

# Antimikrobni učinak karvakrola i eteričnog ulja origana (*O. compactum*) na bakteriju *Staphylococcus aureus*

---

**Brajak, Marko**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:496162>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-12**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Marko Brajak**

**Antimikrobni učinak karvakrola i eteričnog ulja  
origana (*O. compactum*) na bakteriju  
*Staphylococcus aureus***

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Maje Šegvić Klarić.

*Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici Maji Šegvić Klarić na stručnom vodstvu, korisnim savjetima i strpljenju tijekom cijelog procesa izrade ovog diplomskog rada.*

*Velikim srcem zahvaljujem cijelom Zavodu, a posebice najboljoj tehničarki Štefi i asistentici Idi koje su uvijek bile spremne pomoći i pune ljubavi. Također, moram zahvaliti i Manueli Zadravec na ustupljenom laboratoriju i uvijek ugodnoj atmosferi.*

*Posebnu zahvalnost upućujem svojoj obitelji i prijateljima, koji su mi pružali podršku i motivaciju tijekom cijelog mog obrazovanja i rada na ovom diplomskom radu.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Antimikrobna rezistencija.....	1
1.2. Staphylococcus aureus.....	2
1.2.1. MRSA – Meticilin-rezistentni sojevi Staphylococcus aureus .....	2
1.3. Bakterijski biofilm.....	3
1.4. Infekcije kože i mekog tkiva .....	4
1.4.1. Impetigo .....	4
1.4.2. Folikulitis .....	5
1.4.3. Furunkuli i karbunkuli .....	5
1.4.4. Celulitis .....	6
1.4.5. Mastitis.....	6
1.5. Mupirocin .....	7
1.6. <i>Origanum compactum</i> .....	9
1.6.1 Karvakrol i timol.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	15
3.1. Materijali .....	15
3.2. Priprema radnih otopina i reagensa .....	16
3.2.1. Mupirocin.....	16
3.2.2. Karvakrol i eterično ulje origana .....	16
3.2.3. Reagens 2,3,5-trifeniltetrazolin klorid (TTC).....	17
3.3. GCMS analiza eteričnog ulja origana .....	17
3.4. Antimikrobno djelovanje mupirocina, karvakrola i eteričnog ulja origana na planktonske bakterije.....	18
3.4.1. Priprema inokuluma.....	18
3.4.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) .....	18
3.4.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) kombinacijom aktivnih tvari – metoda „šahovske ploče“ (checkerboard assay).....	19
3.5. Antimikrobno djelovanje mupirocina, kavakrola i eteričnog ulja origana i njihovih kombinacija na biofilm bakterija.....	21
3.5.1. Detekcija prizvodnje biofilma metodom Congo Red Agar (CRA) .....	21
3.6. Obrada podataka .....	22
4. REZULTATI.....	23

4.1. GCMS analiza eteričnog ulja origana ( <i>Origanum compactum</i> ) .....	23
4.2. Antimikrobno djelovanje mupirocina, karvakrola, eteričnog ulja origana na planktonske stanice sojeva bakterije <i>S. aureus</i> : određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) .....	25
4.3. Antimikrobno djelovanje mupirocina, karvakrola i eteričnog ulja origana na biofilm bakterije <i>S. aureus</i> . .....	27
5. RASPRAVA.....	32
6. ZAKLJUČCI .....	37
7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....	38
8. LITERATURA.....	39
9. SAŽETAK.....	48
9. SUMMARY .....	49

# 1. UVOD

## 1.1. Antimikrobna rezistencija

U današnje doba susrećemo se sa sve većom globalnom potrošnjom antibiotika i razvojem antimikrobne rezistencije. Prema podacima velike studije (Browne i sur., 2021) koja je pratila globalnu potrošnju antibiotika u razdoblju od 2000. do 2018. godine, utvrđen je značajan porast potrošnje antibiotika protekla dva desetljeća, s izvještajima koji pokazuju rast od 46%. Najveći porast je zabilježen u zemljama trećeg svijeta (za čak 111% u području Sjeverne Afrike i Bliskog Istoka), dok je u razvijenim zemljama stopa potrošnje antibiotika ostala stabilna u razdoblju od 2000. do 2018. godine. Prema WHO-om Izvještaju o nadzoru potrošnje antibiotika (World Health Organization, 2018) u razdoblju od 2016-2018. godine ukupna potrošnja antibiotika, u 65 zemalja i područja koja su uključena u praćenje potrošnje antibiotika, kretala se od 4,4 do 64,4 DDD (definirane dnevne doze) na 1000 stanovnika dnevno. Za područje Europe medijalna je potrošnja antibiotika iznosila 17,9 DDD na 1000 stanovnika dnevno, dok su brojke za Hrvatsku iznosile 20,28 DDD na 1000 stanovnika dnevno (World Health Organization, 2018).

Osim sve veće globalne potrošnje antibiotika puno je veća važnost u nastanku antimikrobne rezistencije. Prema Naghavi i sur. (2024) u 2021. godini procijenjeno je da je 4,71 milijuna smrtnih slučajeva bilo povezano s bakterijskom antimikrobnom rezistencijom (AMR), uključujući 1,14 milijuna (1,00–1,28) smrtnih slučajeva uzrokovanih izravno. Kada se promatraju smrti povezane s AMR-om i smrti izravno uzrokovane AMR-om, najveći globalni porast zabilježen je kod meticilin-rezistentne bakterije *Staphylococcus aureus* (MRSA). Broj smrtnih slučajeva povezanih s MRSA sojevima porastao je s 261.000 u 1990. godini na 550.000 u 2021. godini. Također, broj izravno uzrokovanih smrti porastao je s 57.200 u 1990. godini na 130.000 u 2021. godini. (Naghavi i sur., 2024).

## 1.2. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* je Gram-pozitivna bakterija iz reda Bacillales koja prebiva na našoj koži i sluznici kao komenzalni organizam (Abdelbary i sur., 2017). Obično ne uzrokuje infekciju na zdravoj koži; međutim, ako uđe u krvotok ili unutarnja tkiva, može uzrokovati različite potencijalno ozbiljne infekcije (Lowy, 1998). Od svog otkrića 1880-ih prepoznata je kao značajan oportunistički patogen kod ljudi, odgovoran za različite bolesti, od manjih kožnih infekcija do teške bakterijemije, infektivnog endokarditisa i nekrotizirajuće pneumonije (Tong i sur., 2015). Vrsta *S. aureus* je još uvijek vodeći uzročnik bolničkih infekcija rana nakon operacija (Giudice, 2020). Godišnja incidencija bakterijemije uzrokovane vrstom *S. aureus* kreće se od 9,3 do 65 slučajeva na 100.000 osoba-godina, ovisno o regiji i populaciji (Hindy i sur., 2022). Zanimljivo je da prema podacima iz rada Hindy i sur. (2022) stope bakteremija uzrokovanih ovom bakterijom su tijekom vremena ostale uglavnom iste, te nije bilo promjena u trendu smanjenja incidencije tijekom dva desetljeća. Osim gore navedenih životno opasnih bakteremija, *S. aureus* uzrokuje razne infekcije kože i mekog tkiva koje se kreću od bezopasnih (npr. impetigo i nekomplikirani celulitis) do životno ugrožavajućih. Također je najčešći patogen izoliran iz kirurških infekcija mjesta reza, kožnih apscesa i gnojnog celulitisa (Hindy i sur., 2022). Važnost infekcija vrstom *S. aureus* svakim danom postaje sve značajnija zbog pojave i rapidnog razvoja visoko rezistentnih sojeva kao što su već spomenuti MRSA i VRSA (vankomicin rezistentni *S. aureus*), a sve manjeg broja novih antibiotika.

### 1.2.1. MRSA – Meticilin-rezistentni sojevi *Staphylococcus aureus*

Meticilin-rezistentni soj *Staphylococcus aureus* (MRSA) prvi je put otkriven 1961. godine i postao je raširen patogen u mnogim zdravstvenim ustanovama (Siddiqui i Koirala, 2024). Godine 2017. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) kategorizirala je MRSA-u kao patogen visokog prioriteta na globalnoj listi prioriteta višestruko otpornih bakterija. Visoka opasnost MRSA-e leži u proizvodnji mnoštva čimbenika virulencije koji pomažu MRSA-i preživjeti u stresnim uvjetima *in vivo* te razvijenoj rezistenciji naspram širokog spektra antibiotika, uključujući antibiotike penicilinske i cefalosporinske strukture. Ključni razlog otpornosti MRSA-e na beta-laktamske antibiotike je prisutnost genske sekvence *mecA* koja stvara transpeptidazu PB2a koja smanjuje afinitet organizma za vezanje na beta-laktamske antibiotike (Shahkarami i sur., 2014). MRSA je evoluirao razvijajući brojne mehanizme antimikrobne

rezistencije i izbjegavanja imunološkog odgovora domaćina, a jedan od tih mehanizama uključuje i stvaranje biofilma.

### **1.3. Bakterijski biofilm**

Bakterijski biofilm je skupina bakterija koje su pričvršćene na površinu i/ili jedna na drugu te su ugrađene u samoproizvedenu podlogu uklopljenu u polimerni matriks (Vestby i sur., 2020). Zajednice biofilma mogu biti pripadnici više vrsta mikroorganizama, ili više carstava (npr. bakterija i gljiva), ali mogu pripadati i samo jednoj vrsti kao što je to u slučaju stvaranja biofilma MRSA-e. Polimerni matriks biofilma sastoji se od polimernih tvari (EPS - egzopolisaharida) zajedno s proteinima koji vežu ugljikohidrate (npr. fibrin) (Tielker i sur. 2005; Branda i sur. 2006; Diggle i sur. 2006) te izvanstanične DNA (eDNA) (Vestby i sur., 2020). Sve te spojeve sintetiziraju bakterije i ostale stanice uključene u matriks biofilma.

Unutar biofilma bakterije se prilagođavaju anoksiji okoliša i ograničenom izvoru hranjivih tvari, stvarajući izmijenjeni metabolizam, drugačiju gensku ekspresiju i proizvodnju proteina (Hall-Stoodley i Stoodley, 2009). Takav način prilagodbe čini bakterije otpornijima na vanjske čimbenike, pa tako i na antimikrobnu terapiju inaktivacijom mjesta djelovanja antibiotika i inhibicijom ulaska antibiotika u bakterijske stanice. Ukoliko dođe do nastanka biofilma tijekom infekcije, iako dolazi do aktivacije i urođenog i stečenog imunološkog odgovora, niti jedan od njih ne može adekvatno eliminirati nastali biofilm (Moser i sur., 2017), već se umjesto toga ubrzava kolateralno oštećenje i upala tkiva. Stvaranje biofilma je višestupanjski i složen proces koji uključuje prijelaz bakterija iz slobodno plivajućeg planktonskog oblika u sjedilački oblik koji stvara biofilm. Cijeli proces formiranja je pod utjecajem vanjskih uvjeta kao što su temperatura, pH, gravitacijske sile, priroda površina na kojima se nalaze, *quorum sensing*-a i drugih signalnih glasnika (Rather i sur. , 2021). Povijesno se pretpostavljalo da su infekcije rana uzrokovane planktonskim bakterijama. No danas znanstvenici sugeriraju da su kronične infekcije rana posljedica načina rasta bakterija u obliku biofilma (Costerton i sur., 1999; Parsek and Singh, 2003). Ovu hipotezu podržavaju nedavne studije koje su pokazale da su kronične infekcije rana zapravo infekcije biofilmom, a opažanja ukazuju na prisutnost biofilma i kod akutnih infekcija (Davis i sur., 2008; James i sur., 2008; Bjarnsholt, 2013).



## 1.4. Infekcije kože i mekog tkiva

Infekcije kože i mekog tkiva (SSTI – skin and soft tissue infections) predstavljaju mikrobnu invaziju (infekciju) kože i potkožnih mekih tkiva različitih uzročnika, ozbiljnosti i prezentacija. Prema radu Ray i sur. (2013), *S. aureus* predstavlja najčešće izoliranog patogena u kulturama SSTI infekcija u Sjedinjenim Američkim Državama. Od 2000. godine porast infekcija uzrokovanih bolnički stečenom MRSA-om povezan je s globalnim porastom incidencije SSTI-a uzrokovanih bakterijom *S. aureus* (Hersh i sur., 2008; Pallin i sur., 2008; Hindy i sur., 2022).

Lokalizirane kožne infekcije uzrokovane vrstom *S. aureus* mogu biti primarne ili sekundarne. Primarna ili "spontana" kožna infekcija je infekcija koja se javlja bez prethodno klinički vidljivih lezija ili je sekundarna na minimalnu kožnu leziju (Giudice, 2020). Ove infekcije uključuju impetigo, folikulitis, furunkule i primarne apscese. Sekundarne kožne infekcije nastaju kao posljedica već postojeće kožne lezije, uključujući impetiginizaciju, sekundarne apscese, limfangitis, celulitis i sekundarne infekcije rana.

### 1.4.1. Impetigo

Impetigo je infekcija epidermisa uzrokovana vrstama *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* ili njihovom kombinacijom. U sjevernim i razvijenim zemljama prevladavaju infekcije uzrokovane stafilokokom, koje čine 90% bakterijski uzrokovanog impetiga, dok je u zemljama u razvoju prijavljeno da prevladava *S. pyogenes* kao uzročnik. Impetigo uglavnom pogađa djecu i prevladava u siromašnim zajednicama. Izuzetno je zarazna bolest, s mogućnošću samoinokulacije i pojave malih obiteljskih ili zajedničkih epidemija (Pallin i sur., 2008; Ray, Suaya i Baxter, 2013; Salah i Faergemann, 2015).

Patofiziologija stafilokoknog impetiga povezana je s lokalnom proizvodnjom eksofolijativnih toksina - eksofolijantina A i B (Amagai i sur., 2002; Hanakawa i sur., 2002). Ciljni protein toksina eksofolijantina A i B je desmoglein 1, desmosomalni protein čija je uloga održavanje kohezije između keratinocita, a nalazi se uglavnom u površinskom sloju epidermisa. Glavna posljedica djelovanja toksina na desmoglein 1 je gubitak kohezije keratinocita i stvaranje kožnih mjehura na mjestu infekcije (Giudice, 2020). Liječenje se provodi topikalnom ili oralnom primjenom antibiotika. Prema Koningu i sur. (2012) liječenje topikalnim mupirocinom i topikalnom fusidinskom kiselinom jednako je učinkovito ili učinkovitije od oralnog liječenja, osim kod ekstenzivnog impetiga gdje istraživanja nedostaju.

### **1.4.2. Folikulitis**

Folikulitis predstavlja infekciju pilosebacealnog folikula dlake. Najčešće je uzrokovan bakterijskom infekcijom, no može biti uzrokovan i gljivičnim vrstama ili virusima. Bakterija *S. aureus* odgovorna je za većinu slučajeva bakterijskog folikulitisa (Winters i Mitchell, 2024). Razlikujemo površinski i dubinski oblik folikulitisa ovisno o manifestaciji infekcije: samo na folikul dlake ili i na dublje strukture u koži. Površinski folikulitis ograničen je na površinski dio pilosebacealnog folikula (folikularni ostij), gdje dolazi do infiltracije neutrofila. Klinički se manifestira kao pustula, centrirana oko dlake, uz prisutnost peri-folikularnog eritema (Giudice, 2020). Kod dubinskog oblika folikulitisa neutrofilni infiltriraju dublji dio folikula i okolni dermis što dovodi do pojave plakova i nodula koji su obično prekriveni pustulama osjetljivim na dodir, a karakterizirane su nastankom ožiljnog tkiva (Laureano i sur., 2014).

### **1.4.3. Furunkuli i karbunkuli**

Furunkul je duboki i nekrotizirajući oblik folikulitisa koji uključuje cijelu pilosebacealnu jedinicu folikula dlake. Pojavljuje se kao bolna upalna papula ili nodul, centrirana oko pustule na dijelu kože s dlakom. Unutar nekoliko dana sazrijevanja formira se gnoj povezan s nekrozom (Giudice, 2020). Furunkuli uzrokovani vrstom *S. aureus* povezani su s proizvodnjom Panton-Valentine leukocidinom (PVL), citotoksičnim čimbenikom virulencije, s pozitivnim stopama između 40 i 90 posto u određenim područjima (Yamasaki i sur., 2005; Masiuk i sur., 2010; Linz i sur., 2023). PVL dovodi do lokalnog uništenja leukocita i formiranja većih kožnih lezija, koje slabije reagiraju na liječenje i imaju tendenciju ponovne pojave.

Karbunkul predstavlja najozbiljniju kliničku varijantu upale folikula dlake, a nastaje spajanjem dvaju ili više furunkula ispod površine kože i dubljim prodiranjem u hipodermis. Karbunkul se u klasičnom smislu manifestira kao crveni, eritematozni, bolni čvor, s višestrukim apscesima ispunjenim gnojom (Linz i sur., 2023). Često pucaju zbog manjih trauma, trenja ili pritiska, što može rezultirati stvaranjem hematogenih krasta. Također mogu uzrokovati sistemske simptome, poput vrućice i groznice (Troxell i Hall, 2024).

#### **1.4.4. Celulitis**

Celulitis je kožna infekcija dermisa i potkožnog tkiva, koja obično nastaje ulaskom bakterija kroz narušenu kožnu barijeru. Vrsta *S. pyogenes* najčešći je uzročnik nepurulentnog celulitisa, koji se definira kao celulitis bez gnojnih pustula ili drenaže. Dok je *S. aureus* najčešći uzročnik purulentnog (gnojnog) celulitisa, ali također može uzrokovati i nepurulentni celulitis (Rrapi i sur., 2021). Celulitis se obično manifestira s loše ograničenim eritemom, edemom, osjetljivošću i toplinom zahvaćene kože. Erizipel se može smatrati vrstom celulitisa koji zahvaća površinski dermis i limfne čvorove, a manifestira se oštro ograničenim eritemom (Cranendonk i sur., 2017).

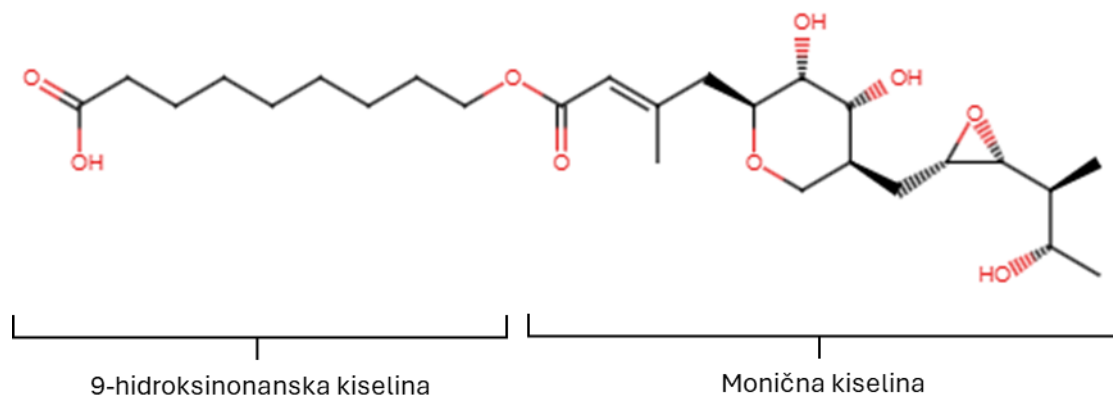
#### **1.4.5. Mastitis**

Mastitis predstavlja upalu tkiva dojke, koja je česta među dojiljama. Obično se manifestira lokaliziranom osjetljivošću, a može i sistemskom groznicom i malaksalošću. Mastitis se javlja kod približno 10 posto majki u Sjedinjenim Državama (Spencer, 2008), najčešće se događa u prvih 6 tjedana dojenja, no može se dogoditi u bilo kojem trenutku tijekom laktacije. Vrsta *S. aureus* je jedan od najčešćih uzročnika infekcija (Delgado i sur., 2011) i dominantan uzročnik akutnog mastitisa (Angelopoulou i sur., 2018). Prema studiji Rimoldi i sur. (2020), vrsta *S. aureus* izolirana je kod 50% pacijentica s mastitisom i 70% pacijentica s apscesom dojke. Također je dokazano da su infekcije pozitivne na PVL i MRSA sojeve imale više stope hospitalizacije.

## 1.5. Mupirocin

Mupirocin (MUP) je antibiotik iz skupine monokarboksilnih kiselina koji se koristi za liječenje topikalnih infekcija, često uzrokovanih MRSA sojevima *S. aureus*. Pripada grupi poliketidnih antibiotika nazvanih pseudomonične kiseline, koje nastaju kao skup sekundarnih metabolita bakterije *Pseudomonas fluorescens* (Tucaliuc i sur., 2019). Proizvodi se kao mješavina četiri pseudomonične kiseline (A, B, C i D), s osnovnom strukturom monične kiseline (heptaketid) koja sadrži piranski prsten vezan na 9-hidroksinonansku kiselinu (kratki lanac masne kiseline) putem esterske veze (Matthijs i sur., 2014; Khoshnood i sur., 2019). Pseudomonična kiselina A čini 90–95% smjese i glavni je sastojak mupirocina. Rezultat je esterifikacije između 17-C poliketida monične kiseline i 9-C masne kiseline 9-hidroksi-nonanske kiseline (Khoshnood i sur., 2019) (Slika 1.).

**Slika 1.** Strukturni prikaz pseudomonične kiseline A.



MUP inhibira sintezu proteina vezanjem na ciljni enzim, bakterijsku izoleucil-tRNA sintetazu, uzrokujući kompetitivnu inhibiciju enzima (Tucaliuc i sur., 2019). Bočni lanac epoksida mupirocina strukturno je sličan bočnom lancu izoleucina te se veže za vezno mjesto izoleucina na izoleucil-tRNA sintetazi koja katalizira adiciju izoleucina na odgovarajuću tRNA uz utrošak ATP-a (Hughes i Mellows, 1978). Budući da je formiranje izoleucil-tRNA sintetaze blokirano, stanične razine izoleucin-tRNA su iscrpljene, što dovodi do prekida sinteze proteina u bakteriji. Mupirocin ima široki spektar djelovanja na Gram-pozitivne i neke Gram-negativne bakterije, uz ograničenu sistemsku apsorpciju: poluzivot je 15 minuta, nakon čega se pretvara u moničnu kiselinu (neaktivni oblik) i izlučuje putem bubrega (Poovelikunnel i sur., 2015). Zbog vrlo niskog afiniteta MUP-a prema izoleucil-tRNA sintetazi sisavaca, nije povezan sa značajnom

toksičnošću, a zbog svog vrlo kratkog poluživota, siguran je za primjenu kod ljudi (Tucaliuc i sur., 2019). Nastanak rezistencije na MUP identificiran je gotovo odmah nakon njegovog uvođenja u kliničku praksu 1985. godine, s prvim prijavljenim rezistentnim slučajem 1987. godine (Hughes i sur., 2015). Unutar velikog 74-kb genskog klastera *Pseudomonas fluorescens*, koji sadrži nekoliko gena za sintezu poliketida, nalazi se gen osjetljiv na mupirocin: iLeRS1, kao i divergentni paralog mupirocin-otpornog IleRS-a (IleRS2). Budući da gen IleRS2 nema osjetljivost na MUP i pokazuje eukariotske značajke, smatra se kako ovaj gen štiti bakteriju od djelovanja mupirocina (Khoshnood i sur., 2019).

Za izolate *S. aureus* postoje tri skupine osjetljivosti na MUP. Kada je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC)  $\leq 4$   $\mu\text{g/mL}$  ti su izolati osjetljivi na MUP; pri MIC-u od 8 do 64  $\mu\text{g/mL}$ , izolati imaju nisku razinu rezistencije; dok MIC koji je  $\geq 512$   $\mu\text{g/mL}$  ukazuje na rezistenciju visoke razine (Khoshnood i sur., 2019). Visoka razina rezistencije uzrokovana je plazmidno kodiranom otpornošću na MUP, koja nastaje ubacivanjem gena ileS-2 (koji sadrži informacije za drugu izoleucil-tRNA sintetazu neosjetljivu na mupirocin) ili sintezom drugog paralognog gena: MupB (3102 bp). MupB dijeli čak 65% sličnosti sekvence s genom (MupA) za rezistenciju kod sojeva pseudomonasa (Tucaliuc i sur., 2019). Niska razina rezistencije nastaje točkastim mutacijama u genu IleS (još jednom genu za izoleucil-tRNA sintetazu), što dovodi do promjene aminokiseline valin (Val) u fenilalanin (Phe) na veznom mjestu za MUP (Khoshnood i sur., 2019). Izolati MRSA-e s niskom razinom rezistencije mogu steći visoku razinu rezistencije na MUP stjecanjem plazmida sličnog pSK41. Ovaj plazmid pripada obitelji stafilokoknih višestruko rezistentnih konjugativnih plazmida koji omogućavaju visoku razinu rezistencije na MUP (Zhu i sur., 2013).

MUP je danas jedan od najraširenije korištenih topikalnih antibiotika na svijetu za liječenje infekcija mekih tkiva i kože uzrokovanih MRSA-om, kao i za dekolonizaciju kliconoša *Staphylococcus* vrsta u pacijenata s visokim rizikom. Dekolonizacija smanjuje rizik od infekcije MRSA sojevima vrste *S. aureus* i smanjuje prijenos MRSA-e na druge pacijente (Gilpin i sur., 2010; Gurney i Thomas, 2011). Pri koncentracijama blizu minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za vrstu *S. aureus*, natrijeva sol MUP-a djeluje bakteriostatski. Međutim, antibiotik je baktericidan pri višim koncentracijama, uključujući one koje se nanose na kožu u 2% formulaciji, nakon jednog dana izlaganja (Khoshnood i sur., 2019). Stoga se MUP najčešće primjenjuje kao krema ili mast, obično u koncentracijama od 1% ili 2%.

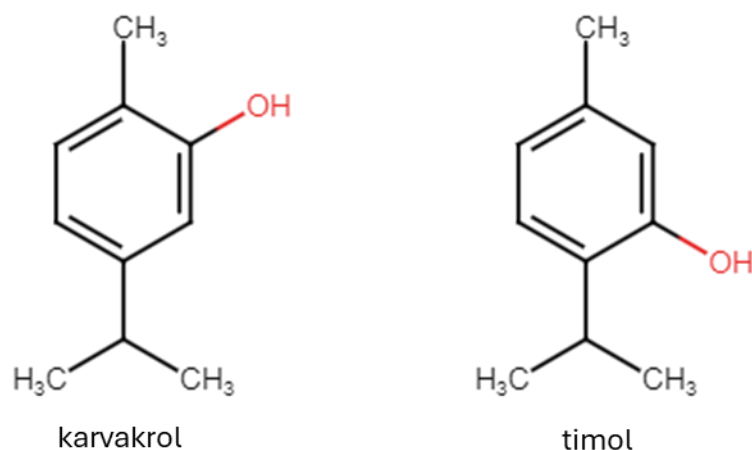
## 1.6. *Origanum compactum*

*Origanum compactum* Benth. je aromatična i ljekovita biljka iz porodice *Lamiaceae*, porijeklom iz Maroka, gdje je poznata pod narodnim imenima "Zaatar" i "Sahtar". Ova se vrsta već dugo koristi u marokanskoj farmakopeji zbog svojih brojnih ljekovitih svojstava. Nekoliko studija pokazalo je da su eterična ulja biljaka porodice *Origanum* bogata terpenskim spojevima fenolnih i aromatskih struktura, kao što su karvakrol, timol,  $\gamma$ -terpinen i p-cimen (Ouedrhiri i sur., 2016; Bouyahya i sur., 2019; Al-Mijalli i sur., 2022). Razni radovi ukazuju na potentna antimikrobna i antioksidativna svojstva biljke *O. compactum* (Ouedrhiri i sur., 2016; Bouyahya i sur., 2019; Al-Mijalli i sur., 2022; Chroho i sur., 2024), što može objasniti njegovu upotrebu u tradicionalnoj medicini. Antimikrobno djelovanje pripisuje se sastavu eteričnog ulja s visokim sadržajem hlapljivih terpenskih i polifenolnih komponenti, kao što su karvakrol i timol. Udio ovih i drugih sastojaka u eteričnom ulju origana unutar iste vrste određuje kemotip. Kemotip se obično naziva prema dominantnoj komponenti eteričnog ulja, poput karvakrola, timola, 1,8-cineola i sličnih spojeva.

### 1.6.1 Karvakrol i timol

Karvakrol (IUCAP: 2-metil-5-(propan-2-il)fenol ili 5-izopopil-2-metilfenol) je monoterpenški alkohol s fenolnom skupinom u svojoj strukturi, i glavni sastojak eteričnih ulja mnogih biljaka iz porodice *Lamiaceae* (Sharifi-Rad i sur., 2018; Kiliç i sur., 2022), a posebno roda *Origanum* (Zhang i sur., 2014). Kao što je gore navedeno, zbog sastava eteričnog ulja *O. compactum* i koncentracije pojedinih komponenti eteričnog ulja, jedan od kemotipova biljke je upravo onaj s visokim udjelom karvakrola. Karvakrol, kao komponenta eteričnog ulja u različitim biljkama, često dolazi u paru sa svojim izomerom timolom (Maćzka i sur., 2023). Karvakrol je strukturno okarakteriziran kao fenolni alkohol koji na 2. ugljikovom atomu ima vezanu metilnu skupinu, a na 5. ugljikovom atomu izopropilnu skupinu. S druge strane, njegov izomer timol sadrži na 2. ugljikovom atomu izopropilnu, a na 5. ugljikovom atomu metilnu skupinu. Zbog sličnosti u strukturama, njihova svojstva su također slična (Kachur i Suntres, 2020). Strukture karvakrola i timola prikazane su slikom (Slika 2).

**Slika 2.** Strukturni prikaz molekula karvakrola i timola.



U biljkama se karvakrol (kao i timol) biosintetizira ciklizacijom geranil-difosfata (mevalonatnim putem biosinteze monoterpena) do  $\gamma$ -terpinena, nakon čega slijedi niz oksidacija preko p-cimena (Krause i sur., 2021). Zbog istog puta biosinteze, ta su dva spoja uvijek prisutna u uljima koja sadrže karvakrol i timol. Nedavno su Krause i sur. (2021) predložili put biosinteze karvakrola u biljkama iz porodice *Lamiaceae*, pri kojem se  $\gamma$ -terpinen oksidira pomoću citokrom P450 (CYP) monooksigenaza iz podfamilije CYP71D, kako bi se proizveo nestabilni cikloheksadienolni intermedijer. Dobiveni se spoj potom dehidrogenira kratkolančanom dehidrogenazom/reduktazom (SDR – short-chain dehydrogenase/reductase) do odgovarajućeg ketona, koji se zatim pretvara u karvakrol. U odsutnosti kratkolančane dehidrogenaze/reduktaze (SDR) nije uočena formacija karvakrola, već se formirao samo p-cimen (Krause i sur., 2021). Organskom sintezom karvakrol se dobiva Friedel–Craftsovom alkilacijom o-krezola s propilenom ili izopropilnim alkoholom na čvrstim kiselim katalizatorima (npr. aluminiju ili željezovom (III) kloridu) (Yadav i Kamble, 2009; Vrbková i sur., 2021).

Metabolizam karvakrola odvija se dvama različitim metaboličkim putevima. Glavni metabolički put uključuje konjugaciju fenolne skupine s glukuronskom kiselinom ( $C_6H_{10}O_7$ ) i sulfatom ( $SO_4^{2-}$ ). Pri niskim razinama glukuronske kiseline i sulfata, metabolizam karvakrola uključuje oksidaciju terminalnih metilnih skupina do primarnih alkohola (Austgulen i sur., 1987). Dong i sur. (2012) istraživali su ulogu citokroma P450 u metabolizmu karvakrola i njegovog izomera timola, koristeći mikrosome ljudske jetre i utvrdili da je CYP2A6 glavni enzim za metabolizam oksidacije karvakrola i nastanak njegovih metabolita. Istraživanja na zečevima pokazuju da se karvakrol sporo apsorbira u crijevima nakon oralno primijenjene doze

od 1,5 g, pri čemu više od 30% ostaje u gastrointestinalnom traktu, a otprilike 25% ukupne doze se izlučuje urinom 22 sata kasnije (Suntres i sur., 2015). U starijoj studiji koja je obuhvatila oralnu primjenu različitih doza karvakrola, dobivenog iz ulja sezama, na štakorima (500 mg) i zečevima (1.500 i 5.000 mg), pokazano je da se karvakrol uglavnom distribuira u želucu, crijevima i urinu, dok se manje količine nalaze u plućima, jetri i mišićnim tkivima (Schroder i Vollmer, 1932.). Zbog svoje monoterpenske strukture i lipofilnosti, karvakrol, kao i drugi monoterpeni, pokazuje dobru transdermalnu penetraciju koja se može dodatno povećati korištenjem novijih formulacija, poput mikro i nanoemulzija ili fitosoma (Taleb i sur., 2018; Laothaweerungsawat i sur., 2020; Tafish i sur., 2023).

Karvakrol pokazuje izvrsnu antimikrobnu aktivnost i svojstvo inhibicije nastanka biofilma bakterija (Ben Arfa i sur., 2006; Kachur and Suntres, 2020; Soltani i sur., 2021; Mączka i sur., 2023). Kao potentna bioaktivna molekula, karvakrol pokazuje djelovanje na široki spektar Gram-pozitivnih i nekih Gram-negativnih bakterija, djelujući protiv planktonskih i sesilnih humanih patogena (Marchese i sur., 2018; Lombrea i sur., 2020; Soltani i sur., 2021; Mączka i sur., 2023). Osim djelovanja na bakterije, karvakrol pokazuje i antifungalno djelovanje na gljivice *Candida* spp. (Niu i sur., 2020; Miranda-Cadena i sur., 2021). Predloženi mehanizam antimikrobne aktivnosti karvakrola uključuje djelovanje na biološke membrane bakterija (Baser, 2008). Djeluje tako što brzo iscrpljuje unutarstanični ATP na dva načina: smanjujući sintezu ATP-a i povećavajući njegovu hidrolizu (Baser, 2008). Smanjenje zaliha ATP-a dovodi do smanjenja transmembranskog električnog potencijala i povećane protonске propusnosti membrane, što rezultira istjecanjem kalija iz stanica bakterija. Kalij ima ključnu ulogu u aktivaciji citoplazmatskih enzima, održavanju osmotskog tlaka i regulaciji citoplazmatskog pH stanice (Ultee i sur., 1999). Osim što interferira s membranom stanica, drugi značajni mehanizam djelovanja karvakrola je inhibicija nastanka bakterijskog biofilma. U nekoliko studija dokazano je da primjenom subinhibitornih koncentracija (sub-MICa) karvakrola dolazi do smanjenja nastanka biofilma kod vrsta *S. aureus*, *S. typhimurium* i *S. epidermidis* (Nostro i sur., 2012; Espina i sur., 2015; Marchese i sur., 2018, 2018; Akbar i sur., 2023; Peng i sur., 2023). Poznato je da je formiranje biofilma regulirano *quorum sensing*-om, komunikacijskim sustavom koji bakterije koriste za kontrolu grupnog ponašanja u odgovoru na gustoću populacije. Burt i sur. (2014) prvi su pokazali da karvakrol može inhibirati proizvodnju N-acil-L-homoserin laktone (N-AHL) na razini ekspresije gena za N-AHL-sintetazu.



Karvakrol pokazuje širok spektar drugih bioloških aktivnosti, uključujući kardioprotektivna i neuroprotektivna svojstva (Azizi i sur., 2022); modulaciju imunološkog odgovora (Pelvan i sur., 2022); antioksidativna i protuupalna svojstva (Moghrovyan i sur., 2019; Somensi i sur., 2019); analgetska svojstva (Guimarães i sur., 2012); hepato i renoprotektivna (Anaeigoudari, 2022).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Antimikrobna rezistencija (AMR) predstavlja rastuću globalno zdravstvenu prijetnju, koja je u velikoj mjeri uzrokovana prekomjernom upotrebom i pogrešnom upotrebom antibiotika. Kako bakterije evoluiraju i postaju otporne na uobičajene antibiotike, infekcije postaju teže za liječenje, što dovodi do dužih bolesti, povećanih troškova zdravstvene zaštite i viših stopa smrtnosti. Jedan od pristupa za borbu protiv ovog problema uključuje smanjenje upotrebe antibiotika kombiniranjem s prirodnim alternativama, poput eteričnih ulja. Konkretno, eterično ulje origana pokazalo je potencijal u poboljšanju učinkovitosti antibiotika, posebno u topikalnoj primjeni.

Ulje origana sadrži aktivne komponente poput karvakrola i timola, koje posjeduju snažna antimikrobna svojstva. Istraživanja sugeriraju da kombiniranje eteričnog ulja origana s antibioticima može poboljšati učinkovitost liječenja djelujući na stanične membrane bakterija i slabeći njihove obrambene mehanizme. Kombinacija eteričnih ulja i antibiotika omogućuje korištenje manjih doza antibiotika, čime se smanjuje rizik od razvoja AMR-a. Za topikalnu primjenu, poput infekcija kože, sinergija između antibiotika i eteričnog ulja origana može biti posebno korisna jer pruža dvostruko djelovanje: antibiotici ciljaju specifične bakterijske procese, dok ulje origana narušava integritet bakterijskih stanica, pojačavajući ukupni antimikrobni učinak.

Obzirom na nastanak sve veće rezistencije sojeva *S. aureus* na MUP, intenzivno se istražuju alternativne opcije u formulacijama kako bi se povećala učinkovitost antibiotika i smanjio nastanak rezistencije na MUP. Jedna od takvih formulacija uključuje razvoj polimernih nano-kapsula s MUP koristeći različita ulja, poput ulja ružmarina i kaprilnih/kapričnih triglicerida, u nastojanju da se poveća aktivnost MUP protiv sojeva MRSA, ili formulacije u obliku nanoemulzija eteričnim uljem eukaliptusa (Rubenick i sur., 2017; Alhasso, Ghori and Conway, 2023; Zubairi, Abd and Al-lami, 2023).

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati i dokazati postojanje sinergizma ili antagonizma u interakciji između antibiotika mupirocina i eteričnog ulja origana, kao i njegove glavne komponente karvakrola, na planktonske stanice i čimbenike tvorbe biofilma bakterije *S. aureus* koristeći *in vitro* metode.

Specifični ciljevi rada su:

- 1) GCMS analizom utvrditi točan sastav eteričnog ulja origana i udio pojedinih aktivnih komponenti eteričnog ulja.
- 2) Odrediti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) MUP-a, karvakrola i eteričnog ulja origana primijenjenih pojedinačno i u kombinaciji na *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Staphylococcus aureus* NCTC 12493 (MRSA) primjenom CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) protokola.
- 3) Ispitati antimikrobno djelovanje MUP-a, karvakrola i eteričnog ulja origana apliciranih pojedinačno i u kombinacijama na čimbenike tvorbe biofilma spomenutih sojeva bakterije *S. aureus* primjenom Congo Red Agar in vitro testa.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

U ovom ispitivanju kao ljekovita supstancija korišten je komercijalno dostupan mupirocin (Sigma-Aldrich, Njemačka), antibiotik za lokalnu primjenu, prirodna supstanca karvakrol (Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zavod za farmakognoziju) i komercijalno dostupno eterično ulje origana (*O. compactum*) (Pranarom, Francuska). Neposredno prije ispitivanja, antibiotik i prirodne supstance otapane su u DMSO otapalu. Sav mikrobiološki materijal bio je steriliziran autoklaviranjem na 121°C/1 atmosfera tijekom 15 minuta ili upotrebom ultraljubičastog zračenja UV-C (180–280 nm) u trajanju od 15 minuta UV lampom.

Ispitivane bakterijske vrste uzete su iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Korišteni su sojevi *S. aureus* ATCC 25923, i *S. aureus* NCTC 12493 (MRSA).

Sve metode provedene su u kontroliranim uvjetima, uključujući pozitivnu i negativnu kontrolu. Također, provedena je kontrola MIC vrijednosti otapala (DMSO) prije svih mjerenja kako bi se isključio utjecaj otapala na MIC vrijednosti ispitivanih aktivnih tvari.

## **3.2. Priprema radnih otopina i reagensa**

### **3.2.1. Mupirocin**

Mupirocin u obliku praha (Sigma-Aldrich, Njemačka) korišten je za pripremu radne otopine u konačnoj koncentraciji od 2 mg/mL. Kao otapalo korišten je dimetil-sulfoksid (DMSO, Merck, Njemačka) koji omogućava potpuno otapanje mupirocina. Za pripremu radne otopine, izmjerena je odgovarajuća količina mupirocina u prahu koristeći preciznu analitičku vagu ( $\pm 0.0001$  g). Kako bi se postigla koncentracija od 2 mg/mL, 10 mg mupirocina otopljeno je u 5 mL DMSO-a. Prah mupirocina pažljivo je prenesen u sterilnu epruvetu, a zatim je dodano otapalo DMSO do volumena od 5 mL. Otopina je vorteksirana 1 minutu kako bi se osiguralo potpuno otapanje antibiotika. Pripremljena je otopina potom pohranjena na 4 °C do daljnje upotrebe. S obzirom na poznatu osjetljivost mupirocina na svjetlost, epruveta s otopinom je bila zaštićena od direktne izloženosti svjetlosti aluminijskom folijom tijekom skladištenja.

### **3.2.2. Karvakrol i eterično ulje origana**

Karvakrol (Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb) i eterično ulje origana (Pranarom, Francuska) korišteni su u tekućem obliku za pripremu radnih otopina koncentracija od 200 mg/mL. Kao otapalo korišten je dimetil-sulfoksid (DMSO, Merck, Njemačka). Za pripremu otopine, pipetom je preneseno približno 1 mL supstance u tariranu epruvetu. Zatim je odvagana količina (oko 1000 mg) na preciznoj analitičkoj vagi razrijeđena potrebnom količinom DMSO-a (približno 4 mL), ovisno o točno uzetom volumenu supstancije, do ukupnog volumena od oko 5 mL za dobivanje koncentracije od 200 mg/mL. Isti je postupak ponovljen i za eterično ulje origana. Otopine su potom vorteksirane 1 minutu kako bi se osiguralo homogeno miješanje i disperzija supstanci u otapalu. Pripremljene radne otopine su pohranjene na 4 °C i zaštićene od svjetlosti aluminijskom folijom kako bi se izbjegla oksidacija i degradacija spojeva uslijed izlaganja svjetlosti.

### **3.2.3. Reagens 2,3,5-trifeniltetrazolin klorid (TTC)**

Reagens 2,3,5-trifeniltetrazolin klorid (TTC; Sigma-Aldrich, Njemačka) korišten je za vizualizaciju bakterijskog rasta. Kako bi se osigurala svježina i reaktivnost otopine, otopina je pripravljena svakodnevno, neposredno prije eksperimentalnih postupaka.

Za pripremu otopine, izmjereno je 20 mg krutine TTC-a pomoću analitičke vage ( $\pm 0.0001$  g). TTC u prahu prenesen je u sterilnu plastičnu falkonicu volumena 50 mL, nakon čega je dodano 20 mL sterilizirane deionizirane vode. Smjesa je lagano miješana do potpunog otapanja TTC-a. Kako bi se osigurala sterilnost otopine i spriječila mikrobiološka kontaminacija, otopina je prije upotrebe profiltrirana kroz sterilni mikrobiološki filter veličine pora  $0,2 \mu\text{m}$  u aseptičkim uvjetima. Tako pripremljena otopina TTC-a korištena je unutar istog dana za eksperimentalne postupke kako bi se izbjeglo smanjenje aktivnosti reagensa.

### **3.3. GCMS analiza eteričnog ulja origana**

Kvalitativna i kvantitativna analiza eteričnog ulja provedena je pomoću veznog sustava plinskog kromatografa (Agilent 7890B, SAD) i masenog spektrometra (Agilent 5977A, SAD). Uzorci za analizu priređeni su otapanjem u heksanu u omjeru 1:100, nakon čega je pri temperaturi od  $240 \text{ }^\circ\text{C}$  u sustav injektirano  $1 \mu\text{L}$  uzorka. Helij s brzinom protoka  $1,2 \text{ mL/min}$  korišten je kao plin nositelj. Sastavnice ispitivanih eteričnih ulja odijeljene su u koloni HP-5ms duljine 30 m, unutarnjeg promjera  $0,25 \text{ mm}$  i debljine filma  $0,25 \mu\text{m}$ . Temperatura pećnice tijekom prve 2 minute prema zadanom programu iznosila je  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , nakon čega je uslijedilo zagrijavanje od  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  u minuti sve do postizanja konačne temperature od  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  na kojoj je kolona održavana sljedeće 2 minute. Odijeljene sastavnice analizirane su na masenom spektrometru uz EI  $70\text{eV}$ ,  $m/z$  40–400. Sastavnice eteričnih ulja identificirane su usporedbom njihovih masenih spektara s onima dostupnim u NIST bazi.

### **3.4. Antimikrobno djelovanje mupirocina, karvakrola i eteričnog ulja origana na planktonske bakterije**

#### **3.4.1. Priprema inokuluma**

Inokulum bakterija pripremljen je iz 24-satne kulture bakterija, uzgojene na hranjivoj podlozi Müller-Hinton agar (MHA; Merck, Njemačka) pri temperaturi aerobne inkubacije 37°C. Kolonije bakterija zahvaćene su sterilnom mikrobiološkom ezom i suspendirane u fiziološkoj otopini (0,9% NaCl) do koncentracije od 0,5 McFarlanda, što odgovara  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL, koristeći nefelometar (bioMerieux, Francuska).

#### **3.4.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)**

Minimalna inhibitorna koncentracija mupirocina, karvakrola i eteričnog ulja origana određena je metodom dvostruke mikrodilucije, u skladu s CLSI smjernicama (CLSI, 2007), u Müller-Hinton bujonu (MH bujon; Merck, Njemačka). Vizualizacija je provedena modificiranom CLSI metodom mikrodilucije koja koristi 2,3,5-trifeniltetrazolin klorid (TTC; Sigma-Aldrich, Njemačka) kao reagens. Kolorimetrijska metoda koja koristi TTC reagens identična je metodi mikrodilucije u bujonu opisanoj u CLSI smjernicama u pogledu reagensa, pripreme medija, inokuluma, koncentracije supstancije i vremena inkubacije. Jedina je razlika u tome što je TTC reagens dodan u jažice na kraju inkubacije, i to tako da mu konačna koncentracija u svakoj jažici bude 50 µg/mL (Lee i sur., 2007).

Korištene su mikrotitarske pločice s 96 jažica zaobljenog dna. U svaku jažicu dodano je 100 µL MH bujona. Metodom dvostruke mikrodilucije dodane su antimikrobne tvari (aktivne tvari) u različitom rasponu koncentracija za određivanje pojedinačnih MIC vrijednosti. Za određivanje MIC vrijednosti, mupirocin je dodan u rasponu koncentracija od 0,015625 µg/mL do 32 µg/mL, dok su karvakrol i eterično ulje origana dodani u rasponu od 0,97656 µg/mL do 2000 µg/mL. Rasponi koncentracija prikazani su u tablici (Tablica 1).

Iz prethodno pripremljenih inokuluma u fiziološkoj otopini, čija koncentracija bakterijskih stanica odgovara  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL, pripremljene su radne otopine tako da je 200 µL inokuluma razrijeđeno u 19,8 mL MH bujona, kako bi se postiglo razrjeđenje od  $1,5 \times 10^6$

CFU/mL. Iz tako pripremljenog inokuluma u svaku je jažicu dodano 100  $\mu$ L suspenzije bakterije *S. aureus*, čime se postigla konačna koncentracija bakterijskih stanica od približno  $5 \times 10^5$  CFU/mL. Pločice s uzorcima su inkubirane 24 sata na  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Zadnje dvije jažice u zadnjem redu su korištene kao kontrole: pozitivna (kontrola rasta) i negativna (kontrola sterilnosti). Pozitivna kontrola sadržavala je pripremljeni inokulum bakterijskih stanica bez ispitivanih supstanci, dok je negativna kontrola sadržavala čisti bujon. Nakon završene inkubacije u svaku je jažicu dodano 10  $\mu$ L iz prethodno svježe pripremljene radne otopine TTC-a, da konačna koncentracija u svakoj jažici bude 50  $\mu\text{g/mL}$ . Pločice su vraćene u inkubator na 15ak minuta do pojave crvenog obojenja.

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je najmanja koncentracija aktivne tvari (mupirocina, karvakrola ili eteričnog ulja origana) koja je inhibirala vidljivi bakterijski rast nakon 24-satne inkubacije. Žive bakterijske stanice metaboliziraju TTC reagens do crvenog produkta formazana, pa se crvena boja uočava u jažicama s bakterijskim rastom. U jažicama bez bakterijskog rasta, crvena boja izostaje.

### **3.4.3. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) kombinacijom aktivnih tvari – metoda „šahovske ploče“ (checkerboard assay)**

Za evaluaciju učinka kombinacije dviju aktivnih tvari, korištena je metoda tzv. „šahovske ploče“ (checkerboard assay) u mikrotitarskoj pločici od 96 jažica, koja pruža dobru in vivo procjenu učinka kombinacije aktivnih tvari te značajno smanjuje potrošnju reagensa i biološkog materijala. Test je proveden prema postupku opisanom u radu Bellio i sur. (2021), koji je u potpunosti usklađen s CLSI i EUCAST smjernicama te protokolima za određivanje MIC-a metodom mikrodilucije. Dvije aktivne tvari (antibiotik mupirocin i karvakrol/et. ulje origana) testirane su metodom dvostrukog serijskog razrjeđenja, pri čemu se koncentracija svake aktivne tvari ispituje pojedinačno i u kombinaciji. Na taj način moguće je odrediti učinak svake pojedinačne aktivne tvari, kao i učinak koji proizlazi iz njihove kombinacije.

Postupak je proveden uz manje modifikacije u završnom koraku određivanja bakterijskog rasta, gdje se umjesto turbidimetrijskog mikrotitarskog mjerača za određivanje rasta bakterija koristila gore prethodno opisana metoda s TTC-om. Raspon koncentracija ispitivanih tvari iznosio je: mupirocin od 0,00390625  $\mu\text{g/mL}$  do 4  $\mu\text{g/mL}$ , dok su rasponi za karvakrol i eterično



ulje origana bili od 15,625 µg/mL do 1000 µg/mL (Tablica 1). Postupak pripreme inokuluma identičan je gore opisanom postupku određivanja MIC-a pojedinačnih komponenti, tako da konačna koncentracija bakterijskih stanica u mikrotitarskoj pločici iznosi  $5 \times 10^5$  CFU/mL. Koristeći postupak prema Bellio i sur. (2021.) omogućeno je, kako istodobno određivanje MIC-a pojedinačnih komponenta kao dupla provjera, tako i 77 kombinacija različitih koncentracija dviju aktivnih tvari.

**Tablica 1.** Prikaz raspona korištenih koncentracija u određivanju MIC-ova

	<b>Aktivna tvar</b>	<b>Najveća koncentracija</b>	<b>Najmanja koncentracija</b>
<b>Pojedinačna ispitivanja</b>	Mupirocin	32 µg/mL	0,0156250 µg/mL
	Karvakrol	2000 µg/mL	0,9765625 µg/mL
	Eterično ulje origana	2000 µg/mL	0,9765625 µg/mL
<b>Ispitivanja u kombinaciji</b>	Mupirocin	4 µg/mL	0,00390625 µg/mL
	Karvakrol	1000 µg/mL	15.625 µg/mL
	Eterično ulje origana	1000 µg/mL	15.625 µg/mL

### 3.5. Antimikrobno djelovanje mupirocina, kavakrola i eteričnog ulja origana i njihovih kombinacija na biofilm bakterija

#### 3.5.1. Detekcija proizvodnje biofilma metodom Congo Red Agar (CRA)

Sposobnost proizvodnje biofilma ispitivana je kultivacijom sojeva *S. aureus* na pločama s Congo Red agarom (CRA), prema modificiranom postupku Freeman i sur. (1989), kako je opisano u radu Darwish i sur. (2013). Ukratko, CRA ploče pripremljene su korištenjem Triptik soja agara (TSA) (Biolife, Italija) uz dodatak 0,08% Congo Red (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 3,6% saharoze. Congo Red boja pripremljena je kao koncentrirana vodena otopina i autoklavirana na 121°C tijekom 15 minuta, odvojeno od ostalih sastojaka podloge. Zatim je dodana u TSA pri ohlađenoj temperaturi od približno 50°C.

Za određivanje utjecaja aktivnih tvari na smanjenje nastanka biofilma, u tekući agar za pripremu CRA ploča dodane su aktivne tvari u različitim koncentracijama. Postupak je proveden tako da se ohlađeni, ali još uvijek tekući agar (približno 50 °C) prelije u manje falkonice. U te falkonice pojedinačno su dodani mupirocin, karvakrol i eterično ulje origana, tako da u 20 mL agara koncentracije aktivnih tvari iznose: MUP od 0,015625 µg/mL do 0,25 µg/mL, karvakrol od 50 µg/mL do 200 µg/mL, te eterično ulje origana od 50 µg/mL do 200 µg/mL. Osim pojedinačnih koncentracija, pripremljene su i kombinacije antibiotika MUP i karvakrola/eteričnog ulja origana u rasponima prikazanim u tablici (Tablica 2).

**Tablica 2.** Prikaz raspona korištenih koncentracija prilikom kombinacije aktivnih tvari na inhibiciju nastanka biofilma CRA metodom

Aktivna tvar	Koncentracije A	Koncentracije B
Mupirocin	0,0625 µg/mL	0,0625 µg/mL
Karvakrol/et. ulje origana	150 µg/mL	100 µg/mL
Mupirocin	0,03125 µg/mL	0,03125 µg/mL
Karvakrol/et. ulje origana	150 µg/mL	100 µg/mL

Tako pripremljeni agari razliveni su u petrijeve zdjelice, pri čemu je u svaku dodano približno 10 mL agara, čime su predstavljene gotove CRA ploče. CRA ploče inokulirane su sojevima *S. aureus* uz pomoć sterilne eze i inkubirane na  $35 \pm 2$  °C u aerobnim uvjetima tijekom 24 sata, nakon čega su očitani rezultati. U ispitivanju su korištene pozitivna kontrola (inokulirana CRA ploča bez prisustva aktivnih tvari) i negativna kontrola (CRA ploča bez aktivnih tvari i inokulirane bakterije).

Tamno crvene do crne kolonije sa suhom konzistencijom, hrapavom površinom i rubovima smatrane su pozitivnim pokazateljem proizvodnje biofilma.

### **3.6. Obrada podataka**

Dobiveni podaci prikazani su u tabličnom formatu i statistički obrađeni koristeći Microsoft® Excel® 365 (v. 16.0.17928.20114, Richmond, Virginia, SAD). Obrada slika izvršena je pomoću Microsoft® PowerPoint® 365 (v. 16.0.17928.20114, Richmond, Virginia, SAD) i Mylio Photos® (v. 24.2, Washington, SAD). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (S.D.). Statistička obrada zajedno s vizualnom obradom grafova je napravljena uz pomoć programa GraphPad Prism v. 10.4.0 (621) (GraphPad Software, Boston, SAD).

## 4. REZULTATI

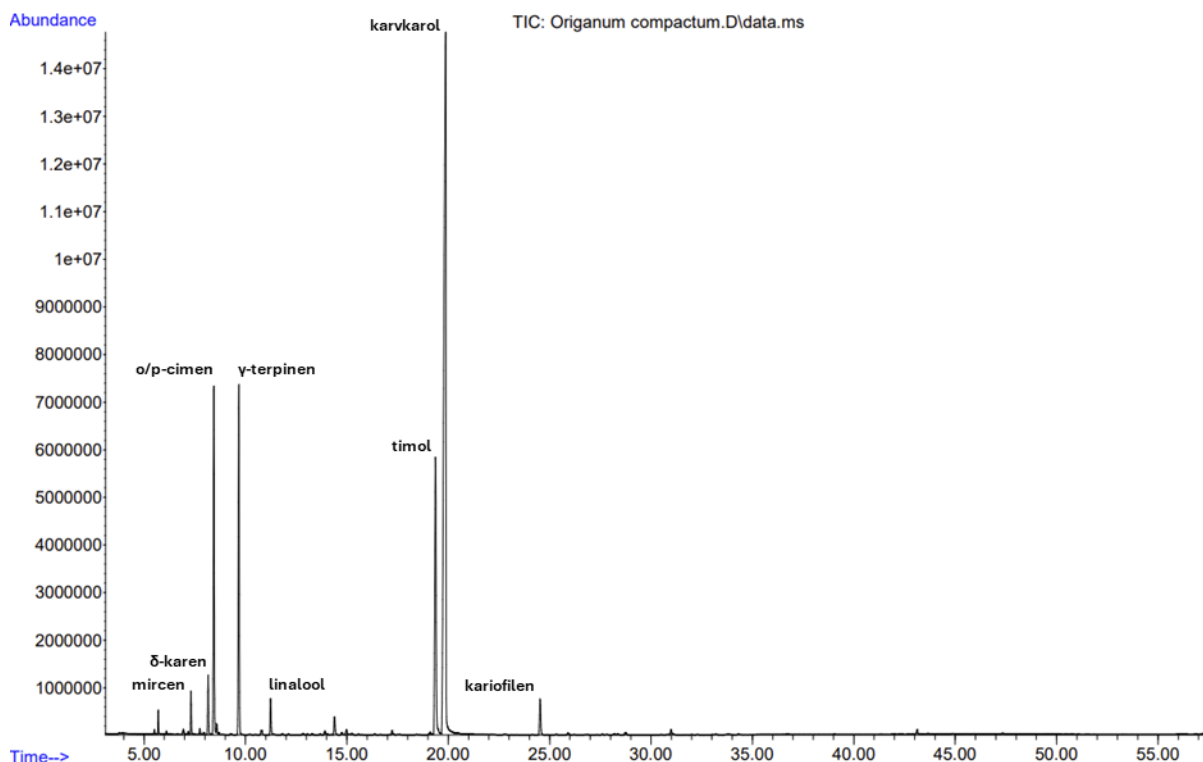
### 4.1. GCMS analiza eteričnog ulja origana (*Origanum compactum*)

Kako bi se odredio točan sastav pojedinih komponenti ispitivanog eteričnog ulja provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza eteričnog ulja origana (Pranarom, Francuska) metodom plinske kromatografije spregnute s spektrometrijom masa (GC-MS). Hlapljive sastavnice eteričnog ulja identificirane su usporedbom spektara masa s retencijskim indeksom iz NIST baze podataka. Ukupno je identificirano 23 hlapljiva spoja u različitim postocima koji su prikazani u tablici (Tablica 3.). Izdvojeno je 8 najzastupljenijih spojeva čiji udio prelazi 1% ukupnog udjela svih sastavnica ispitivanog eteričnog ulja. Osim tabličnog prikaza, udio pojedinih komponenti prikazan je i na dobivenom kromatogramu (Slika 3.).

**Tablica 3.** Prikaz rezultata GC-MS analize eteričnog ulja origana. (n.i. – nije identificirano)

Broj pika	Retencijsko vrijeme (min)	Udio (%)	Spoj
1	5,513	0,110	n.i.
2	5,699	0,615	n.i.
3	6,102	0,084	n.i.
4	6,944	0,225	n.i.
5	7,182	0,081	n.i.
<b>6</b>	<b>7,311</b>	<b>1,223</b>	<b>mircen</b>
7	7,753	0,190	n.i.
<b>8</b>	<b>8,162</b>	<b>1,827</b>	<b>δ-karen</b>
<b>9</b>	<b>8,441</b>	<b>11,155</b>	<b>p/o-cimen</b>
10	8,580	0,360	n.i.
<b>11</b>	<b>9,673</b>	<b>12,197</b>	<b>γ-terpinen</b>
12	10,787	0,246	n.i.
<b>13</b>	<b>11,241</b>	<b>1,280</b>	<b>linalool</b>
14	13,905	0,206	n.i.
15	14,391	0,751	n.i.
16	14,974	0,239	n.i.
17	17,228	0,180	n.i.
18	19,102	0,199	n.i.
<b>19</b>	<b>19,374</b>	<b>13,785</b>	<b>timol</b>
<b>20</b>	<b>19,871</b>	<b>53,082</b>	<b>karvakrol</b>
<b>21</b>	<b>24,529</b>	<b>1,554</b>	<b>kariofilen</b>
22	30,985	0,268	n.i.
23	43,121	0,223	n.i.

**Slika 3.** Kromatogram eteričnog ulja origana s naznačenim najzastupljenijim komponentama.



Iz dobivenih rezultata GC-MS analize jasno se vidi kako su najzastupljenije komponente eteričnog ulja upravo karvakrol s udjelom od 53,082% i timol s udjelom od 13,785%. Osim karvakrola i timolola, značajniji je udio i  $\gamma$ -terpinena (12,197 %) i p/o-cimena (11,155%) što je logično zbog biosintetskog puta karvakrola i timola. Obzirom da su karvakrol i timolol komponente u najvećem udjelu i strukturno sadrže reaktivnu -OH skupinu možemo pretpostaviti kako su upravo one odgovorne za antimikrobno djelovanje eteričnog ulja origana.

## 4.2. Antimikrobno djelovanje mupirocina, karvakrola, eteričnog ulja origana na planktonske stanice sojeva bakterije *S. aureus*: određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) se određuje iz mikrotitarskih pločica i predstavlja najmanju koncentraciju u kojoj je inhibiran rast bakterijskih stanica. To se uočava kao odsustvo crvene boje u jažici nakon primjene TTC reagensa tokom 15 minutne inkubacije na 37°C. Dakle najmanja koncentracija u jažici u kojoj nema crvenog obojenja je jednaka MIC. Rasponi koncentracija koji su obuhvaćeni na mikrotitarskim pločicama u metodi dvostrukog razrjeđenja za pojedine antimikrobne tvari su prikazane u Tablici 1. Dobiveni rezultati mjerenja pojedinačnih MIC-ova aktivnih tvari prikazani su u tablici (Tablica 4.).

**Tablica 4.** Prikaz dobivenih MIC vrijednosti mupirocina (mup), karvakrola (kar) i eteričnog ulja origana (et.u.) za bakterijske sojeve *S. aureus*.

Bakterijski soj	MIC <sub>mup</sub> (µg/mL)	MIC <sub>kar</sub> (µg/mL)	MIC <sub>et.u.</sub> (µg/mL)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,141 ± 0,016	525 ± 56	750 ± 217
<i>S. aureus</i> NCTC 12493 (MRSA)	0,076 ± 0,012	700 ± 274	625 ± 125

Za jednostavniju interpretaciju MIC-ova dobivenih djelovanjem MUP-a u kombinaciji s karvakrolom i eteričnim ulje origana korišten je FIC indeks (Fractional Inhibitory Concentration Index). FIC indeks govori o djelovanju antimikrobnih tvari u kombinaciji. Ukoliko je FIC indeks  $\leq 0,5$ , djelovanje je sinergističko, vrijednosti 0,5 – 1.0 interpretiramo kao aditivno djelovanje, nadalje za kombinacije koje daju vrijednosti u rasponu 1.0 – 4.0 kažemo da djeluju neovisno jedna o drugoj (indiferentno), dok kombinacije koje daju FIC indeks vrijednosti  $> 4$  djeluju antagonistički (Wormser i Tang, 2005). FIC indeks je zbroj svih frakcijskih inhibitornih koncentracija (FIC) za pojedine antimikrobne tvari koje se testiraju u kombinaciji. Frakcijska inhibitorna koncentracija za neku antimikrobnu tvar je omjer MIC-a korištenog u kombinaciji i MIC-a dobivenog kada ta antimikrobna tvar djeluje sama. Matematički izraženo FIC indeks se dobiva pomoću navedenog izraza u kojem  $n$  broj tvari u kombinaciji:

$$FIC\ index = \sum_{i=1}^n FIC_i = \sum_{i=1}^n \frac{MIC\ (antimikrobna\ tvar\ i\ u\ kombinaciji)}{MIC\ (antimikrobna\ tvar\ i\ kada\ djeluje\ sama)}$$

Dobiveni rezultati mjerenja MIC-ova u kombinaciji aktivnih tvari prikazani su u tablici (Tablica 5.).

**Tablica 5.** Prikaz dobivenih MIC vrijednosti mupirocina (mup), karvakrola i eteričnog ulja origana (kar/et.o.) pojedinačno i u kombinaciji (mup K, kar/et.o K) metodom „šahovske ploče“ na sojeve baktreije *S. aureus*.

	<b>Bakterijski soj</b>	<b>MIC<sub>mup</sub></b> (µg/mL)	<b>MIC<sub>kar/et.</sub></b> (µg/mL)	<b>MIC<sub>mup K</sub></b> (µg/mL)	<b>MIC<sub>kar/et.o. K</sub></b> (µg/mL)	<b>FIC indeks</b>	<b>Djelovanje</b>
<b>Karvakrol</b>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,188 ± 0,072	875 ± 250	0,125 ± 0,0	500 ± 0,0	1,24	Indiferentno
	<i>S. aureus</i> NCTC 12493 (MRSA)	0,125 ± 0,0	625 ± 250	0,094 ± 0,036	375 ± 144	0,75	Aditivno
<b>Eterično ulje origana</b>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,188 ± 0,072	750 ± 289	0,094 ± 0,036	438 ± 125	1,08	Indiferentno
	<i>S. aureus</i> NCTC 12493 (MRSA)	0,188 ± 0,072	875 ± 250	0,078125 ± 0,031	500 ± 0,0	0,99	Aditivno

Iz dobivenih rezultata možemo vidjeti da su ispitivani bakterijski sojevi znatno osjetljiviji na MUP (Tablica 4.), odnosno da je MIC antibiotika puno manji od karvakrola i eteričnog ulja origana. S druge strane, karvakrol i eterično ulje origana pokazuju slične vrijednosti MIC-ova, što je u skladu sa sastavom eteričnog ulja origana, čija je najzastupljenija komponenta upravo karvakrol i njegov izomer timol (Tablica 3.).

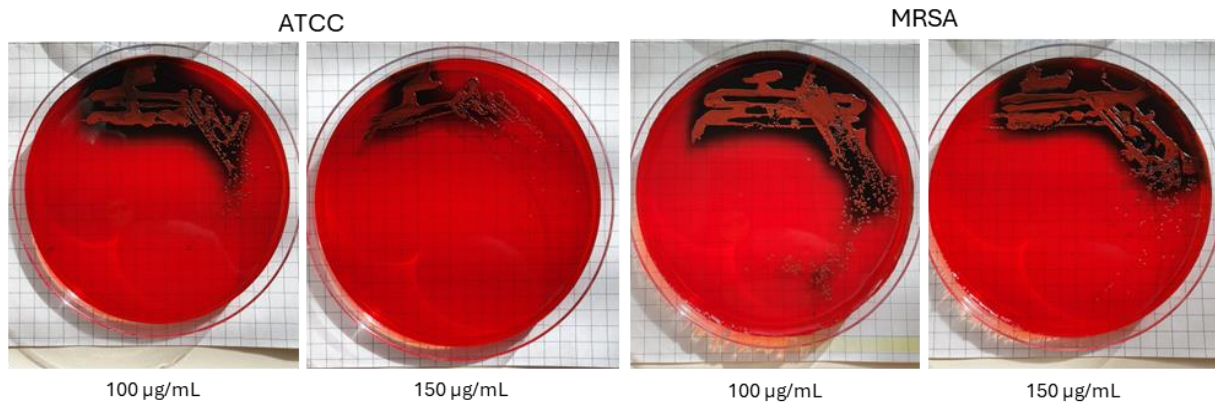
Prilikom ispitivanja kombinacije antibiotika i karvakrola/eteričnog ulja origana metodom šahovske ploče, nije primijećeno značajno smanjenje MIC-a niti za antibiotik niti za karvakrol/eterično ulje origana. Upotrebom FIC indeksa kombinacija MUP-a i aktivnih tvari se može okarakterizirati kao indiferentno za soj *S. aureus* ATCC 25923, dok je za *S. aureus* NCTC 12493 (MRSA) pokazano aditivno djelovanje za oba spoja.

### 4.3. Antimikrobno djelovanje mupirocina, karvakrola i eteričnog ulja origana na biofilm bakterije *S. aureus*.

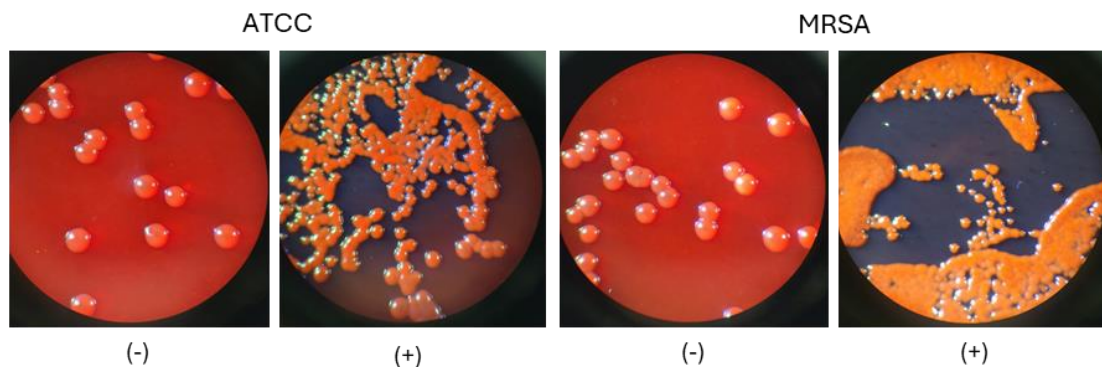
CRA metoda je brza, jednostavna za izvođenje, reproducibilna i ima značajnu prednost: kolonije ostaju održive u mediju za daljnju analizu. Rezultati se obično temelje na boji kolonija, koja varira od crvene/bezbojne za sojeve koji ne proizvode biofilm do crne za sojeve koji proizvode biofilm.

Slike (Slika 4. i Slika 5.) prikazuju rast kolonija *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 i NCTC 12493 (MRSA)) na CRA pločama nakon 24-satne inkubacije na  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Pozitivne kolonije, koje indiciraju proizvodnju biofilma, prikazane su tamno crvenom do crnom bojom, s hrapavom i suhom konzistencijom, te nepravilnim rubovima. Negativne kolonije, koje ne pokazuju proizvodnju biofilma, odnosno dolazi do inhibicije nastanka, prepoznatljive su po crvenoj do bezbojnoj boji, te glatkoj, okrugloj i sjajnoj površini (Slika 5.)

**Slika 4.** Vizualni prikaz rasta kolonija *S. aureus* na TSA agaru CRA metodom. U podlogu je dodan karvakrol u koncentracijama  $100 \mu\text{g/mL}$  i  $150 \mu\text{g/mL}$ .



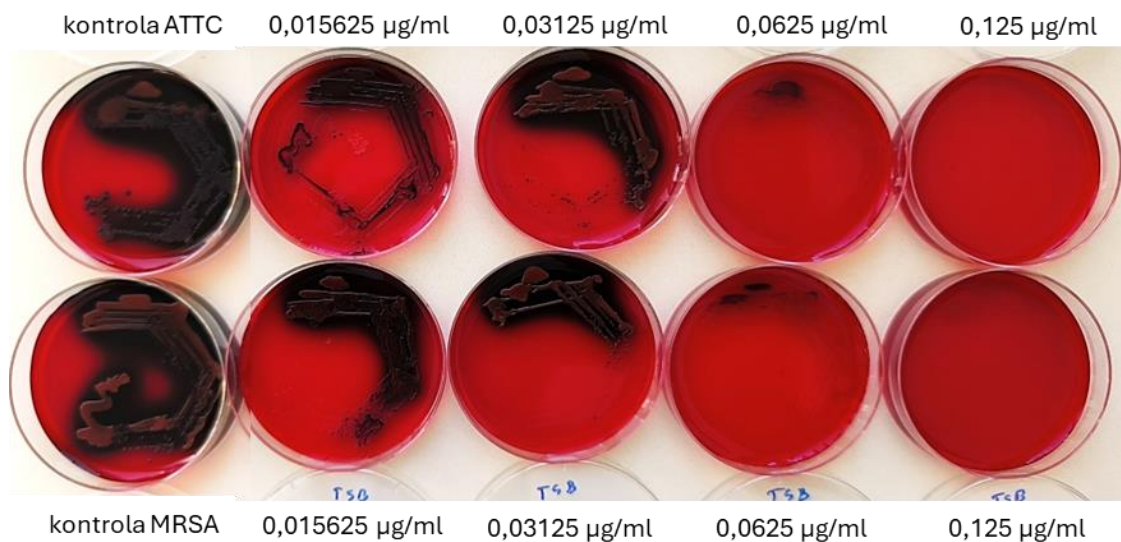
**Slika 5.** Prikaz kolonija na povećanju od 10x uz pomoć elektronske lupe na primjeru karvakrola  $150 \mu\text{g/mL}$ . Lijeva strana prikazuje negativne kolonije (-), a desna pozitivne kolonije (+).



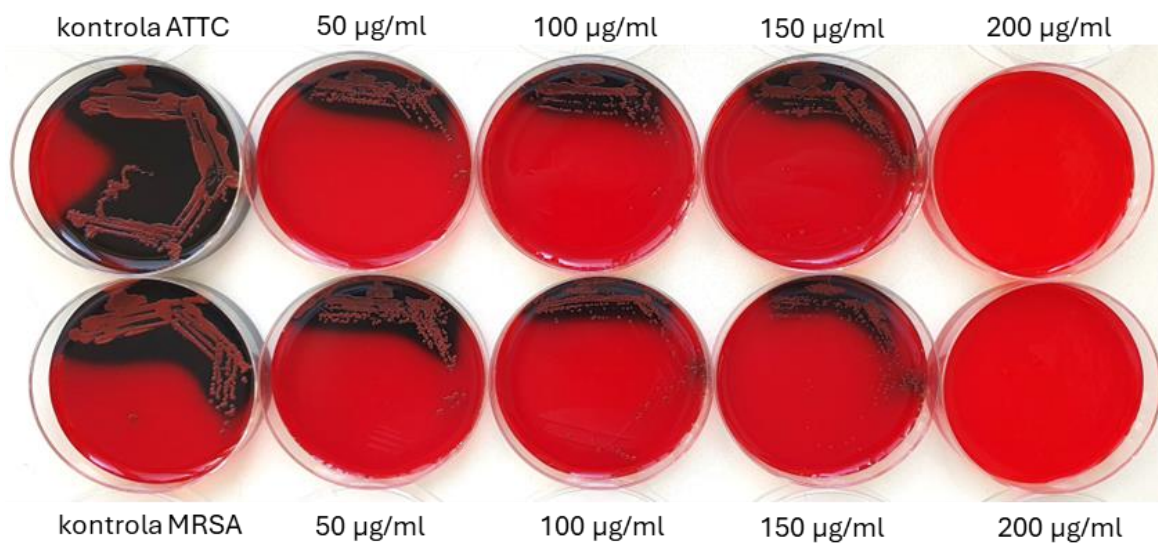


Na sljedećim slikama (Slika 6., Slika 7., Slika 8.) prikazan je rast *S. aureus* kolonija CRA metodom na gradijentu različitih koncentracija MUP, karvakrola (KAR) i eteričnog ulja origana (ET.U.).

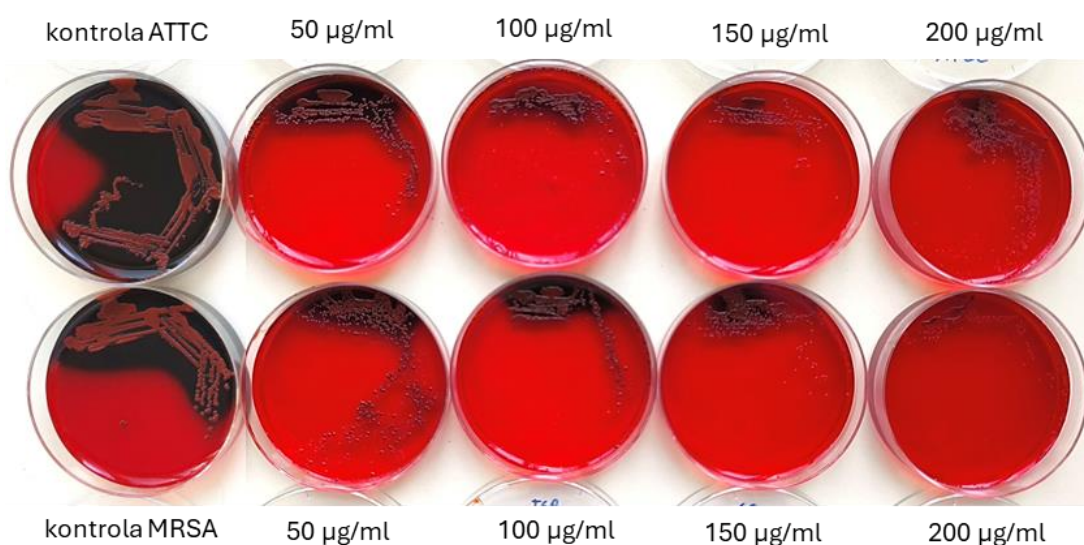
**Slika 6.** Vizualni prikaz rasta kolonija *S. aureus* na TSA agaru CRA metodom. U podlogu je dodan MUP u rasponu koncentracija od 0,014625  $\mu\text{g/mL}$  do 0,125  $\mu\text{g/mL}$



**Slika 7.** Vizualni prikaz rasta kolonija *S. aureus* na TSA agaru CRA metodom. U podlogu je dodan karvakrol u rasponu koncentracija od 50  $\mu\text{g/mL}$  do 200  $\mu\text{g/mL}$ .

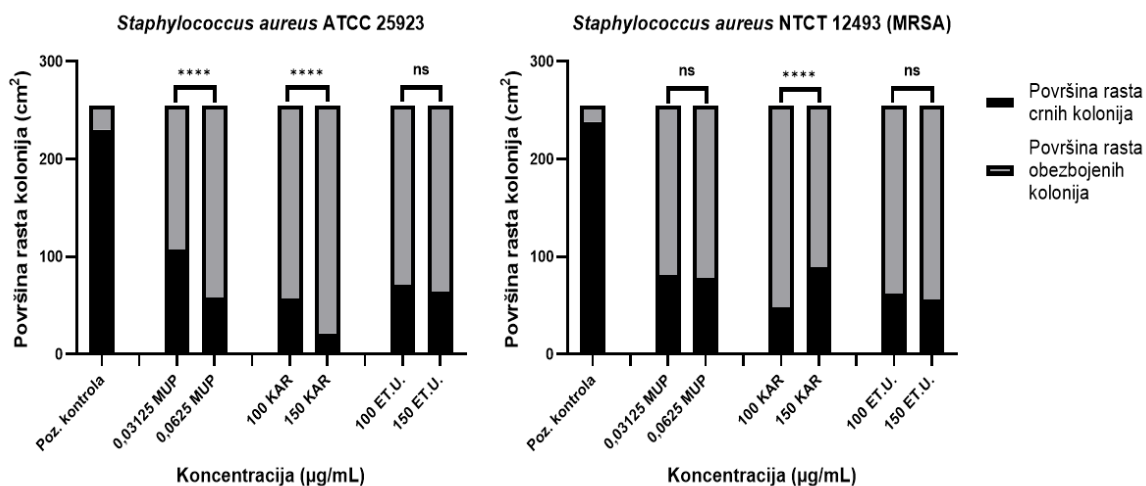


**Slika 8.** Vizualni prikaz rasta kolonija *S. aureus* na TSA agaru CRA metodom. U podlogu je dodano eterično ulje origana u rasponu koncentracija od 50 µg/mL do 200 µg/mL.



Na slikama se uočava smanjenje produkcije čimbenika nastanka biofilma povećanjem koncentracije aktivnih tvari u mediju u odnosu na kontrolu. Također se primjećuje kako karvakrol i eterično ulje origana pridonose smanjenju produkcije biofilma u puno nižim koncentracijama od MIC-a (Tablica 4.), dok mupirocin nije pokazao vizualno značajan efekt na smanjenje produkcije biofilma u koncentracijama ispod MIC-a. Kako bi se kvantificirala metoda uzete su pojedinačne koncentracije MUP, KAR i ET.U. gdje se mjerila površina rasta crnih kolonija, u odnosu na obezbojene kolonije. Dobiveni rezultati prikazani su grafički (Graf 1.)

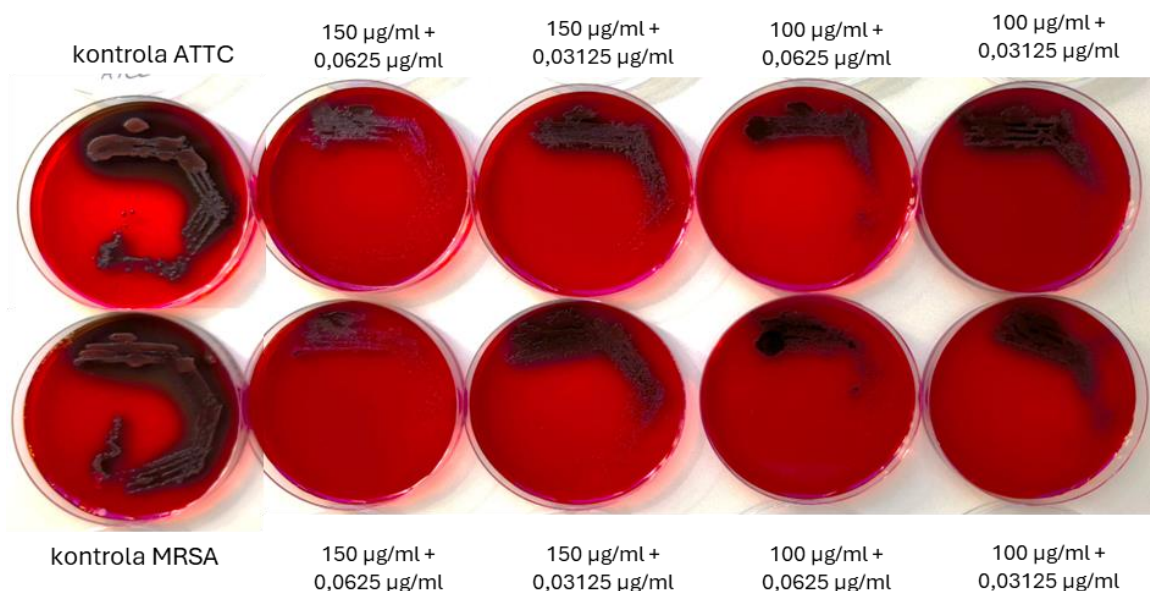
**Graf 1.** Grafički prikaz površine rasta kolonija *S. aureus* na TSA agaru CRA metodom u različitim koncentracijama MUP, KAR i ET.U.



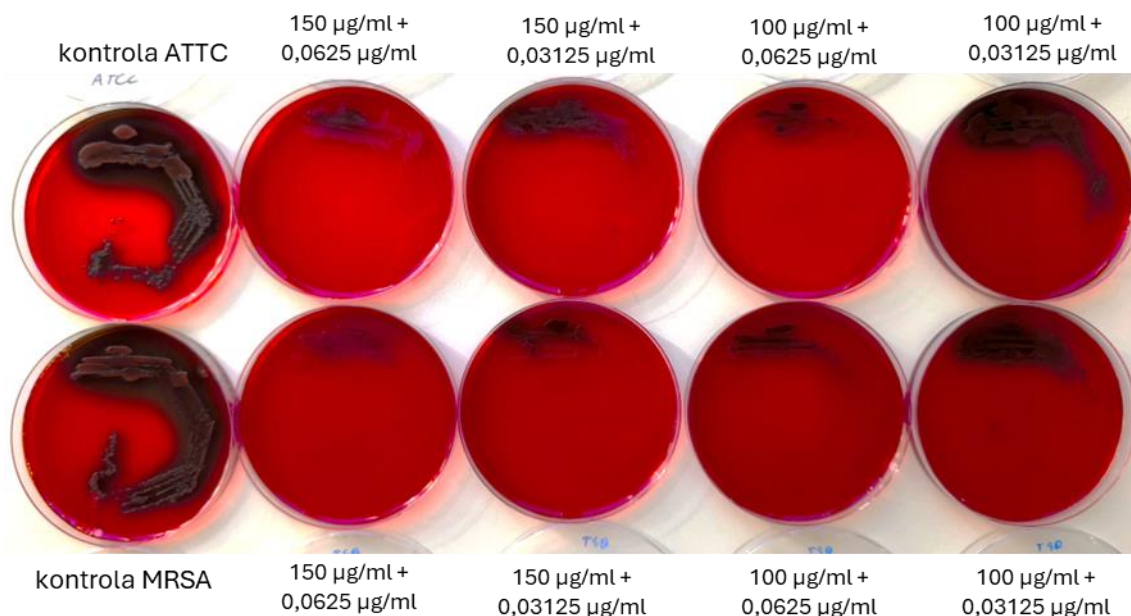
Iz dobivenih rezultata uočava se statistički značajna razlika u smanjenju rasta crnih kolonija prilikom povećanja koncentracije aktivne tvari samo na soju *S. aureus* ATCC 25923 za MUP i KAR, dok ET.U. nije pokazalo statistički značajnu razliku između dvije korištene koncentracije. S druge strane za *S. aureus* NCTC 12943 nije utvrđena statistički značajna razlika povećanjem koncentracije MUP i ET.U., dok je za KAR dobiveni rezultat suprotan očekivanom gdje je manja koncentracija KAR pokazala veću inhibiciju nastanka crnih kolonija. Osim pojedinačnih koncentracija mupirocina, karvakrola i eteričnog ulja origana, ispitivana je i kombinacija mupirocin + karvakrol/eterično ulje origana. Dobiveni rezultati su prikazani na slikama (Slika 9. i Slika 10.).

Najznačajniju inhibiciju nastanka biofilma je imala kombinacija koncentracija 0,0625 µg/mL mupirocina i 150 µg/mL karvakrola. Također u ispitivanju kombinacije mupirocina i eteričnog ulja origana, najjaču inhibiciju biofilma je pokazala ista kombinacija koncentracija od 0,0625 µg/mL mupirocina i 150 µg/mL eteričnog ulja origana. Kombinacija mupirocina s karvakrolom je pokazala nešto značajniju vizualnu inhibiciju nastanka biofilma u odnosu na kombinaciju s eteričnim uljem.

**Slika 9.** Vizualni prikaz rasta kolonija *S. aureus* na TSA agaru CRA metodom. U podlogu je dodana kombinacija mupirocina i karvakrola u koncentracijama navedenim u **Tablici 2.**

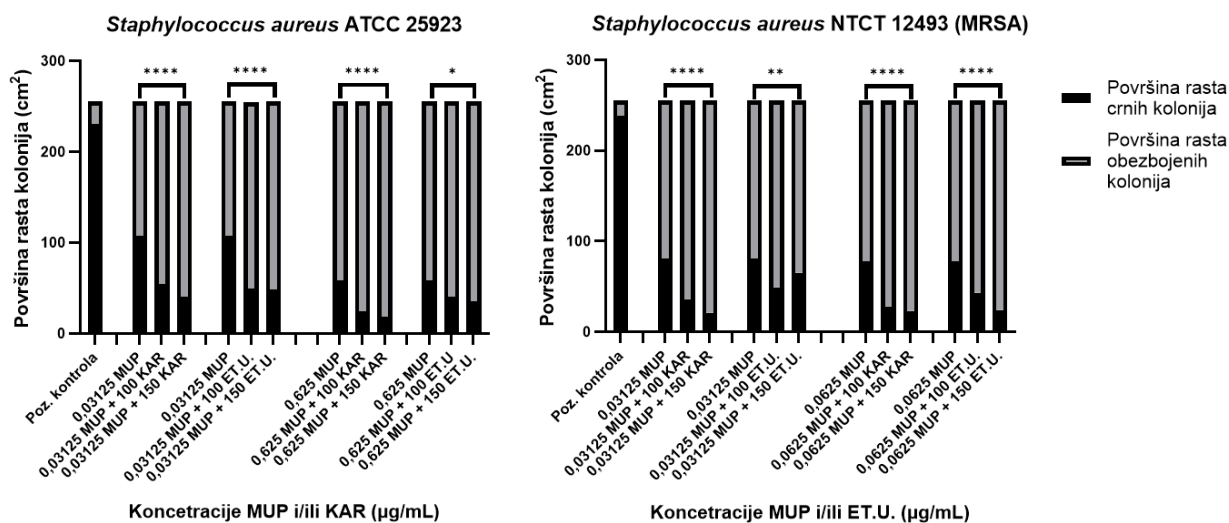


**Slika 10.** Vizualni prikaz rasta kolonija *S. aureus* na TSA agaru CRA metodom. U podlogu je dodana kombinacija mupirocina i eteričnog ulja origana u koncentracijama navedenim u **Tablici 2.**



Obradom koncentracija kombinacija MUP + KAR/ET.U. također je dobiven grafički prikaz smanjenja površine rasta crnih kolonija u usporedbi s identičnim koncentracijama pojedinačno mjenog MUP-a (Graf 2.).

**Graf 2.** Grafički prikaz površine rasta kolonija *S. aureus* na TSA agaru CRA metodom u različitim koncentracijama kombinacija MUP + KAR/ET.U. u usporedbi s identičnim koncentracijama pojedinačno mjenog MUP-a.



## 5. RASPRAVA

Prema dobivenim rezultatima MIC-ova možemo zaključiti kako je MUP pokazao znatno bolji antimikrobni učinak od karvakrola i eteričnog ulja origana. U odnosu na KAR i ET.U., za uspostavu minimalne inhibitorne koncentracije potrebna je gotovo 5 redova veličine manja koncentracija antibiotika. MIC antibiotika kretao se u rasponu 0,076 – 0,141 µg/mL, dok je karvakrola 525 – 700 µg/mL, i eteričnog ulja origana 625 – 750 µg/mL u pojedinačnim mjerenjima. Ispitivani sojevi nisu pokazali rezistenciju na MUP, te su dobiveni rezultati u skladu s CSLI smjernicama za određivanje visokorezistentnih sojeva *S. aureus* otpornih na MUP (CLSI, 2020). Prema prethodno navedenim smjernicama da bi se soj okarakterizirao kao visokorezistentan na MUP, MIC dobiven mikrodilucijskom metodom mora iznositi  $\geq 256$  µg/mL, dok MIC referentnog soja bez ikakve rezistencije (*S. aureus* ATCC 29123) iznosi 0,06 – 0,5 µg/mL. Kako je gore navedeno, rezultati MIC vrijednosti naših sojeva su iznosili 0,075 – 0,141 µg/mL, čije vrijednosti također odgovaraju dobivenim rezultatima u sličnim radovima (Kifer i sur., 2016; Mercer i sur., 2017) gdje su MIC vrijednosti MUP-a iznosile 0,125 – 0,5 µg/mL. Razlika može biti posljedica manjih modifikacija u metodama ili upotrebom različitih sojeva u ispitivanju.

Primijećena je razlika u pojedinačnom ispitivanju MIC-ova između sojeva *S. aureus* ATCC 25923 i *S. aureus* NCTC 12493 (MRSA). Kod MRSA soja dobiveni MIC bio je jedno serijsko razrjeđenje manji što može ukazati na pojačanu osjetljivost tog soja na MUP, no prilikom ispitivanja kombinacije antibiotika i aktivnih tvari, oba soja su pokazala približno iste MIC-ove. Dobivena razlika može se objasniti mogućim manjim razlikama prilikom pripreme inokuluma i pipetiranja uzoraka. U svakom slučaju, možemo zaključiti da su sojevi osjetljivi na mupirocin što odgovara činjenici da je prevalencija rezistentnih sojeva još uvijek relativno niska. Prema meta analizi Dadashi i sur. (2020.) otpornost na MUP zabilježena je u 7,6% kliničkih izolata *S. aureus*, što ukazuje na relativno nisku prevalenciju MUP-rezistentnih sojeva MRSA-e.

Što se tiče dobivenih vrijednosti MIC-ova karvakrola i eteričnog ulja origana, kako je gore navedeno, oni pokazuju znatno manju antimikrobnu aktivnost od MUP-a. Pregledom literature utvrđeno je da rezultati MIC-a uglavnom odgovaraju sličnim istraživanjima, iako su vrijednosti ponešto više u odnosu na referentne radove. U radu Speranza i sur. (2023) sistematizirane su MIC vrijednosti za karvakrol i timol u relevantnim radovima objavljenima od 2005. do 2023.

godine. Prema njihovim nalazima, srednja vrijednost za *S. aureus* iznosi 399 µg/mL. U radu Rúa i sur. (2019), gdje je ispitivano 76 sojeva *S. aureus*, uključujući soj ATCC 25923, srednja vrijednost MIC-a za karvakrol iznosila je  $384,21 \pm 78,40$  µg/mL. U literaturi se mogu pronaći i niže vrijednosti MIC-ova za karvakrol; primjerice u radu Sousa Silveira i sur. (2020), MIC vrijednost na soj *S. aureus* IS-58 iznosila 256 µg/mL. Kako je gore spomenuto, vrijednosti MIC-ova dobivenih u ovom radu su nešto više: za *S. aureus* ATCC 25923 iznosio je  $525 \pm 56$  µg/mL prilikom pojedinačnih mjerenja, i u rasponu od 500 do 875 µg/mL u ispitivanju kombinacije s mupirocinom. Soj *S. aureus* NCTC 12493 (MRSA) pokazao je nešto veću otpornost prema karvakrolu, s MIC vrijednostima  $700 \pm 274$  µg/mL u pojedinačnom ispitivanju, odnosno 375 – 625 µg/mL u kombinaciji s mupirocinom. Za soj *S. aureus* NCTC 12493 (MRSA) nisu pronađeni referenti radovi, osim sličnog rada Kifer i sur. (2016), koji je ispitao antimikrobno djelovanje različitih monoterpena, uključujući timol (izomer karvakrola), na različite MRSA sojeve. U tom su radu MIC vrijednosti za različite MRSA sojeve kretale su se od 750 do 2500 µg/mL. Razlike u dobivenim MIC vrijednostima mogu se objasniti upotrebom različitih sojeva i modifikacija metoda mjerenja, kao i utjecaja temperature na hlapljivost aktivnih komponenata.

Slične vrijednosti MIC-ova dobivene su i prilikom ispitivanja eteričnog ulja što je i očekivano, obzirom da je karvakrol glavna sastavnica ispitivanog eteričnog ulja origana, pa je i njegovo djelovanje vrlo slično. Pregled literature otkriva ograničen broj radova koji su ispitivali eterično ulje *Origanum compactum*, što ograničava usporedbu rezultata. Jedan od ključnih preglednih radova, Bouyahya i sur. (2020), navodi djelovanje eteričnog ulja *O. compactum* na različite mikrobe, uključujući *S. aureus*, za koji je MIC iznosio 1 mg/mL (1000 µg/mL). Osim ovog rada, pronađen je i jedan rad u kojemu su MIC vrijednosti eteričnog ulja na *S. aureus* značajno manje od naših dobivenih rezultata i ostalih radova. Prema Ersanli i sur. (2023) MIC vrijednosti za *S. aureus* sojeve kretale su se od 91 do 182 µg/mL, iako je metoda određivanja MIC-a mikrodilucijom bila identična našem mjerenju. Razlika se djelomično može objasniti većim udjelom karvakrola (78,72%) i mogućim sinergističkim učinkom sa drugim sastavnicama ulja.

Pretpostavlja se da mehanizam djelovanja karvakrola i ostalih komponenti eteričnog ulja origana proizlazi iz njihove kemijske strukture. Zbog svoje amfipatske strukture, ove se molekule ugrađuju u membranu bakterija, povećavajući njezinu propusnost, što dovodi do curenja sadržaja i smrti stanice. Suprotno tome, mupirocin mora prodrjeti u bakterijsku stanicu kako bi ostvario svoje djelovanje na izoleucil-tRNA sintetazi. U stanicu, MUP ulazi pasivnom

difuzijom – na temelju probijanja lipidnog dvosloja bakterijske membrane. Na temelju ovih činjenica, moglo bi se očekivati da će kombinacija mupirocina s karvakrolom i eteričnim uljem origana dovesti do sinergističkog učinka. No prilikom ispitivanja kombinacija mupirocina i aktivnih tvari nisu zamijećeni značajni pomaci u smanjenju MIC-ova za ispitivane sojeve. Primjenom metode „checkerboard assay“ primijećeno je smanjenje MIC-a za jedno serijsko razrjeđenje u većini mjerenja, no upotrebom FIC indeksa, dobiveni rezultati pokazuju na indiferentnost prilikom ispitivanja na soju *S. aureus* ATCC 25923. S druge strane, na soj *S. aureus* NCTC 12493 (MRSA) FIC indeks ukazao je na aditivni učinak.

Djelovanje na biofilm zahtijeva drugačiji pristup. U biofilmu, gdje bakterijske stanice žive u zajednici, nije dovoljno da antimikrobna tvar samo proдре u pojedinačne bakterijske stanice, već mora prodrijeti i kroz polimerni matriks biofilma kako bi djelovala na bakterije koje se nalaze dublje unutar strukture biofilma.

Prema radu Kifer i sur., (2016) MUP nije pokazao antimikrobni učinak na biofilm u ispitivanom rasponu koncentracija 0,016 – 2 mg/mL. S druge strane, u pojedinim je istraživanjima dokazano kako subinhibitorne koncentracije MUP-a na visoko rezistentne sojeve MRSA-e čak potiču produkciju biofilma (Jin i sur., 2020). Međutim, treba naglasiti kako su koncentracije MUP-a ispod 4 µg/mL imale mali učinak na stvaranje biofilma te da se u tom istraživanju radi o visokorezistentnim sojevima s MIC vrijednostima znatno višim od naših ispitivanih sojeva. U sličnom istraživanju Park i sur. (2020) utvrđeno je kako je maksimalna indukcija biofilma postignuta pri koncentracijama MUP-a od približno 0,25 µg/mL, s rasponom između 0,016 i 2 µg/mL, no i ovdje se radilo o visokorezistentnim sojevima MRSA-e na. Na temelju dostupnih podataka može se zaključiti da MUP kao antibiotik nema značajan učinak na inhibiciju produkcije biofilma, a u nekim slučajevima može ga čak i potaknuti. Naši rezultati pokazuju da subinhibitorne koncentracije mupirocina ipak imaju određeni učinak na smanjenje produkcije biofilma u usporedbi s kontrolom, iako je taj učinak znatno slabiji nego kod karvakrola i eteričnog ulja origana. Pri koncentraciji od 0,125 µg/mL koja je označavala MIC za naše sojeve, nije došlo ni do rasta bakterija, pa se tako nije mogao razviti ni biofilm, dok se pri koncentraciji od 0,0625 µg/mL vidi vizualno smanjenje nastanka biofilma u odnosu na kontrolu. S druge strane, koncentracije 0,03125 - 0,015625 µg/mL pokazuju produkciju biofilma. Razlike u dobivenim rezultatima se mogu objasniti korištenjem potpuno drugačije metode, od one u gore navedenim radovima. Također, važno je naglasiti da je CRA metoda više vizualnog i kvalitativnog karaktera koja pokazuje sposobnost bakterije da stvaraju biofilm te ju je teže

kvantificirati u odnosu na spektrofotometrijske metode mjerenja apsorbancije nastalog biofilma. Nepostojanje standardne metode za ispitivanje antimikrobnog učinka na bakterije u biofilmu je velik problem pri uspoređivanju rezultata različitih istraživanja.

Uspoređujući dobivene rezultate pri upotrebi karvakrola i eteričnog ulja origana, zabilježena je inhibicija nastanka biofilma u puno nižim koncentracijama od MIC-a. Najveća inhibicija biofilma opažena je pri koncentracijama 100 – 150 µg/mL za karvakrol, odnosno 150 – 200 µg/mL za eterično ulje origana. No, čak i koncentracije od 50 µg/mL pokazale su vizualni učinak inhibicije nastanka biofilma. Zanimljivo je da su ovo koncentracije značajno niže od MIC-ova (4-8 puta niže koncentracije), dok subinhibitorne koncentracije MUP-a nisu imale toliki učinak na smanjenje produkcije biofilma. Slični podaci dobiveni su radu (Selvaraj et al., 2020) u kojemu je korištena ista metoda uz pomoć CRA agara. Ispitivanje učinka karvakrola na formiranje biofilma MRSA-e pokazalo je da karvakrol u koncentracijama od 25, 50 i 75 µg/mL ima antimikrobni učinak ovisan o dozi. U drugom istraživanju (Peng et al., 2023) također je dokazan učinak karvakrola na biofilm *S. aureus*. Istraživanje je pokazalo da je količina formiranog biofilma kod *S. aureus SYN* pri svakoj koncentraciji karvakrola bila značajno manja u usporedbi s kontrolnim uzorkom bez tretmana. Antibiofilmsko djelovanje karvakrola pokazalo se ovisnim o koncentraciji, pri čemu su veće koncentracije bile učinkovitije u inhibiciji formiranja biofilma, no treba naglasiti kako je korištena u potpunosti drugačija metoda, te su ispitivane koncentracije karvakrola bile značajno niže (4 – 8 µg/mL).

Kao što je u rezultatima spomenuto, prilikom obrade podataka u programu GraphPad Prism, dobiveni su pomalo proturječni rezultati u odnosu na vizualno promatranje rasta biofilma bakterijskih kolonija. Uspoređujući koncentracije MUP, KAR i ET.U., statistički značajna razlika u inhibiciji biofilma s povećanjem koncentracija aktivnih tvari (Graf 1) primijećena je samo za MUP i KAR kod soja *S. aureus* ATCC 25923. Kod soja *S. aureus* NCTC 12493 nije utvrđena statistički značajna razlika, već čak i kontradiktorni rezultat gdje je niža koncentracija ET.U. pokazala snažniju inhibiciju biofilma od više koncentracije. Ovi se rezultati mogu objasniti tako što je razlika koncentracija između KAR i ET.U. za samo 50 µg/mL (koncentracije od 100 i 150 µg/mL), dok je razlika između koncentracija MUP-a jedno serijsko razrjeđenje (0,03125 i 0,0625 µg/mL). No, to ne objašnjava činjenicu da MUP kod soja *S. aureus* NCTC 12493 nije pokazao statistički značajnu razliku, niti činjenicu da je KAR pokazao kako je manja koncentracija ET.U. bila učinkovitija u inhibiciji nastanka biofilma. Ove kontradiktorne rezultate moguće je djelomično pripisati nenamjernim varijacijama prilikom



inokulacije sojeva. Unatoč ovim rezultatima, važno je naglasiti da u usporedbi s pozitivnom kontrolom (ne tretiranim inokuliranim sojevima) svaka aktivna tvar pokazuje statistički značajnu inhibiciju biofilma (Graf 1.). Prilikom ispitivanja kombinacija MUP-a i karvakrola/et. ulja origana, u svim je slučajevima dokazano statistički značajno smanjenje produkcije biofilma u usporedbi s istim koncentracijama čistog antibiotika. Slično vizualnim opažanjima, grafički prikaz (Graf 2.) pokazuje da je najveći učinak u smanjenju biofilma imala kombinacija od 0,0625 µg/mL MUP + 150 µg/mL KAR i 0,0625 µg/mL MUP + 150 µg/mL ET.U.

## 6. ZAKLJUČCI

Mupirocin inhibira rast planktonskih bakterijskih stanica sojeva *S. aureus* ATCC 2592 i *S. aureus* NCTC 12493 u značajno manjoj koncentraciji (0,076 – 0,141 µg/mL) od karvakrola (525 – 700 µg/mL) i eteričnog ulja origana (625 – 750 µg/mL).

Kombinacije mupirocina s karvakrolom, odnosno eteričnim uljem origana pokazuju indiferentan učinak na *S. aureus* ATCC 2592 te aditivni učinak na *S. aureus* NCTC 12493 (MRSA).

Primjenom CRA metode pokazano je da mupirocin i karvakrol ovisno o koncentraciji značajno smanjuje sposobnost tvorbe biofilma kod *S. aureus* ATCC 2592 ali ne i kod MRSA soja, dok eterično ulje origana nije pokazalo značajan antibiofilm učinak. Kombinacije antibiotika s karvakrolom i/ili eteričnim uljem origana, u odnosu na pojedinačno aplicirani mupirocin, značajno smanjuju sposobnost tvorbe biofilma kod oba soja *S. aureus*.

U praktičnom smislu, spoznaje iz ovog rada bi mogle omogućiti primjenu posebnih formulacija kombinacije mupirocina i karvakrola/eteričnog ulja origana za topikalnu primjenu koji bi imao sinergistički učinak u vidu smanjenja produkcije biofilma na potencijalnim rana. Osim toga, uz antimikrobno djelovanje, aktivne komponente eteričnog ulja bi imale antioksidativno i protuupalno djelovanje.

No, treba naglasiti kako ovaj rad ukazuje na određene nedostatke i izazove u učinkovitom korištenju eteričnog ulja origana. Među ključnim problemima je varijabilnost u djelovanju između različitih sojeva, nedostatak standardiziranih protokola, kao i manjak radova koji bi omogućili usporedbu rezultata.

## 7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

AMP	Adenozin monofosfat
AMR	Antimikrobna rezistencija
ATP	Adenozin trifosfat
CLSI	The Clinical and Laboratory Standards Institute
CRA	Congo red agar
CYP	Citokrom P450
DDD	Definirane dnevne doze
DMSO	Dimetil-sulfoksid
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina
eDNA	Environmental DNA (izvanstanična/okolišna DNA)
EPS	Egzopolisaharid
ET.U.	Eterično ulje origana
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FIC	Fractional Inhibitory Concentration
GC-MS	Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa
IUCAP	International Union of Pure and Applied Chemistry
KAR	Karvakrol
MH bujon	Müller-Hinton bujon
MHA	Müller-Hinton agar
MIC	Minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	Meticilin-rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i>
MUP	Mupirocin
N-AHL	N-acil-L-homoserin lakton
NIST	National Institute of Standards and Technology
PVL	Panton-Valentine leukocidin
SDR	Short-chain dehydrogenase/reductase
SSTI	Soft skin tissue infection
TSA	Tryptic Soy agar
TTC	2,3,5-trifeniltetrazolin klorid
VRSA	Vankomicin rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i>
WHO	World Health Organization

## 8. LITERATURA

Abdelbary MMH, Basset P, Blanc DS, Feil EJ. The Evolution and Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Genetics and Evolution of Infectious Diseases (2. verzija)*, 2017, 553–572.

Akbar MU, Haque A, Liaquat S, Schierack P, Ali A. Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis* and Its Inhibition Using Carvacrol, 2-Aminobenzimidazole, and 3-Indole Acetonitrile. *ACS omega*, 2023, 8(1), 682–687.

Alhasso B, Ghori MU, Conway BR. Development of Nanoemulsions for Topical Application of Mupirocin. *Pharmaceutics*, 2023, 15(2), 378.

Al-Mijalli SH, Mrabti NN, Ouassou H, Sheikh RA. Chemical Composition and Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Inflammatory Properties of *Origanum compactum* Benth Essential Oils from Two Regions: In Vitro and In Vivo Evidence and In Silico Molecular Investigations. *Molecules*, 2022, 27(21), 7329.

Amagai M, Yamaguchi T, Hanawaka Y, Nisjifuji K, Sugai M, Stanley JR. Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein 1. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2002, 118(5), 845–850.

Anaeigoudari A. Hepato- and reno-protective effects of thymoquinone, crocin, and carvacrol: A comprehensive review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2022, 12(5), 185.

Angelopoulou A, Field D, Ryan CA, Stanton C, Hill C, Ross RP. The microbiology and treatment of human mastitis. *Medical Microbiology and Immunology*, 2018, 207(2), 83–94.

Asokan G, Ramadhan T, Ahmed E, Sanad H. WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medline-PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. *Oman Medical Journal*, 2019, 34(3), 184–193.

Austgulen LT, Solheim E, Scheline RR. Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol. *Pharmacology & Toxicology*, 1987, 61(2), 98–102.

Azizi Z, Majlessi N, Choopani S, Naghdi N. Neuroprotective effects of carvacrol against Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases: A review. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 2022, 12(4), 371–387.

Baser KHC. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*, 2008, 14(29), 3106–3119.

Bellio P, Fagnani L, Nazzicone L, Celenza G. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. *MethodsX*, 2021, 8, 101543.

Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43(2), 149–154.

Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43(2), 149–154.

- Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS. Supplementum*, 2013, 136, 1–51.
- Bouyahya A, Abrini J, Dakka N, Bakri Y. Essential oils of *Origanum compactum* increase membrane permeability, disturb cell membrane integrity, and suppress quorum-sensing phenotype in bacteria. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2019, 9(5), 301–311.
- Bouyahya A, Zengin G, Belmehdi O, Bourais I, Chamkhi I. *Origanum compactum* Benth., from traditional use to biotechnological applications. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(8), e13251.
- Browne AJ, Chipeta MG, Haines-Woodhouse G, Kumaran E, Hamadani BH... Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. *The Lancet Planetary Health*, 2021, 5(12), 893–904.
- Chroho M, Roupheal Y, Petropoulos SA, Bouissane L. Carvacrol and Thymol Content Affects the Antioxidant and Antibacterial Activity of *Origanum compactum* and *Thymus zygis* Essential Oils. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 2024, 13(2), 139.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y.)*, 1999, 284(5418), 1318–1322.
- Cranendonk DR, van Vught LA, Wiewel MA, Cremer OL, Horn J. Clinical Characteristics and Outcomes of Patients With Cellulitis Requiring Intensive Care. *JAMA Dermatology*, 2017, 153(6), 578–582.
- Dadashi M, Hajikhani B, Darban-Sarokhalil D, van Belkum A, Goudarzi M. Mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2020, 20, 238–247.
- Darwish SF, Asfour HAE. Investigation of Biofilm Forming Ability in *Staphylococci* Causing Bovine Mastitis Using Phenotypic and Genotypic Assays. *The Scientific World Journal*, 2013, 378492.
- Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, Welsh E, Eaglstein WH, Mertz PM. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 2008, 16(1), 23–29.
- Delgado S, Garcia P, Fernandez L, Jimenez E, Rodríguez-Banos M. del Campo R, Rodriguez JM. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. *FEMS immunology and medical microbiology*, 2011, 62(2), 225–235.
- Dong RH, Fang ZZ, Zhu LL, Ge GB, Cao YF. Identification of CYP isoforms involved in the metabolism of thymol and carvacrol in human liver microsomes (HLMs). *Die Pharmazie*, 2012, 67(12), 1002–1006.
- Ersanli C, Tzora A, Skoufos I, Fotuo K, Maloupa E. The Assessment of Antimicrobial and Anti-Biofilm Activity of Essential Oils against *Staphylococcus aureus* Strains. *Antibiotics*, 2023, 12(2), 384.

Espina L, Pagan R, Lopez D, Garcia-Goznalo D. Individual Constituents from Essential Oils Inhibit Biofilm Mass Production by Multi-Drug Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2015, 20(6), 11357–11372.

Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci*. *Journal of Clinical Pathology*, 1989, 42(8), 872–874.

Giudice P. Skin Infections Caused by *Staphylococcus aureus*. *Acta Dermato Venereologica*, 2020, 100(9), 110-215.

Guimarães AG, Silva FV, Xavier MA, Santos MRV, Oliviera RCM. Orofacial analgesic-like activity of carvacrol in rodents. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 2012, 67(9–10), 481–485.

Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, 2009. 11(7), 1034–1043.

Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, Garza L, Li H. Molecular mechanisms of blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 2002, 110(1), 53–60.

Hersh AL, Chambers HF, Maselli JH, Gonzales R. National trends in ambulatory visits and antibiotic prescribing for skin and soft-tissue infections. *Archives of Internal Medicine*, 2008, 168(14), 1585–1591.

Hindy JR, Quintero-Martinez JA, Lee AT, Scott CG, Gerberi DJ. Incidence Trends and Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Systematic Review of Population-Based Studies. *Cureus*, 2022, 29;14(5), e25460.

Hughes J, Stabler R, Gaunt M, Karadag T, Desai N... Clonal variation in high- and low-level phenotypic and genotypic mupirocin resistance of MRSA isolates in south-east London. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, 70(12), 3191–3199.

James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini EdL, Secor P. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 2008, 16(1), 37–44.

Jin Y, Guo Y, Zhan Q, Shang Y, Qu D, Yu F. Subinhibitory Concentrations of Mupirocin Stimulate *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation by Upregulating cidA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2020, 64(3), e01912.

Jurado P, Uruen C, Martinez S, Lain E, Sanchez S, Rezusta A, Lopez V, Arenas J. Essential oils of *Pinus sylvestris*, *Citrus limon* and *Origanum vulgare* exhibit high bactericidal and anti-biofilm activities against *Neisseria gonorrhoeae* and *Streptococcus suis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, vol 168, 115703.

Kachur K, Suntres Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(18), 3042–3053.

Kachur K, Suntres Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(18), 3042–3053.

Khoshnood S, Heidary M, Asadi A, Soleimani S, Motahar M, Saki M, Abdi M. A review on mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of mupirocin against *Staphylococcus aureus*. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2019, 109, 1809–1818.

Kifer D, Mužinić V, Šegvić Klarić M. Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1,8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm growth. *The Journal of Antibiotics*, 2016, 69(9), 689–696.

Kiliñç BÖ, Gödelek D, Süfer O, Saygideğer Demir B, Sezan A, Saygideğer Y, Bozok F. Essential Oils from Some Lamiaceae Plants: Antioxidant and Anticancer Potentials besides Thermal Properties. *Chemistry & Biodiversity*, 2022, 19(10), e202200418.

Kim JS, Kwon SH. Mupirocin in the Treatment of Staphylococcal Infections in Chronic Rhinosinusitis: A Meta-Analysis. *PloS One*, 2016, 11(12), e0167369.

Kintzios SE *Oregano: The genera Origanum and Lippia*, Florida, CRC Press, 2002, str. 292.

Kirschner J. A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 1981, 16(4), 390–390.

Krause ST, Liao P, Crocoll C, Boachon B, Forster C... The biosynthesis of thymol, carvacrol, and thymohydroquinone in Lamiaceae proceeds via cytochrome P450s and a short-chain dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2021, 118(52), e211009211

Laothaweerungsawat N, Neimkhum W, Anuchapreeda S, Sirithunyalug J, Chaiyana W. Transdermal delivery enhancement of carvacrol from *Origanum vulgare* L. essential oil by microemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, 579, 119052.

Laureano AC, Schwartz RA, Cohen PJ. Facial bacterial infections: folliculitis. *Clinics in Dermatology*, 2014, 32(6), 711–714.

Lee SM, Kim J, Jeong J, Park YK, Bai GH, Lee EY, Lee MK, Chang CL. Evaluation of the broth microdilution method using 2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride for rapidly growing mycobacteria susceptibility testing. *Journal of Korean Medical Science*, 2007, 22(5), 784–790.

Leyva-López N, Gutiérrez-Grijalva EP, Vazquez-Olivo G, Heredia J. Essential Oils of *Oregano*: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 2017, 22(6), 989.

Linz MS, Mattappallil A, Finkel D, Parker D. Clinical Impact of *Staphylococcus aureus* Skin and Soft Tissue Infections. *Antibiotics*, 2023, 12(3), 557.

Lombrea A, Anatal D, Ardelean F, Avram S, Pavel IZ. A Recent Insight Regarding the Phytochemistry and Bioactivity of *Origanum vulgare* L. Essential Oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(24), 9653.

Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections. *New England Journal of Medicine*, 1998, 339(8), 520–532.

Lu M, Dai T, Murray CK, Wu MX. Bactericidal Property of Oregano Oil Against Multidrug-Resistant Clinical Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9, 2329.

Mączka W, Twardawska M, Grabarczyk M, Wińska K. Carvacrol – A Natural Phenolic Compound with Antimicrobial Properties. *Antibiotics*, 2023, 12(5), 824.

Marchese A, Arciola CR, Coppo E, Barbieri R, Barreca D... The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials. *Biofouling*, 2018, 34(6), 630–656.

Masiuk H, Kopron K, Grumann D, Goerke C, Kolata J... Association of recurrent furunculosis with Panton-Valentine leukocidin and the genetic background of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(5), 1527–1535.

Matthijs, S. *i sur.* (2014) ‘Antimicrobial properties of *Pseudomonas* strains producing the antibiotic mupirocin’, *Research in Microbiology*, 165(8), pp. 695–704. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.09.009>.

Memar MY, Raei P, Alizadeh N, Akbari Agham M, Kafil H. Carvacrol and thymol; Strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Reviews in Medical Microbiology*, 2017, 28, 63–68.

Mercer DK, Katvars LK, Hewitt F, Smith DW, Robertson J, O’Neil DA. NP108, an Antimicrobial Polymer with Activity against Methicillin- and Mupirocin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(9).

Miranda-Cadena K, Vander Wauven C, Cornu B, Ye L, Crnelis P, Thomas CM, Ongena M. In vitro activities of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol against *Candida* biofilms. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2014, 143, 112218.

Moghrovyan A, Sahakyan N, Babayan A, Chichoyan N, Petrosyan M, Trchounian A. Essential Oil and Ethanol Extract of Oregano (*Origanum vulgare* L.) from Armenian Flora as a Natural Source of Terpenes, Flavonoids and other Phytochemicals with Antiradical, Antioxidant, Metal Chelating, Tyrosinase Inhibitory and Antibacterial Activity. *Current Pharmaceutical Design*, 2019, 25(16), 1809–1816.

Moser C, Pedersen HT, Lerche CJ, Koplén M, Line L, Thomsen K, Hoiby N, Jensen PO. Biofilms and host response - helpful or harmful. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 2017, 125(4), 320–338.

Naghavi M, Vollset SE, Ikuta KS, Swetschinski LR. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, 2024, 0(0).

Niu C, Wang C, Yang Y, Chen R, Zhang J... Carvacrol Induces *Candida albicans* Apoptosis Associated With Ca<sup>2+</sup>/Calcineurin Pathway. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10, 192.

Nostro A, Cellini L, Zimbalatti V, Blanco AR, Marino A, Pizzimenti F, Di Giulio M, Bisignano G. Enhanced activity of carvacrol against biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in an acidic environment. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 2012, 120(12), 967–973.



- Ouedrhiri W, Balouiri M, Bouhdid S, Moja S, Chahdi FQ, Taleb M, Greche H. Mixture design of *Origanum compactum*, *Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: Optimization of their antibacterial effect. *Industrial Crops and Products*, 2016, 89, 1–9.
- Pallin DJ, Ergan DJ, Pelletier AJ, Espinola JA, Hooper DC, Camargo CA. Increased US emergency department visits for skin and soft tissue infections, and changes in antibiotic choices, during the emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of Emergency Medicine*, 2008, 51(3), 291–298.
- Park KH, Jung M, Kim DY, Lee YM, Lee MS... Effects of subinhibitory concentrations of chlorhexidine and mupirocin on biofilm formation in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Hospital Infection*, 2020, 106(2), 295–302.
- Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57, 677–701.
- Pelvan E, Karaoğlu O, Onder Firat E, Betül Kaylon K, Ros E, Alsalvar C. Immunomodulatory effects of selected medicinal herbs and their essential oils: A comprehensive review. *Journal of Functional Foods*, 2022, 94, 105108.
- Peng Q, Tang X, Dong W, Zhi Z, Zhong T, Lin S, Ye J, Qian X, Chen F, Yuan W. Carvacrol inhibits bacterial polysaccharide intracellular adhesin synthesis and biofilm formation of mucoid *Staphylococcus aureus*: an in vitro and in vivo study. *RSC Advances*, 2023, 13(41), 28743–28752.
- Peng Q, Tang X, Dong W, Zhi Z, Zong T... Carvacrol inhibits bacterial polysaccharide intracellular adhesin synthesis and biofilm formation of mucoid *Staphylococcus aureus*: an in vitro and in vivo study. *RSC advances*, 2023, 13(41), 28743–28752.
- Phillips M. The sulfonation of para-cymene. *Journal of the American Chemical Society*, 1924, 46(3), 686–694.
- Poovelikunnel T, Gethin G, Humphreys H. Mupirocin resistance: clinical implications and potential alternatives for the eradication of MRSA. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, 70(10), 2681–2692.
- Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Flora Croatica baza podataka, 2015, <https://hirc.botanic.hr/fcd/>, pristupljeno 19.06.2024
- Rather MA, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2021, 52(4), 1701–1718.
- Ray GT, Suaya JA, Baxter R. Incidence, microbiology, and patient characteristics of skin and soft-tissue infections in a U.S. population: a retrospective population-based study. *BMC Infectious Diseases*, 2013, 13, 252.
- Rimoldi SG, Pileri P, Mazzocco MI, Romeri F... The Role of *Staphylococcus aureus* in Mastitis: A Multidisciplinary Working Group Experience. *Journal of Human Lactation: Official Journal of International Lactation Consultant Association*, 2020, 36(3), 503–509.
- Ritter JJ, Ginsburg D. The Action of t-Butyl Hypochlorite on  $\alpha$ -Pinene. *Journal of the American Chemical Society*, 1950, 72(6), 2381–2384.

Rrapi R, Chand S, Kroshinsky D. Cellulitis: A Review of Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *The Medical Clinics of North America*, 2021, 105(4), 723–735.

Rúa J, Del Valle P, De Arriga D, Fernández-Álvarez L, García-Armesto MR. Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2019, 16(9), 622–629.

Rubenick J, Rubim A, Bellé F, Rubert Nogueira-Librelotto D, Rolim C. Preparation of mupirocin-loaded polymeric nanocapsules using essential oil of rosemary. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 53.

Salah LA, Faergemann J. A retrospective analysis of skin bacterial colonisation, susceptibility and resistance in atopic dermatitis and impetigo patients. *Acta Dermato-Venereologica*, 2015, 95(5), 532–535.

Schroder J, Vollmer H. The excretion of thymol, carvacrol, eugenol and guaiacol and the distribution of these substances in the organism. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 1932, 168, 331–353.

Selvaraj A, Valliammai A, Muthuramalingam P, Priya A, Suba M, Ramesh M, Karutha Pandian S. Carvacrol Targets SarA and CrtM of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to Mitigate Biofilm Formation and Staphyloxanthin Synthesis: An In Vitro and In Vivo Approach. *ACS Omega*, 2020, 5(48), 31100–31114.

Shahkarami F, Rashki A, Rashki Ghalehnoo Z. Microbial Susceptibility and Plasmid Profiles of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Susceptible *S. aureus*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2014, 7(7), e16984.

Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martonell M... Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 2018, 32(9), 1675–1687.

Siddiqui AH, Koirala J. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2024.

Soltani S, Shakeri A, Iranshahi M, Boozari M. A Review of the Phytochemistry and Antimicrobial Properties of *Origanum vulgare* L. and Subspecies. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 2021, 20(2), 268–285.

Somensi N, Rabelo TK, Guimarães AG, Quintans LJ, de Souza Araújo AA, Moreira JC, Gelain DP. Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF-κB pathway. *International Immunopharmacology*, 2019, 75, 105743.

Sousa Silveira Z, Macêdo NS, Sampaio dos Santos JF, Sampaio de Freitas T... Evaluation of the Antibacterial Activity and Efflux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Molecules*, 2020, 25(9), 2103.

Spencer JP. Management of mastitis in breastfeeding women. *American Family Physician*, 2008, 78(6), 727–731.

Speranza B, Bevilacqua A, Campaniello D, Altieri C, Corbo MR, Sinigalia M. Minimal Inhibitory Concentrations of Thymol and Carvacrol: Toward a Unified Statistical Approach to Find Common Trends. *Microorganisms*, 2023, 11(7), 1774.

Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, 55(3), 304–318.

Tafish AM, El-Sherbiny M, Al-Karmalawy AA, Soliman OAEA, Saleh NM. Carvacrol-Loaded Phytosomes for Enhanced Wound Healing: Molecular Docking, Formulation, DoE-Aided Optimization, and in vitro/in vivo Evaluation. *International Journal of Nanomedicine*, 2023, 18, 5749.

Taleb, M.H. *i sur.* (2018) ‘Origanum vulgare L. Essential Oil as a Potential Anti-Acne Topical Nanoemulsion—In Vitro and In Vivo Study’, *Molecules*, 23(9), p. 2164. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules23092164>.

Tong SYC, Abdeltawab NF, Shamma RN, Abdelgayed SS, Mohamed SS, Farag MA, Ramadan MA. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 2018, 28(3), 603–661.

Troxell T, Hall CA. Carbuncle. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2024.

Tucaliuc A, Blaga AC, Galaction AI, Cascaval D. Mupirocin: applications and production. *Biotechnology Letters*, 2019, 41(4–5), 495–502.

Ultee A, Kets EPW, Smid EJ. Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(10), 4606–4610.

Ultee A, Kets EPW, Smid EJ. Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(10), 4606–4610.

Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 2015, 40(4), 277–283.

Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics*, 2020, 9(2), 59.

Visan AI, Negut I. Coatings Based on Essential Oils for Combating Antibiotic Resistance. *Antibiotics*, 2024, 13(7), 625.

Vrbková E, Šimová A, Vyskočilová E, Lhotka M, Červený L. Acid Treated Montmorillonite – Eco-Friendly Clay as Catalyst in Carvone Isomerization to Carvacrol. *Reactions*, 2021, 2(4), 486–498.

Winters RD, Mitchell M. Folliculitis. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2024.

World Health Organization, *WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation*, Geneva: World Health Organization, 2018, <https://iris.who.int/handle/10665/277359> pristupljeno 25.10.2024.

Wormser GP, Tang YW. Antibiotics in Laboratory Medicine, 5th Edition Edited by Victor Lorain Philadelphia: Lippincott Williams. *Clinical Infectious Diseases*, 2005. 41(4), 577.

Yadav GD, Kamble SB Synthesis of carvacrol by Friedel–Crafts alkylation of *o*-cresol with isopropanol using superacidic catalyst UDCaT-5. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2009, 84(10), 1499–1508.

Yamasaki O, Kaneko J, Morizane S, Akiyama H, Arata J... The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying panton-valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2005, 40(3), 381–385.

Zhang XL, Guo YS, Wang CH, Li GQ, Xu JJ... Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. *Food Chemistry*, 2014, 152, 300–306.

Zhu W, Clark N, Patel JB. pSK41-like plasmid is necessary for Inc18-like vanA plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus* in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(1), 212–219.

Zubairi MB, Abd AH, Al-lami MS. Formulation and Characterization of Mupirocin Nanomicelles in Insulin-Based Gel for Dermatological Application. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 2023, 15(2), S1178–S1181.

## 9. SAŽETAK

Zbog sve većeg razvoja antimikrobne rezistencije (AMR) intenzivno se istražuju različite alternative antibioticima ili potencijalne kombinacije s prirodnim tvarima koje bi smanjile korištenje antibiotika. Eterična ulja i njihove sastavnice pokazale su se u brojnim istraživanjima kao potentne aktivne tvari svojim antimikrobnim, ali i antioksidativnim i protuupalnim djelovanjem. Mupirocin je jedan od najčešće korištenih topikalnih antibiotika pogotovo za infekcije kože uzrokovane *S. aureusom*. Razvojem posebnih formulacija antibiotika zajedno s eteričnim uljima ili njihovim sastavnicama mogao bi se postići sinergistički učinak u vidu korištenja manjih koncentracija antibiotika i pojačanog antimikrobnog djelovanja takvih formulacija. Dok antibiotici ciljaju specifične bakterijske procese, eterična ulja narušavaju integritet bakterijskih stanica i utječu na smanjenje produkcije biofilma, čime se pojačava ukupni antimikrobni učinak. Kako bi se uopće započelo s razvojem takvih formulacija, potrebno je utvrditi učinkovitost djelovanja eteričnog ulja i njegovih sastavnica te kombinacija s antibiotikom. Stoga je cilj ovoga rada bio utvrditi antimikrobni potencijal eteričnog ulja origana (*O. compactum*) i njegove glavne sastavnice karvakrola pojedinačno i u kombinacijama s antibiotikom mupirocinom.

U radu su ispitivane MIC vrijednosti mupirocina (MUP), karvakrola (KAR) i eteričnog ulja origana (ET.U.) pojedinačno i u kombinacijama. MIC mupirocina za *S. aureus* sojeve kretao se u rasponu 0,076 – 0,141 µg/mL, dok su MIC-ovi karvakrola i eteričnog ulja origana bili nekoliko redova veći: karvakrol 525 – 700 µg/mL, eterično ulje origana 625 – 750 µg/mL. U ispitivanju kombinacija MUP i KAR/ET.U. na soju *S. aureus* NCTC 12493 dokazan je aditivni učinak dok je na *S. aureus* ATCC 2592 rezultat bio indiferentan. Prilikom ispitivanja inhibicije nastanka biofilma u pojedinačnim ispitivanjima dokazana je statistički značajna razlika u smanjenju produkcije biofilma u odnosu na pozitivnu kontrolu, ali nije zabilježena statistički značajna razlika u povećanju koncentracija pojedinih aktivnih tvari. Kombinacija MUP + KAR/ET.U. pokazala je statistički značajnu razliku u smanjenju produkcije biofilma u odnosu na identične koncentracije mupirocina. Najjači učinak imala je kombinacija koncentracija od 0,0625 µg/mL MUP + 150 µg/mL KAR i identična kombinacija od 0,0625 µg/mL MUP + 150 µg/mL ET.U. Ovime je dokazano da kombinacija manjih koncentracija mupirocina i eteričnog ulja origana, odnosno njegove glavne sastavnice karvakrola nije djelovala na značajno smanjenje MIC-a mupirocina, ali može potentno djelovati na smanjenju produkcije biofilma *S. aureus*.

## 9. SUMMARY

Due to the increasing development of antimicrobial resistance (AMR), various alternatives to antibiotics or potential combinations with natural substances that could reduce antibiotic use are being intensively researched. Essential oils and their components have demonstrated potent active properties in numerous studies, exhibiting not only antimicrobial effects but also antioxidant and anti-inflammatory activities. Mupirocin is one of the most commonly used topical antibiotics, especially for skin infections caused by *S. aureus*. The development of specific antibiotic formulations together with essential oils or their components could achieve a synergistic effect, allowing the use of lower antibiotic concentrations and enhancing the antimicrobial action of such formulations. While antibiotics target specific bacterial processes, essential oils disrupt bacterial cell integrity and reduce biofilm production, thereby enhancing the overall antimicrobial effect. To initiate the development of such formulations, it is necessary to establish the efficacy of essential oil and its components, as well as their combinations with antibiotics. Therefore, the aim of this study was to determine the antimicrobial potential of oregano essential oil (*O. compactum*) and its main component, carvacrol, both individually and in combination with the antibiotic mupirocin.

The study investigated the minimum inhibitory concentration (MIC) values for mupirocin (MUP), carvacrol (CAR), and oregano essential oil (EO) both individually and in combination. The MIC of mupirocin for *S. aureus* strains ranged from 0.076 to 0.141 µg/mL, whereas the MICs for carvacrol and oregano essential oil were several orders higher: carvacrol 525–700 µg/mL and oregano essential oil at 625–750 µg/mL. In tests of MUP and CAR/EO combinations on the *S. aureus* NCTC 12493 strain, an additive effect was observed, while the results for *S. aureus* ATCC 2592 were indifferent. When examining inhibition of biofilm formation in individual tests, a statistically significant reduction in biofilm production was noted compared to the positive control; however, increasing the concentrations of individual active substances did not produce a statistically significant difference. The combination of MUP + CAR/EO showed a statistically significant reduction in biofilm production compared to identical mupirocin concentrations. The strongest effect was seen with the combination of 0.0625 µg/mL MUP + 150 µg/mL CAR, and 0.0625 µg/mL MUP + 150 µg/mL EO. This demonstrated that while combining lower concentrations of mupirocin with oregano essential oil or its main component (carvacrol) did not significantly reduce mupirocin's MIC, it could effectively reduce *S. aureus* biofilm productio

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za mikrobiologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## Antimikrobni učinak karvakrola i eteričnog ulja origana (*O. compactum*) na bakteriju *Staphylococcus aureus*

Marko Brajak

### SAŽETAK

Zbog sve većeg razvoja antimikrobne rezistencije (AMR) intenzivno se istražuju različite alternative antibioticima ili potencijalne kombinacije s prirodnim tvarima koje bi smanjile korištenje antibiotika. Eterična ulja i njihove sastavnice pokazale su se u brojnim istraživanjima kao potentne aktivne tvari svojim antimikrobnim, ali i antioksidativnim i protuupalnim djelovanjem. Mupirocin je jedan od najčešće korištenih topikalnih antibiotika pogotovo za infekcije kože uzrokovane *S. aureusom*. Razvojem posebnih formulacija antibiotika zajedno s eteričnim uljima ili njihovim sastavnicama mogao bi se postići sinergistički učinak u vidu korištenja manjih koncentracija antibiotika i pojačanog antimikrobnog djelovanja takvih formulacija. Dok antibiotici ciljaju specifične bakterijske procese, eterična ulja narušavaju integritet bakterijskih stanica i utječu na smanjenje produkcije biofilma, čime se pojačava ukupni antimikrobni učinak. Kako bi se uopće započelo s razvojem takvih formulacija, potrebno je utvrditi učinkovitost djelovanja eteričnog ulja i njegovih sastavnica te kombinacija s antibiotikom. Stoga je cilj ovoga rada bio utvrditi antimikrobni potencijal eteričnog ulja origana (*O. compactum*) i njegove glavne sastavnice karvakrola pojedinačno i u kombinacijama s antibiotikom mupirocinom. U radu su ispitivane MIC vrijednosti mupirocina (MUP), karvakrola (KAR) i eteričnog ulja origana (ET.U.) pojedinačno i u kombinacijama. MIC mupirocina za *S. aureus* sojeve kretao se u rasponu 0,076 – 0,141 µg/mL, dok su MIC-ovi karvakrola i eteričnog ulja origana bili nekoliko redova veći: karvakrol 525 – 700 µg/mL, eterično ulje origana 625 – 750 µg/mL. U ispitivanju kombinacija MUP i KAR/ET.U. na soju *S. aureus* NCTC 12493 dokazan je aditivni učinak dok je na *S. aureus* ATCC 2592 rezultat bio indiferentan. Prilikom ispitivanja inhibicije nastanka biofilma u pojedinačnim ispitivanjima dokazana je statistički značajna razlika u smanjenju produkcije biofilma u odnosu na pozitivnu kontrolu, ali nije zabilježena statistički značajna razlika u povećanju koncentracija pojedinih aktivnih tvari. Kombinacija MUP + KAR/ET.U. pokazala je statistički značajnu razliku u smanjenju produkcije biofilma u odnosu na identične koncentracije mupirocina. Najjači učinak imala je kombinacija koncentracija od 0,0625 µg/mL MUP + 150 µg/mL KAR i identična kombinacija od 0,0625 µg/mL MUP + 150 µg/mL ET.U. Ovime je dokazano da kombinacija manjih koncentracija mupirocina i eteričnog ulja origana, odnosno njegove glavne sastavnice karvakrola nije djelovala na značajno smanjenje MIC-a mupirocina, ali može potentno djelovati na smanjenju produkcije biofilma *S. aureus*.

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

Rad sadrži: 49 stranica, 12 grafička prikaza, 5 tablica i 115 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Staphylococcus aureus*, mupirocin, karvakrol, eterično ulje origana, *Origanum compactum*, antimikrobni učinak, biofilm

Mentor: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Darija Stupin Polančec**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: studeni 2024.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### Antimicrobial effect of carvacrol and oregano essential oil (*O. compactum*) on the bacterium *Staphylococcus aureus*

Marko Brajak

#### SUMMARY

Due to the increasing development of antimicrobial resistance (AMR), various alternatives to antibiotics or potential combinations with natural substances that could reduce antibiotic use are being intensively researched. Essential oils and their components have demonstrated potent active properties in numerous studies, exhibiting not only antimicrobial effects but also antioxidant and anti-inflammatory activities. Mupirocin is one of the most commonly used topical antibiotics, especially for skin infections caused by *S. aureus*. The development of specific antibiotic formulations together with essential oils or their components could achieve a synergistic effect, allowing the use of lower antibiotic concentrations and enhancing the antimicrobial action of such formulations. While antibiotics target specific bacterial processes, essential oils disrupt bacterial cell integrity and reduce biofilm production, thereby enhancing the overall antimicrobial effect. To initiate the development of such formulations, it is necessary to establish the efficacy of essential oil and its components, as well as their combinations with antibiotics. Therefore, the aim of this study was to determine the antimicrobial potential of oregano essential oil (*O. compactum*) and its main component, carvacrol, both individually and in combination with the antibiotic mupirocin. The study investigated the minimum inhibitory concentration (MIC) values for mupirocin (MUP), carvacrol (CAR), and oregano essential oil (EO) both individually and in combination. The MIC of mupirocin for *S. aureus* strains ranged from 0.076 to 0.141 µg/mL, whereas the MICs for carvacrol and oregano essential oil were several orders higher: carvacrol 525–700 µg/mL and oregano essential oil at 625–750 µg/mL. In tests of MUP and CAR/EO combinations on the *S. aureus* NCTC 12493 strain, an additive effect was observed, while the results for *S. aureus* ATCC 2592 were indifferent. When examining inhibition of biofilm formation in individual tests, a statistically significant reduction in biofilm production was noted compared to the positive control; however, increasing the concentrations of individual active substances did not produce a statistically significant difference. The combination of MUP + CAR/EO showed a statistically significant reduction in biofilm production compared to identical mupirocin concentrations. The strongest effect was seen with the combination of 0.0625 µg/mL MUP + 150 µg/mL CAR, and 0.0625 µg/mL MUP + 150 µg/mL EO. This demonstrated that while combining lower concentrations of mupirocin with oregano essential oil or its main component (carvacrol) did not significantly reduce mupirocin's MIC, it could effectively reduce *S. aureus* biofilm production.

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

Thesis includes: 49 pages, 12 figures, 5 tables and 115 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, mupirocin, carvacrol, oregano essential oil, *Origanum compactum*, antimicrobial effect, biofilm

Mentor: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana-Marija Domijan, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Dr. sc. Darija Stupin Polančec, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2024.