

Utjecaj eteričnog ulja biljnih vrsta *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i *Calamintha officinalis* na proteolitičku aktivnost i pokretljivost bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Kerner, Nives

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:931084>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



Repository / Repozitorij:

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



Nives Kerner

Utjecaj eteričnog ulja biljnih vrsta *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i *Calamintha officinalis* na proteolitičku aktivnost i pokretljivost bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021. godina

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

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček koja je u iznimno teškoj situaciji uspjela naći vremena i strpljenja kako bi mi omogućila izradu ovog diplomskog rada. Hvala na uloženom trudu i prenesenom znanju.
Zahvaljujem svojim roditeljima na svojoj podršci i savjetima kojima su me pratili tokom studija.*

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.1. Virulencija bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.2. Enzimi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.1.3. Proteolitička aktivnost <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.2. Antibiotici	3
1.2.1. Bakterijska rezistencija na antibiotike	4
1.2.2. Tobramicin	6
1.3. Bakterijska međustanična komunikacija (engl. <i>quorum sensing</i>)	7
1.4. Pokretljivost <i>P. aeruginosa</i> u polukrutom mediju	9
1.5. Eterična ulja	10
1.5.1. Terpeni	10
1.5.2. Mehanizam djelovanja eteričnih ulja	10
1.5.3. Međudjelovanje eteričnog ulja i antibiotika	11
1.5.4. Eterično ulje biljne vrste <i>Calamintha officinalis</i>	12
1.5.5. Eterično ulje biljne vrste <i>Micromeria thymifolia</i> (Scop.) Fritsch	12
1.5.6. Pulegon	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Bakterije	15
3.1.2. Eterično ulje	15
3.1.3. Antibiotici	15
3.1.4. Hranjivi medij	15

3.1.5. Standardne kemikalije i otopine.....	15
3.1.6. Filteri za sterilizaciju.....	16
3.2. Metode	16
3.2.1. Priprava otopina eteričnog ulja <i>Micromeria thymifolia</i> (Scop.) Fritsch i <i>Calamintha officinalis</i>	16
3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije tobramicina.....	16
3.2.1. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
3.2.2. Ispitivanje pokretljivosti u obliku rojenja <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	18
4.1. REZULTATI.....	18
4.1.1. Minimalna inhibitorna koncentracija	18
4.1.2. Proteolitička aktivnost različitih sojeva <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
4.1.3. Rojenje <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
4.2. RASPRAVA.....	31
5. ZAKLJUČCI.....	36
6. LITERATURA.....	37
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	41
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA /BASIC DOCUMENTATION CARD.....	44

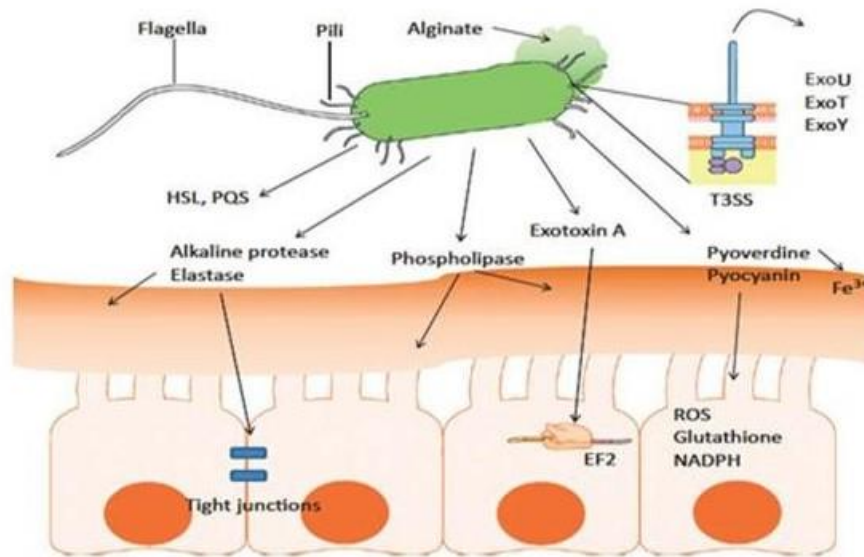
1. UVOD

1.1. Bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Iako se za ovu bakteriju znalo i u 19. stoljeću pod imenom *Bacillus pyocyaneus* ili *Pseudomonas polycolor*, na važnosti je kao oportunistički patogen dobila tek u drugoj polovici 20. stoljeća, osobito kod hospitaliziranih pacijenata. Ova gram negativna bakterija odgovorna je za infekcije pluća, kože, očiju, rana, koštane srži i urinarnog trakta. Jedan je od najčešćih uzročnika bolničkih infekcija kao što su upala pluća povezana s mehaničkom respiracijom i upale mokraćnog mjehura povezane s kateterom. Glavni je patogen kod imunokompromitiranih pacijenata koji boluju od cistične fibroze, ili kod onih s opeklinama, otvorenim prijelomima i implantatima. Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* je ubikvitarna, a prija joj vlažni okoliš stoga se najčešće nalazi u slivnicima, posudama za mokraću i antiseptičkim otopinama u bolnicama. Ponekad se može naći na normalnoj koži aksile i anogenitalnog područja kod zdravih osoba. Mogućnost koloniziranja raznih površina proizlazi iz sposobnosti sinteze velikog broja strukturnih virulentnih faktora kao što su alginati, pili i lipopolisaharidi te sekrecijskih virulentnih faktora, poput toksina, proteaza i hemolizina. Prilikom rasta na površini *P. aeruginosa* formira biofilm koji se definira kao strukturirana zajednica bakterijskih stanica koje, zatvorene u polimerni matriks sastavljen od egzopolisaharida, proteina, nukleinskih kiselina i lipida, prijanjaju na organske ili anorganske površine i međupovršine (Campa i sur., 1993).

1.1.1. Virulencija bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Klinički značaj *P. aeruginosa* proizlazi iz činjenice da je bakterija sposobna eksprimirati mnoštvo čimbenika virulencije koji uzrokuju štetu u tkivu domaćina. Koristi flagele i pile tipa IV za adheziju na površinu tkiva, ali i za pokretljivost u vidu puzanja ili rojenja (engl. *swarming*; u daljnjem tekstu rojenje) i trzanja (engl. *twitching*). Luči višestruke egzoenzime (elastaza, alkalna proteaza i fosfataza te lipaza) i egzotoksin (egzotoksin A) koji uzrokuju degradaciju tkiva te proteine koji onemogućuju obrambeni mehanizam domaćina. Također, izlučuje sekundarne metabolite poput vodikovog cijanida te se pomoću pigmenta piocijanina upliće u domaćinov odgovor na oksidativni stres. Zahvaljujući sideroforima pioverdinu i piokelinu sposoban je krasti esencijalne nutrijente poput željeza iz transferina i laktoferina domaćina. Jedna od najvećih obrana protiv antibiotika i imunosnog sustava je tvorba biofilma (Rocha i sur., 2019). Navedeni mehanizmi virulencije su prikazani na slici 1.



Slika 1. Mehanizmi virulencije *P. aeruginosa* (preuzeto iz Panga i sur., 2019).

1.1.2. Enzimi *Pseudomonas aeruginosa*

Izvanstanični enzimi su veoma važni čimbenici virulencije. Odgovorni su za preživljavanje u nepovoljnim uvjetima te imaju utjecaj na fizičko-kemijska svojstva izvanstaničnih polimernih supstanci (engl. *extracellular polymeric substance*, EPS) tijekom formiranja biofilma. Pogotovo su bitni lipolitički te proteolitički enzimi, od kojih *P. aeruginosa* proizvodi dvije lipaze (C8 i C14) koje su uključene u patogenezu cistične fibroze. Alkalna fosfataza je enzim pronađen u membranskim vezikulama koje se otpuštaju u okoliš bakterije. Iako nije direktno povezana s patogeneзом smatra se važnim markerom bakterije *P. aeruginosa* i ostalih gram negativnih bakterija (Koziróg i sur., 2018). Elastaza, proteinski autotransporter vezan s vanjske strane membrane bakterije *P. aeruginosa*, ima ulogu u proizvodnji ramnolipida, koji su važni za pokretljivost bakterije u obliku rojenja (Wilhelm i sur., 2007).

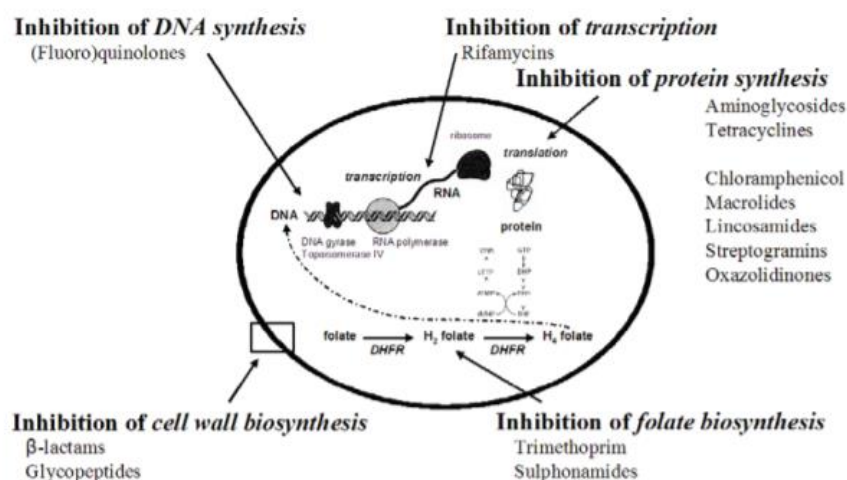
1.1.3. Proteolitička aktivnost *Pseudomonas aeruginosa*

Prilikom bolničkog liječenja, najveća opasnost za pacijente kojima je neophodna mehanička ventilacija kao pomoć kod disanja je infekcija bakterijom *Pseudomonas aeruginosa*. Komplikacije nakon infekcije dovode do dužeg vremenskog perioda provedenog u bolnici, što otvara mogućnost za razvoj daljnjih infekcija te povećava trošak liječenja. Prilikom liječenja takvih infekcija, osim antibiotske rezistencije veliki je problem i mehanizam obrane bakterije od imunskog sustava domaćina. Kod upale pluća uzrokovanom *P. aeruginosa* obrana bakterije je većim dijelom posredovana proteolitičkom aktivnošću gdje glavnu ulogu ima proteaza IV. Pokazalo se kako je interleukin-22 (IL-22) ključan faktor u prvoj liniji obrane protiv patogena. On je glavni medijator urođene imunosti mukoznih stanica u epitelu pluća te regulira imunosti

odgovor organizma i održavanje zdrave mukoze pluća koja čini barijeru zaštite od raznih alergena i patogena. Proteaza IV je faktor virulencije jer bakterija pomoću nje razgrađuje domaćinove proteine i omogućuje kolonizaciju tkiva. Pri tome osobito važnu ulogu ima razgradnja IL-22, što rezultira sprječavanjem imunskog odgovora domaćina i neometanim razmnožavanjem bakterije (Bradshaw i sur., 2018). Osim bolničke upale pluća, *P. aeruginosa* je i vodeći uzročnik keratitisa uzrokovanim nošenjem kontaktnih leća koji kao posljedicu može imati gubitak vida. Osim proteaze IV koja također sudjeluje u nastajanju i širenju infekcije, bitan enzim *P. aeruginosa* je i mala proteaza (engl. *P. aeruginosa* small protease, PASP). PASP je posebna serinska proteaza koja ima klasičnu katalitičku trijadu Asp-His-Ser. Osim što kida strukturne proteine rožnice poput kolagena tipa I i IV te razne druge proteine koji se nalaze u očnom filmu, razgrađuje i obrambene molekule domaćina, poput C3 komponente komplemanta ili IL-37. Na taj način se bori protiv imunskog odgovora domaćina i otežava liječenje infekcije (Tang i sur., 2018).

1.2. Antibiotici

Prema tipu djelovanja, antibiotici se dijele na bakteriostatike koji ne ubijaju, nego učinkovito sprječavaju razmnožavanje mikroorganizama te na baktericide koji imaju mogućnost smanjenja broja mikroorganizama. Minimalna inhibitorna koncentracija (engl. *minimal inhibitory concentration*, MIC) te minimalna baktericidna koncentracija (engl. *minimal bactericidal concentration*, MBC) su mjerne jedinice učinkovitosti antibiotika, a govore kolika je najniža koncentracija antibiotika potrebna da bi se postiglo sprječavanje rasta ili smanjenje broja mikroorganizama. Osnovna podjela antibiotika u skupine je prema mehanizmu djelovanja kao što je prikazano na slici 2.



Slika 2. Mete djelovanja različitih skupina antibiotika (preuzeto iz Bockstae i Aerschot, 2009).

Razlikujemo djelovanje na staničnu stijenku ili staničnu membranu kao na stanične strukture te ometanje sinteze proteina, sinteze DNA ili RNA i metabolizma folne kiseline kao učinak na stanične procese (Bockstae i Aerschot, 2009). U tablici 1. su navedene mete djelovanja prema skupinama uz primjere antibiotika.

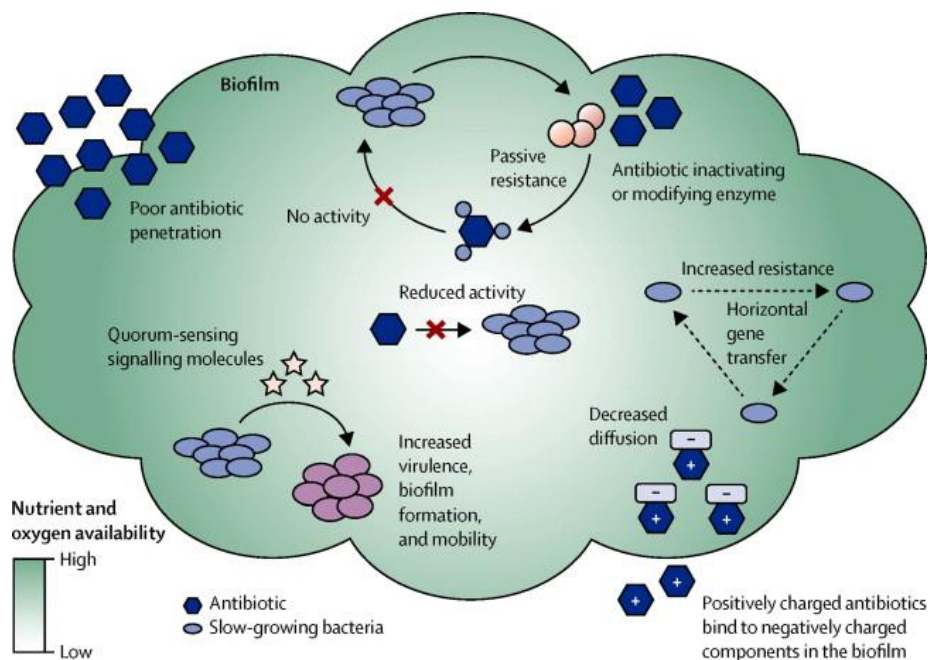
Tablica 1. Mete djelovanja antibiotika prema skupinama, preuzeto i prilagođeno iz (Bockstae i Aerschot, 2009).

META DJELOVANJA	SKUPINA ANTIBIOTIKA	PRIMJER ANTIBIOTIKA
Biosinteza stanične stijenke	Beta-laktami	Penicilin, ampicilin
	Glikopeptidi	Vankomicin, teikoplanin
Stanična membrana	Kationski peptidi	Kolistin
	Polimiksini	Polimiksin B
	Lipopeptidi	Daptomicin
Biosinteza bakterijskih proteina: 30S podjedinica ribosoma	Aminoglikozidi	Tobramicin
	Tetraciklini	Doksiciklin
Biosinteza bakterijskih proteina: 50S podjedinica ribosoma	Makrolidi	Eritromicin, klaritromicin
	Fenilni propanoidi	Kloramfenikol
	Ketolidi	Azitromicin, telitromicin
	Linkozamidi	Klindamicin
	Oksazolidinoni	Linezolid
Biosinteza DNA	Florokinoloni	Ciprofloksacin
Biosinteza RNA	Rifamicini	Rifampicin

1.2.1. Bakterijska rezistencija na antibiotike

Jedna od najvećih globalnih prijetnji javnom zdravstvu je bakterijska rezistencija na antibiotike. Dodatno se problem odražava kroz porast kompleksnosti, rizika i cijene vezanih za istraživanje novih antibakterijskih lijekova što potiče velike farmaceutske kompanije da se okrenu istraživanju lijekova za akutne bolesti, stoga je napredak u razvoju novih antibiotika ograničen. Dodatni problem čine ESKAPE patogeni koji imaju rezistenciju na višestruke lijekove. Akronim ESKAPE obuhvaća prva slova imena bakterija *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter species*. Mikroorganizam se smatra otpornim na određeni antibiotik

u slučaju kada je minimalna inhibitorna koncentracija viša od najviše koju je moguće postići u tkivu ili serumu, bez pojave toksičnih učinaka za domaćina (Bockstae i Aerschot, 2009). Visoka rezistencija na antibiotike proizlazi iz intrinzičnih, stečenih i razvijenih mehanizama obrane. Mehanizmi antibiotičke rezistencije *P.aeruginosa* su prikazani na slici 3. Intrinzična rezistencija se očituje kao slaba permeabilnost vanjske membrane uz postojanje barem 12 efluksnih pumpi koje su sposobne izbaciti antibiotike poput cefalosporina, karbapenema, florokinolona i aminoglikozida. Rezistenciju na cefalosporine i peniciline bakteriji omogućuju različite beta-laktamaze. Stečena rezistencija se osigurava horizontalnim prijenosom gena za rezistenciju s jedne bakterije na drugu. Ona se javlja kao specifična evolucijska prilagodba bakterija. Također može biti i posljedica mutacije, poput one u DNA-girazi, što rezultira smanjenim afinitetom za flouorokinolone. Razvijena rezistencija se u *P. aeruginosa* javlja kao odgovor na razne podražaje, kao što su subinhibitorna koncentracija antibiotika, nedostatak nutrijenata, promjena pH i temperature. Očituje se u obliku ekspresije gena koji pojačavaju aktivnosti efluksne pumpe ili sudjeluju u stvaranju biofilma (Rocha i sur., 2019).



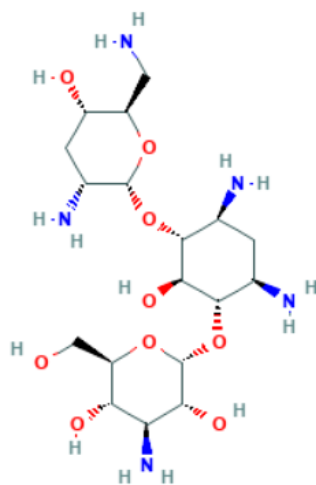
Slika 3. Mehanizmi antibiotičke rezistencije *P. aeruginosa* (preuzeto iz Sherrard i sur., 2014).

Preporučene smjernice za liječenje višestruko rezistentnih sojeva uključuju prvenstveno beta-laktame. Od skupine karbapenema se kao antibiotik s najmanjom minimalnom inhibitornom koncentracijom preporučuje doripenem, a zatim meropenem te imipenem. Od cefalosporina se koriste ceftazidim, cefoperazon (treća generacija) i cefepim. Odobrene su kombinacije beta-laktama i inhibitora beta-laktamaza poput ceftazidim-avibaktama, ceftolozan-tazobaktama i

imipenem-relebaktama. Beta-laktami se također mogu kombinirati i s drugim skupinama antibiotika. Od aminoglikozida se uključuju tobramicin i gentamicin, od fluorokinolona ciprofloksacin i levofloksacin, a od polimiksina kolistin (Ibrahim i sur., 2020, O'Donnell i sur., 2020).

1.2.2. Tobramicin

Tobramicin je antibiotik koji spada u skupinu aminoglikozida širokog spektra, a proizvodi ga bakterija *Streptomyces tenebrarius*. Učinkovit je naspram gram negativnih bakterija, osobito bakterija vrste *Pseudomonas*. Spada u skupinu malih molekula, organski je spoj kemijske formule $C_{18}H_{37}N_5O_9$. Kemijska struktura tobramicina je prikazana na slici 4.



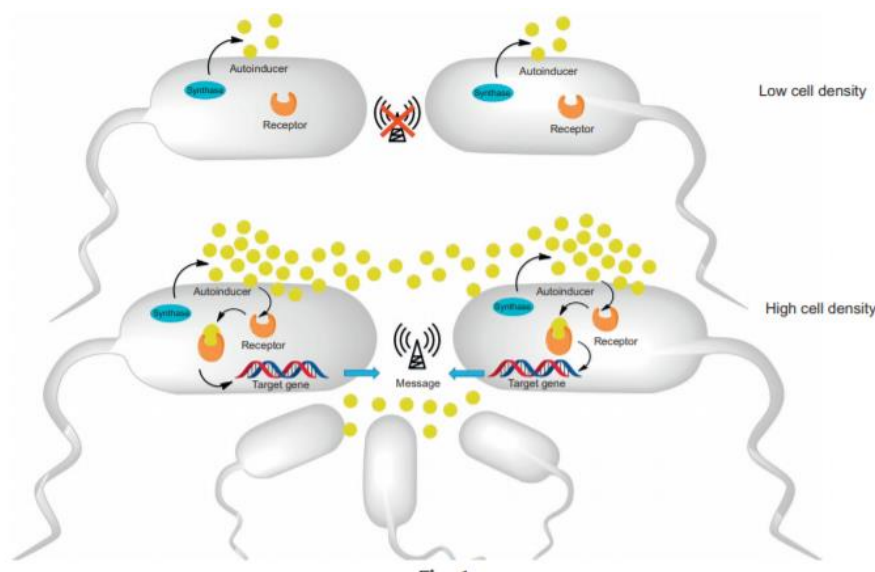
Slika 4. Kemijska struktura tobramicina (Preuzeto sa www.pubmed.com).

Kao i ostali aminoglikozidi, pozitivno je nabijen spoj, dobro topljiv u vodi i relativno topljiv u mastima, stoga je za postizanje dovoljne unutarstanične koncentracije tobramicina potreban aktivan transport lijeka u stanicu. Mehanizam djelovanja je primarno usmjeren na ometanje sinteze proteina što uzrokuje promjene u permeabilnosti membrane, progresivne smetnje u propusnosti i u konačnici staničnu smrt. Vodikovim se vezama ireverzibilno veže na 16S rRNA na 30S podjedinici ribosoma, što ometa pravilno sparivanje kodona i antikodona, a to rezultira stvaranjem neispravnih proteina. Zbog genetičke varijabilnosti pacijenata, odnosno njihovog odgovora na terapiju i drugačijih izvedbi nebulizatora, biološka dostupnost tobramicina se može razlikovati, a poluvrijeme eliminacije nakon intravenske primjene je dva sata. Rezistencija na tobramicin se može postići putem više mehanizama. Najčešća je inaktivacija ključne hidroksilne skupine kovalentnom modifikacijom uz pomoć enzima aminoglikozid acetil-transferaze aminoglikozid fosfotransferaze ili aminoglikozid adenil-transferaze. Neke bakterije posjeduju gene koji kodiraju specifične rRNA metil-transferaze koje

posttranskripcijski metiliraju 16S rRNA. Metilacija mijenja vezno mjesto i smanjuje afinitet vezanja aminoglikozida. Primjer takve bakterije je *P. aeruginosa* soj BB1285 (*rmtD*⁺). Treći mehanizam rezistencije je smanjenje unosa antibiotika u bakterijsku stanicu, a povećanje aktivnosti efluksnih pumpi (Bockstae i Aerschot, 2009).

1.3. Bakterijska međustanična komunikacija (engl. *quorum sensing*)

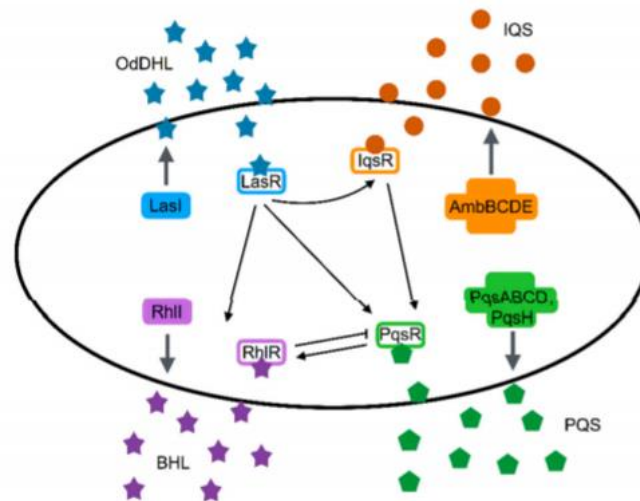
Bakterijska međustanična komunikacija (engl. *quorum sensing*, QS) je mehanizam komunikacije između bakterija koja se temelji na proizvodnji i detekciji specifičnih signalnih molekula nazvanih autoinduktorima (AI). Transkripcija mnogobrojnih gena koji pomažu bakterijskoj populaciji da se ponaša kolektivno započinje kada se postigne određeni prag (engl. *quorum*) signalnih molekula, pa ekspresija većine faktora virulencije nije konstitutivna nego je regulirana gustoćom bakterijskih stanica (slika 5). Osim stvaranja i izlučivanja faktora virulencije, međustaničnom komunikacijom su kontrolirane razne bakterijske aktivnosti poput mogućnosti plivanja i rojenja, stvaranja biofilma, sekundarnih metabolita, korištenja hemoglobina kao izvora željeza te antibiotičke rezistencije.



Slika 5. Prikaz ovisnosti proizvodnje autoinduktora o gustoći bakterijskih stanica (preuzeto iz Tommonaro, 2020).

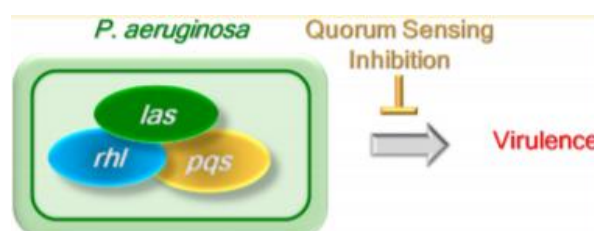
Kod bakterije *P. aeruginosa* su opisana četiri QS sustava, Las, Rhl, Pqs te IQS. Oni su međusobno povezani na način da je svaki sustav autoregulatoran, ali također i modulira aktivnost ostalih sustava. Las sustav je vrhu kaskade hijerarhijske mreže signalizacije pa regulira i sustave Rhl i Pqs. Geni sustava Rhl i Pqs kodiraju receptore za signalne molekule međustanične komunikacije (*rhlR* i *pqsR*) i gene za sintazu autoinduktora (*lasI*, *rhlI* i *pqsH*).

Autoinduktori sustava Las i Rhl su signalne molekule N-acil-homoserin laktoni (AHL), konkretno N-(3-okso-C12-homoserin lakton (HSL) i N-butilil-homoserin lakton (BHL). Treći QS sustav, Pqs, koristi 2-alkil-4-kinolone kao signalne molekule. To su 3,2-heptil-4-hidroksikinolin (HHQ), ili 4,2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon (PQS). Zadnje otkriveni sustav IQS kao signalnu molekulu koristi 2-(2-hidrooksifenil)-tiazol-4-karbaldehide (IQS). On se i dalje istražuje, ali je poznato da ga aktivira nedostatak fosfata i željeza u okolini bakterije (Scoffone i sur., 2019). Sistemi te njihove signalne molekule su prikazani na slici 6. Za svaki sustav vrijedi da odgovarajuća signalna molekula aktivira transkripcijske faktore (LasR, RhlR i PqsR) čime se pokreće ekspresija gena te postavlja autoinduktorska petlja koja je odgovorna za proizvodnju još signalnih molekula te uzvodnu regulaciju raznih gena povezanih s virulencijom, sekundarnim metabolizmom i stvaranjem biofilma (Soukarieh i sur., 2017).



Slika 6. Prikaz QS mehanizma i njihovih signalnih molekula (preuzeto iz Scoffone i sur., 2019).

Las signalni put osigurava aktivaciju gena koji kodiraju sintezu LasA proteaze, LasB elastaze te alkalne fosfataze. Geni koji kodiraju sintezu LasB elastaza, ramnolipida, piocijanina i vodikovog cijanida se aktiviraju putem Rhl sustava, a oni za piocijanin, vodikov cijanid te lecitin preko Pqs sustava (Lee i Zhang, 2014). Slika 7. prikazuje kako se inhibicijom QS sustava može utjecati na virulentnost bakterije *P. aeruginosa*.



Slika 7. Shematski prikaz utjecaja bakterijske međustanične komunikacije na virulenciju bakterije (preuzeto iz Soukarieh i sur., 2017).

1.4. Pokretljivost *P. aeruginosa* u polukrutom mediju

Kako bi mogao kolonizirati različite okoliše *P. aeruginosa* ima više tipova pokretljivosti. U tekućem mediju pliva (engl. *swimming*), na krutoj podlozi koristi oblik kretanja poput trzanja (engl. *twitching*), a u polukrutom mediju se kreće rojenjem ili puzanjem (engl. *swarming*). Rojenje ovisi o gustoći bakterijskih stanica, mediju u kojem bakterija raste i površinskim uvjetima vlažnosti. Stanice koje se kreću rojenjem, prolaze kroz niz fizičkih promjena, ali i značajnih promjena u metabolizmu i ekspresiji gena što ukazuje da je rojenje više kompleksna prilagodba na životne uvjete, nego jednostavno način kretanja (Overhage i sur., 2008). Kako bi taj način kretanja bio moguć, bakterija mora imati funkcionalne flagele tipa IV i proizvoditi ramnolipide. Flagele koristi na način da njihova rotacija služi kao propeler koji pokreće bakterijsku stanicu, a ramnolipidi služe kao površinski aktivne tvari koji moće površinu te smanjuju površinsku napetost. Rezultat svega su brzi pokreti na površini. Ramnolipidi su glikolipidi sastavljeni od L-ramnoze i 3-hidroksilaktonske kiseline. U njima varira duljina lanca hidroksi masne kiseline na koju su spojene jedna ili dvije molekule ramnoze. S obzirom da sadrže hidrofobni lipidni dio te hidrofilni šećerni dio, to su amfipatske molekule zbog čega imaju mogućnost smanjivanja površinske napetosti i stvaranja emulzija. Upravo zbog amfifilnosti ramnolipida koja omogućuje pseudosolubilizaciju netopljivih spojeva, *P. aeruginosa* uspijeva iskorištavati razne izvore ugljika, poput alkana i alkena. Ramnolipidi mogu mijenjati i raspored lipopolisaharida na površini stanica što rezultira povećanim prijanjanjem bakterije, što ih čini bitnim faktorima virulencije (Caiazza i sur., 2005). Tvorbu ramnolipida kontrolira QS. Pokretač je Las sistem, koji se sastoji od transkripcijskog faktora LasR i LasI sintetaze, koja proizvodi autoinduktor HSL. Aktivacija Rhl sistema ide preko LasR i sastoji se od transkripcijskog faktora RhlR i RhlI sintetaze, koja proizvodi BHL. RhlR regulira transkripciju rhlAB operona, koji potiče aktivnost enzima RhlA, RhlB i RhlC, čiji su krajnji produkti ramnolipidi (Robitaille i sur., 2020). Za početak sinteze lipidnog dijela ramnolipida je odgovorna NADPH ovisna β -ketoacil-reduktaza RhlG. Zatim taj lipidni dio uz acil-transferazu RhlA postaje prekursor ramnolipida ((3-(3-hidroksialkanoiloksi) alkanoična kiselina, HAA). Zadnji korak sinteze se odvija pomoću enzima RhlB i RhlC koji dodaju L-ramnozu na HAA zahvaljujući ramnozil-transferaznoj aktivnosti te su konačni produkti mono- ili diramnolipidi. Različiti sojevi *P. aeruginosa* pokazuju različite obrasce puzanja pa se tako soj PAO1 povezuje s kružnim načinom kretanja, dok je soj PA14 povezan s kretanjem koje se opisuje kao izgled cvijeta te ima karakteristične vitice koje se šire od središta kolonije (Caiazza i sur., 2005).

1.5. Eterična ulja

Eterična ulja su prirodni, lako hlapljivi spojevi podrijetlom iz biljaka, a još se nazivaju i sekundarnim metabolitima biljke. Imaju lipofilna svojstva stoga su topljiva u mastima, alkoholima, organskim otapalima te drugim hidrofobnim tvarima, a teško topljiva u vodi. Na sobnoj temperaturi su u tekućem stanju i vrlo često karakterizirana snažnim mirisom. U biljci su pohranjena u specijaliziranim stanicama, najčešće uljnim stanicama, kanalićima ili žljezdanim dlakama. Mogu se nalaziti u korijenu, podanku, kori, listu, plodu ili sjemenkama biljke, a dobivaju se postupcima destilacije, ekstrakcije i tiještenja. Eterična ulja čine 1% ukupne mase biljke. Prisutnost, sastav i udio eteričnog ulja u biljci ovisi o klimatskim uvjetima te tlu na kojem biljka raste. Kemijski sastav eteričnih ulja je veoma kompleksan jer su ulja smjesa velikog broja spojeva različite kemijske strukture od kojih su najzastupljeniji terpeni, a među ostalim spojevima su fenilpropani, spojevi s dušikom i sumporom itd. (Thormar, 2011).

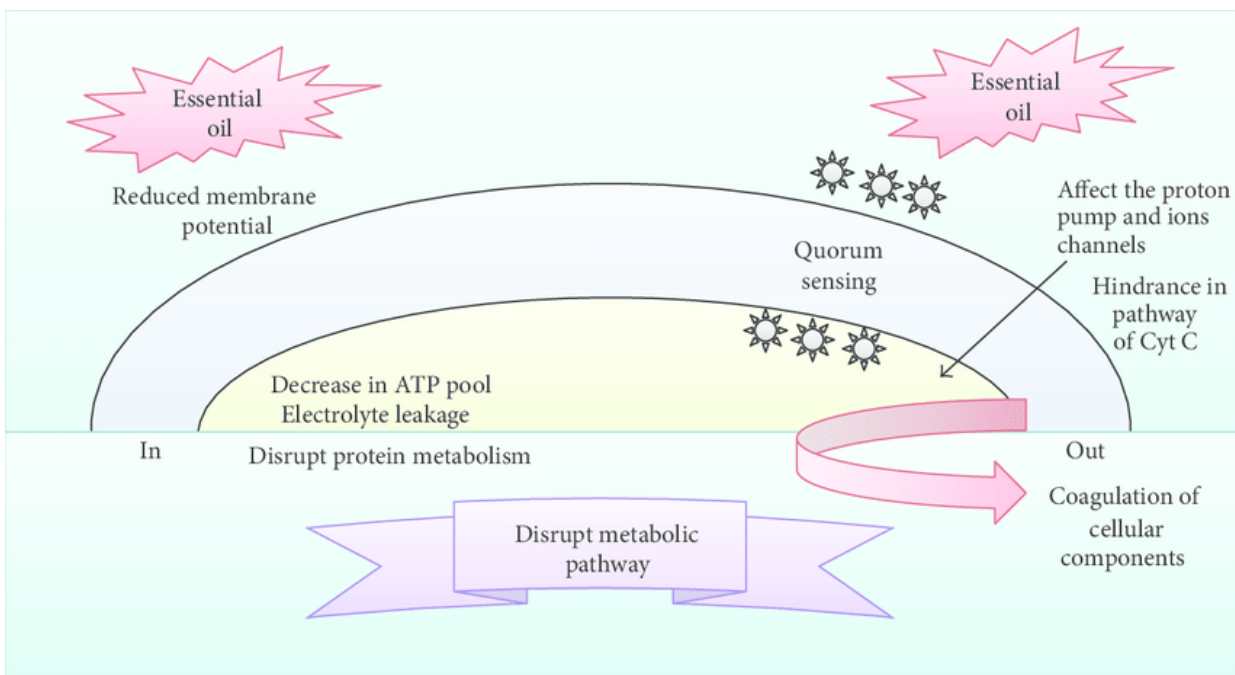
1.5.1. Terpeni

Terpeni, drugim imenom izopreni ili terpenoidi, polimeri su izoprenskih jedinica (C_5H_8) čiji se redoslijed "glava-rep" vrlo dosljedno ponavlja u većini terpena, pa se može upotrijebiti kao osnova za određivanje strukture. To je poznato pod nazivom izoprensko pravilo. Postoje dva osnovna puta biosinteze terpena, put mevalonske kiseline (izopentenil difosfatni put) i metil-eritritol fosfatni put. Hemiterpeni su sastavljeni od jedne izoprenske jedinice, povezivanjem dvije izoprenske jedinice nastaju monoterpene ($C_{10}H_{16}$), seskviterpeni sadrže tri ($C_{15}H_{24}$), a diterpeni četiri izoprenske jedinice ($C_{20}H_{32}$). U eteričnim uljima su najzastupljeniji monoterpene i seskviterpeni (Thormar, 2011).

1.5.2. Mehanizam djelovanja eteričnih ulja na bakterijsku stanicu

Predloženi su mnogobrojni mehanizmi djelovanja eteričnih ulja na bakterijske patogene. Primarno dovode do destabilizacije stanične strukture te uzrokuju slabljenje integriteta membrane i povećanu permeabilnost što ometa mnogobrojne stanične aktivnosti, uključujući i proizvodnju energije, membranski transport te ostale metaboličke funkcije. Eterična ulja također djeluju i na citoplazmu bakterije te mogu uzrokovati koagulaciju unutarstaničnih komponenata u citoplazmi te kidanje veza između lipidnog i proteinskog sloja. Zbog lipofilnih svojstava imaju mogućnost prolaska kroz bakterijske membrane što može poremetiti raspored masnih kiselina, fosfolipidnog dvosloja i polisaharida u membrani. Povećanjem permeabilnosti membrana uzrokuju gubitak iona i curenje staničnih komponenata van stanice. Zbog toga što smanjuju membranski potencijal mogu poremetiti protonsku pumpu i uzrokovati nedostatak

ATP-a. Ovakva promjena u stanici može uzrokovati kaskadu reakcija, koje se odražavaju i preko ostalih organela. Još jedno od svojstava eteričnih ulja je inhibicija sekrecije toksina iz bakterije. Moguća je i inhibicija sinteze flagelina, što bakteriji onemogućava kretanje. Vrlo važan mehanizam je mogućnost inhibicije QS-a (Swamy i sur., 2016). Mehanizmi djelovanja eteričnih ulja na bakterijsku stanicu su prikazani na slici 8. Faktori virulencije poput elastaze, proteaze, proizvodnja pigmenta piocijanina, pokretljivost i stvaranje biofilma su kod bakterije *P. aeruginosa* pod utjecajem QS-a posredovanog acil-homoserin laktonima. Očekivano je da će se inhibicijom bakterijske međustanične komunikacije dovesti do promjene virulencije i posljedično eradikacije patogena (Husain i sur., 2013). Jedna od vrlo povoljnih odlika eteričnih ulja je raznovrsnost mehanizma djelovanja što otežava stvaranje bakterijske rezistencije. Iako su to kompleksne smjese različitih kemijskih spojeva, mjerilo za aktivnost eteričnog ulja je uglavnom postotak glavne terpenске ili terpenoidne sastavnice. Mehanizam djelovanja eteričnih ulja još nije u potpunosti objašnjen i moguće je da eterično ulje kao cjelina djeluje potentnije nego njegova čista djelatna tvar u istoj koncentraciji zbog sinergističkog djelovanja svih ostalih komponenata ulja (El-Hosseiny i sur., 2014).



Slika 8. Mehanizam djelovanja eteričnih ulja na bakterijsku stanicu (preuzeto iz Swamy i sur., 2016).

1.5.3. Međudjelovanje eteričnog ulja i antibiotika

Kada se promatra dvojna terapija, mogući ishodi djelovanja su aditivnost, sinergizam, antagonizam ili poništavanje učinka. Aditivni učinak bi bio onaj koji djeluje jednako jako kao

dva učinka zbrojena zajedno, a sinergistički znači da jedna sastavnica potencira djelovanje druge. Antagonističko djelovanje upućuje na to da jedna sastavnica smanjuje učinak druge jer je zajedničko djelovanje slabije nego djelovanje svake komponente zasebno. Eterična ulja bi mogla biti od velike pomoći u borbi protiv sojeva otpornih na antibiotike ako se pokaže sinergističko djelovanje eteričnog ulja i antibiotika. Time se omogućuje smanjenje doze antibiotika što je veoma bitno zbog njihovih mogućih nuspojava te kako bi se smanjilo izlaganje bakterija antibioticima u sve većim dozama i posljedično time jačanje njihove rezistencije (Soo Xi Yap i sur., 2014).

1.5.4. Eterično ulje biljne vrste *Calamintha officinalis*

Calamintha je aromatična biljka koja pripada porodici *Lamiaceae*, većinom rasprostranjena na području Mediterana. Biljke ove vrste su srednje do velike uspravne zeljaste trajnice s ponekad drvenom bazom, široko jajastih, tupih ili nazubljenih listova, a razlikuje se osam različitih podvrsta biljke *Calamintha* prema kemotaksonomskim markerima. Zbog svog ugodnog mirisa koji podsjeća na mentol koriste se u kulinarstvu, ali i u tradicionalnoj medicini kao stimulans, digestiv, tonik i antiseptik. Djeluju kao antispazmodik, emenagog, diaforetik, diuretik, karminativ i ekspektorans, te imaju djelovanje na jačanje središnjeg živčanog sustava. Čaj biljke *Calamintha officinalis* se prilikom unutarnje primjene koristi za probavne smetnje poput nadutosti i kolika, a kod vanjske primjene služi kao oblog za modrice te probleme sa grloboljom. Također je dokazano i antimikrobno djelovanje eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis* koje se primjenjuje prilikom očuvanja sirove i procesuirane hrane i fitoterapije. Razliku između podvrsta biljaka *Calamintha* čini kemijski sastav monoterpena, ali tri najzastupljenija u svima su C3 oksigenirani p-mentani poput pulegona, mentona, piperitona i piperiton oksida te C6 oksigenirani mentani, na primjer karvon. Na kemijski sastav biljke osim same podvrste utječu i podrijetlo te okolišni uvjeti rasta (temperatura, izloženost suncu, kompozicija tla), ali i uvjeti berbe te metode obrade biljke nakon berbe (Campa i sur., 1993).

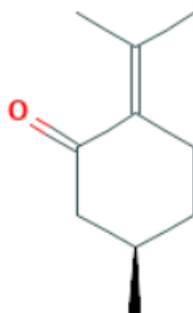
1.5.5. Eterično ulje biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch

Micromeria thymifolia (Scop.) Fritsch pripada porodici *Lamiaceae*. Biljke ove vrste imaju mnogobrojne i razgranate, uspravne ogranke, visine do 50 cm, a najčešće raste na stijenama i u pukotinama kamenja. Rasprostranjena je po Balkanskom poluotoku, preko Srbije, Hrvatske, Bosne i Hercegovine, dijelova Italije i Mađarske. Eterična ulja cijelog roda *Micromeria* iskazuju značajnu antivirusnu, antibakterijsku i antioksidativnu aktivnost. Na Balkanu se uglavnom koristi u tradicionalnoj medicini kao terapija poremećaja živčanog sustava,

uključujući anksioznost i epilepsiju. Također je korištena i za gastrointestinalne i respiratorne probleme. Eterično ulje ima ugodan miris koji nalikuje eteričnim uljima vrsti *Mentha* i *Thymus* (Bukvičćia i sur., 2016). Kemijska kompozicija ovog eteričnog ulja je slična kompoziciji eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis*. U najvećem postotku sadrži pulegon, piperitenon, piperiton, izomenton i limonen (Marinković i sur., 2003).

1.5.6. Pulegon

(R)-5-Metil-2-(1-metil-etilidin) cikloheksanon je monoterpenski keton, poznat kao pulegon. Pretežito se nalazi u ulju biljaka porodice *Lamiaceae*, a prvo je izoliran iz ulja vrste *Menta pulegium* L. prema čemu je i dobio naziv. Miris mu je ugodan i osvježavajuć te ga je najlakše usporediti s mirisima peperminta i kamfora. Spoj je netopljiv u vodi, ali topljiv u etanolu, dietil-eteru i kloroformu. U prirodi se pojavljuje kao dva različita enantiomera, od kojih je R(+) zastupljeniji u eteričnim uljima. Ova bezbojna uljasta tekućina (C₁₀H₁₆O, molekulska težina 152,23) na sobnoj temperaturi ima gustoću 0,9346 g/cm⁻³. Kemijska struktura pulegona je prikazana na slici 9. Pulegon ima tlak pare od 138 mm Hg, a specifična težina je 0,937 na 25 °C. Točka vrenja mu je 224 °C, a smrzava se na manje od 25 °C. To je zapaljiva tekućina (plamište od 82 °C) koja će se zapaliti ako se umjereno zagrije.



Slika 9. Kemijska struktura pulegona (Preuzeto sa www.pubmed.com).

Pulegon ima dodijeljen GRAS status (engl. *Generally Recognized as Safe*) čime mu je odobrena primjena u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji te aromaterapiji. Neka od bioloških djelovanja koja iskazuje su antimikrobna, antihistaminička i antipiretička, ali je i potentan abortiv. Također ima i pesticidna i antirepelentna svojstva. Dvostruka veza između C4 i C7 je odgovorna za antibakterijski učinak koji je promatran na bakterijama *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* i soju *S. aureus* rezistentnom na meticilin (engl. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) (Božović i Ragno, 2017).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Pseudomonas aeruginosa se nameće kao jedan od velikih javnozdravstvenih problema današnjice zbog rastućeg trenda rezistencije na dosadašnju terapiju, što posljedično rezultira povećanjem doze antibiotika kako bi liječenje bilo uspješno. Visoke doze antibiotika dalje uzrokuju prilagodbu obrambenih mehanizama bakterije i time se njezina rezistencija dodatno razvija. Drugi problem visokih doza antibiotika je ispoljavanje neželjenih i potencijalno opasnih nuspojava.

Cilj ovog rada je ispitati djelovanje eteričnih ulja biljnih vrsta *Calamintha officinalis* i *Micromeria thymifolia* (Scop.) Frisch zasebno i u kombinaciji s antibiotikom tobramicinom na bakterijsku međustaničnu komunikaciju različitih sojeva *Pseudomonas aeruginosa*. Pri tome će se ispitati proteolitička aktivnost bakterije temeljena na djelovanju niza enzima kao faktora virulencije, čija je ekspresija regulirana QS sustavima Las, Rhl i Pqs. Analizirat će se i pokretljivost bakterije u polukrutom mediju jer je i taj oblik kretanja jedan od faktora virulencije kontroliran QS sustavom.

Specifični ciljevi rada su sljedeći:

- 1) Odrediti minimalne inhibitorne koncentracije eteričnog ulja biljnih vrsta *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i *Calamintha officinalis* te aminoglikozidnog antibiotika tobramicina u polukrutom LB-mediju i krutom LB-mediju s 2% obranim mlijekom za sojeve *P. aeruginosa* ATCC 27853, PAO1, PA14 i BB1285 (*rmtD*⁺);
- 2) Ispitati utjecaj eteričnog ulja biljnih vrsta *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i *Calamintha officinalis* te antibiotika tobramicina zasebno i u kombinaciji na proteolitičku aktivnost sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853, PAO1, PA14, i BB1285 (*rmtD*⁺) u krutom LB-mediju s 2% obranim mlijekom;
- 3) Ispitati utjecaj eteričnog ulja *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i *Calamintha officinalis* te tobramicina pojedinačno i u kombinaciji na pokretljivost u polukrutom LB-mediju za sojeve *P. aeruginosa* ATCC 27853, PAO1, PA14, i BB1285 (*rmtD*⁺).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Bakterije

U ovom radu korištena su četiri različita soja bakterijske vrste *Pseudomonas aeruginosa*:

soj ATCC 27853 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA);

soj PAO1 (Leibnitz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany; kataloški broj DSM 1707);

soj PA14 (Leibnitz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany; kataloški broj DSM 19882);

soj BB1285 (*rmtD*⁺) (dobiven ljubaznošću prof. Brune Gonzaleza-Zorna, Universidad Complutense, Madrid, Španjolska) .

3.1.2. Eterična ulja

Eterično ulje biljne vrste *Calamintha officinalis*, *Lamiaceae*

Eterično ulje biljne vrste *Micromeria officinalis* (Scop.) Fritsch, *Lamiaceae*

3.1.3. Antibiotici

Tobramicin sulfat (Xellia Pharmaceuticals ApS, Copenhagen, Denmark)

3.1.4. Hranjivi medij

Za ispitivanje proteolitičke aktivnosti je korišten Luria-Bertani (LB) kruti medij s dodatkom obranog mlijeka u prahu: 10 g/L tripton, 5 g/L kvašćev ekstrakt, 5 g/L NaCl, agar 15 g/L; konačni pH=7,0 ± 0,2 (Difco TM, Lennox), 20 g/L obrano mlijeko u prahu (Dukat).

Za ispitivanje pokretljivosti u obliku rojenja korišten je polukruti LB-medij (0,5% LB-agar): 10 g/L tripton, 5 g/L kvašćev ekstrakt, 5 g/L NaCl; konačni pH=7,0 ± 0,2 (LB Broth, Difco TM, Lennox), 5 g/L agar (Bacto TM Agar).

3.1.5. Standardne kemikalije i otopine

Dimetilsulfoksid, DMSO (Sigma)

ultračista voda

3.1.6. Filteri za sterilizaciju

MS ® PTFE Syringe Filters, veličina pora 0,22 µm (Membrane Solution)

3.2. Metode

3.2.1. Priprava otopina eteričnog ulja *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i *Calamintha officinalis*

Eterična ulja biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i *Calamintha officinalis* koja su korištena u ovom radu dobivena su destilacijom vodenom parom korištenjem Clevenger aparature (dobiveno ljubaznošću prof. dr. sc. Sande Vladimir-Knežević, Zavod za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta). Udio pulegona u eteričnom ulju *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch iznosi 59,7%, a u eteričnom ulju *Calamintha officinalis* iznosi 38,1%. Navedeni postotci su određeni analizom u vezanom sustavu plinski kromatograf-spektrometar masa na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Eterična ulje obje biljne vrste su otopljena u DMSO-u do konačne koncentracije 100 mg/mL. Koncentracija koja je korištena prilikom izvođenja pokusa iznosi 0,5 mg/mL.

3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije tobramicina

Za utvrđivanje minimalne inhibitorne koncentracije tobramicina u uvjetima pokusa korištena je metoda razrjeđenja u agaru (engl. *agar dilution method*) prema prilagođenim CLSI (engl. Clinical Laboratory Standard Institute) uputama (Balouiri i sur., 2016). Noćne kulture četiriju sojeva *P. aeruginosa* (ATCC 27853, PAO1, PA14 i BB1285 (*rmtD*⁺)) uzgojene su inokulacijom male količine bakterijskih stanica u 3 mL tekućeg LB-medija koji je inkubiran 20 h na 37°C uz potresanje. Matična otopina tobramicina pripremljena je u koncentraciji 0,5 mg/mL i sterilizirana filtracijom kroz filter veličine pora 0,22 µm. Dvostruka serijska razrjeđenja tobramicina pripremljena su dodatkom tobramicina u 0,5% LB-agar i LB-agar s dodatkom 2% obranog mlijeka nakon autoklaviranja i hlađenja na 50°C. Koncentracije tobramicina korištene za LB-agar s dodatkom 2% obranog mlijeka bile su 0,5, 2, 4, 8 i 16 µg/mL, a za 0,5% LB-agar 0,5, 2 i 4 µg/mL. Kruta podloga inokulirana je s 1,5 µL noćne kulture bakterija i uzgajana 16-20 h na 37°C. Minimalna inhibitorna koncentracija tobramicina određena je kao najniža koncentracija antibiotika koja inhibira vidljivi rast bakterija.

3.2.3. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti *Pseudomonas aeruginosa*

Polukvantitativna metoda koja pokazuje sveukupnu proteolitičku aktivnost bakterije *P. aeruginosa* provodi se inokulacijom bakterijskih stanica na kruti LB-medij s dodatkom obranog mlijeka. Ovako pripremljeni medij je zamućen zbog prisutnosti mliječnog proteina kazeina, a kao posljedica djelovanja razgradnje kazeina izlučenim proteazama pojavljuje se čista zona oko bakterijskih stanica (Filloux i Ramos, 2014).

Noćne kulture četiriju sojeva *P. aeruginosa* (ATCC 27853, PAO1, PA14 i BB1285 (*rmtD*⁺)) uzgojene su inokulacijom male količine bakterijskih stanica u 3 mL tekućeg LB-medija koji je inkubiran 20 h na 37°C uz potresanje. Tako pripremljene bakterijske kulture nanose se na 1,5% LB-agar ploče koje još sadrže i 2% obrano mlijeko. Kako bi se navedena ploča dobila potrebno je napraviti agar i mlijeko dvostruko veće koncentracije, odnosno 3% LB-agar i 4% obrano mlijeko. Oni se zasebno autoklaviraju 15 minuta, LB-agar na 121°C, a obrano mlijeko na 115°C, ohlade na 50°C te zatim pomiješaju u omjeru 1:1 (7,5 mL + 7,5 mL) kako bi se dobila zadana koncentracija. U tako pripremljen medij dodana su eterična ulja biljnih vrsta *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i *Calamintha officinalis* zasebno u koncentracijama od 0,5 mg/mL te u kombinaciji sa subinhibitornom koncentracijom tobramicina od 0,5 µg/mL i 2 µg/mL. Prilikom izlivanja pripremljenog medija u Petrijevu zdjelicu treba paziti kako ne bi došlo do stvaranja mjehurića zraka. Ploče su zatim osušene preko noći i sljedeći dan inokulirane s 1,5 µL bakterijske kulture koje su zatim inkubirane 16-20 h na 37°C.

3.2.4. Ispitivanje pokretljivosti u obliku rojenja *Pseudomonas aeruginosa*

Metoda koja ispituje jedan od oblika pokretanja sojeva bakterije *P. aeruginosa*, rojenje (engl. *swarming*) provodi se na polukrutom LB-mediju s 0,5 % agarom. Na ploče su također dodana eterična ulja *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i *Calamintha officinalis* zasebno te u kombinaciji sa tobramicinom u dvije različite subinhibitorne koncentracije. Korištene koncentracije eteričnih ulja su 0,5 mg/mL, a tobramicina 0,5 µg/mL i 2 µg/mL.

Noćne kulture četiriju sojeva *P. aeruginosa* (ATCC 27853, PAO1, PA14 i BB1285 (*rmtD*⁺)) uzgojene su inokulacijom male količine bakterijskih stanica u 3 mL tekućeg LB-medija koji je inkubiran 20 h na 37°C uz potresanje. Na središte ploče je inokulirano 1,5 µL prekonoćne kulture te su ploče narednih 24 sata inkubirane na 37°C (Filloux i Ramos, 2014). Rezultati su očitani vizualno uspoređivanjem razlika u obrascima puzanja bakterijskih sojeva *P. aeruginosa*.

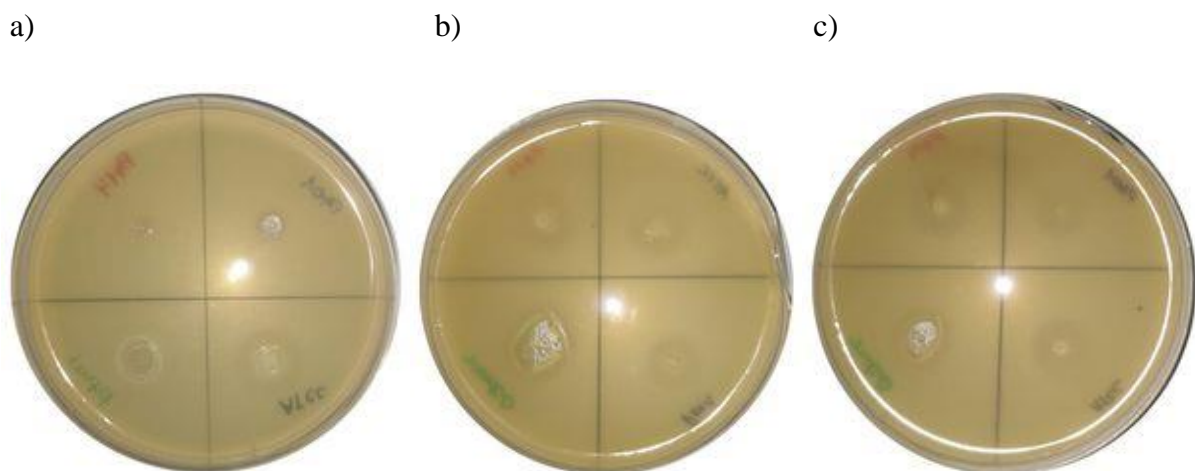
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI

4.1.1. Minimalna inhibitorna koncentracija

Antibiotici u subinhibitornim koncentracijama djeluju kao signalne molekule koje se upliću u regulaciju QS sustava i na taj način mogu utjecati na proteolitičku aktivnost i rojenje *P. aeruginosa* koji su pod kontrolom QS sustava (Babić i sur. 2010). Stoga je najprije bilo potrebno utvrditi minimalne inhibitorne koncentracije tobramicina u uvjetima pokusa da bi se mogle odabrati subinhibitorne koncentracije s kojima će se raditi u pokusima ispitivanja proteolitičke aktivnosti i pokretljivosti. Za određivanje MIC-a korištena je metoda razrjeđenja u agaru prema prilagođenim CLSI uputama kako je opisano u poglavlju Materijali i metode. Minimalna inhibitorna koncentracija tobramicina određena je kao najniža koncentracija antibiotika koja inhibira vidljivi rast bakterija.

Koncentracije tobramicina korištene za LB-agar s dodatkom 2% obranog mlijeka bile su 0,5, 2, 4, 8 i 16 $\mu\text{g/mL}$. Na slici 10. je prikazana proteolitička aktivnost sojeva PA14, PAO1, BB1285 (*rmtD*⁺) i ATCC 27853 *P. aeruginosa* na LB-agaru s 2% obranim mlijekom nakon dodatka tobramicina u koncentracijama od 4 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$ i 16 $\mu\text{g/mL}$, a izmjereni radijusi čiste zone za sve tri navedene koncentracije tobramicina kod sojeva PA14, PAO1 i ATCC 27835 iznose 0,0 cm, a za soj BB1285 (*rmtD*⁺) 0,1 cm. Rezultati za subinhibitorne koncentracije 0,5 $\mu\text{g/mL}$ i 2 $\mu\text{g/mL}$ prikazani su u poglavlju 4.1.2.



Slika 10. Proteolitička aktivnost sojeva *P. aeruginosa* PA14 (gore lijevo), PAO1 (gore desno), BB1285 (*rmtD*⁺) (dolje lijevo) i ATCC 27853 (dolje desno) na LB-agaru u 2% obranim mlijekom nakon dodatka tobramicina u koncentracijama od a) 4 $\mu\text{g/mL}$ b) 8 $\mu\text{g/mL}$ c) 16 $\mu\text{g/mL}$.

Bakterijski rast još uvijek je vidljiv i pri najvećoj ispitanoj koncentraciji tobramicina, što pokazuje da je MIC za sva četiri soja *P. aeruginosa* na LB-agaru s 2% obranim mlijekom >16 µg/mL.

Koncentracije tobramicina korištene za polukrutu LB-podlogu s 0,5% agarom bile su 0,5, 2 i 4 µg/mL. Slika 11. prikazuje rezultate rojenja sojeva *P. aeruginosa* PA14, PAO1, BB1285 (*rmtD*⁺) i ATCC 27853 na 0,5% LB-agaru nakon dodatka tobramicina u koncentraciji od 4 µg/mL, te su vrijednosti radijusa bakterijskih kolonija za soj PA14 0,4 cm, soj PAO1 0,4 cm, soj ATCC 27835 0,1 cm i soj BB1283 (*rmtD*⁺) 1,4 cm. Rezultati za subinhibitorne koncentracije 0,5 µg/mL i 2 µg/mL prikazani su u poglavlju 4.1.3.



Slika 11. Rojenje sojeva *P. aeruginosa* PA14 (gore lijevo), PAO1 (gore desno), BB1285 (*rmtD*⁺) (dolje lijevo) i ATCC 27853 (dolje desno) na 0,5% LB-agaru uz dodatak tobramicina u koncentraciji 4 µg/mL.

MIC tobramicina na 0,5% LB-agaru iznosi 4 µg/mL za sojeve PA14, PAO1 i ATCC 27853. Soj BB1285 (*rmtD*⁺) je rezistentan na aminoglikozidne antibiotike jer sadrži gen *rmtD* koji kodira 16S rRNA metil-transferazu odgovornu za modifikaciju veznog mjesta antibiotika (Gutierrez i sur., 2013).

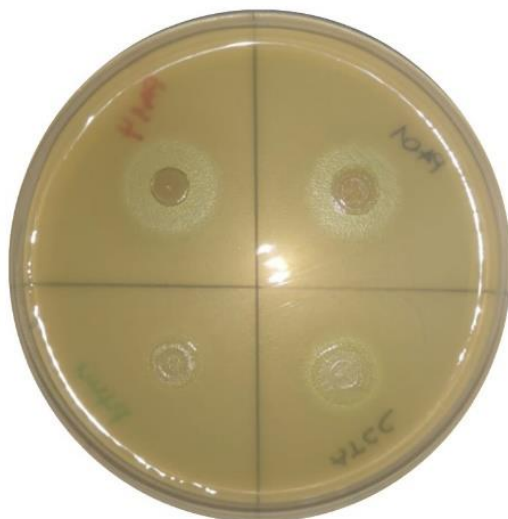
Na temelju dobivenih rezultata, koncentracije tobramicina 0,5 i 2 µg/mL odabrane su kao subinhibitorne koncentracije koje su korištene u nastavku istraživanja.

4.1.2. Proteolitička aktivnost različitih sojeva *Pseudomonas aeruginosa*

Ispitivanje proteolitičke aktivnosti *P. aeruginosa* se provodi polukvantitativnom metodom na zamućenom LB-mediju s 2% obranim mlijekom. Razlika djelovanja dodanih supstanci na proteolitičku aktivnost se uočava kao razlika u promjeru čiste zone oko bakterije koja nastaje razgradnjom proteina kazeina iz mlijeka pomoću proteaza koje luči *P. aeruginosa*. U ovom radu ispitano je djelovanje subinhibitornih koncentracija antibiotika tobramicina i eteričnih ulja

biljnih vrsta *Micromerija thymifolia* (Scop.) Fritsch (dalje u tekstu: mikromerija) i *Calamintha officinalis* (dalje u tekstu: kalaminta) zasebno te u kombinaciji. Prema istraživanju na ostalim uljima porodice *Lamiaceae* pokazalo se kako subinhibitorna koncentracija eteričnog ulja ulazi u interakciju s QS sustavom bakterije i na taj način smanjuje proteolitičku aktivnost, a time posljedično i virulentnost bakterije (Čabarkapa i sur., 2019). U laboratoriju je također pokazan povoljan učinak eteričnih ulja mikromerije i kalaminte u koncentraciji 0,5 mg/mL na tvorbu biofilma, zasebno i u kombinaciji s tobramicinom (Koprivčić, 2019, Sičić, 2019). Iz tog razloga je u ovom radu za izvođenje pokusa odabrana subinhibitorna koncentracija eteričnih ulja mikromerije i kalaminte od 0,5 mg/mL.

Rezultati djelovanja ispitanih eteričnih ulja i tobramicina na proteolitičku aktivnost različitih sojeva *P. aeruginosa* u usporedbi s netretiranim bakterijama prikazani su na slikama 12-16 i u tablici 2. Slika 12. prikazuje proteolitičku aktivnost sojeva *P. aeruginosa* PA14, PAO1, BB1285 (*rmtD*⁺) i ATCC 27853 na LB-agaru s 2% obranim mlijekom.



Slika 12. Proteolitička aktivnost bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* PA14 (gore lijevo), PAO1 (gore desno), BB1285 (*rmtD*⁺) (dolje lijevo) i ATCC 27853 (dolje desno), na LB-agaru s 2% obranim mlijekom.

Najveću proteolitičku aktivnost pokazuje soj PA14, zatim PAO1. Sojevi ATCC 27853 i BB1285 (*rmtD*⁺) pokazuju vrlo slabu proteolitičku aktivnost.

Slika 13. prikazuje proteolitičku aktivnost sojeva *P. aeruginosa* PA14, PAO1, BB1285 (*rmtD*⁺) i ATCC 27853 na LB-agaru s 2% obranim mlijekom nakon dodatka subinhibitornih koncentracija tobramicina od 0,5 µg/mL i 2 µg/mL.

a)



b)



Slika 13. Proteolitička aktivnost bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* PA14 (gore lijevo), PAO1 (gore desno), BB1285 (*rmtD*⁺) (dolje lijevo) i ATCC 27853 (dolje desno), na LB-agaru s 2% obranim mlijekom nakon dodatka subinhibitornih koncentracija tobramicina od a) 0,5 µg/mL b) 2 µg/mL.

Nakon dodatka tobramicina u koncentraciji od 0,5 µg/mL nije uočena promjena proteolitičke aktivnosti sojeva u odnosu na kontrolnu skupinu. Povećanjem koncentracije na 2 µg/mL vidi se smanjenje proteolitičke aktivnosti jer se smanjila čista zona oko bakterijskih kolonija.

Slika 14. prikazuje proteolitičku aktivnost sojeva *P. aeruginosa* PA14, PAO1, BB1285 (*rmtD*⁺) i ATCC 27853 na LB-agaru s 2% obranim mlijekom nakon dodatka eteričnih ulja mikromerije i kalaminte u subinhibitornoj koncentraciji od 0,5 mg/mL.

a)



b)



Slika 14. Proteolitička aktivnost bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* PA14 (gore lijevo), PAO1 (gore desno), BB1285 (*rmtD*⁺) (dolje lijevo) i ATCC 27853 (dolje desno), na LB-agaru s 2% obranim mlijekom nakon dodatka subinhibitornih koncentracija od 0,5 mg/mL eteričnih ulja a) mikromerije b) kalaminte.

Dodatkom eteričnih ulja mikromerije i kalaminte se smanjuje proteolitička aktivnost *P. aeruginosa* soja PA14. Kod sojeva PAO1 i BB1285 (*rmtD*⁺) nema vidljive promjene nakon dodatka eteričnih ulja u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod soja ATCC 27853 se uočava blago povećanje proteolitičke aktivnosti, što nije slučaj nakon dodatka samog tobramicina. Usporedno s djelovanjem samog tobramicina na inhibiciju proteolitičke aktivnosti soja PA14, djelovanje eteričnih ulja je jače nego djelovanje tobramicina koncentracije 0,5 µg/mL, a slabije nego koncentracije 2 µg/mL. Na soj PAO1 tobramicin u koncentraciji 2 µg/mL jače inhibira proteolitičku aktivnost nego eterična ulja. Na sva četiri soja eterična ulja djeluju jednakim intenzitetom.

Slika 15. prikazuje proteolitičku aktivnost sojeva *P. aeruginosa* PA14, PAO1, BB1285 (*rmtD*⁺) i ATCC 27853 na LB-agaru s 2% obranim mlijekom nakon dodatka eteričnog ulja mikromerije u koncentraciji od 0,5 mg/mL zajedno s tobramicinom u koncentracijama od 0,5 µg/mL, odnosno 2 µg/mL.

a)



b)



Slika 15. Proteolitička aktivnost bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* PA14 (gore lijevo), PAO1 (gore desno), BB1285 (*rmtD*⁺) (dolje lijevo) i ATCC 27853 (dolje desno), na LB-agaru s 2% obranim mlijekom nakon dodatka eteričnog ulja mikromerije zajedno s tobramicinom koncentracije a) 0,5 µg/mL i b) 2 µg/mL.

Vidi se kako porastom koncentracije tobramicina raste i jačina inhibicije proteolitičke aktivnosti sojeva PA14 i PAO1. Postiže se sinergistički učinak eteričnog ulja i tobramicina za ova dva soja za obje koncentracije tobramicina jer je djelovanje jače nego kod svake sastavnice zasebno. Za sojeve ATCC 27853 i BB1285 (*rmtD*⁺) ne dolazi do razlike u jačini inhibicije nakon porasta koncentracije tobramicina. Kod soja ATCC 27853 se za nižu koncentraciju tobramicina ne

razlikuje djelovanje samog tobramicina i kombinacije s eteričnim ulje mikromerije, ali se kod više koncentracije tobramicina vidi antagonistički učinak eteričnog ulja na tobramicin. Kod soja BB1285 (*rmtD*⁺) nisu uočene vidljive promjene proteolitičke aktivnosti nakon dodatka tobramicina i eteričnih ulja zasebno, niti u kombinaciji, u odnosu na kontrolnu skupinu.

Slika 16. prikazuje proteolitičku aktivnost sojeva *P. aeruginosa* PA14, PAO1, BB1285 (*rmtD*⁺) i ATCC 27853 na LB-agaru s 2% obranim mlijekom nakon dodatka eteričnog ulja kalaminte zajedno s tobramicinom u koncentracijama od 0,5 µg/mL i 2 µg/mL.

a)



b)



Slika 16. Proteolitička aktivnost bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* PA14 (gore lijevo), PAO1 (gore desno), BB1285 (*rmtD*⁺) (dolje lijevo) i ATCC 27853 (dolje desno), na LB-agaru s 2% obranim mlijekom nakon dodatka eteričnog ulja kalaminte u koncentraciji 0,5 mg/mL zajedno s tobramicinom u koncentraciji od a) 0,5 µg/mL i b) 2 µg/mL.

Ne uočava se razlika u rezultatima dobivenim za jednake koncentracije eteričnih ulja mikromerije i kalaminte kada su u kombinaciji s tobramicinom i niže i više koncentracije, odnosno djelovanje eteričnog ulja kalaminte za navedene koncentracije jednako je djelovanju eteričnog ulja kalaminte.

U tablici 2. su sumarno prikazani promjeri čiste zone različitih sojeva *P. aeruginosa* na 1,5% agaru s dodatkom 2% obranog mlijeka s obzirom na dodane supstance u navedenim koncentracijama.

Tablica 2. Radijusi čiste zone oko bakterijskih kolonija *P. aeruginosa* sojeva PA14, PAO1, BB1285 (*rmtD*⁺) u centimetrima nakon dodatka eteričnih ulja mikromerije i kalaminte te tobramicina u navedenim koncentracijama.

DODANA SUPSTANCA	SOJEVI <i>P. aeruginosa</i>			
	PA14	PAO1	ATCC 27835	BB1285 (<i>rmtD</i> ⁺)
Ø	0,6	0,4	0,1	0,1
Tobramicin 0,5 µg/mL	0,6	0,4	0,1	0,1
Tobramicin 2 µg/mL	0,3	0,1	0,0	0,1
Tobramicin 4 µg/mL	0,0	0,0	0,0	0,1
Tobramicin 8 µg/mL	0,0	0,0	0,0	0,1
Tobramicin 16 µg/mL	0,0	0,0	0,0	0,1
Eterično ulje mikromerije 0,5 mg/mL	0,5	0,4	0,2	0,1
Eterično ulje kalaminte 0,5 mg/mL	0,5	0,4	0,2	0,1
Eterično ulje mikromerije 0,5 mg/mL i tobramicin 0,5 µg/mL	0,5	0,3	0,1	0,1
Eterično ulje kalaminte 0,5 mg/mL i tobramicin 0,5 µg/mL	0,5	0,3	0,1	0,1
Eterično ulje mikromerije 0,5 mg/mL i tobramicin 2 µg/mL	0,1	0,1	0,1	0,1
Eterično ulje kalaminte 0,5 mg/mL i tobramicin 2 µg/mL	0,1	0,1	0,1	0,1

4.1.3. Rojenje *Pseudomonas aeruginosa*

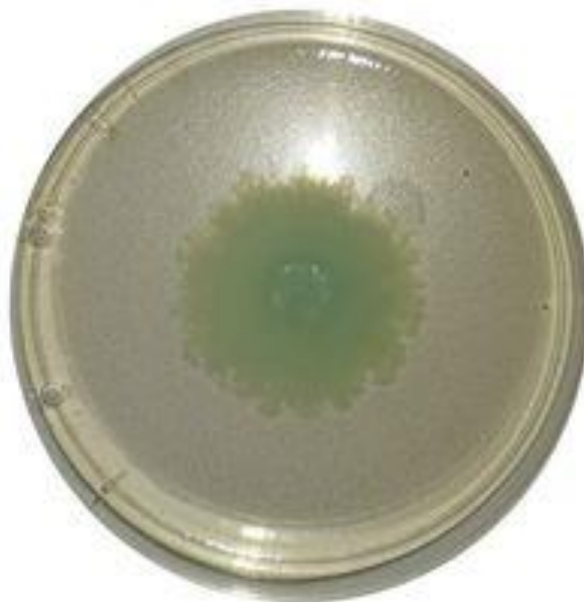
Rojenje kao jedan od oblika pokretljivosti sojeva bakterije *P. aeruginosa* je vrlo značajan čimbenik virulencije kontroliran QS sustavom. Pokretljivost u obliku rojenja za različite sojeve *P. aeruginosa* ispitana je na polukrutom LB-mediju s 0,5 % agarom kao što je prikazano na slici 17. Najizraženiju sposobnost rojenja ima soj PA14. Način na koji se opisuje njegov uzorak rojenja je poput cvijeta (engl. *flower like*). Soj PAO1 također ima svojstvo rojenja, no uzorak

kojim se kreće je kružnog oblika. Kod sojeva ATCC 27835 i BB1285 (*rmtD*+) nije uočena sposobnost rojenja na 0,5% LB-agaru. Slike ovih ploča služe kao kontrolna skupina za uspoređivanje uspješnosti inhibicije rojenja nakon dodatka eteričnih ulja mikromerije i kalaminte te tobramicina. Rezultati su prikazani kao slike Petrijevih zdjelica (slike 17-21) i kao promjer pokretljivosti (tablica 8).

a)



b)



c)

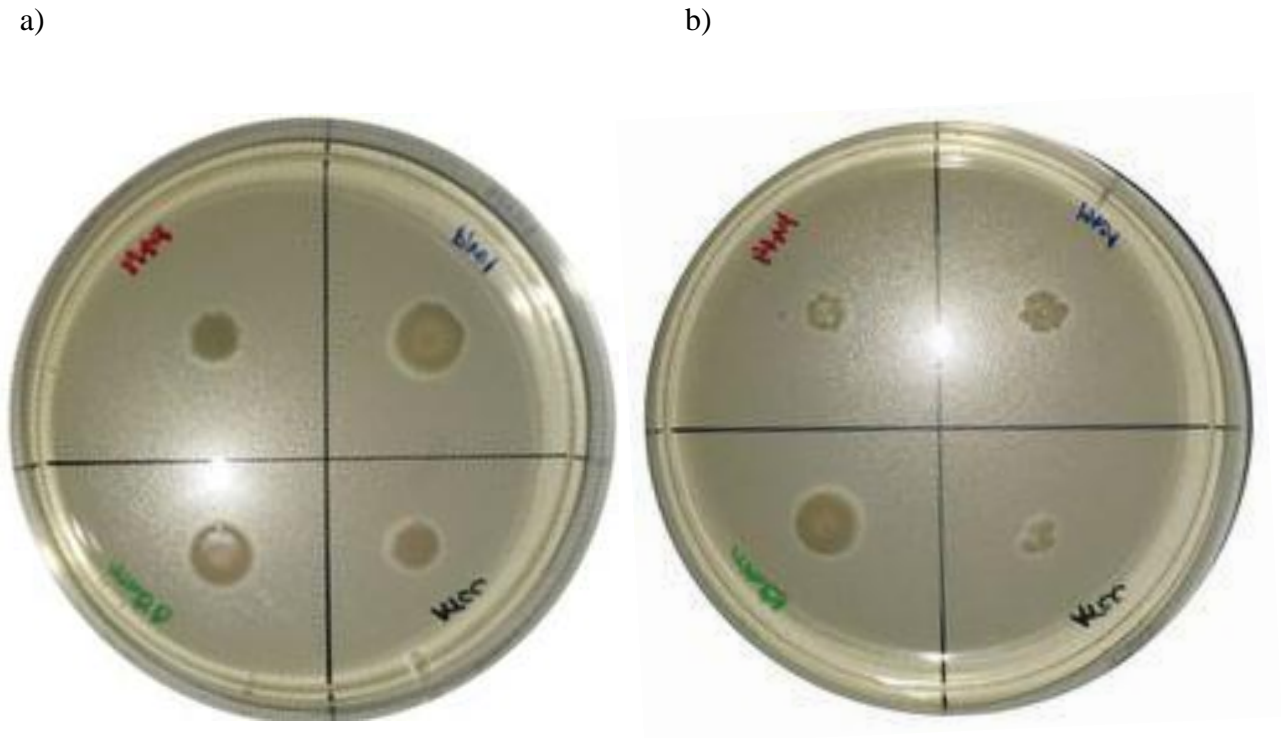


d)



Slika 17. Obrasci pokretljivosti sojeva *P. aeruginosa* na 0,5% LB-agaru: a) PA14; b) PAO1; c) ATCC 27835; d) BB1285 (*rmtD*+).

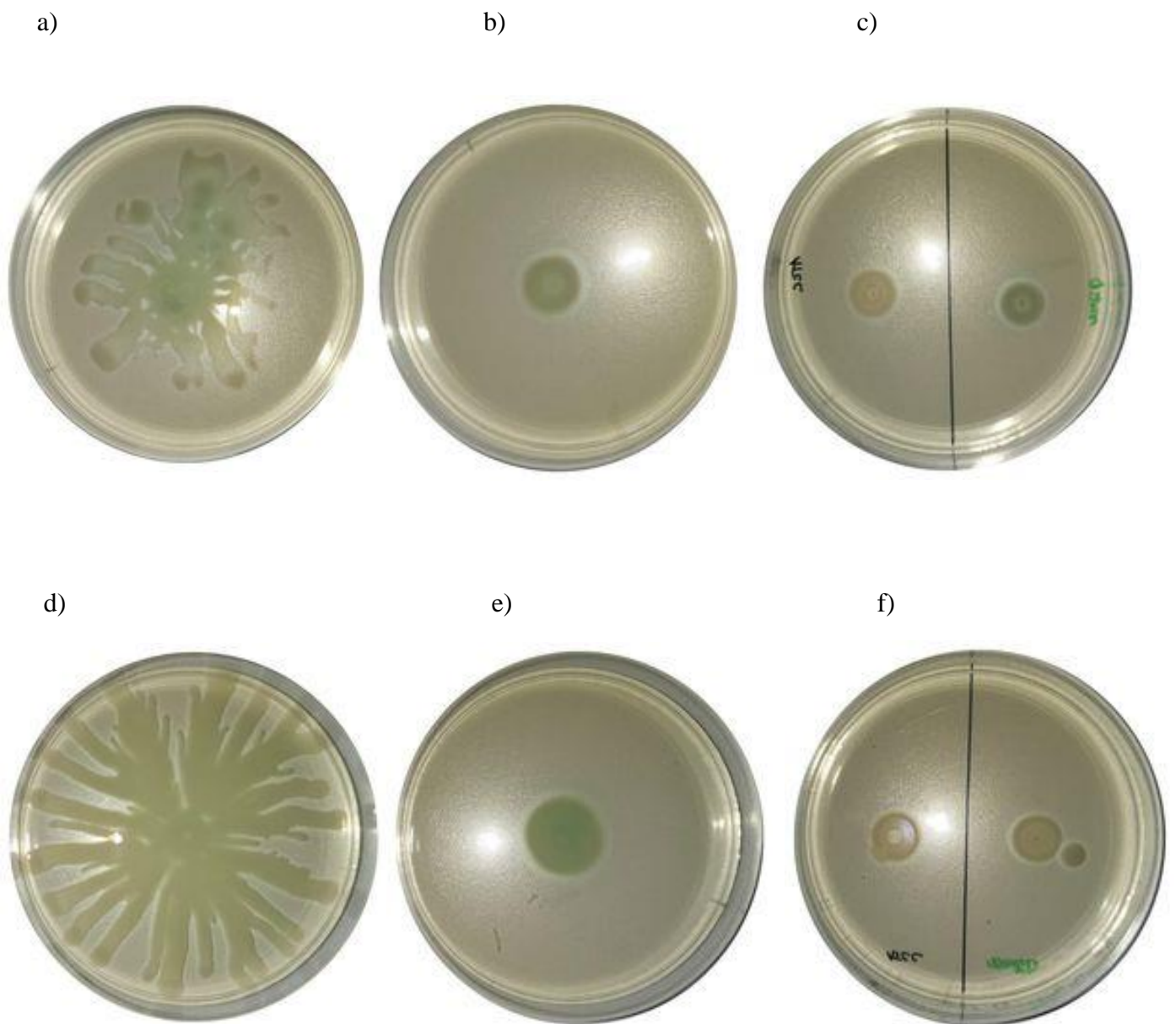
Utjecaj tobramicina na rojenje ispitan je u koncentracijama od 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kao što je prikazano na slici 18.



Slika 18. Rojenje sojeva *P. aeruginosa* PA14 (gore lijevo), PAO1 (gore desno), BB1285 (*rmtD*+) (dolje lijevo) i ATCC 27853 (dolje desno) u 0,5% LB-agaru s dodatkom tobramicina u koncentraciji od a) 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i b) 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Rezultati pokazuju da tobramicin na rojenja sojeva PA14 i PAO1 djeluje inhibitorno tako da se s povećanjem koncentracije tobramicina proporcionalno smanjuje rojenje bakterija. Tobramicin djeluje inhibitorno i na rast kolonija što je vidljivo u slučaju soja ATCC 27835. Na soj BB1285 (*rmtD*+) tobramicin ne djeluje inhibitorno zbog rezistencije tog soja na aminoglikozide.

Slika 19. prikazuje utjecaj eteričnih ulja mikromerije i kalaminte u koncentraciji od 0,5 mg/mL na rojenje različitih sojeva *P. aeruginosa*.



Slika 19. Rojenje bakterije *P. aeruginosa* soja:

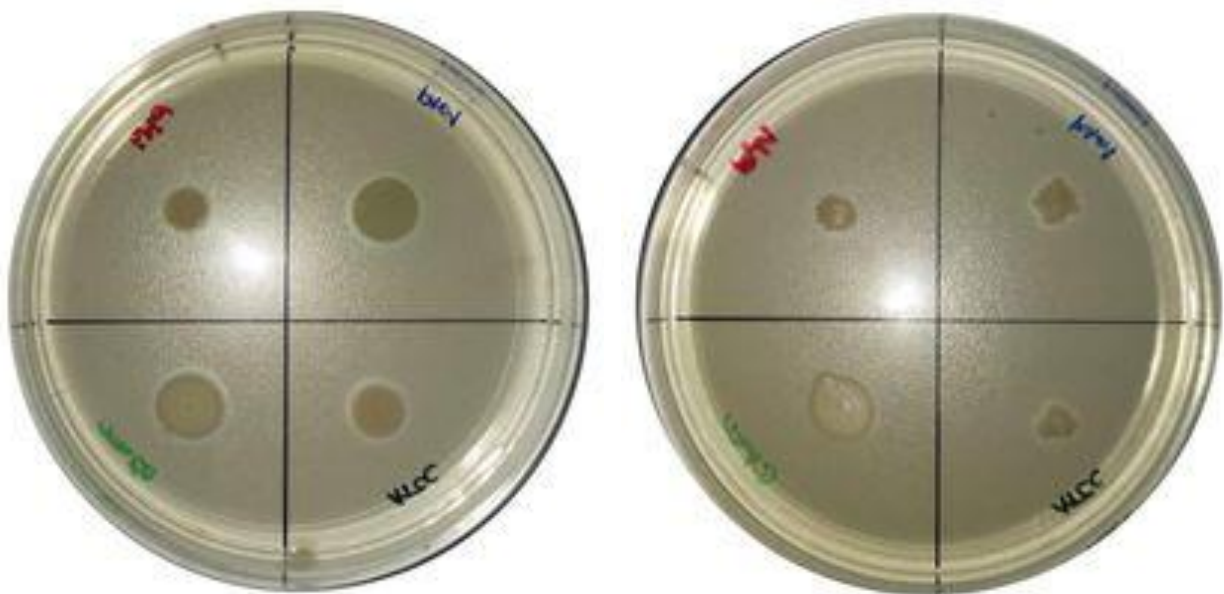
- a) PA14 uz dodatak eteričnog ulja mikromerije koncentracije 0,5 mg/mL
- b) PAO1 uz dodatak eteričnog ulja mikromerije koncentracije 0,5 mg/mL
- c) ATCC 27835 (lijevo) i BB1285 (*rmtD+*) (desno) uz dodatak eteričnog ulja mikromerije koncentracije 0,5 mg/mL
- d) PA14 uz dodatak eteričnog ulja kalaminte koncentracije 0,5 mg/mL
- e) PAO1 uz dodatak eteričnog ulja kalaminte koncentracije 0,5 mg/mL
- f) ATCC 27835 (lijevo) i BB1285 (*rmtD+*) (desno) uz dodatak eteričnog ulja kalaminte koncentracije 0,5 mg/mL.

Na sojeve PA14 i PAO1 je učinak eteričnog ulja mikromerije na inhibiciju rojenja nešto jači u odnosu na eterično ulje kalaminte. Utjecaj na inhibiciju rojenja soja ATCC 27835 je jednak kod oba eterična ulja. Na inhibiciju rojenja soja BB1285 (*rmtD*⁺) oba eterična ulja djeluju negativno jer se uočava porast promjera kolonije. U ovom slučaju djeluju jednakim intenzitetom. U odnosu na djelovanje samog tobramicina u koncentracijama od 0,5 µg/mL i 2 µg/mL eterična ulja djeluju puno slabije na inhibiciju rojenja sojeva PA14, PAO1 i ATCC 27835.

Slika 20. prikazuje utjecaj dodatka kombinacije eteričnog ulja mikromerije koncentracije 0,5 mg/mL s tobramicinom koncentracije 0,5 µg/mL i 2 µg/mL na rojenje različitih sojeva *P. aeruginosa*.

a)

b)

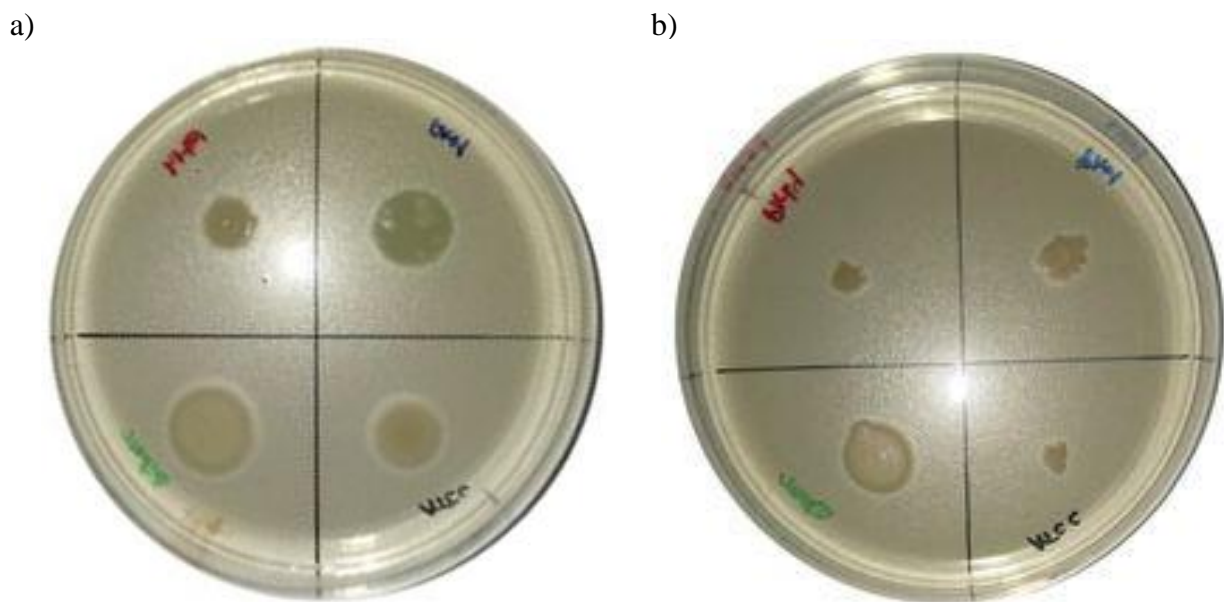


Slika 20. Rojenje sojeva *P. aeruginosa* PA14 (gore lijevo), PAO1 (gore desno), BB1285 (*rmtD*⁺) (dolje lijevo) i ATCC 27835 (dolje desno), na 0,5% LB-agaru uz dodatak eteričnog ulja mikromerije koncentracije 0,5 mg/mL u kombinaciji s tobramicinom koncentracije a) 0,5 µg/mL i b) 2 µg/mL.

Porastom koncentracije tobramicina u kombinaciji s eteričnim uljem mikromerije se pojačava inhibični učinak na rojenje soja PA14 te se u odnosu na sam tobramicin u istim koncentracijama uočava sinergistički učinak. Kod soja PAO1 se također vidi jača inhibicija porastom koncentracije tobramicina u kombinaciji s eteričnim uljem. Usporedno sa samim tobramicinom, pri nižoj koncentraciji u kombinaciji s eteričnim uljem mikromerije se uočava sinergistički učinak, a pri višoj koncentraciji tobramicina antagonistički učinak eteričnog ulja

na tobramicin. Kod soja ATCC 27835 u obje koncentracije tobramicina u kombinaciji s eteričnim uljem dolazi do antagonističkog učinka eteričnog ulja na tobramicin, ali se opet uočava porast inhibicije rojenja proporcionalno s povećanjem koncentracije tobramicina. Kombinacija eteričnog ulja mikromerije i tobramicina u obje koncentracije djeluje promotivno na rojenje soja BB1285 (*rmtD+*) s obzirom da se povećava promjer kolonije.

Slika 21. prikazuje utjecaj kombinacije eteričnog ulja kalaminte koncentracije 0,5 mg/mL s tobramicinom koncentracije 0,5 $\mu\text{g/mL}$ i 2 $\mu\text{g/mL}$ na rojenje različitih sojeva *P. aeruginosa*.



Slika 21. Rojenje sojeva *P.aeruginosa* PA14 (gore lijevo), PAO1 (gore desno), BB1285 (*rmtD+*) (dolje lijevo) i ATCC 27853 (dolje desno), na 0,5% agaru uz dodatak eteričnog ulja kalaminte u kombinaciji s tobramicinom koncentracije a) 0,5 $\mu\text{g/mL}$ b) 2 $\mu\text{g/mL}$.

Za sojeve PA14 i PAO1 je djelovanje samog tobramicina koncentracije 0,5 $\mu\text{g/mL}$ i tobramicina u kombinaciji s eteričnim uljem kalaminte jednako. Povećanjem koncentracije tobramicina na 2 $\mu\text{g/mL}$ u kombinaciji dolazi do sinergističkog učinka za soj PA14, a antagonističkog učinka za soj PAO1 u odnosu na sam tobramicin koncentracije 2 $\mu\text{g/mL}$. Kod soja ATCC 27835 se uočava antagonistički učinak eteričnog ulja kalaminte kod obje koncentracije tobramicina. Kombinacija eteričnog ulja kalaminte i tobramicina u obje koncentracije djeluje promotivno na rojenje soja BB1285 (*rmtD+*) s obzirom da se povećava promjer kolonije. Eterično ulje djeluje jednako na soj BB1285 (*rmtD+*), ali je intenzitet

djelovanja za niže koncentracije tobramicina u kombinaciji s eteričnim uljima jači za eterično ulje kalaminte, a pri višim za eterično ulje mikromerije.

U tablici 3. su sumarno prikazani promjeri pokretljivosti različitih sojeva *P. aeruginosa* na 0,5% LB-agaru s obzirom na dodane supstance u navedenim koncentracijama.

Tablica 3. Promjer pokretljivosti sojeva *P. aeruginosa* PA14, PAO1, ATCC 27835 i BB1285 (*rmtD*+), na 0,5% LB-agaru u centimetrima nakon dodatka tobramicina i eteričnih ulja mikromerije i kalaminte u navedenim koncentracijama.

DODANA SUPSTANCA	SOJEVI <i>P. aeruginosa</i>			
	PA14	PAO1	ATCC 27835	BB1285 (<i>rmtD</i> +))
Ø	10,0	5,0	1,7	1,4
Tobramicin 0,5 µg/mL	1,0	1,5	1,1	1,3
Tobramicin 2 µg/mL	0,7	0,7	0,6	1,3
Tobramicin 4 µg/mL	0,4	0,4	0,1	1,4
Eterično ulje mikromerije 0,5 mg/mL	7,9x5,8	2,0	1,5	1,6
Eterično ulje kalaminte 0,5 mg/mL	10,0	2,7	1,5	1,6
Eterično ulje mikromerije 0,5 mg/mL i tobramicin 0,5 µg/mL	0,9	1,4	1,2	1,5
Eterično ulje kalaminte 0,5 mg/mL i tobramicin 0,5 µg/mL	1,0	1,5	1,5	1,8
Eterično ulje mikromerije 0,5 mg/mL i tobramicin 2 µg/mL	0,6	1,0	0,7	1,6
Eterično ulje kalaminte 0,5 mg/mL i tobramicin 2 µg/mL	0,6	0,9	0,7	1,5

4.2. RASPRAVA

Pseudomonas aeruginosa jedan je od najčešćih oportunističkih patogena koji izaziva plućne, urinarne te očne infekcije s velikom stopom komplikacija, stoga su mnoga istraživanja usmjerena na način borbe protiv njega. Borba je otežana činjenicom da je u određenoj mjeri rezistentan na antibiotike te ima vrlo učinkovit način izbjegavanja imunskog odgovora domaćina. Iz tih razloga javlja se potreba za korištenjem sve većih doza antibiotika koje mogu djelovati štetno i izazvati opasne nuspojave. Kako bi se te doze smanjile traže se alternativni načini borbe, a predvodnici u novim metodama liječenja su eterična ulja. To su lako hlapljive tekućine koje su po kemijskom sastavu mješavina raznih spojeva od kojih se u najvećem udjelu nalaze terpeni i terpenoidi. Eterična ulja biljnih vrsta *Micromeria thymifolia* (Scop.) Frisch i *Calamintha officinalis* koja su korištena u ovom radu pripadaju porodici *Lamiaceae*. Sadrže istu glavnu komponentu, pulegon, kojem se pripisuje antibakterijsko djelovanje. Smatra se da je za njegov učinak ključna dvostruka veza između C4 i C7. Mehanizam djelovanja eteričnih ulja nije do kraja razjašnjen te se ne može sa sigurnošću predvidjeti hoće li u različitim uvjetima doći do sinergističkog ili antagonističkog učinka eteričnog ulja i antibiotika. Osim eteričnog ulja i antibiotika koji ulaze u interakciju, na krajnji ishod utječe i bakterijski soj koji se ispituje. U ovom radu su promatrani sojevi *P. aeruginosa* PAO1, PA14, ATCC 28735 i BB1285 (*rmtD+*). Sojevi sami po sebi imaju različite karakteristike što se vidi u obliku rezistencije na antibiotike, jačini proteolitičke aktivnosti, sposobnosti i obrascu rojenja itd.

U prvom dijelu rada ispitan je utjecaj eteričnih ulja te antibiotika zasebno, a zatim u kombinaciji, na proteolitičku aktivnost bakterije. Naime, proteolitička aktivnost je jedan od najvažnijih faktora virulencije zbog toga što bakteriji omogućuje uništavanje tkiva te izbjegavanje imunskog odgovora domaćina. Proteolitička aktivnost je pod kontrolom sustava bakterijske međustanične komunikacije. Na LB-agar pločama s 2% obranim mlijekom promatra se radijus čiste zone oko bakterijskih kolonija. Čista zona nastaje zahvaljujući enzimskoj aktivnosti proteaza koje luči *P. aeruginosa* i koje razgrađuju kazein iz mlijeka. Ukoliko dodana supstanca inhibira proteolitičku aktivnost bakterije, čista zona, odnosno njezin radijus se smanjuje u odnosu na netretiranu bakteriju jer se smanjuje enzimska aktivnost proteaze. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da *P. aeruginosa* podnosi tobramicin u nižim koncentracijama jer nema promjene u proteolitičkoj aktivnosti nakon dodatka 0,5 µg/mL tobramicina u odnosu na kontrolnu skupinu koja nije ničime tretirana. Povećanjem koncentracije tobramicina proporcionalno se smanjuje čista zona oko bakterijskih kolonija, odnosno inhibira se proteolitička aktivnost bakterije. Različiti sojevi *P. aeruginosa* različito

reagiraju na antibiotik. Vidljivo je da je soj *P. aeruginosa* BB1285 (*rmtD*+) rezistentan na aminoglikozidne antibiotike jer nema nikakve promjene u proteolitičkoj aktivnosti bez obzira na koncentraciju dodanog tobramicina. Rezistenciju mu omogućuje enzim metil-transferaza koja metilirajući vezno mjesto aminoglikozidnog antibiotika, nukleotide mjesta A u 16S rRNA, onemogućuje njegovo vezanje i time učinkovitost (Morić i sur., 2010). Gledajući utjecaj eteričnog ulja mikromerije i kalaminte na proteolitičku aktivnost soja PA14 dolazi do inhibicije, odnosno smanjenja proteolitičke aktivnosti. Usporedno s djelovanjem samog tobramicina na inhibiciju proteolitičke aktivnosti soja PA14, djelovanje eteričnih ulja je jače nego djelovanje tobramicina koncentracije 0,5 µg/mL, a slabije nego koncentracije 2 µg/mL. Za soj ATCC 27835 se uočava razlika nakon dodatka samog tobramicina i samih eteričnih ulja pošto se dodatkom eteričnih ulja uočava blago povećanje proteolitičke aktivnosti što se ne događa nakon dodatka tobramicina. Na sojeve PAO1 i BB1285 (*rmtD*+) eterična ulja u ovoj koncentraciji nemaju vidljiv učinak. Koristeći kombinaciju eteričnih ulja u koncentraciji od 0,5 mg/mL i tobramicina koncentracije 0,5 µg/mL dolazi do smanjenja proteolitičke aktivnosti sojeva PA14 i PAO1, dok za sojeve ATCC 27835 i BB1285 (*rmtD*+) nema vidljive razlike. Kod soja PAO1 se uočava sinergistički učinak eteričnog ulja i antibiotika s obzirom da je proteolitička aktivnost jače inhibirana nakon dodatka kombinacije supstanci nego nakon dodatka samo jedne od supstanci. Povišenjem koncentracije tobramicina na 2 µg/mL u kombinaciji s eteričnim uljima koncentracije 0,5 mg/mL dolazi do inhibicije proteolitičke aktivnosti sojeva PA14 i PAO1, dok za sojeve ATCC 27853 i BB1285 (*rmtD*+) nema vidljivih promjena u odnosu na kontrolnu skupinu. Oba eterična ulja u kombinaciji s tobramicinom u navedenim koncentracijama pokazuju sinergistički učinak na inhibiciju proteolitičke aktivnosti soja PA14 pošto je čista zona oko bakterije manja nego nakon dodatka samo jedne od supstanci. Kod soja ATCC 27835 se uočava antagonistički učinak jer sam tobramicin u koncentraciji od 2 µg/mL ima jače inhibitorno djelovanje nego u kombinaciji s eteričnim uljima. Kod sojeva PAO1 i BB1285 (*rmtD*+) nema razlike u djelovanju samog tobramicina i kombinacije tobramicina i eteričnih ulja. Tokom cijelog pokusa je uočeno kako je intenzitet djelovanja eteričnih ulja mikromerije i kalaminte isti na sva četiri soja.

Drugi dio rada se bavi utjecajem eteričnih ulja i tobramicina, pojedinačno i u kombinaciji, na pokretljivost različitih sojeva *P. aeruginosa* u polukrutom mediju. Na ploči s 0,5% LB-agarom određeni sojevi *P. aeruginosa* pokazuju svojstvo rojenja. To je način kretanja koji zahtijeva funkcionalne flagele tipa IV i proizvodnju ramnolipida kao surfaktanata. Rojenje je također pod utjecajem QS sustava i, kao i proteolitička aktivnost, bitan je faktor virulencije jer omogućava

bakteriji lakše širenje. Promatran je promjer bakterijske kolonije koji označava u kojoj se mjeri bakterija roji. Učinkovitost dodanih supstanci se mjeri smanjenjem promjera kolonije jer to ukazuje na inhibiciju rojenja. U ovom pokusu nam je kontrolna skupina pokazala koji soj *P. aeruginosa* ima kakvu sposobnost rojenja, zbog toga što je takav oblik pokretanja ovisan o proizvodnji ramnolipida. Sojevi PAO1 i PA14 imaju vrlo izraženu sposobnost rojenja, ali u različitim obrascima. PA14 se širi radijalno od središta, u obrascu koji nalikuje na cvijet, a PAO1 se roji u pravilnom kružnom obrascu. Soj ATCC 27835 pokazuje jedva vidljivu sposobnost rojenja uz vrlo malo povećanje promjera, dok BB1285 (*rmtD+*) nema izraženu sposobnost rojenja. Tobramicin dodan već u subinhibitornoj koncentraciji uvelike smanjuje sposobnost rojenja, posebice sojeva PA14 i PAO1, ali i ATCC 27835. Iz razloga što je BB1285 (*rmtD+*) rezistentan na aminoglikozidne antibiotike, nema razlike u obrascima pokretljivosti između bakterija kod kojih je dodan tobramicin u podlogu u odnosu na kontrolnu skupinu. Porastom koncentracije tobramicina proporcionalno raste i inhibicija rojenja sojeva PA14, PAO1 i ATCC 27835. Eterična ulja djeluju inhibitorno na rojenje, ali dosta slabije u odnosu na sam tobramicin dodan u koncentraciji od 0,5 µg/mL. Korištena eterična ulja imaju kao glavnu djelatnu sastavnicu istu komponentu, pulegon, ali u različitim postotcima. Udio pulegona u eteričnom ulju *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch iznosi 59,7%, a u eteričnom ulju *Calamintha officinalis* iznosi 38,1%. Navedeni postotci su određeni analizom u vezanom sustavu plinski kromatograf-spektrometar masa na Zavodu za farmakognozijsku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. S obzirom da oba eterična ulja djeluju na inhibiciju rojenja sojeva PA14 i PAO1, ali različitim intenzitetom, pretpostavka je da je intenzitet djelovanja eteričnog ulja povezan s koncentracijom pulegona. Eterično ulje mikromerije s većim udjelom pulegona pokazuje nešto jači učinak nego eterično ulje kalaminte s manjim udjelom pulegona. Kod soja ATCC 27835 nakon dodatka eteričnih ulja također dolazi do inhibicije rojenja, no nema razlike u intenzitetu. Dolazi do negativnog učinka eteričnih ulja na inhibiciju rojenja soja BB1285 (*rmtD+*) pošto se uočava porast promjera kolonije. U ovom slučaju oba eterična ulja djeluju jednakim intenzitetom. Zanimljiv je rezultat kada se koristi kombinacija antibiotika i eteričnog ulja. Koncentracije eteričnih ulja mikromerije i kalaminte su iznosile 0,5 mg/mL, a koncentracija tobramicina se povećava s 0,5 µg/mL na 2 µg/mL. U odnosu na kontrolne skupine dolazi do inhibicije rojenja sojeva PA14, PAO1 i ATCC 27835 kada je korištena kombinacija i s nižom i s višom koncentracijom tobramicina. U slučaju kombinacije kada je korištena niža koncentracija tobramicina, kod sojeva PA14 i PAO1 se uočava sinergističko djelovanje eteričnog ulja mikromerije i tobramicina pošto je rojenje manje nego kada je korišten sam tobramicin iste koncentracije. Tobramicin niže koncentracije pojedinačno i u kombinaciji s

eteričnim uljem kalaminte ima jednak učinak na ova dva soja. Dodatak eteričnih ulja u kombinaciji s tobramicinom niže koncentracije za soj ATCC 27835 kod oba eterična ulja ima antagonistički učinak, no jače antagonističko djelovanje na tobramicin pokazuje eterično ulje kalaminte. Promatrajući soj BB1285 (*rmtD+*) vidi se porast promjera kolonije nakon dodatka kombinacije eteričnih ulja i niže koncentracije tobramicina te je porast kolonije veći nakon dodatka eteričnog ulja kalaminte. U slučaju kada se koristi viša koncentracija tobramicina u kombinaciji s eteričnim uljima, kod soja PA14 se vidi sinergistički učinak na inhibiciju rojenja te oba ulja djeluju jednakim intenzitetom. Povećanjem koncentracije tobramicina dolazi do promjene učinka na soj PAO1 jer se uočava antagonističko djelovanje eteričnih ulja na tobramicin, pri čemu eterično ulje mikromerije jače inhibira djelovanje tobramicina nego eterično ulje kalaminte. Kod soja ATCC 27835 se ponovno vidi antagonistički učinak oba eterična ulja na djelovanje tobramicina, te oba eterična ulja djeluju jednakim intenzitetom. S povišenjem koncentracije tobramicina u kombinaciji s eteričnim uljima ponovno dolazi do porasta promjera kolonije soja BB1285 (*rmtD+*), no u ovom slučaju je porast promjera veći nakon dodatka eteričnog ulja mikromerije. Mehanizam antagonističkog i sinergističkog djelovanja antibiotika i pojedinih sastavnica eteričnih ulja još nije potpuno razjašnjen. U pokusima prethodno napravljenim u laboratoriju (Koprivčić, 2019, Sičić, 2019) se također vidi dvojadi učinak eteričnog ulja ovisno o njegovoj koncentraciji na tvorbu biofilma i planktonske stanice *P. aeruginosa*. Pokazano je da eterično ulje kalaminte djeluje promotivno na stvaranje biofilma u određenom rasponu subinhibitornih koncentracija. Također je uočeno da u određenim subinhibitornim koncentracijama, u kombinaciji s tobramicinom, eterično ulje kalaminte te čisti pulegon imaju antagonistički učinak na tobramicin kada se promatra djelovanje na tvorbu biofilma. Za eterično ulje mikromerije su pokazane subinhibitorne koncentracije koje djeluju promotivno na rast planktonskih stanica i formiranje biofilma *P. aeruginosa*. U radu koji je istraživao utjecaj eteričnog ulja klinčića, *Syzygium aromaticum*, *Myrtaceae*, pokazalo se povoljno djelovanje subinhibitornih koncentracija ulja na aktivnost elastaze LasB. Njezina aktivnost je pod utjecajem QS sustava i jedan je od faktora virulencije bakterije *P. aeruginosa* te je bila znatno inhibirana dodatkom eteričnog ulja klinčića. (Husain i sur., 2013). Gledajući utjecaj drugih eteričnih ulja porodice *Lamiaceae*, poput eteričnog ulja bosiljka, *Ocimum basilicum* i kadulje, *Salvia officinalis* na pokretljivost *P. aeruginosa* u obliku rojenja zapaženo je dvojadi djelovanje eteričnih ulja. Proučavani su sojevi izolirani iz različitih ljudskih materijala (uho, oko, koža, urin) te su korištene više koncentracije eteričnih ulja nego u ovome radu (MIC/2). Za oba je eterična ulja, ovisno o bakterijskom soju bilo uočeno inhibitorno, no i promotivno djelovanje na rojenje (Pejčić i sur., 2020). Iz svega navedenog vidi

se da su potrebna dodatna istraživanja kako bi se razjasnio mehanizam djelovanja eteričnih ulja, utvrdio potreban omjer eteričnih ulja i antibiotika da se dobije željeni sinergistički učinak. Pri tome treba uzeti u obzir i raznolikost svojstava i obrazaca ponašanja različitih sojeva *P. aeruginosa* koji pristup liječenju čine još kompleksnijim i izazovnijim.

5. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

- Tobramicin u koncentracijama iznad 2 µg/mL djeluje inhibitorno na proteolitičku aktivnost, dok je koncentracija 0,5 µg/mL je dovoljna za inhibiciju rojenja sojeva PAO1, PA14 i ATCC 27835. Na soj BB1285 (*rmtD+*) tobramicin u ispitanim koncentracijama nema učinak zbog njegove rezistencije.
- Eterično ulje *Micromeria thymifolia* (Scop.) Frisch i eterično ulje *Calamintha officinalis* imaju jednak učinak na proteolitičku aktivnost ispitanih sojeva. Djeluju inhibitorno za soj PA14, promotivno za soj ATCC 27835, a na sojeve PAO1 i BB1285 (*rmtD+*) nemaju izražen učinak. Učinak na inhibiciju rojenja se razlikuje i jači je za eterično ulje *Micromeria thymifolia* (Scop.) Frisch za sojeve PAO1 i PA14. Djelovanje na sojeve ATCC 27835 i BB1285 (*rmtD+*) je jednakog intenziteta, ali na ATCC 27835 imaju inhibitoran, a na BB1285 (*rmtD+*) promotivan učinak.
- Kombinacija tobramicina i eteričnog ulja *Micromeria thymifolia* pokazuje jednaki učinak na proteolitičku aktivnost kao i kombinacija tobramicina i eteričnog ulja *Calamintha officinalis*. Učinak je pretežito sinergistički i smanjuje proteolitičku aktivnost sojeva PAO1, PA14 i ATCC 27835. Kod soja BB1285 (*rmtD+*) nema izraženog učinka.
- Kombinacija tobramicina i eteričnog ulja *Micromeria thymifolia* kao i kombinacija tobramicina i eteričnog ulja *Calamintha officinalis* za sojeve PAO1, PA14 i ATCC 27835 djeluje na smanjenje rojenja za razliku od djelovanja na soj BB1285 (*rmtD+*) gdje djeluje promotivno. Kod soja PA14 se vidi sinergističko djelovanje, kod soja ATCC 27835 antagonističko, a kod PAO1 djelovanje ovisi i o eteričnom ulju i koncentraciji tobramicina, ali pri višim koncentracijama tobramicina oba eterična ulja djeluju antagonistički.
- Mehanizam međudjelovanja eteričnih ulja i antibiotika je veoma kompleksan i nedovoljno istražen te ovaj rad pridonosi korak dalje u njegovom razumijevanju.

6. LITERATURA

Babić F, Venturi V, Maravić-Vlahoviček V. Tobramycin at subinhibitory concentration inhibits the RhII/R quorum sensing system in a *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolate. *BMC Infect Dis*, 2010, 10:148.

Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 6, 71–79.

Bockstael K, Van Aerschot A. Antimicrobial resistance in bacteria. *Cent Eur J Med*, 2009, 4, 141-155.

Božović M, Ragno R. *Calamintha nepeta* (L.) Savi and its Main Essential Oil Constituent Pulegone: Biological Activities and Chemistry. *Molecules*, 2017, 22, 290.

Bradshaw JL, Caballero AR, Bierdeman MA, Adams KV, Pipkins HR, Tang A, O’Callaghan RJ, McDaniel LS. *Pseudomonas aeruginosa* Protease IV Exacerbates Pneumococcal Pneumonia and Systemic Disease. *mSphere*, 2018, 3, 3, e00212-18.

Bukvičkia D, Ćirić A, Soković M, Vannini L, Nissen L, Novaković M, Vujisić Lj, Asakawa Y and Marin PD. *Micromeria thymifolia* Essential Oil Suppresses Quorum-sensing Signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Prod Commun*, 2016, 11, 1903 – 1906.

Caiazza NC, Shanks RMQ, O’Toole GA. Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol Res*, 2005, 187,7351–7361.

Campa M, Bendinelli M, Friedman H. *Pseudomonas aeruginosa* as an Opportunistic Pathogen. 1993, 1, 1-13.

Čabarkapa I, Čolović R, Đuragić O, Popović S, Kokić B, Milanov D, Pezo L. Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella enteritidis*. *Biofouling*, 2019, 35, 361-375.

El-Hosseiny L, El-Shenawy M, Haroun M, Abdullah F. Comparative Evaluation of the Inhibitory Effect of Some Essential Oils with Antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antibiot*, 2014, 586252.

Filloux A., Ramos JL. *Pseudomonas* Methods and Protocols, 2014, I str. 67-70, II str. 165-170.

- Gutierrez B, Douthwaite S, Gonzalez-Zorn B. Indigenous and acquired modifications in the aminoglycoside binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* rRNAs. *RNA Biol*, 2013, 10, 1324-1332.
- Husain F, Ahmadi I, Asif M, Thseen Q. Influence of clove oil on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*. *J. Biosci*, 2013, 38 835–844.
- Ibrahim D, Jabbour JF, Kanj SS. Current choices of antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Curr Opin Infect Dis*, 2020, 33, 464–473.
- Koprivčić D. Učinkak eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis Moench* i pulegona na rast i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa*. *Diplomski rad*, 2019, Sveučilište u Zagrebu.
- Koziróg A, Otlewska A Brycki B. Viability Enzymatic and Protein Profiles of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm and Planktonic Cells after Monomeric/Gemini Surfactant Treatment. *Molecules*, 2018, 23, 1294.
- Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*, 2014, 6, 26–41.
- Marinković B, Vuković-Gačić B, Knežević-Vukčević I, Marin PD, Soković M, Duletić-Lausević S. Antibacterial activity of the essential oil of *Micromeria thymifolia* and *M. albanica* (*Lamiaceae*). *Bocconea*, 2003, 16, 1131-1134.
- Morić I, Savić M, Ilić-Tomić T, Vojnović S, Bajkić S, Vasiljević B. rRNA Methyltransferases and Their Role in Resistance to Antibiotics. *J Med Biochem*, 2010, 29,165 –174.
- O'Donnell JN, Bidell MR, Lodise TP. Approach to the Treatment of Patients with Serious Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Pharmacotherapy*, 2020, 40, 952–969.
- Overhage J, Bains M, Brazas MD, Hancock REW. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is a Complex Adaptation Leading to Increased Production of Virulence Factors and Antibiotic Resistance. *J Bacteriol Res*, 2008, 190, 2671–2679.
- Panga Z, Raudonisb R, Glickc BR, Lina TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*, 2019, 37, 177-192.

- Pejčić M, Stojanović-Radić Z, Genčić M, Dimitrijevića M, Radulović N. Anti-virulence potential of basil and sage essential oils: Inhibition of biofilm formation, motility and pyocyanin production of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Food Chemical Toxicol*, 2020, 141, 111431.
- Robitaille S, Groleau MC, Déziel E. Swarming motility growth favours the emergence of a subpopulation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutants. *Environ Microbiol*, 2020, doi:10.1111/1462-2920.15042.
- Rocha AJ, Ramos de Oliveira Barsottini M, Rhonalty R, Laurindo MV, Leandro F, de Moraes L, da Rocha SL. *Pseudomonas aeruginosa*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance Genes, *Braz Arch Biol Technol*, 2019, 62, e19180503.
- Sičić I. Učinak eteričnog ulja vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i pulegona na rast i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa*. *Diplomski rad*, 2019, Sveučilište u Zagrebu.
- Scoffone VC, Trespidi G, Chiarelli LR, Barbieri G, Buroni S. Quorum Sensing as Antivirulence Target in Cystic Fibrosis Pathogens. *Int J Mol Sci*, 2019, 20, 1838.
- Sherrard LJ, Tunney MM, Elborn JS. Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. *Lancet*, 2014, 384, 703–13.
- Soo Xi Yap P, Yiap BC, Ping HC, Hua S, Lim E. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *Open Microbiol J*, 2014, 8, 6-14.
- Soukariéh F, Williams P, Stocks MJ, Camara M. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems as Drug Discovery Targets: Current Position and Future Perspectives. *J Med Chem*, 2018, 61, 10385–10402.
- Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. Hindawi Publishing Corporation, 2016, 3012462, 1-21.
- Tang A, Caballero AR, Marquart ME, Bierdeman MA, O’Callaghan RJ. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* Small Protease (PASP), a Corneal Virulence Factor. *IOVS*, 2018, 59, 15, 5997.
- Thormar H. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. Wiley, 2011, str, 2-20, 203-223.
- Tommonaro G. Quorum Sensing Molecular Mechanism and Biotechnological Application. Academic Press, 2020, 1, 3.

Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, Rosenau F, Jaeger KE. The Autotransporter Esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* Is Required for Rhamnolipid Production, Cell Motility, and Biofilm Formation. *J Bacteriol Res*, 2007, 6695–6703.

Kemijska struktura tobramicina,
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/36294#section=3D-Conformer>, pristupljeno
12.06.2021.

Kemijska struktura pulegona, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pulegone>,
pristupljeno 12.06.2021.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa je kao oportunistički patogen postao jedan od najčešćih uzročnika bolničkih infekcija. Može dovesti do ozbiljnih posljedica nakon infekcije pluća, kože, oka, rana te urinarnog trakta. Ima vrlo razvijenu sposobnost ekspresije mnoštva faktora virulencije koji mu omogućavaju kolonizaciju tkiva domaćina, njegovo uništavanje te obranu od imunskog sustava. Također ima učinkovite načine izbjegavanja djelovanja antibiotika što otežava liječenje infekcija. Bakterijska međustanična komunikacija omogućava stvaranje i izlučivanje faktora virulencije te razne bakterijske aktivnosti poput pokretljivosti u obliku plivanja i rojenja, stvaranja biofilma, sekundarnih metabolita, korištenja hemoglobina kao izvora željeza te antibiotske rezistencije. Kako bi se smanjila doza antibiotika korištenih u borbi protiv patogenih bakterija razmatra se utjecaj eteričnih ulja zasebno, te u kombinaciji sa antibioticima. Eterična ulja su prirodni, lako hlapljivi spojevi podrijetlom iz biljaka koji se u tradicionalnoj medicini koriste kao antispazmodici, emenagozi, diaforetici, diuretici, karminativi i ekspektoransi, ali imaju dokazano antibakterijsko, antivirusno i antifungalno djelovanje. U ovom radu je ispitan utjecaj eteričnih ulja biljnih vrsta *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i *Calamintha officinalis* u koncentraciji 0,5 mg/mL te aminoglikozidnog antibiotika tobramicina u subinhibitornim koncentracijama 0,5 µg/mL i 2 µg/mL na proteolitičku aktivnost i pokretljivost raznih sojeva *P. aeruginosa*. Uočena je razlika u ponašanju sojeva i njihovoj reakciji na dodatak tobramicina i eteričnih ulja pojedinačno te u kombinaciji. Tobramicin se pokazao djelotvoran u inhibiciji proteolitičke aktivnosti i rojenja za sojeve PAO1, PA14 i ATCC 27835, ali ne i za visoko rezistentni soj BB1285 (*rmtD+*). Eterična ulja pokazuju inhibitoran učinak na proteolitičku aktivnost soja PA14, potiču proteolitičku aktivnost soja ATCC 27835, a na sojeve PAO1 i BB1285 (*rmtD+*) u korištenoj koncentraciji nemaju izražen učinak. Oba ulja inhibiraju rojenje sojeva PAO1 i PA14, no jači učinak pokazuje ulje *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, moguće zbog većeg udjela pulegona. Na soj ATCC 27835 oba ulja djeluju inhibitorno, a na BB1285 (*rmtD+*) promotivno, ali jednakom jačinom. Oba ulja u kombinaciji s tobramicinom imaju sinergistički učinak na smanjenje proteolitičke aktivnosti svih sojeva osim BB1285 (*rmtD+*) na kojem se ne opaža učinak. Kombinacija eteričnih ulja i antibiotika djeluje promotivno na rojenje soja BB1285 (*rmtD+*), a na sve ostale sojeve inhibitorno. Sinergistički učinak eteričnih ulja i antibiotika je zapažen kod soja PA14, dok je kod sojeva ATCC 27835 i PAO1 pri višim koncentracijama tobramicina učinak antagonistički. Ovaj rad pridonosi naporima u razumijevanju još do sada nerazjašnjenih mehanizama međudjelovanja eteričnih ulja i antibiotika te stvara temelj za daljnja istraživanja

usmjerena prema traženju novih opcija liječenje infekcija uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa*.

As an opportunistic pathogen, *Pseudomonas aeruginosa* has become one of the most common causes of nosocomial infections. It can lead to serious consequences after infection of the lungs, skin, eyes, wounds and urinary tract. It has a strong ability to express many virulence factors that allow it to colonize and destroy host tissue and evade the immune system. It also shows many ways to avoid the effects of antibiotics, which makes infections difficult to treat. Quorum sensing enables the production and secretion of virulence factors and various bacterial activities such as motility in the form of swimming and swarming, biofilm formation, production of secondary metabolites, the use of hemoglobin as a source of iron and antibiotic resistance. To reduce the dose of antibiotics for treatment of bacterial infections, the use of essential oils is considered separately, and in combination with antibiotics. Essential oils are natural, easily volatile compounds derived from plants that are used in traditional medicine as antispasmodics, emmenagogues, diaphoretics, diuretics, carminatives and expectorants, and have shown antibacterial, antiviral and antifungal activity. This work examined the effect of essential oils of plant species *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch and *Calamintha officinalis* at a concentration of 0,5 mg/mL and the aminoglycoside antibiotic tobramycin at subinhibitory concentrations of 0,5 µg/mL and 2 µg/mL on proteolytic activity and swarming of various strains of *P. aeruginosa*. The addition of tobramycin and essential oils individually and in combination showed different effects on different strains. Tobramycin was effective in inhibiting proteolytic activity and swarming for strains PAO1, PA14 and ATCC 27835, but not for the highly resistant strain BB1285 (*rmtD+*). Essential oils showed an inhibitory effect on the proteolytic activity of strain PA14, stimulated the proteolytic activity of strain ATCC 27835, while on strains PAO1 and BB1285 (*rmtD+*) did not show notable effect. Both essential oils inhibit the swarming of PAO1 and PA14 strains, but stronger effect is shown by *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch oil, possibly due to the higher proportion of pulegone. Both oils in combination with tobramycin have a synergistic effect on reducing the proteolytic activity of all strains except BB1285 (*rmtD+*), on which no effect is observed. The combination of essential oils and antibiotics showed promotive swarming effect for BB1285 (*rmtD+*), and inhibitory effect on swarming of all other strains. A synergistic effect of essential oils and antibiotics was observed in strains PA14, while in strains ATCC 27835 and PAO1 at higher concentrations of tobramycin the effect was antagonistic. This work supports the efforts to

understand the mechanisms of the interaction of essential oils and antibiotics and provides a basis for further research to find new treatment options for infections caused by *P. aeruginosa*.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Utjecaj eteričnog ulja biljnih vrsta *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i *Calamintha officinalis* na proteolitičku aktivnost i pokretljivost bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Nives Kerner

Pseudomonas aeruginosa je kao oportunistički patogen postao jedan od najčešćih uzročnika bolničkih infekcija. Može dovesti do ozbiljnih posljedica nakon infekcije pluća, kože, oka, rana te urinarnog trakta. Ima vrlo razvijenu sposobnost ekspresije mnoštva faktora virulencije koji mu omogućavaju kolonizaciju tkiva domaćina, njegovo uništavanje te obranu od imunskog sustava. Također ima učinkovite načine izbjegavanja djelovanja antibiotika što otežava liječenje infekcija. Bakterijska međustanična komunikacija omogućava stvaranje i izlučivanje faktora virulencije te razne bakterijske aktivnosti poput pokretljivosti u obliku plivanja i rojenja, stvaranja biofilma, sekundarnih metabolita, korištenja hemoglobina kao izvora željeza te antibiotske rezistencije. Kako bi se smanjila doza antibiotika korištenih u borbi protiv patogenih bakterija razmatra se utjecaj eteričnih ulja zasebno, te u kombinaciji sa antibioticima. Eterična ulja su prirodni, lako hlapljivi spojevi podrijetlom iz biljaka koji se u tradicionalnoj medicini koriste kao antispazmodici, emenagozi, diaforetici, diuretici, karminativi i ekspektoransi, ali imaju dokazano antibakterijsko, antivirusno i antifungalno djelovanje. U ovom radu je ispitan utjecaj eteričnih ulja biljnih vrsta *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i *Calamintha officinalis* u koncentraciji 0,5 mg/mL te aminoglikozidnog antibiotika tobramicina u subinhibitornim koncentracijama 0,5 µg/mL i 2 µg/mL na proteolitičku aktivnost i pokretljivost raznih sojeva *P. aeruginosa*. Uočena je razlika u ponašanju sojeva i njihovoj reakciji na dodatak tobramicina i eteričnih ulja pojedinačno te u kombinaciji. Tobramicin se pokazao djelotvoran u inhibiciji proteolitičke aktivnosti i rojenja za sojeve PAO1, PA14 i ATCC 27835, ali ne i za visoko rezistentni soj BB1285 (*rmtD+*). Eterična ulja pokazuju inhibitoran učinak na proteolitičku aktivnost soja PA14, potiču proteolitičku aktivnost soja ATCC 27835, a na sojeve PAO1 i BB1285 (*rmtD+*) u korištenoj koncentraciji nemaju izražen učinak. Oba ulja inhibiraju rojenje sojeva PAO1 i PA14, no jači učinak pokazuje ulje *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, moguće zbog većeg udjela pulegona. Na soj ATCC 27835 oba ulja djeluju inhibitorno, a na BB1285 (*rmtD+*) promotivno, ali jednakom jačinom. Oba ulja u kombinaciji s tobramicinom imaju sinergistički učinak na smanjenje proteolitičke aktivnosti svih sojeva osim BB1285 (*rmtD+*) na kojem se ne opaža učinak. Kombinacija eteričnih ulja i antibiotika djeluje promotivno na rojenje soja BB1285 (*rmtD+*), a na sve ostale sojeve inhibitorno. Sinergistički učinak eteričnih ulja i antibiotika je zapažen kod soja PA14, dok je kod sojeva ATCC 27835 i PAO1 pri višim koncentracijama tobramicina učinak antagonistički. Ovaj rad pridonosi naporima u razumijevanju još do sada nerazjašnjenih mehanizama međudjelovanja eteričnih ulja i antibiotika te stvara temelj za daljnja istraživanja usmjerena prema traženju novih opcija liječenje infekcija uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa*.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 21 sliku, 8 tablica i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Pseudomonas aeruginosa*, bakterijska međustanična komunikacija, eterično ulje, *Micromeria Thymifolia* (Scop.) Fritsch, *Calamintha officinalis*, pulegon, tobramicin, proteolitička aktivnost, rojenje

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

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

Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Maja Bival Štefan, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj, 2021.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Influence of *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch and *Calamintha officinalis* essential oils on proteolytic activity and motility of *Pseudomonas aeruginosa*

Nives Kerner

As an opportunistic pathogen, *Pseudomonas aeruginosa* has become one of the most common causes of nosocomial infections. It can lead to serious consequences after infection of the lungs, skin, eyes, wounds and urinary tract. It has a strong ability to express many virulence factors that allow it to colonize and destroy host tissue and evade the immune system. It also shows many ways to avoid the effects of antibiotics, which makes infections difficult to treat. Quorum sensing enables the production and secretion of virulence factors and various bacterial activities such as motility in the form of swimming and swarming, biofilm formation, production of secondary metabolites, the use of hemoglobin as a source of iron and antibiotic resistance. To reduce the dose of antibiotics for treatment of bacterial infections, the use of essential oils is considered separately, and in combination with antibiotics. Essential oils are natural, easily volatile compounds derived from plants that are used in traditional medicine as antispasmodics, emmenagogues, diaphoretics, diuretics, carminatives and expectorants, and have shown antibacterial, antiviral and antifungal activity. This work examined the effect of essential oils of plant species *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch and *Calamintha officinalis* at a concentration of 0,5 mg/mL and the aminoglycoside antibiotic tobramycin at subinhibitory concentrations of 0,5 µg/mL and 2 µg/mL on proteolytic activity and swarming of various strains of *P. aeruginosa*. The addition of tobramycin and essential oils individually and in combination showed different effects on different strains. Tobramycin was effective in inhibiting proteolytic activity and swarming for strains PAO1, PA14 and ATCC 27835, but not for the highly resistant strain BB1285 (*rmtD+*). Essential oils showed an inhibitory effect on the proteolytic activity of strain PA14, stimulated the proteolytic activity of strain ATCC 27835, while on strains PAO1 and BB1285 (*rmtD+*) did not show notable effect. Both essential oils inhibit the swarming of PAO1 and PA14 strains, but stronger effect is shown by *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch oil, possibly due to the higher proportion of pulegone. Both oils in combination with tobramycin have a synergistic effect on reducing the proteolytic activity of all strains except BB1285 (*rmtD+*), on which no effect is observed. The combination of essential oils and antibiotics showed promotive swarming effect for BB1285 (*rmtD+*), and inhibitory effect on swarming of all other strains. A synergistic effect of essential oils and antibiotics was observed in strains PA14, while in strains ATCC 27835 and PAO1 at higher concentrations of tobramycin the effect was antagonistic. This work supports the efforts to understand the mechanisms of the interaction of essential oils and antibiotics and provides a basis for further research to find new treatment options for infections caused by *P. aeruginosa*.

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

Thesis includes: 45 pages, 21 pictures, 8 tables and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing, essential oil, *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, *Calamintha officinalis*, pulegone, tobramycin, proteolytic activity, swarming

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

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

Maja Šegvić Klarić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Maja Bival Štefan, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: june 2021.