

Laboratorinė medicina.
2017, t. 19, Nr. 2(74), p. 93–98.

Grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikis atsparumą skirtingiems antibiotikams įgijusioms *Acinetobacter baumannii* padermėms

Povilas Lozovskis¹
Virginija Jankauskaitė²
Lukas Vitkauskas³
Astra Vitkauskienė¹

Santrauka

Darbo tikslas. Pasaulio mokslininkai yra susitelkę į naujų technologijų ir antibakterinių produktų kūrimą. Šiam tikslui pasiekti didžiulis dėmesys yra skiriamas nanotechnologijų taikymui kuriant naujų savybių turinčias medžiagas, kurios slopintų patogeniškų bakterijų augimą ir dauginimąsi ir užkirstų kelią infekcijoms vystytis. Mūsų darbo tikslas buvo įvertinti grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozitų poveikį atsparumą skirtingiems antibiotikams įgijusioms klinikinėms *Acinetobacter baumannii* padermėms.

Medžiaga ir metodai. Į tyrimą buvo įtrauktos 79 klinikinės *A. baumannii* padermės, kurios mikrobiologijos laboratorijoje buvo išskirtos iš įvairių klinikinių medžiagų, tyrimą atliekant pagal standartinę metodiką – klinikinę medžiagą išsėjant ant maitinamosios ar į gausinamąją terpę, priklausomai nuo ėminio pobūdžio. Išaugusių bakterijų rūšys identifikuotos remiantis masių spektrometrijos principu. Grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikis *A. baumannii* padermėms vertintas atsižvelgiant į augimo gausumą po inkubacijos su tiriamąja medžiaga.

Rezultatai. Tirtosios *A. baumannii* padermės buvo įgijusios atsparumą daugumai jas galinčių veikti antibiotikų, iš jų net 22,8 % (n=18) padermių pasižymėjo atsparumu visiems tirtiesiems antibiotikams.

Geras grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikis po 1 val. buvo nustatytas padermėms, kurios buvo jautrios, lyginant su atspariomis padermėmis: ceftazidimui ir ciprofloksacinui (100 %, n=6 ir atitinkamai 37,0 %, n=27, p=0,004), doksaciklinui (57,6 %, n=19, ir atitinkamai 30,4 %, n=14, p=0,015), karbapenemams (imipenemui ir meroopenemui) (77,8 %, n=7 ir atitinkamai 37,1 % n=26, p=0,025), gentamicinui (69,2 %, n=9 ir atitinkamai 36,4 %, n=24, p=0,03), tigeciklinui (53,3 %, n=16 ir atitinkamai 34,7 %, n=17, p=0,082).

Po dviejų valandų inkubacijos grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikis tiek antibiotikams jautrioms, tiek atsparioms *A. baumannii* padermėms supanašėjo. Išsiskyrė poveikis doksaciklinui atsparioms padermėms – atsparios padermės buvo paveiktos labiau nei jautrios (93,5 %, n=43, ir atitinkamai 51,5 %, n=17, p<0,001).

Išvados. Grafeno oksidas ir metalo nanostruktūrų kompozitai labai gerai veikia beta laktaminiais antibiotikams (ceftazidimui, karbapene-

¹Lietuvos sveikatos mokslų universiteto
Medicinos fakulteto Laboratorinės
medicinos klinika
El. paštas: astravitka@hotmail.com

²Kauno technologijos universiteto
Mechanikos inžinerijos ir dizaino
fakulteto Funkcinių medžiagų centras

³Lietuvos sveikatos mokslų universiteto
Medicinos fakultetas

mams) ir ciprofloksacinui jautrias *A. baumannii* padermes po trumpalaikės ekspozicijos, tačiau atsparioms padermėms paveikti reikia ilgesnio laiko, t. y. bent 2 valandų inkubacijos. Dalis paveiktų *A. baumannii* padermių po 2 val. inkubacijos pradeda atsigausti, todėl tikėtina, kad grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozitų sudėtis dar nėra optimali ir reikia tolesnių studijų, kad būtų galima pasiekti ilgalaikį baktericidinį poveikį. Šie nanokompozitai gerai veikia aminoglikozidams (gentamicinui, amikacinui) ir tigecklinui jautrias, o po 2 val. ekspozicijos ir atsparias *A. baumannii* padermes.

Reikšminiai žodžiai: grafeno oksidas ir metalo nanostruktūrų kompozitai, *Acinetobacter baumannii*, atsparumas antibiotikams, antibakterinės medžiagos.

IVADAS

Šiuolaikinėse gydymo įstaigose gydant daug rizikos veiksnių turinčius, imunosupresijos būklės pacientus, dažnai skiriami plačiausio spektro antibiotikai. Todėl tampa vis sunkiau išvengti daugumai antibiotikų atsparių bakterijų padermių išsivystymo. Nors gydymo galimybės plečiasi, bet ligoninės infekcijomis sergančių žmonių mirštamumas išlieka didelis (30–50 %), o jei infekciją sukelia didelės rizikos patogenai – *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ar *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), pacientų mirštamumas gali siekti net iki 70 % [1–3]. Tai siejama su tuo, kad *P. aeruginosa* ar *A. baumannii* sukeltų infekcijų gydymas antibiotikais yra problemiškas dėl šių mikroorganizmų didelio pradinio atsparumo antibiotikams bei gebėjimo greitai įgyti atsparumą dažnai vartojamiems antibiotikams. Didėjantis *P. aeruginosa* ir *A. baumannii* padermių atsparumas net rezerviniams karbapenemų grupės antibiotikams yra aktuali problema ir kitose šalyse [4], ir Lietuvoje [5, 6]. Bakterijų atsparumas vystosi greičiau, nei kuriami nauji antibiotikai. Todėl ypatingas dėmesys turi būti skiriamas siekiant išnaikinti šiuos patogenus, įgijusius dauginį atsparumą net plačiausio spektro antibiotikams – karbapenemams, ir užkirsti kelią jų perdavimui nuo paciento pacientui.

Metodai, kurie taikomi infekcijos plitimo rizikai sveikatos priežiūros įstaigose sumažinti, tradiciškai susiję su dezinfekcinių priemonių naudojimu, bet ilgainiui bakterijos tampa atsparios ir jiems. Tuomet tokias bakterijų populiacijas itin sunku išnaikinti, o dėl ligoninės aplinkoje didėjančios jų koncentracijos jas vis lengviau perduoti rankomis nuo vieno paciento kitam. Apsaugos nuo infekcijos plitimo mechanizmas – tinkami higienos įpročiai bei antibakterinių komponentų sintezė [7]. Todėl pasaulio mokslin-

kai yra susitelkę į naujų technologijų ir antibakterinių produktų kūrimą. Šiam tikslui pasiekti didžiulis dėmesys skiriamas nanotechnologijų taikymui kuriant naujų savybių turinčias medžiagas, kurios slopintų patogeniškų bakterijų augimą ir dauginimąsi ir užkirstų kelią infekcijoms vystytis. Pastaruoju metu tam pradėtos naudoti sidabro ir kitų metalų nanodalelės [8, 9].

Šiandien plačiai atliekami tyrimai siekiant grafeną ir jo darinius panaudoti fizikiniuose ir cheminiuose procesuose. Grafeno oksido kaip pamatinės medžiagos nanokompozitams, pasižymintiems antibakterinėmis savybėmis, panaudojimo galimybės, pvz., vandens gryninimui ir dezinfekavimui, pradėtos tirti apie 2011 metus. Kauno technologijos universiteto mokslininkams pavyko sukurti ilgalaikiu baktericidiniu poveikiu pasižymintį hibridinius nanokompozitus, gebančius efektyviai slopinti standartinių gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų dauginimąsi [10].

DARBO TIKSLAS

Mūsų darbo tikslas buvo įvertinti grafeno oksido ir sidabro dalelių nanokompozitų poveikį atsparumą skirting-

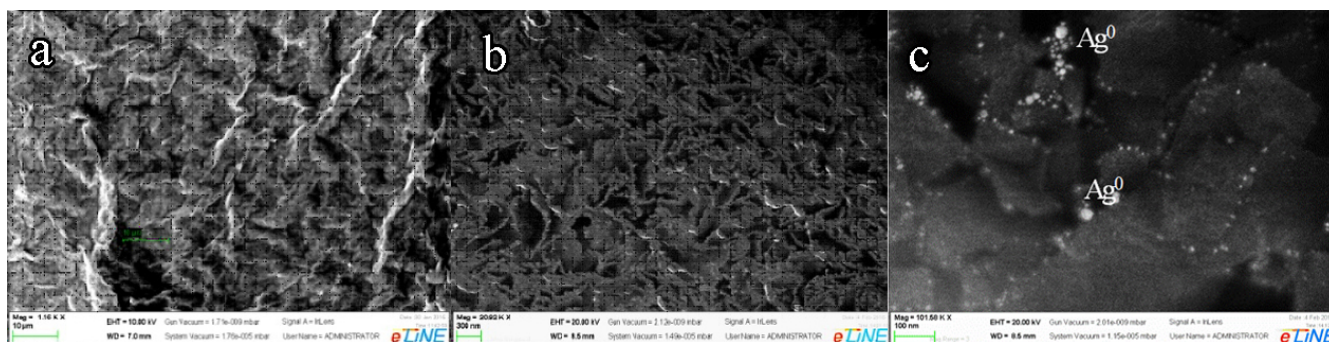
giems antibiotikams įgijusioms klinikinėms *A. baumannii* padermėms.

MEDŽIAGA IR METODAI

Į tyrimą buvo įtrauktos 79 klinikinės *A. baumannii* padermės, kurios mikrobiologijos laboratorijoje buvo išskirtos iš įvairių klinikinių medžiagų tyrimą atliekant pagal standartines metodikas – klinikinę medžiagą išsėjant ant maitinamosios ar į gausinamąją terpę, priklausomai nuo ėminio pobūdžio. *A. baumannii* buvo identifikuotos iki rūšies naudojant masių spektrometrą „Maldi-Tof“ (Bruker, JAV). Beveik pusė visų tirtų padermių (40,5 %, n=32) buvo išskirtos iš apatinių kvėpavimo takų gleivių pacientams, sergantiems ligoninėje įgyta pneumonija. Apie ketvirtadalis (27,8 %, n=22) *A. baumannii* padermių buvo išskirtos iš pūlinių žaizdų sekreto, 15,2 % (n=12) – iš šlapimo, 11,4 % (n=9) – iš sterilių organizmo skysčių (kraujo, stuburo smegenų skysčio ar ascito punkto), likusios – iš kateterio ar dreno. *A. baumannii* jautrumas antibiotikams buvo nustatytas diskų difuzijos metodu remiantis EUCAST (angl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) rekomendacijomis.

1 lentelė. *A. baumannii* padermių atsparumas tirtiems antibiotikams
Table 1. *A. baumannii* resistance to antibiotics

Antibiotikas	<i>Acinetobacter baumannii</i> N=79	
	Atsparios n (%)	Jautrios n (%)
Ceftazidimas	73 (92,4)	6 (7,6)
Ciprofloksacinas	73 (92,4)	6 (7,6)
Amikacinas	63 (79,7)	16 (20,3)
Gentamicinas	66 (83,5)	13 (16,5)
Imipenemas	70 (88,6)	9 (11,4)
Meropenemas	70 (88,6)	9 (11,4)
Doksaciklinas	46 (58,2)	33 (41,8)
Tigecklinas	49 (62,0)	30 (38,0)



1 pav. Grafeno oksido struktūros kitimas nuo sąveikos su metalo nanodariniiais, esant skirtingam didinimui

a – hGO lakštų struktūra; b – hGO lakštų struktūra, įmaišius Ag PV; c – hGO lakštų briaunos

Fig. 1. Alteration on graphene oxide induced by interaction with metal nanostructures

a – hGO plate structure; b – hGO plate structure when Ag PV is added; c – hGO plate edges

Nanostruktūrų kompozitas buvo gautas iš didelės koncentracijos grafeno oksido (hGO) dispersiją vandenyje (koncentracija – 5 g/l; kompozicija – anglis (79 %), deguonis (20 %); lakštų dydis 0,5–50 μm , storis – 1 atominis sluoksnis – >60 %) įmaišant sidabro nanodalelių koloidą etanolyje. Didelės koncentracijos nanodalelių koloidas (koncentracija – 12 g/l) gautas pagal KTU sukurtą cheminės redukcijos metodą, sidabro nitrata (pirmtakas) etilo alkoholio terpėje redukuojant polivinilpirolidonu ($M_n=10\,000$), kuris atlieka ne tik reduktoriaus, bet ir antikoagulianto bei stabilizatoriaus vaidmenį. Tyrimams naudotas hGO/Ag PV =1,3:1 sudėties nanokompozitas.

Prieš tyrimą su grafeno oksido nanokompozitu *A. baumannii* padermės buvo išsėtos ant 5 % kraujo agar (BD, JAV) ir inkubuotos 35 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 20–24 val. hGO/Ag PV nanokompozitas buvo praskiestas 0,5 MF drumstumo *A. baumannii* inokuliatu steriliame fiziologiniame tirpale dalimis 20 : 1 : 180 : 1. Paruoštas mišinys buvo gerai išmaišytas pipetuoiant ir inkubuotas 35 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Po 1 val. inkubacijos išsėta ant kraujo

agaro su sterilia vienkartinė 1 l kilpele, vėliau procedūra pakartota po 2 val. inkubacijos. Kraujo agaras inkubuotas 35 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 24 val., paskui vertintas *A. baumannii* kolonijų augimo gausumas.

Duomenys rinkti ir susisteminti naudojantis programa „Microsoft Excel“. Duomenų analizė atlikta „IBM SPSS Statistics, Version 19“ programa. Rezultatų reikšmingumas nustatytas remiantis χ^2 ir Fišerio testo kriterijais.

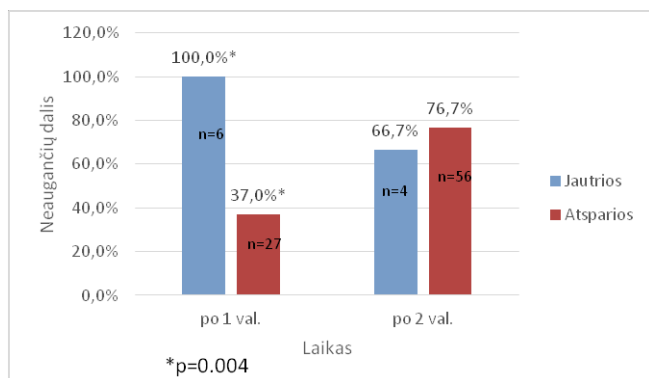
REZULTATAI

Tirtosios *A. baumannii* padermės buvo įgijusios atsparumą daugumai jas galinčių veikti antibiotikų, iš jų net 22,8 % ($n=18$) padermių pasizymėjo atsparumu visiems tirtiesiems antibiotikams. Didžiausias *A. baumannii* padermių atsparumas buvo nustatytas piperacilinui/tazobaktamui, ceftazidimui ir ciprofloksacinui (92,4 %, $n=73$), net 88,6 % ($n=70$) tirtųjų padermių buvo atsparios plataus spektro antibiotikams – imipenemui ir meropenemui, 83,5 % ($n=66$) – gentamicinui ir cefepimui. *A. baumannii* pader-

mių atsparumas tirtiems antibiotikams pateikiamas 1 lentelėje.

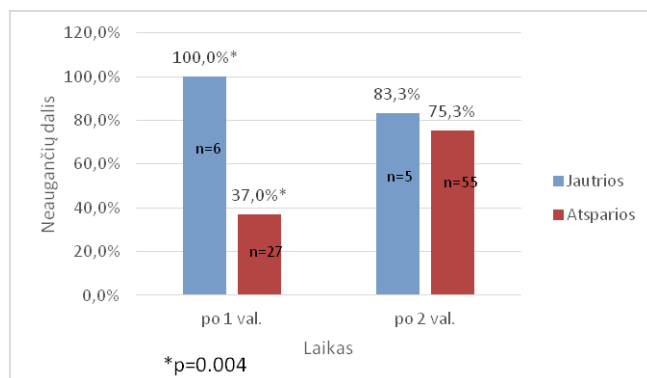
Grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozitas pasižymi tam tikru antibakteriniu poveikiu [11], kurį galima labai sustiprinti ant jo nanolakštų nusodinant metalo nanodarius [10, 12]. Mūsų tyrimai, parodė, kad iš grafeno oksido dispersiją įmaišius nanodarius (sidabro, vario ar kitų nanodalelių) koloidinius tirpalus, pakinta grafeno oksido lakštų struktūra. Iš 1 pav. pateiktų skenuojančio elektroninio mikroskopo nuotraukų matyti, kad sidabro (Ag) nanodalelių koloidinis tirpalas suskaido hGO lakštus į gerokai mažesnius darinius su aštriomis briaunomis (1 pav., b), ant kurių nusėda sidabro nanodalelės (Ag^0) (1 pav., c). Teigiama [13], kad šios aštrios lakštų briaunos geba pažeisti bakterijų ląstelės sienelę, sukelti citoplazmos išsiliejimą, lemiantį bakterijos žūtį. Šį efektą labai suintensyvina ant hGO esančios nanodalelės.

Geras grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikis buvo nustatytas padermėms, kurios buvo jautrios ceftazidimui ir ciprofloksacinui. Po 1 val. inkubacijos reikšmingai



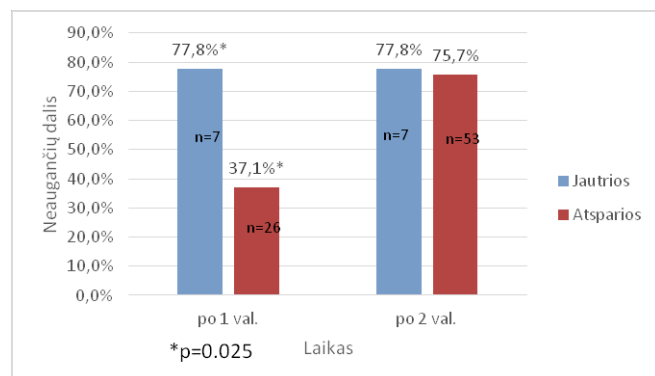
2 pav. Grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikis lyginant ceftazidimui jautrias ir atsparias *A. baumannii* padermes

Fig. 2. Effect of graphene oxide and metal nanostructures composites by comparing ceftazidime susceptible and resistant *A. baumannii* strains



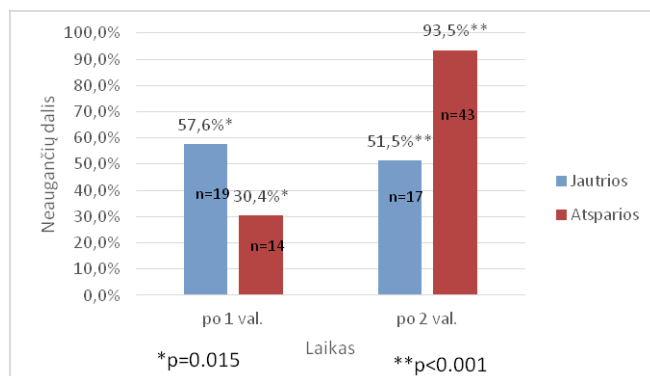
3 pav. Grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikis lyginant ciprofloksacinui jautrias ir atsparias *A. baumannii* padermes

Fig. 3. Effect of graphene oxide and metal nanostructures composites by comparing ciprofloxacin susceptible and resistant *A. baumannii* strains



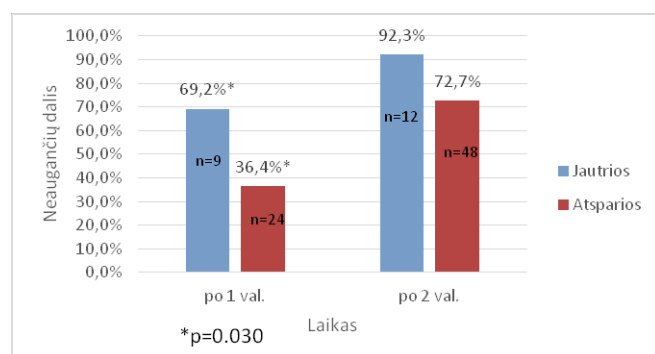
4 pav. Grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozitų poveikis lyginant karbapenemams jautrias ir atsparias *A. baumannii* padermes

Fig. 4. Effect of graphene oxide and metal nanostructures composites by comparing carbapenem susceptible and resistant *A. baumannii* strains



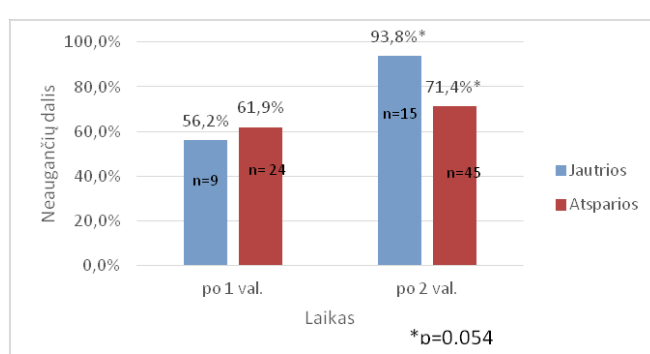
5 pav. Grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozitų poveikis lyginant doksaciklinui jautrias ir atsparias *A. baumannii* padermes

Fig. 5. Effect of graphene oxide and metal nanostructures composites by comparing doxycycline susceptible and resistant *A. baumannii* strains



6 pav. Grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozitų poveikis lyginant gentamicinui jautrias ir atsparias *A. baumannii* padermes

Fig. 6. Effect of graphene oxide and metal nanostructures composites by comparing gentamicin susceptible and resistant *A. baumannii* strains



7 pav. Grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozitų poveikis lyginant amikacinui jautrias ir atsparias *A. baumannii* padermes

Fig. 7. Effect of graphene oxide and metal nanostructures composites by comparing amikacin susceptible and resistant *A. baumannii* strains

dažniau neišaugo ceftazidimui ir ciprofloksacinui jautrios, lyginant su atspariomis padermėmis (100 %, n=6 ir atitinkamai 37,0 %, n=27, p=0,004). Tačiau po 2 val. inkubacijos buvo nustatyta, kad grafeno oksidas ir metalo nanostruktūrų kompozitas paveikė net 76,7 % (n=56) ceftazidimui atsparių padermių, nors atsirado dvi ceftazidimui jautrios padermės (33,3 %), kurioms grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikio nepakako ir po 2 val. inkubacijos pradėjo augti kolonijos (2 pav.).

Panaši tendencija buvo matoma ir su ciprofloksacinui jautriomis padermėmis: po 2 val. inkubacijos buvo nuslopintas augimas 75,3 % (n=55) ciprofloksacinui atsparių padermių, tačiau viena šiam antibiotikui jautri padermė (16,7 %) dėl grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikio pradėjo augti (3 pav.).

Reikšmingas grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikis buvo nustatytas padermėms, priklausomai nuo jautrumo karbapenemams (imipenemui ir meropenemui).

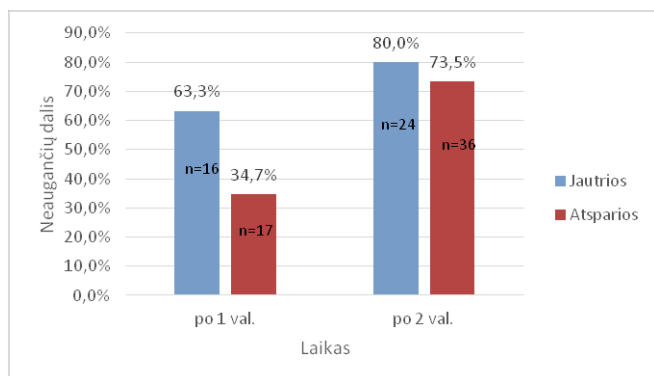
Grafeno oksidas ir metalo nanostruktūrų kompozitas turėjo poveikį 77,8 % (n=7) karbapenemams jautrių ir tik 37,1 % (n=26) atsparių padermių (p=0,025) jau po 1 val. inkubacijos. Tačiau po 2 val. inkubacijos buvo matoma priešinga tendencija – poveikis karbapenemams jautrioms padermėms išliko toks pat (77,8 %, n=7), o poveikis atsparioms padermėms padidėjo net iki 75,7 % (n=53), p=0,629 (4 pav.).

Labai geras grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikis buvo nustatytas doksaciklinui jautrioms ir prastas poveikis atsparioms padermėms po 1 val. inkubacijos. Po 1 val. inkubacijos grafeno oksidas ir metalo nanostruktūrų kompozitas turėjo poveikį daugiau nei pusei visų doksaciklinui jautrių ir tik trečdaliui šiam antibiotikui atsparių padermių (57,6 %, n=19, ir atitinkamai 30,4 %, n=14, p=0,015). Po 2 val. inkubacijos grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikis doksaciklinui jautrioms padermėms išliko panašus, tačiau buvo patikimai geres-

nis doksaciklinui atsparioms padermėms (51,5 %, n=17, ir atitinkamai 93,5 %, n=43, p<0,001) (5 pav.).

Po 1 val. inkubacijos grafeno oksidas ir metalo nanostruktūrų kompozitas turėjo patikimai geresnį poveikį gentamicinui jautrioms padermėms: net 69,2 % (n=9) gentamicinui jautrių ir tik 36,4 % (n=24) atsparių padermių buvo paveiktos grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito (p=0,03). Tačiau buvo nustatytas labai geras grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikis tiek gentamicinui jautrioms, tiek atsparioms padermėms po 2 val. inkubacijos: neaugo 92,3 % (n=12) jautrių ir atitinkamai 72,7 % (n=48) atsparių padermių (p=0,120) (6 pav.).

Po 1 val. inkubacijos nebuvo reikšmingo augimą slopinančio poveikio priklausomai nuo *A. baumannii* padermių atsparumo amikacinui: buvo nuslopintas augimas 38,1 % (n=24) amikacinui atsparių ir tik 56,2 % (n=9) jautrių padermių. Tačiau nustatytas reikšmingas skirtumas šias *A. baumannii* padermes grafeno oksido



8 pav. Grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikis lyginant tigeciklinui jautrias ir atsparias *A. baumannii* padermes

Fig. 8. Effect of graphene oxide and metal nanostructures composites by comparing tigecycline susceptible and resistant *A. baumannii* strains

do ir metalo nanostruktūrų kompozitu paveikus ilgesnį laiką, t. y. po 2 val. inkubacijos: dažniau neaugo *A. baumannii* padermės, kurios buvo jautrios amikacinui, palyginti su atspariomis (93,8 %, $n=15$ ir atitinkamai 71,4 %, $n=45$, $p=0,054$) (7 pav.).

Po 1 val. inkubacijos grafeno oksidas ir metalo nanostruktūrų kompozitas turėjo poveikį daugiau nei pusei visų tigeciklinui jautrių ir tik trečdaliui šiam antibiotikui atsparių padermių (53,3 %, $n=16$, ir atitinkamai 34,7 %, $n=17$, $p=0,082$). Po 2 val. inkubacijos buvo nustatytas geras grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikis tiek tigeciklinui jautrioms, tiek atsparioms padermėms (80,0 %, $n=24$, ir atitinkamai 73,5 %, $n=36$, $p=0,353$) (8 pav.).

DISKUSIJA

Grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų baktericidinis efektyvumas prieš skirtingas bakterijas tyrinėjamas įvairiose studijose [10, 14, 15]. Ieškoma naujų kompozitų variantų padidinant ir gaunant didesnę koncentraciją ir platesnio poveikio metalo nanostruktūrų (pvz., sidabro citratinių kompleksų) koloidus, suteikiant joms anizotropinę formą (nanoplokštelių, nanovielų) ir taip padidinant sąveiką su bakterijomis plotą, panaudojant kitos prigimties platų antimikrobinį poveikį turinčias nanodaleles (pvz., aukso). Šiuos hibridinius nanokompozitus siekiama panaudoti liginėse instaliuotos įrangos paviršiams padengti, filtrams modifikuoti, taip užtikrinant jų antibakterinį saugumą nuo patogeninių bakterijų, ypač *P. aeruginosa* ir *Acinetobacter* spp., kolonizacijos. Tačiau, žinant *P. aeruginosa* ir *Acinetobacter* spp. gebėjimą

prisitaikyti joms nepalankioje aplinkoje ir igyti atsparumą daugumai jas galinčių veikti antibiotikų, kyla abejonų, ar naujai sukurti grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozitai bus efektyvūs prieš skirtingą atsparumą antibiotikams išgijusias bakterijas.

Mes nagrinėjome grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozitų poveikį beta laktaminiams antibiotikams jautrioms ir atsparioms *A. baumannii* padermėms. *A. baumannii* atsparumas beta laktaminiams antibiotikams dažniausiai susijęs su beta laktamazių: AmpC cefalosporinazių ar D klasės OXA karbapenemazių sinteze [16, 17]. Grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozitas paveikė daugiau nei 70 % ceftazidimui atsparių *A. baumannii* padermių, tačiau tam pasiekti reikėjo net 2 val. inkubacijos. Visas ceftazidimui jautrias padermes paveikė jau po 1 val. inkubacijos, nors šis poveikis po 2 val. inkubacijos susilpnėjo ir dalis padermių pradėjo augti. Tačiau karbapenemams jautrias padermes grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozitas paveikė negrįžtamai ir visos padermės, kurios buvo paveiktos po 1 val., neaugo ir po 2 val. inkubacijos. Mūsų tyrimo metu geras šio kompozito poveikis buvo nustatytas ir karbapenemams atsparioms padermėms, tačiau šiam poveikiui pasiekti prireikė taip pat 2 val. inkubacijos.

Acinetobacter spp. atsparumas ciprofloksacinui susijęs su skirtingu nei beta laktaminiams antibiotikams atsparumo mechanizmu – topoizomerezės genų *gyrA*, *parC* mutacijomis, tačiau nustatėme visiškai tokį patį grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikį ciprofloksacinui, kaip ir ceftazidimui, atsparioms padermėms [16].

Skirtingas nei beta laktaminiams antibiotikams grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikis buvo nustatytas *A. baumannii* aminoglikozidams (gentamicinui, amikacinui) tiek jautrioms, tiek atsparioms padermėms. Gentamicinui ir amikacinui jautrioms padermėms paveikti reikėjo ne mažiau kaip 2 val. inkubacijos ir buvo pasiektas beveik maksimalus efektas – nuslopintas daugiau kaip 90 % padermių augimas. Tačiau *A. baumannii* atsparumo aminoglikozidams mechanizmas dažniausiai yra susijęs su aminoglikozidus modifikuojančių fermentų sinteze ir grafeno oksido bei metalo nanostruktūrų kompozito poveikis gentamicinui ir amikacinui atsparioms padermėms išsiskyrė. Gentamicinui atsparias padermes grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozitas gerai veikė po 2 val. inkubacijos, o amikacinui atsparioms padermėms šis poveikis nuo inkubacijos laiko beveik nesiskyrė.

Mes nustatėme labai įdomų grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito poveikį *A. baumannii* padermėms, priklausomai nuo atsparumo doksaciklinui. Lyginant su kitais mūsų tirtais antibiotikais, grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozitas prastai veikė doksaciklinui jautrias padermes ir šis poveikis nepriklausė nuo inkubacijos laiko, tačiau gerai veikė šiam antibiotikui, taip pat kaip ir tigeciklinui, atsparias padermes po 2 val. inkubacijos.

IŠVADOS

Grafeno oksidas ir metalo nanostruktūrų kompozitas labai gerai veikia beta laktaminiams antibiotikams (ceftazidimui, karbapenemams) ir ciprofloksacinui jautrias *A. baumannii* padermes po trumpalaikės ekspozicijos, tačiau atsparioms padermėms paveikti reikia ilgesnio laiko, t. y. bent 2 valandų inkubacijos. Dalis paveiktų *A. baumannii* padermių po 2 val. inkubacijos pradeda atsigauti, todėl tikėtina, kad grafeno oksido ir metalo nanostruktūrų kompozito sudėtis dar nėra optimali, ir reikia tolesnių studijų, kad būtų pasiektas ilgalaikis baktericidinis poveikis.

Grafeno oksidas ir metalo nanostruktūrų kompozitas gerai veikia aminoglikozidams (gentamicinui, amikacinui) ir tigeciklinui jautrias, o po 2 val. ekspozicijos ir atsparias *A. baumannii* padermes. ♦

Gauta: 2016 12 21
Priimta spaudai: 2017 06 06

Summary

INFLUENCE OF GRAPHENE OXIDE AND METAL NANOSTRUCTURE COMPOSITES ON *ACINETOBACTER BAUMANNII* STRAINS RESISTANT TO DIFFERENT ANTIBIOTICS

Povilas Lozovskis, Virginija Jankauskaitė, Lukas Vitkauskas, Astra Vitkauskienė

Aim of the study. World's scientists are focused on creating new technologies and antimicrobial products. Application of nanotechnologies has high importance to reach this goal by developing new materials that would inhibit growth of pathogenic microorganisms and stop infections before it occurs. The aim of our work was to evaluate influence of graphene oxide and metal nanostructures composites on antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* strains.

Material and methods. We studied 79 strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from various clinical materials in microbiology laboratory by using standard methods.

Results. *A. baumannii* strains, that we tested, had acquired resistance mech-

anisms for the most of antibiotics we tested. 22.8% (n=18) of strains were resistant to all the antibiotics we tested.

After one hour of incubation graphene oxide and metal nanostructures composites showed better performance on strains that were susceptible, than resistant to ceftazidime, and ciprofloxacin (100%, n=6 respectively 37.0%, n=27, p=0.004), doxacycline (57.6%, n=19, respectively 30.4%, n=14, p=0.015), carbapenems (imipenem and meropenem) (77.8%, n=7 respectively 37.1% n=26, p=0.025), gentamicin (69.2%, n=9 respectively 36.4%, n=24, p=0.03), tigecycline (53.3%, n=16 respectively 34.7%, n=17, p=0.082).

After two hours of incubation graphene oxide and metal nanostructures composites effect on strains that were resistant and

susceptible to antibiotics became similar. Strains, that were resistant to doxacycline were effected more than susceptible ones (93.5%, n=43, respectively 51.5%, n=17, p<0.001).

Conclusions. Graphene oxide and metal nanostructures composites has shown very significant effect on *Acinetobacter baumannii* strains that are susceptible to beta-lactams (ceftazidime, carbapenems) and ciprofloxacin after a short exposition, while it took longer incubation time (2 hrs.) to effect resistant strains. Some of effected *A. baumannii* strains showed recovery after 2 hours of incubation. Plausible cause is not optimal composition of graphene oxide and metal nanostructures composites and requires further studies to achieve long-term bactericidal effect. These nanostructures works well on aminoglycoside (gentamicin, amikacin) and tygecycline susceptible strains as well as resistant after 2 hours of exposition.

Keywords: graphene oxide and metal nanostructures composites, *Acinetobacter baumannii*, drug resistance, antimicrobial materials.

LITERATŪRA

1. Bosso JA, Sieg A, Mauldin PD. Comparison of hospitalwide and custom antibiograms for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Hosp Pharm* 2013; 48(4): 295–301.
2. Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(6): 560–78.
3. Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(S4): 17–32.
4. Fernacho-Montero J, Amaya-Villar R. Multiresistant *Actinobacter baumannii* infections: epidemiology and management. *Curr Opin Infect Dis* 2010; 23: 332–9.
5. Vitkauskienė A, Skrodenienė E, Dambrauskienė A, Macas A, Sakalauskas R. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality. *Medicina* 2010; 46(7): 490–5.
6. Vitkauskienė A, Dambrauskienė A, Černiauskienė K, Rimdeika R, Sakalauskas R. Risk factors and outcomes in patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter* infection. *Scand J Infect Dis* 2013; 45(3): 213–8.
7. Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 1992; 257(5073): 1064–73.
8. Li WR, Xie XB, Shi QS, Duan SS, Ouyang YS, Chen YB. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *BioMetals* 2011; 24: 135–41.
9. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 2004; 27: 177–82.
10. Jankauskaitė V, Vitkauskienė A, Lazauskas A, Baltrusaitis J, Prosyčėvas I, Andrulevičius M. Bactericidal effect of graphene oxide/Cu/Ag nanoderivatives against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Pharm* 2016; 511(1): 90–7.
11. Akhavan O, Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano* 2010; 4(10): 5731–6.
12. Shao W, Liu X, Min H, Dong G, Feng Q, Zuo S. Preparation, characterization, and antibacterial activity of silver nanoparticle-decorated graphene oxide nanocomposite. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015; 7: 6966–73.
13. Mangadlao JD, Santos CM, Felipe MJL, de Leon ACC, Rodrigues DF, Advincula RC. On the antibacterial mechanism of graphene oxide (GO) Langmuir-Blodgett films. *Chem Communications* 2015; 51: 2886–9.
14. Kruk K, Szczepanowicz K, Stefańska J, Socha RP, Warszyński P. Synthesis and antimicrobial activity of monodisperse copper nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2015; 128: 17–22.
15. Singh S, Gundampati RK, Mitra K, Ramesh K, Jagannadham MV, Misra N, Ray B. Enhanced catalytic and antibacterial activities of silver nanoparticles immobilized on poly (N-vinyl pyrrolidone)-grafted graphene oxide. *RSC Advances* 2015; 5: 81994–2004.
16. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 49–56.
17. Fzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 583–8.