation of antibacterial activity. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 90: 308–313.

Rodríguez-Merchán, E. C., Davidson, D. J., Liddle, A. D. (2021): Recent Strategies to Combat Infections from Biofilm-Forming Bacteria on Orthopaedic Implants. *International journal of molecular sciences* 22: 10243.

Sampath Kumar, T. S., Madhumathi, K., Rubaiya, Y., Doble, M. (2015): Dual mode antibacterial activity of ion substituted calcium phosphate nanocarriers for bone infections. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 3: 59.

Shi, C., Gao, J., Wang, M., Fu, J., Wang, D., Zhu, Y. (2015): Ultra-trace silver-doped hydroxyapatite with non-cytotoxicity and effective antibacterial activity. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 55: 497–505.

Siddiqi, K. S., Husen, A., Rao, R. (2018): A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of nanobiotechnology* 16: 14.

Sommerfeldt, D. W., Rubin, C. T. (2001): Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 10 Suppl 2(Suppl 2): S86–S95.

Ueno, M., Miyamoto, H., Tsukamoto, M., Eto, S., Noda, I., Shobuike, T., Kobatake, T., Sonohata, M., Mawatari, M. (2016): Silver-Containing Hydroxyapatite Coating Reduces Biofilm Formation by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In Vitro and In Vivo. *BioMed research international* 2016: 8070597.

Velasco, M. A., Narváez-Tovar, C. A., Garzón-Alvarado, D. A. (2015): Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. *BioMed research international* 2015: 729076.

Wilcock, C. J., Stafford, G. P., Miller, C. A., Ryabenkova, Y., Fatima, M., Gentile, P., Möbus, G., Hatton, P. V. (2017): Preparation and Antibacterial Properties of Silver-Doped Nanoscale Hydroxyapatite Pastes for Bone Repair and Augmentation. *Journal of biomedical nanotechnology* 13: 1168–1176.

Willerth, S. M., Sakiyama-Elbert, S. E. (2007): Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 59: 325–338.

Yang, F., Yang, D., Tu, J., Zheng, Q., Cai, L., Wang, L. (2011): Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 29: 981–991.

Zougrou, I. M., Katsikini, M., Brzhezinskaya, M., Pinakidou, F., Papadopoulou, L., Tsoukala, E., Paloura, E. C. (2016): Ca L<sub>2,3</sub>-edge XANES and Sr K-edge EXAFS study of hydroxyapatite and fossil bone apatite. *Die Naturwissenschaften* 103: 60.

## 8. ŽIVOTOPIS

Helena Turk rođena je 7. lipnja 1998. godine u Čakovcu. Završila je 2013. godine Osnovnu školu u Prelogu, a srednjoškolsko obrazovanje nastavila u Čakovcu gdje je 2017. godine završila opći smjer u Gimnaziji Josipa Slavenskog Čakovec. Upisala je 2017. godine integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije, smjer nastavnički na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom studija sudjelovala je u raznim aktivnostima koje doprinose popularizaciji znanosti. Cijelu 2019. godinu sudjelovala je kao volonter studentske sekcije Hrvatskog kemijskog društva – Znanstvene čarolije. Iste godine sudjelovala je na popularno-znanstvenoj manifestaciji Dan i noć na PMF-u 2019 kao član Znanstvenih čarolija. 2022. godine se priključila volontiranju za Udrugu Profesor Baltazar u sklopu projekta Mobilni zez centar. Dobitnica je Dekanove nagrade za najbolju studenticu preddiplomske, integrirane i diplomske razine studija nastavničkog usmjerenja na Biološkom odsjeku PMF-a.