

Utjecaj eteričnog ulja biljne vrste Calamintha officinalis Moench i pulegona na proizvodnju piocijanina bakterije Pseudomonas aeruginosa PAO1

Španić, Fani

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:906420>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



Fani Španić

Utjecaj eteričnog ulja biljne vrste *Calaminhta officinalis* Moench i pulegona na proizvodnju piocijanina bakterije *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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 na uloženom trudu i pruženoj pomoći tijekom izrade ovog rada.

Također zahvaljujem i svojoj obitelji na vječnoj ljubavi i strpljenju koje su za mene imali kroz cijeli moj život.

Hvala i svim predivnim prijateljima koji su mi olakšali studiranje i ispunili život smijehom i lijepim uspomenama.

Posebno zahvaljujem Ivi i Zrinki na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju koje je uvijek imala za mene.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.1. Čimbenici virulencije	1
1.1.2. Bakterijska međustanična komunikacija (engl. <i>quorum sensing</i>)	3
1.2. Piocijanin	5
1.2.1. Značajke i sinteza	5
1.2.2. Uloga u infekciji	6
1.3. Antibiotici i rezistencija	7
1.3.1. Antibiotička rezistencija bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.3.2. Tobramicin	9
1.4. <i>Calamintha officinalis</i>	10
1.4.1. Eterično ulje biljke <i>Calamintha officinalis</i>	10
1.4.2. Pulegon	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Materijali	13
3.1.1. Bakterije	13
3.1.2. Standardne kemikalije i otopine	13
3.1.3. Eterično ulje i komponente	13
3.1.4. Antibiotici	13
3.1.5. Hranjivi mediji	13
3.2. Metode	13
3.2.1. Priprava otopina eteričnog ulja vrste <i>Calamintha officinalis</i> i pulegona	14
3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije tobramicina	14
3.2.3. Priprema i tretiranje bakterijske kulture s otopinama eteričnog ulja kalaminte, pulegona i tobramicina	14
3.2.4. Određivanje vrijednosti optičke gustoće bakterijske kulture OD ₆₀₀	16
3.2.5. Ekstrakcija piocijanina	16
3.2.5. Statistička analiza	18
4. REZULTATI	19
4.1. Minimalna inhibitorna koncentracija tobramicina	19
4.2. Učinak eteričnog ulja kalaminte i pulegona zasebno i u kombinaciji s tobramicinom na rast bakterija <i>P. aeruginosa</i>	20
4.3. Učinak eteričnog ulja kalaminte i pulegona zasebno i u kombinaciji s tobramicinom na proizvodnju piocijanina	21

5. RASPRAVA.....	24
6. ZAKLJUČAK.....	28
7. LITERATURA	29
8. SAŽETAK/SUMMARY	32

1. UVOD

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

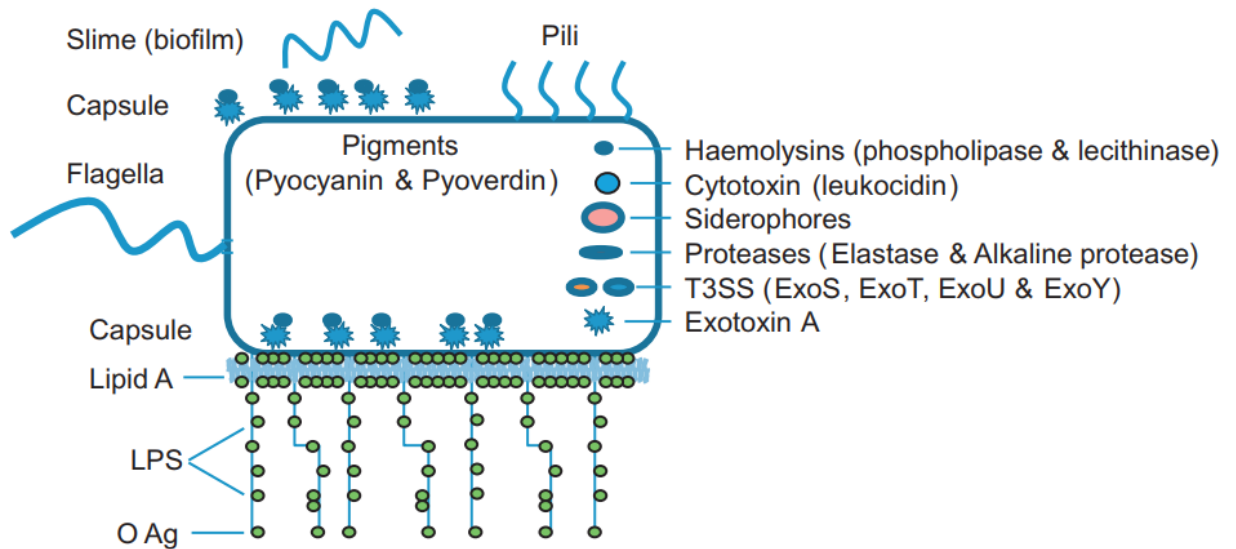
Pseudomonas aeruginosa je Gram-negativna, aerobna bakterija iz porodice *Pseudomonaceae*. Ubikvitarna je bakterija prilagodljiva na različite okolišne uvjete pa se može izolirati iz tla, vode, biljaka i životinja. Metabolizam je striktno aerobni s kisikom kao terminalnim akceptorom elektrona, a kao izvor ugljika može koristiti jednostavne i složene ugljikohidrate, aminokiseline i alkohole. Najčešće je mezofilna s optimalnom temperaturom rasta i razvoja između 30°C i 37°C, ali određeni sojevi mogu opstati i na temperaturama od 4°C do 42°C. Posjeduje jedan ili više polarnih bičeva te fimbrije što ju čini visoko pokretnom vrstom bakterije. Nesporogeni je oportunistički patogen koji često uzrokuje bolničke infekcije kod imunokompromitiranih pacijenata. Iako rijetko uzrokuje infekcije zdravih pojedinaca, može inficirati bilo koje tkivo kod kompromitiranih pacijenata uključujući mokraćni sustav, dišni sustav, kožu, kosti i zglobove, gastrointestinalni trakt i krv. Posebno je opasna kod pacijenata s teškim bolestima kao što su AIDS, rak ili cistična fibroza kod kojih uzrokuje infekcije s 50% smrtnosti (Wu i Li 2015).

1.1.1. Čimbenici virulencije

Zbog velikog genoma (5,5 – 7 milijuna parova baza), *P. aeruginosa* ima mogućnost kodiranja velikog broja čimbenika virulencije koji osiguravaju izbjegavanje obrambenih mehanizama imunskog sustava te uspostavljanje i održavanje infekcije. Osim toga, oko 8% genoma kodira regulatorne gene, što omogućuje bakteriji da razvije kompleksnu mrežu regulatornih signala i prilagodi se složenim okruženjima rasta. Na taj je način ekspresija faktora virulencije vremenski i prostorno kontrolirana što bakteriji pruža maksimalnu šansu za preživljavanje.

Čimbenici virulencije mogu se podijeliti na strukturne i sekrecijske. **Strukturne faktore** čine adhezini koji su ključni u ranoj fazi infekcije s obzirom da omogućuju vezanje i kolonizaciju tkiva domaćina. Tri glavna faktora adhezije *P. aeruginosa* su pili (fimbrije), flagele (polarni bič) i lipopolisaharid (LPS). Pili tipa 4 (T4P) posreduju adheziju bakterije na epitelne stanice domaćina, flagele mogu vezati mucine na površini stanica, a sržni oligosaharidi u sastavu LPS-a omogućuju vezanje na transmembranski regulator cistične fibroze (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR). Osim toga, adhezini su značajni u

posredovanju mnogih drugih funkcija kao što je pokretljivost, formiranje biofilma, transformacija DNA i izbjegavanje imunskog odgovora. Glavni čimbenici virulencije prikazani su na Slici 1.



Slika 1. Glavni čimbenici virulencije bakterije *P. aeruginosa* (preuzeto iz Wu i Li, 2015).

Sekrecijski faktori virulencije izlučuju se u međustanični prostor ili u citosol stanica domaćina putem različitih sustava sekrecije. *P. aeruginosa* posjeduje 5 sustava sekrecije: tip I, tip II, tip III, tip V i tip VI. Sekrecijski sustav tip I uključen je u sekreciju tri važna faktora virulencije, alkalne proteaze AprA, hemofera HasAp i pigmenata (piocijanin i pioverdin). Proteaza AprA može razgraditi ljudski interferon gama (IFN- γ) te se smatra iznimno važnim faktorom virulencije kod pacijenata oboljelih od cistične fibroze jer može aktivirati epitelne natrijeve kanale i na taj način poremetiti izlučivanje tekućine i pogoršati kliničku sliku pacijenata. Hemofer HasAp veže hem iz hemoglobina i smatra se ključnim faktorom preživljavanja bakterije u ranoj fazi infekcije. Sekrecijski sustav tip II u ekstracelularni prostor izlučuje proteine LasA, LasB, PrpL, ExoA i fosfolipazu C. LasA i LasB imaju elastaznu aktivnost pa mogu djelovati na komponente vezivnog tkiva kao što je elastin i olakšavati prodor bakterije u tkivo. Također sudjeluju u razgradnji IgA i IgG protutijela te komponenti komplementa i na taj način značajno oslabljuju imunski odgovor domaćina. Egzotoksin ExoA je glavni faktor virulencije koji inhibira sintezu proteina u stanicama domaćina i uzrokuje staničnu smrt. Karakteristika sekrecijskog sustava III i IV je mogućnost direktnog unosa faktora virulencije u citosol stanica domaćina izravno uzrokujući oštećenje tkiva. sustav tip III uključen je u sekreciju 4 citotoksina - ExoS, ExoT, ExoU, ExoY, koji na različite načine ometaju faze

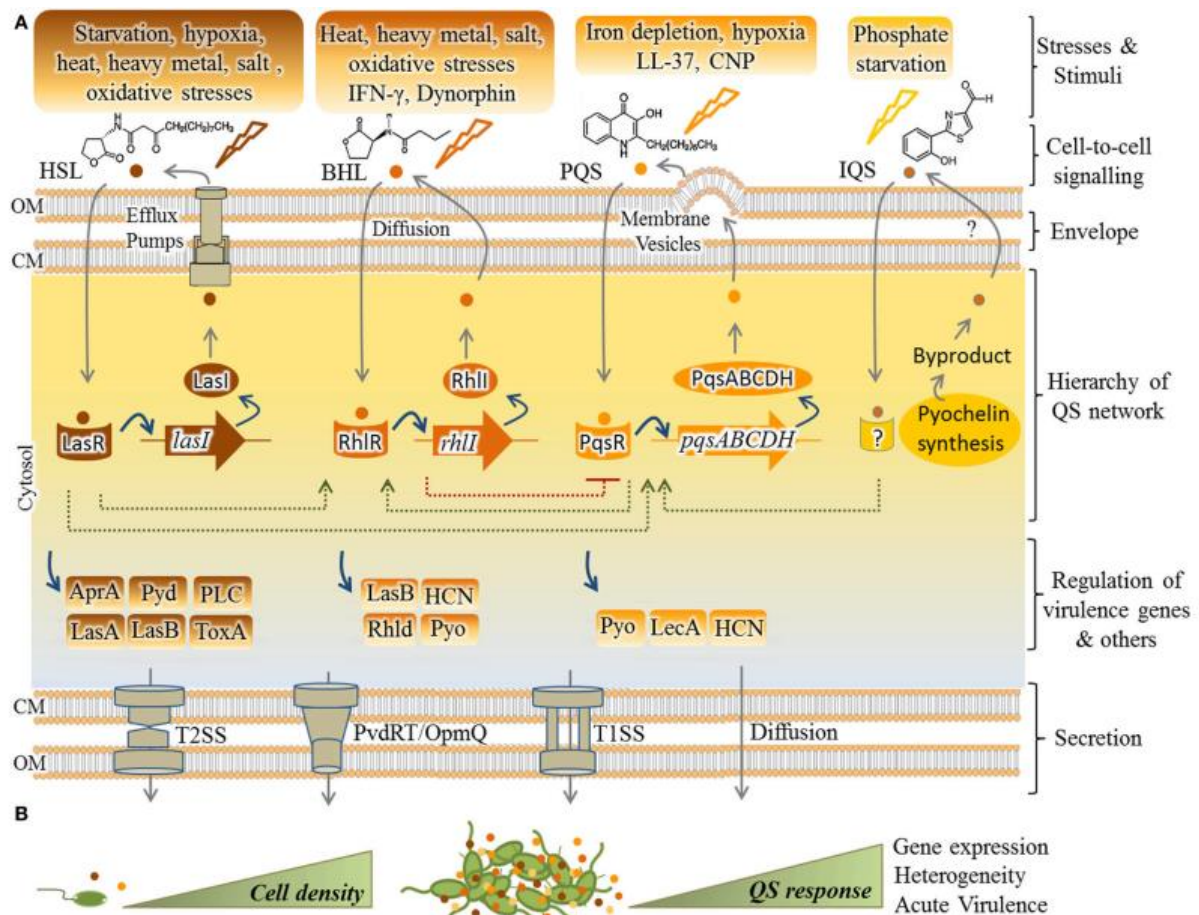
staničnog ciklusa i posljedično djeluju citotoksično. Sekrecijski sustav tip V izlučuje proteine LepA, LepB i EstA čije djelovanje nije u potpunosti razjašnjeno. Vrlo važan sekrecijski faktor virulencije je i alginat. Alginat je polimer D-manuronske i L-glukuronske kiseline koji može stvarati zaštitni matriks oko kolonije bakterija. On štiti *P. aeruginosa* od imunskog odgovora domaćina tako što inhibira aktivaciju komplementa, smanjuje stopu fagocitoze i onemogućuje nakupljanje slobodnih radikala koji djeluju toksično na bakterijske stanice (Wu i sur., 2015).

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

Pseudomonas aeruginosa je visoko interaktivna vrsta bakterije koja pokazuje niz mogućnosti kolektivnog ponašanja reguliranog bakterijskom međustaničnom komunikacijom. Bakterijska međustanična komunikacija ili engl. *quorum sensing* (QS) je genski regulacijski mehanizam koji omogućuje komunikaciju individualnih bakterijskih stanica sintezom signalnih molekula koje se nazivaju autoinduktori (AI). Pri postignutoj koncentraciji autoinduktora iznad kritičnog stimulatornog praga populacija bakterija može djelovati na okolišne uvjete koordiniranim odgovorom. To se odvija na način da sve bakterije u populaciji sintetiziraju i luče signalne molekule koje se vežu na specifične receptore na bakterijskim stanicama i posljedično uzrokuju promjene u genskoj ekspresiji (Williams i Cámara, 2009). Na taj način bakterije mogu potaknuti stvaranje biofilma, promjene u pokretljivosti, mehanizme antibiotičke rezistencije ili povećanu proizvodnju sekundarnih metabolita i faktora virulencije.

Pseudomonas aeruginosa posjeduje 4 glavna sustava međustanične signalizacije; Las, Rhl, Pqs i IQS. Nedostatak jedne ili više komponenata uzrokuje manje oštećenje tkiva te općenito blažu kliničku sliku kod inficiranih pacijenata uslijed značajnog smanjenja virulencije i citotoksičnosti (Nelson i sur., 2009). Svi sustavi sadrže tri glavna elementa: specifični autoinduktor, transkripcijski faktor i sintazu proteina. Kako je IQS sustav zadnji otkriven, još nisu poznati svi elementi tog sustava. Autoinduktori HSL (3-okso-C12-homoserin lakton), BHL (N-butirilhomoserin lakton), PQS (2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon) i IQS (2-(2-hidroksifenil)-tiazol-4-karbaldehid) aktiviraju transkripcijske faktore (LasR, RhlR i PqsR) koji potiču ekspresiju pripadajućih sintaza AI (LasI, RhlI, PqsABCDH). Sintetizirani autoinduktori ulaze i izlaze iz bakterijskih stanica procesom difuzije ili pomoću efluksnih proteinskih pumpi. *Quorum sensing* sustavi aktiviraju se u odgovoru na okolišne faktore stresa kao što su nedostatak željeza ili fosfata, imunski odgovor domaćina, bakterijska kompeticija, hipoksija i

oksidativni stres. Aktivacija dovodi do nakupljanja AI, povećanja gustoće populacije i pojačane sinteze faktora virulencije (Slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz četiri glavna sustava međustanične komunikacije (preuzeto iz Moradali i sur., 2017).

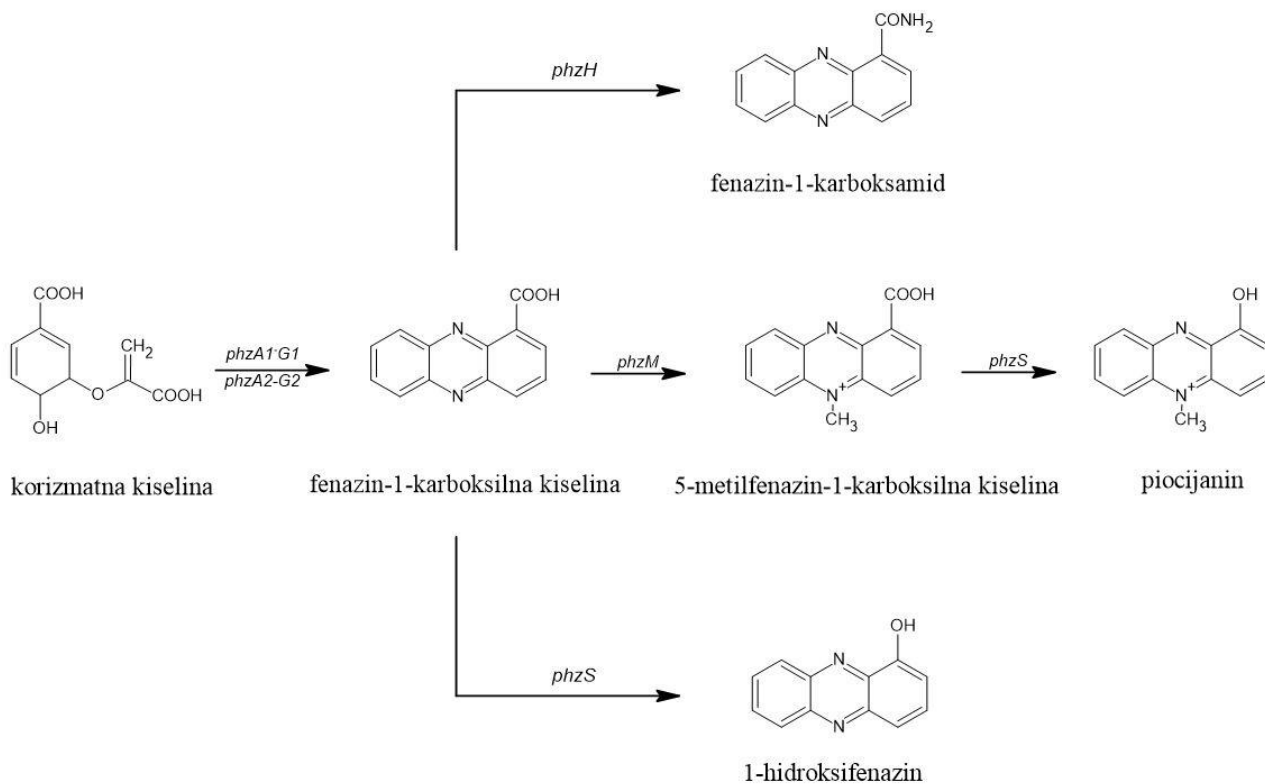
Las sustav kontrolira sva tri ostala sustava pa se smatra glavnim regulacijskim sustavom QS-a. Vezanjem HSL autoinduktora na LasR receptorske proteine oni postaju aktivni transkripcijski faktori koji aktiviraju promotore gena virulencije. Ovaj sustav potiče transkripciju gena za elastazu, alkalnu proteazu, egzotoksin A i druge. **Rhl sustav** funkcionira na vrlo sličan način. BHL autoinduktor veže se na RhlI receptor koji kao transkripcijski faktor aktivira sintezu elastaze, ramnolipida, cijanovodika i piocijanina. Aktivira se na poticaj oksidacijskog stresa, povišene temperature i prisutnosti povišene koncentracije teških metala ili IFN- γ . **Pqs sustav** se za razliku od ostalih aktivira tek u kasnoj ekspanzijskoj fazi rasta. Odgovara na podražaje kao što je deplecija željeza, hipoksija i prisutnost LL-37 antimikrobnog peptida te potiče sintezu lektina, cijanovodika i piocijanina (Moradali i sur., 2017).

1.2. Piocijanin

P. aeruginosa proizvodi više pigmenata, uključujući piocijanin (plavo-zeleni), pioverdin (žuto-zeleni i fluorescentni), piorubin (crveno-smeđi) i piomelanin (crni). Piocijanin je važan faktor virulencije zbog uloge u stvaranju biofilma važnog za održavanje postojanosti bakterije na mjestu infekcije, ali i zbog direktnih mehanizama kojima štetno djeluje na tkivo domaćina. Dokazano je više poremećaja fizioloških funkcija povezanih s piocijaninom, međutim, molekularni mehanizam patoloških procesa koje uzrokuje nije u potpunosti razjašnjen (Wu i sur. 2015).

1.2.1. Značajke i sinteza

Piocijanin je vodotopljiv, plavozeleni pigment koji bakterija *Pseudomonas aeruginosa* proizvodi kao sekundarni metabolit. Strukturno je derivat fenazina (5-metil-1-hidroksifenazin) te može sudjelovati u redoks reakcijama u prisustvu kisika posljedično stvarajući toksične kisikove radikale koji uzrokuju oštećenja tkiva pri infekciji (Britigan et al., 1992). Sintezu piocijanina, kao i sintezu ostalih faktora virulencije, regulira *quorum sensing*. Započinje u ranoj stacionarnoj fazi razvoja aktivacijom operona *phzA1-G1* i *phzA2-G2* (tzv. Geni koji proizvode fenazine) putem QS signalnih molekula. Primarna signalna molekula N-acil-L-homoserin lakton (AHL) i PQS kontroliraju ekspresiju operona *phzA-G* uzrokujući produkciju fenazin-1-karboksilne kiseline (PCA) iz korizmatne kiseline (Slika 3). PCA se dalje metabolizira pod utjecajem gena *phzM* u različite produkte od kojih je najzastupljeniji piocijanin (Das i sur., 2016).



Slika 3. Sinteza piocijanina iz korizmatne kiseline.

1.2.2. Uloga u infekciji

Piocijanin je izoliran je u značajnim količinama iz sputuma pacijenata s cističnom fibrozom inficiranim *P. aeruginosa* i iz sekreta uha kod pacijenata s kroničnim otitisom posredovanim *P. aeruginosa* infekcijom. Također je dokazano da mutanti koji ne proizvode piocijanin ili ga proizvode u značajno manjim količinama uzrokuju niže razine smrtnosti od bakterije divljeg tipa (Lau i sur., 2004).

Piocijanin je zwitterion niske molekulske mase što mu omogućuje prolazak kroz biološke membrane stanica gdje stupa u redoks reakcije s drugim molekulama. Glavni mehanizam citotoksičnosti piocijanina je indukcija oksidacijskog stresa. Piocijanin prima elektrone od NADH i donira ih molekularnom kisiku stvarajući reaktivne kisikove specije (ROS) kao što su superoksid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) i vodikov peroksid (H_2O_2). Ti radikali direktno mogu oštetiti DNA i inhibirati stanične enzime, ali mogu i posredno uzrokovati oštećenja smanjujući razinu aktivnog reduciranog glutationa (GSH) u stanici. Kod pacijenata s cističnom fibrozom dokazano je da snižene razine reduciranog glutationa uzrokuju smrt epitelnih stanica i posljedično oštećenja pluća. Također studije pokazuju da piocijanin može i izravno oksidirati

glutathion što dodatno onemogućuje neutralizaciju radikala i promovira oksidacijski stres (Das i sur., 2016; Hall i sur., 2016).

Drugi mehanizam kojim piocijanin otežava kliničku sliku infekcije *P. aeruginosa* je poticanje stvaranja biofilma. Naime, dokazano je da sojevi *P. aeruginosa* koji u većim količinama proizvode piocijanin uzrokuju veće razine oksidativnog stresa što dovodi do lize stanica i značajnog povećanja ekstracelularne bakterijske DNA (eDNA). Pokazalo se da je upravo eDNA, čija se prisutnost vjerojatno povećava kao posljedica stanične lize putem stvaranja H₂O₂, esencijalna biomolekula za uspostavljanje biofilma *P. aeruginosa*. Piocijanin se može interkalirati između baznih parova DNA i vezati šećerno-fosfatnu okosnicu DNA. Kompleks eDNA i piocijanina utječe na hidrofobnost i površinska svojstva bakterijske stanice što povećava fizikalno-kemijske interakcije između bakterijskih stanica i komponenti biofilma (Das i sur., 2016).

1.3. Antibiotici i rezistencija

1.3.1. Antibiotička rezistencija bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* posjeduje mnoge mehanizme rezistencije na antibiotike. Kod nekih sojeva moguće je i preklapanje većeg broja mehanizama što dovodi do nastajanja panrezistentih sojeva i iznimno smanjuje izbor moguće terapije takvih infekcija. Mehanizmi se mogu podijeliti na intrinzične i stečene. Intrinzični mehanizmi rezistencije odnose se na kromosomski kodirane gene rezistencije, dok su stečeni dobiveni putem pokretnih genetičkih elemenata. Četiri glavna mehanizma rezistencije su nepropusnost membrane, efluksne pumpe, bakterijski enzimi i promjena ciljnog mjesta djelovanja antibiotika. Svi oni mogu biti regulirani unutar populacije direktno ili posredno putem QS-a.

Sve Gram-negativne bakterije imaju **vanjsku lipidnu membranu** koja onemogućuje ulaz velikih hidrofilnih molekula. Takve molekule u bakterijsku stanicu ulaze specifičnim transmembranskim kanalima koji se nazivaju porini. Mutacije koje uzrokuju gubitak ili smanjenu transkripciju gena određenih tipova porina mogu dovesti do pojačane rezistencije prema nekim tipovima antibiotika. Najveći utjecaj na rezistenciju na antibiotike ima gubitak porina OprD koji je povezan s rezistencijom na karbapeneme, posebno na imipenem. U kombinaciji s djelovanjem efluksnih pumpi gubitak ovog porina može dovesti i do rezistencije na visoko učinkoviti meropenem.

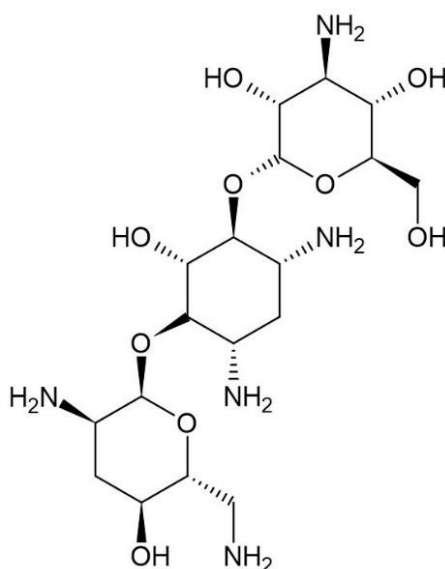
Efluksne pumpe su proteinski kompleksi koji imaju sposobnost aktivnog transporta tvari iz stanice u izvanstanični prostor. Sastoje se od porina u vanjskoj membrani, transportnog proteina u staničnoj membrani i proteina u periplazmatskom prostoru koji ih povezuje. Efluksom se sprječava akumulacija antibiotika u citosolu i njihovo baktericidno djelovanje. Različite vrste efluksnih pumpi izbacuju specifične skupine antibiotika ovisno o njihovoj građi. Najzastupljenija je konstitutivno eksprimirana pumpa MexAB-OprM koja može izbacivati florokinolone, tetracikline, kloramfenikol, β -laktame i inhibitore β -laktamaza, makrolide, trimetoprim i sulfonamide. Nalazi se intrinzično u genomu *P. aeruginosa*, a njena proizvodnja kontrolirana je QS-om.

Enzimi koji inaktiviraju antibiotike kod *P. aeruginosa* su β -laktamaze klase A,B,C i D i aminoglikozid-modificirajući enzimi. Klase A i B su stečene β -laktamaze dok se geni za enzime C i D klase nalaze na kromosomu bakterije. β -laktamaze klase A mogu inhibirati djelovanje penicilina i prvih generacija cefalosporina te su osjetljive na klavulansku kiselinu. Metalo- β -laktamaze, odnosno β -laktamaze klase B ključne su kod Gram-negativnih bacila jer mogu hidrolizirati sve β -laktamske antibiotike osim monobaktama i ne mogu se inhibirati klasičnim inhibitorima β -laktamaza. AmpC je serinska β -laktamaza klase C čija je ekspresija inducirana prisutnošću β -laktamskih antibiotika. Vezanjem tih antibiotika na ciljno mjesto, penicilin vezujuće proteine (engl. *penicillin-binding proteins*, PBP), dolazi do povišenja koncentracije muropeptida koji se vežu na receptor AmpR i pretvaraju ga u transkripcijski faktor za promotor gena AmpC. U dovoljnoj koncentraciji AmpC može djelovati na sve antibiotike osim karbapenema. Oksacilinaze su β -laktamaze klase D koje djeluju na karboksipeniciline, aminopeniciline i cefalosporine i uglavnom imaju uzak spektar djelovanja. Aminoglikozid-modificirajući enzimi uzrokuju kemijske promjene na molekulama aminoglikozidnih antibiotika kao što je adenilacija, fosforilacija ili acetilacija i na taj način inhibiraju njihovo djelovanje. U kombinaciji s rRNA metil-transferazama mogu dovesti do stvaranja višestruko rezistentnih sojeva *P. aeruginosa* (engl. *multidrug resistant*, MDR).

Promjena ciljnog mjesta djelovanja antibiotika najznačajnija je za fluorokinolone i aminoglikozidne antibiotike. Mutacije koje uzrokuju promjene aminokiselinskog slijeda enzima DNA giraze i topoizomeraze IV dovode do razvoja rezistencije na fluorokinolone. Mehanizam djelovanja aminoglikozida uključuje vezanje na 30S ribosomske podjedinice tako da mutacije 16S rRNA u sastavu ribosoma onemogućuju vezanje aminoglikozidnih antibiotika na svoje ciljno mjesto djelovanja. Bakterija *P. aeruginosa* posjeduje velik broj 16S rRNA metilaza što kod nekih sojeva može dovesti do visoke rezistencije na gentamicin, amikacin i tobramicin (Wu i sur., 2015).

1.3.2. Tobramicin

Tobramicin je aminoglikozidni antibiotik koji se najčešće koristi topički u terapiji oftalmičkih infekcija ili inhalacijski u terapiji infekcije bakterijom *P. aeruginosa* kod pacijenata s cističnom fibrozom. Prema strukturi je šećer s bazičnim amino skupinama, a farmakofor koji mu osigurava baktericidno djelovanje je 2-deoksistreptamin (Slika 4).

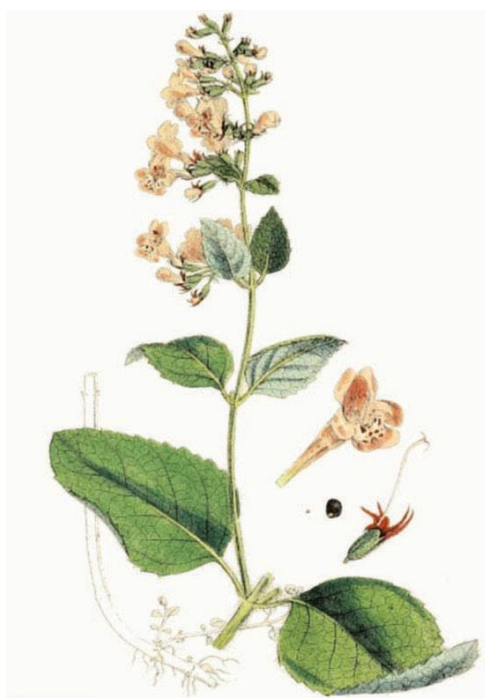


Slika 4. Kemijska struktura tobramicina.

Djeluje tako da se veže na 16S rRNA u 30S podjedinici bakterijskog ribosoma i sprječava translukaciju (pomicanje ribosoma duž mRNA molekule). Na taj se način zaustavlja sinteza proteina i otpuštaju nefunkcionalni krnji proteini koji djeluju na staničnu membranu tako da joj povećavaju permeabilnost. Zbog toga tobramicin ima neposredne baktericidne učinke putem poremećaja integriteta membrane i odgođene baktericidne učinke zbog poremećene sinteze proteina. Pokazano je da u niskim do srednjim koncentracijama tobramicina (<4 mg/L) baktericidni učinak potječe od utjecaja na sintezu proteina dok u višim koncentracijama (≥ 8 mg/L) dominantni učinak ima narušavanje integriteta vanjske membrane pod utjecajem nefunkcionalnih krnjih proteina (Davis, 1987; Bulitta i sur., 2015).

1.4. *Calamintha officinalis*

Calamintha officinalis je aromatična biljna vrsta iz porodice Lamiaceae. Široko je rasprostranjena na području Mediterana gdje se koristi kao začinska biljka te u tradicionalnoj medicini kao antiseptik, diuretik, spazmolitik i ekspektorans (Arantes et sur., 2019). Višegodišnja je grmolika biljka malih ovalnih listova sa do 9 zubaca na svakoj strani i sitnih cjevastih, dvousnih lila cvjetova (Slika 5). Raste u kasno proljeće, cvjeta u kasno ljeto, a plod dobiva na jesen. Moguće ju je pronaći u južnoj, srednjoj i zapadnoj Europi.



Slika 5. *Calamintha officinalis* Moench (preuzeto iz Singh PP et al, 2012).

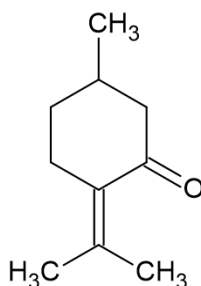
1.4.1. Eterično ulje biljke *Calamintha officinalis*

Eterično ulje vrste *Calamintha officinalis* pokazuje visoki kemijski polimorfizam, pa se može podijeliti u tri glavna kemotipa: pulegon, piperiton oksid i karvon. Najšire raspostranjeni kemotip je onaj u kojem kao glavna komponenta prevladava pulegon. Osim pulegona najzastupljenije monoterpenke komponente eteričnog ulja kalaminte su piperiton, piperitenon oksid, karvon, 1,8-cineol, mentol i menton. Upravo zbog prisutnosti aktivnih monoterpenkih sastavnica ovo eterično ulje pokazuje antimikrobna svojstva (Božović i sur., 2017). Prema istraživanju koje je uključivalo eterična ulja 4 različite vrste iz porodice Lamiaceae, eterično

ulje vrste *Calamintha officinalis* pokazalo je najviše stope antimikrobnog djelovanja prema Gram pozitivnim, Gram negativnim bakterijama i gljivicama (Panizzi et al., 1993).

1.4.2. Pulegon

Pulegon ((R)-5-metil-2-(1-metiletiliden)cikloheksanon) je monoterpenski keton prisutan u listovima i cvjetnim vrhovima porodice Lamiaceae, uključujući biljku *Calamintha officinalis*. Prirodno se pojavljuje u dva enantiomerna oblika od kojih je R-(+) enantiomer zastupljeniji u eteričnim uljima. Kemijska struktura pulegona prikazana je na Slici 6. Kao čista tvar pulegon je bezbojna, uljasta tekućina snažnog mirisa koji podsjeća na mentol. Praktički je netopljiv u vodi, ali se miješa s etanolom, kloroformom i dietileterom. Koncentracije pulegona u različitim eteričnim uljima se razlikuju ovisno o vrsti biljke, lokaciji, godišnjim klimatskim uvjetima i periodu branja. Dokazano je da koncentracije pulegona padaju u vrijeme cvatnje (Hayes i sur., 2007; Božović i sur., 2017).



Slika 6. Kemijska struktura pulegona.

Pulegon pokazuje razna biološka djelovanja kao što je antimikrobno, antipiretsko, hiperlipemijsko, abortivno i hepatotoksično. Hepatotoksičan učinak posljedica je jetrenog metabolizma pulegona u toksični metabolit mentofuran putem enzima P-450 (Gordon i sur., 1987). Antimikrobni učinak pulegona vidljiv je na više bakterijskih i gljivičnih vrsta uključujući bakteriju *P. aeruginosa*. Eterično ulje biljke *Calamintha nepeta* s pulegonom kao glavnom aktivnom tvari pokazalo je najznačajniju antimikrobnu aktivnost prema *P. aeruginosa* u usporedbi s eteričnim uljima srodnih biljaka iz porodice Lamiaceae (Panizzi i sur., 1993).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Skлонost izazivanju infekcija kod imunokompromitiranih pacijenata, široka rasprostranjenost u okolišu i širok raspon obrambenih mehanizama čine bakteriju *Pseudomonas aeruginosa* značajnim izazovom za suvremenu medicinu. Razumijevanje regulatornih mehanizama kojima *P. aeruginosa* kontrolira ekspresiju faktora virulencije ključno je za razvijanje alternativnih kliničkih intervencija koje bi mogle unaprijediti prevenciju i liječenje infekcija ovom bakterijom.

Eterična ulja ljekovitih biljaka te njihove aktivne sastavnice dugo su korištene u tradicionalnoj medicini zbog širokog spektra bioloških aktivnosti koji posjeduju, uključujući i antimikrobno djelovanje. Daljnja istraživanja *in vitro* i *in vivo* važna su jer potiču fitokemijski i biološki probir aktivnih tvari koje mogu postići pozitivne rezultate u kliničkoj praksi (Božović et al., 2017).

Svrha ovog rada je ispitati učinak eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis* i pulegona u odabranim koncentracijama na rast bakterije *P. aeruginosa* i proizvodnju piocijanina. Piocijanin je vrlo važan faktor virulencije bakterije *Pseudomonas aeruginosa* čija koncentracija dokazano korelira s težinom kliničke slike inficiranih pacijenata što ukazuje na mogućnost unaprjeđenja terapije inhibicijom njegove sinteze.

Specifični ciljevi ovog rada su:

- 1) Odrediti minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK) tobramicina za bakteriju *P. aeruginosa* PAO1 metodom serijske mikrodilucije;
- 2) Ispitati učinak eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis* Moench. i pulegona u odabranim koncentracijama zasebno i kombinaciji s tobramicinom na rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* PAO1;
- 3) Ispitati učinak eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis* Moench i pulegona u odabranim koncentracijama zasebno i u kombinaciji s tobramicinom na proizvodnju piocijanina kod bakterije *P. aeruginosa* PAO1.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Bakterije

U ovom istraživanju ispitivana je bakterijska vrsta *Pseudomonas aeruginosa*, soj PAO1 (Leibnitz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany; kataloški broj DSM 1707).

3.1.2. Standardne kemikalije i otopine

kloroform (Riedel-de-Haën)

klorovodična kiselina, HCl (Lach-Ner)

dimetilsulfoksid, DMSO (Sigma)

3.1.3. Eterično ulje i komponente

eterično ulje biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench (dobiveno ljubaznošću prof. dr. sc. Sande Vladimir Knežević, Zavod za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu)

pulegon (Sigma Aldrich)

3.1.4. Antibiotici

tobramicin sulfat (Xellia Pharmaceuticals ApS, Copenhagen, Denmark)

3.1.5. Hranjivi mediji

Korišten je tekući medij:

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

3.2. Metode

3.2.1. Priprava otopina eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis* i pulegona

U radu je korišten komercijalno pribavljeni pulegon te eterično ulje biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench (dalje u tekstu kao eterično ulje kalaminte) dobiveno destilacijom vodenom parom korištenjem Clevenger aparature. Udio pulegona u eteričnom ulju iznosi 38.1% i određen je analizom u vezanom sustavu plinski kromatograf-spektrometar masa na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Pulegon i eterično ulje kalaminte otopljeni su u otapalu DMSO do konačne koncentracije 100 mg/mL. Iz te matične otopine pripravljene su konačne koncentracije eteričnog ulja i pulegona u LB-mediju. Odabrane su koncentracije 0,5 mg/mL koje su se u prethodnim istraživanjima napravljenim u laboratoriju pokazale kao učinkovite u djelovanju na rast biofilma (Koprivčić, 2020), proizvodnju proteaza i pokretljivost (Kerner, 2021).

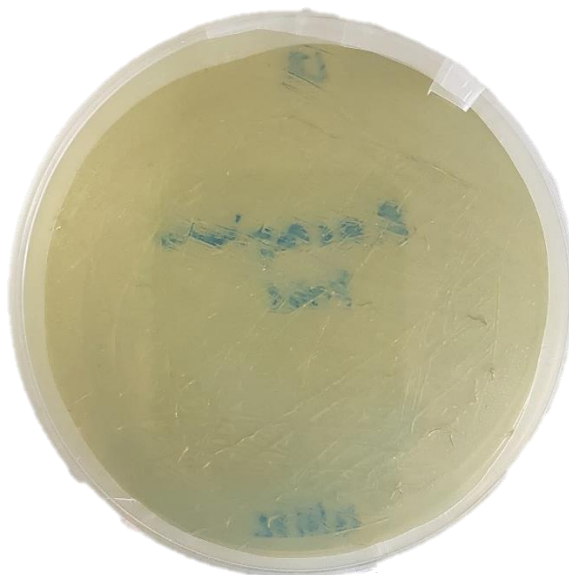
3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije tobramicina

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) tobramicina potrebna za inhibiciju rasta *Pseudomonas aeruginosa* određena je metodom serijske dilucije (Andrews, 2001). Antibiotik se geometrijskom progresijom razrjeđuje u nizu epruveta s tekućim hranjivim medijem. Mjerenje je provedeno za koncentracije 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L i 16 mg/L. 3 mL LB-medija s antibiotikom inokulirano je noćnom kulturom *P. aeruginosa* PAO1 u omjeru 1:100 te je kultura inkubirana 24 h pri temperaturi od 37°C uz potresanje od 200 rpm (zračna tresilica MaxQ 400, Thermo Scientific). Rezultat je određen ispitivanjem bistrine i stupnja замуćenja. Promatra se epruveta duž svoje osi naspram tamne podloge i uspoređuje s poredbenom suspenzijom. Poredbena suspenzija priprema se inokulacijom hranjivog medija bakterijskom kulturom PAO1 bez dodatka antibiotika. MIK je određen kao najmanja koncentracija koja inhibira vidljivi rast bakterija.

3.2.3. Priprema i tretiranje bakterijske kulture s otopinama eteričnog ulja kalaminte, pulegona i tobramicina

Ispitivanje učinka eteričnog ulja kalaminte, pulegona i tobramicina na proizvodnju piocijanina provedeno je prema prilagođenoj metodi rada Essar i sur., 1990. Prvi korak je

priprema noćne kulture bakterije *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Noćna kultura pripremljena je inokulacijom 5 mL LB medija s bakterijskom kulturom s Petrijeve ploče (Slika 7). Inkubacija je trajala 21 sat pri temperaturi od 37°C u zračnoj tresilici (MaxQ 400, Thermo Scientific) na brzini od 200 rpm.



Slika 7. Petrijeva ploča s bakterijskom kulturom *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

U šest sterilnih Erlenmeyerovih tikvica od 100 mL alikvotirano je 20 mL LB medija. U svaku pojedinu tikvicu dodan je određeni volumen matičnih otopina prema shemi u Tablici 1. Koncentracija eteričnog ulja kalaminte i pulegona u pripremljenim matičnim otopinama je 100 mg/mL. U ovom ispitivanju dodani su u volumenu od 100 μ L kako bi postigli konačnu koncentraciju od 0,5 mg/mL. Tobramicin je dodan u konačnoj koncentraciji 0,5 mg/L. U svaku tikvicu dodaje se 200 μ L prethodno inkubirane noćne kulture pri čemu se postiže razrjeđenje 1:100. Pripremljene otopine inkubirane su 24 h pri temperaturi od 37°C u zračnoj tresilici (MaxQ 400, Thermo Scientific) na brzini 200 rpm.

TIKVICA	LB MEDIJ	<i>P. a.</i> PAO1	ETERIČNO ULJE	PULEGON	TOBRAMICIN
1	20 mL	200 µL	x	x	x
2	20 mL	200 µL	100 µL	x	x
3	20 mL	200 µL	x	100 µL	x
4	20 mL	200 µL	x	x	20 µL
5	20 mL	200 µL	100 µL	x	20 µL
6	20 mL	200 µL	x	100 µL	20 µL

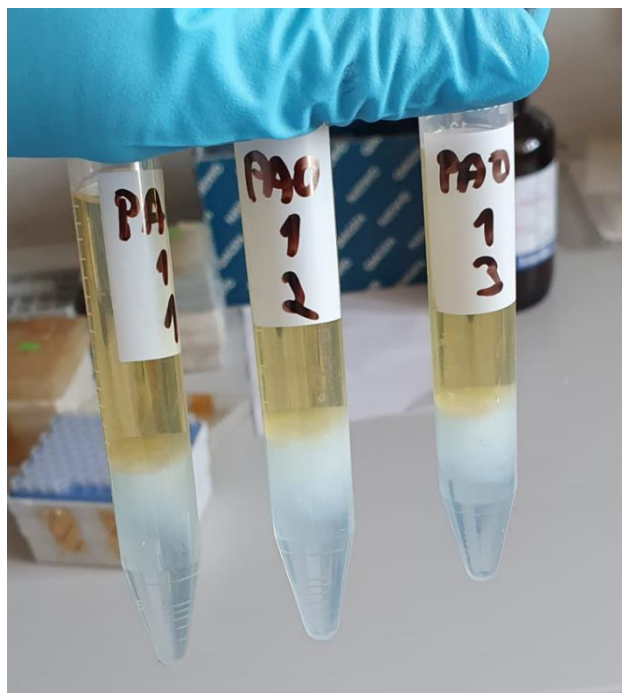
Tablica 1. Shema priprave otopina.

3.2.4. Određivanje vrijednosti optičke gustoće bakterijske kulture OD₆₀₀

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

3.2.5. Ekstrakcija piocijanina

Sadržaj prethodno pripremljenih Erlenmeyerovih tikvica prenesen je u osam Eppendorf epruveta, u svaku po 2 mL. Potom je provedeno centrifugiranje 5 minuta na 16000 g stolnom centrifugom (5424R, Eppendorf). Nakon centrifugiranja otpipetirano je po 7,5 mL supernatanta u dvije epruvete od 15 mL. U svaku epruvetu dodajno je 4,5 mL kloroforma. Sadržaj je promiješan na mješaču Vortex dva puta po 10 sekundi, a nakon toga je slijedilo centrifugiranje 10 minuta na 3500 g (centrifuga Jouan, Thermo Scientific). U donjem plavkastom sloju kloroforma otopljen je piocijanin (Slika 8).



Slika 8. Centrifugirane epruvete PAO1 kulture s odijeljenim slojevima (donji plavkasti sloj prikazuje sloj kloroforma u kojem je otopljen piocijanin).

Pomoću pipete uzet je 1 mL plavkastog sloja u novu Eppendorf epruvetu od 1,5 mL I dodano je 0,5 mL 0,2 M HCl. Sadržaj je promiješan na mješaču Vortex dva puta po 10 sekundi te su epruvetecentrifugirane 5 minuta na 16000 g u stolnoj centrifugi (5424R, Eppendorf). Nakon centrifugiranja odvojen je gornji vodeni sloj svijetlo ružičaste boje u Eppendorf epruvete od 1,5 mL (Slika 9).



Slika 9. Centrifugirane Eppendorf epruvete s odijeljenim gornjim vodenim slojem u kojem je otopljen piocijanin.

Na mikrotitarsku pločicu preneseno je 350 μ L otopine i izmjerena apsorbancija pri 520 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer). Kao slijepa proba koristi se 350 μ L 0,2 M HCl.

3.2.5. Statistička analiza

Vrijednosti optičke gustoće (OD_{600}) za svaku kulturu dobivene su u tri neovisna pokusa od kojih je svaki proveden u duplikatu. Konačne vrijednosti odnose se na aritmetičku sredinu vrijednosti \pm standardna devijacija (SD). Za prikaz utjecaja na rast planktonskih stanica bakterije potrebno je staviti u odnos vrijednosti optičke gustoće (OD_{600}) tretirane kulture s netretiranom PAO1 kulturom. Rezultat je postotni udio optičke gustoće tretiranih u odnosu na netretiranu kulturu.

$$\frac{OD_{600}(PAO1 + CAL/PUL/TOB)}{OD_{600}(PAO1)} \times 100$$

Za prikaz utjecaja na proizvodnju piocijanina apsorbancije ekstrahiranog piocijanina potrebno je staviti u odnos vrijednosti apsorbancije pri 520 nm tretiranih kultura s netreteiranom PAO1 kulturom.

$$\frac{A_{520}(PAO1 + CAL/PUL/TOB)}{A_{520}(PAO1)} \times 100$$

Kako bi se koncentracija piocijanina normalizirala prema broju planktonskih bakterijskih stanica u kulturi potrebno je staviti u omjer apsorbanciju izmjerenu na 520 nm s vrijednostima optičke gustoće na 600 nm. Kako bi se prikazao utjecaj eteričnog ulja kalaminte, pulegona i tobramicina na proizvodnju piocijanina rezultati tretiranih bakterijskih kultura iskazuju se u odnosu na normaliziranu vrijednost čiste bakterijske kulture PAO1.

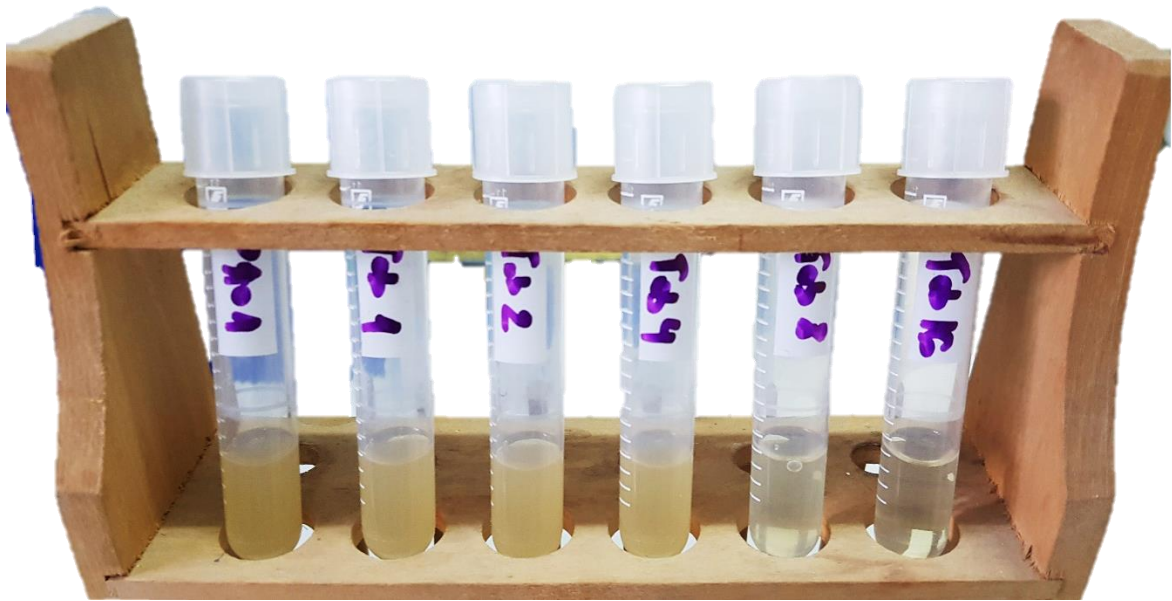
$$\frac{A_{520}/OD_{600}(PAO1 + CAL/PUL/TOB)}{A_{520}/OD_{600}(PAO1)} \times 100$$

Krajnji rezultati prikazani su kao stupčasti grafovi aritmetičke sredine vrijednosti dobivene iz tri neovisna pokusa \pm standardna devijacija.

4. REZULTATI

4.1. Minimalna inhibitorna koncentracija tobramicina

Za mjerenje minimalne inhibitorne koncentracije tobramicina potrebne za inhibiciju rasta bakterije *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 korišteno je pet koncentracija u rasponu od 1 mg/L do 16 mg/L (1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L i 16 mg/L).

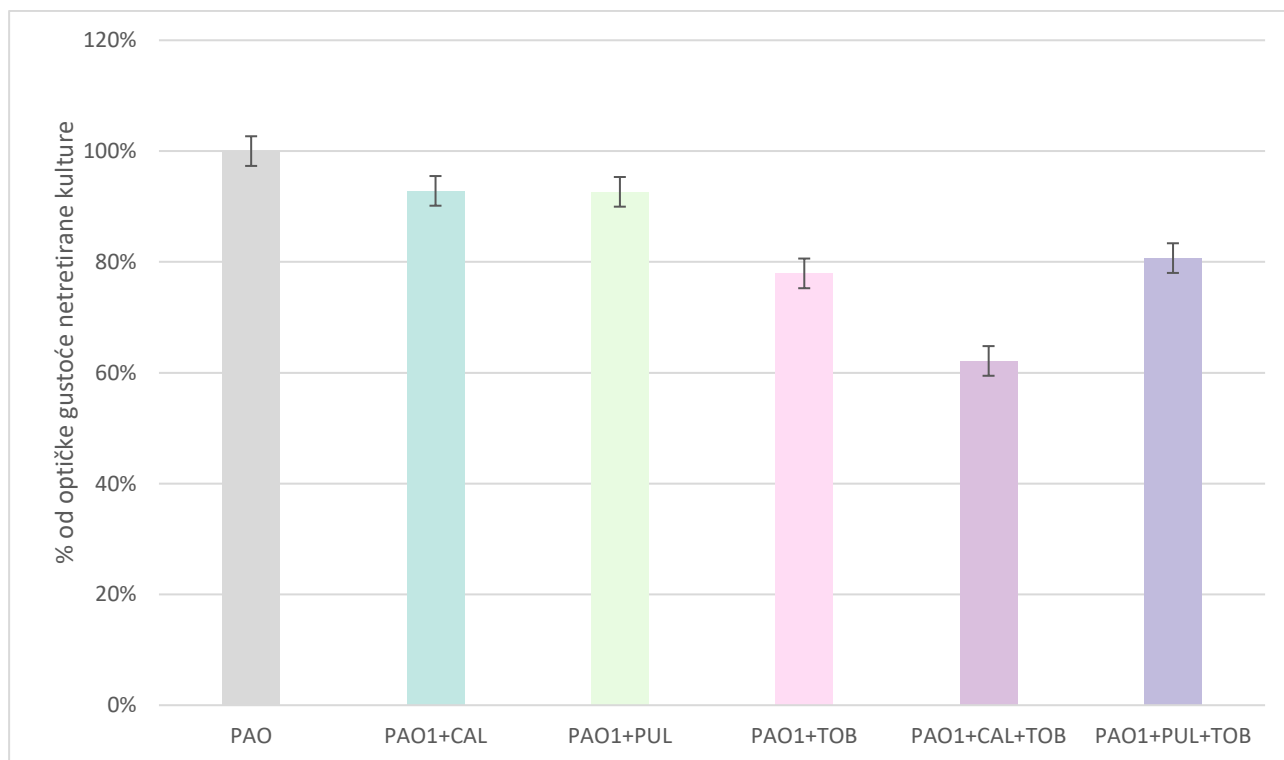


Slika 10. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije tobramicina metodom serijske mikrodilucije praćenjem zamućenja otopina različitih koncentracija tobramicina (s lijeva na desno 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L i 16 mg/L) u odnosu na netretiranu kulturu PAO1 (prva epruveta).

Metodom serijske dilucije praćenjem zamućenja utvrđeno je da minimalna inhibitorna koncentracija između 8 mg/L i 16 mg/L (Slika 10). Za daljnji rad odabrana je subinhibitorna koncentracija od 0,5 mg/L za koju je u prethodnim istraživanjima u laboratoriju pokazano da smanjuje proizvodnju proteaza i pokretljivost, koji su pod izravnom kontrolom QS-a (Kerner, 2021).

4.2. Učinak eteričnog ulja kalaminte i pulegona zasebno i u kombinaciji s tobramicinom na rast bakterija *P. aeruginosa*

Na Slici 11 prikazan je utjecaj eteričnog ulja *Calaminthe officinalis*, pulegona i tobramicina zasebno i u kombinacijama na rast planktonskih stanica bakterije u obliku odnosa OD₆₀₀ vrijednosti tretirane kulture i netretirane kulture *P. aeruginosa* PAO1.



Slika 11. Učinak eteričnog ulja kalaminte (CAL), pulegona (PUL), tobramicina (TOB) i kombinacija na rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* PAO1. Rezultati su prikazani kao vrijednosti OD₆₀₀ u odnosu na netretiranu kulturu (PAO1) kao aritmetička sredina vrijednosti optičke gustoće iz tri neovisna pokusa \pm SD.

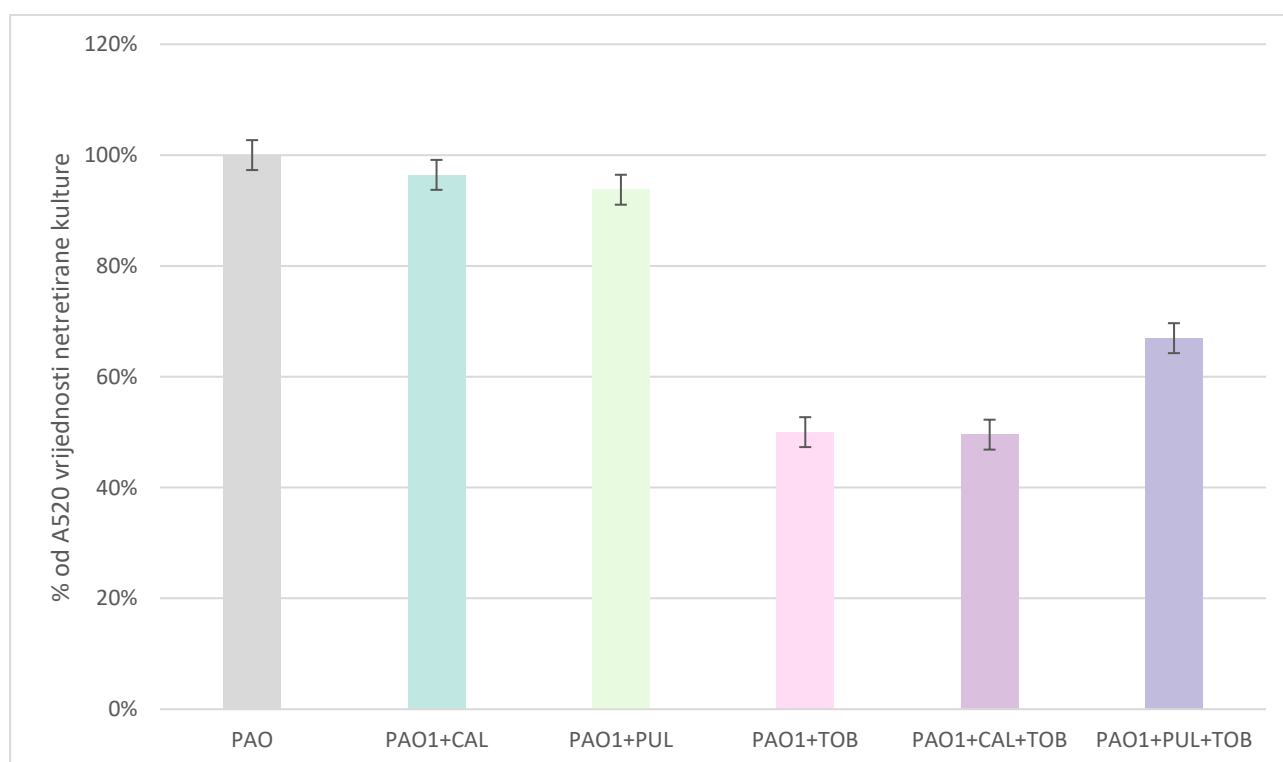
Prema podacima iz tri neovisna pokusa mjerenja OD₆₀₀ pokazan je inhibitorni učinak eteričnog ulja *Calaminthe officinalis* u koncentraciji 0,5 mg/mL na rast planktonskih stanica *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Dobiveno je smanjenje rasta bakterija za 9,1% \pm 1,56%. Vrijednosti optičke gustoće za kulturu tretiranu pulegonom u koncentraciji od 0,5 mg/mL također ukazuju na smanjenje rasta planktonskih bakterijskih stanica. Smanjenje iznosi 7,3%

$\pm 3,85\%$ u odnosu na netretiranu kulturu. Tobramicin u koncentraciji od 0,5 mg/L dovodi do smanjenje optičke gustoće za $22\% \pm 4,61\%$ u odnosu na netretiranu kulturu.

Vrijednosti optičke gustoće za kulturu tretiranu kombinacijom eteričnog ulja *Calaminthe officinalis* u koncentraciji 0,5 mg/mL i tobramicina u koncentraciji 0,5 mg/L ukazuju na smanjenje rasta planktonskih stanica za $37\% \pm 3,45\%$ u odnosu na netretiranu kulturu. Kombinacija pulegona u koncentraciji od 0,5 mg/mL s tobramicinom u koncentraciji 0,5 mg/L dovodi do smanjenja rasta planktonskih stanica za $19,2\% \pm 6,53\%$.

4.3. Učinak eteričnog ulja kalaminte i pulegona zasebno i u kombinaciji s tobramicinom na proizvodnju piocijanina

Slika 12 prikazuje utjecaj eteričnog ulja *Calaminthe officinalis*, pulegona i tobramicina zasebno i u kombinacijama na proizvodnju piocijanina u obliku odnosa vrijednosti apsorbancije piocijanina na 520nm (A_{520}) tretirane kulture i netretirane kulture *P. aeruginosa* PAO1.



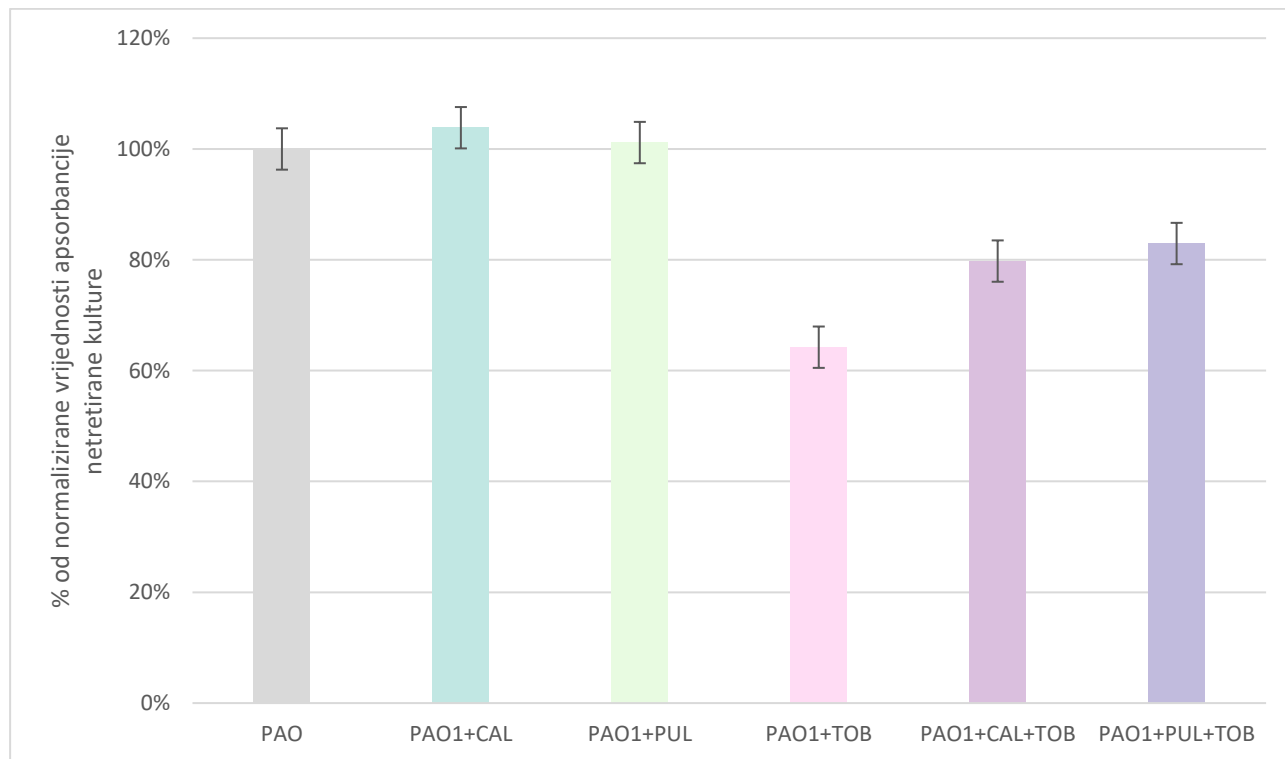
Slika 12. Učinak eteričnog ulja kalaminte (CAL), pulegona (PUL), tobramicina (TOB) i kombinacija na proizvodnju piocijanina bakterije *P. aeruginosa* PAO1. Prikazane su vrijednosti A_{520} u odnosu na netretiranu kulturu (PAO1) kao aritmetička sredina vrijednosti apsorbancije iz tri neovisna pokusa \pm SD.

Rezultati pokazuju da smanjenje apsorbancije kulture tretirane eteričnim uljem kalaminte u koncentraciji od 0,5 mg/mL u odnosu na netretiranu kulturu iznosi $3,57\% \pm 2,70\%$, dok za kulturu tretiranu pulegomom u koncentraciji 0,5 mg/mL smanjenje iznosi $6,25\% \pm 3,85\%$.

Značajnu razliku proizvodnji piocijanina uzrokuje tobramicin zasebno i u kombinacijama s eteričnim uljem i pulegomom. Sam tobramicin u koncentraciji 0,5 mg/L uzrokuje smanjenje apsorbancije za $50\% \pm 4,61\%$ u odnosu na netretiranu PAO1 kulturu.

Kombinacija tobramicina s eteričnim uljem kalaminte djeluje slično kao i sami tobramicin uzrokujući smanjenje od $50,45\% \pm 3,45\%$. Kod kombinacije tobramicina s pulegomom učinak na inhibiciju proizvodnje piocijanina je manji od učinka samog tobramicina. Smanjenje apsorbancije u odnosu na netretiranu kulturu iznosi $33,04\% \pm 6,53\%$.

Slika 13 prikazuje odnos vrijednosti apsorbancije piocijanina normaliziranih na broj planktonskih stanica netretirane kulture i kultura tretiranih eteričnim uljem *Calaminthe officinalis*, pulegomom i tobramicinom zasebno te u kombinacijama.



Slika 13. Učinak eteričnog ulja kalaminte (CAL), pulegona (PUL), tobramicina (TOB) i kombinacija na proizvodnju piocijanina bakterije *P. aeruginosa* PAO1. Prikazane su

normalizirane vrijednosti apsorbancije u odnosu na netretiranu kulturu (PAO1) kao aritmetička sredina normaliziranih vrijednosti apsorbancije iz tri neovisna pokusa \pm SD.

Za korištenu koncentraciju eteričnog ulja *Calaminthe officinalis* od 0,5 mg/mL količina piocijanina povećana je za $4\% \pm 2,23\%$. Za navedenu koncentraciju eteričnog ulja nije pokazan inhibitorni učinak na proizvodnju piocijanina. Kod kulture tretirane pulegomom u koncentraciji od 0,5 mg/mL rezultati ne pokazuju statistički značajnu razliku proizvodnje piocijanina u odnosu na netretiranu kulturu. Tobramicin pokazuje značajno smanjenje apsorbancije piocijanina od $36\% \pm 2,95\%$ u odnosu na netretiranu kulturu. Proizvodnja piocijanina za kulturu tretiranu kombinacijom eteričnog ulja *Calaminthe officinalis* u koncentraciji 0,5 mg/mL i tobramicina u koncentraciji 0,5 mg/L smanjena je za $20\% \pm 4,77\%$ u odnosu na netretiranu PAO1 kulturu, dok smanjenje za kombinaciju pulegona u koncentraciji 0,5 mg/mL i tobramicina u koncentraciji 0,5 mg/L iznosi $17\% \pm 11,89\%$.

5. RASPRAVA

Pseudomonas aeruginosa jedan je od najčešćih bolničkih patogena koji uzrokuje brojne infekcije povezane s visokom stopom mortaliteta kod imunokompromitiranih osoba. Ne izaziva teže infekcije kod imunokompetentnih pacijenata, ali može izazvati vrlo invazivne i smrtonosne infekcije kod pacijenata s neutropenijom. Može se prilagođavati različitim vanjskim okolišnim uvjetima i kolektivno koordinirati ponašanje unutar populacije. Posebno je opasna bakterija iz razloga što posjeduje širok spektar faktora virulencije koji joj omogućuju preživljavanje u domaćinu i izbjegavanje imunskog odgovora (Laborda et al., 2021).

Jedan od tih faktora je i pigment piocijanin koji ima važnu ulogu u propagiranju infekcije. Kao mala zwitterionska molekula piocijanin može učinkovito prelaziti biološke membrane te sudjelovati u redoks reakcijama unutar stanice. Osim što može posredovati u stvaranju reaktivnih kisikovih radikala štetnih za stanicu, piocijanin je također važan u populaciji bakterija pri uvjetima niske koncentracije kisika. Važan je u poticanju stvaranja i održavanju biofilma i zbog svojih antimikrobnih svojstava u kompeticiji s drugim bakterijskim vrstama (Nawas, 2018). Sve to čini ga iznimno važnim faktorom virulencije bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i potencijalnom terapijskom metom.

Poznato je da eterična ulja mnogih mediteranskih biljaka iz porodice Lamiaceae posjeduju antimikrobna svojstva i da nisu primijećeni znakovi razvijanja rezistencije kod dužeg izlaganja eteričnim uljima. Iz tog razloga eterična ulja i njihove sastavnice se istražuju kao potencijalne terapijske opcije u borbi protiv bakterija i gljivica. Mehanizmi antimikrobnog djelovanja eteričnih ulja nisu u potpunosti razjašnjeni, ali primarno mogu uzrokovati poremećaje integriteta stanične membrane i povećanu permeabilnost što dovodi do gubitka iona i staničnog sadržaja te smrti bakterijskih stanica. Sastavnice eteričnog ulja kalaminte najzaslužnije za antibakterijski i antimikotički učinak su terpeniski spojevi koji čine najveći udio u sastavu eteričnih ulja. Ipak, moguće je da eterična ulja kao cjeline djeluju potentnije od samih antimikrobnih sastavnica zbog sinergijskog učinka s ostalim sastojcima eteričnih ulja (El-Hosseiny L i sur., 2014; Swamy i sur., 2016).

Eterično ulje korišteno u ovom radu je eterično ulje biljke *Calamintha officinalis* Moench iz porodice Lamiaceae. Unutar roda *Calamintha* postoje različite vrste koje proizvode eterična ulja različitih sastava, ali kod svih su glavne sastavnice monoterpeniski spojevi. Kod biljke *Calamintha officinalis* najzastupljeniji monoterpen u eteričnom ulju je pulegon. Pulegon je monoterpeniski keton koji dokazano ima antimikrobna i antimikotička svojstva. U

istraživanjima je dokazana inhibicija rasta i Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija uključujući bakteriju *Pseudomonas aeruginosa* eteričnim uljem biljke *Calamintha nepeta* (L.) Savi čija je glavna sastavnica upravo pulegon (Božović i Ragno, 2017). Utjecaj eteričnih ulja i njihovih sastavnica na sintezu pigmenta piocijanina nije često istraživano pa ovaj rad detaljnije ispituje učinak tih tvari u odabranim koncentracijama na rast planktonskih stanica bakterije, ali i na samu proizvodnju piocijanina.

U prvom dijelu eksperimenta ispitivan je utjecaj eteričnog ulja kalaminte i pulegona u koncentracijama od 0,5 mg/mL na rast planktonskih stanica bakterijske kulture *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Koncentracija od 0,5 mg/mL odabrana je jer se u istraživanjima pokazala učinkovitom u inhibiciji pokretljivosti, proizvodnje proteaza (Kerner, 2021) i proizvodnje biofilma bakterije *P. aeruginosa* (Koprivčić, 2020). Učinak na rast planktonskih stanica određen je mjerenjem optičke gustoće bakterijske kulture pri 600 nm (OD_{600}) nakon 24-satne inkubacije s otopinama eteričnog ulja kalaminte i pulegona pri uvjetima opisanim u Metodama (3.2.3.). Pokazano je da u usporedbi s netretiranom kontrolnom kulturom eterično ulje *Calaminthe officinalis* u koncentraciji 0,5 mg/mL pokazuje inhibitorni učinak na rast bakterija u sva tri provedena neovisna pokusa. Slični rezultati pokazani su i za čisti pulegon. Naime, pulegon u koncentraciji 0,5 mg/mL također pokazuje smanjenje optičke gustoće bakterija, ali u nešto manjoj mjeri od eteričnog ulja. To ukazuje na antimikrobno djelovanje pulegona koje je već dokazano, ali također potvrđuje pretpostavku da eterično ulje vjerojatno ima višu učinkovitost zbog sinergističkog djelovanja više sastavnica koje sadrži (El-Hosseiny L i sur., 2014).

Također je ispitan učinak koji eterično ulje kalaminte i pulegon imaju na rast bakterija *Pseudomonas aeruginosa* u kombinaciji s antibiotikom tobramicinom. Kombinacija eteričnog ulja kalaminte u koncentraciji od 0,5 mg/mL i tobramicina u koncentraciji od 0,5 mg/L pokazala je značajno inhibitorno djelovanje na rast bakterijske kulture. Također je napravljen kontrolni pokus s čistim tobramicinom u istoj koncentraciji. Smanjenje rasta i optičke gustoće značajno je povećano u kombinaciji s eteričnim uljem kalaminte u odnosu na čisti tobramicin što ukazuje na mogući sinergizam djelovanja antibiotika i eteričnog ulja kalaminte na inhibiciju rasta bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Kombinacija pulegona u koncentraciji od 0,5 mg/mL i tobramicina u koncentraciji od 0,5 mg/L također pokazuje smanjenje optičke gustoće, ali to smanjenje je nešto manje od smanjenja koje uzrokuje sam tobramicin.

U drugom dijelu istraživanja ispitan je učinak eteričnog ulja biljke *Calamintha officinalis* Moench i pulegona u koncentraciji od 0,5 mg/mL na proizvodnju pigmenta piocijanina kod *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Učinak na proizvodnju piocijanina određen je mjerenjem apsorbancije ekstrahiranog piocijanina te normaliziranjem tih vrijednosti na broj stanica. Za eterično ulje kalaminte u koncentraciji od 0,5 mg/mL nije pokazana inhibicija proizvodnje piocijanina već su vrijednosti neznatno povećane. Za pulegon u koncentraciji od 0,5 mg/mL nije bilo statistički značajne razlike u proizvodnji piocijanina u odnosu na netretiranu kontrolnu kulturu. S obzirom da je proizvodnja piocijanina pod izravnom kontrolom QS-a ovim eksperimentom nije dokazano djelovanje odabranih koncentracija eteričnog ulja kalaminte i pulegona na QS. Za detaljnije podatke vezane za utjecaj eteričnog ulja i pulegona na proizvodnju pigmenta piocijanina potrebno je provesti daljnja istraživanja s različitim koncentracijama eteričnog ulja kalaminte i pulegona.

Ispitan je i utjecaj eteričnog ulja biljke *Calamintha officinalis* Moench i pulegona na proizvodnju pigmenta piocijanina u kombinaciji s antibiotikom tobramicinom. Proizvodnja piocijanina kod kulture tretirane eteričnim uljem kalaminte u koncentraciji 0,5 mg/mL i tobramicinom u koncentraciji 0,5 mg/L značajno je smanjena. Ipak, kod kombinacije eteričnog ulja kalaminte i tobramicina zapaženo je antagonističko djelovanje s obzirom da sam tobramicin ima jače inhibitorno djelovanje na proizvodnju piocijanina od kombinacije s eteričnim uljem kalaminte. Proizvodnja piocijanina kod kulture tretirane pulegomom u koncentraciji 0,5 mg/mL i tobramicinom u koncentraciji 0,5 mg/L također pokazuje inhibiciju koja je manja od inhibicije koju uzrokuje sam tobramicin što također ukazuje na antagonističko djelovanje pulegona i tobramicina na proizvodnju piocijanina. U pokusima prethodno napravljenim u laboratoriju (Kerner, 2021) može se uočiti antagonističko djelovanje tobramicina u koncentraciji od 0,5 mg/L s eteričnim uljem kalaminte u koncentraciji 0,5 mg/mL na pokretljivost *P. aeruginosa* koja je također pod kontrolom QS-a. Također u određenim pokusima (Koprivčić, 2020) pokazano je da eterično ulje kalaminte i čisti pulegon djeluju antagonistički na tobramicin kad se promatra njegovo djelovanje na inhibiciju tvorbe biofilma.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da su eterično ulje biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench i pulegon u odabranim koncentracijama učinkoviti u inhibiciji rasta planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa*, samostalno, ali i u kombinaciji s antibiotikom tobramicinom. To ukazuje na potencijal koji eterična ulja imaju kao antimikrobne djelatne tvari i na sinergizam koji mogu postizati u kombinaciji s antibioticima. Zato je važno daljnje

istraživanje njihovih terapijskih mogućnosti. Eterično ulje i pulegon pokazali su slično djelovanje što je očekivano s obzirom da je pulegon najzastupljenija sastavnica ovog eteričnog ulja. Ipak, s obzirom na više vrijednosti inhibicije rasta bakterija koje pokazuje eterično ulje može se zaključiti da je matriks eteričnog ulja u kojem se pulegon nalazi također važan za sinergističko antimikrobno djelovanje. Učinkovitost u inhibiciji proizvodnje pigmenta piocijanina za eterično ulje i pulegon nije dokazana u ovom istraživanju.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- Eterično ulje biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench djeluje inhibitorno na rast planktonskih stanica bakterijske kulture *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pri koncentraciji od 0,5 mg/mL;
- Pulegon djeluje inhibitorno na rast planktonskih stanica bakterijske kulture *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pri koncentraciji od 0,5 mg/mL;
- Jači inhibicijski učinak na rast planktonskih bakterijskih stanica eteričnog ulja kalaminte u odnosu na pulegon upućuje na sinergijsko djelovanje sastojaka eteričnog ulja;
- U kombinaciji s tobramicinom u koncentraciji od 0,5 mg/L eterično ulje biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench i pulegon djeluju sinergistički s antibiotikom u inhibiciji rasta planktonskih stanica bakterijske kulture *Pseudomonas aeruginosa* PAO1;
- Eterično ulje *Calaminthe officinalis* Moench i pulegon ne pokazuju svojstva inhibicije proizvodnje piocijanina u koncentraciji od 0,5 mg/mL;
- Eterično ulje *Calaminthe officinalis* Moench i pulegon u koncentraciji 0,5 mg/mL imaju antagonističko djelovanje u kombinaciji s tobramicinom u koncentraciji od 0,5 mg/L na proizvodnju piocijanina kod *P. aeruginosa* PAO1;
- Rezultati ovoga istraživanja mogu poslužiti u daljnjim istraživanjima u području terapije infekcija izazvanih bakterijom *Pseudomonas aeruginosa* i očuvanju već postojećih pristupa kojima prijeti razvijanje multirezistentnih sojeva bakterija.

7. LITERATURA

- Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48, 5–16.
- Arantes SM, Piçarra A, Guerreiro M, Salvador C, Candeias F, Caldeira AT, Martins MR. Toxicological and pharmacological properties of essential oils of *Calamintha nepeta*, *Origanum virens* and *Thymus mastichina* of Alentejo (Portugal). *Food Chem. Toxicol.*, 2019, 133, 110747.
- Božović M, Ragno R. *Calamintha nepeta* (L.) Savi and its Main Essential Oil Constituent Pulegone: Biological Activities and Chemistry. *Molecules*, 2017, 22, 290.
- Britigan BE, Roeder TL, Rasmussen GT, Shasby DM, McCormick ML, Cox CD. Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells: Implications for pseudomonas-associated tissue injury. *J. Clin. Invest.*, 1992, 90(6).
- Bulitta JB, Ly NS, Landersdorfer CB, Wanigaratne NA, Velkov T, Yadav R, Oliver A, Martin L, Shin BS, Forrest A, Tsuji BT. Two mechanisms of killing of *Pseudomonas aeruginosa* by tobramycin assessed at multiple inocula via mechanism-based modeling. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, 59(4), 2315–2327.
- Das T, Ibugo AI, Klare W, Manefield M. Role of Pyocyanin and Extracellular DNA in Facilitating *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *Microb. Biofilms: Importance Appl.*, 2016, 8(3), e58299.
- Davis BD. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol. Rev.*, 1987, 51(3), 341.
- 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

- Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford IP. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol*, 1990, 172, 884–900
- Gordon WP, Huitric AC, Seth CL, McClanahan RH, Nelson SD. The metabolism of the abortifacient terpene, (R)-(+)-pulegone, to a proximate toxin, menthofuran. *Drug Metab. Dispos.*, 1987, 15(5), 589-94.
- 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.
- Koprivčić D. Učinak eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis* Moench i pulegona na rast i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa*. *Diplomski rad*, 2020, Sveučilište u Zagrebu.
- Laborda P, Sanz-García F, Hernando-Amado S, Martínez JL. *Pseudomonas aeruginosa*: an antibiotic resilient pathogen with environmental origin, U: *Curr. Opin. Microbiol.*, 2021, 64, str. 125–132.
- Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection, U: *Trends Mol. Med.*, 2004, 10(12), 599-606.
- Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 2017, 7, 39.
- Nawas T. Extraction and purification of pyocyanin: a simpler and more reliable method. *MOJ Toxicology*, 2018, 4(6), 417–422.
- Nelson LK, D'Amours GH, Sproule-Willoughby KM, Morck DW, Ceri H. *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems are important for infection and inflammation in a rat prostatitis model, U: *Microbiology*, 2009, 155(8), str. 2612–2619.
- Panizzi L, Flamini G, Cioni PL, Morelli I. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *J. Ethnopharmacol.*, 1993, 39(3), 167–170.

Singh PP, Jha S, Irchhaiya R, Fatima A. Agarwal P. A review on phytochemical and pharmacological potential of *Calamintha officinalis* Moench. *IJPSR*, 2012, 3, 1001 - 1004.

Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evid. Base. Compl. Alternative Med.*, 2016, 2016.

Williams P, Cámara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2009, str. 182–191.

Wu M, Li X. *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol. Med. Microbiol. (2nd Ed.)*, 2015, 3, str. 1547–1564.

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

8. SAŽETAK/SUMMARY

Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* je široko rasprostranjen oportunistički patogen koji uzrokuje smrtonosne infekcije kod imunokompromitiranih pacijenata. Infekcije ovom bakterijom predstavljaju značajan izazov za modernu medicinu zbog sve veće učestalosti multirezistentnih sojeva koji ne reagiraju na postojeće antibiotske terapije. Djelovanje na nove faktore virulencije i bakterijsku međustaničnu komunikaciju kao terapijske mete ključno je za unaprjeđenje terapije. Eterična ulja i njihovi aktivni sastojci dokazano imaju antimikrobna djelovanja na koja nije zabilježena rezistencija, ali nisu dovoljno istražena. U ovom radu ispitan je učinak eteričnog ulja biljke *Calamintha officinalis* Moench i pulegona u odabranim koncentracijama zasebno i u kombinaciji s tobramicinom na rast planktonskih stanica bakterijske kulture *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 i proizvodnju pigmenta piocijanina kao važnog faktora virulencije.

Djelovanje na rast planktonskih bakterijskih stanica određeno je mjerenjem optičke gustoće kulture pri 600 nm. Učinak na proizvodnju piocijanina određen je mjerenjem apsorbancije ekstrahiranog piocijanina i normaliziranjem vrijednosti prema broju bakterijskih stanica. Rezultati pokazuju da eterično ulje biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench i pulegon u koncentraciji od 0,5 mg/mL učinkovito inhibiraju rast stanica bakterije *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, samostalno, ali i u kombinaciji s tobramicinom u koncentraciji 0,5 mg/L s kojim djeluju sinergistički. Također je pokazano da pri korištenim koncentracijama ni eterično ulje biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench ni pulegon ne djeluju inhibitorno na proizvodnju piocijanina. U kombinaciji s tobramicinom djeluju antagonistički na proizvodnju piocijanina. Ovaj rad pridonosi sveobuhvatnijem razumijevanju djelovanja eteričnih ulja i njihovih sastavnica na bakteriju *Pseudomonas aeruginosa* s ciljem unaprjeđenja terapijskih mogućnosti liječenja infekcija ovom bakterijom.

Pseudomonas aeruginosa is a widespread opportunistic pathogen that causes fatal infections in immunocompromised patients. Infections with these bacteria represent a significant challenge for modern medicine due to the increasing frequency of multidrug-resistant strains that do not respond to existing antibiotic therapies. Targeting new virulence factors and bacterial intercellular communication as therapeutic targets is a key to improving treatment. Essential oils and their active ingredients have been shown to have antimicrobial effects with no resistance reported, but they have not been sufficiently studied. In this work, the

effect of *Calamintha officinalis* Moench essential oil and pulegon separately, and in combination with tobramycin, on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 planktonic bacterial cells and the synthesis of pyocyanin pigment as an important virulence factor was investigated.

The effect on planktonic growth was determined by measuring the optical density of the culture at 600 nm. The effect on pyocyanin synthesis was determined by measuring pyocyanin absorption and normalizing the value according to the number of bacterial cells. The results showed that the *Calamintha officinalis* Moench essential oil and pulegon at a concentration of 0,5 mg/mL effectively inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 separately, but also synergistically in combination with 0,5 mg/L tobramycin in. It has also been shown that, at the concentrations used, neither the *Calamintha officinalis* Moench essential oil nor pulegon have an inhibitory effect on pyocyanin synthesis. In combination with tobramycin both have an antagonistic effect on piocyanin production. This work contributes to a more comprehensive understanding of antimicrobial and anti QS effects of the essential oils and their constituents on *Pseudomonas aeruginosa*, with the aim of improving the therapeutic possibilities for treating these bacterial infections.

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 biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench i pulegona na proizvodnju piocijanina bakterije *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Fani Španić

SAŽETAK

Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* je široko rasprostranjen oportunistički patogen koji uzrokuje smrtonosne infekcije kod imunokompromitiranih pacijenata. Infekcije ovom bakterijom predstavljaju značajan izazov za modernu medicinu zbog sve veće učestalosti multirezistentnih sojeva koji ne reagiraju na postojeće antibiotske terapije. Djelovanje na nove faktore virulencije i bakterijsku međustaničnu komunikaciju kao terapijske mete ključno je za unaprjeđenje terapije. Eterična ulja i njihovi aktivni sastojci dokazano imaju antimikrobna djelovanja na koja nije zabilježena rezistencija, ali nisu dovoljno istražena. U ovom radu ispitan je učinak eteričnog ulja biljke *Calamintha officinalis* Moench i pulegona u odabranim koncentracijama zasebno i u kombinaciji s tobramicinom na rast planktonskih stanica bakterijske kulture *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 i proizvodnju pigmenta piocijanina kao važnog faktora virulencije.

Djelovanje na rast planktonskih bakterijskih stanica određeno je mjerenjem optičke gustoće kulture pri 600 nm. Učinak na proizvodnju piocijanina određen je mjerenjem apsorbancije ekstrahiranog piocijanina i normaliziranjem vrijednosti prema broju bakterijskih stanica. Rezultati pokazuju da eterično ulje biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench i pulegon u koncentraciji od 0,5 mg/mL učinkovito inhibiraju rast stanica bakterije *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, samostalno, ali i u kombinaciji s tobramicinom u koncentraciji 0,5 mg/L s kojim djeluju sinergistički. Također je pokazano da pri korištenim koncentracijama ni eterično ulje biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench ni pulegon ne djeluju inhibitorno na proizvodnju piocijanina. U kombinaciji s tobramicinom djeluju antagonistički na proizvodnju piocijanina. Ovaj rad pridonosi sveobuhvatnijem razumijevanju djelovanja eteričnih ulja i njihovih sastavnica na bakteriju *Pseudomonas aeruginosa* s ciljem unaprjeđenja terapijskih mogućnosti liječenja infekcija ovom bakterijom.

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

Rad sadrži: 35 stranica, 13 grafičkih prikaza, 1 tablica i 23 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Pseudomonas aeruginosa*, piocijanin, *Calamintha officinalis*, eterično ulje, pulegon, tobramicin

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 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

Effect of *Calamintha officinalis* Moench essential oil and pulegone on pyocyanin synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Fani Španić

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is a widespread opportunistic pathogen that causes fatal infections in immunocompromised patients. Infections with these bacteria represent a significant challenge for modern medicine due to the increasing frequency of multidrug-resistant strains that do not respond to existing antibiotic therapies. Targeting new virulence factors and bacterial intercellular communication as therapeutic targets is a key to improving treatment. Essential oils and their active ingredients have been shown to have antimicrobial effects with no resistance reported, but they have not been sufficiently studied. In this work, the effect of *Calamintha officinalis* Moench essential oil and pulegon separately, and in combination with tobramycin, on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 planktonic bacterial cells and the synthesis of pyocyanin pigment as an important virulence factor was investigated.

The effect on planktonic growth was determined by measuring the optical density of the culture at 600 nm. The effect on pyocyanin synthesis was determined by measuring pyocyanin absorption and normalizing the value according to the number of bacterial cells. The results showed that the *Calamintha officinalis* Moench essential oil and pulegon at a concentration of 0,5 mg/mL effectively inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 separately, but also synergistically in combination with 0,5 mg/L tobramycin in. It has also been shown that, at the concentrations used, neither the *Calamintha officinalis* Moench essential oil nor pulegon have an inhibitory effect on pyocyanin synthesis. In combination with tobramycin both have an antagonistic effect on piocyanin production. This work contributes to a more comprehensive understanding of antimicrobial and anti QS effects of the essential oils and their constituents on *Pseudomonas aeruginosa*, with the aim of improving the therapeutic possibilities for treating these bacterial infections.

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

Thesis includes: 35 pages, 13 figures, 1 table and 23 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, pyocyanin, *Calamintha officinalis*, essential oil, pulegone, tobramycin

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 2022.