

»52. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2022«

**Vpliv različnih analgetikov
(acetilsalicilna kislina, tramadol, paracetamol) na izbrane
mikroorganizme v črevesni mikrobioti**

Raziskovalno področje: Interdisciplinarno – Biologija/Zdravstvo

Raziskovalna naloga

Šola: II. gimnazija Maribor

Avtorji: Brina Homšak, Anja Paar

Mentorji: Vesna Hojnik, Barbara Janžič

Maribor, april 2022

POVZETEK

Cilj raziskovalne naloge je bil preučiti vpliv različnih analgetikov (Paracetamola, Tramadola in acetilsalicilne kisline) na izbrane mikroorganizme, ki so prisotni v naši črevesni mikrobioti: fakultativni anaerob - *Escherichia coli*, obligatni anaerob – *Bacteroides fragilis*, aeroba - *Pseudomonas aeruginosa* in *Enterococcus faecalis* ter kvasovka – *Candida albicans*.

Zdravila imajo lahko tudi stranske učinke, zato nas je zanimalo, kako analgetiki vplivajo na preučevane mikroorganizme, predvsem vpliv koncentracije ter vrste izbranih zdravil na njihovo rast. Ugotovili smo največji vpliv acetilsalicilne kisline, ki je v najvišji koncentraciji zavirala rast vseh mikroorganizmov, medtem ko je paracetamol zavrl rast le v najvišji koncentraciji pri kvasovki *Candida albicans*. Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* se je izkazala za najodpornejši mikroorganizem, saj je na njeno rast vplivala samo acetilsalicilna kislina v najvišji koncentraciji.

ABSTRACT

This research paper studies the effect of various analgesics (Paracetamol, Tramadol and acetylsalicylic acid) on selected microorganisms present in our intestinal microbiota: facultative anaerobe - *Escherichia coli*, obligate anaerobe - *Bacteroides fragilis*, aerobes – *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*, and yeast – *Candida albicans*. Since drugs exhibit side effects, we were interested in how analgesics affect the selected microorganisms, especially the effect of the concentration and the type of the drug on their growth. The acetylsalicylic acid was found to have the greatest effect, having inhibited the growth of all microorganisms as the highest concentration, while paracetamol inhibited growth only at the highest concentration for the yeast *Candida albicans*. The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* proved to be the most resistant microorganism, as its growth was affected only by acetylsalicylic acid at the highest concentration.

Kazalo Vsebin

POVZETEK	2
ABSTRACT	3
ZAHVALE	8
1 UVOD	9
1.1 IZHODIŠČA IN NAMEN DELA	10
1.2 RAZISKOVALNA VPRAŠANJA	10
1.3 HIPOTEZE	10
2 TEORETIČNO OZADJE	11
2.1 ČREVESNA MIKROBIOTA	11
2.2 SESTAVA ČREVESNE MIKROBIOTE	12
2.2.1 Metode za preučevanje sestave črevesne mikrobiote	13
2.2.2 Vpliv starosti na črevesno mikrobioto in njen razvoj	13
2.3 ANAEROBNI ORGANIZMI	15
2.3.1 Fakultativni anaerobi	15
2.3.2 Obligatni anaerobi	16
2.4 AEROBI	18
2.4.1 Enterokoki	18
2.5 KVASOVKE	21
2.5.1 <i>Candida albicans</i>	22
2.6 ANALGETIKI	23
2.6.1 Opioidni analgetiki	23
2.6.2 Neopiodni analgetiki	23
2.6.3 Nesteroidne protivnetne zdravilne učinkovine ali NSAID	24
2.6.4 Klinična uporaba	24
2.6.5 Acetilsalicilna kislina	25
2.6.6 Tramadol	25
2.6.7 Paracetamol	26
3 MATERIALI	27
3.1 DELOVNI MIKROORGANIZMI	27
3.2 ZAŠČITNA OPREMA	27
3.3 KEMIKALIJE IN ZDRAVILA	27
4 METODE	29
4.1 PRIPRAVA ZAČETNIH RAZTOPIN ANALGETIKOV	30
4.1.1 Priprava osnovnih raztopin	30
4.1.2 Priprava raztopin analgetikov za prvo stopnjo poskusa	31

4.1.3	<i>Priprava raztopin analgetikov v drugi stopnji poskusa</i>	33
4.2	PRIPRAVA MIKROORGANIZMOV	35
4.2.1	<i>Priprava bakterijske suspenzije</i>	35
4.2.2	<i>Priprava raztopin mikroorganizmov</i>	35
4.3	IZVEDBA POSKUSA – PREUČEVANJE VPLIVA ANALGETIKOV NA RAST BAKTERIJ	36
4.3.1	<i>Prva stopnja – preučevanje vpliva osnovnih koncentracij analgetikov</i>	36
4.3.2	<i>Druga stopnja poskusa</i>	40
	45
	45
5	REZULTATI	46
6	RAZPRAVA	48
7	DRUŽBENA ODGOVORNOST	52
8	ZAKLJUČEK	53
9	VIRI IN LITERATURA	54
10	PRILOGA	62

Kazalo Slik

SLIKA 1: RAST ESCHERICHIA COLI	46
SLIKA 2: RAST PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	46
SLIKA 3: RAST ENTEROCOCCUS FAECALIS	46
SLIKA 4: RAST BACTEROIDES FRAGILIS	46
SLIKA 5: RAST CANDIDA ALBICANS.....	46
SLIKA 6: RAST E. COLI V PRVI STOPNJI POSKUSA.	62
SLIKA 7: RAST E. COLI V DRUGI STOPNJI POSKUSA	63
SLIKA 8: RAST E. COLI V DRUGI STOPNJI POSKUSA Z RESAZURINOM.....	63
SLIKA 9: RAST BACTEROIDES FRAGILIS V PRVI STOPNJI POSKUSA	64
SLIKA 10: RAST BACTEROIDES FRAGILIS V PRVI STOPNJI POSKUSA	65
SLIKA 11: RAST ENTEROCOCCUS FAECALIS V PRVI STOPNJI POSKUSA	66
SLIKA 12: RAST ENTEROCOCCUS FAECALIS V DRUGI STOPNJI POSKUSA.	67
SLIKA 13: RAST ENTEROCOCCUS FAECALIS V DRUGI STOPNJI POSKUSA Z RESAZURINOM.	68
SLIKA 14: PONOVLJENA DRUGA STOPNJA POSKUSA ENTEROCOCCUS FAECALIS V ACETILSALICILNI KISLINI	68
SLIKA 15: PONOVLJENA DRUGA STOPNJA POSKUSA ENTEROCOCCUS FEACALIS V TRAMADOLU.....	68
SLIKA 16: PONOVLJENA DRUGA STOPNJO ENTEROCOCCUS FAECALIS V TRAMADOLU, Z DODANIM RESAZURINOM.	69
SLIKA 17: PONOVLJENA DRUGA STOPNJA POSKUSA ENTEROCOCCUS FAECALIS V PARACETAMOLU	69
SLIKA 18: PONOVLJENA DRUGA STOPNJO ENTEROCOCCUS FAECALIS V PARACETAMOLU, Z DODANIM RESAZURINOM.	69
SLIKA 19: RAST PSEUDOMONAS AEROUGINOSA V PRVI STOPNJI POSKUSA.....	70
SLIKA 20: RAST PSEUDOMONAS AEROUGINOSA V DRUGI STOPNJI POSKUSA.....	71
SLIKA 21: RAST PSEUDOMONAS AEROUGINOSA V DRUGI STOPNJI POSKUSA Z RESAZURINOM.	72
SLIKA 22: PONOVLJENA DRUGA STOPNJA PSEUDOMONAS AEROUGINOSA V TRAMADOLU	72
SLIKA 23: PONOVLJENA DRUGA STOPNJA PSEUDOMONAS AEROUGINOSA V TRAMADOLU, Z DODANIM RESAZURINOM.	72
SLIKA 24: RAST CANDIDA ALBICANS V PRVI STOPNJI POSKUSA	73
SLIKA 25: RAST CANDIDA ALBICANS V DRUGI STOPNJI POSKUSA	74

Kazalo Tabel

TABELA 1: PRIPRAVA RAZLIČNO KONCENTRIRANIH RAZTOPIN ACETILSALICILNA KISLINA V PRVI STOPNJI POSKUSA.....	32
TABELA 2: PRIPRAVA RAZLIČNO KONCENTRIRANIH RAZTOPIN PARACETAMOLA V PRVI STOPNJI POSKUSA	32
TABELA 3: PRIPRAVA RAZLIČNO KONCENTRIRANIH RAZTOPIN TRAMADOLA V PRVI STOPNJI POSKUSA	33
TABELA 4: TABELA PRIKAZUJE KONCENTRACIJE ACETILSALICILNE KISLINE V DRUGI STOPNJI POSKUSA.....	34
TABELA 5: RAZPOREDITEV GOJIŠČ V PRVI STOPNJI POSKUSA, PRVO TESTIRANJE	37
TABELA 6: RAZPOREDITEV GOJIŠČ ZA PRVO STOPNJO POSKUSA, DRUGO TESTIRANJE	38
TABELA 7: RAZPOREDITEV GOJIŠČ ZA PRVO STOPNJO POSKUSA, TRETJE TESTIRANJE	39
TABELA 8: RAZPOREDITEV GOJIŠČ V DRUGI STOPNJI POSKUSA, PRVO TESTIRANJE	41
TABELA 9: RAZPOREDITEV GOJIŠČ V DRUGI STOPNJI POSKUSA, DRUGO TESTIRANJE	42
TABELA 10: RAZPOREDITEV GOJIŠČ V DRUGI STOPNJI POSKUSA, TRETJE TESTIRANJE	43
TABELA 11: RAZPOREDITEV GOJIŠČ V DRUGI STOPNJI POSKUSA, ČETRTO TESTIRANJE	44
TABELA 12: PRIKAZ RASTI PRI DOLOČENIH KONCENTRACIJAH ANALGETIKOV; ACETILSALICILNA KISLINA, TRAMADOL, PARACETAMOL.	47

ZAHVALE

Zelo radi raziskujeva nove stvari in jih spoznavava, zato sva se odločili za raziskovalno nalogo. Ob tem sva spoznali in pričeli uporabljati nove tehnike ter metode preučevanja. Vendar sama radovednost ni dovolj. Potrebuješ nekoga, ki se na to področje spozna, da te lahko na poti usmerja, daje navodila ter te spodbuja k zastavljenemu cilju. Iskreno se zahvaljujema obema mentorjema za vso pomoč, namenjen čas in trud.

Zahvaljujema se tudi Nacionalnemu laboratorju za zdravje, okolje in hrano (NLZOH), kjer sva v njihovem laboratoriju in s pomočjo specialistk klinične mikrobiologije lahko prišli do rezultatov. Še posebej se želiva zahvaliti slednje navedenima, da ste z nama dolge ure preživeli v laboratoriju, nama pomagali pri delu in naprej delili vaše znanje na tem področju.

Nenazadnje se zahvaljujema tudi najinim družinskim članom, ki so naju podpirali in spodbujali že od začetka raziskovanja oziroma ko se je ideja šele razvijala.

Z Vašo pomočjo in spodbudo nama je le uspelo. Hvala.

1 UVOD

Črevesna mikrobiota velja za kompleksno združbo bakterij, arhej, gliv in praživali. Njen vpliv je pomemben za zdravje tkiva prebavnega trakta, prebavo, produkcijo hranil in vitaminov ter nudi kolonizacijsko odpornost proti patogenim vrstam bakterij.

Pomen slednjega je zaščita pred kolonizacijo zunanjih mikroorganizmov in zaviranje prekomerne rasti posameznih članov mikrobiote, ki so v prebavnem traktu normalno zastopani v manjšem deležu. Črevesna mikrobiota tudi pomembno vpliva na razvoj gostiteljevega imunskega sistema, telesno težo ter prav tako na vedenje posameznika (Jandhyala, 2015; Collen, 2016).

Dejavniki, ki so v sodobni družbi vedno pogostejši (stres, nezdrava prehrana in nezdrav način življenja, jemanje različnih zdravil ...) lahko v črevesni mikrobioti povzročijo spremembe. Tako neuravnotežena mikrobiota posledično vodi do slabšega delovanja številnih organov in dolgotrajno tudi v bolezni, zato je med drugim dobro poznati alternativne pristope za ponovno vzpostavitev ravnovesja v črevesni mikrobioti. (Laparra in Sanz, 2010)

Na črevesno mikrobioto najbolj vplivajo protimikrobna zdravila (antibiotiki in kemoterapevtiki), v določeni meri pa podobne učinke opazimo tudi po uporabi nesteroidnih protivnetnih zdravil (npr. ketoprofena, ibuprofena, naproksena) in zdravil, ki znižujejo kislost želodčne vsebine (zaviralci protonske črpalke). Določena zdravila pa imajo lahko tudi pozitiven ali prebiotičen vpliv. Primer je sintezni sladkor laktuloza, ki se uporablja za lajšanje zaprtja, poleg tega pa v črevesju spodbuja rast določenih koristnih bakterij.

1.1 Izhodišča in namen dela

Za raziskavo smo se odločili, ker smo želeli prispevati k razumevanju delovanja in obsega vpliva izbranih analgetikov na izbrane mikroorganizmi, ki so tudi sestavni del črevesne mikrobiote. Večje poznavanje tega področja bi lahko vodilo do boljšega razumevanja uporabnikov izbranih zdravil glede tega, kaj se ob zaužitju analgetikov dogaja z mikrobi in podobno.

1.2 Raziskovalna vprašanja

V nalogi nas je zanimalo, kateri analgetik bo povzročil najmanjšo rast uporabljenih predstavnikov mikrobiote (*Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* ter *Candida albicans*) in pri kateri koncentraciji zdravila. Prav tako nas je zanimalo, na rast katerega uporabljenega, že omenjenega predstavnika mikrobiote bodo analgetiki imeli najmanjši učinek.

1.3 Hipoteze

Pred začetkom dela za raziskovalno nalogo smo se skupaj odločili o nekakšnih zaključkih, ki smo jih tekom in ob koncu dela pričakovali.

H1: Pri najvišjih koncentracijah v prisotnosti kateregakoli analgetika ne bo prisotnih mikroorganizmov.

H2: Največji negativen vpliv na rast mikroorganizmov bo imel opioid tramadol.

H3: Najbolj odporna na analgetike bo bakterija *Pseudomonas aeruginosa*.

Rezultate smo želeli preveriti pri fakultativnih anaerobih, aerobih in kvasovkah (glive) s testiranjem zaviralnih učinkov teh snovi na mikroorganizme. Za potrditev živosti (viabilnosti) mikroorganizmov smo v gojišče dodali resazurin. Na žalost pa s tem nismo mogli preveriti prisotnost obligatnih anaerobov, saj ti za rast ne potrebujejo kisika, kar pomeni, da ne bi potekla nobena reakcija pri dodanem resazurinu.

2 TEORETIČNO OZADJE

2.1 Črevesna mikrobiota

Mikrobiota je pojem, ki se nanaša na celotno populacijo mikroorganizmov, naseljenih v določenem območju telesa. Poleg bakterij vključuje tudi druge mikrobove, kot so arheje, virusi, kvasovke, praživali (Jandhyala idr., 2015). Črevesna mikrobiota prebavil zajema vse mikroorganizme, ki naseljujejo prebavni trakt, večina pa se jih nahaja v debelem črevesju (Baothman idr., 2016). Sestavlja jo 100 bilijonov mikrobnih celic, kar za primerjavo predstavlja 10-kratno število vseh telesnih celic v celotnem organizmu (Qin idr., 2010).

Omenjeni avtorji glede na svojo raziskavo predvidevajo, da lahko črevesno mikrobioto naseljuje med 1000 in 1150 različnih vrst bakterij, medtem ko mikrobioto vsakega posameznika sestavlja vsaj 160 različnih bakterijskih vrst. Gostota in sestava mikrobnih združb se vzdolž prebavnega trakta močno razlikujeta, ker so okolja in pogoji za preživetje različni. Na primer v želodcu in tankem črevesju je število mikroorganizmov nizko, saj so razmere zanje dokaj neugodne (Stephens, Arhire in Covasa, 2018).

Črevesna mikrobiota ima v našem organizmu pomembno vlogo, zato je njeno delovanje predmet številnih raziskav. S svojim delovanjem gostitelju zagotavlja večjo mero metaboličnih zmognosti, ki drugače ne bi bile mogoče, s čimer ima velik vpliv na metabolizem gostitelja (Castanys-Muñoz idr., 2016). Mikrobi, ki so njen sestavni del, proizvajajo številne metabolite, katerim avtorji pripisujejo pomembno vlogo predvsem pri normalnem razvoju in rasti otrok. (Arrieta, Stiemsma, Amenyogbe, Brown in Finlay, 2014). Bakterije naj bi imele velik vpliv tudi na vedenje človeka ter ključno vlogo pri razvoju možganov v prvih letih življenja. Podrobnejše raziskave na tem področju še potekajo, saj so ugotovitve o povezavi med vedenjem in mikrobioto še relativno mlade (Collen, 2016).

Prav tako ima mikrobiota pomembno vlogo pri različnih fizioloških procesih v našem telesu, kot so prebava, absorpcija hranil in njihova presnova, sinteza vitaminov in aminokislin, metabolizem žolčnih kislin, uravnavanje imunskega sistema in drugo (Jandhyala idr., 2015). Kot pravijo Kim, Choi in Yim (2019), mikrobiota uravnava posameznikov metabolizem preko energijskega ravnotežja (vnos in poraba energije), vnetnega odgovora in funkcije črevesne

bariere. Uravnavanje teh faktorjev je tudi močno povezano z debelostjo. Njen učinek na telesno težo je domnevno veliko večji kot učinek naših genov. Bäckhed in sodelavci poročajo, da je količina kalorij, ki jo pridobimo iz hrane, odvisna od naših prehranjevalnih navad, saj se glede na njih spreminjajo tudi bakterije, ki poseljujejo naše črevesje. Človek, ki uživa zelo malo maščob, ima zelo malo mikrobov, specializiranih za metabolizem maščob, zato bakterije ob občasni mastni hrani ne bi pridobile toliko kalorij, kot pri človeku, ki se z maščobami prehranjuje vsakodnevno (Collen, 2016). Od prehrane je tako odvisna sama sestava mikrobiote, kjer so določene vrste bakterije bolj prilagojene za izkoriščanje specifičnih substratov.

2.2 Sestava črevesne mikrobiote

Črevesna mikrobiota je sestavljena iz velikega števila mikroorganizmov (približno 10^{12} bakterij na gram blata). Kljub temu, da ima vsak posameznik različno sestavo črevesne mikrobiote, je vsem skupno, da prevladujejo bakterije, ki spadajo v debla *Firmicutes* (firmikuti), *Bacteroidetes* (bakteroidete), *Actinobacteria*, *Proteobacteria* in *Verrucomicrobia*. Prav tako velja, da anaerobne bakterije v črevesni mikrobioti prevladujejo nad fakultativno anaerobnimi bakterijami (bakterije, ki lahko rastejo v prisotnosti ali odsotnosti kisika, kot so npr. enterobakterije in enterokoki) (Chakraborti, 2015; Cuevas-Sierra, Ramos-Lopez, Riezu-Boj, Milagro in Martinez, 2019; Buffie in Pamer, 2013; Žalig in Rupnik, 2014).

Vsak posameznik ima unikatno sestavo črevesne mikrobne skupnosti, saj je dokazano, da obstajajo znatne razlike v sestavi mikrobiote med zdravimi posamezniki, ki so še posebno vidne pri majhnih otrocih, kasneje pri odraslih pa je njena sestava med posamezniki bolj podobna (Qin idr., 2010). Sestava mikrobiote se sicer stalno spreminja zaradi vpliva raznih dejavnikov, kot so prehrana, bolezenska stanja, uživanje zdravil (predvsem antibiotikov), kajenje, stres (Baothman idr., 2016). Mikrobna raznolikost variira glede na fiziološko stanje posameznika, kar dokazuje spremenjena mikrobiota pri nosečnicah, pri debelosti, vnetni črevesni bolezni in aterosklerozi, kot navajajo Brahe idr. (2016).

S porušenjem mikrobne ravnovesja v črevesju se vse zgoraj naštetе karakteristike spremenijo, kar lahko vodi do raznih okužb in bolezni. Porušeno ravnovesje se lahko zgodi kot

posledica končane terapije z antibiotiki, nezdrave prehrane, jemanja močnih zdravil, stresnega in nezdravega načina življenja ali okužbe s patogeno bakterijo (Buffie in Pamer, 2013; Žalig in Rupnik, 2014).

2.2.1 Metode za preučevanje sestave črevesne mikrobiote

Za razumevanje vpliva mikrobov, ki naseljujejo črevesje, na človekovo zdravje, je potrebno poznati oziroma ugotoviti sestavo, raznolikost in delovanje mikrobne skupnosti (Qin idr., 2010). Za proučevanje črevesne mikrobiote posameznika je potreben vzorec blata, iz katerega izolirajo DNA (Jandhyala idr., 2015). Izolacija, identifikacija ter določanje števila mikroorganizmov je z običajnimi tehnikami zahteven in dolgotrajen proces. Omenjen vir navaja, da so pred odkritjem novih tehnik znanstveniki uspeli izolirati le 10-25 % celotne mikrobiote, vzrok za tako majhen odstotek pa je v tem, da so črevesni mikroorganizmi večinoma anaerobi, za katere takrat še niso poznali ustreznih gojitvenih tehnik. Leta 1969 je Robert Hungate natančno opisal tehniko gojenja anaerobnih bakterij, ki jo znanstveniki uporabljajo še danes. Tako so pred približno 50 leti z izboljšanimi anaerobnimi gojitvenimi tehnikami identificirali glavne rodove bakterij, ki so sestavni del mikrobiote; to so *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Veillonella*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus* in *Peptococcus* (Rajilič-Stojanovič in de Vos, 2014).

Z razvojem novejših tehnologij današnje raziskave mikrobiote sestavljata dve fazi. Prva faza je določanje genskega zaporedja bakterij, druga pa analiza vzorca s bioinformatiko (Jandhyala idr., 2015). Vir navaja, da analiza genskega zaporedja omogoča identifikacijo raznolikosti med bakterijami znotraj mikrobiote enega posameznika, raznolikost bakterij med mikrobiotami različnih posameznikov, relativno količino ter več drugih parametrov.

2.2.2 Vpliv starosti na črevesno mikrobioto in njen razvoj

K oblikovanju črevesne mikrobiote zdravega posameznika prispevajo številni dejavniki, ki se razlikujejo glede na starost posameznika (Jandhyala idr., 2015). To je dogajanje, katero se odvija skozi celotno življenje, saj se naseljevanje mikrobov v črevesju začne že ob rojstvu in se pod vplivom različnih zunanjih in notranjih dejavnikov stalno spreminja. Ravno zato že v prvih mesecih življenja pomembno vplivamo na razvoj črevesne mikrobiote, ki je v tem

obdobju odvisen predvsem od naslednjih naštetih dejavnikov: način poroda (vaginalni porod ali carski rez), dojenje ali hranjenje z mlečno formulo, uvajanje goste hrane in uživanje antibiotikov. Zgodnje otroštvo je torej izredno občutljivo obdobje, ko imajo lahko nenadne spremembe v sestavi mikrobiote dolgoročne posledice za zdravje.

Črevesna mikrobiota dojenčkov je manj kompleksna kot mikrobiota odraslega človeka (Jimenez idr., 2008; Fouhy in sod., 2012). Dojenčkovo črevo naseljujejo enterokoki, tem pa sledijo bifidobakterije, klostridiji, bakteriodete, streptokoki in enterobakterije. Razvija se do tretjega leta starosti, nakar postane podobna mikrobioti odraslega človeka (Palmer in sod., 2007). S staranjem človeka se spreminja tudi sestava črevesne mikrobiote. Pri starejših posameznikih se raznolikost črevesne mikrobiote ponovno zmanjša, opaženo je zmanjšanje deleža predstavnikov *Firmicutes* (vljučno z laktobacili) in bifidobakterij (aktinobakterije). Našteto poveča dovzetnost za razne bolezni. Ravno nasprotno pa se s starostjo zvišuje delež fakultativnih anaerobov, kot so streptokoki, enterokoki ter enterobakterije (Marx, 2015).

2.3 Anaerobni organizmi

Anaerobni organizmi živijo v anoksičnem okolju, kjer primanjkuje kisika. Čeprav večina živih bitij za preživetje potrebuje kisik (so aerobna), je lahko kisik za omenjene tudi strupen. Velika večina organizmov v procesu aerobnega celičnega dihanja proizvaja ATP (adenozin trifosfat). Ta zapleten sklop kemičnih interakcij poteka v citoplazmi in celični membrani prokariotov ter v mitohondrijih evkariotov. Anaerobni organizmi za proizvodnjo ATP uporabljajo fermentacijo ali anaerobno celično dihanje, v katerem končni prejemnik elektronov ni kisik (2017, spletni vir - 1) Poznamo dva tipa anaerobov – to so fakultativni in obligatni anaerobi.

Anaerobne bakterije so prisotne na sluzničnih površinah in koži kot del normalne mikrobiote. Predele pod sluznicami lahko okužijo ob prekinitvi sluznične bariere, do katere pride npr. z operacijo, travmo ali drugimi bolezenskimi stanji. Odmiranje tkiva in slaba prekrvavljenost zmanjšata oksidacijsko-redukcijski potencial in s tem olajšata rast anaerobnim bakterijam. Mraz, šok, travma, operacije in produkcija plinov drugih bakterij pa na podoben način vodijo do anaerobnih okužb (Finegold in sod., 1992). Le redko se pojavijo anaerobne okužbe zaradi zunanjega vira, vendar v primeru, da se to zgodi, so najpogostejši povzročitelji predstavniki rodu *Clostridium* (Nagy, 2010).

Najpogostejše anaerobne bakterije v debelem črevesju so predstavniki skupin *Bacteroides*, *Fragilis*, *Bilophia wadsworthia*, vsi tipi anaerobnih kokov, predstavniki rodu *Clostridium*, *Eubacterium* in *Bifidobacterium*, tudi predstavniki rodov *Prevotella*, *Porphyromonas* in *Fusobacterium*. (Finegold in sod., 1992; Finegold in Jousimies-Somer, 1997)

2.3.1 Fakultativni anaerobi

Fakultativni anaerobi so organizmi, ki lahko preživijo v prisotnosti bodisi v odsotnosti kisika. S kisikom preživijo z njegovo porabo v procesu aerobnega celičnega dihanja, brez njega pa preko fermentacije ali anaerobne respiracije. S tem poimenovanje je včasih omenjena tudi večina evkariotov obligatnih aerobov, ki za preživetje potrebujejo kisik, saj med njimi ni velikih razlik.

2.3.1.1 *Escherichia coli*

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je ena izmed najbolj raziskanih mikroorganizmov, nasplošno ena najbolj proučenih modelnih organizmov (Riley in sod., 2006). Je gibljiva paličasta bakterija, ki v premeru meri 1,1 do 1,5 μm x 2,0 do 6,0 μm , in je predstavnik normalne črevesne mikrobiote vseh toplokrvnih živali, vključno s človekom ter nekaterimi plazilci. Le del poznanih sevov *E. coli* je patogenih, ostali se nahajajo v mikrobioti, kjer predstavljajo večinski del med fakultativnimi anaerobi. *E. coli* v črevesju proizvaja vitamine, med drugim vitamin K ter s porabljanjem kisika vzdržuje pogoje, ugodne za rast anaerobnih mikroorganizmov (Madigan in sod., 2012; Leimbach in sod., 2013; Conway in Cohen, 2015).

Je fakultativen anaerob in kemoorganotrof, ki optimalno raste pri 37 °C. Leta 1885 je bakterijsko vrsto odkril nemški bakteriolog Theodor Escherich. Takrat jo je poimenoval *Bacillus coli commune*. Kasneje so jo na čast odkritelju rod *Bacterium* preimenovali v rod *Escherichia*. Omenjen rod uvrščamo v družino *Enterobacteriaceae* (Žgur- Bertok in Starčič Erjavec, 2009, str. 11).

Poleg komenzalnih sevov, ki so del črevesne mikrobiote, kot že omenjeno poznamo tudi patogene seve, ki povzročajo okužbe črevesja, sečil in zunajčrevesne okužbe. Pri tem imajo pomembno vlogo virulentni dejavniki, kateri bakterijam omogočajo prodor v novo okolje v gostitelju in izmikanje imunskemu sistemu (Johnson, 1991). Patogeni sevi *E. Coli* s zapis za virulentne dejavnike in se v bakteriji tudi izražajo, so zmožni premagati gostiteljevo obrambo ter rasti v novem okolju. Uvrščamo jih v več skupin glede na mehanizem povzročenih okužb in simptomov. (Kaper in sod., 2004).

2.3.2 Obligatni anaerobi

Obligatni anaerobi so organizmi, ki lahko živijo le v okoljih brez kisika zaradi nezaželjenega, tudi škodljivega učinka, ki ga kisik v njihovi bližini povzroči. To so običajno bakterije in živijo na različnih naravnih habitatih. Veliko obligatnih anaerobov živi v v tleh, stran od zgornjih plasti, izpostavljenim kisiku. Številni obligatni anaerobi živijo na mestih človeškega telesa z zelo nizko ravnjo kisika, kot so usta in prebavila.

Včasih se te bakterije pomotoma znajdejo tam, kjer ne bi smele biti in posledično povzročijo resne okužbe. Do hudih okužb lahko pride, ko te bakterije preidejo v notranja območja telesa. To se običajno zgodi, ko je organizem poškodovan, kar bakterijam omogoči dostop do običajno zaprtih območij. Če je rana hitro in sterilno zaprta, bakterije ob prisotnosti kisika v krvi, ki pride v rano, odmrejo. Med obligatne anaerobe spadajo tudi bakterije, ki lahko povzročajo resne zdravstvene težave.

2.3.2.1 *Bacteroides fragilis*

Vrste *Bacteroides* so pomembni klinični patogeni in so prisotne pri večini anaerobnih okužb, s katerimi je povezana približno 19-odstotna smrtnost. (Wexler, 2007) *Bacteroides fragilis* je obligatni anaerobni Gram-negativni bacil. Človeško debelo črevo ima največjo populacijo bakterij v telesu in največji del teh organizmov so anaerobi, med katerimi je približno 25 % vrst *Bacteroides* (Salyers, 1984). *Bacteroides fragilis* je del normalne mikrobiote človeškega debelega črevesja.

Ljudje se z bakterijo *Bacteroides fragilis* verjetno okužijo ob rojstvu. V prvih mesecih življenja se bakterijska mikrobiota močno spremeni, od enega leta starosti pa se črevesna mikrobiota že preobrazi v profil odrasle mikrobiote (Endo, Pärtty, Kalliomäki, Isolauri, Salminen, 2014).

Vnetja, poškodbe ali kirurški posegi lahko povzročijo prekinitve sluznice in širjenja *Bacteroides fragilis* v krvni obtok ali okoliška tkiva, česar posledica je okužba za klinično obravnavo. Okužba s tem anaerobom je eden od pogostih povzročiteljev intraabdominalne okužbe. Prekinitve tkivnih pregrad in širjenje črevesne flore v sosednja tkiva povzroči polimikrobno okužbo. Zato velja za redko samostojen organizem okužbe in je običajno del drugih anaerobnih organizmov in *Enterobacteriaceae*. (Elsaghir & Reddivari, 2021).

2.4 Aerobi

Spadajo v razred mikroorganizmov, ki lahko živijo in se razmnožuje le v prisotnosti prostega kisika. Aerobne bakterije so ključnega pomena za biološko razgradnjo, saj prisotnost kisika pospešuje razgradnjo ogljikovodikov. Slednje omenjeno lahko zasledimo v naravi, kjer anaerobi razgrajujejo listje ter druge organske ostanke, zato je imenovana aerobni proces (spletni vir – 2).

Večina bakterij, ki naseljujejo človeško črevesje, je anaerobnih in so od 100 do 1000-krat številčnejše od aerobnih (Finegold, 1995). Anaerobne bakterije se razlikujejo po občutljivosti na kisik in v njegovi prisotnosti pogosto ne morejo preživeti ali pa reagirajo negativno. Sposobnost aerobnega dihanja pozitivno in koristno vpliva na aerobni organizem, saj prejme več energije kot organizem z anaerobnim dihanjem. Nedavna študija je natančno izmerila spreminjanje ravni kisika v črevesju in pokazala, da ta ostaja pod 1 mmHg. (Albenberg in idr., 2014)

2.4.1 Enterokoki

Enterokoki so grampozitivni koki. Omenjeni ubikvitarni oz. vseprisotni mikroorganizmi se pojavljajo v zelo različnih habitatih, kot so tla, celinske vode in oceani, odplake, na rastlinah, v hrani (sir, mleko, meso), v prebavilih ljudi in živali (perutnina, ovce, prašiči, krave). So del normalne človeške mikrobiote in pri zdravih ljudeh običajno ne povzročajo težav. Bakterija *Enterococcus faecalis* se v blatu ljudi pojavlja pogosteje kot *Enterococcus faecium*. Mikroorganizmi, ki so del navedenega rodu dobro tolerirajo visoke vrednosti pH in soli (do 6,5 % NaCl v gojišču) (Braïek in Smaoui, 2019);(Franz, Huch, Abriouel, Holzapfel in Gálvez, 2011).

Enterokoki rastejo med 10 °C in 45 °C, preživijo pa tudi pri 60 °C. Prisotni so v veliko različnih okoljih in sicer v svežih in morskih vodah, sedimentih, tleh, v vodnih kot tudi zemeljskih rastlinah ter v mnogih produktih, vključno z mlečnimi izdelki in fermentiranimi živili. (Mundy idr., 2000). V nasprotju z drugimi mlečnokislinskimi bakterijami niso dosegli statusa »splošno priznane kot varne« (GRAS). *E. faecalis* in *E. faecium* predstavljata problem zaradi virulenčnih dejavnikov in zaradi odpornosti proti antibiotikom med kliničnimi sevi (Lepage in sod., 2006).

Enterococcus faecalis in *Enterococcus faecium* spadata med najpogostejše povzročitelje bolnišničnih okužb pri ljudeh (oportunistična patogena) in povzročata endokarditis, bakteriemijo, urinarne in gastrointestinalne okužbe, okužbe centralnega živčnega sistema in druge. Okoli 80 % teh okužb je povezanih z *E. faecalis*. (Braňek in Smaoui, 2019);(Franz idr., 2011).

Ker se izločajo s človeškim in živalskim blatom, jih je mogoče zlahka gojiti in ker napovedujejo tveganje za zdravje ljudi zaradi izpostavljenosti onesnaženim vodam, se uporabljajo kot nadomestilo za patogene, ki se prenašajo z vodo in kot fekalne indikatorske bakterije (FIB) v raziskavah ter pri testiranju kakovosti vode po vsem svetu. (Byappanahalli, Nevers, Korajkic idr., 2012).

2.4.1.1 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis je v naravi vseprisoten in je bil izoliran iz številnih različnih habitatov. Prebavila ljudi in živali so običajno označena kot primarni habitat *E. faecalis*, kjer se pojavlja kot komenzal (Gilmore, Clever, Ike & Shankar, 2014). Poleg tega so glavni vir *E. faecalis* tudi vzorci krvi in urina ljudi ter živali. Je vrsta mlečnokislinskih bakterij, ki se pogosto uporablja v proizvodnji fermentiranih živil, zlasti fermentiranih mlečnih izdelkih (Chen, Song, Xu in drugi, 2015).

Je Gram-pozitivna bakterija, ki lahko povzroči različne okužbe, med katerimi so najpogostejše okužbe sečil, lahko pa povzroči tudi endokarditis, bakteriemijo in okužbe ran. Zdravljenje okužb z *E. faecalis* je posebej težavno zaradi njihove pogoste odpornosti na številne antibiotike, vključno z vankomicinom, ki je zadnje zdravilo pri ostalih Gram-pozitivnih okužbah (Huycke, Sahm, Gilmore, 1998).

2.4.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je oportunistični patogen in modelna bakterija za preučevanje virulence ter socialnih lastnosti bakterij. V majhnem številu ga je mogoče izolirati iz najrazličnejših okolij, vključno z zemljo in vodo. Z lahkoto ga najdemo v skoraj vsakem okolju, ki je pod vplivom ljudi ali živali (Diggle & Whiteley, 2019).

Je heterotrofna, gibljiva, Gram-negativna paličasta bakterija, dolga približno 1-5 μm in široka 0,5-1,0 μm . Sodi v skupino fakultativnih aerobov, ki raste z aerobno in anaerobno respiracijo z nitratom kot končnim prejemnikom elektronov. Organizem lahko kot vir ogljika in/ali energije uporabi več kot 100 organskih molekul in kot prototrof¹ lahko na splošno raste na gojišču z minimalno količino soli z enim samim virom ogljika in energije. Dobro raste pri 37 °C, vendar lahko preživi od 4 °C do 42 °C. (Stover in sod., 2000)

Pseudomonas aeruginosa je presnovno vsestranska bakterija, ki lahko pri bolnikih z resnimi osnovnimi bolezenskimi stanji povzroči številne hude oportunistične okužbe. Je eden glavnih povzročiteljev okužb in smrti pri ljudeh z imunosupresivnimi in kroničnimi boleznimi, okužbe pri teh bolnikih pa je težko zdraviti zaradi številnih mehanizmov odpornosti na antibiotike in nagnjenosti organizma k oblikovanju večceličnih biofilmov² (Diggle & Whiteley, 2019).

¹ **Prototrof** je organizem ali celica, ki je sposobna proizvesti aminokislino, potrebne za svoje vitalne procese.

² **Biofilmi** so skupek ene ali več vrst mikroorganizmov, ki lahko rastejo na različnih površinah.

2.5 Kvasovke

Glive so evkariontski organizmi, ki živijo kot zajedavke. So heterotrofne, kar pomeni, da se hranijo z mrtvo organsko snovjo. Glive lahko človeku tudi koristijo, saj so nekatere cenjena hrana, ob pomoči drugih pa pridobivamo hrano in zdravila (Dragaš, 2004).

Poznamo različne pojavne oblike gliv. Večina je nitastih (plesni), ki rastejo v obliki tankih, razvejanih nitk (hife), ki se podaljšujejo na konici. Hifne nitke se med seboj prepletajo v micelij. Miceliji lahko rastejo prosto ali pa se združujejo v tako imenovana psevdotkiva, v katera uvrščamo tudi pojavno obliko gliv, imenovano plodišče ali goba. Druga skrajnost je enocelična pojavna oblika gliv, imenovana kvasovka (Zalar, Jančič & Gaude Cimerman, 2012).

So prvi mikroorganizem, ki jih je človeštvo uporabljalo v pridelavi hrane. Kvasovke uvrščamo med enocelične evkariontske organizme, večino teh pa v skupino *Ascomycetes*. Po obliki so kroglaste, ovalne ali cilindrične, njihova velikost je od 5 do 10 μm , ali tudi več. So heterotrofi, saj za rast potrebujejo organske spojine. Razmnoževanje poteka z nespolno delitvijo celice in brstenjem ali spolno. Najbolje preučene so kvasovke iz rodu *Saccharomyces*, ki se uporabljajo pri peki kruha in proizvodnji alkoholnih pijač (vina in piva) (Žgur-Bertok in Starčič Erjavec, 2009, str. 20).

Tako kot višji evkarionti imajo podobno osnovno zgradbo celic s prisotnim jedrom, mitohondriji, endoplazmatskim retikulum, Golgijevim aparatom, sektornimi vezikli, vakuolami in mikrotelesi. Kvasovke kot gostiteljski sistem so primerne za izražanje genov različnega izvora (humani, živalski, rastlinski ali virusni geni). Izražanje tujih genov vključuje več korakov:

1. Vključitev tujega kodirajočega zaporedja DNA v primerno ekspresijsko kaseto oz. vektor, ki vsebuje kvasni promotor in terminator.
2. Transformacija (vnos) vektorja v ustrezen gostiteljski sev in njegovo stabilno vzdrževanje v celicah.
3. Sinteza proteina pri točno določenih pogojih gojenja.
4. Izolacija ter čiščenje tarčnega proteina (Novak štagoj Mateja ter Podobnik Marjetka, 2006).

2.5.1 *Candida albicans*

V rodu *Candida*, ki je sicer najbolj znan glede patogenosti, uvrščamo tako patogene kot tudi neškodljive kvasovke. Z vidika zdravja so pomembne *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* in *Candida parapsilosis*. Težave pri iskanju zdravil proti glivi *Candida* povzročajo podobnost med človeškimi celicami in celicami glive *Candida* (oboje so evkariontske), saj je težje poiskati zdravila, ki bodo selektivno ubijala samo celice glive *Candida*. (Nesterenko, 2010).

Candida albicans je eden od številnih saprofitov na sluznicah človeka. Najdemo jo v ustih, v dihalih, prebavilih. Druge vrste kandid, ki so manj patogene, lahko najdemo tudi na zunanji površini telesa. Na koži so precej razširjene, ne da bi povzročale kake bolezenske procese. Izven telesa jih najdemo v mlečnih izdelkih in na sadju (Stropnik, 1958); (Vesel, 2008).

Candida albicans je diploidna gliva kvasovka, ki živi v mikrobioti prebavnega trakta približno 70 % svetovnega prebivalstva. V normalnih razmerah svojemu gostitelju ne povzročajo nikakršnih zdravstvenih problemov (Vesel, 2008). Je tudi eden najpogostejših glivnih oportunističnih patogenov pri ljudeh, saj lahko povzročajo lokalne, sistematske in površinske okužbe sluznice (zlasti okužbe ustne votline, prebavil, dihal in spolovil) pri imunsko oslabljenih posameznikih, kot so bolniki z levkemijo, diabetesom ali tudi z AIDS-om (Kovačević, Podunavac Kuzmanović in Jevrić, 2013).

Celice glive so okrogle ali ovalne oblike, s premerom 3 – 9 μm . Razmnožuje se vegetativno z brstenjem, brsti se podaljšujejo v podaljške (pseudohife), ki se na koncu razcepijo v samostojne celice (blastociste). Prisotnost pseudohif ali blastospor je pogosto povezana z nastankom okužbe.

2.6 Analgetiki

Analgetiki so široko uporabljena zdravila, nekateri neopioidni analgetiki so prav tako dostopni brez recepta. Acetilsalicilno kislino (Aspirin) in paracetamol najdemo praktično v vsaki domači lekarni, zato so relativno pogost vzrok namernih zastrupitev pri odraslih in nenamernih zastrupitev pri otrocih (Šarc & Jamšek, 2009). Najpogosteje se uporabljajo za zdravljenje in lajšanje bolečin. Primerne analgetike izberemo glede na vrsto in jakost bolečine. Na samo izbiro vplivajo tudi farmakokinetične lastnosti analgetika in njegova farmacevtska oblika. Glavni skupini analgetikov sta opioidni (narkotični) in neopioidni (nenarkotični) analgetiki (Kerec Kos, 2012).

2.6.1 Opioidni analgetiki

Opioidne analgetike delimo na šibke opioide (tramadol in dihidrikodein) ter močne opioide (morfin, hidromorfon, oksikodon, metadon). Opioidni analgetiki preprečijo nastanek občutka bolečine z vezavo na različne opioidne receptorje v osrednjem živčnem sistemu (možganih in hrbtenjači) in na perifernih živcih po telesu (Kerec Kos, 2012). Dokaj pogoste so tudi zastrupitve z opioidnimi analgetiki. Obravnava zastrupitev z opiodi je podobna obravnavi zastrupitve s heroinom, kokainom, amfetamini, kanabisom, gamahidroksi-butiratom in dietilamidom lizergične kisline (Šarc & Jamšek, 2009).

2.6.2 Neopioidni analgetiki

V skupino neopioidnih analgetikov spadajo paracetamol, metamizol, nesteroidna protivnetna in protirevmatična zdravila. Prednost uporabe omenjene skupine zdravil je v tem, da ne povzročajo odvisnosti, vendar je pri uživanju analgetikov vseeno potrebno upoštevati priporočeni odmerek, saj lahko povečano zaužitje od priporočljivega vodi do neželenih učinkov (Kerec Kos, 2012).

2.6.3 Nesteroidne protivnetne zdravilne učinkovine ali NSAID

Nesteroidne protivnetne zdravilne učinkovine delujejo pri odpravljanju bolečine, vročine in vnetja. Z zaviranjem delovanja encimov ciklooksigenaze³ v telesu zmanjšajo nastajanje prostaglandinov⁴ (Kerec Kos, 2012). Ob uporabi zdravil, ki zavirajo nastajanje prostaglandinov, se slabijo povezave in prenos informacij do možganov, posledično se tudi zmanjšuje občutek za bolečino (Kočevar in Gartner, 2006). Vsem predstavnikom NSAID je skupno, da so šibke organske kisline. Večina se jih absorbira iz prebavnega trakta. Izločajo se skozi ledvice, deloma pa tudi z žolcem (Mimica Matanović, 2014).

Dobre lastnosti nesteroidnih protivnetnih zdravil so nizka cena, dolgotrajna zgodovina varne uporabnosti (npr. Aspirin), nizka toksičnost (derivati propionske kisline) in dolga razpolovna doba. Nesteroidna protivnetna zdravila so relativno varni analgetiki, ki so zaradi možne intravenske uporabe primerni za uporabo pri urgentnih stanjih, vendar so tveganja oz. slabe lastnosti njihovega delovanja pa povezane s težavami zgornjega prebavnega trakta, krvavitve in razjede, povečana možnost možganske ali srčne kapi, vpliv na oz. zaviranje celjenja kosti (zlasti pri kadicah) (Herman, 2014).

2.6.4 Klinična uporaba

V Sloveniji ni kombinacij med NSAID in opioidnimi analgetiki, vendar pa obstajajo kombinacije z drugimi analgetiki ali protivnetnimi zdravili (kombinacije s paracetamolom), predvsem za zdravljenje prehlada (kombinacija zdravil z vitaminom C in kofeinom) ter za preprečevanje trombotičnih zapletov, za kar se uporablja kombinacija z dipiridamolom.

Pomembno je poudariti, da ni smiselno kombinirati različnih vrst NSAID med sabo, saj se kompetitivno inhibirajo, prav tako z višjimi odmerki ne dosežemo povečanega analgetičnega učinka, povečamo pa možnosti nezaželenih stranskih učinkov (Herman, 2014).

³ **Ciklooksigenaza** je encim, ki katalizira oksidacijo in ciklizacijo arahidonske kisline.

⁴ **Prostaglandini** so hormoni, nastali iz arahidonske kisline, nenasičene maščobne kisline z 20 ogljikovimi atomi, ki imajo različne fiziološke učinke, npr. mediatorji vnetja.

2.6.5 Acetilsalicilna kislina

Acetilsalicilna kislina, poznana tudi pod imenom Aspirin, se že več kot sto let uporablja za odpravljanje bolečin ter zniževanje povišane telesne temperature. Zavira tudi vnetje in sicer tako, da preprečuje nastajanje posebnih snovi, prostaglandinov, ki prispevajo k otekanju. Acetilsalicilna kislina uspešno preprečuje glavobol, zobobol, blage revmatične bolečine, boleče grlo. Uporabljamo jo tudi pri preprečevanju nenormalnega strjevanja krvi. Zato se uživanje te učinkovine odsvetuje ljudem, ki se jim kri ne strjuje normalno (Stropnik, 2010).

Zdravilo se uporablja v odmerku 100-300 mg proti agregaciji trombocitov. Stranski učinki acetilsalicilne kisline se lahko kažejo v poslabšanem astmatičnem stanju ali pa sproženem napadu astme. Prav tako vpliva na izločanje sečne kisline ter povečano izločanje inzulina.

Aspirin ni primerno zdravilo za lajšanje bolečin in vročine pri otrocih, mlajših od 12 let, saj je lahko povzročitelj Reyevega sindroma. Ta se pojavi ob okužbi z noricami ali virusni okužbi dihal in sočasnem jemanju acetilsalicilne kisline. Povzroči lahko odpoved jeter, komo in tudi smrt zaradi možganskega edema (Pavšar, Pustoslemšek in Hohler, 2016).

2.6.6 Tramadol

Tramadol je uvrščen v skupino šibkih centralno delujočih opioidnih analgetikov. Deluje protibolečinsko z zaviranjem prenosa bolečine in z zaviranjem občutenja bolečine. Poznamo tri mehanizme analgetičnega učinka tramadola in njegovih metabolitov. Na sinapsi se tramadol veže na μ -opioidni receptorin, tako prepreči prehod bolečinskega dražljaja v možgane.

Tramadol se hitro razporedi po telesu, največ se ga razporedi v pljuča, vranico, jetra, ledvice in možgane. Ker prehaja tudi v placento in majhen delež preide v materino mleko, se ga med nosečnostjo in dojenjem ne sme uporabljati.

Uporablja se za zdravljenje srednje močne in močne bolečine, ko nesteroidni antirevmatiki in paracetamol niso dovolj učinkoviti. Predvsem se uporablja pri akutni bolečini (postoperacijska bolečina, travmatska bolečina, abdominalna bolečina, porodna bolečina, pediatrična bolečina) in pri kronični bolečini (bolečina pri bolnikih z rakom, nevropatska bolečina, osteoartritis). Pogosti neželeni učinki tramadola so slabost, omotica, vrtoglavica, zaspanost, utrujenost, potenje, bruhanje, glavobol in suha usta (Jančar, 2009).

2.6.7 Paracetamol

Paracetamol je najbolj prodajano in uporabljeno zdravilo v prosti prodaji. Uvrščamo ga med blage analgetike ter antipiretike. Pogosto ga uporabljamo za blaženje glavobol in drugih manjših bolečin, za znižanje povišane telesne temperature, je tudi pogosto uporabljena sestavina kombiniranih zdravil za lajšanje simptomov pri prehladu in gripi. V kombinaciji z opioidnimi analgetiki pozitivno deluje proti bolečinam pri bolnikih z rakom.

Paracetamol ne sodi v skupino NSAID zaradi minimalnega protivnetnega učinka. Stranski učinki so vezani predvsem na prekomerno zaužitje. Akutna zastrupitev lahko povzroči smrtonosno okvaro jeter. Tveganje za jetrno okvaro se še poveča ob sočasnem zaužitju alkohola. Je lahko tudi vzrok usodnim kožnim reakcijam in bolezenskim stanjem kot na primer toksični epidermalni nekrolizi.

Predoziranje z navedenim analgetikom se sprva kaže z zelo nespecifičnimi znaki, ki se pojavijo šele nekaj ur po zaužitju. Pojavijo se slabost, potenje in bolečine kot posledica jetrne odpovedi (Hajdinja, 2014).

3 MATERIALI

3.1 Delovni mikroorganizmi

- sev bakterije *Escherichia coli* (25922)
- sev bakterije *Bacteroides fragilis* (25285)
- sev bakterije *Enterococcus faecalis* (29212)
- sev bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (27853)
- kvasovka *Candida albicans* (90028)

3.2 Zaščitna oprema

- zaščitne rokavice za enkratno uporabo
- zaščitna halja

3.3 Kemikalije in zdravila

- destilirana voda
- rezaurin (UV indikatorsko barvilo)
- Acetilsalicilna kislina oz. Acetilsalicilna kislina (Sanofi aventis)
- Tramadol (KRKA d.d. Novo Mesto)
- Paracetamol (Fagron d.o.o)

3.4 Laboratorijski pripomočki

- Kalibrirane pipete različnih velikosti: 10-100 μ l, 100-1000 μ l
- Plastični nastavki za pipete različnih velikosti: 200 μ l, 1000 μ l
- Sterilne mikrotiterske ploščice s 96 vdolbinicami
- Stresalnik (vorteks mešalo)
- Inkubator
- Nefelometer
- Sterilne epruvete s sterilno fiziološko raztopino
- Steklene, sterilne epruvete z navojem

- Stojalo za epruvete
- Sterilne pincete

4 METODE

Naš cilj raziskovalne naloge je ugotoviti kakšen vpliv imajo izbrani analgetiki na rast in življenje proučevanih mikroorganizmov, ki se nahajajo v človeški črevesni flori. V ta namen smo izdelali protokol raziskave, ki je vseboval več faz:

1. pripravo osnovnih raztopin analgetikov v koncentracijah, ki so primerne za zdravljenje,
2. pripravo različnih koncentracij raztopin proučevanih analgetikov:
 - z redčenjem osnovne raztopine analgetika z ustreznimi gojišči za bakterije, za namen testiranja vpliva analgetikov na bakterije v prvi stopnji
 - z uporabo mikrotitrne plošče in mikrodilucije raztopin analgetikov po protokolu prenašanja raztopin v vdolbinice z gojišči v drugi stopnji poskusa
3. pripravo izbranih mikroorganizmov (suspenzije in raztopin) za namen proučevanja
4. testiranje-spremljanje rasti bakterij pri različnih koncentracijah analgetikov in določitev kritične koncentracije, pri kateri je ta rast ustavljena s pomočjo uporabe rezorcinola (prva stopnja in druga stopnja poskusa).

V prvi stopnji poskusa smo izvedli testiranje vpliva analgetikov na preživetje mikroorganizmov v različnih osnovnih koncentracijah in v grobem določili pri vseh mikroorganizmih za vsak analgetik dve pomembni koncentraciji; pri kateri je v osnovnih razredčitvah prišlo do ustavitve rasti bakterij in koncentracijo, kjer je bila rast še ohranjena. Ti rezultati (obe koncentraciji) so v **drugi stopnji poskusa** služili za pripravo natančnejših redčitev znotraj razpona obeh koncentracij in za natančnejšo opredelitev kritične koncentracije, pri kateri je bila rast posameznih bakterij pod vplivom posameznih analgetikov zavrta.

4.1 Priprava začetnih raztopin analgetikov

4.1.1 Priprava osnovnih raztopin

Pripraviti smo morali osnovne raztopine z začetnimi koncentracijami za tri različne analgetike; aspirin, paracetamol in tramadol.

Aspirin se je nahajal v pripravku z embalažo, sestavljeno iz stekleničke, v kateri je bil aspirin v obliki prahu in steklene vijale s tekočino za injekcije, v kateri smo raztopili aspirin. Tako smo pripravili osnovno raztopino s točno koncentracijo 100 mg/mL .

Pri pripravi smo poskrbeli za primerno zaščito, si nadeli plašč ter rokavice, in s pomočjo razkužene pincete odprli pokrovček stekleničke, ki vsebuje aspirin v prahu. Nato smo z roko zlomili vrhnji del vijale in tako dobili dostop do tekočine, ki nam je naredila željeno raztopino. Iz ampule smo s pomočjo brizgalke, na kateri je bila igla, tekočino iztisnili skozi membrano k aspirinu. Stekleničko smo stresli in s tem premešali tekočino, da smo dobili čisto raztopino aspirina z našo željeno koncentracijo.

Tramadol se je nahajal že v obliki raztopine s koncentracijo $100\text{ mg}/2\text{mL}$ v stekleni vijali, ki smo jo morali za uporabo samo odpreti.

Paracetamol smo dobili v trdnem agregatnem stanju v obliki praška, ki smo ga raztopili v sterilni destilirani vodi in pripravili raztopino s koncentracijo 100 mg/mL .

Pred začetkom dela smo se v lekarni pozanimali, kakšna je njegova topnost v vodi. Za pripravo te raztopine smo tako stekali 1 g paracetamola ter ga prenesli v sterilno posodico, kjer smo pripravili raztopino. V ločeni epruveti smo s pomočjo merilnih pipet izmerili 10 mL sterilne vode za injekcijo, ki smo ji dodali 1 g paracetamola. Ob mešanju smo dobili motno raztopino, ki smo jo s pomočjo brizgalke z nameščenim mikrofiltrirali do bistre raztopine. Tako smo pripravili našo začetno koncentracijo paracetamola.

4.1.2 Priprava raztopin analgetikov za prvo stopnjo poskusa

Za prvo stopnjo poskusa je bilo potrebno pripraviti raztopine različnih koncentracij (redčitev osnovnih raztopin) analgetikov z gojiščem za razrast bakterij (bujonom). Tem smo v prvi fazi poskusa v mikrotitrnih ploščah dodajali bakterije, za prvo opazovanje, pri katerih koncentracijah dodanih analgetikov je prišlo do preprečevanja rasti proučevanih mikroorganizmov.

V ta namen smo z 10x redčitvami pripravili štiri različne koncentracije. Na ta način smo dobili velik razpon od najnižje in najvišje koncentracije. Koncentracije smo izračunali s pomočjo enačbe:

$$\begin{aligned}n_1 &= n_2 \\c_1 \times V_1 &= c_2 \times V_2 \\c_2 &= \frac{c_1 \times V_1}{V_2}\end{aligned}$$

n = množina snovi; *c* = koncentracija snovi; *V* = volumen snovi

Pri vseh analgetikih smo za razliko od postopka priprave osnovnih raztopin (z začetnimi koncentracijami), zdaj uporabili enak postopek. Za pripravo vseh raztopin (redčitev osnovnih raztopin) smo namesto vode uporabili gojišče za bakterije (bujon), ki nam je v prvi fazi poskusa omogočilo, da so mikroorganizmi sploh lahko rastle. Ob tem smo pri izračunu dobljenih koncentracij upoštevali nastale redčitve zaradi dodatka bujona.

V stojalo smo si za vsak analgetik pripravili po 5 sterilnih manjših (2 ml) ependorfk. Te smo označili s črkami A, 1A, 2A, 3A, 4A in 5A (na primeru Acetilsalicilna kislina) in pripravili raztopine, kot to prikazuje Tabela 1. Podobno smo storili za paracetamol (Tabela 2) in Tramadol (Tabela 3).

Tabela 1: Priprava različno koncentriranih raztopin Acetilsalicilna kislina v prvi stopnji poskusa. *Za poskuse s fakultativnimi anaerobi, aerobi in kvasovkami smo uporabili Mueller-Hintonov bujon (MHB), za poskuse z obligatnimi anaerobi pa tioglikolati bujon (TIO).

Oznaka epruvete	A	1A	2A	3A	4A
Koncentracija začetne raztopine (mg/ml)	100.00	100.00	50.00	5.00	0.50
Volumen dodane začetne raztopine (μ l)	2000	1000	100	100	100
Volumen bujona* (μ l)	0	1000	900	900	900
Končna koncentracija raztopine (mg/ml)	100.00	50.00	5.00	0.50	0.05

Tabela 2: Priprava različno koncentriranih raztopin Paracetamola v prvi stopnji poskusa. *Za poskuse s fakultativnimi anaerobi, aerobi in kvasovkami smo uporabili Mueller-Hintonov bujon (MHB), za poskuse z obligatnimi anaerobi pa tioglikolati bujon (TIO).

Oznaka epruvete	P	1P	2P	3P	4P
Koncentracija začetne raztopine (mg/ml)	100.00	100.00	50.00	5.00	0.50
Volumen dodane začetne raztopine (μ l)	2000	1000	100	100	100
Volumen bujona* (μ l)	0	1000	900	900	900
Končna koncentracija raztopine (mg/ml)	100.00	50.00	5.00	0.50	0.05

Tabela 3: Priprava različno koncentriranih raztopin Tramadola v prvi stopnji poskusa. *Za poskuse s fakultativnimi anaerobi, aerobi in kvasovkami smo uporabili Mueller-Hintonov bujon (MHB), za poskuse z obligatnimi anaerobi pa tioglikolatni bujon (TIO).

Oznaka epruvete	T	1T	2T	3T	4T
Koncentracija začetne raztopine (mg/ml)	50.000	50.000	25.000	2.500	0.250
Volumen dodane začetne raztopine (μ l)	2000	1000	100	100	100
Volumen bujona* (μ l)	0	1000	900	900	900
Končna koncentracija raztopine (mg/ml)	50.000	25.000	2.500	0.250	0.025

Protokol redčenja z gojiščem:

Rečitve smo dosegli tako, da smo začeli z 1 mL začetne koncentracije in tej dodali 1 mL MHB oz. *Mueller-Hinton bujona* pri poskusih s fakultativnimi anaerobi, aerobi in kvasovkami oz. 1 mL TIO oz. *Tioglikolatnega bujona* pri obligatnih anaerobih. Tako smo pri vseh analgetikih dobili 2x nižjo koncentracijo od začetne. Iz prve smo nato vzeli s pomočjo pipete 100 μ L prve raztopine in jo prenesli v drugo epruveto, ki smo jo prej označili in tej dodali 900 μ l bujona. Enako smo ponovili z raztopinami številc 3 in 4, ne glede na vrsto analgetika. Vsako od novo pridobljenih koncentracij raztopin smo dobro premešali z vorteks mešalom (2-7 s).

Moramo pa se zavedati, da se po dodatku mikroorganizmov v gojišče koncentracije raztopin zmanjšajo še za 2x.

4.1.3 Priprava raztopin analgetikov v drugi stopnji poskusa

Po izvedenem tako imenovanem prvem delu eksperimenta, kjer smo opazovali preživetje mikroorganizmov ob dodanih prvih različnih koncentracijah (redčitvah) analgetikov, smo določili dva parametra oz. dve mejni koncentraciji analgetikov; koncentracijo, pri kateri so mikroorganizmi še preživeli in koncentracijo, pri kateri se rast mikroorganizmov ni več nadaljevala.

Zato smo v drugi stopnji poskusa uporabili za nadaljnje redčenje samo tiste (najnižje) koncentracije posameznih analgetikov, pri katerih smo v prvem poskusu še ugotovili vpliv na smrtnost posameznih bakterij. Te smo redčili do druge mejne koncentracije, kjer je preživetje v prvem poskusu še bilo mogoče. Postopek redčitve v sami mikrotiterski plošči je potekal tako, da smo prenašali raztopino določenega volumna iz ene vdolbinice v drugo, po določenem protokolu mikrodilucije.

Protokol redčenja z mikrodilucijo v mikrotiterni plošči:

Preden smo dodali analgetike, smo v vse vdolbinice mikrotitrne plošče, ki smo jih imeli za namen redčitve, dodali 50 μL bujona s pomočjo merilnih pipet. Nato smo v naprej določene vdolbinice dodali analgetike, tako, da smo v »prvo« ponovno dodali 50 μL izbranega analgetika in rahlo premešali s pipeto. Po tem smo iz novo nastale raztopine odvzeli ponovnih 50 μL in jih prenesli v naslednjo vdolbinico. Postopek smo nadaljevali vse do konca, tako da smo dobili paleto raztopin, ki so se razlikovale po koncentracijah od prejšnje za 2x. Ob koncu smo iz zadnje vdolbinice odvzeli 50 μL , tako da smo v vseh vdolbinicah dobili enak volumen.

Primer:

Koncentracije Acetilsalicilna kislina v drugi stopnji poskusa.

Tabela 4: Tabela prikazuje koncentracije acetilsalicilne kisline v drugi stopnji poskusa.

	1	2	3	4	5
Koncentracije acetilsalicilne kisline (mg/mL)	25,000	12,500	6,250	3,125	1,562

4.2 Priprava mikroorganizmov

4.2.1 Priprava bakterijske suspenzije

Vse izbrane bakterije smo pridobili iz 18-24 urnih kultur, ki so bile inkubirane pri 35 ± 2 °C na krvnem agarju. Za pripravo bakterijske suspenzije smo s sterilno vatirano palčko vzeli približno 5 kolonij ter jih prenesli v epruveto z 2,5 mL 2% NaCl. Pripravili smo začetni inokulum po standardu 0,5 po McFarlandovi lestvici, kar ustreza koncentraciji $1-2 \times 10^8$ CFU/mL, izmerjene s pomočjo nefelometra. Po tem smo to dobro premešali na vorteks mešalcu za 15-20s. Koncentracijo pa smo nato še enkrat preverili s spektrofotometrom. Če kultura ni bila pravilne koncentracije, smo to redčili z 2% fiziološko raztopino, da smo dobili željeno koncentracijo. Ob delu pa smo se morali držati tudi časovnega roka, ki zagotavlja homogenost, ki je približno 15 minut.

4.2.2 Priprava raztopin mikroorganizmov

Pripravljeno bakterijsko suspenzijo z izhodiščno koncentracijo, smo redčili z bujonom v razmerju 1:100, da smo tako dobili koncentracijo 1×10^6 CFU/mL. To smo pripravili tako, da smo s pomočjo merilnih pipet odpepitirali 30 μ L izhodiščne koncentracije in dodali 3000 μ L oz. 3 mL bujona MHB oz. v primeru obligatnih anaerobov bujona TIO. Dobljeno suspenzijo smo dobro premešali z vorteks mešalom 15-20s.

4.3 Izvedba poskusa – preučevanje vpliva analgetikov na rast bakterij

Poskus vpliva analgetikov na rast bakterij smo pri vseh bakterijah izvedli v dveh stopnjah, ob uporabi mikrotiterske plošče. V drugi stopnji poskusa smo za izvedbo redčitve analgetikov uporabili metodo mikrodilucije. Mikrotiterska plošča je narejena iz prozorne polistirenske plastike s 96 vdolbinicami, z dnom v obliki črke U. Označena je s številkami od 1-12 na zgornji strani (stolpci) in s črkami A-H (vrstice) na levi strani ploščice. Za našo izvedbo poskusa je morala biti sterilna.

Pred začetkom dela smo si pripravili shemo oz. načrt kako bomo nanašali gojišča z analgetiki in mikroorganizme. Pri vsakem poskusu smo izvedli kontrolo postopka z dodatkom pozitivne (PK) in negativne kontrole (NK).

4.3.1 Prva stopnja – preučevanje vpliva osnovnih koncentracij analgetikov

V vsako izbrano vdolbinico mikrotiterske plošče smo odpipetirali 50 μL pripravljene raztopine analgetika (štiri redčitve osnovne raztopine analgetikov z dodatkom bujona kot je omenjeno v točki 4.1.1. oz. 4.1.2, Tabela 1,2,3,) in dodali 50 μL raztopine izbranega mikroorganizma. Tako smo dobili volumen 100 μL v vseh izbranih vdolbinicah z gojišči. Pri izračunu končnih koncentracij analgetikov smo upoštevali, da so se po dodatku mikroorganizmov v gojišče koncentracije raztopin analgetikov zmanjšale za 2x.

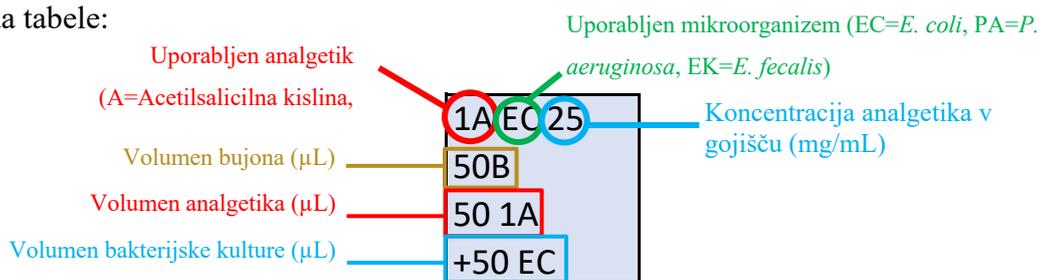
Testiranje posameznih koncentracij je potekalo v dvojniku oz. na mikrotiterno ploščo smo vsako raztopino nanесли 2x - enako v dve vdolbinici. Praviloma so bili dvojniki razporejeni v dveh vrsticah, od manjše proti večji koncentraciji analgetika (Tabela 5,6,7).

1. Testiranje

Tabela 5: Razporeditev gojišč v prvi stopnji poskusa, prvo testiranje. Prva stopnja poskusa za *E. coli* (EC), *Enterococcus faecalis* (EF) in *Pseudomonas aeruginosa* (PA). En kvadratik v tabeli prikazuje eno vdolbinico v mikrotitrski plošči. Obarvani kvadratici predstavljajo vdolbinice, ki vsebujejo gojišča z analgetiki (modri – acetilsalicilna kislina, oranžna – tramadol, zelena – paracetamol). Neobarvani kvadratici predstavljajo vdolbinice, v katerih so potekali kontrolni poskusi (pozitivni in negativni).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1A EC 25 50B 50 1A +50 EC	2A EC 2,5 50B 50 2A +50 EC	3A EC 0,25 50B 50 3A +50 EC	4A EC 0,025 50B 50 4A +50 EC	1T EC 12,5 50B 50 1T +50 EC	2T EC 1,25 50B 50 2T +50 EC	3T EC 0,125 50B 50 3T +50 EC	4T EC 0,0125 50B 50 4T +50 EC	1P EC 25 50B 50 1P +50 EC	2P EC 2,5 50B 50 2P +50 EC	3P EC 0,25 50B 50 3P +50 EC	4P EC 0,025 50B 50 4P +50 EC
B	1A EC 25 50B 50 1A +50 EC	2A EC 2,5 50B 50 2A +50 EC	3A EC 0,25 50B 50 3A +50 EC	4A EC 0,025 50B 50 4A +50 EC	1T EC 12,5 50B 50 1T +50 EC	2T EC 1,25 50B 50 2T +50 EC	3T EC 0,125 50B 50 3T +50 EC	4T EC 0,0125 50B 50 4T +50 EC	1P EC 25 50B 50 1P +50 EC	2P EC 2,5 50B 50 2P +50 EC	3P EC 0,25 50B 50 3P +50 EC	4P EC 0,025 50B 50 4P +50 EC
C	1A PA 25 50B 50 1A +50 PA	2A PA 2,5 50B 50 2A +50 PA	3A PA 0,25 50B 50 3A +50 PA	4A PA 0,025 50B 50 4A +50 PA	1T PA 12,5 50B 50 1T +50 PA	2T PA 1,25 50B 50 2T +50 PA	3T PA 0,125 50B 50 3T +50 PA	4T PA 0,0125 50B 50 4T +50 PA	1P PA 25 50B 50 1P +50 PA	2P PA 2,5 50B 50 2P +50 PA	3P PA 0,25 50B 50 3P +50 PA	4P PA 0,025 50B 50 4P +50 PA
D	1A PA 25 50B 50 1A +50 PA	2A PA 2,5 50B 50 2A +50 PA	3A PA 0,25 50B 50 3A +50 PA	4A PA 0,025 50B 50 4A +50 PA	1T PA 12,5 50B 50 1T +50 PA	2T PA 1,25 50B 50 2T +50 PA	3T PA 0,125 50B 50 3T +50 PA	4T PA 0,0125 50B 50 4T +50 PA	1P PA 25 50B 50 1P +50 PA	2P PA 2,5 50B 50 2P +50 PA	3P PA 0,25 50B 50 3P +50 PA	4P PA 0,025 50B 50 4P +50 PA
E	1A EK 25 50B 50 1A +50 EK	2A EK 2,5 50B 50 2A +50 EK	3A EK 0,25 50B 50 3A +50 EK	4A EK 0,025 50B 50 4A +50 EK	1T EK 12,5 50B 50 1T +50 EK	2T EK 1,25 50B 50 2T +50 EK	3T EK 0,125 50B 50 3T +50 EK	4T EK 0,0125 50B 50 4T +50 EK	1P EC 25 50B 50 1P +50 EK	2P EK 2,5 50B 50 2P +50 EK	3P EK 0,25 50B 50 3P +50 EK	4P EK 25 50B 50 4P +50 EK
F	1A EK 25 50B 50 1A +50 EK	2A EK 2,5 50B 50 2A +50 EK	3A EK 0,25 50B 50 3A +50 EK	4A EK 0,025 50B 50 4A +50 EK	1T EK 12,5 50B 50 1T +50 EK	2T EK 1,25 50B 50 2T +50 EK	3T EK 0,125 50B 50 3T +50 EK	4T EK 0,0125 50B 50 4T +50 EK	1P EC 25 50B 50 1P +50 EK	2P EK 2,5 50B 50 2P +50 EK	3P EK 0,25 50B 50 3P +50 EK	4P EK 25 50B 50 4P +50 EK
G	PK EC 50B 50 EC	PK PA 50B 50 PA	PK EK 50B 50 EK									
H	NK A 50B 50 A	NK T 50T 50 T	NK P 50B 50 P	NK VODA 50B 50 VODA								

Legenda tabele:



Ob končanem nanosu vseh gojišč in kontrol smo mikrotitrsko ploščo zaprli s priloženim pokrovom in jo postavili v posodo, v katero je bil položen papir, premočen z vročo vodo, saj raziskovani mikroorganizmi za rast potrebujejo vlago. Posodo smo še dodatno zaprli in jo za 24h inkubirali na 35 ± 2 °C.

2. Testiranje

Tabela 6: Razporeditev gojišč za prvo stopnjo poskusa, drugo testiranje. Prva stopnja poskusa za *Candida albicans* (CA). Obarvani kvadrati predstavljajo vdolbinice, ki vsebujejo gojišča z analgetiki (svetlo rumena – acetilsalicilna kislina, srednje temno rumena – tramadol, temno rumena – paracetamol). Neobarvani kvadrati predstavljajo vdolbinice, v katerih so potekali kontrolni poskusi (pozitivni in negativni).

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
A	1T PA 12,5 50B 50 T +50 PA	2T PA 6,25 50B 50 1T +50 PA	3T PA 3,125 50B 50 2T +50 PA	4T PA 1,563 50B 50 3T +50 PA	5T PA 0,781 50B 50 4T +50 PA	6T PA 0,39 50B 50 5T +50 PA	7T PA 0,195 50B 50 6T +50 PA	8T PA 0,098 50B 50 7T +50 PA	9T PA 0,049 50B 50 8T +50 PA	10T PA 0,024 50B 50 9T +50 PA	NK VODA 50B 50 VODA	PK PA 50B 50 PA
B	1T PA 12,5 50B 50 T +50 PA	2T PA 6,25 50B 50 1T +50 PA	3T PA 3,125 50B 50 2T +50 PA	4T PA 1,563 50B 50 3T +50 PA	5T PA 0,781 50B 50 4T +50 PA	6T PA 0,39 50B 50 5T +50 PA	7T PA 0,195 50B 50 6T +50 PA	8T PA 0,098 50B 50 7T +50 PA	9T PA 0,049 50B 50 8T +50 PA	10T PA 0,024 50B 50 9T +50 PA	NK A 50B 50 A	PK EK 50B 50 EK
C	1T EK 12,5 50B 50 T +50 EK	2T EK 6,25 50B 50 1T +50 EK	3T EK 3,125 50B 50 2T +50 EK	4T EK 1,563 50B 50 3T +50 EK	5T EK 0,781 50B 50 4T +50 EK	6T EK 0,39 50B 50 5T +50 EK	7T EK 0,195 50B 50 6T +50 EK	8T EK 0,098 50B 50 7T +50 EK	9T EK 0,049 50B 50 8T +50 EK	10T EK 0,024 50B 50 9T +50 EK	NK T 50B 50 T	PK CA 50B 50 CA
D	1T EK 12,5 50B 50 T +50 EK	2T EK 6,25 50B 50 1T +50 EK	3T EK 3,125 50B 50 2T +50 EK	4T EK 1,563 50B 50 3T +50 EK	5T EK 0,781 50B 50 4T +50 EK	6T EK 0,39 50B 50 5T +50 EK	7T EK 0,195 50B 50 6T +50 EK	8T EK 0,098 50B 50 7T +50 EK	9T EK 0,049 50B 50 8T +50 EK	10T EK 0,024 50B 50 9T +50 EK	NK P 50B 50 P	
E	1P EK 25 50B 50 P +50 EK	2P EK 12,5 50B 50 1P +50 EK	3P EK 5,25 50B 50 2P +50 EK	4P EK 3,125 50B 50 3P +50 EK	5P EK 1,563 50B 50 4P +50 EK	6P EK 0,781 50B 50 5P +50 EK	7P EK 0,39 50B 50 6P +50 EK	8P EK 0,195 50B 50 7P +50 EK	9P EK 0,098 50B 50 8P +50 EK	10P EK 0,049 50B 50 9P +50 EK		
F	1P EK 25 50B 50 P +50 EK	2P EK 12,5 50B 50 1P +50 EK	3P EK 5,25 50B 50 2P +50 EK	4P EK 3,125 50B 50 3P +50 EK	5P EK 1,563 50B 50 4P +50 EK	6P EK 0,781 50B 50 5P +50 EK	7P EK 0,39 50B 50 6P +50 EK	8P EK 0,195 50B 50 7P +50 EK	9P EK 0,098 50B 50 8P +50 EK	10P EK 0,049 50B 50 9P +50 EK		
G	1A CA 25 50B 50 1A +50 CA	2A CA 2,5 50B 50 2A +50 CA	3A CA 0,25 50B 50 3A +50 CA	4A CA 0,025 50B 50 4A +50 CA	1T CA 12,5 50B 50 1T +50 CA	2T CA 1,25 50B 50 2T +50 CA	3T CA 0,125 50B 50 3T +50 CA	4T CA 0,0125 50B 50 4T +50 CA	1P CA 25 50B 50 1P +50 CA	2P CA 2,5 50B 50 2P +50 CA	3P CA 0,25 50B 50 3P +50 CA	4P CA 0,025 50B 50 4P +50 CA
H	1A CA 25 50B 50 1A +50 CA	2A CA 2,5 50B 50 2A +50 CA	3A CA 0,25 50B 50 3A +50 CA	4A CA 0,025 50B 50 4A +50 CA	1T CA 12,5 50B 50 1T +50 CA	2T CA 1,25 50B 50 2T +50 CA	3T CA 0,125 50B 50 3T +50 CA	4T CA 0,0125 50B 50 4T +50 CA	1P CA 25 50B 50 1P +50 CA	2P CA 2,5 50B 50 2P +50 CA	3P CA 0,25 50B 50 3P +50 CA	4P CA 0,025 50B 50 4P +50 CA

V prvi stopnji smo testirali samo glivo *Candida albicans*, ki je na tabeli označena z rumeno barvo; najsvetlejša barva označuje analgetik acetilsalicilna kislina, srednja tramadol in najtemnejša analgetik paracetamol.

(Preostali pobarvani kvadrati prikazujejo ponovitve drugih mikroorganizmov v drugi stopnji poskusa. Zato moramo za to obravnavo te ignorirati.)

Za glive velja enako kot za bakterije iz prvega poskusa oz. za aerobe in fakultativne anaerobe, da jih moramo za rast priskrbeti z vlažnim okoljem v inkubatorju pri 35 ± 2 °C za 24h.

3. Testiranje

Tabela 7: Razporeditev gojišč za prvo stopnjo poskusa, tretje testiranje. Prva stopnja poskusa za *Bacteroides fragilis* (BF). Obarvani kvadrati predstavljajo vdolbinice, ki vsebujejo gojišča z analgetiki (svetlo siva – acetilsalicilna kislina, srednje temno siva – tramadol, temno siva – paracetamol). Neobarvani kvadrati predstavljajo vdolbinice, v katerih so potekali kontrolni poskusi (pozitivni in negativni).

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
A	1A BF 25 50TI 50 1A +50 BF	2A BF 2,5 50TI 50 2A +50 BF	3A BF 0,25 50TI 50 3A +50 BF	4A BF 0,025 50B 50 TI +50 BF	1T BF 12,5 50TI 50 1T +50 BF	2T BF 1,25 50TI 50 2T +50 BF	3T BF 0,125 50TI 50 3T +50 BF	4T BF 0,0125 50TI 50 4T +50 BF	1P BF 25 50TI 50 1P +50 BF	2P BF 2,5 50TI 50 2P +50 BF	3P BF 0,25 50TI 50 3P +50 BF	4P BF 0,025 50TI 50 4P +50 BF
B	1A BF 25 50TI 50 1A +50 BF	2A BF 2,5 50TI 50 2A +50 BF	3A BF 0,25 50TI 50 3A +50 BF	4A BF 0,025 50B 50 TI +50 BF	1T BF 12,5 50TI 50 1T +50 BF	2T BF 1,25 50TI 50 2T +50 BF	3T BF 0,125 50TI 50 3T +50 BF	4T BF 0,0125 50TI 50 4T +50 BF	1P BF 25 50TI 50 1P +50 BF	2P BF 2,5 50TI 50 2P +50 BF	3P BF 0,25 50TI 50 3P +50 BF	4P BF 0,025 50TI 50 4P +50 BF
C	NK VODA 50TI 50 VODA	NK A 50TI 50 A	NK T 50TI 50 T	NK P 50TI 50 P	PK BF 50TI 50 BF							
D												
E												
F												
G												
H												

Obligatni anaerobi oz. *Bacteroides fragilis*, je bil zadnji mikroorganizem, ki je bil testiran v prvi stopnji poskusa, saj namreč ta bakterija potrebuje več časa za rast in drugačne razmere, kot vsi mikroorganizmi do zdaj.

Na shemi so obligatni anaerobi prikazani v sivi barvi; svetlo siva je acetilsalicilna kislina, srednja tramadol in temno siva analgetik paracetamol. Omeniti pa moramo tudi, da smo namesto bujona MHB uporabili TIO.

Ob končanem nanašanju gojišč in kontrol smo ponovili enak postopek kot pri ostalih mikroorganizmih, vendar smo za razliko od njih te dali v poseben inkubiran prostor brez kisika, saj te bakterije rastejo pri odsotnosti kisika ter pri 36 °C. Za rast so potrebovale najdlje od vseh, 46h oz. dva dni.

4.3.2 Druga stopnja poskusa

V drugi stopnji poskusa smo ponovili podoben poskus kot v prvi stopnji, le da smo z dodatnimi redčitvami s pomočjo mikrodilucije ob uporabi titerne plošče skušali natančneje ugotoviti, pri katerih koncentracijah se je ustavila rast mikroorganizmov.

Zato smo pripravili samo koncentracije analgetikov, pri katerih smo v prvi fazi poskusa ugotovili ustavitev rasti posameznih mikroorganizmov in s pomočjo mikrodilucije iz teh pripravili redčitve in manjše koncentracije. V naprej določene vdolbinice na mikrotitrni plošči smo napipetirali bujon ter temu v prvo vdolbinico dodali analgetik v omenjeni koncentraciji (za vsak analgetik posebej določene vdolbinice za nadaljnje redčenje). Po protokolu iz točke 4.1.3. smo s prenašanjem $50 \mu\text{L}$ iz prve vdolbinice (z analgetikom) v drugo (prisoten samo bujon) in iz nastale nove raztopine prenašali $50 \mu\text{L}$ v naslednjo vdolbinico, spreminjali koncentracije le-teh. Tako pripravljenim raztopinam smo dodali $50 \mu\text{L}$ suspenzije izbranega mikroorganizma. Pri izračunu končnih koncentracij smo upoštevali vse razredčitve, ki so nastale zaradi prenašanj raztopin in dodatkov mikroorganizmov.

Za vsako koncentracijo smo test izvedli v dvojniku in ponovno dodali pozitivne in negativne kontrole.

1. Testiranje

Tabela 8: Razporeditev gojišč v drugi stopnji poskusa, prvo testiraje. Drugo stopnja za *E. coli* (EC), *Enterococcus faecalis* (EF) in *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Obarvani kvadrati predstavljajo vdolbinice, ki vsebujejo gojišča z analgetiki (modri – acetilsalicilna kislina, oranžna – tramadol, zelena – paracetamol). Neobarvani kvadrati predstavljajo vdolbinice, v katerih so potekali kontrolni poskusi (pozitivni in negativni).

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
A	1A EC 25	2A EC 12,5	3A EC 6,25	4A EC 3,125	5A EC 1,5625	1T EC 12,5	2T EC 6,25	3T EC 3,125	4T EC 1,5625	5T EC 0,78125	1P EK 25	1P EK 25
	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B
	50 A	50 1A	50 2A	50 3A	50 4A	50 T	50 1T	50 2T	50 3T	50 4T	50 P	50 P
	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EK	+50 EK
B	1A EC 25	2A EC 12,5	3A EC 6,25	4A EC 3,125	5A EC 1,5625	1T EC 12,5	2T EC 6,25	3T EC 3,125	4T EC 1,5625	5T EC 0,78125	2P EC 12,5	2P EC 12,5
	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B
	50 A	50 1A	50 2A	50 3A	50 4A	50 T	50 1T	50 2T	50 3T	50 4T	50 1P	50 1P
	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EK	+50 EK
C	1A PA 25	2A PA 12,5	3A PA 6,25	4A PA 3,125	5A PA 1,5625	1T PA 12,5	2T PA 6,25	3T PA 3,125	4T PA 1,5625	5T PA 0,78125	3P EK 6,25	3P EK 6,25
	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B
	50 A	50 1A	50 2A	50 3A	50 4A	50 T	50 1T	50 2T	50 3T	50 4T	50 2P	50 2P
	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 EK	+50 EK
D	1A PA 25	2A PA 12,5	3A PA 6,25	4A PA 3,125	5A PA 1,5625	1T PA 12,5	2T PA 6,25	3T PA 3,125	4T PA 1,5625	5T PA 0,78125	4P EK 0,25	4P EK 0,25
	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B
	50 A	50 1A	50 2A	50 3A	50 4A	50 T	50 1T	50 2T	50 3T	50 4T	50 3P	50 3P
	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 EK	+50 EK
E	1A EK 25	2A EK 12,5	3A EK 5,25	4A EK 3,125	5A EK 1,5625	1T EK 12,5	2T EK 6,25	3T EK 3,125	4T EK 1,5625	5T EK 0,78125	5P EK 1,5625	5P EK 1,5625
	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B
	50 A	50 1A	50 2A	50 3A	50 4A	50 T	50 1T	50 2T	50 3T	50 4T	50 4P	50 4P
	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK
F	1A EK 25	2A EK 12,5	3A EK 5,25	4A EK 3,125	5A EK 1,5625	1T EK 12,5	2T EK 6,25	3T EK 3,125	4T EK 1,5625	5T EK 0,78125	NK A	NK T
	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B
	50 A	50 1A	50 2A	50 3A	50 4A	50 T	50 1T	50 2T	50 3T	50 4T	50 A	50 T
	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK		
G	1P EC 25	2P EC 12,5	3P EC 6,25	4P EC 3,125	5P EC 1,5625	1P PA 25	2P PA 12,5	3P PA 6,25	4P PA 3,125	5P PA 1,5625	NK P	PK EC
	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B
	50 P	50 1P	50 2P	50 3P	50 4P.	50 P	50 1P	50 2P	50 3P	50 4P	50 P	50 EC
	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA		
H	1P EC 25	2P EC 12,5	3P EC 6,25	4P EC 3,125	5P EC 1,5625	1P PA 25	2P PA 12,5	3P PA 6,25	4P PA 3,125	5P PA 1,5625	PK EK	PK PA
	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B
	50 P	50 1P	50 2P	50 3P	50 4P.	50 P	50 1P	50 2P	50 3P	50 4P	50 EK	50 PA
	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 EC	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA	+50 PA		

Ponovno smo naredili pozitivne in negativne kontrole, ter naredili eno ponovitev za vsako gojišče. Prav tako modra barva spet predstavlja acetilsalicilna kislina, oranžna tramadol in zelena paracetamol, ter najsvetlejša barva *Escherichia Coli*, srednja *Pseudomonas aeruginosa* in najtemnejša *Enterococcus faecalis*.

Postopek po nanosu je enak, prav tako pa razmere za rast, kot pri prvem testiranju pri prvi stopnji poskusa.

2. Testiranje

Tabela 9: Razporeditev gojišč v drugi stopnji poskusa, drugo testiranje. Tukaj smo ponovili drugo stopnjo pri bakterijah *Pseudomonas aeruginosa* (PA) in *Enterococcus faecalis* (EF) v paracetamolu in tramadolu. Obarvani kvadrati predstavljajo vdolbinice, ki vsebujejo gojišča z analgetiki (oranžna – tramadol, zelena – paracetamol). Neobarvani kvadrati predstavljajo vdolbinice, v katerih so potekali kontrolni poskusi (pozitivni in negativni).

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
A	1T PA 12,5 50B 50 T +50 PA	2T PA 6,25 50B 50 1T +50 PA	3T PA 3,125 50B 50 2T +50 PA	4T PA 1,563 50B 50 3T +50 PA	5T PA 0,781 50B 50 4T +50 PA	6T PA 0,39 50B 50 5T +50 PA	7T PA 0,195 50B 50 6T +50 PA	8T PA 0,098 50B 50 7T +50 PA	9T PA 0,049 50B 50 8T +50 PA	10T PA 0,024 50B 50 9T +50 PA	NK VODA 50B 50 VODA	PK PA 50B 50 PA
B	1T PA 12,5 50B 50 T +50 PA	2T PA 6,25 50B 50 1T +50 PA	3T PA 3,125 50B 50 2T +50 PA	4T PA 1,563 50B 50 3T +50 PA	5T PA 0,781 50B 50 4T +50 PA	6T PA 0,39 50B 50 5T +50 PA	7T PA 0,195 50B 50 6T +50 PA	8T PA 0,098 50B 50 7T +50 PA	9T PA 0,049 50B 50 8T +50 PA	10T PA 0,024 50B 50 9T +50 PA	NK A 50B 50 A	PK EK 50B 50 EK
C	1T EK 12,5 50B 50 T +50 EK	2T EK 6,25 50B 50 1T +50 EK	3T EK 3,125 50B 50 2T +50 EK	4T EK 1,563 50B 50 3T +50 EK	5T EK 0,781 50B 50 4T +50 EK	6T EK 0,39 50B 50 5T +50 EK	7T EK 0,195 50B 50 6T +50 EK	8T EK 0,098 50B 50 7T +50 EK	9T EK 0,049 50B 50 8T +50 EK	10T EK 0,024 50B 50 9T +50 EK	NK T 50B 50 T	PK CA 50B 50 CA
D	1T EK 12,5 50B 50 T +50 EK	2T EK 6,25 50B 50 1T +50 EK	3T EK 3,125 50B 50 2T +50 EK	4T EK 1,563 50B 50 3T +50 EK	5T EK 0,781 50B 50 4T +50 EK	6T EK 0,39 50B 50 5T +50 EK	7T EK 0,195 50B 50 6T +50 EK	8T EK 0,098 50B 50 7T +50 EK	9T EK 0,049 50B 50 8T +50 EK	10T EK 0,024 50B 50 9T +50 EK	NK P 50B 50 P	
E	1P EK 25 50B 50 P +50 EK	2P EK 12,5 50B 50 1P +50 EK	3P EK 5,25 50B 50 2P +50 EK	4P EK 3,125 50B 50 3P +50 EK	5P EK 1,563 50B 50 4P +50 EK	6P EK 0,781 50B 50 5P +50 EK	7P EK 0,39 50B 50 6P +50 EK	8P EK 0,195 50B 50 7P +50 EK	9P EK 0,098 50B 50 8P +50 EK	10P EK 0,049 50B 50 9P +50 EK		
F	1P EK 25 50B 50 P +50 EK	2P EK 12,5 50B 50 1P +50 EK	3P EK 5,25 50B 50 2P +50 EK	4P EK 3,125 50B 50 3P +50 EK	5P EK 1,563 50B 50 4P +50 EK	6P EK 0,781 50B 50 5P +50 EK	7P EK 0,39 50B 50 6P +50 EK	8P EK 0,195 50B 50 7P +50 EK	9P EK 0,098 50B 50 8P +50 EK	10P EK 0,049 50B 50 9P +50 EK		
G	1A CA 25 50B 50 1A +50 CA	2A CA 2,5 50B 50 2A +50 CA	3A CA 0,25 50B 50 3A +50 CA	4A CA 0,025 50B 50 4A +50 CA	1T CA 12,5 50B 50 1T +50 CA	2T CA 1,25 50B 50 2T +50 CA	3T CA 0,125 50B 50 3T +50 CA	4T CA 0,0125 50B 50 4T +50 CA	1P CA 25 50B 50 1P +50 CA	2P CA 2,5 50B 50 2P +50 CA	3P CA 0,25 50B 50 3P +50 CA	4P CA 0,025 50B 50 4P +50 CA
H	1A CA 25 50B 50 1A +50 CA	2A CA 2,5 50B 50 2A +50 CA	3A CA 0,25 50B 50 3A +50 CA	4A CA 0,025 50B 50 4A +50 CA	1T CA 12,5 50B 50 1T +50 CA	2T CA 1,25 50B 50 2T +50 CA	3T CA 0,125 50B 50 3T +50 CA	4T CA 0,0125 50B 50 4T +50 CA	1P CA 25 50B 50 1P +50 CA	2P CA 2,5 50B 50 2P +50 CA	3P CA 0,25 50B 50 3P +50 CA	4P CA 0,025 50B 50 4P +50 CA

Ponovili smo drugo stopnjo *Pseudomonas aeruginosa* v acetilsalicilni kislini in *Enterococcus faecalis* v acetilsalicilni kislini ter paracetamolu. To smo naredili, saj pri prvem testiranju druge stopnje teh gojišč, nismo bili prepričani o realnosti rezultatov, zato smo te še enkrat repetirali. (V tej mikrotiterski plošči smo naredili tudi prvo testiranje, prve stopnje za glivo *Candida albicans*, ki je na shemi predstavljena z rumeni barvo, vendar moremo to iz te obravnave izključiti.)

Proces nanosa gojišč, raztopin analgetikov in mikroorganizmov je enak, kot pri vseh testiranjih druge stopnje. Seveda pa smo ponovno naredili pozitivne ter negativne kontrole.

3. Testiranje

Tabela 10: Razporeditev gojišč v drugi stopnji poskusa, tretje testiranje. Tukaj smo naredili drugo stopnjo pri glivi *Candida albicans* (CA) in to ponovili pri *Enterococcus faecalis* (EF) v acetilsalicilni kislini. Obarvani kvadrati predstavljajo vdolbinice, ki vsebujejo gojišča z analgetiki (zelena (pri EF) in svetlo rumena (pri CA) – acetilsalicilna kislila, srednje temno rumena – tramadol, temno rumena – paracetamol). Neobarvani kvadrati predstavljajo vdolbinice, v katerih so potekali kontrolni poskusi (pozitivni in negativni).

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
A	1A CA 25	2A CA 12,5	3A CA 6,25	4A CA 3,125	5A CA 1,563	6A CA 0,781	1P CA 25	2P CA 12,5	3P CA 6,25	4P CA 3,125	5P CA 1,563	6P CA 0,781
	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B
	50 A	50 1A	2A	3A	50 4A	5A	50 P	50 1P	50 2P	50 3P	50 4P	50 5P
	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA
B	1A CA 25	2A CA 12,5	3A CA 6,25	4A CA 3,125	5A CA 1,563	6A CA 0,781	1P CA 25	2P CA 12,5	3P CA 6,25	4P CA 3,125	5P CA 1,563	6P CA 0,781
	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B
	50 A	50 1A	2A	3A	50 4A	5A	50 P	50 1P	50 2P	50 3P	50 4P	50 5P
	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA
C	1T CA 12,5	2T CA 6,25	3T CA 3,125	4T CA 1,563	5T CA 0,781	6T CA 0,39						
	50B	50B	50B	50B	50B	50B						
	50 T	50 1T	50 2T	50 3T	50 4T	5T						
	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA						
D	1T CA 12,5	2T CA 6,25	3T CA 3,125	4T CA 1,563	5T CA 0,781	6T CA 0,39						
	50B	50B	50B	50B	50B	50B						
	50 T	50 1T	50 2T	50 3T	50 4T	5T						
	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA	+50 CA						
E	1A EK 25	2A EK 12,5	3A EK 5,25	4A EK 3,125	5A EK 1,563	6A EK 0,781	7A EK 0,39	8A EK 0,195	9A EK 0,098	10A EK 0,049		
	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B		
	50 A	50 1A	50 2A	3A	50 4A	5A	50 6A	50 7A	50 8A	50 9A		
	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK		
F	1A EK 25	2A EK 12,5	3A EK 5,25	4A EK 3,125	5A EK 1,563	6A EK 0,781	7A EK 0,39	8A EK 0,195	9A EK 0,098	10A EK 0,049		
	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B	50B		
	50 A	50 1A	50 2A	3A	50 4A	5A	50 6A	50 7A	50 8A	50 9A		
	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK	+50 EK		
G	NK VODA	NK A	NK T	NK P								
	50B	50B	50B	50B								
	50 VODA	50 A	50 T	50 P								
H	PK CA	PK EK										
	50B	50B										
	50 CA	50 EK										

Za oba mikroorganizma je potek dela po nanosu gojišč v mikrootitersko ploščo, enak kot je bil v prvi stopnji poskusa. Ponovili smo tudi vse pozitivne in negativne kontrole.

4. Testiranje

Tabela 11: Razporeditev gojišč v drugi stopnji poskusa, četrto testiranje. Tukaj smo naredili drugo stopnjo pri bakteriji *Bacteroides fragilis* (BF). Obarvani kvadrati predstavljajo vdolbinice, ki vsebujejo gojišča z analgetiki (svetlo siva – acetilsalicilna kislina, srednje temno siva – tramadol, temno siva – paracetamol). Neobarvani kvadrati predstavljajo vdolbinice, v katerih so potekali kontr

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
A	1A BF 25 50TIO 50 A +50 BF	2A BF 12,5 50TIO 50 1A +50 BF	3A BF 6,25 50TIO 50 2A +50 BF	4A BF 3,125 50TIO 50 3A +50 BF	5A BF 1,563 50TIO 50 4A +50 BF	6A BF 0,781 50TIO 50 5A +50 BF	7A BF 0,39 50TIO 50 6A +50 BF	8A BF 0,195 50TIO 50 7A +50 BF	9A BF 0,097 50TIO 50 8A +50 BF	10A BF 0,049 50TIO 50 9A +50 BF		
B	1A BF 25 50TIO 50 A +50 BF	2A BF 12,5 50TIO 50 1A +50 BF	3A BF 6,25 50TIO 50 2A +50 BF	4A BF 3,125 50TIO 50 3A +50 BF	5A BF 1,563 50TIO 50 4A +50 BF	6A BF 0,781 50TIO 50 5A +50 BF	7A BF 0,39 50TIO 50 6A +50 BF	8A BF 0,195 50TIO 50 7A +50 BF	9A BF 0,097 50TIO 50 8A +50 BF	10A BF 0,049 50TIO 50 9A +50 BF		
C	1T BF 12,5 50TIO 50 T +50 BF	2T BF 6,25 50TIO 50 1T +50 BF	3T BF 3,125 50TIO 50 2T +50 BF	4T BF 1,563 50TIO 50 3T +50 BF	5T BF 0,781 50TIO 50 4T +50 BF	6T BF 0,39 50TIO 50 5T +50 BF	7T BF 0,195 50TIO 50 6T +50 BF	8T BF 0,097 50TIO 50 7T +50 BF	9T BF 0,049 50TIO 50 8T +50 BF	10T BF 0,024 50TIO 50 9T +50 BF		
D	1T BF 12,5 50TIO 50 T +50 BF	2T BF 6,25 50TIO 50 1T +50 BF	3T BF 3,125 50TIO 50 2T +50 BF	4T BF 1,563 50TIO 50 3T +50 BF	5T BF 0,781 50TIO 50 4T +50 BF	6T BF 0,39 50TIO 50 5T +50 BF	7T BF 0,195 50TIO 50 6T +50 BF	8T BF 0,097 50TIO 50 7T +50 BF	9T BF 0,049 50TIO 50 8T +50 BF	10T BF 0,024 50TIO 50 9T +50 BF		
E	1P BF 25 50TIO 50 P +50 BF	2P BF 12,5 50TIO 50 1P +50 BF	3P BF 6,25 50TIO 50 2P +50 BF	4P BF 3,125 50TIO 50 3P +50 BF	5P BF 1,563 50TIO 50 4P +50 BF	6P BF 0,781 50TIO 50 5P +50 BF	7P BF 0,39 50TIO 50 6P +50 BF	8P BF 0,195 50TIO 50 7P +50 BF	9P BF 0,097 50TIO 50 8P +50 BF	10P BF 0,049 50TIO 50 9P +50 BF		
F	1P BF 25 50TIO 50 P +50 BF	2P BF 12,5 50TIO 50 1P +50 BF	3P BF 6,25 50TIO 50 2P +50 BF	4P BF 3,125 50TIO 50 3P +50 BF	5P BF 1,563 50TIO 50 4P +50 BF	6P BF 0,781 50TIO 50 5P +50 BF	7P BF 0,39 50TIO 50 6P +50 BF	8P BF 0,195 50TIO 50 7P +50 BF	9P BF 0,097 50TIO 50 8P +50 BF	10P BF 0,049 50TIO 50 9P +50 BF		
G												
H	NK VODA 50TIO 50 VODA	NK A 50TIO 50 A	NK T 50TIO 50 T	NK P 50TIO 50 P	PK BF 50TIO 50 BF							

Anaerob je označen s sivo barvo. Najsvetlejša barva prikazuje gojišča z aspirinom, srednja analgetik tramadol in najtemnejša paracetamol. V tem primeru smo naredili s postopnimi redčitvami po že znanem protokolu razpon desetih koncentracij, za vse analgetike. V mikrotitersko ploščo pa smo ponovno dodali pozitivne in negativne kontrole.

Legenda:

A – acetilsalicilna kislina

T – tramadol

P – paracetamol

EC – *Escherichia Coli*

PA – *Pseudomonas aeruginosa*

EK – *Enterococcus faecalis*

CA – *Candida albicans*

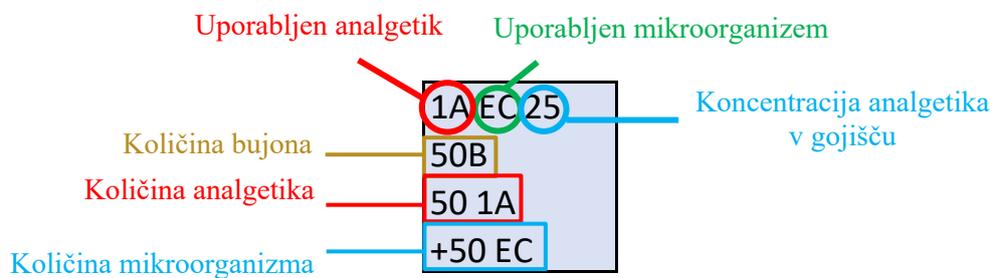
BF – *Bacteroides fragilis*

B – bujon MHB

TIO – bujon TIO

NK – negativna kontrola

PK – pozitivna kontrola

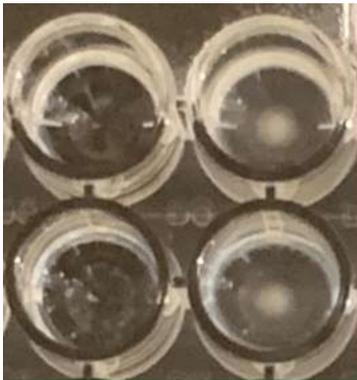


5 REZULTATI

Prikaz rasti pri vseh mikroorganizmih:

V vseh gojiščih na slikah 1 do 5 so na levi strani prazna oz. v njih ni prisotnih nobenih mikroorganizmov. Medtem ko je rast prisotna v gojiščih na desni. Rast vsakega organizma izgleda drugače, zato so pri poskusih zelo pomembne bile pozitivne kontrole.

Slika 1: Rast Escherichia coli.



Slika 2: Rast Pseudomonas aeruginosa.



Slika 3: Rast Enterococcus faecalis.



Slika 4: Rast Bacteroides fragilis.



Slika 5: Rast Candida albicans.

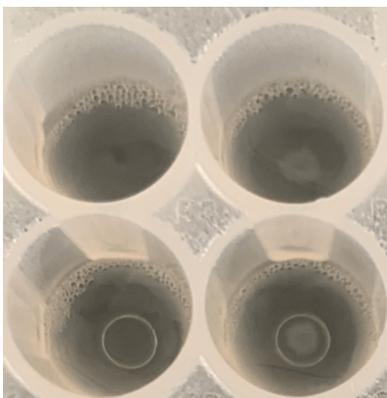


Tabela 12: Prikaz rasti pri določenih koncentracijah analgetikov; acetilsalicilna kislina, tramadol, paracetamol.

Kljukica predstavlja rast mikroorganizmov.

Acetilsalicilna kislina (mg/mL)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
25					
12,5				✓	
6,25				✓	✓
3,125	✓		✓	✓	✓
1,563	✓	✓	✓	✓	✓
0,781	✓	✓	✓	✓	✓
Tramadol (mg/mL)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
12,5				✓	
6,25				✓	✓
3,125	✓	✓		✓	✓
1,563	✓	✓		✓	✓
0,781	✓	✓	✓	✓	✓
0,39	✓	✓	✓	✓	✓
Paracetamol (mg/mL)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
25	✓	✓	✓	✓	
12,5	✓	✓	✓	✓	✓
6,25	✓	✓	✓	✓	✓
3,125	✓	✓	✓	✓	✓
1,563	✓	✓	✓	✓	✓

V raziskavi smo ugotovili, da je bila rast mikroorganizmov zaradi vpliva acetilsalicilne kisline zavrneta v koncentraciji 25 mg/mL pri vseh proučevanih mikroorganizmih. Največji vpliv tega analgetika je bilo opaziti pri *Bacteroides fragilis*, saj je bila njegova rast zavrneta že pri koncentraciji 3,125 mg/mL.

Opioid, tramadol je največji vpliv imel na enterokok *Enterococcus faecalis*, kateremu je rast ustavil že v koncentraciji 1,563 mg/mL. Tukaj se je analgetiku uprla samo bakterija *Pseudomonas aeruginosa*.

Paracetamol, razen v primeru *Candida albicans*, kjer je prišlo do zaviranja rasti pri koncentraciji 25 mg/mL, ni imel vpliva na zaviranje rasti drugih mikroorganizmov pri koncentraciji 25 mg/mL. (Tabela 12)

Pseudomonas aeruginosa je med proučevanimi vplivi analgetikov bil občutljiv le na acetilsalicilno kislino v najvišji koncentraciji. Vplivi drugih analgetikov na rast te bakterije so bili v našem primeru neopaženi.

6 RAZPRAVA

V današnjem času je uživanje različnih analgetikov zelo pogosto. Njihova raba je namenjena lajšanju bolečin tako zaradi stresa, kot je glavobol, kot zaradi različnih bolezenskih stanj. Zato so v uporabi zelo različni analgetiki, ki se razlikujejo med seboj tako po učinku, kot po načinu delovanja. Ob pogostem uživanju pa predstavljajo tudi veliko breme za črevesje, skozi katero poteka absorpcija. V naši nalogi smo zato hoteli tudi proučiti, ali imajo analgetiki vpliv tudi na samo črevesno floro in rast bakterij, ki so njen pomemben sestavni del.

Zato smo se v raziskovalni nalogi odločili proučiti odziv petih različnih mikroorganizmov (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis* in *Candida albicans*), ki so sicer sestavni del človeške črevesne flore, na dodane izbrane analgetike. V ta namen smo se odločili proučiti tri najpogosteje uporabljene analgetike, acitilsalicilno kislino, paracetamol in tramadol, ki se razlikujejo tako po svojem učinku delovanja kot po kemijski strukturi in načinu delovanja. Zato smo njihov vpliv na rast izbranih različnih mikroorganizmov proučevali glede na njihove različne koncentracije v raziskovanih gojiščih. To nam je omogočalo, da smo opazovali, pri kateri najnižji koncentraciji je določen analgetik vplival na rast mikroorganizmov.

Rezultati, ki smo jih dobili so nas presenetili, medtem ko smo nekatere tudi predvideli. Rast smo definirali glede na negativne (bujon + analgetik) in pozitivne (bujon + mikroorganizmi) kontrole, kjer nam je lahko negativna kontrola pokazala izgled gojišča brez rasti, saj v njej ni bilo mikroorganizmov ter pozitivna izgled rasti, saj analgetikov, ki bi to lahko zatirali, ni bilo prisotnih. Ta je bila zelo pomembna, saj rast posameznih mikroorganizmov nikoli ni bila enaka. V raziskavi smo ugotovili, da so vsi analgetiki; acetilsalicilna kislina, tramadol in paracetamol imeli vsaj pri enem mikroorganizmu vpliv na njihovo rast. Vendar je acetilsalicilna kislina imela očitno največji vpliv, saj je v primerjavi s paracetamolom in tramadolom onemogočila rast vseh mikroorganizmov v koncentracijah enakih ali celo manjših od 25 mg/mL. Še posebej močan vpliv je bilo opaziti na razvoj opazovanih bakterij ali gliv. Največji vpliv tega analgetika je bilo opaziti pri *Bacteroides fragilis*, saj je bila njegova rast zavrta že pri koncentraciji 3,125 mg/mL. Acetilsalicilna kislina je imela močan vpliv tudi na *Enterococcus faecalis* ter *Escherichia coli*, katerih rast je bila zavrta pri koncentraciji 6,25 mg/mL. Med tem ko pri bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* kislina ni vplivala na rast pri koncentracijah nižjih od 25 mg/mL. Najmanjši vpliv med analgetiki je imel paracetamol, ki je le pri kvasovki *Candida albicans* ustavil rast pri najvišji proučevani koncentraciji 25 mg/mL. Med mikroorganizmi se

je vsem analgetikom najboljše upirala *Pseudomonas aeruginosa*, Kot že rečeno, je *Pseudomonas aeruginosa* med proučevanimi vplivi analgetikov bil občutljiv le na acetilsalicilno kislino v koncentraciji 25 mg/mL.

Analgetik tramadol je podobno kot acetilsalicilna kislina imel največji vpliv na *Enterococcus faecalis* ter *Bacteroides fragilis*. Rast enterokoka je zatiral vse do koncentracije 0,781 mg/mL, kar je v primerjavi s preostalimi mikroorganizmi veliko nižje, saj sta naslednji bakteriji; *Escherichia coli* in *Bacteroides fragilis*, na kateri je opioid tudi močnejše vplival, rast pričeli pri koncentraciji tramadola 3,125 mg/mL.

Naše rezultate smo skušali primerjati z do sedaj znanimi sorodnimi raziskavami. Zato smo se obrnili na različne vire, članke, ki so obravnavali sorodno področje raziskav. Najlažje smo rezultate primerjali z raziskavo M.A.M. Rogers in D.M. Aronoff-a (2015). Čeprav je bila uporabljena drugačna metoda, je tema raziskave bila zelo podobna, saj so namreč v raziskavo vključili 155 odraslih ljudi, ki so 30 dni uživali predpisana zdravila ter nato preiskovali vzorce blata. 40% teh je jemalo analgetike, ki so v primerjavi z ljudmi, ki zdravil niso jemali, črevesno mikrobioto spremenili. Število nekaterih bakterij, kot so različne vrste *Bacteroides*, se je povečalo, med tem ko se je pri nekaterih zmanjšalo. Ena glavnih ugotovitev pa je bila, da na število mikroorganizmov v črevesni mikrobioti ne vpliva število (količina) užvanih zdravil, vendar vrsta. To smo nekako ugotovili tudi mi, ko smo videli očitno razliko v vplivu paracetamola in acetilsalicilne kisline ter tramadola na proučevane mikroorganizme. Kjer paracetamol ne glede na višino koncentracije ni imel tako močnega vpliva, kot acetilsalicilna kislina in tramadol pri nižjih koncentracijah. Čeprav so tukaj naredili raziskave glede na uživanje različnih zdravil, med katere sodijo tudi probiotiki in antidepresivi, smo vseeno lahko opazili podobnosti v rezultatih, kjer so bili proučevani vplivi analgetikov.

Ugotovitev, pridobljena iz naših rezultatov, da opioid zaustavlja rast večine mikroorganizmov, se ujema z ugotovitvami v raziskavi Li Zhang-a in sodelavcev (2019). Ti so raziskovali vpliv morfina na miši in vlogo črevesne mikrobiote pri takšnem zdravljenju. Čeprav so ti ob zdravljenju z opiatom dodajali probiotike, se je vseeno pokazal očitni vpliv le tega, saj je v črevesni mikrobioti povzročil zmanjšano število mikroorganizmov. Podobne rezultate smo dobili mi, kjer v najvišjih koncentracijah pri večini mikroorganizmov ni bilo rasti.

Raziskava H. Farzam, A. Farahani in sodelovcev (2018), je proučevala vpliv tramadola na bakteriji *Staphylococcus aureus* in *Pseudomonas aeruginosa*. Metoda, ki so jo uporabljali je slonela na poskusih na miših, na katerih je bil proučevan vpliv dveh različnih koncentracij

tramadola; 25 mg/mL in 12,5 mg/mL. Članek prav tako omeni, da ti bakteriji pogosto povzročita oz. se pojavita na mestu okužbe na mestu vboda, pri neželenih učinkih regionalne in lokalne anestezije ter pri epiduralnem abscesu in meningitisu. Rezultati v povezavi z bakterijo *Pseudomonas aeruginosa* podobno nakazujejo odpornost te bakterije na vpliv tramadola, saj je bakterija bila odporna na vpliv obeh koncentracij. Razlika z našo raziskavo je bila tudi v času opazovanja, saj so v omenjeni raziskavi opazovali odziv na opioid po 48h, medtem ko smo mi to spremljali samo po 24h. Po tem času se je namreč premer vnetja oz. rast bakterije pri obeh odmerkih statistično povečal.

Metode, ki smo si jih izbrali so temeljile izključno na kvalitativnem opazovanju odziva mikroorganizmov na analgetike, saj smo opazovali samo gojišča in rast mikroorganizmov.

Rast smo definirali glede na negativne (bujon + analgetik) in pozitivne (bujon + mikroorganizmi) kontrole, kjer nam je lahko negativna kontrola pokazala izgled gojišča brez rasti mikroorganizmov ter pozitivna izgled rasti, saj analgetikov, ki bi to lahko zatirali, ni bilo prisotnih.

Drug pristop bi lahko bil opazovanje obnašanja manjše živali; miši, podgane ali opazovanje ljudi, ki redno uživajo izbrana zdravila in bi raziskovali vsebnost blata. Našo metodo smo izbrali zato, ker je bila najbolj preprosta in nam pri delu ni prinesla veliko ovir, na katere bi naleteli pri drugih metodah, ki vključujejo ljudi ali živali. Odločili smo se za dve stopnji poskusa. To smo naredili, saj smo tako lažje spremljali opažanja in jih sproti zbirali. V prvi stopnji smo tako določili osnovne parametre, okvirne koncentracije posameznega analgetika, pri katerih je bila rast prisotna in kje že zavrta. Glede na te ugotovitve pa smo nadaljevali s poskusom, s katerim smo s pripravo dodatnih koncentracij znotraj določenih parametrov iz prvega poskusa bolj natančno določili, kdaj je bila rast mikroorganizmov preprečena oz. je bila koncentracija previsoka za njihovo rast. Z izbiro teh metod smo pridobili le kvalitativne rezultate, saj smo z opazovanjem prisotne razvite obarvanosti dokazovali ali so mikroorganizmi v koncentraciji analgetika prisotni ali ne. Svoje raziskave bi morda lahko v prihodnosti nadgradili s kvantitativnim spektrofotometričnim merjenjem, ki bi omogočalo hkrati tudi določiti koncentracijo (število) mikroorganizmov v posameznem gojišču.

Izbrali smo tri analgetike; aspirin, tramadol in paracetamol. Vsak od teh je vsakodnevno najbolj uporabljen analgetik svoje skupine. Čeprav je morda tramadol za nekatere ne tako znan opioid kot npr. morfin, smo se za tega odločili, saj slednjega nismo uspeli uporabiti zaradi težje dostopnosti.

Za raziskavo smo izbrali glavne predstavnike mikroorganizmov, ki so prisotni v črevesni mikrobioti in so nam bili za delo dostopni in nezahtevni. Ob tem smo morali paziti tudi na to, da nam ob delu ne bi neposredno ogrožali zdravja.

Ob gojenju le teh smo morali paziti na pravšnje razmere, kot je npr. dovolj velika vsebnost bujona v gojišču. Če se na to ne bi ozirali, bi lahko prišlo do ne realnih rezultatov, saj bi bila rast v primeru, kjer bi bilo bujona premalo, manjša ali te sploh ne bi bilo, ne glede na dodano koncentracijo analgetika. Zato smo na to morali biti zelo pazljivi. Iz enakih razlogov smo gojišča pustili inkubirati za 24h in nekatere anaerobe tudi 48h v vlažnem okolju. Čeprav se morda napake niso pripetile, smo na njih naleteli ob nanašanju gojišč v mikrotitetsko ploščo, zaradi česar smo morali v določenih primerih poskus ponoviti. To bi morda lahko preprečili, če bi po vsakem nanosu gojišča zapisali na list papirja, katero gojišče smo že nanesli v posamezno vdolbinico. Do napak pa bi lahko prišlo tudi zaradi slabe higijene, vendar smo na to zelo pazili in sproti razkuževali površino in pripomočke ter menjavali plastične nastavke na pipetah.

Meniva, da smo si dobro izbrali vrste analgetikov in mikroorganizmov, ker smo tako pokrili vse glavne skupine, saj smo namreč iz vsake izbrali enega predstavnika. Vsi mikroorganizmi pa so v osnovi tudi del črevesne mikrobiote. Morda bi raziskavo lahko nadgradili, če bi v preiskavo dodali več različnih vrst mikroorganizmov in več različnih analgetikov. Prav tako pa misliva, da smo si odlično zamislili način dela, ki smo ga opravili v dveh stopnjah, da smo imeli lažjo možnost zbiranja in razporejanja vseh novo pridobljenih podatkov. Ponovno bi to lahko izboljšali, če bi se odločili za še več stopenj in raziskavo vodili, tako da bi dobili še bolj natančne koncentracije, kjer se je rast mikroorganizmov ustavila. Čeprav smo preverjali rezultate po 24h oz. 48h, saj je tako bila predvidena časovnica rasti, bi lahko počakali še nekaj ur ali dni, saj se bi morda mikroorganizmi čez nekaj časa ponovno drugače odzvali na dodane substance. Zavedamo se, da naš poskus ni bil popolnoma povezan z črevesno mikrobioto, saj smo si za preiskavo izbrali preprosto okolje, ki ni imelo veliko podobnih lastnosti s tisto v mikrobioti. Raziskavo bi lahko nadgradili, če bi gojišča lahko spremenili tako, da bi bila bolj podobna okolju v črevesni mikrobioti. Kar bi pomenilo, da bi imela podoben pH, vsebnost drugih snovi ipd. Vseeno pa je bila velika pozitivna stran izbrane metode ta, da smo hkrati uspeli spremljati odziv petih različnih mikroorganizmov na izbrane analgetike pod enakimi, kontroliranimi pogoji.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Sama raziskovalna naloga morda na prvi pogled nima posebnega pomena v vsakdanjem življenju. Vendar sva verjeli, da bova z novimi, morda pred tem ne raziskanimi podatki, lahko pomagali družbi v vsaj majhnem smislu. Vsak dan se ljudje spopadajo z boleznimi, ki povzročajo močne bolečine in zahtevajo predpisano uživanje protibolečinski zdravil oz. analgetikov. Namreč že skoraj vsaka oseba vzame paracetamol ob povišani telesni temperaturi in glavobolu. Redko kdaj pa se vprašamo, ali lahko tudi predpisana »zdrava« količina zdravil povzroči negativen vpliv našemu telesu.

Z našo raziskavo, kjer smo preiskovali vpliv različnih koncentracij analgetikov na mikroorganizme, ki so del črevesne mikroflore, smo pridobili veliko uporabnih podatkov. Z različnimi koncentracijami smo želeli prikazati, količino zaužitih zdravil, saj smo želeli preveriti ali ima količina večji vpliv kot vrsta analgetika. Ugotovili smo, da je vrsta imela večji vpliv kot količina. Čeprav obe zaustavita rast vsaj nekaterim mikroorganizmom, so nekateri analgetiki veliko močneje zatirali razvoj, ne glede na količino. Zaradi onemogočenega razvoja mikroorganizmov, bi lahko vodilo do drugačnega delovanja črevesne mikrobiote. Ta pa je za nas zelo pomembna. S tem smo želeli obvestiti ljudi o potencialnih nevarnostih oz. stranskih učinkih, ki morda niso vsakodnevno omenjeni. Zato upava, da bi s tem lahko vzbudili nove ideje, ki bi morda lahko rešile in predvidele različne težave, ki jih zdravila lahko povzročijo.

8 ZAKLJUČEK

Ob zaključenem delu smo opazili veliko nepredvidljivih stvari, ki so se zgodile tekom dela. Zato smo se vrnili na naše predpostavljene hipoteze, ki so nam pomagale podati pravi pogled na vse rezultate.

Vidimo lahko, da smo nekatere rezultate in ugotovitve pravilno predvidevali, kot je bila zadnja hipoteza; Najbolj odporna na analgetike bo bakterija *Pseudomonas aeruginosa*. To smo predvidevali, glede na podatek, ki trdi, da je ta bakterija pogosto prisotna pri okužbah, povzročenih pri mestu vboda, z injekcijo. Iz tega smo predvidevali, da je bakterija zelo odporna iz vidika, da se pojavi zelo hitro in na neobičajnem okolju. Hipotezo smo si potrdili z rezultati, kjer je bila rast te prisotna pri najvišjih koncentracijah tramadola in pracetamola in je to zaustavila samo acetilsalicilna kislina, ki je rast začela zavirati v koncentraciji 25 mg/mL.

Glede na te rezultate pa lahko ugotovimo, da smo prvo hipotezo; Pričakovali smo, da pri najvišjih koncentracijah v prisotnosti kateregakoli analgetika ne bo prisotnosti mikroorganizmov, narobe predpostavili oz. jo lahko ovržemo. Ugotovili smo namreč, da je bila rast prisotna tudi v gojiščih z najvišjimi koncentracijami paracetamola in ponekod tudi tramadola.

Kar nam ponovno dokaže, da je bila naša predpostavljena hipoteza; Največji negativen vpliv na rast mikroorganizmov bo imel opioid, popolnoma nepravilna. Za ta analgetik se je izkazala acetilsalicilna kislina, ki je zelo dobro zatirala rast kateremu koli mikroorganizmu.

Kar nekaj rezultatov nas je zelo presenetilo in nas tudi naučilo veliko novega o delovanju mikroorganizmov in kako na njih vplivajo določeni analgetiki tudi v črevesni flori v realnosti. Zavedamo se omejitvev, da je naša raziskava bila omejena le na določeno število bakterij in na ozko okolje, ki se razlikuje od realne človeške črevesne flore. Kljub temu pa bi naša spoznanja morda lahko pripomogla k nadaljnjim raziskavam vpliva analgetikov na delovanje črevesne flore in morda tudi na razvoj raziskav o preprečevanju tega vpliva ob pogostem uživanju analgetikov.

9 VIRI IN LITERATURA

- Arrieta M. C., Stiemsma L.T., Amenyogbe N., Brown E. M. in Finlay B., (2014). The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Frontiers in immunology*; 5(5), 427. Dostop na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00427/full> [13.2.2022]
- Albenberg L., Esipova T. V., Judge C. P., Bittinger K., Chen J., Laughlin A., idr., (2014). Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology* 147, 1055–1063. Dostop na: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.07.020> [12. 2. 2022].
- Baotman O.A., Zamzami M. A., Taher I., Abubaker J. in Abu-Farha M., (2016). The role of gut microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids in health and disease*, 15(108). Dostop na: <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0278-4> [13.2.2022]
- Bäckhed F., Ley R. E., Sonnenburg J. L., Peterson D. A. in Gordon, J. I., (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717), 1915-1920. Dostop na: <https://doi.org/10.1126/science.1104816> [25.2.2022]
- Brahe L.K., Astrup A. In Larsen L. H., (2016). Can we prevent obesity-related metabolic diseases by dietary modulation of the gut microbiota?. *Advances in nutrition*, 7(1), 90-101. Dostop na: <https://doi.org/10.3945/an.115.010587> [13.2.2022]
- Braïek O. B., Smaoui S., (2019). *Enterococci*: Between emerging pathogens and potential probiotics. *BioMed Res. Int.*, 19, 1–13.
- Buffie C.G., Pamer E.G., (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 13, str. 790–801.
- Byappanahalli M. N., Nevers M. B., Korajkic A., Staley Z. R., & Harwood V. J. ,(2012). *Enterococci in the environment. Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR*, 76(4), 685–706. Dostop na: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12> [22. 2. 2022].

Canstansys-Muñoz E., Martin M. J. In Vazquez E., (2016). Building a beneficial microbiome from birth. *Advances in nutrition*; 7(2), 323-330.

Dostop na: <https://academic.oup.com/advances/article/7/2/323/4558089> [13.2.2022]

Chakraborti C.K., (2015). New-found link between microbiota and obesity. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 6(4), 110-119.

Dostop na: <https://www.wjgnet.com/2150-5330/full/v6/i4/110.htm> [12. 1. 2022].

Chen X., Song Y.Q., Xu H.Y., Menghe B.L., Zhang H.P., Sun Z.H., (2015). Genetic relationships among *Enterococcus faecalis* isolates from different sources as revealed by multilocus sequence typing. *J Dairy Sci.*;98(8):5183–93. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9571> [22. 2. 2022].

Collen A., (2016). *10-odstotno človek: vse kar morate vedeti o "svojih" bakterijah, ki jih še kako potrebujete*. Ljubljana: Mladinska knjiga.

Conway T., Cohen P.S., (2015). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* metabolism in the gut. *Microbiology Spectrum*, 3, 3: 24 str.

Cuevas-Sierra A., Ramos-Lopez O., Riezu-Boj J. I., Milagro F. I. in Martinez J. A., (2019). Diet, Gut microbiota, and obesity: Links with host genetics and epigenetics and potential applications. *Advances in nutrition*, 10(1), S17-S30.

Dostop na: <https://doi.org/10.1093/advances/nmy078> [12. 1. 2022].

C. M. A. P. Franz, M. Huch, H. Abriouel, W. Holzapfel, A. Gálvez, (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.*, 151(2), 125– 140.

Diggle S. P. in Whiteley M. (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (Reading, England)*, 166(1), 30–33. Dostop na: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860> [22. 2. 2022].

Dragaš A. Z., (2004). *Mikrobiologija z epidemiologijo*. Ljubljana, Slovenija: DZS.

- Endo A., Pärty A., Kalliomäki M., Isolauri E., Salminen S., (2014). Long-term monitoring of the human intestinal microbiota from the 2nd week to 13 years of age. Dostop na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24933584/> [12. 2. 2022].
- Elsaghir H., Reddivari A. K. R., (2021). *Bacteroides Fragilis*. StatPearls Publishing. Dostop na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553032/#!po=1.19048> [12. 2. 2022].
- Farzam H., Farahani A., Tafkik A., Karaji A. G., Mohajeri P., Razaee M., Jalalvandi F. ,(2018). *Sciencedirect*:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2052297518300295> [3. 3. 2022].
- Finegold S. M., Baron E. J., Wexler H. M., (1992). A clinical guide to anaerobic infections. Belmont, STAR Publishing Company: str.159
- Finegold S. M., Jousimies-Somer H., (1997). Recently described clinically important anaerobic bacteria: taxonomic aspects and update. *Clinical Infectious Diseases*, 25, Suppl. 2: S78-S87
- Fouhy F., Guinane C., Hussey S., Wall R., Ryand A., Dempsey E. in sod., (2012). High Throughput Sequencing Reveals the Incomplete, Short-Term Recovery of Infant Gut Microbiota following Parenteral Antibiotic Treatment with Ampicillin and Gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11), str. 5811–5820. Dostop na: <http://aac.asm.org/content/56/11/5811> [25. 2. 2022].
- Hajdinja E., (2014). Drugi neopioidni in ne-NSAID analgetiki v urgentni medicini. *Urgentna medicina, izbrana poglavja. 2014*; str. 30-31
- Herman S., (2014). Neopioidni analgetiki – nesteroidna protivnetna zdravila. *Urgentna medicina, izbrana poglavja. 2014*; str. 24-25
- Huycke M. M., Sahm D. F., and Gilmore M. S., (1998). Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* 4:239-249.

- Jančar P., (2009). Šibki opioidi: med NSAR in morfinom?. *Farm vestn*, 60; str. 105-109
- Jandhyala S. M., Talukdar R., Subramanyan C., Vuyyuru H., Sasikala M. in Reddy D. N., (2015). Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology*, 21(29); 8787-8803. Dostop na: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i29/8787.htm> [4.1.2022]
- Jiménez E., Marín M.L., Martín R., Odriozola J.M., Olivares M., Xaus J., Fernández L., Rodríguez J.M., (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.*, 159(3), str. 187–93.
- Johnson J. R., (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4, 1: 80–128
- Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.T., (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews*, 2: 123–140
- Kerec Kos M., (2012). Zdravila za zdravljenje bolečine. *Farmaceutski vestnik*, 1(63), 6-9.
- Kim B., Choi H. in Yim J., (2019). Effect of diet on the gut microbiota associated with obesity. *Journal of obesity & metabolic syndrome*, 28(4), 216-224. Dostop na: <https://doi.org/10.7570/jomes.2019.28.4.216> [13.2.2022]
- Kovačević S. Z., Podunavac Kuzmanović S. O., Jevrić L. R., (2013). *Acta Chim. Slov.*, 60, 756-762. Dostop na: <https://www.dlib.si/stream/URN:NBN:SI:DOC-I6PFFXK4/55caa700-caa1-4bd9-979e-9e3917e58de9/PDF> [12. 2. 2022].
- Kočevar U. In Gartner U., (2006). Izražanje encimov ciklooksigenaza-1 in ciklooksigenaza-2 v zdravem srcu in v srčnem infarktu pri človeku. *Medicinski razgledi*, 45(3), 237-252.
- Laparra J.M., Sanz, Y., (2009). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Elsevier*, 61, str. 219–223.

- Leimbach A., Hacker J., Dobrindt U., (2013). *E. coli* as an all-rounder: The thin line between commensalism and pathogenicity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358: 3–32
- Lepage E., Brinster S., Caron C., Ducroix-Crepy C., Rigottier-Gois L., Dunny G., Hennequet-Antier C., Serron P., (2006). Comparative genomic hybridization analysis of *Enterococcus faecalis*: identification of genes absent from food strains. *Journal of Bacteriology*, 188: 6858–6868
- Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A., Clark D.P., (2012). Brock biology of microorganisms. 13th ed. Boston, Pearson Education Inc.: 116 str.
- Marx T., (2015). *Immunoprotective Effects of Probiotics in the Elderly; Foods and Dietary Supplements in the Prevention and Treatment of Disease in Older Adults*. Academic Press. Dostop na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418680-4.00035-X> [3. 2. 2022].
- Mimica Matanović S., (2014). Farmakokinetika i farmakodinamika analgetika. *Medicus*, 23(1), 31-46.
- Mundy L.M., Sahn D.F., Gilmore M., (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 4: 513–522
- Nagy E., (2010). Anaerobic infections: Update on treatment considerations. *Drugs*, 70(7), 841-858
- Nestrenko S., (2010). Neue Energie ohne Candida. *Rainer Bloch Verlag*.
- Novak Štagoj M., Podobnik M., (2006). Kvasovke – tovarne rekombinantnih proteinov. *Farm vestn*; 57, str. 235-240. Dostop na <https://www.dlib.si/stream/URN:NBN:SI:DOC-4ZE093SV/1354ea25-e9b7-4780-b85b-18123894692c/PDF> [12. 2. 2022].
- Palmer C., Bik E., DiGiulio D., Relman D., Brown P., (2007). *Plos Biology: Development of the Human Infant Intestinal Microbiota*.
Dostop na: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177> [16. 2. 2022]

- Pavšar H., Pustoslemšek P. In Hohler A., (2016). *O pravilni in varni uporabi zdravil – Zdravila in bolečina*. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo.
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K. S., Manichanh C., ... Wang J., (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65. Dostop na: <https://www.nature.com/articles/nature08821> [13.2.2022]
- Rajilić-Stojanović M. in de Vos W. M., (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS microbiology Reviews*, 38(5), 996-1047. Dostop na: <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12075> [13.2.2022]
- Richardson M. in Warnock D., (2003). *Fungal Infection Diagnosis and Management*. Oxford: Blackwell Science
- Riley M., Abe T., Arnaud M. B., Berlyn M.K., Blattner F.R., Chaudhuri R.R., Glasner J.D., Horiuchi T., Keseler I.M., Kosuge T., Mori H., Perna N.T., Plunkett G. 3rd, Rudd K.E., Serres M.H., Thomas G.H., Thomson N.R., Wishart D., Wanner B.L., (2006). *Escherichia coli* K-12: A cooperatively developed annotation. *Nucleic Acids Research*, 34: 1-9
- Ring, T. (2018). *Občutljivost slovenskih izolatov večkratno odpornih gramnegativnih bacilov za kolistin*. Prevezeto 17. 1. 2022.
- Rogers M.A.M., Aronoff D.M., (2015). *The influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the gut microbiome*.
Sciencedirect:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X15009027>
[3. 3. 2022].
- Salyers A. A., (1984). *Bacteroides of the human lower intestinal tract*. *Annu Rev Microbiol*; 38:293-313. Dostop na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6388494/> [12. 2. 2022].
- Spletni vir, (2017). Anaerobni mikroorganizmi. (v besedilu pod (spletni vir - 1)) Dostop na: <https://biologydictionary.net/anaerobic-organism/> [28. 2. 2022].

Spletni vir. Aerobni mikroorganizmi. (v besedilu pod (spletni vir - 2)) Dostop na: <https://www.vedantu.com/biology/difference-between-aerobic-and-anaerobic-bacteria> [28. 2. 2022].

Stephens R. W., Arhire L. In Covasa M., (2018). Gut microbiota: from microorganisms to metabolic organ influencing obesity. *Obesity*, 26(5), 801-809. Dostop na: <https://doi.org/10.1002/oby.22179> [13.2.2022]

Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warren P. idr., (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000;406:959–964. Dostop na: <https://doi.org?10.1038/35023079> [22. 2. 2022].

Stropnik K., (2010). *Didaktični pristop pri obravnavi interdisciplinarne učne vsebine – Aspirin* (Diplomsko delo). Pedagoška fakulteta, Ljubljana.

Stropnik Z., (1958). Kandida in kandidijaze. *Obzornik zdravstvene nege*, 2, str. 99-102. Dostop na: <https://obzornik.zbornica-zveza.si/index.php/ObzorZdravNeg/article/view/479> [24. 2. 2022].

Šarc L., Jamšek M., (2009). Zastrupitve z neopioidnimi analgetiki. *Medicinski razgledi, letnik 48, številka 1/2, str. 59-64.*

Wexler H. M., (2007). Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev.* Oct;20(4): 593-621. Dostop na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2176045/> [12. 2. 2022].

Vesel V., (2008). Ukrotite kandido na povsem naraven način. Ljubljana: Agencija Baribal

Zalar P., Jančič S. in Gunde Cimerman N., (2012). *Mikrologija, priročnik za vaje s teoretičnimi osnovami pri izbirnem predmetu za študente biologije.* Ljubljana, Slovenija.

Zhang L., Meng J., Ban Y., Jalodia R., Chupikova I., Fernandez I., Brito N., Sharma U., Abreu M.T., Ramakrishnan S., Roy S., (2019). *Morphine tolerance is attenuated in germfree mice*

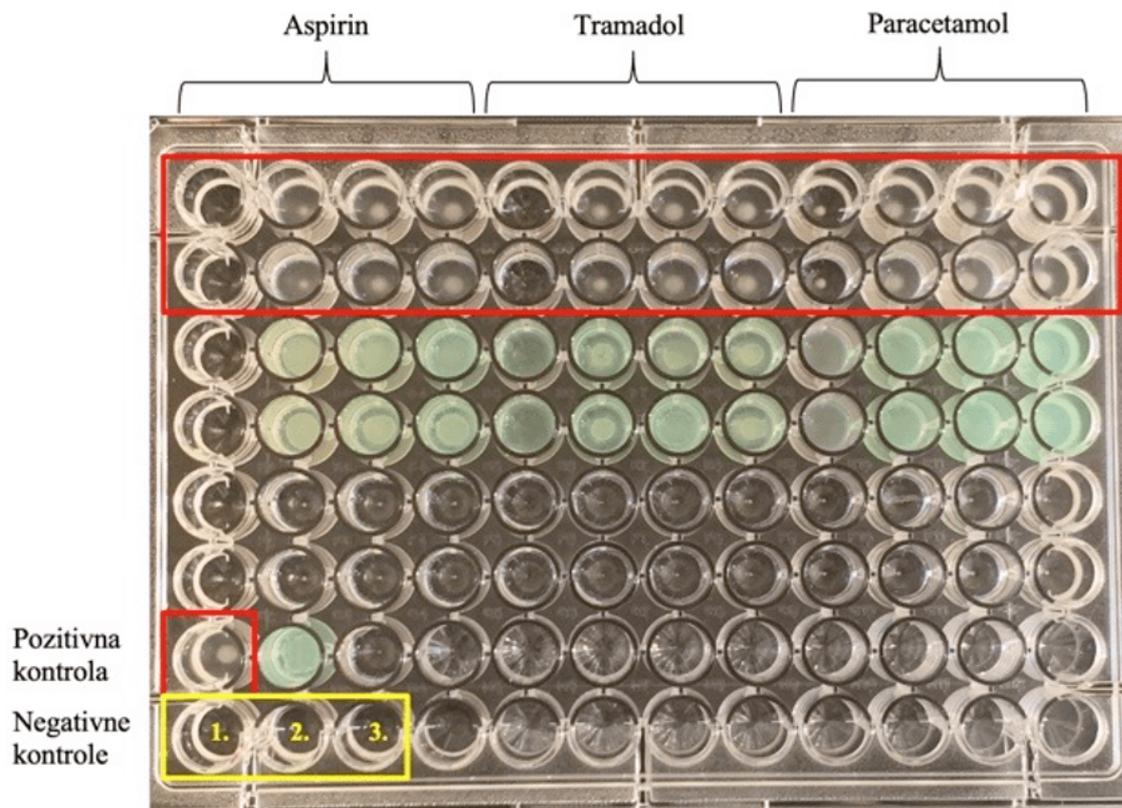
and reversed by probiotics, implicating the role of gut microbiome. PNAS. Dostop na: <https://www.pnas.org/doi/pdf/10.1073/pnas.1901182116> [3. 3. 2022].

Žalig S., Rupnik M., (2014). Clostridium difficile infection and gut microbiota. V *Seminars in Colon and Rectal Surgery*, 25(3), str. 124–127. Dostop na: <http://www.sciencedirect.com/journal/seminars-in-colon-and-rectal-surgery> [12. 1. 2022].

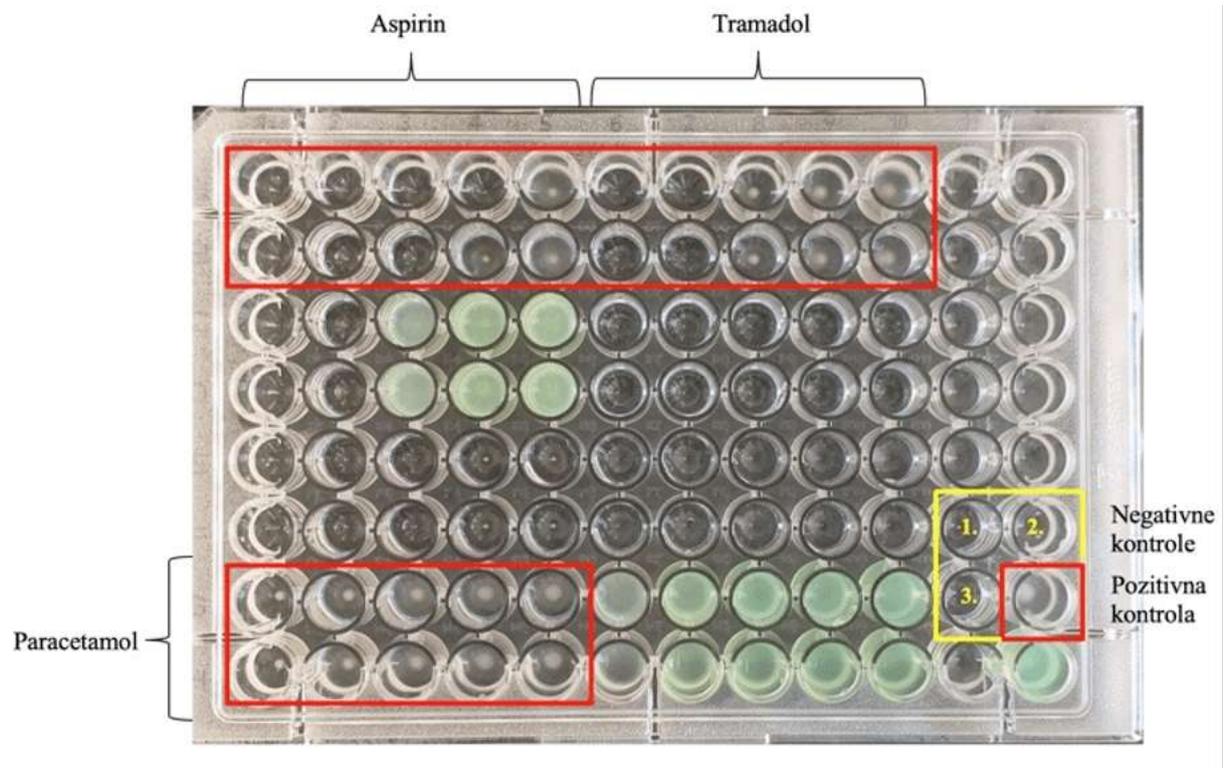
Žgur-Bertok D., Starčič Erjavec M., (2009). *Teoretične osnve in navodila za vaje pri predmetu mikrobna genetika*. Ljubljana: Študentska založba.

10 PRILOGA

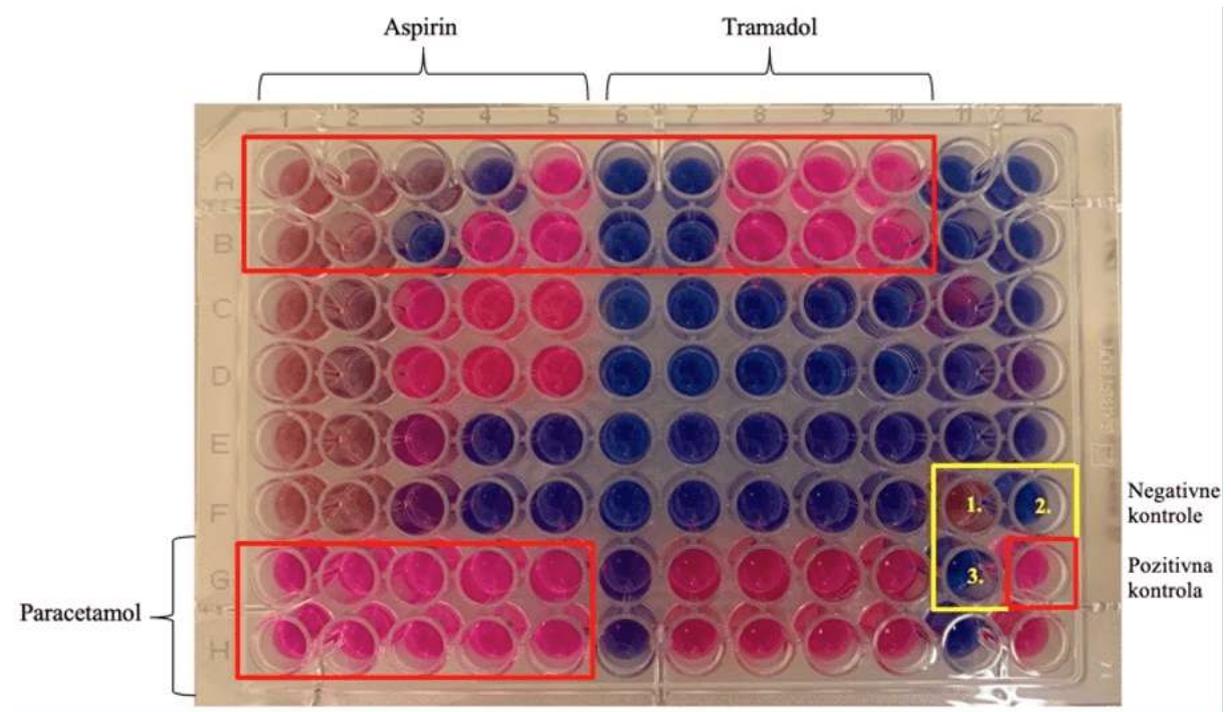
Slika 6: Rast *E. coli* v prvi stopnji poskusa (v rdečem pravokotniku zgoraj). Spodaj levo (v rdečem kvadratu) je pozitivna kontrola in (v rumenem pravokotniku) negativne kontrole analgetikov (1. – acetilsalicilna kislina, 2. – tramadol, 3. – paracetamol).



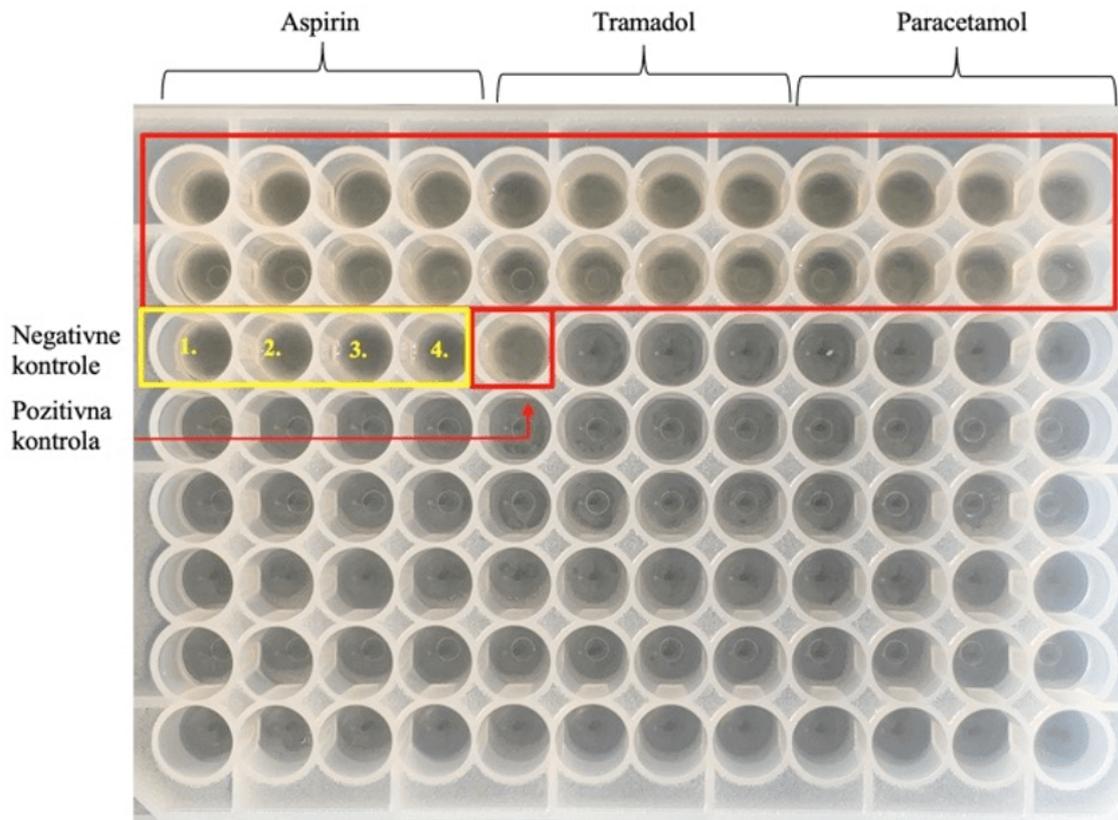
Slika 7: Rast *E. coli* v drugi stopnji poskusa (v rdečem pravokotniku zgoraj desno in levo spodaj). Desno spodaj (v rdečem kvadratu) je pozitivna kontrola in (v rumenem pravokotniku) negativne kontrole analgetikov (1. – acetilsalicilna kislina, 2. – tramadol, 3. – paracetamol).



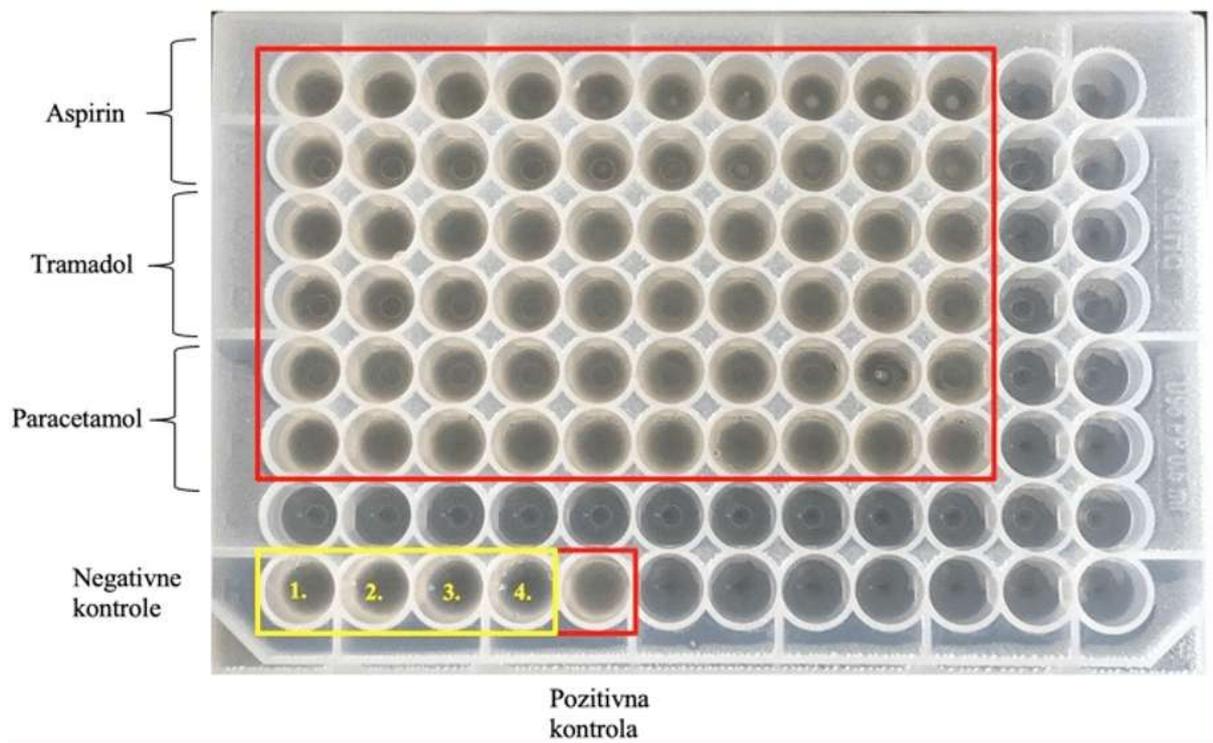
Slika 8: Rast *E. coli* v drugi stopnji poskusa z rezazurinom.



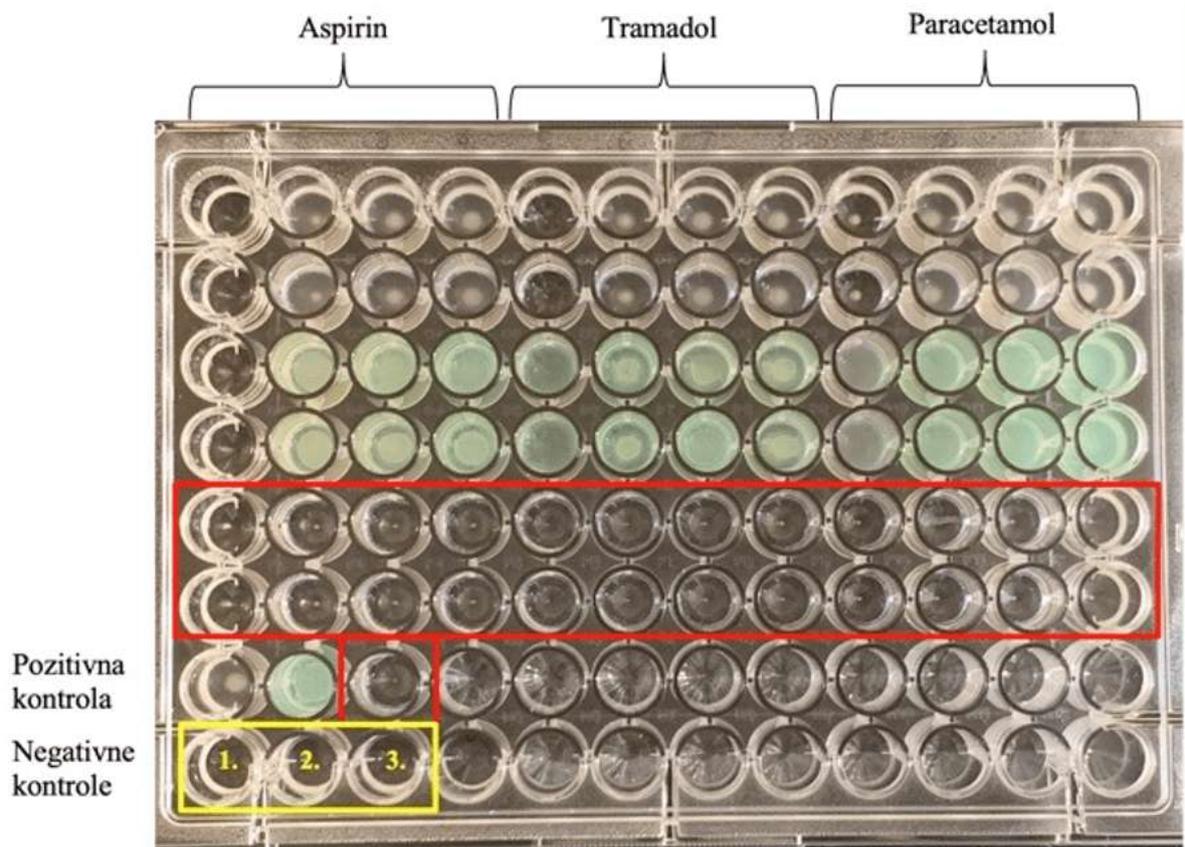
Slika 9: Rast *Bacteroides fragilis* v prvi stopnji poskusa (v rdečem pravokotniku zgoraj). Spodaj (v rdečem kvadratu) je pozitivna kontrola in (v rumenem pravokotniku) negativne kontrole (1. – voda, 2. – acetilsalicilna kislina, 3. – tramadol, 4. – paracetamol).



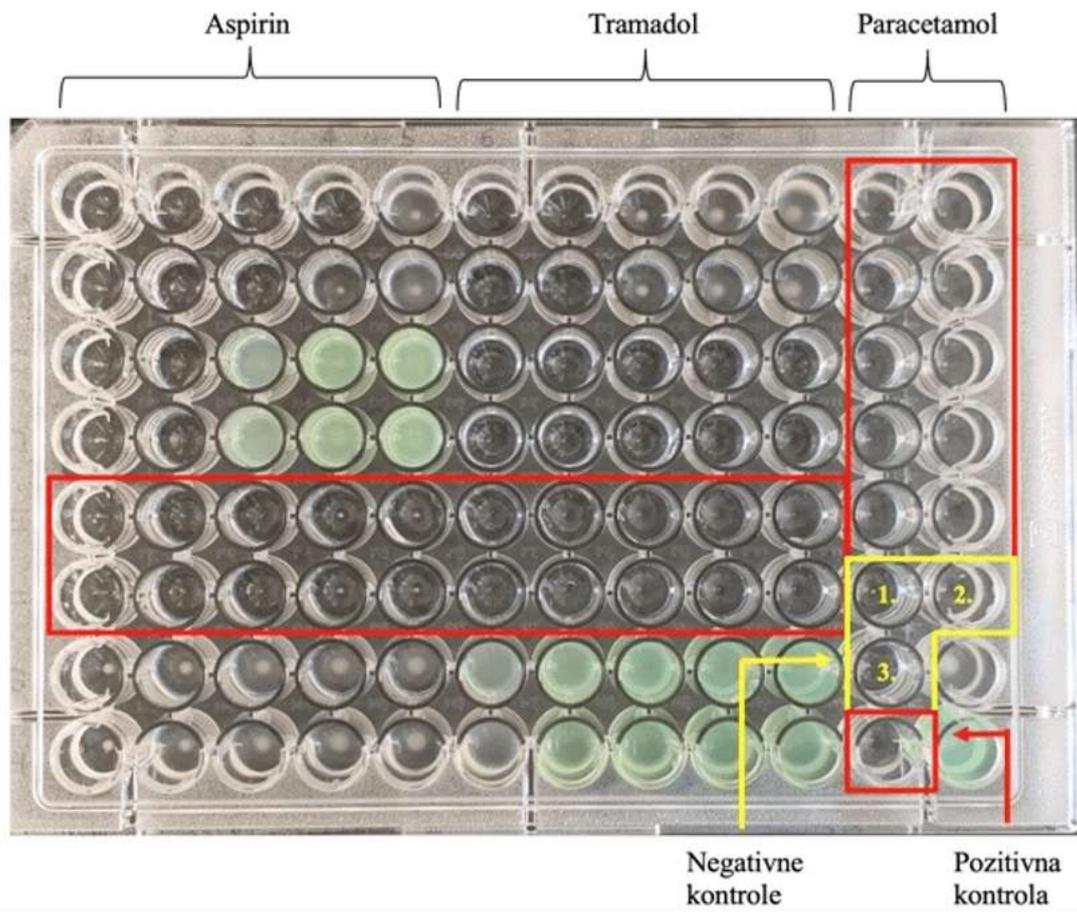
Slika 10: Rast *Bacteroides fragilis* v prvi stopnji poskusa (v rdečem pravokotniku). Spodaj (v rdečem kvadratu) je pozitivna kontrola in (v rumenem pravokotniku) negativne kontrole (1. – voda, 2. – acetilsalicilna kislina, 3. – tramadol, 4. – paracetamol).



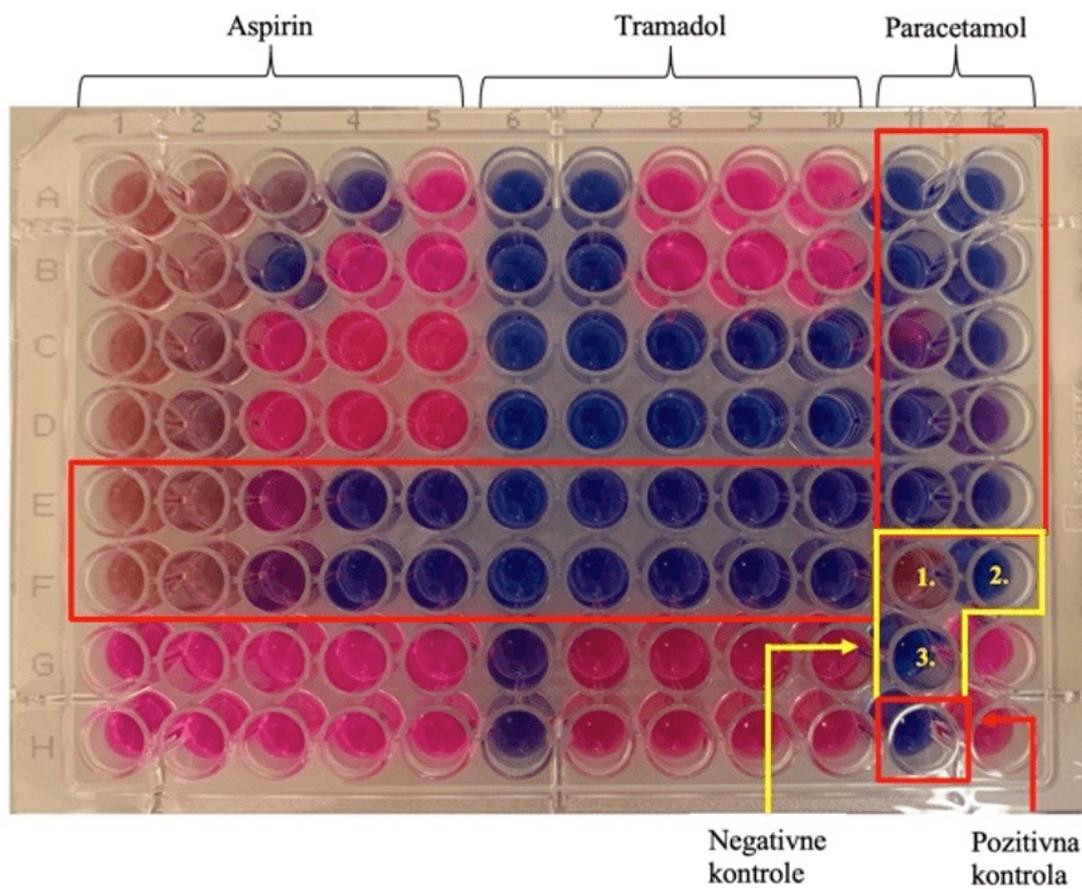
Slika 11: Rast *Enterococcus faecalis* v prvi stopnji poskusa (v rdečem pravokotniku spodaj). Spodaj levo (v rdečem kvadratu) je pozitivna kontrola in (v rumenem pravokotniku) negativne kontrole analgetikov (1. – acetilsalicilna kislina, 2. – tramadol, 3. – paracetamol).



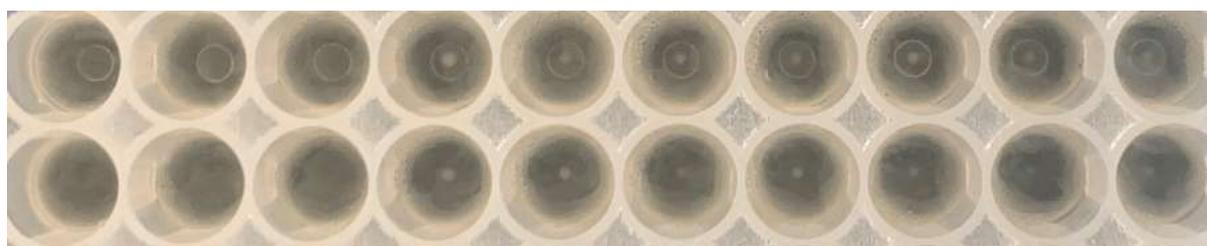
Slika 12: Rast *Enterococcus faecalis* v drugi stopnji poskusa (v rdečem pravokotniku spodaj levo in obstrani na desni). Desno spodaj (v rdečem kvadratu) je pozitivna kontrola in (v rumenem pravokotniku) negativne kontrole analgetikov (1. – acetilsalicilna kislina, 2. – tramadol, 3. – paracetamol).



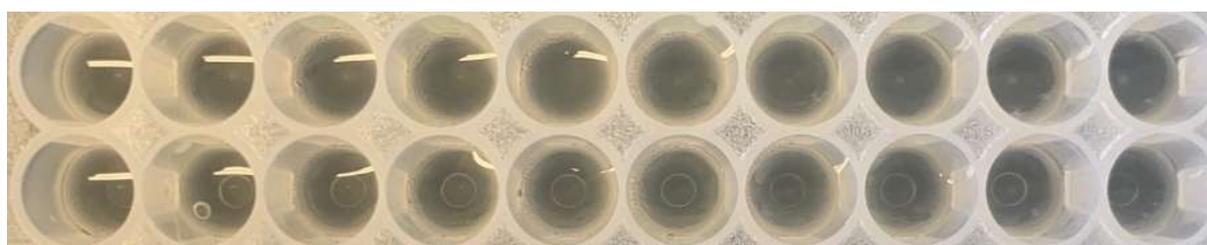
Slika 13: Rast *Enterococcus faecalis* v drugi stopnji poskusa z rezazurinom.



Slika 14: Ponovljena druga stopnja poskusa *Enterococcus faecalis* v acetilsalicilni kislini. Koncentracije kisline se višajo iz desne proti levi.



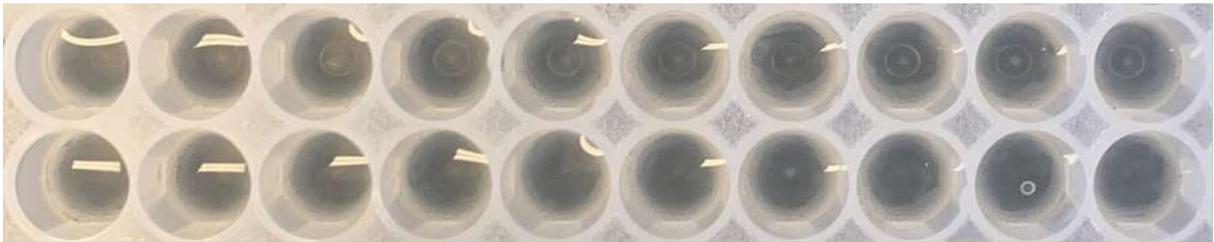
Slika 15: Ponovljena druga stopnja poskusa *Enterococcus faecalis* v tramadolu. Koncentracije analgetika se višajo iz desne proti levi.



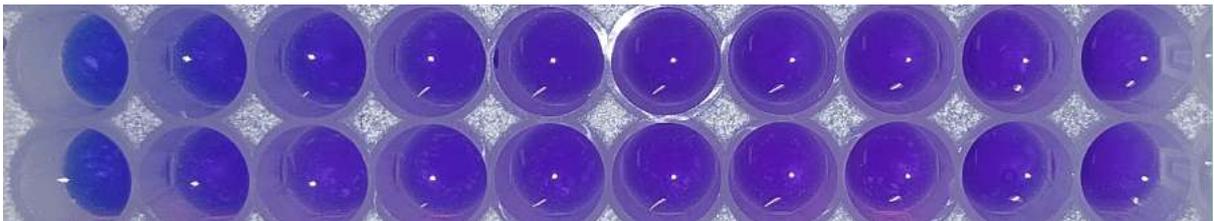
Slika 16: Ponovljena druga stopnja *Enterococcus faecalis* v tramadolu, z dodanim resazurinom.



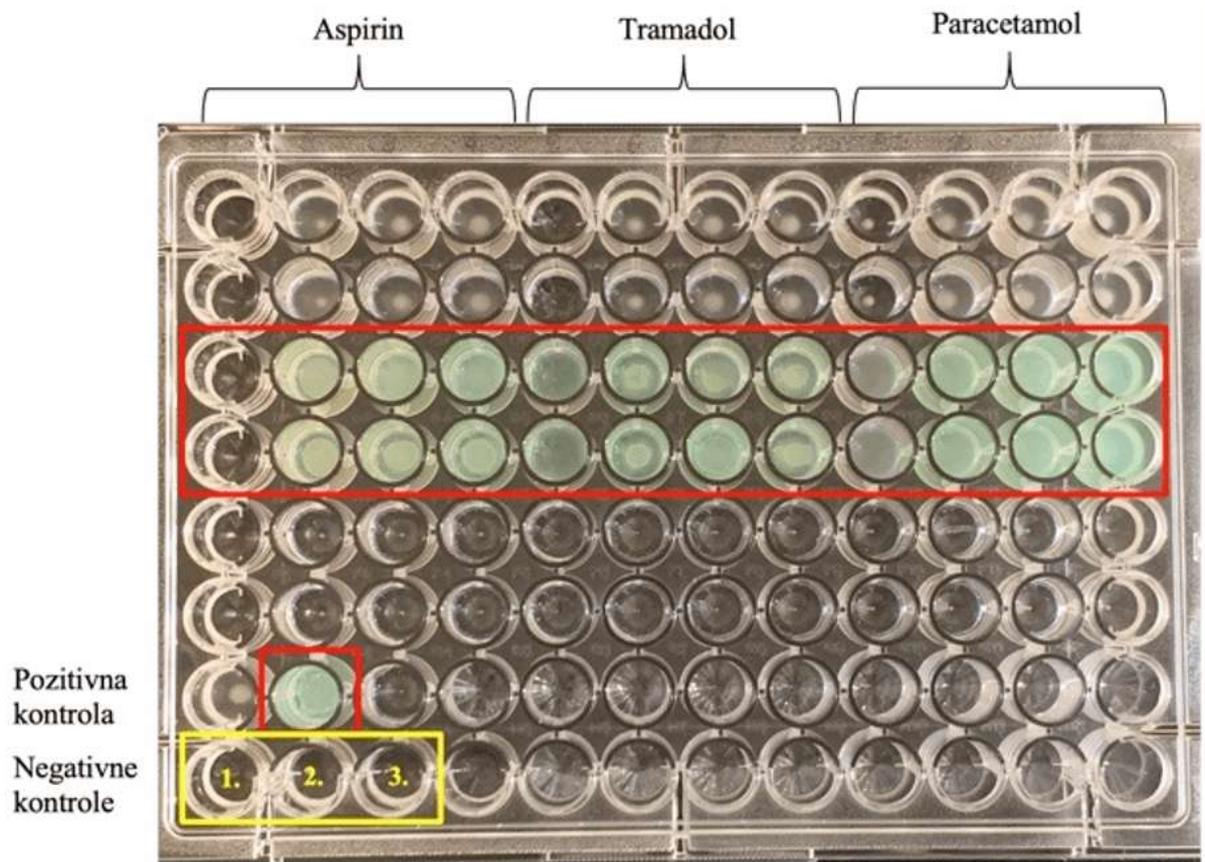
Slika 17: Ponovljena druga stopnja poskusa *Enterococcus faecalis* v paracetamolu. Koncentracije analgetika se višajo iz desne proti levi.



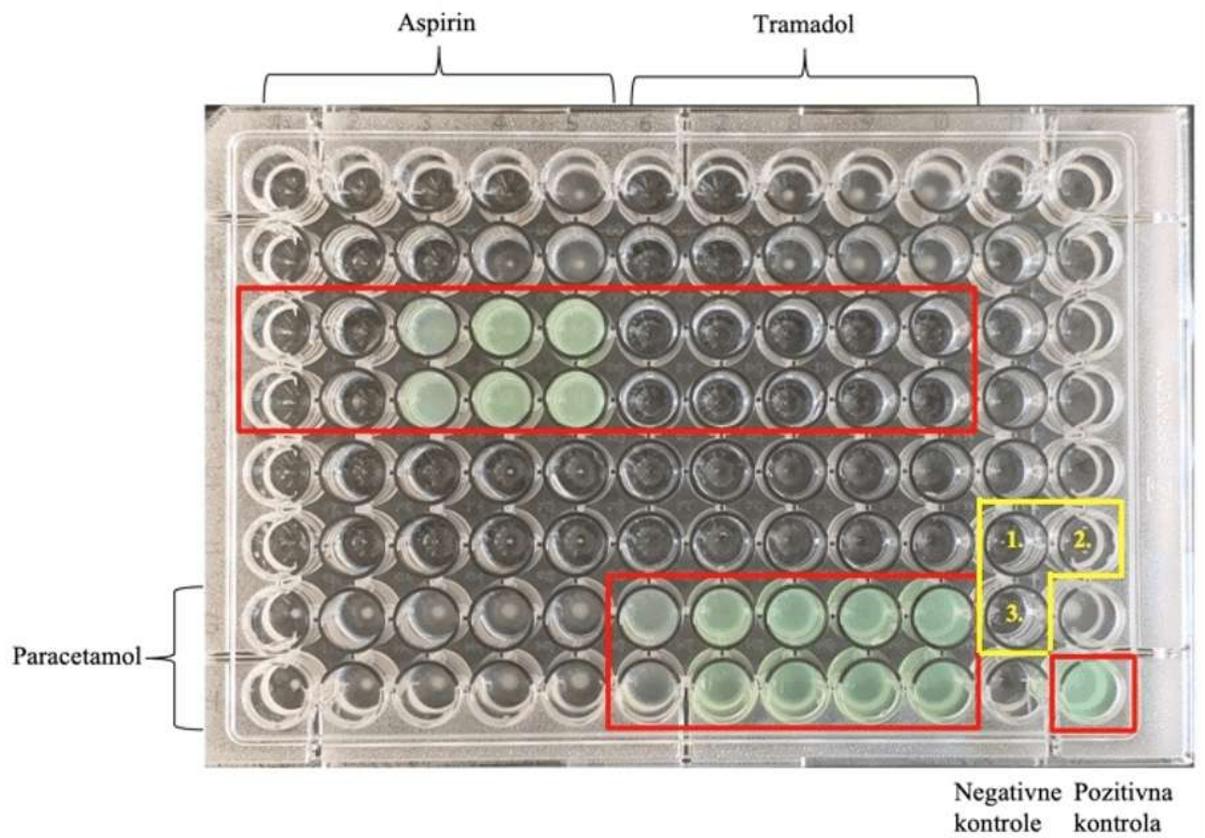
Slika 18: Ponovljena druga stopnja *Enterococcus faecalis* v paracetamolu, z dodanim resazurinom.



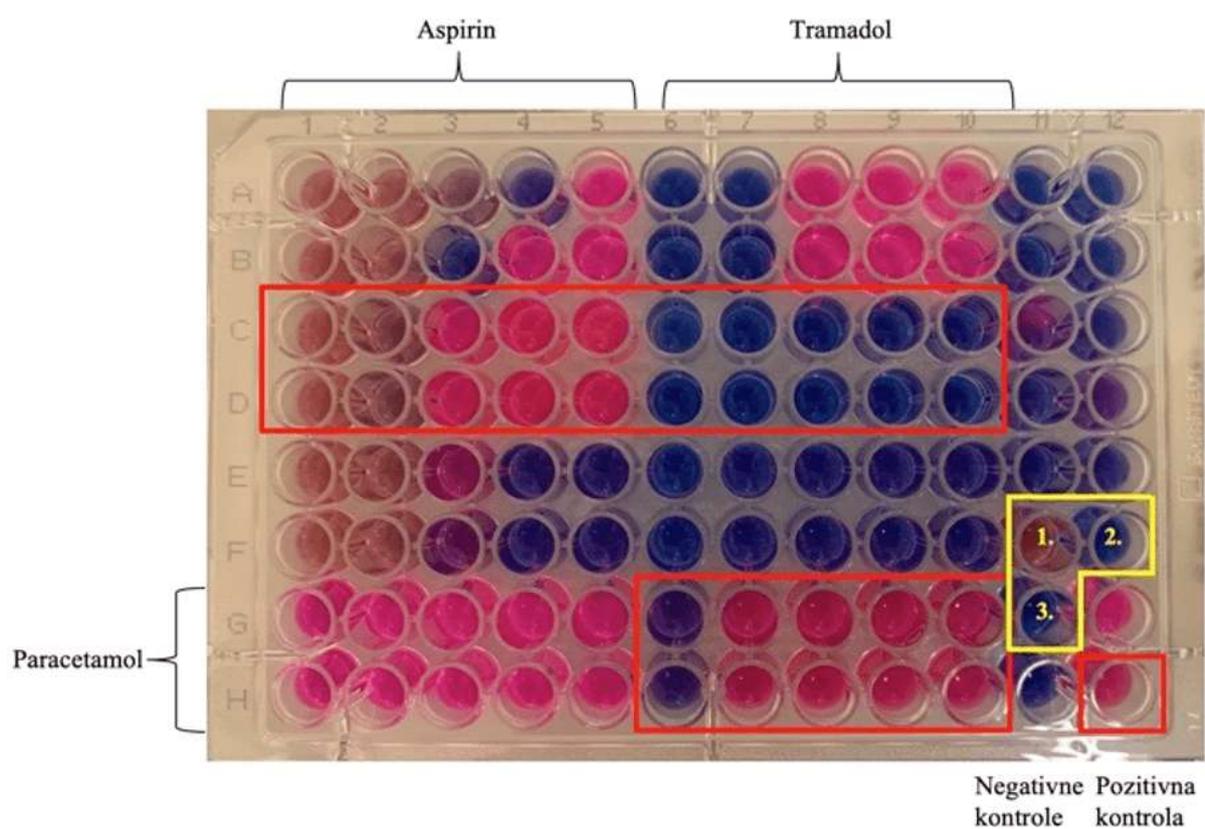
Slika 19: Rast *Pseudomonas aeruginosa* v prvi stopnji poskusa (v rdečem pravokotniku na sredini). Spodaj levo (v rdečem kvadratu) je pozitivna kontrola in (v rumenem pravokotniku) negativne kontrole analgetikov (1. – acetilsalicilna kislina, 2. – tramadol, 3. – paracetamol).



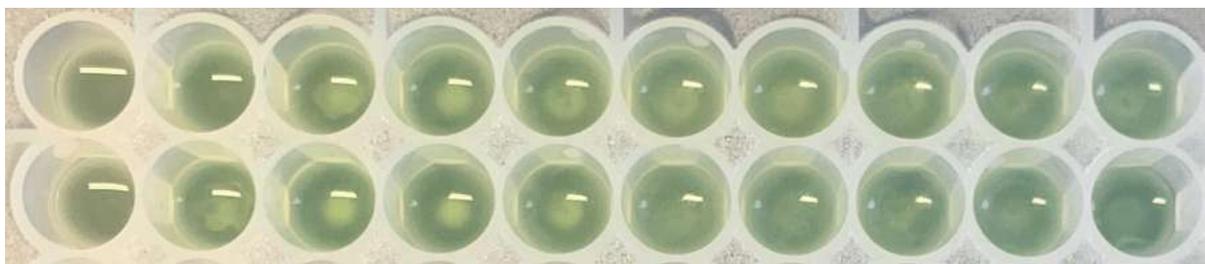
Slika 20: Rast *Pseudomonas aeruginosa* v drugi stopnji poskusa (v rdečem pravokotniku na sredini in desno spodaj). Desno spodaj so pozitivna kontrola (v rdečem kvadratu) in (v rumenem pravokotniku) negativne kontrole (1. – acetilsalicilna kislina, 2. – tramadol, 3. – paracetamol)



Slika 21: Rast *Pseudomonas aeruginosa* v drugi stopnji poskusa z rezazurinom.



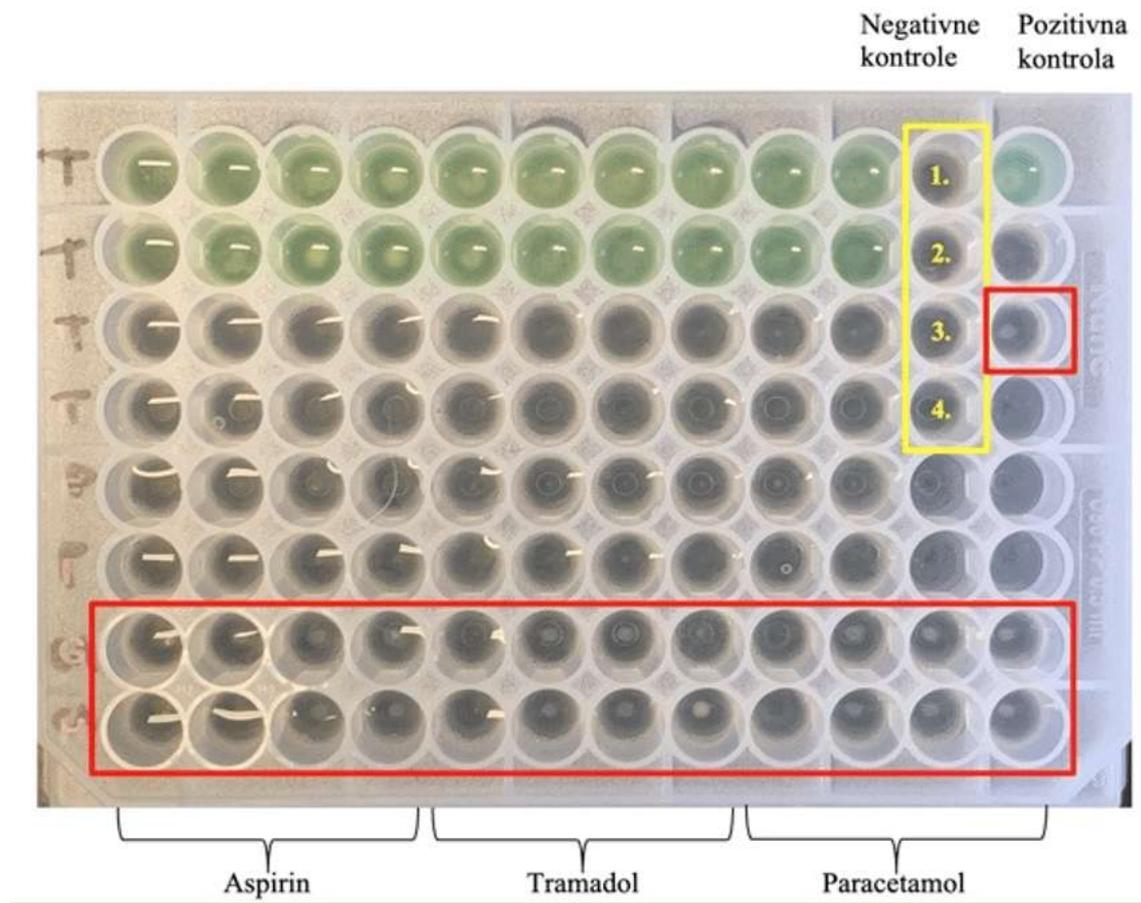
Slika 22: Ponovljena druga stopnja *Pseudomonas aeruginosa* v tramadolu. Koncentracije analgetika se višajo od desne proti levi.



Slika 23: Ponovljena druga stopnja *Pseudomonas aeruginosa* v tramadolu, z dodanim rezazurinom.



Slika 24: Rast *Candida albicans* v prvi stopnji poskusa (v rdečem pravokotniku spodaj). Desno zgoraj so pozitivna kontrola (v rdečem kvadratu) in (v rumenem pravokotniku) negativne kontrole (1. – voda, 2.. – acetilsalicilna kislina, 3. – tramadol, 4. – paracetamol).



Slika 25: Rast *Candida albicans* v drugi stopnji poskusa (v rdečih pravokotnikih zgoraj). Levo spodaj so pozitivna kontrola (v rdečem kvadratu) in (v rumenem pravokotniku) negativne kontrole (1. – voda, 2. – acetilsalicilna kislina, 3. – tramadol, 4. – paracetamol)

