

Utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. i timola na proizvodnju piocijanina bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Sakoman, Filip

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:693605>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Filip Sakoman

Utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. i timola na proizvodnju piocijanina bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom mentorice izv. prof. dr. sc. Gordane Maravić Vlahoviček.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček na potpori i strpljenju tijekom pisanja ovog rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na potpori i ljubavi kroz cijeli studij, osobito bratu Franji i sestri Ani.

Sadržaj

1. UVOD	5
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
1.1.1. Čimbenici virulencije.....	5
1.1.2. Bakterijska međustanična komunikacija	7
1.2. Piocijanin	9
1.3. Liječenje i rezistencija	10
1.4. Tobramicin.....	12
1.5. <i>Satureja montana</i> L.	12
1.6. Timol	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Bakterije.....	15
3.1.2. Standardne kemikalije i otopine.....	15
3.1.3. Eterično ulje i komponente	15
3.1.4. Antibiotici	15
3.1.5. Hranjivi mediji	15
3.2. METODE.....	16
3.2.1. Priprava otopina eteričnog ulja biljne vrste <i>Satureja montana</i> L. i timola.....	16
3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije aminoglikozidnog antibiotika tobramicina	16
3.2.3. Priprema i tretiranje bakterijske kulture s otopinama eteričnog ulja satureje, timola i tobramicina	16
3.2.4. Određivanje vrijednosti optičke gustoće bakterijske kulture OD ₆₀₀	17
3.2.5. Ekstrakcija piocijanina	17
3.2.6 Statistička analiza	18

4. Rezultati	20
4.1 Minimalna inhibitorna koncentracija tobramicina	20
4.2 Učinak eteričnog ulja satireje, timola i tobramicina na rast bakterije <i>P. aeruginosa</i>	20
4.3 Učinak eteričnog ulja satireje, timola i tobramicina na proizvodnju piocijanina	22
5. RASPRAVA.....	25
6. ZAKLJUČAK	28
LITERATURA.....	29
8. SAŽETAK/SUMMARY	31

1. UVOD

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je gram-negativna, štapićasta, aerobna i monoflagelantna bakterija koja najbolje raste u vlažnom okolišu na 25-37 °C, no zbog sposobnosti prilagođavanja raznim životnim uvjetima smatra se ubikvitarnim mikroorganizmom. Specifičnost soja *P. aeruginosa* je stvaranje jednog ili više pigmenata, uključujući plavo-zeleni pigment piocijanin, žuto-zeleni fluorescentni pigment pioverdin i crveno-smeđi pigment piorubin (Kalenić i sur., 2013; Wu i sur., 2015).

Unutar roda *Pseudomonas*, ovo je medicinski najznačajniji soj zbog sposobnosti invazije i raznih čimbenika virulencije i toksičnosti. Oportunistički je patogen koji je uzročnik akutnih i kroničnih infekcija u biljkama i životinjama, ali i ljudima, osobito ozbiljnim u imunokompromitiranim pacijentima, uključujući pacijente s bolničkom pneumonijom, cističnom fibrozom te kroničnom opstruktivnom bolesti pluća. Jedan je od najznačajnijih uzročnika bolničkih infekcija te se zbog svoje sposobnosti preživljavanja u raznim okruženjima može pronaći u dezinficijensima, kremama, sapunima, kapima za oči, ovlaživačima zraka, kupkama itd. Infekcije koje uzrokuje su bakterijemije i seapse, infektivni endokarditis, infekcije dišnog sustava, infekcije središnjeg živčanog sustava, infekcije uha, infekcije oka, infekcije kože i mekih tkiva, infekcije kostiju i zglobova te infekcije mokraćnog sustava (Kalenić i sur., 2013).

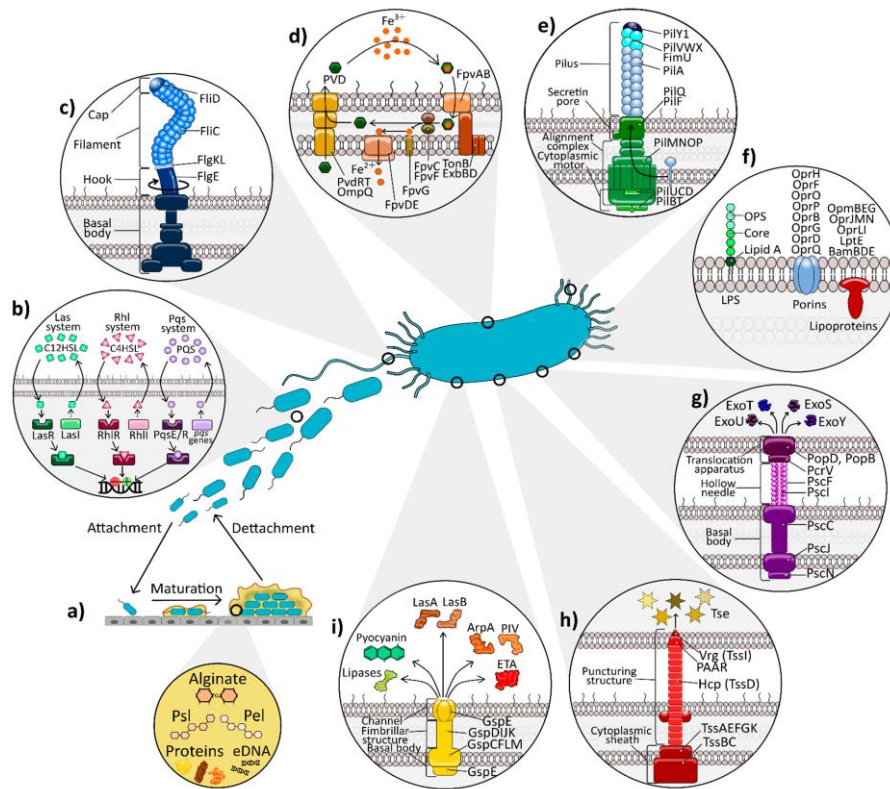
Zbog velike stope morbiditeta i mortaliteta te sve veće antibiotske rezistencije, Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*, WHO) uključuje *P. aeruginosa* u kategoriju kritičnih bakterijskih patogena za koju je nužno potrebno istraživanje i razvoj novih antibiotika (Jurado-Martín i sur., 2021).

1.1.1. Čimbenici virulencije

P. aeruginosa posjeduje velik broj strukturnih i sekrecijskih faktora virulencije odgovornih za patogenost bakterije (Slika 1.) te je razvio kompleksan regulatorni sustav kontrole ekspresije pojedinih faktora virulencije za maksimalnu šansu za preživljavanje. Strukturne faktore čine lipopolisaharidna membrana, koja služi kao fizička barijera bakterije štiteći ju od imunskog sustava domaćina, sudjeluje u adheziji, posrednik je u interakciji sa stanicom domaćina i oštećuje okolno tkivo zahvaljujući svojoj endotoksičnoj aktivnosti, zatim flagela, koja bakteriji pruža pokretljivost i sposobnost vezanja na stanicu domaćina, te pili, koji sudjeluju u motilitetu,

adheziji, agregaciji, stvaranju biofilma te vezanju DNA (Kalenić i sur., 2013; Wu i sur., 2015; Jurado-Martín i sur., 2021).

S druge strane, sekrecijski sustavi bakterije *P. aeruginosa* zaduženi su za oštećivanje barijera domaćina te stvaranje pogodne okoline za bakterijin opstanak otpuštajući faktore virulencije u izvanstanični prostor ili u samu stanicu domaćina. *P. aeruginosa* posjeduje 5 sekrecijskih sustava: tip I, II, III, V i VI. Sekrecijski sustav tipa I zajedno sa sekrecijskim sustavom tipa V čini najjednostavniji sekrecijski sustav *P. aeruginosa*, izlučujući tvari u izvanstanični prostor. Sekrecijski sustav tipa I izlučuje alkalnu proteazu AprA, koja uključena u niz infekcija, hemofor HasAp, važan za preživljavanje bakterije u ranim stadijima infekcije, AprX sa zasad nepoznatom funkcijom te TesG koji smanjuje influks neutrofila tokom kronične infekcije. Sekrecijski sustav tipa II izlučuje široki niz egzoproteina kao što su egzotoksin A, najtoksičniji faktor virulencije *P. aeruginosa* koji potiče nekrozu stanica domaćina, inhibira sintezu proteina, potiče aktivnost kaspaza te smanjuje sekreciju interleukina. Osim toga, sekrecijski sustav tipa II izlučuje razne proteaze, npr. LasA i LasB elastaze i proteaze tipa IV koje, između ostaloga, sudjeluju u izbjegavanju imunskog sustava domaćina razgrađujući citokine i imunoglobuline, zatim lipolaze te pigmente kao što je piocijanin. Najvažniji sekrecijski sustav *Pseudomonas aeruginosa*, sekrecijski sustav tipa III, nije potreban za infekciju, ali povećava ozbiljnost razvijene bolesti uzrokujući oštećenje epitela, omogućujući bakteriji ulazak u krvotok, te sudjeluje u odupiranju imunskom sustavu domaćina. Ovaj sekrecijski sustav ima sposobnost ubacivanja egzotoksina ExoU, ExoT, ExoS i ExoY direktno u citosol stanice domaćina. Sekrecijski sustav tipa V izlučuje esterazu EstA, izvanstanični adhezin CdrA te egzoproteine LepA i LepB. I konačno, sekrecijski sustav tipa VI izlučuje toksine Tse1, Tse2 i Tse3 direktno u citosol ciljane stanice koji uništavaju mikrofloru domaćina. Sekrecijski sustavi tipa II i V uključuju sekreciju u dva koraka, prvo izlučujući tvari u periplazmu, dok sekrecijski sustavi I, III i VI sekreciju vrše u jednom koraku (Kalenić i sur., 2013; Wu i sur., 2015; Jurado-Martín i sur., 2021).



Slika 1. Shematski prikaz čimbenika virulencije *P. aeruginosa* (preuzeto iz Jurado-Martin i sur., 2021).

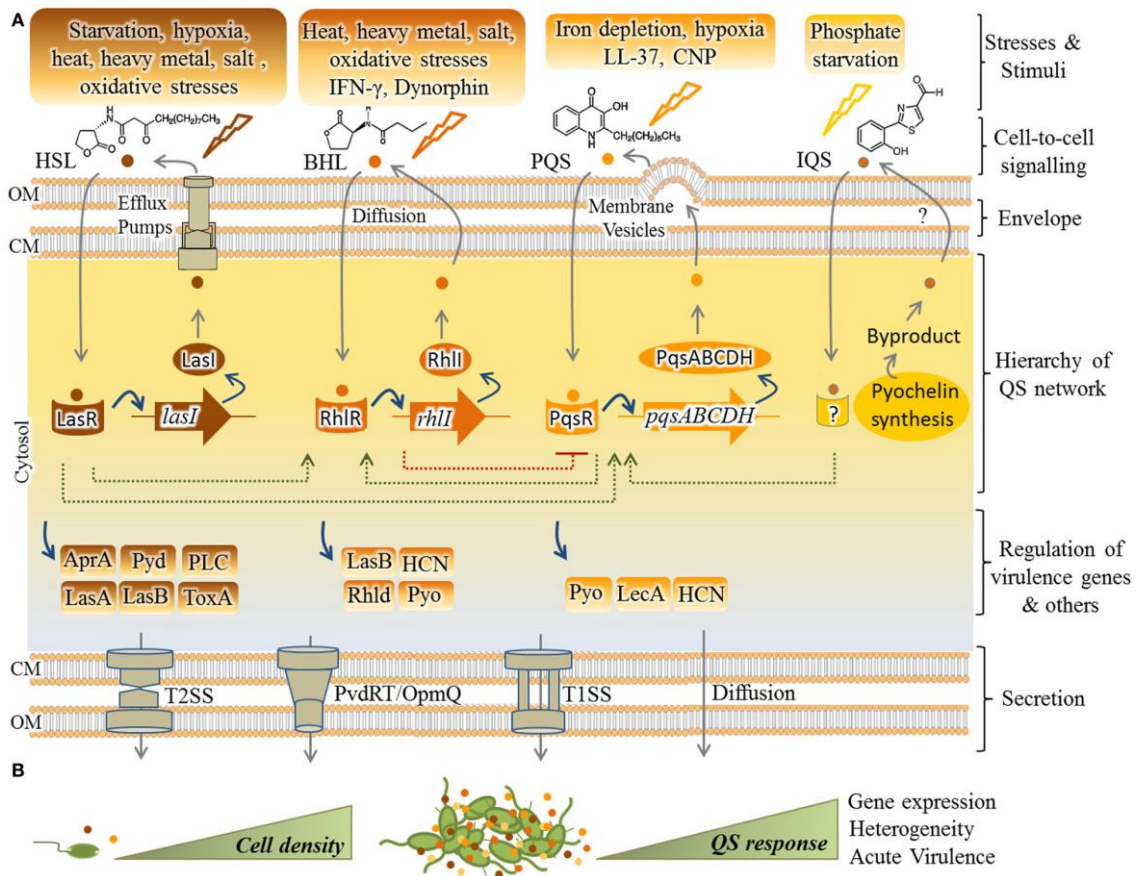
1.1.2. Bakterijska međustanična komunikacija

Prilagodljivosti *P. aeruginosa* pridonosi vrlo velik i dinamičan genom koji sadrži oko 5-7 MB. Čak 10% genoma kodira za regulatorne sustave, uključujući visoko razvijeni sustav bakterijske međustanične komunikacije (engl. *Quorum sensing*, QS), ključan za kolektivno ponašanje bakterijske kolonije. To je genski regulacijski sustav reguliran pomoću ekstracelularnih signalnih molekula (autoinduktora) koje djeluju induksijski ili supresijski na ciljane QS gene. Igra važnu ulogu u kontroli stvaranja faktora virulencije, maturaciji biofilma, rojenju te ekspresiji antibiotičkih efluks pumpi. Nedostatak jednog ili više komponenata QS uvelike smanjuje virulenciju patogena. Shematski prikaz sustava međustanične komunikacije *P. aeruginosa* prikazan je na Slici 2. (Smith i Iglewski, 2003; Moradali i sur., 2017).

P. aeruginosa posjeduje četiri sustava bakterijske međustanične komunikacije: Las, Rhl, Pqs i Iqs, koju su organizirani hijerarhijski. Las sustav je na hijerarhijskom vrhu te stimulira ekspresiju ostalih triju sistema. Iqs sistem pozitivno utječe na Pqs koji pozitivno utječe na Rhl. Rhl pak negativno utječe na Pqs ekspresiju (Jurado-Martín i sur., 2021).

Kao odgovor na vanjski stres i vanjski podražaj dolazi do aktivacije QS sustava i sekrecije specifičnih autoinduktora koji se zatim transportiraju unutar stanice, pretpostavlja se putem

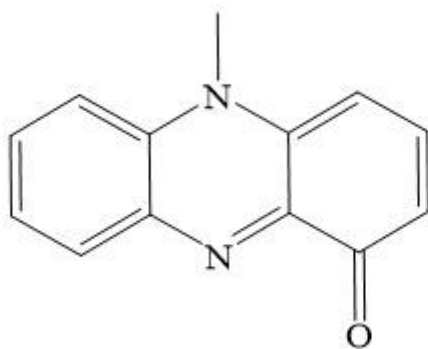
slobodne difuzije ili membranskih transportera kao što su specifične efluks pumpe ili membranske vezikule. Ti autoinduktori su HSL (3-okso-C12-homoserin lakton) za Las sustav, BHL (N-butirilhomoserin lakton) za Rhl sustav, PQS (2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon) za Pqs sustav i IQS (2-(2-hidroksifenil)-tiazol-4-karbaldehid) za Iqs sustav. Unutar stanice oni aktiviraju transkripcijske faktore (LasR, RhlR i PqsR, za prva tri sustava QS) i dovode do sinteze AI sintaza (LasI, RhlI te PqsABCDH, za prva tri sustava QS). Novonastali autoinduktori se zatim izbacuju iz stanice i ulaze u druge stanice te tako nastavljaju regulaciju QS sustava. Osim regulacije, aktivirani transkripcijski faktori potiču ekspresiju drugih gena. Las sustav potiče ekspresiju gena alkalne proteaze, pioveridina, fosfolipaze C, toksina A te LasA i LasB elastaza, a stimuliran je glađu, hipoksijom, toplinom, prisutnošću teških metala ili soli te oksidativnim stresom. Rhl sustav inducira transkripciju gena za LasB elastazu, cijanovodik, ramnolipide te pocijanin i stimuliran je toplinom, oksidativnim stresom, prisutnošću teških metala, soli te IFN- γ i dinorfina. Pqs sustav dovodi do transkripcije gena za pocijanin, lektin A te cijanovodik, a stimulira ga niska koncentracija željeza, hipoksija, antimikrobnog peptida LL-37 i CNP. Iqs sustav je zadnji otkriven te njegova uloga i mehanizam nisu potpuno poznati. (Moradali i sur., 2017).



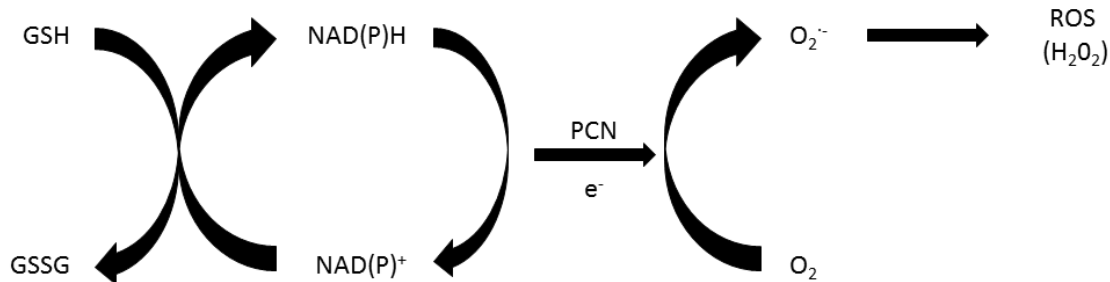
Slika 2. Shematski prikaz sustava međustanične komunikacije *P. aeruginosa* (preuzeto iz Moradali i sur., 2017).

1.2. Piocijanin

Piocijanin je redoksom aktivirani sekundarni metabolit koji *P. aeruginosa* daje karakterističnu plavo-zelenu boju. Izlučuje se putem sekrecijskog sustava tipa II, spada u skupinu fenazina te je zwitterion niske molekulske mase što mu omogućuje lako prolaženje kroz stanične membrane. Njegova struktura prikazana je na Slici 3. Zbog svoje sposobnosti stvaranja slobodnih radikala te proupalnog učinka povezan je sa smanjenjem funkcije pluća i ozbiljnosti razvijene bolesti. Pod aerobnim uvjetima, piocijanin stupa u interakciju s NAD(P)H te prima elektrone koje posljedično donira molekularnom kisiku čime nastaju reaktivne kisikove specije, superoksid ($O_2^{\cdot-}$) i vodikov peroksid (H_2O_2) (Slika 4.). Oni dovode do smanjenja razina glutationa, oksidativnog stresa, oštećenja komponenata staničnog ciklusa, enzima i DNA te konačno dovodeći do lize stanice. Osim toga, dokazano je da povećanje koncentracije ekstracelularne DNA (eDNA) promovira međustanične interakcije te povećava stvaranje biofilma, čime se povećava perzistencija infekcije. No, piocijanin djeluje i proupalno inhibirajući stvaranje interleukina-2 (IL-2) te smanjujući ekspresiju IL-2 receptora na T-limfocitima čime se smanjuje imunosni odgovor domaćina. Nadalje, piocijanin posjeduje i toksičan učinak na neutrofile potičući stvaranje neutrofilnih kemotaksina (IL-8 i leukotrien B_4) te inducirajući brzu i selektivnu apoptozu neutrofila. Njihovom apoptozom dolazi do oslobađanja velikih koncentracija elastaza, proteaza, oksidansa i različitih enzima koji zajedno doprinose pogoršavanju stanja pluća u pacijenata s cističnom fibrozom i bronhiektazijom (Jurado-Martín i sur., 2021, Hall i sur., 2016).



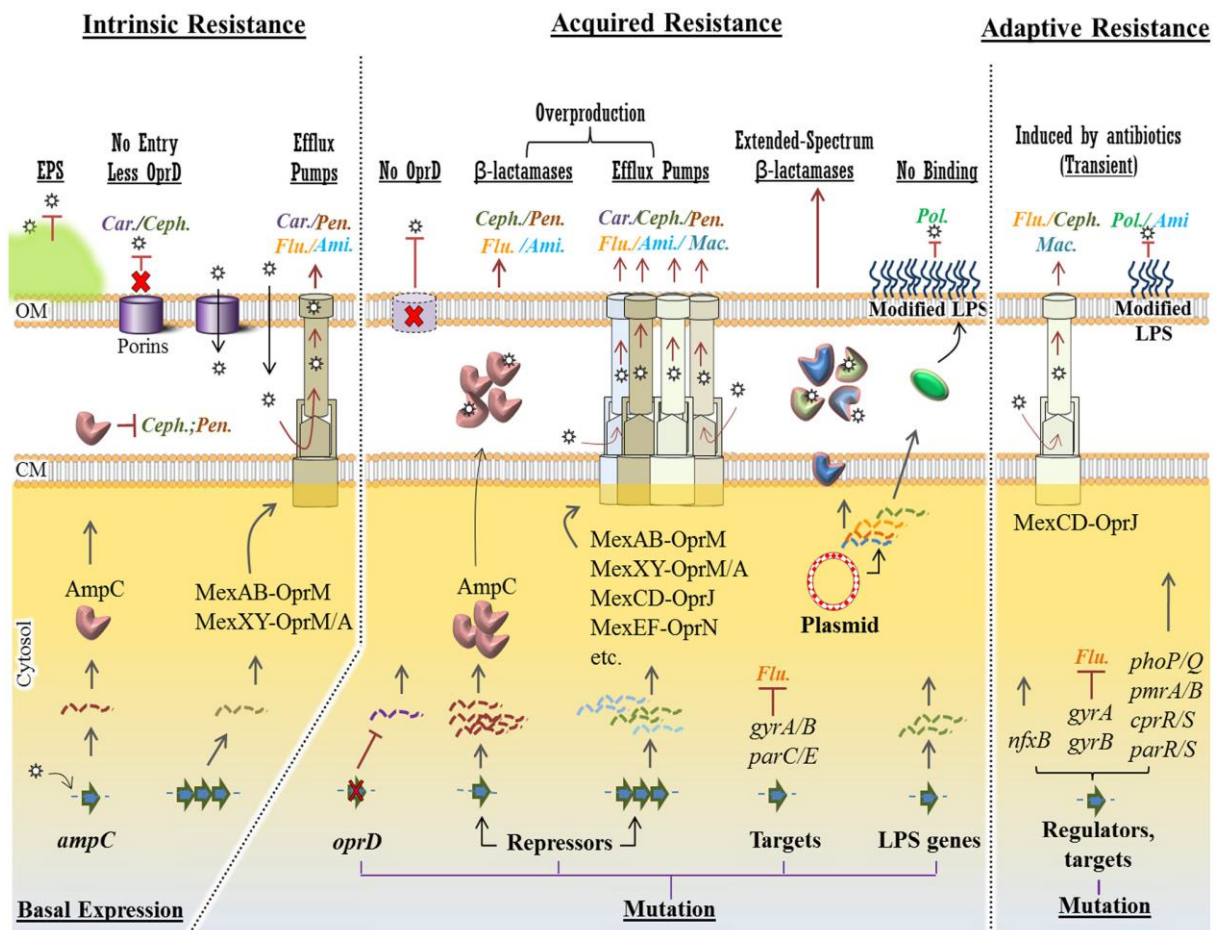
Slika 3. Struktura piocijanina (izrađeno u programu ChemDraw)



Slika 4. Shematski prikaz nastanka citotoksičnih radikala djelovanjem piocijanina (preuzeto iz Hall i sur., 2016).

1.3. Liječenje i rezistencija

Multirezistentne bakterije sve veći su problem današnjice, a jedna od najvećih prijetnji je *P. aeruginosa*. Tri mehanizma kojim ovaj patogen stvara rezistenciju su intrinzična rezistencija, stečena i adaptivna rezistencija. Intrinzična rezistencija odnosi se na genetički kodiranu rezistenciju kao što su građa stanične membrane, koja sprječava ulaz velikih hidrofilnih molekula u citosol, te manjak antibiotskih meta na površini stanice, ali i smanjen broj nespecifičnih porina i zamjena za specifične. Nadalje, *P. aeruginosa* posjeduje velik broj efluks pumpi koje su specijalizirane za izbacivanje toksičnih molekula i antibiotika iz stanice. Četiri glavne efluks pumpe su MexAB-OprM, MexXY/OprM(OprA), MexCD-OprJ, i MexEF-OprN. Osim toga, intrinzično su kodirani i geni za inducibilnu β -laktamazu (AmpC) zaduženi za stvaranje β -laktamaze uz prisutnost aminopenicilina i cefalosporina koji se posljedično hidroliziraju. No, ekspresija ovih gena može se povećati kroz mehanizme stečene i adaptivne rezistencije. Mehanizmi stečene rezistencije su mutacije ili horizontalni prijenos gena putem plazmida. Tako npr. mutacija gena AmpC može uzrokovati povećanje sinteze enzima β -laktamaze čime dolazi do rezistencije na širi spektar antibiotika kao što su aminoglikozidi i fluorokinoloni. Rezistenciju na antibiotike *P. aeruginosa* može steći i horizontalnim prijenosom putem plazmida koji sadrži gene kodirane za β -laktamaze proširenog spektra, karbapenemaze te 16S rRNA metilaze. Adaptivna rezistencija još nije dovoljno proučena, no vjeruje se da prilikom vanjskog stresa ili prisutnošću specifičnih antibiotika dolazi do inducirane promjene genske ekspresije, proizvodnje proteina ili antibiotskih meta. Na ovaj način dolazi do povećane ekspresije efluksnih pumpi ili čak promjene strukture lipopolisaharida. Ovo je reverzibilni tip rezistencije koji će se izgubiti uklanjanjem vanjskog podražaja. Shematski prikaz sustava antibiotske rezistencije *P. aeruginosa* prikazan je na Slici 5. (Moradali i sur., 2017).

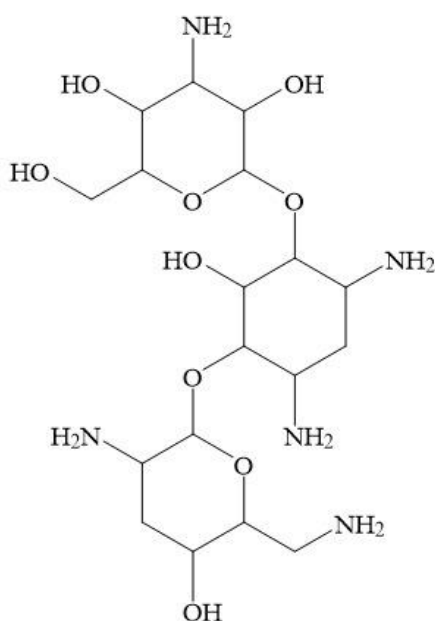


Slika 5. Shematski prikaz sustava antibiotičke rezistencije *P. aeruginosa* (preuzeto iz Moradali i sur., 2017).

Ovisno o rezultatima osjetljivosti na antibiotike, infekcije *P. aeruginosa* liječe se ovim skupinama antibiotika: aminoglikozidima (gentamicin, tobramicin, amikacin, netilmicin), karbapenemima (imipenem, meropenem), cefalosporinima (ceftazidim, cefepim), fluorokinolonima (ciprofloksacin, levofloksacin), penicilinima uz inhibitore β -laktamaze (tikarcilin i piperacilin u kombinaciji s klavulanskom kiselinom ili tazobaktamom), monobactamima (aztreonam), fosfomicinima te polimiksinima (kolistin, polimiksin B). Kako bi liječenje bilo uspješnije te se povećala vjerojatnost odabira učinkovitog antibiotika, kao empirijska terapija koristi se kombinacija antibiotika koja prelazi na monoterapiju nakon obrade osjetljivosti na antibiotike. Kao empirijska terapija se najčešće koriste kombinacije antipseudomonasni β -laktamski antibiotici (piperacilin/tazobaktam, ceftolozan/tazobaktam, ceftazidim, cefepim, ili karbapenem) s aminoglikozidom ili fluorokinolonom (<https://www.drugsincontext.com>).

1.4. Tobramicin

Najdjelotvorniji aminoglikozidni antibiotik u terapiji *P. aeruginosa* je tobramicin čija je struktura prikazana na Slici 6. Kao i svi aminoglikozidi, tobramicin se veže na 16 rRNA na 30S podjedinici ribosoma bakterije sprječavajući translokaciju čime se sprječava sinteza bakterijskih proteina. Dolazi do otpuštanja nefunkcionalnih proteina koji se nakupljaju u stanici te posljedično dovode do njezine lize. Tobramicin se sastoji od šećera s amino skupinama povezanih glikozidnom vezom, a farmakološko djelovanje osigurava mu farmakofor 2-deoksistreptamin. Slabe je oralne i topikalne bioraspodjelivosti te se primjenjuje intravenozno ili intramuskularno (Neu, 1976).



Slika 6. Struktura tobramicina (izrađeno u programu ChemDraw)

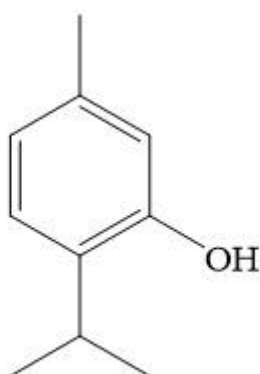
1.5. *Satureja montana* L.

Višegodišnja biljka *Satureja montana* L., poznata i kao primorski vrisak, pripada porodici *Lamiaceae* te raste u toplim, suhim, sunčanim područjima Mediterana i Sjeverne Afrike. Eterično ulje *Satureja montana* L. posjeduje antiseptička, antioksidativna, antifungalna i karminativna svojstva te se osim u industriji koristi i u mediteranskoj kuhinji. Sa sve većom bakterijskom rezistencijom na antibiotike, eterična ulja postaju dobra alternativa za liječenje bakterijskih infekcija, a upravo eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L. pokazalo je izrazita antibakterijska svojstva na različite mikroorganizme. Glavne sastavnice eteričnog ulja

Satureja montana L. odgovorne za njezino antibakterijsko djelovanje su monoterpeni timol i karvakrol (Maccelli i sur., 2019).

1.6. Timol

Timol je monoterpeni fenol, poznat kao i 2-izopropil-5-metilfenol (Slika 7.), prisutan u biljkama porodice Lamiaceae, ponajviše biljkama roda *Thymus*, *Satureja* i *Origanum*. Bijela je kristalična tvar dobro topljiva u alkoholu, bazičnim otopinama te organskim otapalima, a slabo topljiva u vodi. Posjeduje niz farmakoloških djelovanja kao što su antioksidativno, protuupalno, analgetičko, spazmolitičko, antitumorsko, antifungalno, antiseptičko te antibakterijsko zbog čega pokazuje veliki terapijski potencijal. Timol iz eteričnog ulja *Thymus vulgaris* pokazao je bakteriostatsku aktivnost na većinu gram pozitivnih i gram negativnih bakterija. Mehanizam antibakterijskog djelovanja nije potpuno poznat no pretpostavlja se da timol narušava integritet lipidne frakcije bakterijske stanične membrane, inducirajući permeabilizaciju i depolarizaciju, posljedično dovodeći do istjecanja unutarstaničnog sadržaja (Nagoor Meeran i sur., 2017).



Slika 7. Struktura timola (izrađeno u programu ChemDraw)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Velika sposobnost prilagođavanja, ubikvitarnost, česte infekcije, uzrok visokog morbiditeta i mortaliteta te razvoj sve veće rezistencije na antibiotike, razlozi su zbog čega se *Pseudomonas aeruginosa* smatra jednim od najvećih zdravstvenih problema današnjice te zbog čega je hitno pronaći alternativnu terapiju.

Eterična ulja ljekovitih biljaka tradicionalno se koriste u medicini zbog svojeg širokog spektra bioloških svojstava. Antimikrobno svojstvo osobito je istraživano u posljednje vrijeme te se eterična ulja čine kao dobra alternativa u borbi protiv multirezistentnih bakterija.

Cilj ovog rada je ispitati utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. i timola, u odabranim koncentracijama, zasebno i u kombinaciji s antibiotikom tobramicinom, na bakterijsku međustaničnu komunikaciju (engl. *quorum sensing*), odnosno na stvaranje pigmenta piocijanina, važnog faktora virulencije bakterije *P. aeruginosa*.

Specifični ciljevi ovog rada su sljedeći:

- 1) Odrediti minimalne inhibitorne koncentracije eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L., timola i aminoglikozidnog antibiotika tobramicina za bakteriju *Pseudomonas aeruginosa* PAO1;
- 2) Ispitati utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L., timola i aminoglikozidnog antibiotika tobramicina pojedinačno i u kombinaciji na rast planktonskih stanica bakterije *Pseudomonas aeruginosa* PAO1;
- 3) Ispitati utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L., timola i aminoglikozidnog antibiotika tobramicina zasebno i u kombinaciji na stvaranje pigmenta piocijanina bakterije *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Bakterije

U ovom radu ispitivan je bakterijski soj PAO1, vrste *Pseudomonas aeruginosa* (Leibnitz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany; kataloški broj DSM 1707).

3.1.2. Standardne kemikalije i otopine

- kloroform (Riedel-de-Haën)
- klorovodična kiselina, HCl (Lach-Ner)
- dimetilsulfoksid, DMSO (Sigma)

3.1.3. Eterično ulje i komponente

- eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L. (dobiveno od prof. dr. sc. Sande Vladimir Knežević, Zavod za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu)
- timol (Acros Organics)

3.1.4. Antibiotici

- tobramicin sulfat (Xellia Pharmaceuticals ApS, Copenhagen, Denmark)

3.1.5. Hranjivi mediji

- tekući medij Luria-Bertani (LB): 10 g/L tripton, 5 g/L kvašćev ekstrakt, 10 g/L NaCl (Difco TM, Lennox)

3.2. METODE

3.2.1. Priprava otopina eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. i timola

U istraživanju je korišteno eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L. (dalje u tekstu navedeno kao eterično ulje satureje), dobiveno destilacijom vodenom parom pomoću Clevenger aparature (dobiveno ljubaznošću prof. dr. sc. Sande Vladimir-Knežević, Zavod za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta), i komercijalno pribavljen timol. Udio timola u eteričnom ulju satureje određen je analizom u vezanom sustavu plinski kromatograf-spektrometar masa na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. te iznosi 56,47% (Andričević, 2019.; Duspara, 2022).

Timol i eterično ulje satureje otopljeni su u otapalu DMSO do konačne koncentracije 100 mg/mL te su iz te matične otopine pripremljene konačne koncentracije eteričnog ulja i timola u LB-mediju. Koncentracije 0,5 mg/mL odabrane su iz razloga što su se u prethodnim istraživanjima napravljenim u laboratoriju pokazale kao učinkovite u djelovanju na rast biofilma (Andričević, 2019.), proizvodnju proteaza i pokretljivost (Duspara, 2022).

3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije aminoglikozidnog antibiotika tobramicina

Metodom serijske dilucije određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) tobramicina potrebna za inhibiciju rasta *Pseudomonas aeruginosa* (Andrews, 2001). Antibiotik je razrijeđen geometrijskom progresijom u niz epruveta s LB tekućim hranjivim medijem do koncentracija 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L i 16 mg/L te je provedeno mjerenje. Zatim je 3 mL LB-medija s antibiotikom inokulirano noćnom kulturom *P. aeruginosa* PAO1 u omjeru 1:100 te je kultura inkubirana 24 h pri temperaturi od 37°C uz potresanje od 200 rpm (zračna tresilica MaxQ 400, Thermo Scientific). Minimalna inhibitorna koncentracija tobramicina je određena kao najmanja koncentracija antibiotika koja inhibira rast bakterije određena vizualnim ispitivanjem bistrine i stupnja замуćenja epruveta promatranjem duž njezine osi prema tamnoj podlozi i uspoređivanjem s poredbenom suspenzijom, koja je pripremljena inokulacijom hranjivog medija bakterijskom kulturom PAO1 bez dodatka antibiotika.

3.2.3. Priprema i tretiranje bakterijske kulture s otopinama eteričnog ulja satureje, timola i tobramicina

Učinak eteričnog ulja satureje, timola i tobramicina na sintezu piocijanina proveden je prema prilagođenoj metodi rada Essar i sur., 1990. Noćna kultura *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

pripremljena je inokulacijom 5 mL LB-medija s bakterijskom kulturom s Petrijeve ploče. Kultura je zatim inkubirana 21 sat pri temperaturi od 37°C u zračnoj tresilici (MaxQ 4000, Thermo scientific) na brzini od 200 rpm.

Nakon inkubacije je 20 mL LB-medija alikvotirano u šest sterilnih Erlenmeyerovih tikvica od 100 mL. Prema shemi u Tablici 1. je u svaku pojedinu tikvicu dodan određeni volumen pripremljenih matičnih otopina. Koncentracije eteričnog ulja satireje i timola u matičnim otopinama iznosile su 100 mg/mL, a kako bi se postigla koncentracija od 0,5 mg/mL korišteni su volumeni eteričnog ulja i timola od 100 µL. Tobramicin je dodan u konačnoj koncentraciji 0,5 mg/L. U svaku je tikvicu dodano 200 µL noćne kulture kako bi se postiglo razrjeđenje 1:100. Pripremljene otopine su zatim inkubirane 24 h pri temperaturi od 37°C u zračnoj tresilici (MaxQ 4000, Thermo scientific) na brzini 200 rpm.

Tablica 1. Shema priprave otopina

Broj tikvice	Volumen LB medija	Volumen <i>P. a.</i> PAO1	Volumen eteričnog ulja	Volumen timola	Volumen tobramicina
1	20 mL	200 µL	X	X	X
2	20 mL	200 µL	100 µL	X	X
3	20 mL	200 µL	X	100 µL	X
4	20 mL	200 µL	X	X	20 µL
5	20 mL	200 µL	100 µL	X	20 µL
6	20 mL	200 µL	X	100 µL	20 µL

3.2.4. Određivanje vrijednosti optičke gustoće bakterijske kulture OD₆₀₀

Iz prethodno pripremljenih tikvica uzet je alikvot od 350 µL te prenesen na mikrotitarsku pločicu, a kao slijepa proba je korišten LB-medij. Vrijednost optičke gustoće pri valnoj duljini od 600 nm (engl. *optical density*, OD₆₀₀), koja ukazuje na broj bakterijskih stanica u LB mediju, određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 600 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer).

3.2.5. Ekstrakcija piocijanina

U osam Eppendorf epruveta preneseno je po 2 mL bakterijske kulture iz prethodno pripremljenih tikvica. Zatim je provedeno centrifugiranje 5 minuta na 16000 g stolnom centrifugom (5424R, Eppendorf). Nakon centrifugiranja 7,5 mL supernatanta odvojeno je u

dvije epruvete od 15 mL te je u svaku epruvetu dodano je 4,5 mL kloroforma. Epruvete su vorteksirane dva puta po 10 sekundi, a zatim centrifugirane 10 minuta na 3500 g centrifugom Jouan, Thermo Scientific, U donjem plavkastom sloju kloroforma otopljen je piocijanin. 1 mL plavkastog sloja odvojilo se u novu Eppendorf epruvetu od 1,5 mL te je dodano 0,5 mL 0,2 M HCl. Epruvete su zatim vorteksirane dva puta po 10 sekundi nakon čega su centrifugirane 5 minuta na 16000 g u stolnoj centrifugi (5424R, Eppendorf). Potom je gornji vodeni sloj ružičaste boje odvojen u Eppendorf epruvete od 1,5 mL. Na mikrotitarsku pločicu preneseno je 350 µL otopine te izmjerena apsorbancija pri 520 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer). Kao slijepa proba koristilo se 350 µL 0,2M HCl.

3.2.6 Statistička analiza

Učinak eteričnog ulja satureje, timola i tobramicina, samostalno ili u kombinaciji, na smanjenje rasta bakterijske kulture *P. aeruginosa* određen je uspoređivanjem vrijednosti optičke gustoće (OD₆₀₀) netretirane i tretirane kulture. Vrijednosti za pojedinu tretiranu i netretiranu bakterijsku kulturu dobivene su u tri neovisna pokusa od kojih je svaki rađen u duplikatu, a konačne vrijednosti izražene su kao aritmetička sredina i korigirane za vrijednost standardne devijacije (SD). Rezultat je izražen kao postotak optičke gustoće tretiranih stanica u odnosu na netretirane bakterijske stanice:

$$\frac{OD_{600} (PAO1 + et. ulje; tim.; tob.)}{OD_{600} (PAO1)} \times 100$$

Kako bi se odredio utjecaj eteričnog ulja satureje, timola i tobramicina na proizvodnju piocijanina bakterije *P. aeruginosa*, uspoređivala se apsorbancija mjerena na 520 nm (A₅₂₀) tretirane i netretirane bakterijske kulture. Vrijednosti za pojedinu tretiranu i netretiranu bakterijsku kulturu dobivene su u tri neovisna pokusa od kojih je svaki rađen u duplikatu, a konačne vrijednosti izražene su kao aritmetička sredina i korigirane za vrijednost standardne devijacije (SD). Rezultat je izražen kao postotak apsorbancije pri 520 nm tretiranih u odnosu na netretirane stanice:

$$\frac{A_{520} (PAO1 + et. ulje; tim.; tob.)}{A_{520} (PAO1)} \times 100$$

Normalizacija vrijednosti apsorbancije na broj stanica izražena je omjerom vrijednosti apsorbancije izmjerene na 520 nm i vrijednosti optičke gustoće izmjerene na 600 nm. Konačan

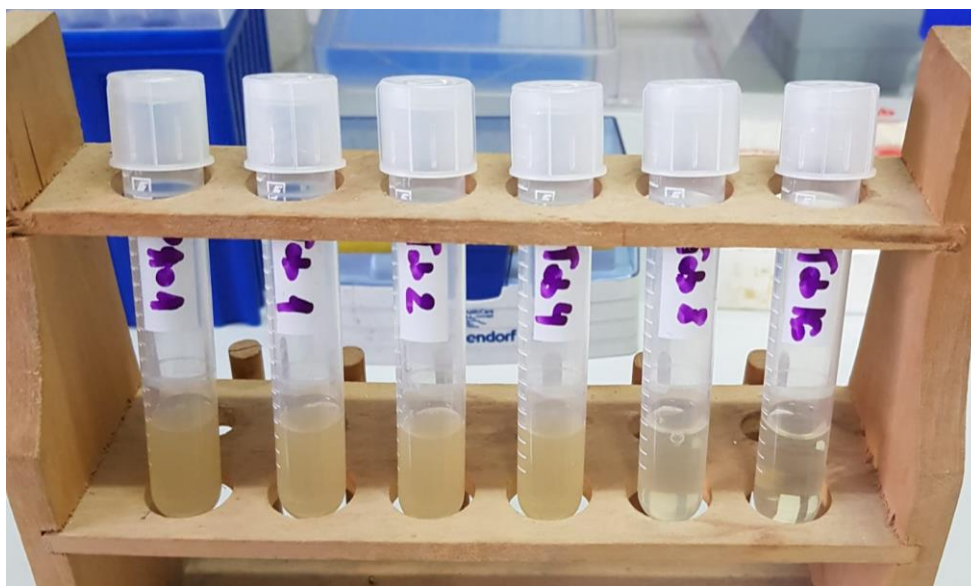
rezultat je izražen kao postotak omjera aritmetičke sredine vrijednosti apsorbancije pri 520 nm i vrijednosti aritmetičke sredine optičke gustoće tretiranih u odnosu na netretirane bakterijske stanice:

$$\frac{\frac{A_{520}}{OD_{600}} (PAO1 + et.ulje; tim.; tob.)}{\frac{A_{520}}{OD_{600}} (PAO1)} \times 100$$

4. Rezultati

4.1 Minimalna inhibitorna koncentracija tobramicina

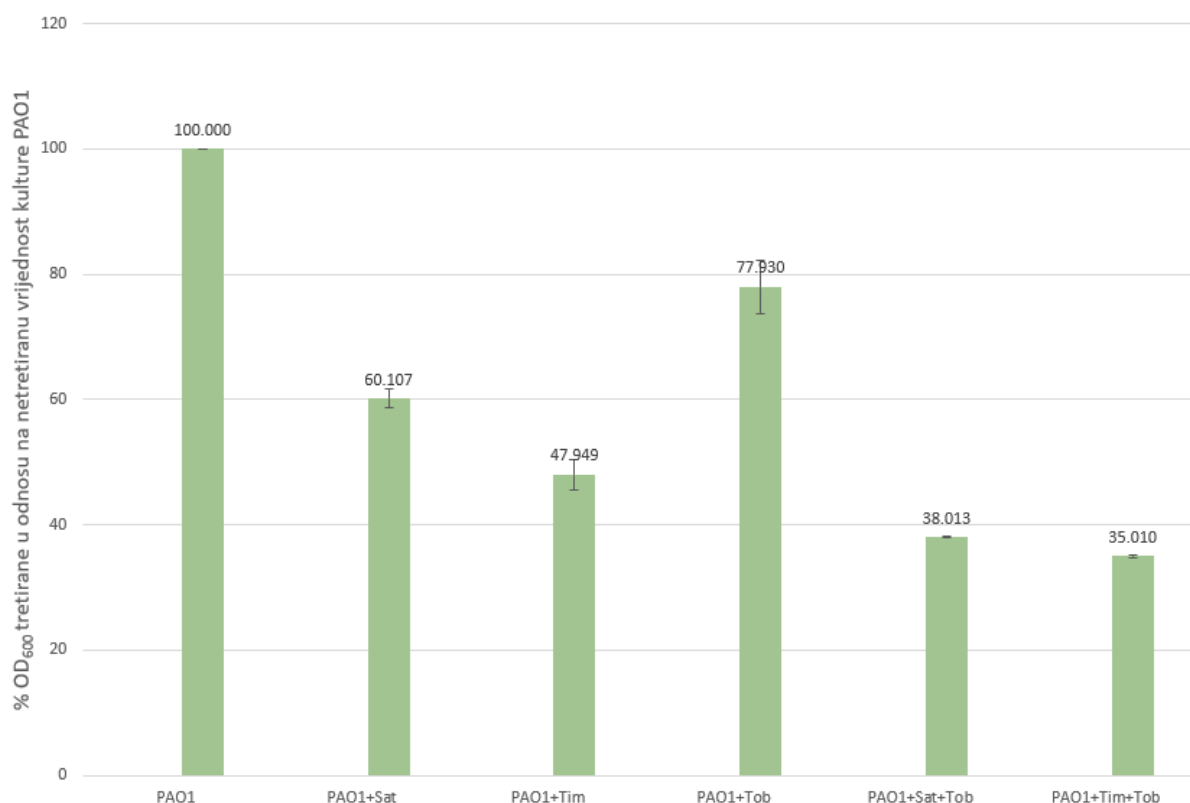
Kao što je već navedeno, minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) tobramicina potrebna za inhibiciju rasta bakterije *P. aeruginosa* određena je metodom serijske dilucije. Temeljem bistrine i stupnja замуćenja otopine, promatranjem epruvete duž osi prema tamnoj podlozi i uspoređivanjem s netretiranom kulturom, zaključeno je da MIK iznosi između 8 mg/L i 16 mg/L. Za daljnji rad odabrana je subinhibitorna koncentracija od 0,5 mg/L za koju je u prethodnim istraživanjima u laboratoriju pokazano da smanjuje proizvodnju proteaza i pokretljivost, koji su pod izravnom kontrolom QS-a (Duspara, 2022).



Slika 7. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije tobramicina metodom serijske dilucije praćenjem замуćenja otopina različitih koncentracija tobramicina (s lijeva na desno od druge epruvete: 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L i 16 mg/L) u odnosu na netretiranu kulturu (prva epruveta).

4.2 Učinak eteričnog ulja satireje, timola i tobramicina na rast bakterije *P. aeruginosa*

Na Slici 8. prikazana je učinak eteričnog ulja satireje, timola i tobramicina, samostalno ili u kombinaciji, na smanjenje rasta bakterijske kulture *P. aeruginosa*.



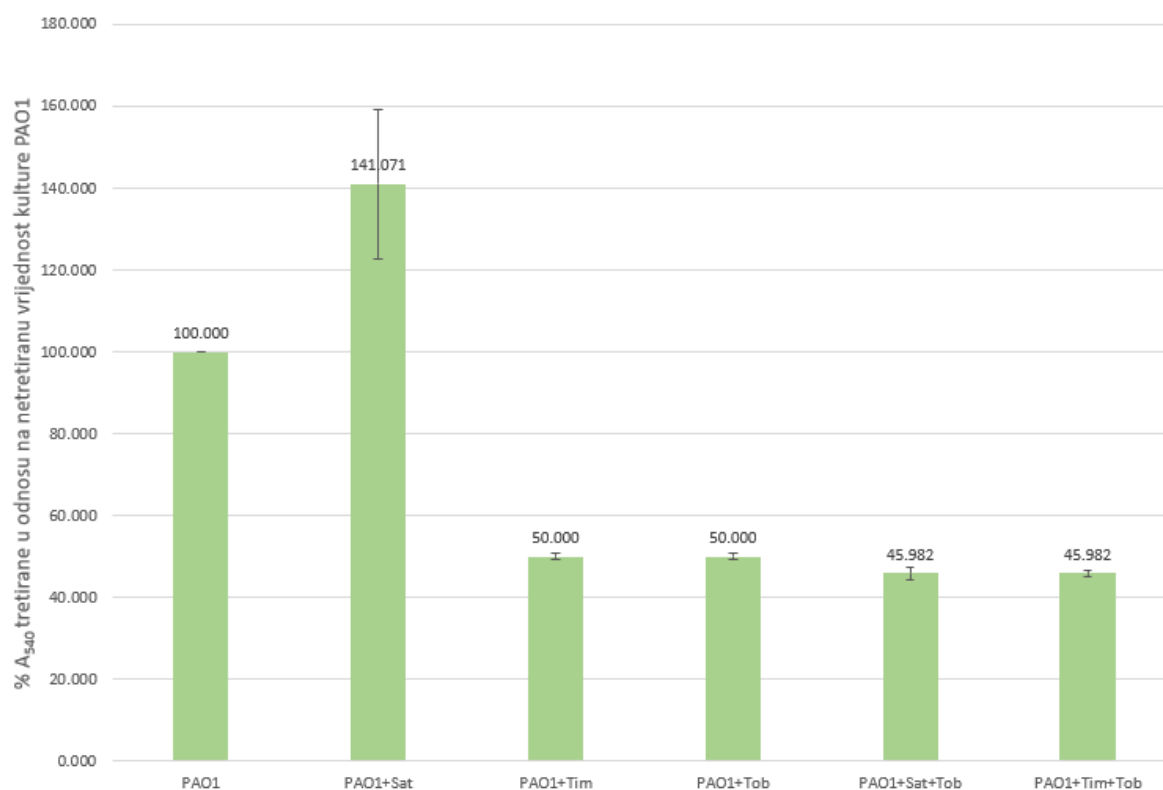
Slika 8. Učinak eteričnog ulja satureje, timola i tobramicina, samostalno ili u kombinaciji, na smanjenje rasta bakterijske kulture *P. aeruginosa* PAO1 određen uspoređivanjem vrijednosti optičke gustoće (OD_{600}) tretirane i netretirane kulture. Vrijednosti za pojedinu tretiranu i netretiranu bakterijsku kulturu dobivene su u tri neovisna pokusa od kojih je svaki rađen u duplikatu, a konačne vrijednosti izražene su kao aritmetička sredina i korigirane za vrijednost standardne devijacije (SD). Rezultat je izražen kao postotak optičke gustoće tretiranih stanica u odnosu na netretirane bakterijske stanice.

Prema dobivenim podacima, rast bakterijske kulture *P. aeruginosa* PAO1 smanjen je u prosjeku $39,9\% \pm 1,5\%$ u kulturi tretiranoj eteričnim uljem satureje u koncentraciji $0,5 \text{ mg/mL}$ u odnosu na netretiranu bakterijsku kulturu dok je u kulturi tretiranoj timolom, koncentracije $0,5 \text{ mg/mL}$, došlo do smanjenja od $52,1\% \pm 2,4\%$. Pri tretiranju bakterijske kulture aminoglikozidnim antibiotikom tobramicinom u koncentraciji $0,5 \text{ mg/L}$ došlo je do redukcije rasta planktonskih stanica za u prosjeku $22,1\% \pm 4,2\%$.

Za određivanje potencijalnog sinergističkog ili antagonističkog djelovanja, bakterijska kultura *P. aeruginosa* tretirana je kombinacijom tobramicina u koncentraciji $0,5 \text{ mg/L}$ s eteričnim uljem satureje koncentracije $0,5 \text{ mg/mL}$ te kombinacijom tobramicina u koncentraciji $0,5 \text{ mg/L}$ i timola u koncentraciji $0,5 \text{ mg/mL}$. Obje kombinacije pokazale su otprilike jednako smanjenje rasta bakterijskih stanica. Eterično ulje satureje i tobramicin doveli su do smanjenja rasta od $38,01\% \pm 0,1\%$, a kombinacija tobramicina s timolom do redukcije rasta od $65\% \pm 0,3\%$.

4.3 Učinak eteričnog ulja satireje, timola i tobramicina na proizvodnju piocijanina

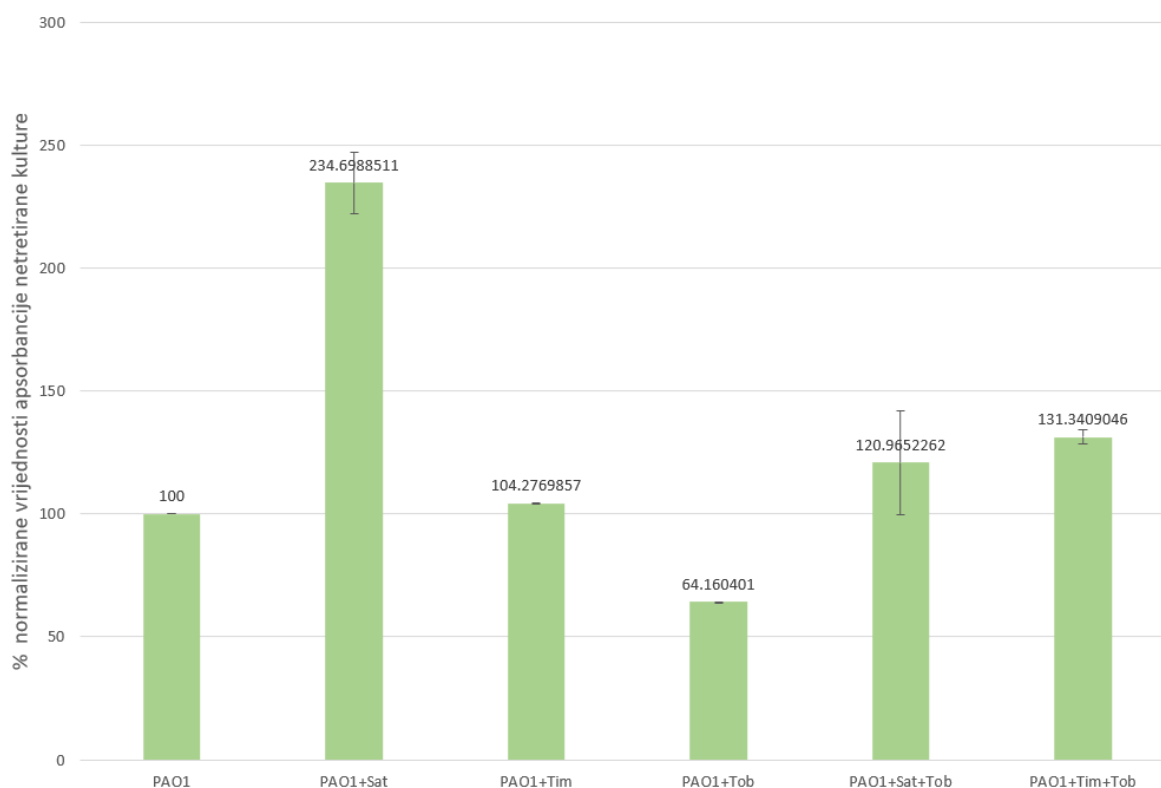
Na Slici 9. prikazan je učinak eteričnog ulja satireje, timola i tobramicina, samostalno ili u kombinaciji, na smanjenje stvaranja pigmenta piocijanina bakterijske kulture *P. aeruginosa*.



Slika 9. Učinak eteričnog ulja satireje, timola i tobramicina, samostalno ili u kombinaciji, na smanjenje stvaranja pigmenta piocijanina bakterijske kulture *P. aeruginosa* PAO1 određen uspoređivanjem vrijednosti apsorbancije ekstrahiranog piocijanina pri 520 nm (A_{520}) tretirane i netretirane kulture. Vrijednosti za pojedinu tretiranu i netretiranu bakterijsku kulturu dobivene su u tri neovisna pokusa od kojih je svaki rađen u duplikatu, a konačne vrijednosti izražene su kao aritmetička sredina i korigirane za vrijednost standardne devijacije (SD). Rezultat je izražen kao postotak apsorbancije tretiranih stanica u odnosu na netretirane bakterijske stanice.

Rezultati pokazuju jednako smanjenje stvaranja pigmenta piocijanina od 50,00% \pm 7,7% u prisustvu timola u koncentraciji 0,5 mg/mL te u prisustvu tobramicina u koncentraciji 0,5 mg/L. Pri inkubaciji PAO1 s kombinacijom eteričnog ulja satireje u kombinaciji s tobramicinom koncentracije 0,5 mg/L, kao i s kombinacijom timola u koncentraciji 0,5 mg/mL i tobramicina u koncentraciji 0,5 mg/L, došlo je do smanjenja stvaranja piocijanina za oko 54,01% \pm 0,8%. No, tretiranjem bakterijske kulture PAO1 s eteričnim uljem satireje u koncentraciji 0,5 mg/mL dovelo je do povećanja stvaranja pigmenta piocijanina za 41,07% \pm 18,8%.

Slika 10. prikazuje odnos vrijednosti apsorbancije piocijanina normaliziranih na broj planktonskih stanica netretirane kulture i kultura tretiranih eteričnim uljem satireje, timolom i tobramicinom, zasebno ili u kombinaciji.



Slika 10. Učinak eteričnog ulja satireje, timola i tobramicina, samostalno ili u kombinaciji, na smanjenje stvaranja pigmenta piocijanina bakterijske kulture *P. aeruginosa* PAO1 određen uspoređivanjem relativne vrijednosti apsorbancije ekstrahiranog piocijanina pri 520 nm (A_{520}) normalizirane na broj bakterijskih stanica tretirane i netretirane bakterijske kulture. Vrijednosti za pojedinu tretiranu i netretiranu bakterijsku kulturu dobivene su u tri neovisna pokusa od kojih je svaki rađen u duplikatu, a konačne vrijednosti izražene su kao aritmetička sredina i korigirane za vrijednost standardne devijacije (SD). Rezultat je izražen kao postotak normalizirane vrijednosti apsorbancije tretiranih stanica u odnosu na netretirane bakterijske stanice.

Dobiveni rezultati pokazuju da se u prisustvu eteričnog ulja satireje u koncentraciji 0,5 mg/mL dolazi do povećanja stvaranja pigmenta piocijanina u bakterijskoj kulturi *P. aeruginosa* PAO1 za oko 132,70% \pm 12,3%. S druge strane, u prisustvu timola u koncentraciji 0,5 mg/mL došlo je do statistički neznačajnog povećanja stvaranja piocijanina od 4,28% \pm 0,3%. Tobramicin u koncentraciji 0,5 mg/L pak pokazuje značajno smanjenje stvaranja pigmenta za 35,84% \pm 0,2%. Kombinacije eteričnog ulja satireje i tobramicina kao i timola i tobramicina također su pokazale povećano stvaranje pigmenta. Bakterijska kultura PAO1 je uz eterično ulje satireje koncentracije 0,5 mg/mL i tobramicin koncentracije 0,5 mg/L, producirala je 20,97% \pm 21,1%

više pigmenta, a kultura tretirana timolom i tobramicinom u istim koncentracijama je proizvodila $31,34\% \pm 2,9\%$ više piocijanina od netretirane kulture.

5. RASPRAVA

Pseudomonas aeruginosa ubikvitarna je gram negativna bakterija koja uzrokuje vrlo ozbiljne oportunističke infekcije. Posjeduje široki spektar virulencije koji je pod kontrolom kompleksnog sustava bakterijske međustanične komunikacije (engl. *Quorum sensing*, QS), a jedan od tih faktora virulencije je plavo-zeleni pigment piocijanin za koji se pokazalo da ima bitnu ulogu u patogenezi ove bakterije. Zbog široke rasprostranjenosti, visoke stope infekcija, visokoj smrtnosti te sve većoj antibiotskoj rezistenciji, *P. aeruginosa* postao je veliki globalni problem za koji su hitno potrebni novi terapijski oblici (Mielko i sur., 2019., Chegini i sur., 2020; Lau i sur., 2004).

Eterična ulja se iz davnina koriste u tradicionalnoj medicini radi svojeg širokog biološkog djelovanja. Eterična ulja biljne vrste *Satureja* posjeduju antibakterijsko, fungicidno, antiviralno, antioksidativno, antispazmogeno te antidijarično djelovanje. Za antimikrobno djelovanje eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. korištenog u ovom radu odgovorna je glavna sastavnica, monoterpen timol (Skočibušić i Bezić, 2004). Mehanizam djelovanja eteričnog ulja i glavne sastavnice timola nije u potpunosti razjašnjen, stoga se ne može zaključiti kako će ono djelovati na rast te stvaranje pigmenta piocijanina bakterijskog soja *P. aeruginosa* PAO1 korištenog u ovom radu.

U prvom dijelu rada ispitivano je kako eterično ulje *satureje* te njezina glavna sastavnica, timol, utječu na rast bakterijskih stanica kulture soja *P. aeruginosa* PAO1. Za oboje su odabrane koncentracije 0,5 mg/mL koje su se u prethodnim istraživanjima napravljenim u laboratoriju pokazale kao učinkovite u djelovanju na rast biofilma (Andričević, 2019.) te proizvodnju proteaza i pokretljivost (Duspara, 2022). Učinak na rast planktonskih stanica određen je mjerenjem optičke gustoće bakterijske kulture pri 600 nm (OD_{600}) nakon 24-satne inkubacije s otopinama eteričnog ulja *satureje* i timola pri uvjetima opisanim u poglavlju 3.2.4. U sva tri neovisno provedena pokusa, eterično ulje *satureje* i timol pokazuju inhibitorni učinak na rast bakterijske kulture *P. aeruginosa*. Čak se pokazalo da čista monoterpenska sastavnica, timol, pokazuje veće inhibitorno djelovanje na rast bakterije od eteričnog ulja *satureje*. To se može objasniti činjenicom da eterična ulja sadrže niz različitih spojeva koji međusobno ulaze u razne interakcije koje mogu biti sinergističke ili antagonističke te se tako učinak eteričnog ulja može razlikovati od učinka izolirane sastavnice (Burt, 2004).

Na isti način ispitan je i učinak kombinacije eteričnog ulja *satureje* i timola s aminoglikozidnim antibiotikom tobramicinom na rast kulture PAO1. Minimalna inhibitorna koncentracija tobramicina određena metodom serijske dilucije iznosila je između 8 i 16 mg/L, a za daljnja

ispitivanja korištena je subinhibitorna koncentracija od 0,5 mg/L. Navedene kombinacije pokazale su znatno smanjenje rasta planktonskih stanica *P. aeruginosa* PAO1 u odnosu na smanjenje koje je pokazao sam tobramicin, upućujući na sinergizam između tobramicina i timola te tobramicina i eteričnog ulja satureje. Ovakvi rezultati su u skladu s prethodnim ispitivanjima gdje je pokazan sinergistički učinak tobramicina s eteričnim uljem satureje i timolom na rast bakterijske kulture *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Andričević, 2019.).

U drugom dijelu rada ispitan je učinak eteričnog ulja satureje i timola na stvaranje pigmenta piocijanina kulture soja *P. aeruginosa* PAO1 koji je određen uspoređivanjem relativne vrijednosti apsorbancije ekstrahiranog piocijanina pri 520 nm (A_{520}) normalizirane na broj bakterijskih stanica tretirane i netretirane bakterijske kulture. Eterično ulje satureje i timol korišteni su u koncentraciji 0,5 mg/L. U navedenim koncentracijama timol nije pokazao značajnu razliku u stvaranju piocijanina u odnosu na netretiranu kulturu. No, zanimljivo je što je eterično ulje satureje u navedenoj koncentraciji uvelike povećalo stvaranje pigmenta piocijanina u odnosu na netretiranu kulturu. Slični rezultati dobiveni su i u prethodnim istraživanjima u kojima je ispitan utjecaj eteričnog ulja satureje na stvaranje biofilma gdje je pokazano da su iste koncentracije eteričnog ulja satureje imale inhibitorni učinak na rast bakterijske kulture *P. aeruginosa* ATCC 27853, a promotivni učinak na stvaranje biofilma (Andričević, 2019.). Isto tako, u prethodnom ispitivanju proteolitičke aktivnosti uočen je promotivni učinak eteričnog ulja satureje na sojeve BB1285 (*rmtD+*) i ATCC 27853 (Duspara, 2022.).

Antibiotik tobramicin u koncentraciji 0,5 mg/L doveo je do smanjenja stvaranja pigmenta piocijanina, a u kombinaciji eteričnog ulja satureje s tobramicinom došlo je do manjeg povećanja u stvaranju piocijanina u odnosu na samo eterično ulje, upućujući na antagonističko djelovanje tobramicina i eteričnog ulja satureje na promociju stvaranja piocijanina. Timol, koji sam ne pokazuje promjenu u stvaranju pigmenta, u kombinaciji s tobramicinom također dovodi do povećanja stvaranja piocijanina iz čega se može zaključiti da međusobno djeluju antagonistički.

Rezultati istraživanja ovog rada pokazali su da eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L. i timol u odabranim koncentracijama učinkovito inhibiraju rast planktonskih stanica kulture *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, samostalno te u kombinaciji s aminoglikozidnim antibiotikom tobramicinom. Ti rezultati sugeriraju na potencijal u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa*, no nužna su opsežnija istraživanja. S druge strane, rezultati ispitivanja stvaranja pigmenta piocijanina pokazuju suprotan učinak te je tako pokazano da eterično ulje satureje i timol djeluju promotivno na stvaranje pigmenta,

sugerirajući da je ovaj mehanizam potpuno neovisan o antibakterijskom učinku. Sve to dodatno upućuje na potrebu daljnjih istraživanja ostalih sastavnica eteričnog ulje satureje te mehanizma njihovih interakcija kako bi se bolje razumjela ova interakcija.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L. i timol u koncentracijama 0,5 mg/mL učinkovito inhibiraju rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* PAO1;
- Timol u koncentraciji 0,5 mg/mL je pokazao jači inhibitorski učinak na rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* PAO1 u odnosu na eterično ulje *Satureja montana* L. što upućuje na antagonističko djelovanje sastavnica eteričnog ulja;
- Eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L. i timol u koncentracijama 0,5 mg/mL u kombinaciji s tobramicinom u koncentraciji 0,5 mg/L pokazuju sinergistički učinak na smanjenje rasta planktonskih stanica *P. aeruginosa* PAO1;
- Timol u koncentraciji 0,5 mg/mL nije pokazao značajan inhibitorski učinak na stvaranje pigmenta piocijanina *P. aeruginosa* PAO1;
- Eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L. u koncentraciji 0,5 mg/mL pokazalo je promotivan učinak na stvaranje pigmenta piocijanina *P. aeruginosa* PAO1;
- Eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L. i timol u koncentracijama 0,5 mg/mL pokazali su antagonističko djelovanje u kombinaciji s tobramicinom koncentracije 0,5 mg/L na stvaranje pigmenta piocijanina *P. aeruginosa* PAO1;
- Rezultati ovog rada doprinijet će budućim istraživanjima kompleksnog mehanizma interakcija eteričnog ulja *Satureja montana* L., timola i tobramicina za pomoć u borbi protiv infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa* PAO1.

LITERATURA

Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2001, 48, 5–16.

Andričević K. Učinak eteričnog ulja vrste *Satureja montana* L. i timola na rast i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa* Andričević, Diplomski rad, 2019, Sveučilište u Zagrebu.

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, 94, 223–253.

Chegini, Z., Khoshbayan, A., Taati Moghadam, M., Farahani, I., Jazireian, P., Shariati, A., Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: A review. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2020., 19(1)

Duspara F. Utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. i timola na pokretljivost te proteolitičku aktivnost bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, Diplomski rad, 2022, Sveučilište u Zagrebu

Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford IP. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J. Bacteriol.*, 1990, 172, 884–900.

Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A.J., Forbes, A., Perkins, A. v., Davey, A.K., Chess-Williams, R., Kiefel, M.J., Arora, D., Grant, G.D., Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 2016, 8(8), 236.

How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections, 2018., <https://www.drugsincontext.com>, pristupljeno 25.9.2022.

Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., McClean, S., *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22(6), 3128

Kalenić S. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 215–220.

Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection, *Trends Mol. Med.*, 2004, 10(12), 599–606.

Maccelli, A., Vitanza, L., Imbriano, A., Frascchetti, C., Filippi, A., Goldoni, P., Maurizi, L., Ammendolia, M. G., Crestoni, M. E., Fornarini, S., Menghini, L., Carafa, M., Marianecchi, C., Longhi, C., Rinaldi, F., *Satureja montana* L. Essential Oils: Chemical Profiles/Phytochemical Screening, Antimicrobial Activity and O/W NanoEmulsion Formulations. *Pharmaceutics*, 2019, 12(1), 7.

Mielko KA, Jabłoński SJ, Milczewska J, Sands D, Łukaszewicz M, Młynarz P. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J. of Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 35(11), 178.

Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, 7, 39

Nagoor Meeran MF, Javed H, Al Tae H, Azimullah S, Ojha SK. Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. *Front. Pharmacol.*, 2017, 8, 380.

Neu, H. C., Tobramycin: An Overview. *J. Infect. Dis.*, 1976., 134, S3–S19.

Skočibušić M, Bezić N. Chemical Composition and Antimicrobial Variability of *Satureja montana* L. Essential Oils Produced During Ontogenesis. *J. Essent. Oil. Res.*, 2004, 16, 387–391.

Smith, R. S., Iglewski, B. H., *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2003,6(1), 56–60.

Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. *Pseudomonas aeruginosa*, U: *Mol. Med. Microbiol.* (2nd Ed.), 2015, 2–3, str. 753–767.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa ubikvitaran je oportunistički patogen te jedan od najznačajnijih uzročnika bolničkih infekcija. Posjeduje velik broj faktora virulencije između kojih se ističe plavo-zeleni pigment piocijanin koji djeluje proupalno, dovodi do stvaranja slobodnih radikala i oksidativnog stresa te potiče stvaranje biofilma i apoptozu neutrofila. Zbog velike stope morbiditeta i mortaliteta te sve veće antibiotske rezistencije uključen je u kategoriju kritičnih bakterijskih patogena za koju je nužno potrebno istraživanje i razvoj novih oblika terapije. Eterična ulja su još iz davnina poznata za svoja antimikrobna svojstva, a eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L. pokazalo je iznimno antibakterijsko djelovanje te je stoga u ovom radu ispitan utjecaj eteričnog ulja satureje i njezine glavne monoterpenke sastavnice timola u koncentracijama 0,5 mg/mL, zasebno i u kombinaciji s aminoglikozidnim antibiotikom tobramicinom u koncentraciji 0,5 mg/L, na rast i stvaranje piocijanina bakterijskog soja *P. aeruginosa* PAO1.

Ispitivanje utjecaja na rast bakterijske kulture provedeno je mjerenjem optičke gustoće na 600 nm dok je učinak na proizvodnju piocijanina određen mjerenjem apsorbancije ekstrahiranog piocijanina na 520 nm te normaliziranjem vrijednosti na broj bakterijskih stanica. Rezultati su pokazali da eterično ulje satureje i timol pokazuju inhibitorni učinak na rast bakterijskih stanica *P. aeruginosa* te sinergistički djeluju na smanjenje rasta u kombinaciji s tobramicinom. S druge strane, timol nije pokazao značajan utjecaj na stvaranje pigmenta piocijanina dok je u prisustvu eteričnog ulja satureje došlo do povećanog stvaranja pigmenta u odnosu na netretiranu bakterijsku kulturu. U kombinaciji s tobramicinom, eterično ulje i timol pokazali su antagonističko djelovanje te doveli do povećanog stvaranja pigmenta. Rezultati ovog rada doprinose boljem razumijevanju kompleksnih interakcija između eteričnih ulja i njezinih sastavnica na *P. aeruginosa* s ciljem unaprjeđenja terapije infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous opportunistic pathogen and one of the most significant causes of healthcare-associated infections. It possesses a variety of virulence factors, namely the blue-green pigment pyocyanin, which acts proinflammatory, leads to the production of free radicals and oxidative stress as well as induces biofilm formation and neutrophil apoptosis. Due to the huge morbidity and mortality and the increasing antibiotic resistance, it is considered a critical pathogen for which the research and new therapy are urgently needed. Essential oils have been recognised for their antimicrobial properties, and the essential oil from *Satureja montana* L. has shown exceptional antibacterial properties. This research examined the effect

of Satureja essential oil and its main monoterpene component thymol, both in concentrations 0,5 mg/mL, alone and in the combination with the aminoglycoside antibiotic tobramycin, on the growth and pyocyanin production of the bacterial cells of *P. aeruginosa* PAO1.

The effect on bacterial growth was examined by measuring the optical density at 600 nm while the effect on pyocyanin production was determined by measuring the absorption of the extracted pyocyanin at 520 nm and normalised on the number of bacterial cells. The results showed that Satureja essential oil and thymol both showed inhibitory effects on *P. aeruginosa* growth and they both acted synergistically with tobramycin. On the other hand, thymol showed no significant effect on pyocyanin production, while pyocyanin production was increased in the presence of Satureja essential oil. In combination with tobramycin, the essential oil and thymol showed antagonistic action that led to increased pigment production. The results of this study contribute to a better understanding of the complex interaction between essential oils and their components on *P. aeruginosa* with the goal of improving the therapy of infections caused by *P. aeruginosa*.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija/Medicinska biokemija
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. i timola na proizvodnju piocijanina bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Filip Sakoman

SAŽETAK

Pseudomonas aeruginosa ubikvitaran je oportunistički patogen te jedan od najznačajnijih uzročnika bolničkih infekcija. Posjeduje velik broj faktora virulencije između kojih se ističe plavo-zeleni pigment piocijanin koji djeluje proupalno, dovodi do stvaranja slobodnih radikala i oksidativnog stresa te potiče stvaranje biofilma i apoptozu neutrofila. Zbog velike stope morbiditeta i mortaliteta te sve veće antibiotske rezistencije uključen je u kategoriju kritičnih bakterijskih patogena za koju je nužno potrebno istraživanje i razvoj novih oblika terapije. Eterična ulja su još iz davnina poznata za svoja antimikrobna svojstva, a eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L. pokazalo je iznimno antibakterijsko djelovanje te je stoga u ovom radu ispitivan utjecaj eteričnog ulja satureje i njezine glavne monoterpeneske sastavnice timola u koncentracijama 0,5 mg/mL, zasebno i u kombinaciji s aminoglikozidnim antibiotikom tobramicinom u koncentraciji 0,5 mg/L, na rast i stvaranje piocijanina bakterijskog soja *P. aeruginosa* PAO1. Ispitivanje utjecaja na rast bakterijske kulture provedeno je mjerenjem optičke gustoće na 600 nm dok je učinak na proizvodnju piocijanina određen mjerenjem apsorbancije ekstrahiranog piocijanina na 520 nm te normaliziranjem vrijednosti na broj bakterijskih stanica. Rezultati su pokazali da eterično ulje satureje i timol pokazuju inhibitorni učinak na rast bakterijskih stanica *P. aeruginosa* te sinergistički djeluju na smanjenje rasta u kombinaciji s tobramicinom. S druge strane, timol nije pokazao značajan utjecaj na stvaranje pigmenta piocijanina dok je u prisustvu eteričnog ulja satureje došlo do povećanog stvaranja pigmenta u odnosu na netretiranu bakterijsku kulturu. U kombinaciji s tobramicinom, eterično ulje i timol pokazali su antagonističko djelovanje te doveli do povećanog stvaranja pigmenta. Rezultati ovog rada doprinose boljem razumijevanju kompleksnih interakcija između eteričnih ulja i njezinih sastavnica na *P. aeruginosa* s ciljem unaprjeđenja terapije infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa*.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 32 stranica, 10 grafičkih prikaza, 1 tablica i 19 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Pseudomonas aeruginosa*, *Satureja montana* L., eterično ulje, timol, piocijanin, tobramicin, bakterijska međustanična komunikacija

Mentor: **Dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Daniela Jakšić, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Maja Bival Štefan, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: veljača 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Biochemistry and Molecular biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

The effect of *Satureja montana* L. essential oil and thymol on pyocyanin synthesis of *Pseudomonas aeruginosa*

Filip Sakoman

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous opportunistic pathogen and one of the most significant causes of healthcare-associated infections. It possesses a variety of virulence factors, namely the blue-green pigment pyocyanin, which acts proinflammatory, leads to the production of free radicals and oxidative stress as well as induces biofilm formation and neutrophil apoptosis. Due to the huge morbidity and mortality and the increasing antibiotic resistance, it is considered a critical pathogen for which research and new therapy are urgently needed. Essential oils have been recognised for their antimicrobial properties, and the essential oil from *Satureja montana* L. has shown exceptional antibacterial properties. This research examined the effect of *Satureja* essential oil and its main monoterpene component thymol, both in concentrations 0,5 mg/mL, alone and in the combination with the aminoglycoside antibiotic tobramycin, on the growth and pyocyanin production of the bacterial cells of *P. aeruginosa* PAO1.

The effect on bacterial growth was examined by measuring the optical density at 600 nm while the effect on pyocyanin production was determined by measuring the absorption of the extracted pyocyanin at 520 nm and normalised on the number of bacterial cells. The results showed that *Satureja* essential oil and thymol both showed inhibitory effects on *P. aeruginosa* growth and they both acted synergistically with tobramycin. On the other hand, thymol showed no significant effect on pyocyanin production, while pyocyanin production was increased in the presence of *Satureja* essential oil. In combination with tobramycin, the essential oil and thymol showed antagonistic action that led to increased pigment production. The results of this study contribute to a better understanding of the complex interaction between essential oils and their components on *P. aeruginosa* with the goal of improving the therapy of infections caused by *P. aeruginosa*.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 32 pages, 10 figures, 1 table and 19 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *Satureja montana* L., essential oil, thymol, pyocyanin, tobramycin, quorum sensing

Mentor: **Gordana Maravić Vlahoviček, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Gordana Maravić Vlahoviček, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Daniela Jakšić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ime i Prezime, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: February 2023.