

Utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. i timola na pokretljivost te proteolitičku aktivnost bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Duspara, Fran

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:163:887588>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

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



Fran Duspara

Utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. i timola na pokretljivost te proteolitičku aktivnost bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček na velikoj pomoći i uloženom trudu u ovom turbulentnom vremenu pri realizaciji ovoga rada.
Hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci kroz moj studij. Hvala mojoj ekipi iz srednje i fakulteta što su bili kraj mene i učinili mi studiranje najljepšim.*

SADRŽAJ

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 |
| 1.1.1. Čimbenici virulencije i proteolitička aktivnost <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 |
| 1.1.2. Bakterijska međustanična komunikacija <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 3 |
| 1.1.3. Rojenje <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4 |
| 1.1.4. Rezistencija <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na antimikrobnu terapiju | 5 |
| 1.2. Aminoglikozidni antibiotici i tobramicin | 7 |
| 1.3. Eterična ulja | 8 |
| 1.3.1. Sastav eteričnih ulja | 9 |
| 1.3.2. Antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja | 10 |
| 1.3.3. Interakcija između eteričnog ulja i antibiotika | 11 |
| 1.4. Eterično ulje biljne vrste <i>Satureja montana</i> L. | 11 |
| 1.5. Timol | 13 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 15 |
| 3.1. Materijali | 15 |
| 3.1.1. Bakterije | 15 |
| 3.1.2. Antibiotici | 15 |
| 3.1.3. Eterična ulja | 15 |
| 3.1.4. Standardne kemikalije i otopine | 15 |
| 3.1.5. Hranjivi medij | 15 |
| 3.1.6. Filteri za sterilizaciju | 16 |
| 3.2. Metode | 16 |
| 3.2.1. Priprava otopina eteričnog ulja biljne vrste <i>Satureja montana</i> L. i timola | 16 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije aminoglikozidnog antibiotika tobramicina..... | 16 |
| 3.2.3 Ispitivanje proteolitičke aktivnosti <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 17 |
| 3.2.4. Ispitivanje pokretljivosti <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 18 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 19 |
| 4.1. REZULTATI..... | 19 |
| 4.1.1 Minimalna inhibitorna koncentracija | 19 |
| 4.1.2. Učinak eteričnog ulja vrste <i>Satureja montana</i> L., timola i tobramicina na proteolitičku aktivnost različitih sojeva <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 22 |
| 4.1.3. Rojenje <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 28 |
| 4.2. RASPRAVA | 34 |
| 5. ZAKLJUČAK | 38 |
| 6. LITERATURA | 39 |
| 7. SAŽETAK/SUMMARY | 42 |
| 8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD | |

1.UVOD

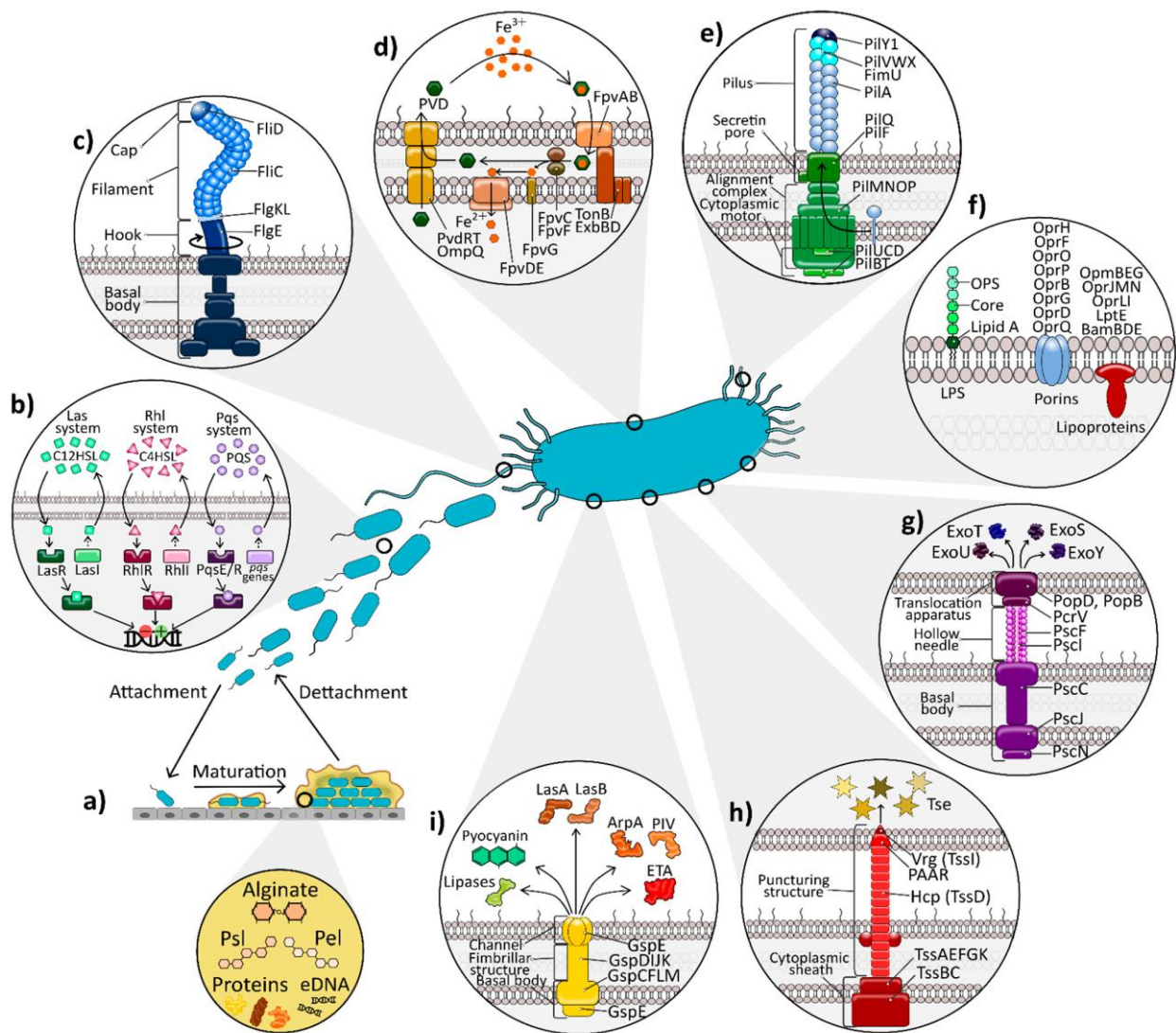
1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Oportunistički patogen *Pseudomonas aeruginosa* sve je češći uzročnik bolničkih infekcija. Iako vrlo rijetko izaziva bolest kod zdravih pojedinaca, pacijenti koji imaju otvoreni prijelom ili kateter u mokraćnom mjehuru te imunokompromitirane osobe, posebice pacijenti koji boluju od cistične fibroze, pod velikim su rizikom od težih oblika infekcija upravo zbog manjka specifične imunosti organizma. Ovoj Gram-negativnoj bakteriji godi vlažno okruženje te je zbog malih nutritivnih zahtjeva ubikvitarna i možemo je pronaći u različitim okolišnim uvjetima kao što su kapi za oči te otopine za leće, javna kupališta, opreme za dijalizu, antiseptičke otopine u bolnicama, dezinficijensi. Sve više se pojavljuju sojevi *P. aeruginosa* koji su izuzetno otporni na antimikrobnu terapiju i to predstavlja sve veći problem u pronalaženju optimalne terapije. Stoga je prije liječenja potrebno provesti testove osjetljivosti soja na antimikrobnu terapiju. Sposobnost koloniziranja različitih površina omogućena je brojnim čimbenicima virulencije, poput strukturnih kao što su pili, lipopolisaharidi i flagele koji su zaslužni za adherenciju bakterije te sekrecijskih kao što su egzotoksini, proteaze i hemolizin, a signalne molekule bakterijske međustanične komunikacije potpomažu invaziju domaćina (Kalenić i sur., 2013).

1.1.1. Čimbenici virulencije i proteolitička aktivnost *Pseudomonas aeruginosa*

Zbog mnoštva čimbenika virulencije, *P. aeruginosa* je sposobna napraviti veliku štetu u tkivu domaćina. Čimbenike virulencije dijelimo na strukturne i sekrecijske. Strukturni čimbenici virulencije *P. aeruginosa* su flagele, fimbrije i pili te lipopolisaharid. Osim što služe za adheziju na površinu tkiva domaćina, flagele, fimbrije i pili služe i za pokretljivost bakterije, što se očituje trzanjem (engl. *twitching*), odnosno puzanjem ili rojenjem bakterije (engl. *swarming*; dalje u tekstu rojenje). Sekrecijski čimbenici virulencije dijele se u 4 tipa sekrecijskog sustava. U tip I sekrecijski sustav spadaju proteini alkalna proteaza, pioverdin i piocijanin. U tip II sekrecijski sustav spadaju različite elastaze i proteaze, egzotoksin A i fosfolipaza C. U tip III sekrecijski sustav spadaju različiti egzotoksini, primjerice egzotoksini Y, T, U i S. U tip IV sekrecijski sustav spadaju mukoidni egzopolisaharid alginat te signalne molekule za bakterijsku međustaničnu komunikaciju (engl. *quorum sensing*) poput acil-homoserin laktone. Egzotoksin A i lipopolisaharid pokazali su se najbitnijim čimbenicima

virulencije u težim oblicima infekcije *P. aeruginosa*, dok siderofori pioverdin i piokelin keliraju esencijalni nutrijent željezo iz transferina i laktoferina domaćina i time održavaju daljnju infekciju (Kalenić i sur., 2013). Navedeni čimbenici virulencije prikazani su na slici 1.



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

Proteaze *P. aeruginosa* istaknule su se kao bitni čimbenici virulencije zbog oštećenja tkiva domaćina i interferencije s antibakterijskim obrambenim mehanizmom domaćina. Istraživanje je pokazalo kako su preživjele bakterijske kolonije i nakon četverodnevne cikličke izloženosti ciprofloksacinu u baktericidnim koncentracijama izlučivale aktivne proteaze, poput elastaze B (LasB), u okoliš oko biofilma. Nakon presađivanja preživjelih kolonija u svježi medij,

bakterijske kolonije *P. aeruginosa* pokazale su povećanu prolaznu otpornost na ciprofloksacin u usporedbi s netretiranim bakterijama (Oldak i Trafny, 2005).

Uviđamo kako je smanjenje proteolitičke aktivnosti odličan pokazatelj djelovanja antibiotika na *P. aeruginosa*.

1.1.2. Bakterijska međustanična komunikacija *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterijska međustanična komunikacija (engl. *quorum sensing*, QS) pomoću višestrukih međusobno povezanih signalnih puteva omogućuje bakterijskim kolonijama reguliranje različitih bioloških procesa važnih za adaptaciju i opstanak u okolišu. QS se temelji na reguliranju ekspresije specifičnih skupina gena kao odgovor na autoinduktove, male difuzibilne signalne molekule. Geni regulirani QS-om zaslužni su za kontrolu mehanizama antibiotske rezistencije, pokretljivosti poput rojenja i plivanja, stvaranje biofilma i sekundarnih metabolita, proizvodnju čimbenika virulencije poput egzotoksina, piocijanina, cijanovodika i elastaze (Moradali i sur., 2017). Autoinduktori se mogu detektirati u sputumu pacijenata te je koncentracija u sputumu pokazala pozitivnu korelaciju s koncentracijom u plazmi pacijenata što ukazuje da su signalne molekule potencijalni biomarkeri *P. aeruginosa* i time olakšavaju dijagnosticiranje i odgovor na liječenje ove bakterije (Barr i sur., 2015). Kod *P. aeruginosa* poznata su četiri QS signalna puta: Las, Rhl, Pqs i IQS (Tablica 1). QS signalni sustav je autoregulatoran, no i hijerarhijski, što znači da Las sustav koji je na vrhu hijerarhijske mreže pozitivno regulira sebe i ostale sustave.

Tablica 1. QS signalni putevi *P. aeruginosa*

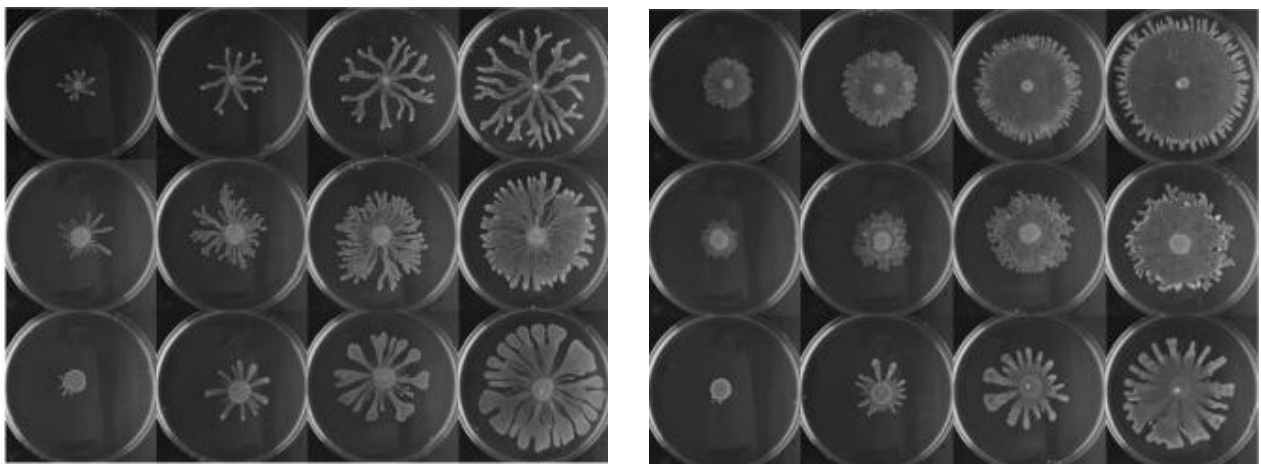
(preuzeto i prilagođeno iz Lee i Zhang, 2014; Moradali i sur., 2017).

| QS Signalni putevi | I | II | III | IV |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| | Las | Rhl | Pqs | IQS |
| Autoinduktori | N-acil-homoserin laktoni -N-(3-okso-C12)-homoserin lakton HSL -N-butilil-homoserin lakton BHL | 2-alkil-4-kinoloni -3,2-heptil-4-hidroksikinolin HHQ -4,2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon PQS | | 2-(2-hidroksifenil)-tiazol-4-karbaldehid IQS |
| Uloga | Regulacija sustava Rhl i Pqs Aktivacija ekspresije gena za kodiranje elastaze LasA, Las B, ezotoksina A, fofolipaze C, alkalne proteaze i pioverdina | Kodiranje receptora za signalne molekule međustanične komunikacije (<i>rhlR, pqsR</i>) Kodiranje gena za sintazu autoinduktora (<i>lasI, rhlI, pqsH</i>) | | Nedovoljno istražen |
| | | Ekspresija gena koji kodiraju elastazu LasB, piocijanin i ramnolipide | Ekspresija gena koji kodiraju piocijanin i lecitin A | |

1.1.3. Rojenje *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa sposobna je trzati (engl. *twitching*), plivati (engl. *swimming*) te se rojiti ili puzati (engl. *swarming*) ovisno u kojem se mediju nalazi. Dok u tekućem mediju pliva, u polukrutom mediju se roji, a u krutom mediju trza. Rojenje je ovisno o okolišu i uvjetima u kojima se bakterija nalazi. Rojenje se istaknulo kao kompleksna prilagodba bakterije na okolišne uvjete, dovodeći do metaboličkih promjena i promjena u genskoj ekspresiji bakterija

(Overhage i sur., 2008). Za rojenje u polukrutom mediju potrebne su funkcionalne flagele i proizvodnja ramnolipida, a genska analiza pokazala je kako je proizvodnja ramnolipida zaslužna za modulaciju tih kretnji. Bakterije s deficijencijom proizvodnje mono- i diramnolipida imaju izmijenjene uzorke rojenja. Ramnolipidi djeluju kao biosurfaktanti, smanjujući površinsku napetost između površine medija i samih bakterija te tako omogućuju lakše prianjanje bakterija na površinu. Za takvo djelovanje zaslužna je njihova struktura. Ramnolipidi se sastoje β -hidroksi masne kiseline (hidrofobni dio) povezane karboksilnim krajem s molekulom šećera ramnoze (hidrofilni dio) (Chong i Li, 2017). Upravo su ramnolipidi sve više razmatrani u industrijskoj proizvodnji kao zamjena za sintetske surfaktante, budući da su prirodnog podrijetla, niske toksičnosti i biorazgradivi, i kao takvi ekološki prihvatljivija alternativa (Randhawa i sur., 2014). Slika 2 prikazuje primjere uzoraka rojenja divljeg tipa *P. aeruginosa* na 0,5 % agaru.



Slika 2. Rojenje divljeg tipa *P. aeruginosa* na 0,5 % agaru

(preuzeto iz Yang i sur., 2017).

1.1.4. Rezistencija *Pseudomonas aeruginosa* na antimikrobnu terapiju

Pseudomonas aeruginosa posebno se ističe zbog svoje velike intrinzične otpornosti na antibiotike. Ni najnoviji antibiotici nisu se pokazali učinkovitim te upravo oko 10 % bolničkih infekcija uzrokuje upravo *P. aeruginosa*. Intrinzična otpornost temelji se na slaboj propusnosti stanične stijenke te sekundarnim mehanizmima rezistencije poput β -laktamaza, aminoglikozidaza i energetske ovisne efluksne pumpe. Dokazano je postojanje barem 12 efluksnih pumpi koje su sposobne izbaciti mnoštvo različitih vrsta antibiotika poput β -laktama i fluorokinolona. Isto tako postoji i stečena rezistencija na antibiotike kao posljedica prilagodbe

P. aeruginosa na terapiju ili uvjete okoliša (Hancock i Speert, 2000). Tablica 2 prikazuje glavne skupine antibiotika korištene za terapiju infekcija *P. aeruginosa* te neke od mehanizama rezistencije bakterije na antibiotike.

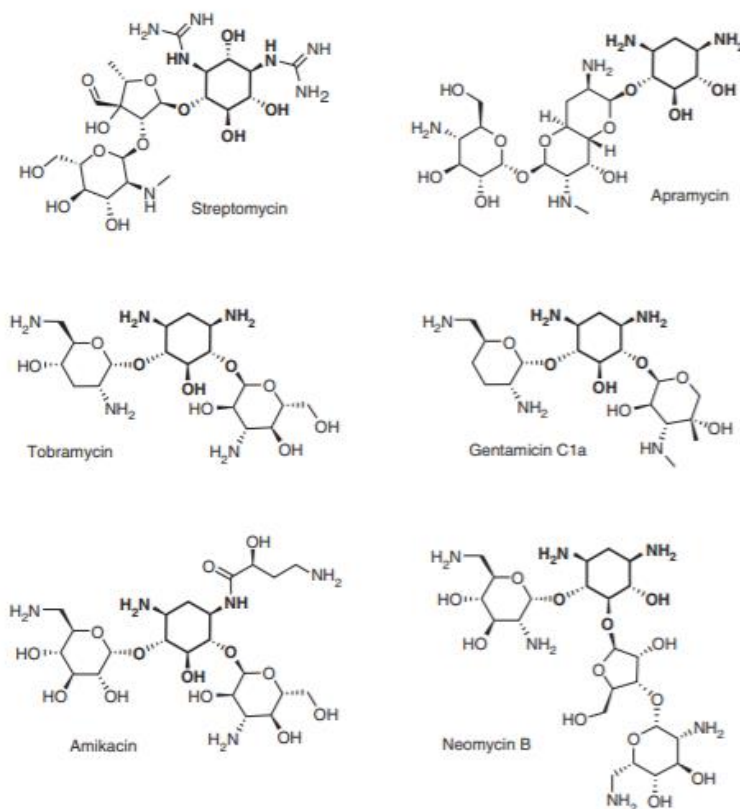
Tablica 2. Mehanizmi rezistencije bakterije na antibiotike (Preuzeto i prilagođeno iz Hancock i Speert, 2000).

| Skupina antibiotika | Primjer antibiotika | Mehanizam rezistencije |
|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Penicilini | Piperacilin Karbenicilin | Aktivacija ekspresije kromosomske β -laktamaze; Povećana ekspresija MexAB-OprM efluks pumpe |
| Cefalosporini | Cefoperazon Cefepim | Aktivacija ekspresije kromosomske β -laktamaze; Povećana ekspresija MexAB-OprM efluks pumpe; U slučaju četvrte generacije cefalosporina, povećana je ekspresija MexCD-OprJ efluks pumpe |
| Aminoglikozidi | Gentamicin Tobramicin | Povećana ekspresija MEXXY efluks pumpe |
| Kinoloni | Ciprofloksacin | Mutacije na ciljnom mjestu u GyrA (ponekad i GyrB) podjedinici topoizomeraze; Povećana ekspresija efluks pumpi |
| Polimiksini | Kolistin | Promjene u vanjskomembranskom LPS-u (nije dokazano u kliničkoj primjeni) |
| Karbapenemi | Imipenem Meropenem | Smanjenje ekspresije specifičnih porinskih kanala OprD; Povećana ekspresija MexAB-OprM efluks pumpe u slučaju meropenema |

Kombinacijom različitih mehanizama rezistencije nastaju višestruko rezistentni sojevi otporni na jedan ili više skupina antibiotika. Upravo zbog mogućnosti prilagodbe na uvjete i okoliš u kojem se bakterija nalazi, biranje optimalne terapije za liječenje infekcije uzrokovane *P. aeruginosa* je otežano i izazovno.

1.2. Aminoglikozidni antibiotici i tobramicin

Aminoglikozidni antibiotici su prirodni ili polusintetski antibiotici koji su u rutinskoj kliničkoj primjeni bili među prvima uvedeni kao prva linija antimikrobne terapije, pogotovo za Gram-negativne bakterije, dok nisu u 1980-im godinama zamijenjeni cefalosporinima, fluorokinolonima i karbapenemima. Aminoglikozidi inhibiraju sintezu proteina vežući se na mjesto A na 16S rRNA na 30S podjedinici ribosoma i time sprječavaju vezanje mRNA na ribosom i stvaranje inicijacijskog kompleksa. Isto tako, dovode do pogrešnog očitavanja genetičkog koda i sinteze nefunkcionalnih proteina što dovodi do smrti bakterije. Osnovna struktura aminoglikozida jest aminociklitolni prsten – streptamin ili 2-deoksistreptamin zasićen hidroksilnim i amino skupinama. Aminoglikozidni antibiotici su bazični, izrazito polarni i pozitivno nabijeni spojevi. Pozitivan naboj u fiziološkom pH dovodi do njihove ototoksičnosti i nefrotoksičnosti (Fejzuli i sur., 2018.; Krause i sur., 2016.). Slika 3 prikazuje strukture reprezentativnih aminoglikozida.



Slika 3. Strukture aminoglikozida streptomicina, apramicina, tobramicina, gentamicina C1a, amikacina i neomicina B, 2-deoksistreptamin i streptamin su podebljani crnom bojom (preuzeto iz Krause i sur., 2016).

Tobramicin je aminoglikozidni antibiotik koji proizvodi bakterija *Streptomyces tenebrarius*. Njegovo antipseudomonalno djelovanje je već dugo poznato, a djeluje kao i ostali aminoglikozidni antibiotici, vežući se na 16S rRNA na 30S podjedinici ribosoma. Koristi se za liječenje infekcija donjeg dišnog sustava, infekcija središnjeg živčanog sustava poput meningitisa, kožnih infekcija te infekcije oka. Slabe je oralne biorasploživosti upravo zbog P-glikoprotein efluksne pumpe u crijevima pacijenata, stoga se najčešće primjenjuje intravenozno ili intramuskularno. Za ulazak tobramicina u bakteriju potreban je aktivni transport lijeka u stanicu pa se zato nerijetko dozira u kombinaciji s β -laktamima kako bi lakše došlo do penetracije vanjskog zida Gram-negativne bakterije (Brogden i sur., 1976). Bakterija može imati više mehanizama rezistencije na tobramicin. Prvi način je inaktivacija tobramicina modifikacijom strukture, u ovom slučaju hidroksilne skupine ključne za njegovo djelovanje, enzimima kao što su aminoglikozid fosfotransferaze, aminoglikozid adenil-transferaze ili aminoglikozid acetil-transferaze. Isto tako bakterija povećava ekspresiju efluksnih pumpi koje izbacuju tobramicin iz stanice. Također bitan mehanizam rezistencije jest metilacija 16S rRNA enzimom 16S rRNA metil-transferaze pri čemu se mijenja vezno mjesto tobramicina i smanjuje mogućnost njegovog vezanja na 16S rRNA (Poole, 2005).

1.3. Eterična ulja

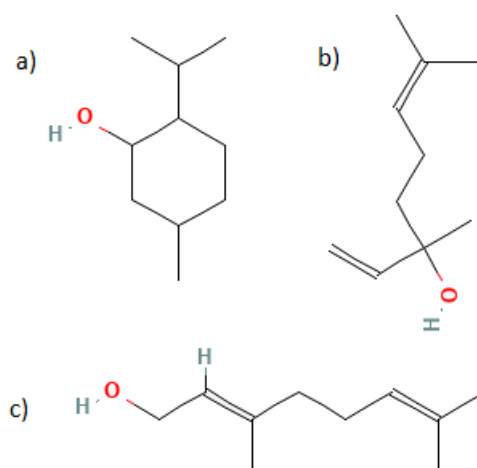
Eterična ulja su sekundarni metaboliti biljaka te ove lako hlapljive, kompleksne smjese izraženog mirisa u prirodi imaju funkciju zaštite biljke od bakterija, virusa, gljivica, kukaca te biljojeda. Isto tako služe kako bi privukle kukce pri oprašivanju, inhibirale rast okolnih biljaka te smanjile transpiraciju. Možemo ih naći u skoro svim dijelovima biljaka, kao što su listovi, stabljika, cvjetovi, sjemenke, plodovi te korijen, a spremaju se u specijaliziranim žljezdanim ili sekretornim stanicama pa čak i u epidermalnim stanicama te međustaničnim šupljinama i kanalima. Ekstrakcija se provodi najčešće postupkom vodene destilacije, ekstrakcijom organskim otapalima ili tiještenjem. Eterična ulja su hlapljive, prozirne i rijetko obojene tekućine, manje gustoće od vode, topljive u lipidima i organskim otapalima, a slabo topljive u vodi. Upravo zbog svoje uloge u prirodi, eterična ulja su poznata po svojim antiseptičkim i antimikrobnim (baktericidnim, fungicidnim, virucidnim) svojstvima. Uz to djeluju analgetski,

sedativno, protuupalno, spazmolitički ili kao lokalni anestetici. Osim u farmaceutskoj industriji, eterična ulja možemo pronaći i u prehrambenoj industriji gdje služe kao arome ili konzervansi te u kozmetičkoj industriji, pogotovo u proizvodnji parfema (Bakkali i sur., 2008).

1.3.1 Sastav eteričnih ulja

Sastav eteričnih ulja je kompleksan jer mogu sadržavati do 200 različitih sastavnica varijabilnih koncentracija. Osim o vrsti biljke, sastav isto tako ovisi u kakvoj klimi se nalazi i u kojem godišnjem dobu se bere. Eterična ulja obično imaju 2-3 sastavnice najzastupljenije, u koncentracijama 20-70 %, dok su ostale sastavnice prisutne u tragovima u koncentracijama do 1 %. Terpeni i terpenoidi su najčešći kemijski spojevi pronađeni u eteričnim uljima, a u manjoj količini možemo pronaći i derivate fenilpropana (Bakkali i sur., 2008).

Terpeni, poznati kao izoprenoidi, najveća su i najraznolikija skupina spojeva pronađena u eteričnim uljima biljaka. Oni su odgovorni za miris, okus i pigment biljke. Kondenzacijom izoprenih jedinica nastaju terpeni koji se klasificiraju na temelju broja izoprenskih jedinica (C_5H_8); monoterpeni koji sadrže dvije, seskviterpeni koji sadrže tri, a diterpeni koji sadrže četiri izoprenske jedinice. Terpeni i terpenoidi često se koriste kao sinonimi, iako postoje blage razlike među njima. Terpenoidi su terpeni koji sadrže kisik i dijele se na alkohole, estere, aldehide, ketone, etere i fenole. Najpoznatiji predstavnici terpenoida su geraniol, mentol, timol i linalol (Macwan i sur., 2016; Cox-Georgian i sur., 2019). Slika 4 prikazuje strukture mentola, linalola i geraniola.

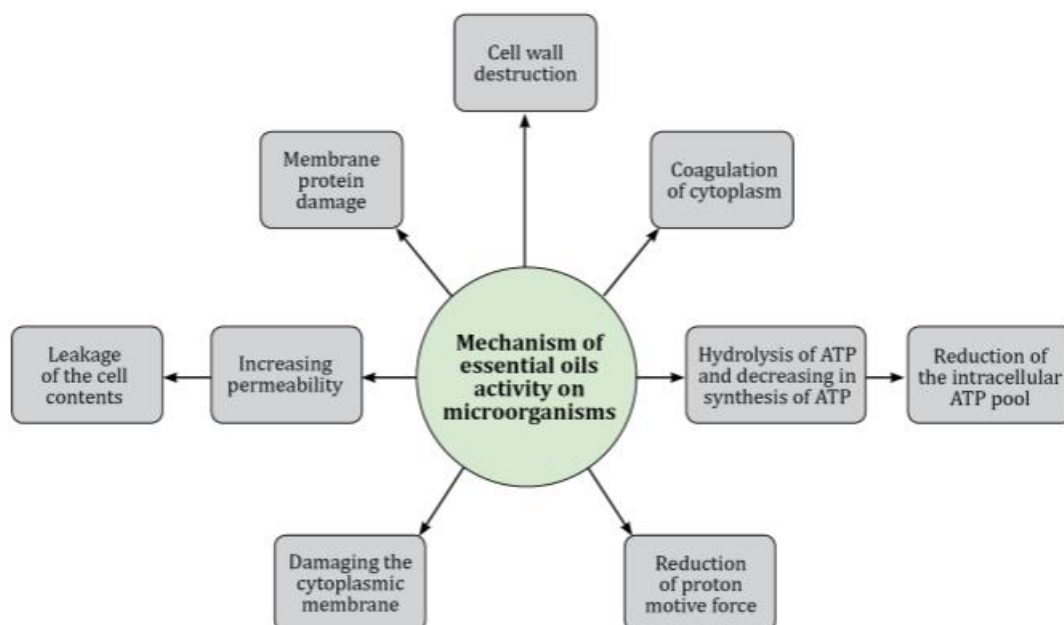


Slika 4. Kemijske strukture terpenoida; a) mentola b) linalola c) geraniola

(preuzeto sa <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

1.3.2. Antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja

Budući da bakterije razvijaju rezistenciju na antibiotike, sve se više obraća pozornost na antimikrobna svojstva eteričnih ulja. Uz to, budući da je eterično ulje smjesa velikog broja kemijskih spojeva, ne postoji specifičan mehanizam djelovanja, već se najvjerojatnije radi o kaskadnim reakcijama koje pogađaju cijelu bakterijsku stanicu i dovode do njene smrti. Eterična ulja destabiliziraju staničnu strukturu degradacijom staničnog zida, oštećenjem stanične membrane čime dolazi do povećane propusnosti membrane i istjecanja staničnog sadržaja, iona te gubitka makromolekula i koagulacije unutarstaničnih komponenata citoplazme. Smanjujući membranski potencijal remete funkcionalnost protonske pumpe i uzrokuju smanjenje sinteze ATP-a (Macwan i sur., 2016). Istraživanje je pokazalo da monoterpenoid karvakrol može inhibirati sintezu flagelina i tako joj onemogućiti kretanje. Isto tako, karvakrol djeluje na proteine vanjske membrane, sprječavajući ugrađivanje i sklapanje šaperona DnaK i GroEL. Također je pokazano da može inaktivirati razne enzime poput ATPaze, amilaze, histidin-karboksilaze te proteaze. Eterična ulja posjeduju i mogućnost inhibiranja QS-a (Swamy i sur., 2016). Mehanizmi antimikrobnog djelovanja eteričnog ulja prikazani su na slici 5. Faktori virulencije *P. aeruginosa* kao što su stvaranje enzima poput proteaza, pokretljivost i stvaranje pigmenta piocijanina i biofilma pod utjecajem su QS-a, zato su se eterična ulja pokazala zanimljivima za daljnja istraživanja za liječenje infekcija uzrokovanih tom bakterijom.



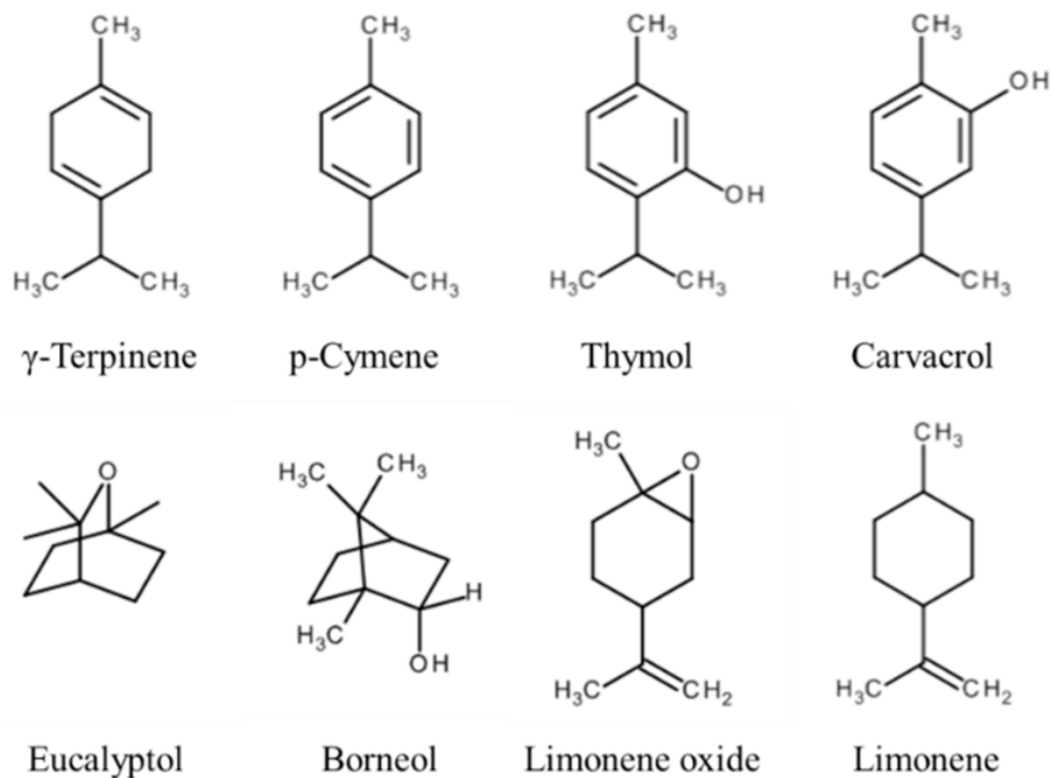
Slika 5. Mehanizmi antimikrobnog djelovanja eteričnog ulja (preuzeto i prilagođeno iz Ferdes, 2018).

1.3.3. Interakcija između eteričnog ulja i antibiotika

Kombinacija konvencionalnih antibiotika i eteričnih ulja pokazala se obećavajućom strategijom u prevladavanju bakterijske rezistencije na antibiotike. Interakcija eteričnog ulja i antibiotika može biti sinergistička, aditivna, bez djelovanja ili antagonistička. Sinergistički učinak znači da jedna od sastavnica potencira djelovanje druge sastavnice, a aditivni učinak znači da kombinacija dviju sastavnica ima djelovanje kao zbroj djelovanja tih sastavnica kada se koriste zasebno. Antagonistički učinak znači da kombinacija tih dviju sastavnica djeluje slabije nego svaka od tih sastavnica zasebno. Sinergističke kombinacije pokazale su potencijalnu terapijsku primjenu upravo zbog veće djelotvornosti i manje toksičnosti njenih sastavnica. Isto tako zbog višestrukih mehanizama djelovanja, sinergističke kombinacije mogu spriječiti nastanak rezistencije na antibiotike i time mogu biti učinkovite u liječenju infekcija sojeva rezistentnih na više lijekova (Aelenei i sur., 2016).

1.4. Eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L.

Satureja montana L., u narodu poznata kao primorski vrisak, višegodišnja je biljka koju pronalazimo u suhim, sunčanim i stjenovitim područjima Sredozemlja, od Alžira u sjevernoj Africi, preko Španjolske, Francuske, Italije i Hrvatske, sve do juga Rusije i Kavkaza. U Hrvatskoj raste ponajviše u Dalmaciji, Lici te Hrvatskom Primorju (Kuštrak, 2005). Pripada porodici Lamiaceae, porodici iznimno bogatoj eteričnim uljima. Eterična ulja biljnih vrsta roda *Satureja*, a pogotovo eterično ulje *Satureja montana* L., poznata su po svojim antiseptičkim, antioksidativnim, antimikrobnim i karminativnim svojstvima. Procijenjeno je da svježa biljka sadrži preko 5 % eteričnog ulja, što ukazuje na visoki biološki potencijal. Glavne sastavnice eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. su monoterpenoidi timol i karvakrol, fenoli odgovorni za antimikrobno djelovanje eteričnog ulja. Karvakrol je odobren za uporabu u hrani te je klasificiran kao GRAS (engl. *Generally Recognized As Safe*). Još sadrži linalol i p-cimen koji su pokazali anagletske učinke, eukaliptol, borneol, limonen te varijabilne količine sekundarnih metabolita poput fenolne kiseline, fenilpropanoide, masnih kiselina, tanina i tokoferola (Maccelli i sur., 2019). Slika 6 prikazuje strukture terpena i terpenoide najviše zastupljenih u eteričnom ulju biljne vrste *Satureja montana* L.



Slika 6. Strukture terpena i terpenoida najviše zastupljenih u eteričnom ulju biljne vrste *Satureja montana* L. (Preuzeto iz Macceli i sur., 2019).

1.5. Timol

Timol (2-izopropil-5-metilfenol) je monoterpenoidni fenol koji je prisutan u eteričnim uljima biljaka iz porodice Lamiaceae, ponajviše u rodu *Thymus*, *Satureja*, *Origanum*. Osim u eteričnom ulju biljne vrste *Satureja montana* L., isto je glavna sastavnica u eteričnom ulju biljne vrste *Thymus vulgaris*, po kojoj je i dobio ime. Timol se već dugo koristi u tradicionalnoj medicini zbog svojeg antibakterijskog (djeluje na Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije) i antivirusnog djelovanja (herpes simpleks virus tipa 1, humani rinovirus te virus gripe), djeluje protuupalno te kao antiseptik i ekspektorans, uglavnom u liječenju gornjeg dišnog sustava. Isto tako se koristi za poboljšanje probave, opuštajući glatke mišiće (Kowalczyk i sur., 2020). Timol ima dodijeljen GRAS status čime mu je odobrena primjena u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

Mehanizam antibakterijskog djelovanja timola nije u potpunosti poznat, no pretpostavlja se da narušava integritet lipidne frakcije bakterijske plazme vežući se na lipidni dvosloj koji dovodi do gubitka protona poput kalija i time dolazi posljedično do istjecanja unutarstaničnog sadržaja. Isto tako djeluje na enzime koji su uključeni u sintezu ATP-a čime dovodi do smanjenog stvaranja stanične energije, što dovodi do smrti bakterije. Timol izoliran iz eteričnog ulja biljnih vrsti *Thymus zygis* i *Thymus vulgaris* inhibirao je rast bakterije *Escherichia coli* inducirajući permeabilizaciju i depolarizaciju citoplazmatske membrane. Isto tako, inhibirao je rast bakterija *Staphylococcus aureus* i *Salmonella typhimurium*. Timol je pokazao sinergističku interakciju sa svim antibioticima testiranim na spomenutim bakterijama (Nagoor Meeran i sur., 2017).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Pseudomonas aeruginosa oportunistički je patogen koji predstavlja sve veći javnozdravstveni problem upravo zbog sve rastuće rezistencije na konvencionalnu antimikrobnu terapiju te sve češćih kliničkih infekcija uzrokovanim zaobilaženjem imunosnog odgovora domaćina. Isto tako, zbog svoje prilagodljivosti na različite uvjete te brojnih čimbenika virulencije, potrebno je pronaći alternativu konvencionalnoj terapiji kako bi izbjegli novo stvaranje višestruko rezistentnih sojeva.

Eterična ulja od davnina su poznata po svojim antibakterijskim svojstvima, stoga se u zadnje vrijeme sve više istražuje djelovanje eteričnih ulja na rast bakterija. Zbog višestrukog mehanizma djelovanja eteričnog ulja na bakteriju, bakterije uglavnom nije sposobna razviti rezistenciju na eterična ulja.

Cilj ovog rada je ispitati djelovanje eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. i timola zasebno i u kombinaciji s antibiotikom tobramicinom na bakterijsku međustaničnu komunikaciju (engl. *quorum sensing*), odnosno na proteolitičku aktivnost i rojenje različitih sojeva *Pseudomonas aeruginosa*. Proteolitička aktivnost i rojenje su pod utjecajem QS sustava bakterije.

Specifični ciljevi ovog rada su sljedeći:

- 1) Odrediti minimalne inhibitorne koncentracije eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L., timola i aminoglikozidnog antibiotika tobramicina u krutom LB-mediju s 2 % obranim mlijekom i polukrutom LB-mediju za sojeve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1;
- 2) Ispitati utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L., timola i aminoglikozidnog antibiotika tobramicina pojedinačno i u kombinaciji u krutom LB-mediju s 2 % obranim mlijekom na proteolitičku aktivnost sojeva *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1;
- 3) Ispitati utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L., timola i aminoglikozidnog antibiotika tobramicina zasebno i u kombinaciji u polukrutom LB-mediju na pokretljivost sojeva *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Bakterije

U ovom istraživanju korištena je bakterijska vrsta *Pseudomonas aeruginosa*, četiri različita soja:

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

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

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

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

3.1.2. Antibiotici

Tobramicin sulfat (Xellia Pharmaceuticals ApS, Copenhagen, Denmark)

3.1.3. Eterična ulja

Eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L., *Lamiaceae* (dobiveno ljubaznošću prof. dr. sc. Sande Vladimir-Knežević, Zavod za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu)

Timol (Acros Organics)

3.1.4. Standardne kemikalije i otopine

Dimetilsulfoksid, DMSO (Sigma)

Ultračista voda

3.1.5. Hranjivi medij

Za ispitivanje proteolitičke aktivnosti bakterije *Pseudomonas aeruginosa* korišten je Luria-Bertani (LB) kruti medij (Difco™, Lennox) s dodatkom obranog mlijeka u prahu: 10 g/L

tripton, 5 g/L NaCl, 15 g/L agar, 5 g/L kvašćev ekstrakt, 20 g/L obrano mlijeko u prahu (Dukat); konačni pH=7,0 ± 0,2.

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

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 biljne vrste *Satureja montana* L. i timola

Eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L. dobivena je destilacijom vodenom parom pomoću Clevenger aparature (dobiveno ljubaznošću prof. dr. sc. Sande Vladimir-Knežević, Zavod za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta). Timol je komercijalno nabavljen. Udio timola u eteričnom ulju *Satureja montana* L. iznosi 56.47 %. Navedeni postotak određen je analizom u vezanom sustavu plinski kromatograf-spektrometar masa na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Eterično ulje i timol otopljeni su u DMSO-u do željene koncentracije od 100 mg/mL. U pokusima su korištene koncentracije od 0,5 mg/mL za timol i eterično ulje.

3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije aminoglikozidnog antibiotika tobramicina

Za potrebe pokusa bilo je potrebno odrediti minimalnu inhibitornu koncentraciju (dalje u tekstu MIK) aminoglikozidnog antibiotika tobramicina u uvjetima pokusa. To je provedeno metodom razrjeđenja u agaru (engl. *agar dilution method*) prema prilagođenim CLSI (engl. *Clinical Laboratory Standard Institute*) uputama (Balouiri i sur., 2016). Inokulacijom male količine bakterijskih stanica četiriju sojeva *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1) uzgojene su noćne kulture u 3 mL tekućeg LB-medija inkubiranog 20 h na 37°C uz potresanje. LB-agar s dodatkom 2 % obranog mlijeka i 0,5 % LB-agar sterilizirani su autoklaviranjem te ohlađeni do 50°C prije dodavanja tobramicina.

Napravljena je početna otopina tobramicina u koncentraciji od 0,5 mg/mL i potom sterilizirana filtracijom kroz MS® PTFE Syringe filter, veličine pora 0,22 µm. Dvostrukim serijskim

razrjeđenjem tobramicina dobivene su nove koncentracije korištene dalje za eksperiment; za LB-agar s 2 % obranim mlijekom korištene su koncentracije od 0,5, 2, 4, 8 i 16 µg/mL, a za 0,5 % LB-agar 0,5, 2 i 4 µg/mL. Na krutu podlogu inokulirano je 1,5 µL noćne kulture spomenutih sojeva bakterija te su ploče inkubirane 16-20 h na 37°C. Kao MIK aminoglikozidnog antibiotika tobramicina u uvjetima eksperimenta uzima se najniža koncentracija tobramicina pri kojoj dolazi do inhibicije vidljivog rasta bakterija.

3.2.3 Ispitivanje proteolitičke aktivnosti *Pseudomonas aeruginosa*

Inokuliranjem bakterijskih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1 na kruti LB-medij s dodanim obranim mlijekom određuje se polukvantitativnom metodom proteolitička aktivnost bakterija. Ovaj LB-medij je zamućen zbog mliječnog proteina kazeina koji se nalazi u dodanom obranom mlijeku. Bakterije razgrađuju kazein proteazama i zato se oko bakterijskih stanica pojavljuje čista zona (Filloux i Ramos, 2014).

Noćne kulture sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1 uzgojene su inokuliranjem bakterija u 3 mL tekućeg LB-medija te inkubirane 20 h pri temperaturi od 37°C uz protresanje. Kulture bakterija se onda nanose na 1,5 % LB-agar ploče s dodanim 2 % obranim mlijekom. LB-agar i mlijeko pripremaju se u dvostruko većim koncentracijama, odnosno kao 3 % LB-agar i 4 % obrano mlijeko. Nakon zasebnog autoklaviranja (LB-agar na temperaturi od 121°C, a mlijeko na 115°C) u trajanju od 15 minuta, slijedi hlađenje na 50°C i nakon toga miješanje u jednakom omjeru (7,5 mL : 7,5 mL). U tako pripremljeni medij dodano je eterično ulje *Satureja montana* L. i timol u koncentracijama od 0,5 mg/mL zasebno ili u kombinaciji s tobramicinom u subinhibitornim koncentracijama od 0,5 i 2 µg/mL. Prilikom izlivanja navedenog medija u Petrijevu zdjelicu, potrebno je obratiti pozornost da se ne stvore mjehurići zraka. Pripremljene ploče osušene su preko noći te su sljedeći dan inokulirane s 1,5 µL bakterijske kulture i potom inkubirane 16-20 h na 37 °C.

3.2.4. Ispitivanje pokretljivosti *Pseudomonas aeruginosa*

Pokretljivost bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1, odnosno rojenje bakterija ispitivano je na polukrutom LB-mediju s 0,5 % agarom. U medij se dodaje eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L. ili timol u koncentracijama od 0,5 mg/mL, zasebno i u kombinaciji s aminoglikozidnim antibiotikom tobramicinom u subinhibitornim koncentracijama od 0,5 µg/mL i 2 µg/mL.

Inokuliranjem bakterija u 3 mL tekućeg LB-medija inkubiranog 20 h na 37°C uz protresanje uzgojene su noćne kulture sojeva *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1. U centar ploče inokulirno je 1,5 µL prekonoćne kulture te su ploče inkubirane 24 h na 37 °C (Filloux i Ramos, 2014).

Rezultati su očitani vizualno uspoređujući razlike u načinu i mjeri puzanja bakterijskih sojeva *P. aeruginosa*.

4. REZULTATI I RASPRAVA

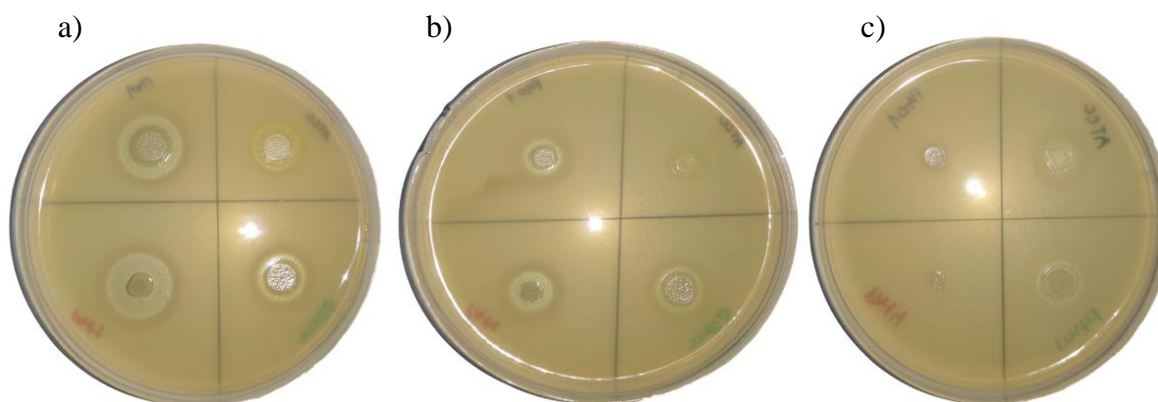
4.1. REZULTATI

4.1.1 Minimalna inhibitorna koncentracija

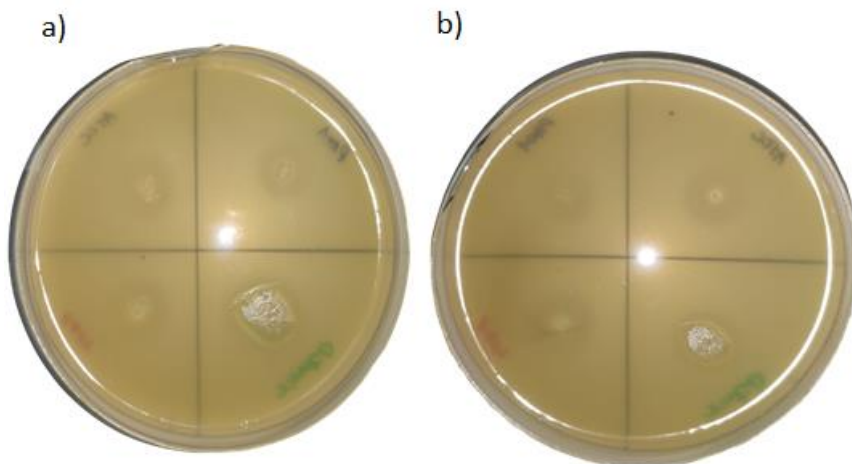
Subinhibitorne koncentracije antibiotika utječu na pokretljivost te proteolitičku aktivnost *P. aeruginosa* koje su pod nadzorom QS sustava, djelujući kao signalne molekule (Babić i sur. 2010). Iz tog razloga bilo je potrebno odrediti minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika tobramicina u uvjetima pokusa za odabir subinhibitorne koncentracije u ispitivanju proteolitičke aktivnosti te pokretljivosti *P. aeruginosa*. Minimalna inhibitorna koncentracija određena je metodom razrjeđenja u agaru s prilagođenim CLSI uputama kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode. Najniža koncentracija koja vidljivo inhibira rast bakterija uzima se kao minimalna inhibitorna koncentracija tobramicina.

Tobramicin je dodan u koncentracijama od 0, 5, 2, 4, 8, i 16 $\mu\text{g/mL}$ u LB-agar s 2 % obranog mlijeka. Slika 7 prikazuje proteolitičku aktivnost sojeva ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 te PAO1 *P. aeruginosa* na LB-agaru s 2 % obranim mlijekom uz dodatak tobramicina u koncentracijama od 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ te 4 $\mu\text{g/mL}$.

Slika 8 prikazuje proteolitičku aktivnost sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 te PAO1 na LB-agaru s 2 % obranim mlijekom u dodatku tobramicina u koncentracijama od 8 $\mu\text{g/mL}$ i 16 $\mu\text{g/mL}$. Rezultati izmjerenih radijusa čiste zone su prikazani u Tablici 3.



Slika 7. Proteolitička aktivnost sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853 (gore desno), BB1285 (*rmtD*⁺) (dolje desno), PA14 (dolje lijevo), PAO1 (gore lijevo) na LB-agaru s 2 % dodanim obranim mlijekom i koncentracijama tobramicina od a) 0,5 $\mu\text{g/mL}$ b) 2 $\mu\text{g/mL}$ c) 4 $\mu\text{g/mL}$.



Slika 8. Proteolitička aktivnost sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853 (gore desno), BB1285 (*rmtD*⁺) (dolje desno), PA14 (dolje lijevo), PAO1 (gore lijevo) na LB-agaru s 2 % dodanim obranim mlijekom i koncentracijama tobramicina od a) 8 µg/mL b) 16 µg/mL.

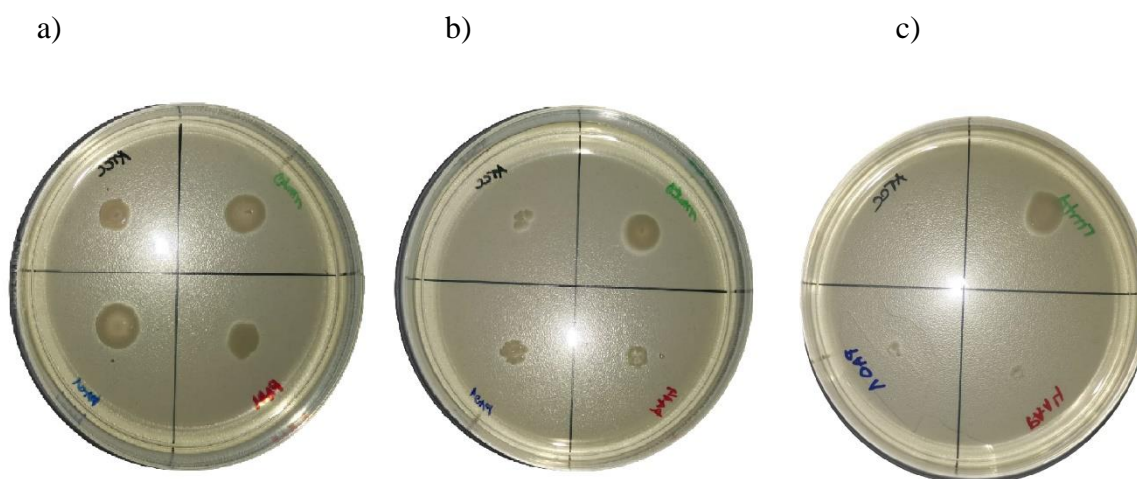
Tablica 3. Ovisnost radijusa čiste zone oko bakterijskih kolonija (u cm) o koncentraciji tobramicina za sojeve *P. aeruginosa* BB1285 (*rmtD*⁺), PAO1, ATCC 27853 i PA14, na LB-agaru s 2 % dodanim obranim mlijekom.

| Koncentracija tobramicina (µg/mL) | Sojevi <i>P. aeruginosa</i> | | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|------|------------|------|
| | BB1285 (<i>rmtD</i> ⁺) | PAO1 | ATCC 27853 | PA14 |
| 0,5 | 0,1 | 0,6 | 0,1 | 0,8 |
| 2 | 0,1 | 0,15 | 0,0 | 0,4 |
| 4 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 8 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 16 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Kako se povećava koncentracija tobramicina, tako je sve veća inhibicija proteolitičke aktivnosti sojeva ATCC 27853, PAO1 i PA14, pri čemu je najizraženija inhibicija soja PAO1, dok ne dolazi do vidljive promjene na proteolitičku aktivnost soja BB1285 (*rmtD*⁺). Pri koncentracijama tobramicina od 4 µg/mL na više, proteolitička aktivnost bakterijskih sojeva ATCC 27853, PAO1 i PA14 je gotovo potpuno inhibirana.

Budući da je vidljiv rast bakterija i pri koncentraciji od 16 $\mu\text{g/mL}$, minimalna inhibitorna koncentracija tobramicina za sva četiri soja *P. aeruginosa* na LB-agaru s 2 % obranim mlijekom je veća od 16 $\mu\text{g/mL}$.

Tobramicin u koncentraciji od 0,5, 2 i 4 $\mu\text{g/mL}$ dodan je u polukrutu LB-podlogu s 0,5 % agarom. Slika 9 prikazuje rojenje sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1 na 0,5 % LB-agaru s dodanim koncentracijama od 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ te 4 $\mu\text{g/mL}$. Vrijednosti promjera kolonija bakterija dani su u Tablici 4.



Slika 9. Rojenje sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853 (gore lijevo), BB1285 (*rmtD*⁺) (gore desno), PA14 (dolje desno), PAO1 (dolje lijevo) na polukrutoj LB-podlozi s 0,5 % agarom s dodatkom tobramicina u koncentraciji od a) 0,5 $\mu\text{g/mL}$ b) 2 $\mu\text{g/mL}$ c) 4 $\mu\text{g/mL}$.

Tablica 4. Ovisnost promjera bakterijskih kolonija (u cm) o koncentraciji tobramicina za sojeve *P. aeruginosa* BB1285 (*rmtD*⁺), PAO1, ATCC 27853 i PA14 na 0,5 % LB-agaru.

| Koncentracija tobramicina ($\mu\text{g/mL}$) | Sojevi <i>P. aeruginosa</i> | | | |
|------------------------------------------------|-------------------------------------|------|------------|------|
| | BB1285 (<i>rmtD</i> ⁺) | PAO1 | ATCC 27853 | PA14 |
| 0,5 | 1,0 | 1,0 | 0,7 | 0,9 |
| 2 | 1,0 | 0,5 | 0,3 | 0,4 |
| 4 | 1,0 | 0,2 | 0,1 | 0,2 |

Rezultati pokazuju da minimalna inhibitorna koncentracija tobramicina za sojeve *P. aeruginosa* ATCC 27853, PA14 i PAO1 na 0,5 % LB-agaru iznosi 4 µg/mL. Ne vrijedi isto za soj BB1285 (*rmtD*⁺) jer posjeduje rezistenciju na tobramicin i ostale aminoglikozidne antibiotike, zbog preinačenja veznog mjesta za aminoglikozidne antibiotike pomoću 16S rRNA metil-transferaze RmtD pa se ovdje očekuju puno više vrijednosti (Gutierrez i sur., 2013).

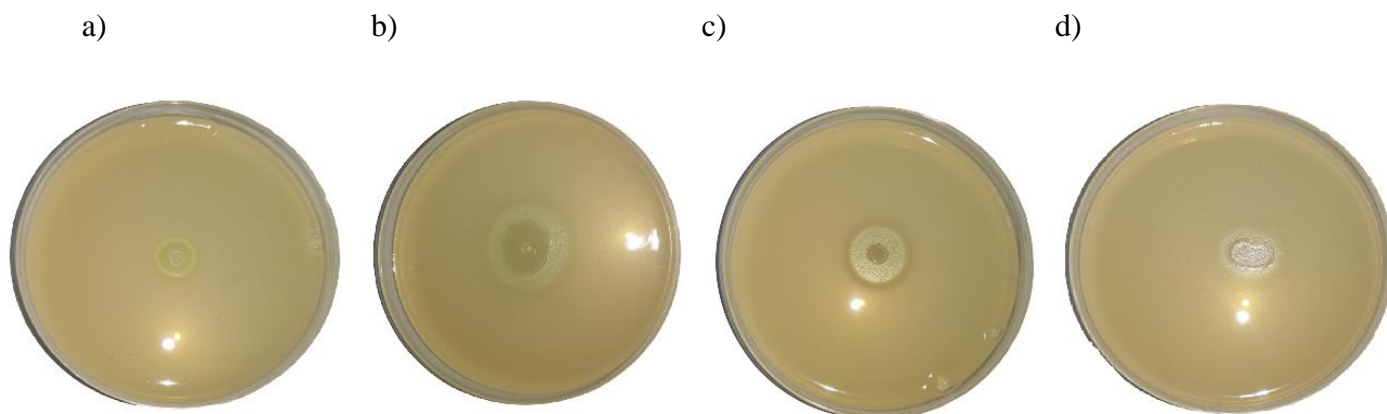
Subinhibitorne koncentracije antibiotika tobramicina od 0,5 i 2 µg/mL korištene su u daljnjem istraživanju.

4.1.2. Učinak eteričnog ulja vrste *Satureja montana* L., timola i tobramicina na proteolitičku aktivnost različitih sojeva *Pseudomonas aeruginosa*

Zamućeni LB-medij s 2 % obranim mlijekom korišten je pri ispitivanju proteolitičke aktivnosti različitih sojeva *P. aeruginosa* polukvantitativnom metodom. *P. aeruginosa* različitim proteazama razgrađuje protein kazein koji se nalazi u mlijeku i pritom stvara čistu zonu oko bakterije. Dodavanjem supstanci u medij može doći do promjene u proteolitičkoj aktivnosti koja se očituje razlikom u polumjeru čiste zone oko bakterije. U ovom radu ispitano je kako djeluje antibiotik tobramicin i eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L. (dalje u tekstu: *satureja*) te timola, zasebno ili u kombinaciji s tobramicinom. Prema prijašnjim istraživanjima, subinhibitorne koncentracije od 0,5 mg/mL eteričnog ulja *satureje* i timola, samostalno i u kombinaciji s tobramicinom, učinkovite su u inhibiciji tvorbe biofilma *P. aeruginosa* (Andričević, 2019.). Stoga je u ovom radu za eksperiment korištena subinhibitorna koncentracija eteričnog ulja *satureje* i timola od 0,5 mg/mL.

Rezultati djelovanja eteričnog ulja *satureje*, timola i tobramicina na proteolitičku aktivnost sojeva *P. aeruginosa* usporedno s netretiranim bakterijama prikazani su na slikama 10-14 te u tablici 5.

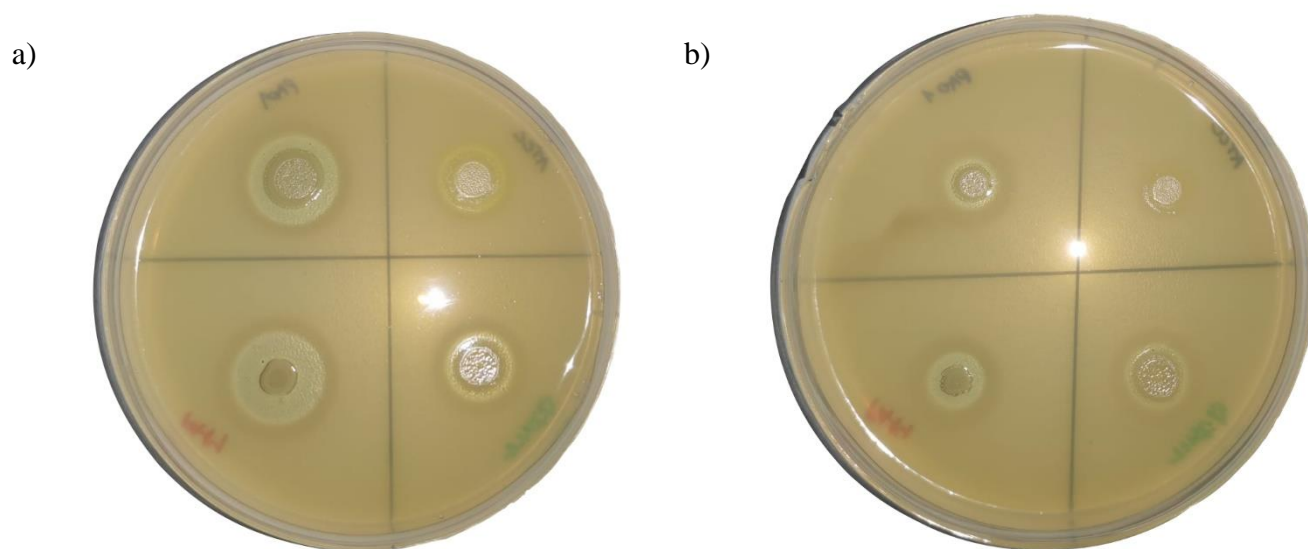
Slika 10 prikazuje proteolitičku aktivnost sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 te PAO1 na LB-mediju s 2 % obranim mlijekom.



Slika 10. Proteolitička aktivnost bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* a) ATCC 27853, b) PAO1, c) PA14 i d) BB1285 (*rmtD*⁺) na LB-agaru s 2 % obranim mlijekom.

PA14 pokazuje najveću proteolitičku aktivnost, zatim slijedi PAO1, dok sojevi ATCC 27853, a pogotovo BB1285 (*rmtD*⁺) pokazuju slabiju proteolitičku aktivnost.

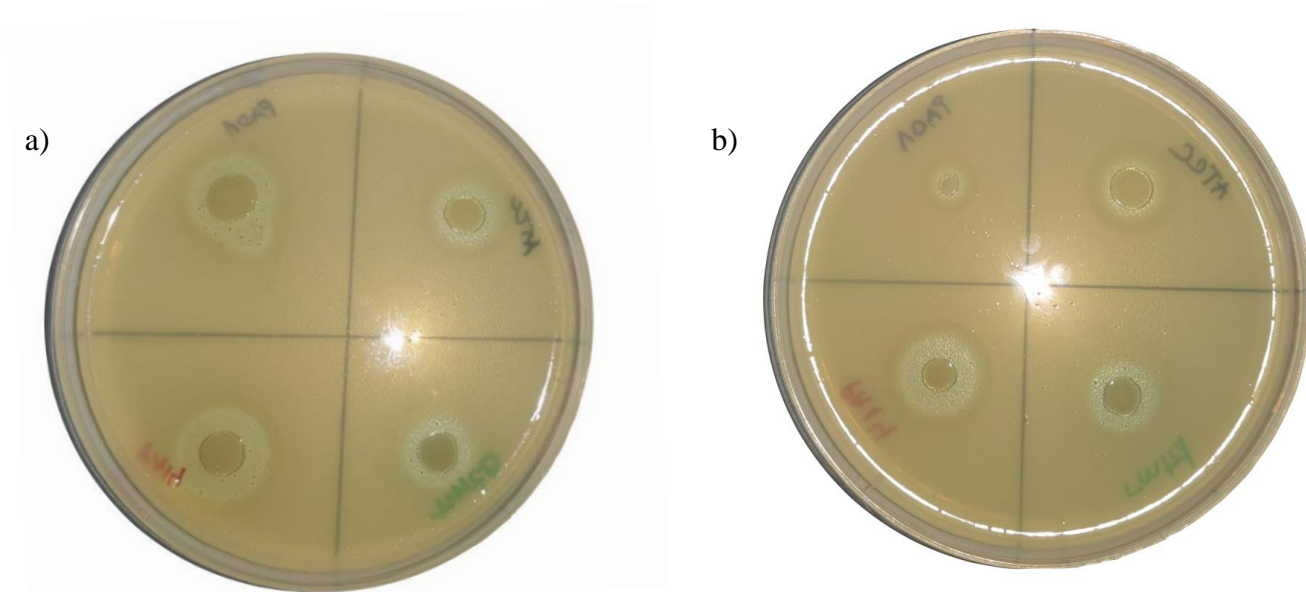
Slika 11 prikazuje proteolitičku aktivnost sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1 na LB-agaru s 2 % obranim mlijekom uz dodatak subinhibitornih koncentracija tobramicina u iznosu od 0,5 µg/mL i 2 µg/mL.



Slika 11. Proteolitička aktivnost bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853 (gore desno), BB1285 (*rmtD*⁺) (dolje desno), PA14 (dolje lijevo) te PAO1 (gore lijevo) na LB-agaru s 2 % obranim mlijekom uz dodatak subinhibitornih koncentracija tobramicina od a) 0,5 µg/mL i b) 2 µg/mL.

Čista zona oko bakterijskih kolonija sojeva *P. aeruginosa* uz dodatak subinhibitorne koncentracije tobramicina od 0,5 µg/mL nije promijenjena u odnosu na kontrolnu skupinu što znači da nije došlo do promjene proteolitičke aktivnosti sojeva *P. aeruginosa*. No, dodatkom koncentracije od 2 µg/mL vidljivo je smanjenje čistih zona oko bakterijskih kolonija što ukazuje na smanjenu proteolitičku aktivnost sojeva *P. aeruginosa*.

Slika 12 prikazuje proteolitičku aktivnost sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1 na LB-agaru s 2 % obranim mlijekom uz dodatak subinhibitornih koncentracija eteričnog ulja satureje te timola u iznosu od 0,5 mg/mL.



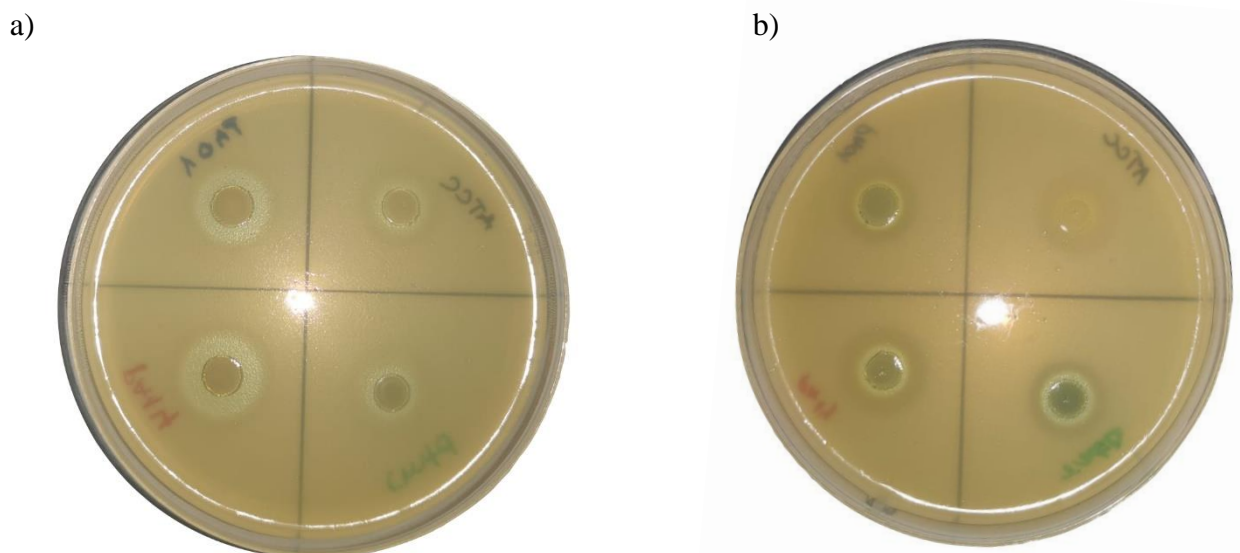
Slika 12. Proteolitička aktivnost bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853 (gore desno), BB1285 (*rmtD*⁺) (dolje desno), PA14 (dolje lijevo) te PAO1 (gore lijevo) na LB- agaru s 2 % obranim mlijekom uz dodatak subinhibitornih koncentracija u iznosu od 0,5 mg/mL a) eteričnog ulja satureje i b) timola.

Dodatkom eteričnog ulja satureje, uviđa se blago povećanje proteolitičke aktivnosti *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 i soja BB1285 (*rmtD*⁺). Kod soja PAO1 nema promjene, a kod soja PA14 postoji vidljivo smanjenje proteolitičke aktivnosti. Dodatkom timola, ne uočava se promjena proteolitičke aktivnosti *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 u odnosu na kontrolnu skupinu, dok kod soja BB1285 (*rmtD*⁺) dolazi do blagog povećanja proteolitičke aktivnosti.

Kod soja PA14 i PAO1 dolazi do inhibicije proteolitičke aktivnosti, jačeg inteziteta nego dodatko eteričnog ulja satureje, pogotovo kod PAO1 gdje je ta promjena najvidljivija.

Usporedno s djelovanjem tobramicina, eterično ulje satureje i timola pokazuje jače djelovanje u inhibiciji proteolitičke aktivnosti soja PA14 nego tobramicin koncentracije 0,5 $\mu\text{g/mL}$, a slabije nego tobramicin koncentracije 2 $\mu\text{g/mL}$. Također, timol pokazuje jaču inhibiciju proteolitičke aktivnosti soja PAO1 nego tobramicin koncentracije 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Tobramicin u koncentraciji od 2 $\mu\text{g/mL}$ je pokazao jače djelovanje u inhibiciji proteolitičke aktivnosti soja PAO1 nego eterično ulje satureje, a jednako djelovanje u inhibiciji proteolitičke aktivnosti kao i timol.

Slika 13 prikazuje proteolitičku aktivnost sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1 na LB-agaru s 2 % obranim mlijekom uz dodatak eteričnog ulja satureje u koncentraciji od 0,5 mg/mL zajedno s tobramicinom u koncentracijama od 0,5 $\mu\text{g/mL}$ i 2 $\mu\text{g/mL}$.

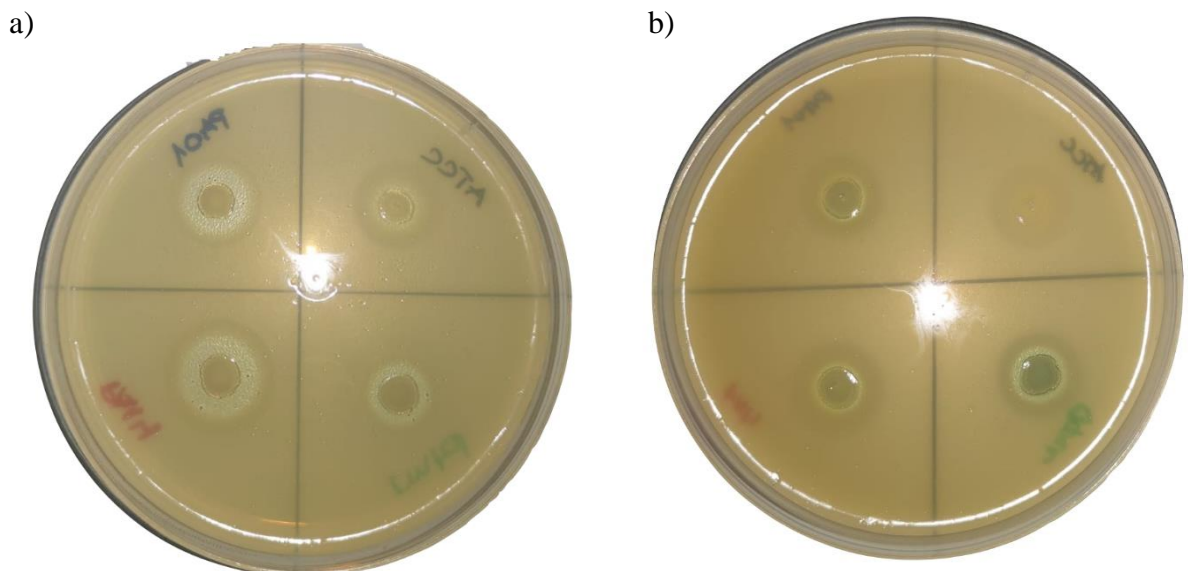


Slika 13. Proteolitička aktivnost bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853 (gore desno), BB1285 (*rmtD*⁺) (dolje desno), PA14 (dolje lijevo) te PAO1 (gore lijevo) na LB- agaru s 2 % obranim mlijekom uz dodatak eteričnog ulja satureje u koncentraciji od 0,5 mg/mL i subinhibitorne koncentracije tobramicina u iznosu od a) 0,5 $\mu\text{g/mL}$ i b) 2 $\mu\text{g/mL}$.

Povećava se inhibicija proteolitičke aktivnosti *P. aeruginosa* sojeva PA14 i PAO1 porastom koncentracije dodanog tobramicina. Također, uviđamo kako dolazi do sinergističkog djelovanja eteričnog ulja satureje i tobramicina i za nižu i za višu koncentraciju jer je jačina inhibitornog djelovanja na proteolitičku aktivnost veća nego eterično ulje i tobramicin zasebno. Sojevi ATCC 27853 i BB1285 (*rmtD*⁺) ne pokazuju razliku u jačini proteolitičke aktivnosti porastom koncentracije tobramicina. Također, kod sojeva ATCC 27853 i BB1285 (*rmtD*⁺), uviđamo kako kombinacijom eteričnog ulja satureje i tobramicina dolazi do jače inhibicije proteolitičke aktivnosti nego eteričnog ulja satureje i timola zasebno.

Usporedno s nižom i višom koncentracijom tobramicina, jačina inhibicije proteolitičke aktivnosti soja ATCC 27853 se ne razlikuje od kombinacije tobramicina i eteričnog ulja satureje. Kod soja BB1285 (*rmtD*⁺) vidljivo je kako kombinacija eteričnog ulja satureje i tobramicina pokazuje jače inhibitorno djelovanje nego eterično ulje zasebno, no nisu uočene vidljive promjene u proteolitičkoj aktivnosti kada uspoređujemo sa samim tobramicinom.

Slika 14 prikazuje proteolitičku aktivnost sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1 na LB-agaru s 2 % obranim mlijekom uz dodatak timola u koncentraciji od 0,5 mg/mL zajedno s tobramicinom u koncentracijama od 0,5 μg/mL i 2 μg/mL.



Slika 14. Proteolitičku aktivnost sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853 (gore desno), BB1285 (*rmtD*⁺) (dolje desno), PA14 (dolje lijevo) i PAO1 (gore lijevo) na LB-agaru s 2 % obranim mlijekom uz dodatak timola u koncentraciji od 0,5 mg/mL zajedno s tobramicinom u koncentracijama od a) 0,5 μg/mL i b) 2 μg/mL.

Porastom koncentracije tobramicina povećava se inhibitorno djelovanje na proteolitičku aktivnost svih *P. aeruginosa* sojeva osim kod soja BB1285 (*rmtD*⁺), dok je ta promjena najvidljivija kod sojeva PAO1 i PA14. Isto tako, kombinacijom timola i tobramicina niže koncentracije, inhibicija proteolitičke aktivnosti je veća nego dodatkom samog timola, za soj PA14, dok za soj PAO1 timol zasebno inhibira jače proteolitičku aktivnost što ukazuje na antagonističko djelovanje timola i tobramicina za taj soj.

Usporedno s pokusom gdje je dodan sam tobramicin, sinergičnim djelovanjem timola i tobramicina je inhibicija proteolitičke aktivnosti vidljivo veća za sojeve PA14 i PAO1. U pokusu gdje je dodano eterično ulje satureje i tobramicin, kombinacija timola i tobramicina jače inhibira proteolitičku aktivnost sojeva ATCC 27853, PA14 i PAO1, dok soj BB1285 (*rmtD*⁺) ne pokazuje vidljivo smanjenje proteolitičke aktivnosti.

Tablica 5 sumarno prikazuje ovisnost radijusa čistih zona različitih sojeva *P. aeruginosa* na LB-agaru s 2 % dodanim obranim mlijekom o dodanim supstancama u navedenim koncentracijama.

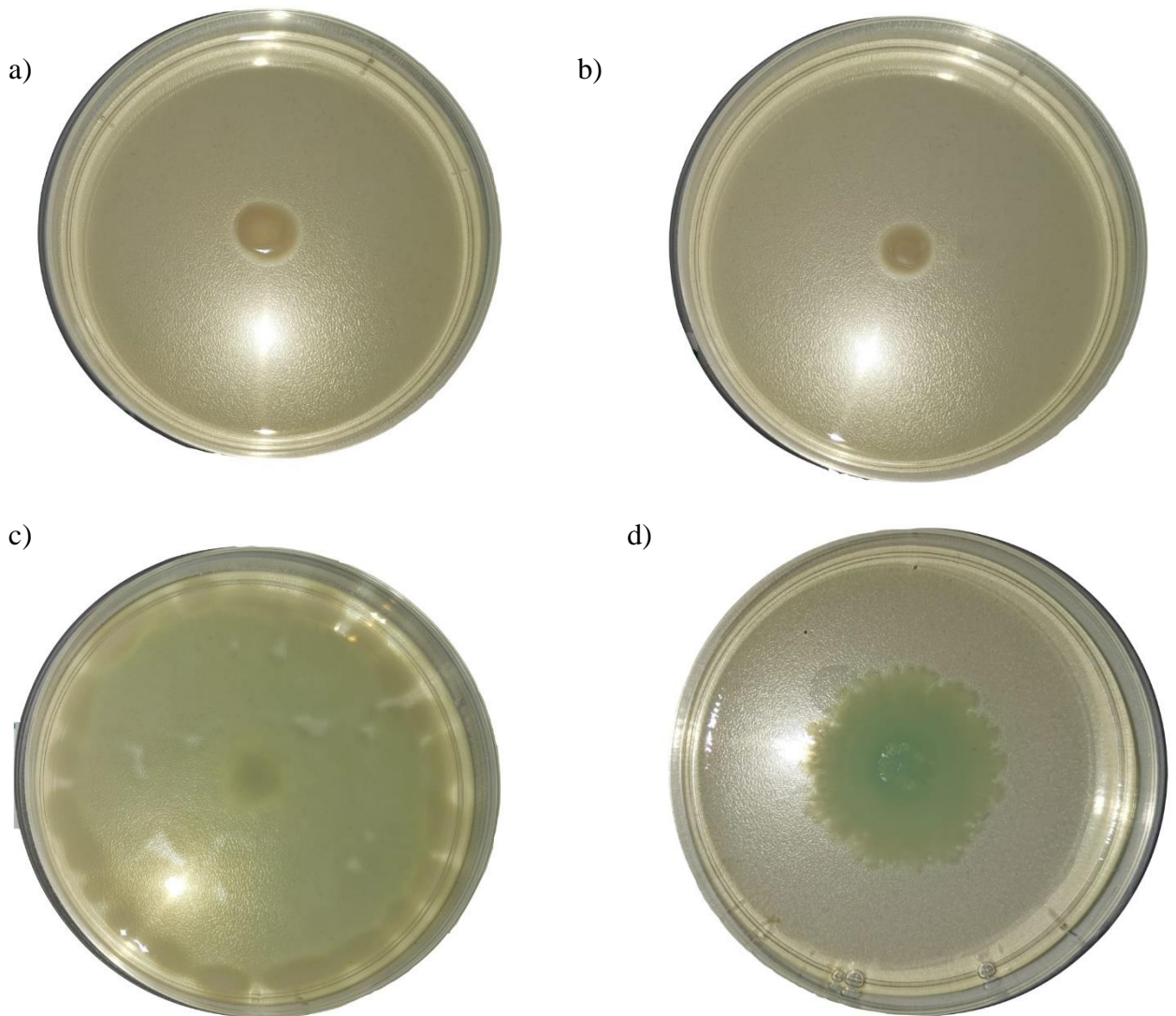
Tablica 5. Polumjer čistih zona oko bakterijskih kolonija *P. aeruginosa* sojeva, BB1285 (*rmtD*⁺), PAO1, ATCC 27853 i PA14 u centimetrima bez i nakon dodatka tobramicina, eteričnog ulja satureje i timola u navedenim koncentracijama.

| Dodana supstanca | Sojevi <i>P. aeruginosa</i> | | | |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|------|------------|------|
| | BB1285 (<i>rmtD</i> ⁺) | PAO1 | ATCC 27853 | PA14 |
| ∅ | 0,10 | 0,60 | 0,10 | 0,80 |
| Tobramicin 0,5 µg/mL | 0,10 | 0,60 | 0,10 | 0,80 |
| Tobramicin 2 µg/mL | 0,10 | 0,15 | 0,00 | 0,40 |
| Tobramicin 4 µg/mL | 0,10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Tobramicin 8 µg/mL | 0,10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Tobramicin 16 µg/mL | 0,10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Eterično ulje satureje 0,5 mg/mL | 0,25 | 0,60 | 0,25 | 0,70 |
| Timol 0,5 mg/mL | 0,30 | 0,15 | 0,10 | 0,60 |
| Eterično ulje satureje 0,5 mg/mL i tobramicin 0,5 µg/mL | 0,10 | 0,50 | 0,10 | 0,70 |
| Eterično ulje satureje 0,5 mg/mL i tobramicin 2 µg/mL | 0,10 | 0,10 | 0,00 | 0,20 |
| Timol 0,5 mg/mL i tobramicin 0,5 µg/mL | 0,10 | 0,35 | 0,10 | 0,55 |
| Timol 0,5 mg/mL i tobramicin 2 µg/mL | 0,10 | 0,10 | 0,00 | 0,10 |

4.1.3. Rojenje *Pseudomonas aeruginosa*

Rojenje, koje je važan čimbenik virulencije pod utjecajem QS sustava *P. aeruginosa*, koordinirano je kretanje bakterija na polukrutom mediju kao što je LB-medij s 0,5 % agarom koji je korišten u ovom pokusu. U takvom mediju bakterija najčešće pokazuje dendritičke uzorke rojenja s više slojeva grananja (Kollaran i sur., 2019.). Rezultati pokusa prikazani su slikama 15-18 kao slike Petrijevih zdjelica te tablicom 6 gdje je prikazan njihov promjer pokretljivosti.

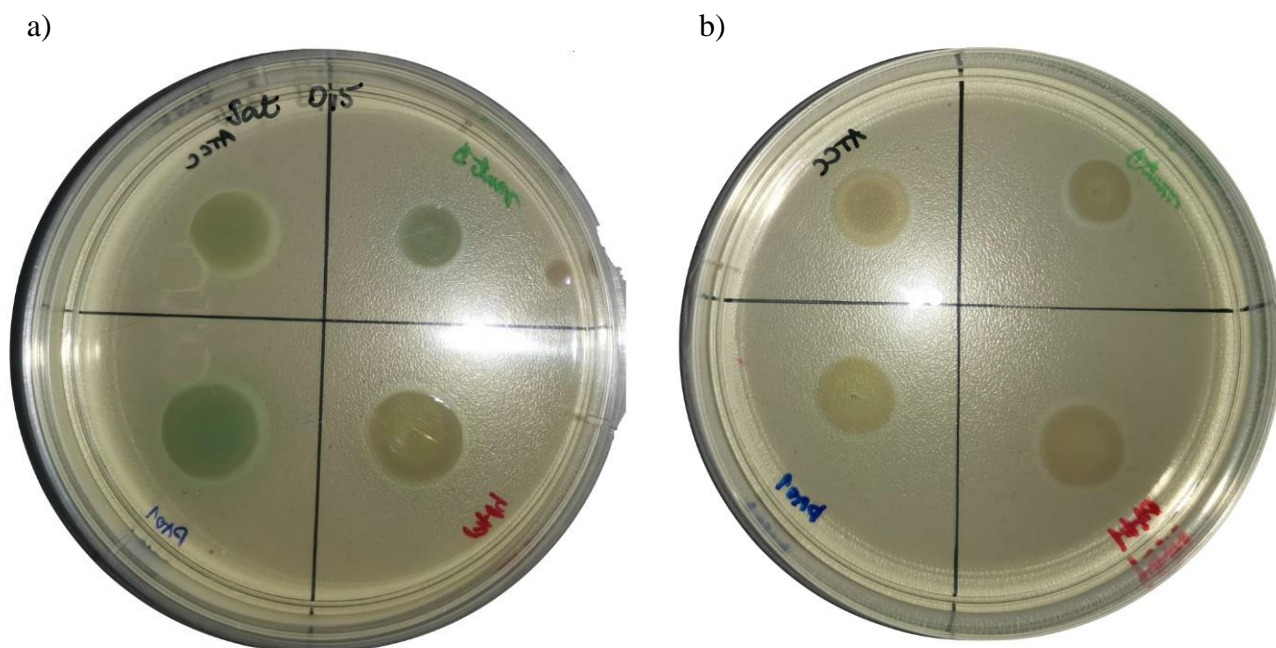
Slika 15 prikazuje Petrijeve zdjelice netretiranih bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1 na 0,5 % LB-agaru te one služe kao kontrolna skupina pomoću koje uspoređujemo uspješnost inhibicije rojenja bakterijskih kolonija nakon dodatka tobramicina, eteričnog ulja satireje i timola.



Slika 15. Pokretljivost sojeva *P. aeruginosa* na 0,5 % LB-agaru: a) ATCC 27853; b) BB1285 (*rmtD*⁺); c) PA14; d) PAO1.

Bakterijski soj PA14 pokazuje najveću sposobnost rojenja. Zatim po sposobnosti rojenja slijedi soj PAO1, dok sojevi ATCC 27853 i BB1285 (*rmtD*⁺) ne pokazuju sposobnost rojenja na 0,5 % LB-agaru.

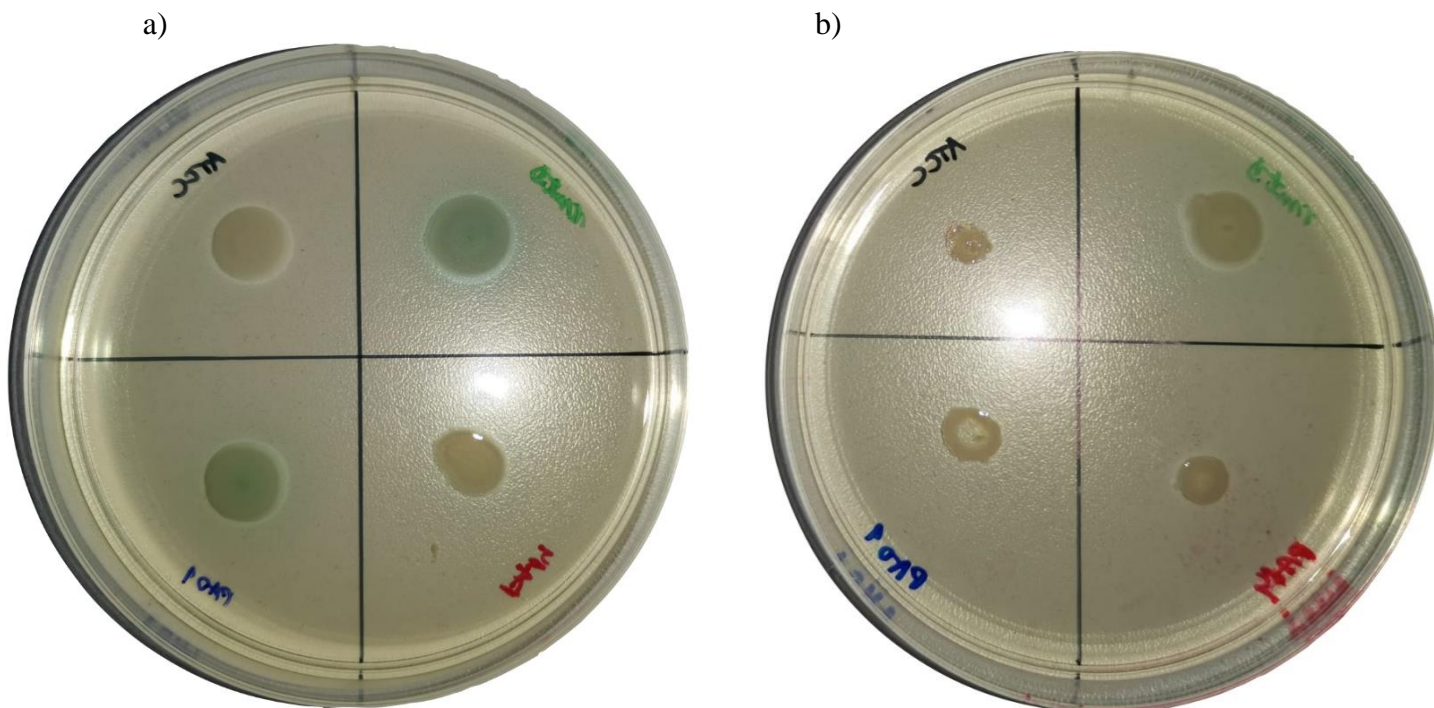
Slika 16 prikazuje Petrijeve zdjelice bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1 na 0,5 % LB-agaru nakon dodatka eteričnog ulja satureje i timola u koncentracijama od 0,5 mg/mL.



Slika 16. Rojenje bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853(gore lijevo), BB1285 (*rmtD*⁺) (gore desno), PA14 (dolje desno) i PAO1 (dolje lijevo) na 0,5 % LB-agaru nakon dodatka: a) eteričnog ulja satureje; b) timola u koncentraciji od 0,5 mg/mL.

Eterično ulje satureje i timol inhibiraju rojenje bakterijskih sojeva PA14 i PAO1 i ATCC 27853 dok rojenje soja BB1285 (*rmtD*⁺) ostaje nepromijenjen usporedno s kontrolnom skupinom. Timol je pokazao jaču inhibiciju rojenja sojeva PA14, PAO1 i ATCC 27853 naspram eteričnom ulju satureje. Tobramicin je pokazao veću inhibiciju rojenja sojeva ATCC 27853, PA14 i PAO1 od eteričnog ulja satureje i timola.

Slika 17 prikazuje Petrijeve zdjelice bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1 na 0,5 % LB-agaru nakon dodatka eteričnog ulja satureje u koncentraciji od 0,5 mg/mL i tobramicina u koncentracijama od 0,5 µg/mL i 2µg/mL.

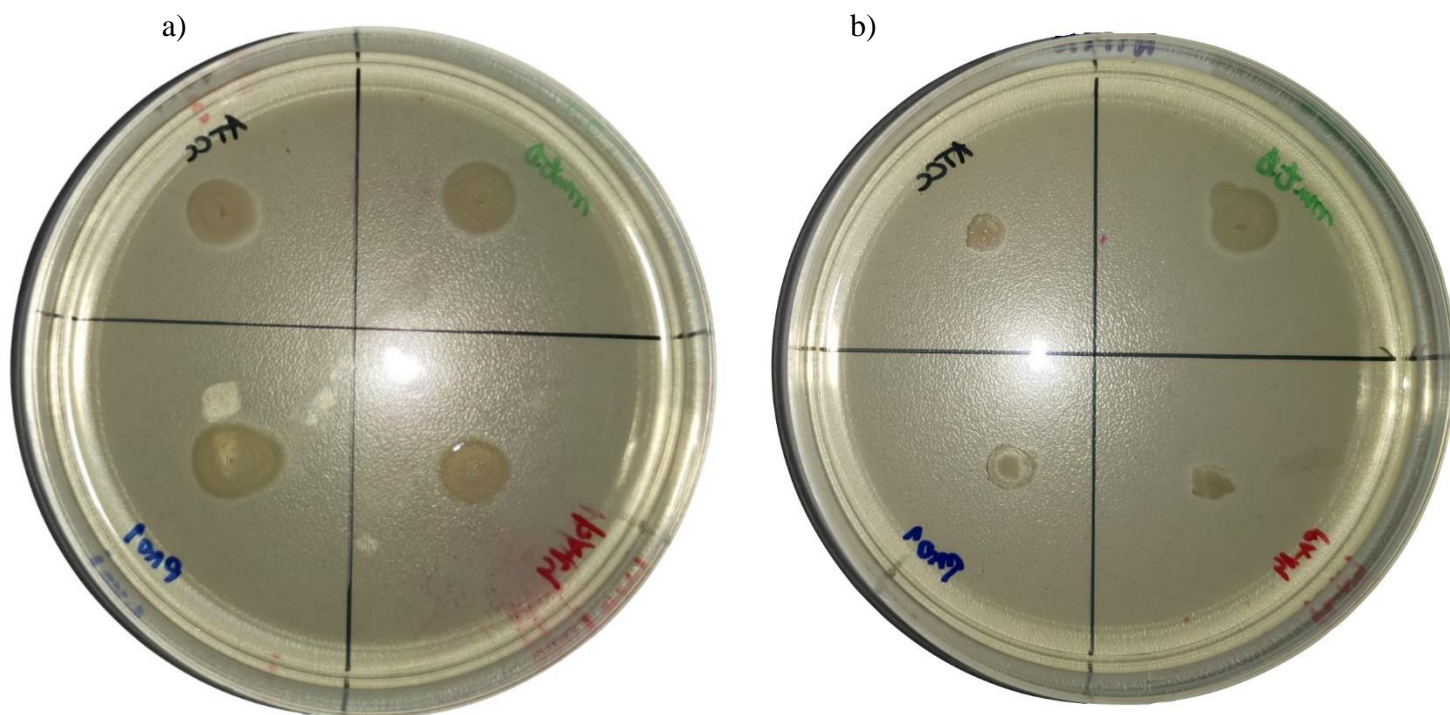


Slika 17. Rojenje bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853 (gore lijevo), BB1285 (*rmtD*⁺) (gore desno), PA14 (dolje desno) i PAO1 (dolje lijevo) na 0,5 % LB-agaru nakon dodatka eteričnog ulja satureje u koncentraciji od 0,5 mg/mL i tobramicina u koncentracijama od a) 0,5 µg/mL i b) 2 µg/mL.

Eterično ulje satureje i tobramicin jače djeluju na inhibiciju rasta bakterijskih sojeva PA14, PAO1 i ATCC 27853 od eteričnog ulja samoga, no jednakim intenzitetom za sojeve PA14 i PAO1 kao i tobramicin u koncentraciji od 0,5 µg/mL, a manjim intenzitetom nego tobramicin pri koncentraciji od 2 µg/mL. To ukazuje na antagonistički učinak eteričnog ulja satureje kod obje koncentracije tobramicina.

Rojenje bakterijskog soja BB1285 (*rmtD*⁺) se ne mijenja usporedno s kontrolnom skupinom.

Slika 18 prikazuje Petrijeve zdjelice bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1 na 0,5 % LB-agaru nakon dodatka timola u koncentracijama od 0,5 mg/mL i tobramicina u koncentracijama od 0,5 µg/mL i 2 µg/mL.



Slika 18. Rojenje bakterijskih sojeva *P. aeruginosa* ATCC 27853 (gore lijevo), BB1285 (*rmtD*⁺) (gore desno), PA14 (dolje desno) i PAO1 (dolje lijevo) na 0,5 % LB-agaru nakon dodatka timola u koncentraciji od 0,5 mg/mL i tobramicina u koncentracijama od a) 0,5 µg/mL i b) 2 µg/mL.

Timol u kombinaciji s obje koncentracije tobramicina jače inhibira rojenje sojeva PA14 i PAO1 od timola samog te eteričnog ulja saturije i tobramicina zajedno. Jednako intenziteta inhibira rojenje kao i tobramicin zasebno pri nižim i višim koncentracijama, što ukazuje na antagonistički učinak timola na tobramicin za te sojeve.

Inhibicija timola i tobramicina na rojenje bakterijskog soja ATCC 27853 je slabijeg intenziteta nego tobramicin zasebno pri višim i nižim koncentracijama što ukazuje na antagonistički učinak timola na tobramicin za taj soj. Bakterijski soj BB1285 (*rmtD*⁺) ostaje nepromijenjen usporedno s kontrolnom skupinom.

Tablica 6 prikazuje ovisnost promjera pokretljivosti sojeva ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1 na 0,5 % LB-agaru o dodatku tvari u navedenim koncentracijama. Rezultati za

promjer pokretljivosti za tobramicin u koncentracijama od 0,5, 2 i 4 µg/mL preuzeti su iz tablice 4.

Tablica 6. Ovisnost promjera (u cm) pokretljivosti sojeva ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*⁺), PA14 i PAO1 na 0,5 % LB-agaru o dodatku tvari u navedenim koncentracijama.

| Dodana supstanca | Sojevi <i>P. aeruginosa</i> | | | |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|------|------------|------|
| | BB1285 (<i>rmtD</i> ⁺) | PAO1 | ATCC 27853 | PA14 |
| ∅ | 1,0 | 4,0 | 1,3 | 9,0 |
| Tobramicin 0,5 µg/mL | 1,0 | 1,0 | 0,7 | 0,9 |
| Tobramicin 2 µg/mL | 1,0 | 0,5 | 0,3 | 0,4 |
| Tobramicin 4 µg/mL | 1,0 | 0,2 | 0,1 | 0,2 |
| Eterično ulje satureje 0,5 mg/mL | 1,0 | 1,6 | 1,2 | 1,4 |
| Timol 0,5 mg/mL | 1,0 | 1,2 | 0,8 | 1,0 |
| Eterično ulje satureje 0,5 mg/mL i tobramicin 0,5 µg/mL | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,9 |
| Eterično ulje satureje 0,5 mg/mL i tobramicin 2 µg/mL | 1,0 | 0,6 | 0,4 | 0,5 |
| Timol 0,5 mg/mL i tobramicin 0,5 µg/mL | 1,0 | 1,0 | 0,9 | 0,9 |
| Timol 0,5 mg/mL i tobramicin 2 µg/mL | 1,0 | 0,5 | 0,4 | 0,4 |

4.2. RASPRAVA

Pseudomonas aeruginosa je sveprisutna okolišna Gram-negativna bakterija koja je sve češće značajni patogeni čimbenik teških infekcija. Upravo zbog svoje otpornosti na antibiotike i mogućnosti stvaranja biofilma, kod imunokompromitiranih pacijenata, a pogotovo kod onih koji boluju od cistične fibroze, infekcija bakterijom *P. aeruginosa* značajno povećava morbiditet te smrtnost (Mielko i sur., 2019). Iz tih razloga tražimo alternativne načine liječenja infekcije, budući da korištenje veće doze antibiotika dovodi do štetnih nuspojava i dalje potiče nastanak i širenje rezistencije. Kao nove metode liječenja pojavljuju se eterična ulja. Eterična ulja, lako hlapljive tekućine glavnim sastavom smjesa terpena i terpenoida, poznata su po svojom antimikrobnom djelovanju. Eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L. (dalje u tekstu: *satureja*) pokazalo je antibakterijsko i antifungalno djelovanje. Antimikrobnom djelovanju najviše pridonose glavne sastavnice, koje su u ovom slučaju strukturni izomeri timol i karvakrol (Skočibušić i Bezić, 2004.). U eteričnom ulju *Satureja montana* L. udio timola je 56,47 %, što dodatno implicira da je zaslužan za antimikrobno djelovanje eteričnog ulja. Mehanizam djelovanja eteričnog ulja i njene glavne sastavnice timola nije u potpunosti razjašnjen, stoga ne možemo zaključiti hoće li u kombinaciji s antibiotikom doći do antagonističkog ili sinergističkog učinka. Isto tako, učinak ovisi i o bakterijskom soju *P. aeruginose* koji se ispituje, a u ovom radu su promatrani sojevi *P. aeruginosa* ATCC 28753, BB1285 (*rmtD*+), PA14 i PAO1. Sojevi su različitih svojstava, pogotovo u sposobnosti rojenja, rezistenciji na antibiotike te proteolitičkoj aktivnosti.

U prvom dijelu rada ispitano je kako eterično ulje *satureje* i timol te antibiotik tobramicin djeluju zasebno, a zatim u kombinaciji s tobramicinom na proteolitičku aktivnost bakterije. Proteolitičkom aktivnošću *P. aeruginosa* omogućeno je izbjegavanje imunosnog odgovora i uništavanje tkiva domaćina, stoga se smatra jednim od najvažnijih faktora virulencije. Enzimskom aktivnošću proteaza bakterije razgrađuje se kazein iz mlijeka pri čemu nastaje čista zona oko bakterijskih kolonija koju promatramo na LB-agar pločama s 2 % dodanim mlijekom. Ako dolazi do inhibicije proteolitičke aktivnosti dodavanjem navedenih susptanci, radijus čiste zone oko bakterije se smanjuje u odnosu na netretiranu, kontrolnu skupinu. U slučaju tobramicina, pri koncentraciji od 0,5 µg/mL ne dolazi do promjene u radijusu u odnosu na netretirane bakterije, a povećanjem koncentracije dolazi do proporcionalnog smanjenja čiste zone, odnosno dolazi do jače inhibicije proteolitičke aktivnosti svih sojeva *P. aeruginosa* osim soja BB1285 (*rmtD*+). Soj BB1285 (*rmtD*+) nije pokazao promjenu u radijusu čiste zone

povećanjem koncentracije tobramicina upravo zbog svoje rezistencije na aminoglikozidne antibiotike omogućene 16S rRNA metil-transferazom RmtD koja preinačenjem veznog mjesta, odnosno nukleotida na mjestu A u 16S rRNA, sprječava njegovo vezanje i time smanjuje učinkovitost antibiotika (Gutierrez i sur., 2013, Morić i sur., 2010). Eterično ulje satureje i timol djeluju inhibitorno na proteolitičku aktivnost soja PA14. Eterično ulje satureje nije pokazalo inhibitorni učinak na proteolitičku aktivnost sojeva PAO1 i BB1285 (*rmtD+*) u usporedbi s kontrolnom skupinom. U slučaju soja BB1285 (*rmtD+*) i ATCC 27853 došlo je do pojačavanja proteolitičke aktivnosti dodavanjem eteričnog ulja satureje, a dodavanjem timola došlo je do pojačavanja proteolitičke aktivnosti samo za soj BB1285 (*rmtD+*). Timol jače inhibira proteolitičku aktivnost sojeva PAO1 i PA14 nego eterično ulje satureje. Tobramicin koncentracije 0,5 µg/mL i eterično ulje satureje zasebno ne pokazuju promjenu u inhibiciji proteolitičke aktivnosti usporedno s kontrolnom skupinom. Usporedno s tobramicinom koncentracije 2 µg/mL, eterično ulje satureje slabije inhibira proteolitičku aktivnost soja PA14, dok timol slabije inhibira soj PA14, a soj PAO1 timol inhibira jednakim intezitetom kao i tobramicin. Kombinacijom eteričnog ulja satureje te timola u koncentraciji od 0,5 mg/mL i tobramicina koncentracije 0,5 µg/mL došlo je do inhibicije proteolitičke aktivnosti za sojeve PAO1 i PA14, dok su sojevi ATCC 27853 i BB1285 (*rmtD+*) ostali nepromijenjeni u odnosu na kontrolnu skupinu. U kombinaciji s tobramicinom koncentracije 2 µg/mL dolazi do inhibicije proteolitičke kativnosti kod svih sojeva osim soja BB1285 (*rmtD+*), s time da je kombinacija timola i tobramicina pokazala jaču inhibiciju nego eterično ulje satureje i tobramicina. Uviđamo kako dolazi do sinergističkog djelovanja eteričnog ulja satureje i timola s tobramicinom za soj PA14 jer zasebno slabije inhibiraju proteolitičku aktivnost. Isto tako, kombinacijom timola i tobramicina niže koncentracije, timol zasebno jače inhibira proteolitičku aktivnost soja PAO1 što ukazuje na antagonističko djelovanje timola i tobramicina u ispitanoj kombinaciji za taj soj.

U drugom dijelu rada ispitan je učinak eteričnog ulja satureje i timola te tobramicina, u kombinaciji ili zasebno, na rojenje sojeva *P. aeruginosa* ATCC 28753, BB1285 (*rmtD+*), PA14 i PAO1 na ploči s 0,5 % LB-agarom. Rojenje *P. aeruginosa* je pod utjecajem QS sustava te je zajedno s proteolitičkom aktivnošću bitan faktor virulencije zbog olakšanog širenja bakterije. No, bakteriji je za rojenje potrebna proizvodnja ramnolipida koji služe kao surfaktant te funkcionalne flagele tipa IV koje omogućuju bakteriji olakšano kretanje kroz medij. Promatran je promjer bakterijske kolonije koji je dobar indikator za pokretljivost, odnosno rojenje bakterija, a inhibicija pokretljivosti dodanim supstancama promatrana je smanjenjem promjera

kolonije. Svaki soj je pokazao različitu pokretljivost na polukrutom mediju. Netretirane bakterije su poslužile kao kontrolna skupina koja pokazuje kakvu sposobnost rojenja imaju pojedini sojevi. Soj PA14 je pokazao najveću sposobnost, a zatim slijedi soj PAO1. Soj ATCC 27853 pokazuje jedva primjetnu sposobnost rojenja, a soj BB1285 (*rmtD+*) ne pokazuje sposobnost rojenja. Tobramicin u subinhibitornim koncentracijama je pokazao veliki učinak u inhibiciji rojenja sojeva ATCC 27853, PA14 i PAO1, dok soj BB1285 (*rmtD+*) zbog svoje rezistencije na aminoglikozidne antibiotike nije pokazao nikakvu promjenu u rojenju u odnosu na kontrolnu skupinu. Inhibicija pokretljivosti sojeva ATCC 27853, PA14 i PAO1 proporcionalna je povećanju koncentracije tobramicina. Eterično ulje satureje i timol inhibiraju rojenje sojeva ATCC 27853, PA14 i PAO1, no slabije nego tobramicin koncentracije 0,5 i 2 µg/mL. Timol jačim intenzitetom inhibira rojenje nego eterično ulje satureje. Kombinacijom eteričnog ulja satureje ili timola s tobramicinom koncentracije 0,5 µg/mL dolazi do inhibicije sojeva PA14 i PAO1, jednakim intenzitetom za obje kombinacije. Tobramicin koncentracije 0,5 µg/mL zasebno jače inhibira rojenje soja ATCC 27853, a jednakom jačinom rojenje sojeva PAO1 i PA14 nego u kombinaciji s eteričnim uljem satureje ili timolom. To ukazuje na antagonističko djelovanje eteričnog ulja satureje, odnosno timola na tobramicin u tom omjeru koncentracija. Za kombinaciju eteričnog ulja satureje ili timola s tobramicinom koncentracije 2 µg/mL dolazi do jače inhibicije timolom nego eteričnim uljem satureje za sojeve ATCC 27853, PA14 i PAO1. Kombinacija eteričnog ulja satureje i tobramicina više koncentracije slabije inhibira navedene sojeve nego tobramicin u istoj koncentraciji zasebno. Timol i tobramicin u jednakom intenzitetu inhibiraju sojeve PAO1 i PA14, a slabije soj ATCC 27853 nego tobramicin u istoj koncentraciji samostalno. Sve to dodatno upućuje na antagonističko djelovanje eteričnog ulja satureje i timola na inhibitorno djelovanje tobramicina za te sojeve u ispitanim koncentracijama. Soj BB1285 (*rmtD+*) ni u jednom slučaju nije pokazao promjenu promjera kolonije bakterija.

Mehanizam antagonističkog, a i sinergističkog djelovanja sastavnica eteričnog ulja satureje i timola na tobramicin nije do kraja razjašnjen. No, takav se učinak već vidio u istraživanju utjecaja na biofilm prethodno napravljenom u laboratoriju (Andričević, 2019). Rezultati istraživanja pokazali su kako eterično ulje satureje i timol u određenom rasponu koncentracija djeluju antagonistički na tobramicin jer umanjuju učinak samog tobramicina na rast planktonskih stanica i tvorbu biofilma *P. aeruginosa*. S druge strane, uočeno je kako u drugom rasponu koncentracija eteričnog ulja satureje i timola dolazi do sinergističkog djelovanja na tobramicin u suzbijanju rasta planktonskih stanica i tvorbu biofilma bakterije. Treba naglasiti

kako su u svom rasponu koncentracija, eterično ulje satireje i timol inhibirali rast planktonskih stanica *P. aeruginosa*. U drugom istraživanju napravljenom u laboratoriju (Kerner, 2021), eterična ulja biljnih vrsta *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i *Calamintha officinalis*, koje obje pripadaju porodici *Lamiaceae*, pokazala su dvojako djelovanje na tobramicin te samim time na intenzitet inhibicije pokretljivosti *P. aeruginosa*.

Isto tako, početna implikacija da je timol, kao glavna sastavnica eteričnog ulja satireje, zaslužna za antimikrobno djelovanje eteričnog ulja dodatno je potvrđena rezultatima ovoga rada budući da je zasebno timol pokazao inhibirajuće djelovanje na rojenje i proteolitičku aktivnost, k tome jačeg inteziteta nego eterično ulje satireje. Sve ovo upućuje da su potrebna daljnja istraživanja mehanizma djelovanja kako bismo mogli sa sigurnošću napraviti potreban omjer eteričnog ulja, odnosno timola s tobramicinom kako bismo postigli željeni sinergistički učinak na inhibiciju *P. aeruginosa*. Pritom ne smijemo zaboraviti kako različiti sojevi djeluju različito na dodane susptrance te je time traženje optimalnog omjera izazovan pothvat.

5. ZAKLJUČAK

Iz provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo izvesti sljedeće zaključke:

- Tobramicin u koncentraciji od 2 µg/mL je dovoljan za inhibiciju proteolitičke aktivnosti, a u koncentraciji od 0,5 µg/mL inhibira rojenje sojeva ATCC 27853, PA14 i PAO1. Tobramicin nije pokazao inhibitorni učinak na soj BB1285 (*rmtD+*), upravo zbog njegove rezistencije na aminoglikozidne antibiotike.

- Eterično ulje *Satureja montana* L. djeluje inhibitorno na proteolitičku aktivnost soja PA14, za soj PAO1 nema izražen učinak, dok za soj ATCC 27853 i BB1285 (*rmtD+*) djeluje promotivno na proteolitičku aktivnost. Timol djeluje inhibitorno na proteolitičku aktivnost za soj PA14 i PAO1, promotivno za soj BB1285 (*rmtD+*), a za soj ATCC 27853 nema izražen učinak. Eterično ulje *Satureja montana* L i timol imaju isti učinak na rojenje. Djelovanje na ATCC 27853, PAO1 i PA14 je inhibitorno, a na soj BB1285 (*rmtD+*) nema učinka. Timol pokazuje inhibitorni učinak jačeg intenziteta u oba slučaja.

- Eterično ulje *Satureja montana* L. i tobramicin u kombinaciji pokazuju isti učinak na proteolitičku aktivnost kao i kombinacija timola i tobramicina, samo slabijeg intenziteta. Učinak je uglavnom sinergičan i djeluje inhibitorno za sojeve ATCC 27853, PA14 i PAO1, a za soj BB1285 (*rmtD+*) nema izraženog učinka.

- Eterično ulje *Satureja montana* L. i tobramicin u kombinaciji pokazuju isti učinak na rojenje kao i kombinacija timola i tobramicina, samo slabijeg intenziteta. Za sojeve ATCC 27853, PAO1 i PA14 djeluju inhibitorno, dok na soj BB1285 (*rmtD+*) ne pokazuju vidljivi učinak. Kod soja ATCC 27853, PAO1 i PA14 se vidi antagonističko djelovanje.

- Rezultati ovoga rada doprinjet će daljnjem istraživanju kompleksnog mehanizma međusobnog djelovanja eteričnog ulja *Satureja montana* L., timola i antibiotika tobramicina te time poduprijeti borbu protiv kobnih infekcija *P. aeruginosa*.

6. LITERATURA

- Kalenić S. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 215-220.
- Ołdak E, Trafny EA. Secretion of Proteases by *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(8), 3281–3288.
- Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 2017, 7, 39.
- Barr HL, Halliday N, Cámara M, Barrett DA, Williams P, Forrester DL, Simms R, Smyth AR, Honeybourne D, Whitehouse JL, Nash EF, Dewar J, Clayton A, Knox AJ, Fogarty AW. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecules correlate with clinical status in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*, 2015, 46(4), 1046–1054.
- 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.
- Chong H, Li Q. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1), 137.
- Sekhona Randhawa KK, Rahman PKSM. Rhamnolipid biosurfactants, past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5, 454.
- Yang A, Tang WS, Si T, Tang JX. Influence of Physical Effects on the Swarming Motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophysical Journal*, 2017, 112(7), 1462-1471.
- Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resistance Updates*, 2000, 3(4), 247-255.
- Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6), 27-29.
- Fejzuli L, Solomun Kolanović B, Šušković, J, Kos B, Bilandžić N. Aminoglikozidni antibiotici – primjena u veterinarstvu i kontrola u hrani životinjskog podrijetla. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 2018, 13 (3-4), 95-106.
- Poole K. Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(2), 479–487.
- Brogden RN, Pinder RM, Sawyer PR, Speight TM, Avery GS. Tobramycin: a review of its antibacterial and pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*. 1976, 12(3), 166-200.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46, 446-475.

Macwan SR, Dabhi BK, Aparnathi KD, Prajapati JB. Essential oils of herbs and spices: their antimicrobial activity and application in preservation of food. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 2016, 5, 885-901.

Cox-Georgian, D, Ramadoss, N, Dona C, Basu C. Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes. U: Medicinal Plants. Joshee N, Dhekney S, Parajuli P, urednici, Springer, Cham, 2019, str. 333–359.

Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 2016, 1-21.

Ferdes M. Antimicrobial compounds from plants. U: Fighting Antimicrobial Resistance. Budimir A, urednica, IAPC-OBP, Zagreb, Croatia, 2018, str. 243-271.

Aelenei P, Miron A, Trifan A, Bujor A, Gille E, Aprotosoai AC. Essential Oils and Their Components as Modulators of Antibiotic Activity against Gram-Negative Bacteria. *Medicines*, 2016, 3(3), 19.

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

Kuštrak D. Farmakognozija fitofarmacija. Zagreb, Golden Marketing - Tehnička Knjiga, 2005, str. 219-225.

Kowalczyk A, Przychodna M, Sopata S, Bodalska A, Fecka I. Thymol and Thyme Essential Oil—New Insights into Selected Therapeutic Applications. *Molecules*, 2020, 25(18), 4125.

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

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

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.

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

Kerner N. Utjecaj eteričnog ulja biljnih vrsta *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch i *Calamintha officinalis* na proteolitičku aktivnost i pokretljivost bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomski rad 2021, Sveučilište u Zagrebu.

Kollaran AM, Joge S, Kotian HS, Badal D, Prakash D, Mishra A, Varma M, Singh V. Context-Specific Requirement of Forty-Four Two-Component Loci in *Pseudomonas aeruginosa* Swarming. *iScience*. 2019, 13, 305-317.

Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(6), 3128.

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

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

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.

Kemijska struktura mentola

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Menthol#section=2D-Structure>, pristupljeno 1.10. 2021.

Kemijska struktura linalola

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linalool#section=Structures>, pristupljeno 1.10.2021.

Kemijska struktura geraniola

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Geraniol#section=2D-Structure>, pristupljeno 1.10.2021

7. SAŽETAK/SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa ubikvitarni je oportunistički patogen koji je sve češći uzročnik bolničkih infekcija, primarno kod imunokompromitiranih pacijenata i pacijenata s kroničnim ranama. Predstavlja sve veći problem u zdravstvu upravo zbog brojnih faktora virulencije koji omogućuju bakteriji prodor u i kroz tkivo domaćina i sposobnosti izbjegavanja imunskog sustava domaćina. Ima brojne efektivne mehanizme rezistencije na antibiotike što dodatno otežava proces liječenja. *Pseudomonas aeruginosa* je sposobna stvoriti biofilm, a stvaranje biofilma je pod kontrolom bakterijske međustanične komunikacije. Isto tako, pod kontrolom bakterijske međustanične komunikacije su kretanje bakterije u obliku rojenja, rezistencija na antibiotike, stvaranje i izlučivanje faktora virulencije poput proteaza koje imaju sposobnost razgradnje tkiva domaćina, te ostalih sekundarnih metabolita koji dodatno kompliciraju infekciju bakterijom. Budući da se javlja sve veća rezistencija na klasičnu terapiju antibioticima, počinje se uzimati u obzir mogućnost korištenja eteričnih ulja u kombinaciji s antibioticima ili zasebno. Eterična ulja su odavno poznata po svojim antimikrobnim svojstvima te zbog više mehanizama djelovanja na bakterije, pokazuju se kao dobri kandidati za testiranje na rast *P. aeruginosa*. U ovom radu ispitan je utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. i njene glavne sastavnice timola u koncentraciji od 0,5 mg/mL, zasebno i u kombinaciji s aminoglikozidnim antibiotikom tobramicinom u subinhibitornim koncentracijama od 0,5 µg/mL i 2 µg/mL na pokretljivost u obliku rojenja i proteolitičku aktivnost *Pseudomonas aeruginosa* sojeva ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*+), PA14 i PAO1. Tobramicin zasebno djeluje inhibitorno na rojenje i proteolitičku aktivnost svih sojeva osim BB1285 (*rmtD*+), upravo zbog njegove visoke rezistencije na aminoglikozide. Eterično ulje *Satureja montana* L. djeluje inhibitorno na proteolitičku aktivnost soja PA14, a za soj PAO1 nema izražen učinak, dok za soj ATCC 27853 i BB1285 (*rmtD*+) djeluje promotivno. Timol pokazuje inhibitorno djelovanje jačeg intenziteta na proteolitičku aktivnost za soj PA14 i PAO1, promotivno za soj BB1285 (*rmtD*+), a za soj ATCC 27853 nema izražen učinak. Eterično ulje *Satureja montana* L. i timol djeluju inhibitorno na rojenje sojeva ATCC 27853, PAO1 i PA14, a na soj BB1285 (*rmtD*+) nemaju učinka, s time da timol pokazuje inhibitorni učinak jačeg intenziteta. Eterično ulje *Satureja montana* L. i tobramicin u kombinaciji pokazuju sinergistički učinak i djeluju inhibitorno na proteolitičku aktivnost sojeva ATCC 27853, PA14 i PAO1, a na soj BB1285 (*rmtD*+) nemaju izraženog učinka. Kombinacija timola i tobramicina je pokazala isti učinak, no jačeg intenziteta. Eterično ulje *Satureja montana* L. i tobramicin u kombinaciji pokazuju inhibitorni učinak na rojenje za sojeve ATCC 27853, PAO1 i PA14, dok za soj BB1285 (*rmtD*+) ne pokazuje vidljivi učinak. Kod soja ATCC 27853, PAO1 i PA14 se

vidi antagonističko djelovanje. Učinak kombinacije timola i tobramicina na rojenje je isti kao i kombinacija eteričnog ulja *Satureja montana* L. i tobramicina, no jačeg intenziteta, što upućuje da je timol sastavnica koja ima najznačajniji učinak u eteričnom ulju *Satureja montana* L. Rezultati ovoga rada doprinijet ćemo daljnjem istraživanju novih mogućnosti u borbi protiv infekcija uzrokovanih bakterijom *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous opportunistic pathogen that is becoming an increasingly common cause of hospital infections. It is an increasing problem in health care because of the numerous virulence factors that allow the bacteria to penetrate into and through the host's tissue and its ability to avoid the immune system of the host. It has numerous effective mechanisms of antibiotic resistance, which further complicates the treatment process. *Pseudomonas aeruginosa* is capable of producing biofilm, which is controlled by quorum sensing. Also, quorum sensing controls the movement of the bacteria in the form of swarming, antibiotic resistance, formation and excretion of various virulence factors, such as proteases that have the ability to break down the host's tissue and other secondary metabolites that further complicate the infection. Since the resistance to conventional antibiotic therapy is constantly increasing, the possibility of using essential oils separately or in combination with antibiotics may be considered. Essential oils have long been known for their antimicrobial properties and due to several mechanism of action towards bacteria, they are taken into consideration as good candidates for *P. aeruginosa* growth testing. This study examined the effects of *Satureja montana* L. essential oil and its main component thymol at a concentration of 0,5 mg/mL, separately and in combination with aminoglycoside tobramycin at subinhibitory concentrations of 0,5 µg/mL and 2 µg/mL on swarming motility and the proteolytic activity of *P. aeruginosa* strains ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*+) PA14 and PAO1. Tobramycin showed an inhibitory effect on swarming and proteolytic activity of all strains except BB1285 (*rmtD*+) because of its high resistance to aminoglycosides. *Satureja montana* L. essential oil acted inhibitory to the proteolytic activity of strain PA14, but for the strain PAO1 it had no visible effect, while for strains ATCC 27853 and BB1285 (*rmtD*+) it stimulated the proteolytic activity. Thymol demonstrated inhibitory effect of higher intensity towards proteolytic activity of strains PA14 and PAO1, promotive effect for BB1285 (*rmtD*+) and no effect for strain ATCC27853. *Satureja montana* L. essential oil and thymol had an inhibitory effect on the swarming of strains ATCC 27853, PAO1 and PA14, but for the strain BB1285 (*rmtD*+) they showed no effect, with thymol showing inhibitory effect of higher intensity. *Satureja montana* L. essential oil and

tobramycin in combination showed synergistic effect on reducing the proteolytic activity for strain ATCC 27853, PA14 and PAO1, but for strain BB1285 (*rmtD*+) they had no significant effect. The combination of thymol and tobramycin demonstrated the same effect, but of a higher intensity. *Satureja montana* L. essential oil and tobramycin in combination reduced the swarming of strains ATCC27853, PA14 and PAO1, while for strain BB1285 (*rmtD*+) they had no significant effect. Antagonistic effect of tobramycin and *Satureja montana* L. essential oil was shown on strains ATCC 27853, PAO1 and PA14. Effects of combination of thymol and tobramycin on swarming was the same as that of the combination of tobramycin and *Satureja montana* L., but of a higher intensity, which indicates that thymol is a component that has the most significant effect in *Satureja montana* L. The results of this study will hopefully contribute to further research of new possibilities in fighting *Pseudomonas aeruginosa* infections.

Temeljna dokumentacijska kartica

Diplomski rad

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

Utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. i timola na pokretljivost te proteolitičku aktivnost bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Fran Duspara

Pseudomonas aeruginosa ubikvitarni je oportunistički patogen koji je sve češći uzročnik bolničkih infekcija, primarno kod imunokompromitiranih pacijenata i pacijenata s kroničnim ranama. Predstavlja sve veći problem u zdravstvu upravo zbog brojnih faktora virulencije koji omogućuju bakteriji prodor u i kroz tkivo domaćina i sposobnosti izbjegavanja imunskog sustava domaćina. Ima brojne efektivne mehanizme rezistencije na antibiotike što dodatno otežava proces liječenja. *Pseudomonas aeruginosa* je sposobna stvoriti biofilm, a stvaranje biofilma je pod kontrolom bakterijske međustanične komunikacije. Isto tako, pod kontrolom bakterijske međustanične komunikacije su kretanje bakterije u obliku rojenja, rezistencija na antibiotike, stvaranje i izlučivanje faktora virulencije poput proteaza koje imaju sposobnost razgradnje tkiva domaćina, te ostalih sekundarnih metabolita koji dodatno kompliciraju infekciju bakterijom. Budući da se javlja sve veća rezistencija na klasičnu terapiju antibioticima, počinje se uzimati u obzir mogućnost korištenja eteričnih ulja u u kombinaciji s antibioticima ili zasebno. Eterična ulja su odavno poznata po svojim antimikrobnim svojstvima te zbog više mehanizama djelovanja na bakterije, pokazuju se kao dobri kandidati za testiranje na rast *P. aeruginosa*. U ovom radu ispitan je utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. i njene glavne sastavnice timola u koncentraciji od 0,5 mg/mL, zasebno i u kombinaciji s aminoglikozidnim antibiotikom tobramicinom u subinhibitornim koncentracijama od 0,5 µg/mL i 2 µg/mL na pokretljivost u obliku rojenja i proteolitičku aktivnost *Pseudomonas aeruginosa* sojeva ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*+), PA14 i PAO1. Tobramicin zasebno djeluje inhibitory na rojenje i proteolitičku aktivnost svih sojeva osim BB1285 (*rmtD*+), upravo zbog njegove visoke rezistencije na aminoglikozide. Eterično ulje *Satureja montana* L. djeluje inhibitory na proteolitičku aktivnost soja PA14, a za soj PAO1 nema izražen učinak, dok za soj ATCC 27853 i BB1285 (*rmtD*+) djeluje promotivno. Timol pokazuje inhibitory djelovanje jačeg intenziteta na proteolitičku aktivnost za soj PA14 i PAO1, promotivno za soj BB1285 (*rmtD*+), a za soj ATCC 27853 nema izražen učinak. Eterično ulje *Satureja montana* L. i timol djeluju inhibitory na rojenje sojeva ATCC 27853, PAO1 i PA14, a na soj BB1285 (*rmtD*+) nemaju učinka, s time da timol pokazuje inhibitory učinak jačeg intenziteta. Eterično ulje *Satureja montana* L. i tobramicin u kombinaciji pokazuju sinergistički učinak i djeluju inhibitory na proteolitičku aktivnost sojeva ATCC 27853, PA14 i PAO1, a na soj BB1285 (*rmtD*+) nemaju izraženog učinka. Kombinacija timola i tobramicina je pokazala isti učinak, no jačeg intenziteta. Eterično ulje *Satureja montana* L. i tobramicin u kombinaciji pokazuju inhibitory učinak na rojenje za sojeve ATCC 27853, PAO1 i PA14, dok za soj BB1285 (*rmtD*+) ne pokazuje vidljivi učinak. Kod soja ATCC 27853, PAO1 i PA14 se vidi antagonističko djelovanje. Učinak kombinacije timola i tobramicina na rojenje je isti kao i kombinacija eteričnog ulja *Satureja montana* L. i tobramicina, no jačeg intenziteta, što upućuje da je timol sastavnica koja ima najznačajniji učinak u eteričnom ulju *Satureja montana* L. Rezultati ovoga rada doprinijet ćemo daljnjem istraživanju novih mogućnosti u borbi protiv infekcija uzrokovanih bakterijom *Pseudomonas aeruginosa*.

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

Rad sadrži: 44 stranica, 18 slika, 6 tablica i 36 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

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

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: ožujak 2022.

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 *Satureja montana* L. essential oil and thymol on motility and proteolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa*

Fran Duspara

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous opportunistic pathogen that is becoming an increasingly common cause of hospital infections. It is an increasing problem in health care because of the numerous virulence factors that allow the bacteria to penetrate into and through the host's tissue and its ability to avoid the immune system of the host. It has numerous effective mechanisms of antibiotic resistance, which further complicates the treatment process. *Pseudomonas aeruginosa* is capable of producing biofilm, which is controlled by quorum sensing. Also, quorum sensing controls the movement of the bacteria in the form of swarming, antibiotic resistance, formation and excretion of various virulence factors, such as proteases that have the ability to break down the host's tissue and other secondary metabolites that further complicate the infection. Since the resistance to conventional antibiotic therapy is constantly increasing, the possibility of using essential oils separately or in combination with antibiotics may be considered. Essential oils have long been known for their antimicrobial properties and due to several mechanism of action towards bacteria, they are taken into consideration as good candidates for *P. aeruginosa* growth testing. This study examined the effects of *Satureja montana* L. essential oil and its main component thymol at a concentration of 0,5 mg/mL, separately and in combination with aminoglycoside tobramycin at subinhibitory concentrations of 0,5 µg/mL and 2 µg/mL on swarming motility and the proteolytic activity of *P. aeruginosa* strains ATCC 27853, BB1285 (*rmtD*+) PA14 and PAO1. Tobramycin showed an inhibitory effect on swarming and proteolytic activity of all strains except BB1285 (*rmtD*+) because of its high resistance to aminoglycosides. *Satureja montana* L. essential oil acted inhibitory to the proteolytic activity of strain PA14, but for the strain PAO1 it had no visible effect, while for strains ATCC 27853 and BB1285 (*rmtD*+) it stimulated the proteolytic activity. Thymol demonstrated inhibitory effect of higher intensity towards proteolytic activity of strains PA14 and PAO1, promotive effect for BB1285 (*rmtD*+) and no effect for strain ATCC27853. *Satureja montana* L. essential oil and thymol had an inhibitory effect on the swarming of strains ATCC 27853, PAO1 and PA14, but for the strain BB1285 (*rmtD*+) they showed no effect, with thymol showing inhibitory effect of higher intensity. *Satureja montana* L. essential oil and tobramycin in combination showed synergistic effect on reducing the proteolytic activity for strain ATCC 27853, PA14 and PAO1, but for strain BB1285 (*rmtD*+) they had no significant effect. The combination of thymol and tobramycin demonstrated the same effect, but of a higher intensity. *Satureja montana* L. essential oil and tobramycin in combination reduced the swarming of strains ATCC27853, PA14 and PAO1, while for strain BB1285 (*rmtD*+) they had no significant effect. Antagonistic effect of tobramycin and *Satureja montana* L. essential oil was shown on strains ATCC 27853, PAO1 and PA14. Effects of combination of thymol and tobramycin on swarming was the same as that of the combination of tobramycin and *Satureja montana* L., but of a higher intensity, which indicates that thymol is a component that has the most significant effect in *Satureja montana* L. The results of this study will hopefully contribute to further research of new possibilities in fighting *Pseudomonas aeruginosa* infections.

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

Thesis includes: 44 pages, 18 pictures, 6 tables and 36 references. Original is in Croatian language.

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

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: March 2022.