

# Učinak eteričnog ulja vrste *Satureja montana* L. i timola na rast i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa*

---

Andričević, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:952291>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-19**



Repository / Repozitorij:

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



**Klara Andričević**

**Učinak eteričnog ulja vrste *Satureja montana* L. i  
timola na rast i tvorbu biofilma bakterije *P.*  
*aeruginosa***

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

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 se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček na svom prenesenom znanju, uloženom trudu i utrošenom vremenu, pomoći i stručnim savjetima tijekom izrade ovog rada.*

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	1
<b>1.1.1. Bakterijska međustanična komunikacija (engl. <i>quorum sensing</i>) i biofilm</b> .....	1
<b>1.1.2. Klinički značaj</b> .....	5
<b>1.1.3. Antimikrobna rezistencija i liječenje</b> .....	5
<b>1.1.4. Mehanizmi rezistencije biofilma na antibiotike</b> .....	6
<b>1.2. Eterična ulja</b> .....	9
<b>1.2.1. Antibakterijski i antibiofilm učinak eteričnih ulja</b> .....	10
<b>1.2.2. Timol</b> .....	11
<b>1.2.3. Eterično ulje vrste <i>Satureja montana</i> L.</b> .....	12
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	13
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	14
<b>3.1. Materijali</b> .....	14
<b>3.1.1. Bakterije</b> .....	14
<b>3.1.2. Standardne kemikalije i otopine</b> .....	14
<b>3.1.3. Eterično ulje i komponente</b> .....	14
<b>3.1.4. Antibiotici</b> .....	14
<b>3.1.5. Filteri za sterilizaciju</b> .....	15
<b>3.1.6. Hranjivi mediji</b> .....	15
<b>3.2. Metode</b> .....	15
<b>3.2.1. Priprava otopina eteričnog ulja satureje i timola</b> .....	15
<b>3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije</b> .....	15
<b>3.2.3. Ispitivanje učinka eteričnog ulja satureje i timola na stvaranje biofilma</b> .....	16
<b>3.2.4. Ispitivanje učinka eteričnog ulja satureje i timola s tobramicinom na formirani biofilm</b> .....	18
<b>3.2.5. Statistička analiza</b> .....	19
<b>4. REZULTATI</b> .....	20
<b>4.1. Minimalna inhibitorna koncentracija</b> .....	20
<b>4.2. Učinak eteričnog ulja satureje na stvaranje biofilma bakterije <i>P. aeruginosa</i></b> .....	21
<b>4.3. Učinak timola na stvaranje biofilma bakterije <i>P. aeruginosa</i></b> .....	24
<b>4.4. Učinak eteričnog ulja satureje i tobramicina na formirani biofilm bakterije <i>P. aeruginosa</i></b> .....	27
<b>4.5. Učinak timola i tobramicina na formirani biofilm bakterije <i>P. aeruginosa</i></b> .....	30

<b>5. RASPRAVA</b> .....	33
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	37
<b>7. LITERATURA</b> .....	38
<b>8. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	42
<b>9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. UVOD

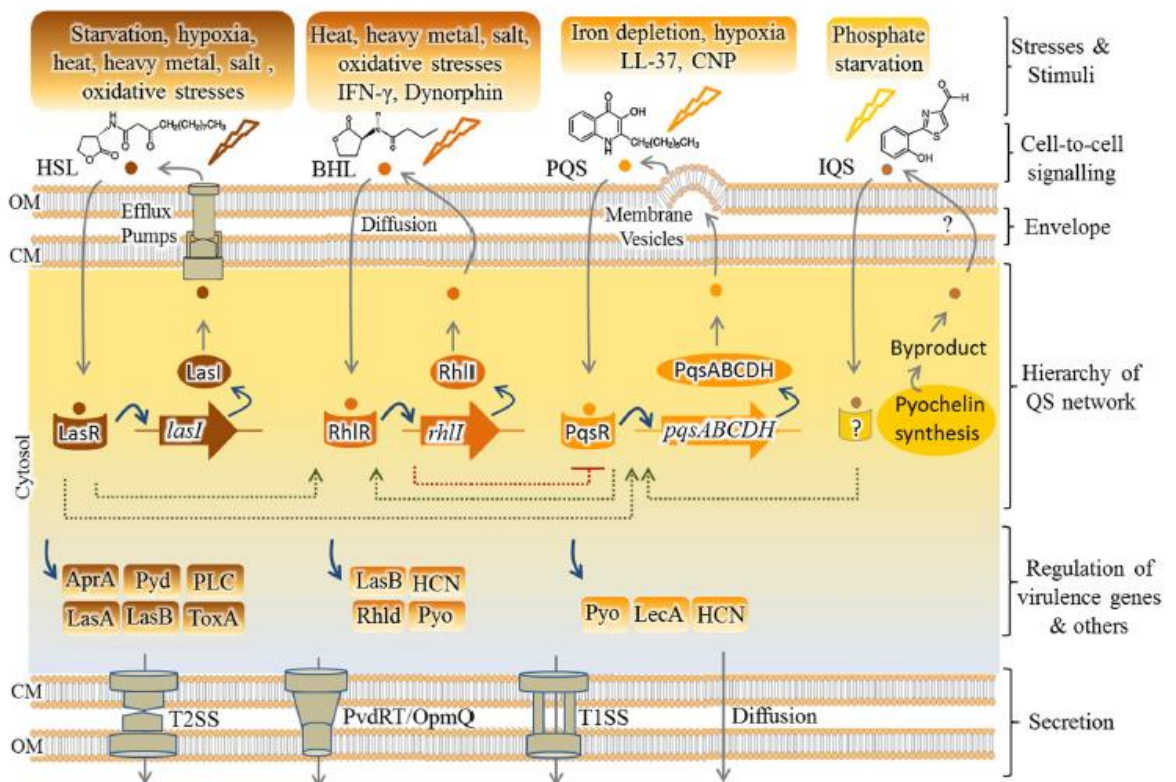
## 1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (grč. *pseudo* i *monas* – lažna jedinka, lat. *aeruginosa* – pun bakrene hrđe, zelen) bakterijska je vrsta roda *Pseudomonas*, oportunističkih patogena kod ljudi, ali i životinja i biljaka, ubikvitarno prisutnih, ponajviše u tlu, vodi i vegetaciji. Gram negativni je, asporogeni i aerobni, pokretni bacil, oksidaza i katalaza pozitivan. Preferira vlažan okoliš, no minimalni nutritivni zahtjevi i korištenje različitih metaboličkih puteva bakteriji omogućuju prilagodbu i preživljavanje u različitim okolišnim uvjetima (dezinficijensi, kreme, sapuni, kapi za oči, ovlaživači zraka, otopine za leće, javna kupališta). Može se uzgajati na različitim hranjivim podlogama, uz jednostavne zahtjeve za uzgoj, a tvori glatke, okrugle kolonije, metalnog sjaja i karakterističnog mirisa, koji podsjeća na miris lipe. Stvara vodotopljive pigmente – piocijanin (plavi), pioverdin (žuti), piorubin (crveni) i poimelanin (crni). Pri uzgoju na agaru koji ne sadrži pigment, piocijanin i pioverdin boje agar karakterističnom žutozelenom bojom. Raste dobro na temperaturi između 37°C i 42°C, a sposobnost rasta na temperaturi od 42°C omogućuje razlikovanje ove od drugih vrsta roda *Pseudomonas*. Posjeduje brojne čimbenike virulencije, koji mogu biti strukturni, odgovorni za adherenciju, i sekrecijski, odgovorni za invaziju domaćina. Strukturni čimbenici virulencije su: pili, flagele i lipopolisaharid, a sekrecijski: enzimi i hemolizini, egzotoksin A i egzotoksini sekrecijskog sustava tipa III, pigmenti piocijanin i pioverdin te signalne molekule bakterijske međustanične komunikacije i egzopolisaharid (Kalenić i sur., 2013).

### 1.1.1. Bakterijska međustanična komunikacija (engl. *quorum sensing*) i biofilm

Mikroorganizmi mogu egzistirati kao planktonske stanice - individualne slobodne stanice, ili u obliku sesilne zajednice - biofilma. Biofilm čine mikroorganizmi uklopljeni u polisaharidni matriks, koji su sami stvorili, vezani za površinu. Genetički je i okolišno različit, s brojnim prednostima u odnosu na planktonski oblik – zaštita od okolišnog stresa, značajna rezistencija na djelovanje antibiotika i molekula imunostrog sustava. Izgradnja ovakvih složenih zajednica zahtijeva koordiniranu međustaničnu interakciju; utvrđeno je da mehanizam bakterijske međustanične komunikacije, poznat kao *quorum sensing* (QS), ima važnu ulogu u stvaranju biofilma. QS sustavi reguliraju gensku ekspresiju u ovisnosti o gustoći mikroorganizama kroz proizvodnju malih difuzibilnih molekula – autoinduktora.

Više od 10% gena bakterije *P. aeruginosa* regulirani su *quorum sensing* signalnim sustavom. Ti su geni uglavnom odgovorni za proizvodnju faktora virulencije, pokretljivost, stvaranje biofilma, mehanizme rezistencije na antibiotike i prilagođavanje metaboličkih putova u odgovoru na stres. Kod bakterije *P. aeruginosa* poznata su četiri QS signalna puta – Las, Rhl, Pqs i nedavno otkriveni, ali nedovoljno istraženi IQS. Signalni sustavi su hijerarhijski, pri čemu je Las sustav na vrhu kaskade, pozitivno regulira ostale. Slika 1 prikazuje hijerarhiju QS signalnih sustava i regulaciju ekspresije faktora virulencije.

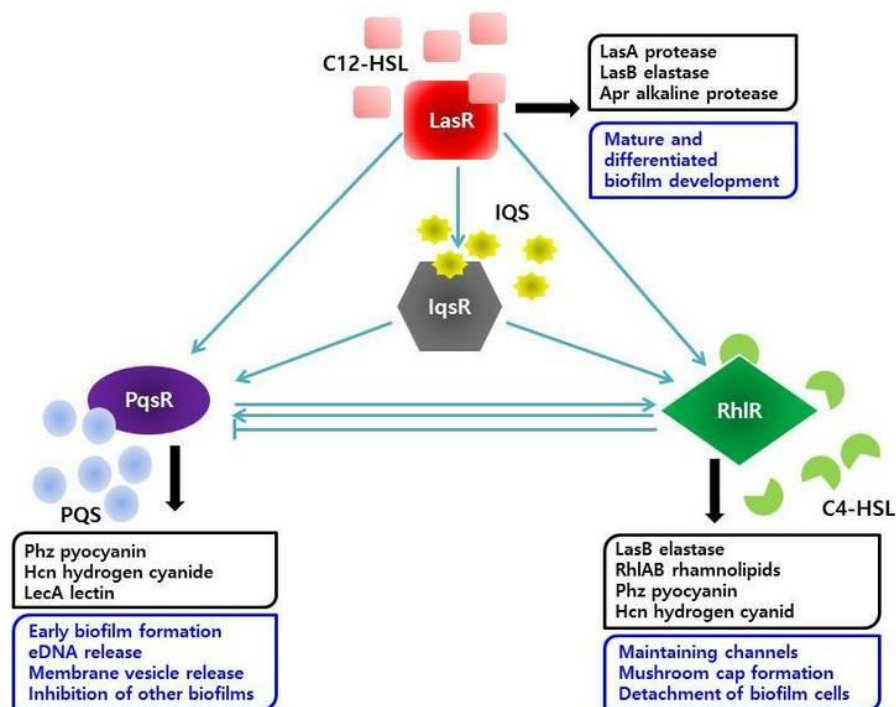


**Slika 1.** Hijerarhija QS signalnih sustava kod *P. aeruginosa* i regulacija ekspresije faktora virulencije (preuzeto iz Moradali i sur., 2017).

Autoinduktori sintaze – LasI, RhlI, PqsABCDH - u odgovoru na stres i podražaje proizvode autoinduktore - HSL (3-okso-C12-homoserin lakton), BHL (N-butirilhomoserin lakton ili C4-HSL), PQS (2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon). Kada autoinduktori dostignu određenu koncentraciju, vežu se na transkripcijske faktore – LasR, RhlR i PqsR - koji potiču ekspresiju različitih gena. Primjerice, signalnim sustavom Las aktivira se ekspresija gena koji kodiraju za elastaze LasA i LasB, egzotoksin A, fosfolipidazu c, alkalnu proteazu i pioverdin. Signalnim sustavom Rhl aktivira se ekspresija gena koji kodiraju za elastazu LasB, piocijanin

i ramnolipide. Signalnim sustavom Pqs aktivira se ekspresija gena koji kodiraju za piocijanin i lecitin A. Sva tri signalna sustava aktiviraju i ekspresiju gena za vlastite autoinduktor sintaze, povećavajući tako koncentracije autoinduktorskih molekula (Moradali i sur., 2017; Lee i Zhang, 2015; De Kievit, 2009).

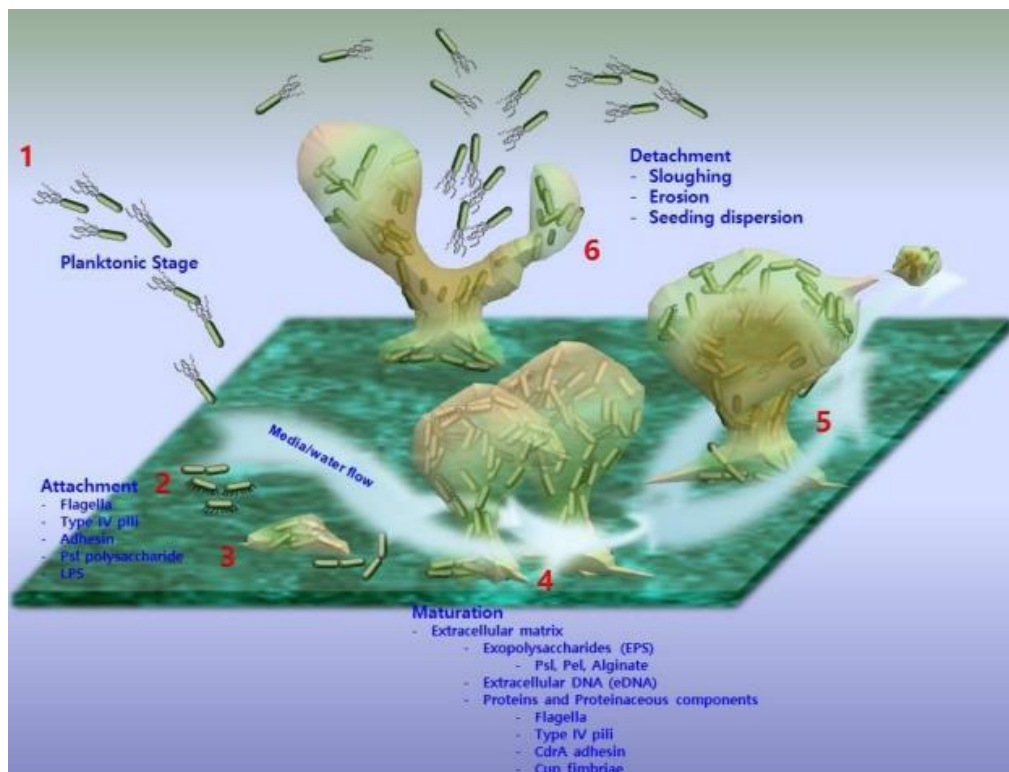
Oko 90% biofilma otpada na matriks, dok ostatak čine bakterije. Matriks je izgrađen od izvanstaničnih polimernih sastavnica, uglavnom polisaharida, proteina, izvanstanične DNA (engl. *extracellular DNA*, eDNA) i lipida. Glavne sastavnice matriksa biofilma bakterije *P. aeruginosa* su egzopolisaharidi Psl, Pel i alginat te eDNA, a ključne su u uređenju arhitekture biofilma. Proteinske sastavnice matriksa su flagele i pili tipa 4. Svaka od navedenih sastavnica ima ulogu u nastanku biofilma. Proizvodnja alginata, polisaharida Pel, ramnolipida (održavaju arhitekturu zrelog biofilma stvarajući šupljine kojima se osigurava protok vode i nutrijenata), eDNA i piocijanina (potiče otpuštanje eDNA) kontrolirana je *quorum sensing* signalnim sustavom, što objašnjava ključnu ulogu sva tri signalna sustava u stvaranju i razvoju biofilma (slika 2).



**Slika 2.** Uloga QS signalnih sustava u stvaranju i razvoju biofilma bakterije *P. aeruginosa* (preuzeto iz Lee i Yoon, 2017).



Stvaranje biofilma bakterije *P. aeruginosa* odvija se u nekoliko faza (slika 3). Prvi korak je adherencija bakterija na površinu i gubitak svojstva pokretljivosti, pri čemu pomažu adhezini, pili tipa 4 i lipopolisaharidi. Inicijalna adherencija potiče stvaranje egzopolisaharida Psl, Pel i alginata, koji bakterije međusobno povezuju, uređuju strukturu biofilma te stvaraju kanale za protok vode. Kako sazrijeva, biofilm raste, postaje višeslojan i mijenja oblik u strukturu nalik gljivi, sve to kako bi bio otporniji na okolišni stres i antibiotike. U zadnjoj fazi dolazi do disperzije planktonskih stanica iz centra u okoliš, ostavljajući tako šupljinu u matriksu. Mehanizam disperzije uključuje razgradnju egzopolisaharida i lizu određene subpopulacije bakterija, no disperzija može biti izazvana i različitim okolišnim stresovima (Lee i Yoon, 2017).



**Slika 3.** Stvaranje biofilma bakterije *P. aeruginosa*. (1) planktonski stadij, (2) adherencija na površinu, (3) proizvodnja matriksa, (4) sazrijevanje, (5) prostorna diferencijacija i (6) disperzija (preuzeto iz Lee i Yoon, 2017).

### 1.1.2. Klinički značaj

*P. aeruginosa* medicinski je najznačajnija bakterijska vrsta roda *Pseudomonas* (Kalenić i sur., 2013). Uzrokuje oportunističke infekcije kod osoba s kompromitiranim imunskim sustavom (osobe koje boluju od bolesti kao neutropenija, hipogamaglobulinemija, cistična fibroza), kao i kod onih s oštećenim fiziološkim barijerama (rane, opekline), dok osobe zdravog imunskog sustava nemaju rizik od ozbiljnijih infekcija. Može zahvatiti gotovo sve organske sustave, a najčešće uzrokuje infekcije oka (keratitis) i uha („plivačko uho“), rana i opekline, kronične infekcije dišnog sustava kod bolesnika s cističnom fibrozom i drugim kroničnim opstruktivnim bolestima, infekcije mokraćnog sustava, kože i mekih tkiva, bakterijemiju i sepsu (Carroll i sur., 2016).

Učestali je uzročnik infekcija visoke stope smrtnosti kod hospitaliziranih pacijenata, osobito onih u jedinici intenzivne skrbi, te jedan od najznačajnijih bolničkih patogena. Kontaminira tekućine za dijalizu, kapi za oči, sapune, dezinfekcijska sredstva, a zbog sposobnosti stvaranja biofilma može kolonizirati površine respiratora, katetera i drugih medicinskih instrumenata. Najčešće uzrokuje infekcije dišnog i mokraćnog sustava pacijenata s dugotrajnom kateterizacijom. Uz to, vodeći je uzročnik pneumonije povezane s mehaničkom ventilacijom (engl. *ventilator associated pneumonia*, VAP) i medicinskom njegom (engl. *healthcare-associated pneumonia*, HCAP) te bakterijemije kod pacijenata u jedinicama intenzivne skrbi (Gužvinec i sur., 2012). Biofilm se stvara kod kroničnih infekcija i upućuje na progresiju bolesti i perzistenciju. Biofilm infekcije najčešće se javljaju kod pacijenata s cističnom fibrozom i drugim kroničnim opstruktivnim plućnim bolestima te kod pacijenata s dijabetičkim kroničnim ranama (Mulcahy i sur., 2014).

### 1.1.3. Antimikrobna rezistencija i liječenje

*P. aeruginosa* posjeduje brojne urođene i stečene mehanizme rezistencije na antimikrobne lijekove – slaba propusnost stanične stijenke, efluks pumpe, promjena ciljnog mjesta djelovanja antibiotika, stvaranje enzima koji razgrađuju antibiotike ( $\beta$ -laktamaze, cefalosporinaze, aminoglikozidaze). Kombinacijom različitih mehanizama rezistencije nastaju višestruko rezistentni sojevi, otporni na barem jedan antibiotik iz tri ili više grupa. Zbog mogućnosti prilagodbe i preživljavanja u različitim uvjetima, brojnih čimbenika virulencije,

urođene i stečene antimikrobne rezistencije te pojave višestruko rezistentnih sojeva, liječenje infekcija izazvanih bakterijom *P. aeruginosa* ozbiljno je kompromitirano.

Učinkoviti lijekovi u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa* su penicilini – tikarcilin, piperacilin, karbencilin; cefalosporini – ceftazidim i cefepim; karbapanemi – imipenem, doripenem, meropenem; monobaktam – aztreonam; fluorokinoloni – ciprofloksacin, levofloksacin, norfloksacin; aminoglikozidi – amikacin, gentamicin, netilmicin, tobramicin. Zbog pojave višestruko rezistentnih sojeva u upotrebu je vraćen i kolistin, kao zadnja linija obrane (Gužvinec i sur., 2012).

Aminoglikozidni antibiotici standardna su terapija u kontroli kroničnih infekcija pluća i eradikaciji bakterije *P. aeruginosa* kod pacijenata s cističnom fibrozom. Ozbiljni problem povezan s primjenom aminoglikozida su toksične nuspojave, najčešće nefrotoksične i ototoksične, koje mogu uzrokovati kratkotrajne komplikacije ili ireverzibilna oštećenja. Zbog često agresivnog i dugotrajnog liječenja, morbiditet zbog nuspojava sve je češći (Prayle i sur., 2010).

#### **1.1.4. Mehanizmi rezistencije biofilma na antibiotike**

Poznato je da su bakterije unutar biofilma 10-1000 puta rezistentnije na djelovanje antimikrobnih lijekova, nego planktonske stanice. Tako značajna otpornost može se objasniti postojanjem nekoliko mehanizama ključnih u stvaranju rezistencije biofilma na antibiotike, koji su razlikuju od mehanizmima rezistencije planktonskih stanica (Mah i O'Toole, 2001). Mehanizmi rezistencije biofilma bakterije *P. aeruginosa* na antibiotike su sljedeći:

**a) Ograničeni prodor antibiotika kroz biofilm matriks** - Biofilm matriks ne predstavlja fizičku barijeru za većinu antibiotika, već prodor može biti ograničen uslijed vezanja antibiotika na sastavne dijelove matriksa i posljedične inaktivacije ili enzimske razgradnje (npr.  $\beta$ -laktamaza, koje se nakupljaju u matriksu). Osim toga, neke studije su pokazale da je prekomjerna proizvodnja matriksa, tj. „deblji“ biofilm, uočen kod nekih kliničkih sojeva bakterije *P. aeruginosa*, značajno povećala toleranciju biofilma na antibiotike.

**b) Heterogenost metabolizma i spori rast** - Biofilm je prostorno heterogen; s porastom debljine slojeva stanica u biofilmu, mijenja se dostupnost hranjivih tvari i prisutnost kisika pa su tako na periferiji bakterije metabolički aktivnije od onih u unutrašnjosti. Restrikcija nutrijenata i kisika dovodi do sporijeg metabolizma i rasta bakterija, a izravna posljedica toga

je rezistencija na antibiotike, zbog inaktivacije ciljnih mjesta djelovanja (npr. smanjena sinteza proteina mijenja učinkovitost aminoglikozida, koji su inhibitori sinteze proteina).

**c) Perzistentne stanice** - Perzisteri su stanice koje se sporo ili uopće ne dijele, što ih čini manje osjetljivima na antibiotike. Čine tek mali udio u biofilmu (~0,01%), a bitno ih je razlikovati od subpopulacije bakterija metabolički neaktivnih uslijed nedostatka nutrijenata, koje čine veliki udio biofilma. Utvrđeno je da niz gena (npr. *rpoS*, *spoT*, *relA*, *dksA*, *dinG*, *spuC*, *algR*, *pilH*, *ycgM* i *pheA*) sudjeluje u stvaranju ovog oblika stanica u biofilmu bakterije *P. aeruginosa*, no točan mehanizam nastanka nije poznat. Za sada je poznato da nisu mutanti, ni poseban stadij bakterijskog razvoja; pretpostavlja se da nastaju diferencijacijom bakterija u stanje mirovanja (engl. *dormant state*). Zbog smanjenog metabolizma, onemogućeno je djelovanje antibiotika na osnovne stanične procese (replikaciju, translaciju ili sintezu stanične stijenke), što perzistentne stanice čini rezistentnima na antibiotike.

**d) Stresni odgovor** - Stresni odgovor kod bakterija može izazvati restrikcija nutrijenata i željeza, kao i razni okolišni stresovi: oksidativni stres, temperaturni šok, promjena pH. Promjenom okolišnih uvjeta dolazi do indukcije ekspresije različitih gena (npr. sigma faktor RpoS), koji poboljšavaju antioksidativni kapacitet biofilma i toleranciju na biocide, koji induciraju sintezu reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS).

**e) Quorum sensing** - Točna uloga QS u rezistenciji na antibiotike nije u potpunosti poznata. QS kod bakterije *P. aeruginosa* kontrolira ekspresiju gena koji kodiraju za superoksid-dismutaze i katalaze, enzime koji biofilm štite od štetnog djelovanja ROS. Poremećaj QS signalnog sustava korelira s tanjim biofilmom i smanjenom proizvodnjom egzopolisaharida.

**f) Ekspresija specifičnih gena i efluks pumpe** - Određeni geni ekspimiraju se specifično u biofilmu bakterije te posreduju u razvoju rezistencije. Utvrđeno je da je transkripcijski aktivator BrlR (engl. *biofilm resistance locus regulator*) ključan u modulaciji osjetljivosti biofilma bakterije *P. aeruginosa* na različite antibiotike. BrlR direktno potiče ekspresiju gena koji kodiraju za efluks pumpe MexAB-oprM i MexEF-oprN i ABC-transportere. Prekomjerna ekspresija efluks pumpi može dovesti do višestruke rezistencije. Osim toga, BrlR utječe i na ekspresiju gena koji moduliraju lipopolisaharid i sastav membranskih proteina, kao i metabolizam i stvaranje energije, a sve navedeno povećava rezistenciju na antibiotike. Različiti oblici stresa mogu inducirati efluks pumpe - oksidativni stres inducira MexXY-OprM, nitrozativni stres inducira MexEF-OprN, a membranska

oštećenja mogu inducirati MexCD-OprJ pumpu kod bakterije *P. aeruginosa*, posredujući tako u razvoju rezistencije na antibiotike.

Posljedica brojnih i složenih mehanizmama rezistencije biofilma je potreba za većom (nekada i do 1000 puta) koncentracijom antibiotika u liječenju biofilm-infekcija. Tako velike primijenjene koncentracije sistemski dovode do toksičnih nuspojava, koje dodatno narušavaju zdravlje pojedinca. Zbog toga su nužne nove strategije u liječenju biofilm-infekcija, primjerice kombinacija antibiotika ili upotreba adjuvansa, koji će povećati učinkovitost antibiotika (Ciofu i Tolkien-Nielsen, 2019; Singh i sur., 2017).

## 1.2. Eterična ulja

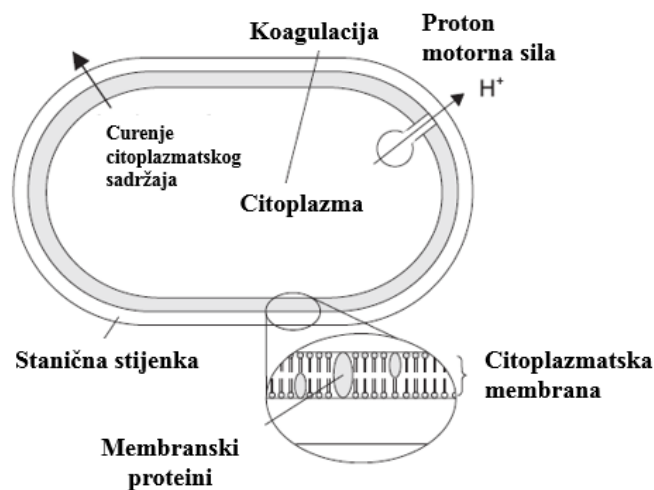
Eterična ulja su prozirne, rijetko obojene, potpuno hlapljive, uljne tekućine, složenog sastava i intenzivnog, najčešće ugodnog mirisa, izolirane iz aromatičnih biljaka. Mogu nastati u svim biljnim organima – listovima, cvjetovima, plodovima, korijenu, stabljici, kori – a biljci služe za zaštitu od različitih patogenih mikroorganizama, insekata koji prenose bolesti i biljojeda. Dobivaju se postupcima hidrodestilacije, ekstrakcije organskim i nehlapljivim otapalima i tiještenjem, koji mogu rezultirati različitim organoleptičkim i farmakološkim svojstvima (Kuštrak, 2005; Macwan i sur., 2016). Poznata su po svojim antimikrobnim (antibakterijskim, antifungalnim, antivirusnim, antiparazitskim) i insekticidnim svojstvima, kao i antioksidativnom, analgezijskom, sedativnom, protuupalnom i spazmolitičkom učinku. Danas je poznato oko 3000 različitih eteričnih ulja, od kojih je 300 komercijalno značajno, a koriste se najčešće u farmaceutskoj industriji (za proizvodnju farmaceutika), prehrambenoj industriji (kao arome, ali i za očuvanje hrane), kozmetičkoj industriji i proizvodnji parfema te aromaterapiji (Bakkali i sur., 2008).

Eterična ulja mogu sadržavati 20-200 kemijski različitih sastavnica, pri čemu su, obično, 2-3 najzastupljenije, glavne sastavnice prisutne u velikim koncentracijama (20-70%), dok su ostale prisutne u tragovima. Vodeće sastavnice određuju glavna obilježja ulja – miris, kemijska i fizikalna te biološka svojstva, primjerice, antibakterijski učinak, a ostale mogu ulaziti u međusobne aditivne, sinergističke ili antagonističke interakcije, koje određuju konačni učinak. Dokazano je više od 3000 kemijski različitih spojeva, kao sastavnica eteričnog ulja, od kojih su najzastupljenije dvije skupine različitog biosintetskog podrijetla: terpeni i terpenoidi te fenilpropanski derivati. S obzirom na funkcionalne skupine, to su najčešće: alkani, alkeni, alkini, alkoholi, fenoli, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline, eteri, esteri i laktoni. Fenolne sastavnice smatraju se glavnim odgovornima za antibakterijsko djelovanje (Burt, 2004; Kuštrak, 2005).

Terpeni nastaju kondenzacijom izoprenskih jedinica; monoterpeni su izgrađeni od dvije, seskviterpeni od tri, a diterpeni od četiri izoprenske jedinice. Terpenoidi su terpeni koji sadrže kisik, a najpoznatiji predstavnici ove skupine su timol, karvakol, linalol, mentol, citronelal i geraniol. Utvrđeno je da monoterpenoidni fenoli pokazuju najsnažnija antimikrobna svojstva, i to zahvaljujući hidroksilnoj funkcionalnoj skupini (Macwan i sur., 2016).

### 1.2.1. Antibakterijski i antibiofilm učinak eteričnih ulja

Antibakterijska svojstva eteričnih ulja poznata su stoljećima. Antibakterijska aktivnost određena je kemijskim sastavom i koncentracijom pojedinačnih sastavnica. S obzirom na veliki broj različitih kemijskih spojeva, njihova se antibakterijska aktivnost ne može pripisati jednom specifičnom mehanizmu, već se, vrlo vjerojatno, radi o kaskadnoj reakciji, koja pogađa cijelu bakterijsku stanicu. Mehanizmi antibakterijskog djelovanja sastavnica eteričnog ulja podrazumijevaju oštećenje stanične stijenke i citoplazmatske membrane ili promjenu permeabilnosti, koja dovodi do curenja staničnog sadržaja i gubitka makromolekula te posljedične lize, koagulacije citoplazme, narušavanja proton motorne sile i toka elektrona te smanjenja sinteze ATP-a (slika 4).



**Slika 4.** Mehanizmi i ciljna mjesta antibakterijskog djelovanja eteričnih ulja (preuzeto i prilagođeno iz Burt, 2004).

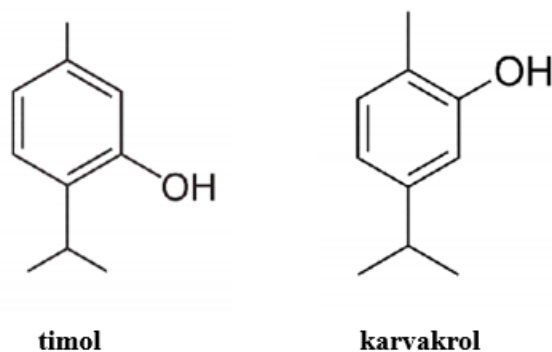
Važna karakteristika sastavnica eteričnog ulja je i hidrofobnost, koja im omogućuje ugradnju u lipidni sloj membrane, čime se narušava integritet i mijenja permeabilnost (Burt, 2004; Macwan i sur., 2016).

U novije vrijeme sve se više istražuje potencijalni antibiofilm učinak eteričnih ulja. Istraživanja su pokazala da neka eterična ulja posjeduju antibiofilm učinak protiv bakterijskih vrsta *Listeria* spp. (Upadhyay i sur., 2013), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Bazargani i Rohloff, 2016), *Salmonella typhimurium* (Miladi i sur., 2016), itd. No, sam mehanizam djelovanja na biofilm i dalje nije u potpunosti jasan; jedan od mogućih mehanizama jest

uplitanje u bakterijsku međustaničnu komunikaciju i posljedično sprječavanje stvaranja biofilma (Burt i sur., 2014).

### 1.2.2. Timol

Timol (2-izopropil-5-metilfenol) spada u skupinu monoterpenoidnih fenola, koji su prisutni u eteričnim uljima različitih biljaka iz porodice Lamiaceae, roda *Thymus*, *Ocimum*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra* i *Monarda*. Ima višestruko djelovanje – poznat je po širokom spektru antimikrobnog djelovanja, protiv brojnih gram negativnih i gram pozitivnih bakterija, kvasaca i gljivica, kao i po antioksidativnim, protuupalnim, analgezijskim, anestetičkim te blagotvornim učincima na kardiovaskularni sustav. Poboljšava probavu opuštajući glatke mišiće, prevenira menstrualne grčeve, ublažava respiratorne probleme, aktivni je sastojak u topikalnim mastima, raznim sapunima, zubnim pastama, šamponima, dezodoransima i vodicama za ispiranje usta (Marchese i sur., 2016; Meeran i sur., 2017). Strukturno je, a i funkcionalno, vrlo sličan karvakrolu – razlikuju se samo u položaju hidroksilne skupine na fenolnom prstenu (slika 5).



**Slika 5.** Kemijske strukture timola i karvakrola

Premda točan mehanizam antibakterijskog djelovanja nije u potpunosti poznat, pretpostavlja se da djeluje na način da dovodi do strukturnog i funkcionalnog poremećaja citoplazmatske membrane. Veže se za polarne glave lipidnog dvosloja i povećava fluidnost membrane, što narušava integritet i mijenja permeabilnost. Posljedično dolazi do gubitka kalija i protona te depolarizacije membranskog potencijala. Osim toga, ulazi u interakciju s membranskim proteinima i drugim unutarstaničnim metama. Također utječe na mnoge enzime



koji su izravno ili neizravno uključeni u sintezu ATP-a i time interferira s procesom stvaranja stanične energije.

Osim antimikrobnog, timol je dosada pokazao i antibiofilm učinak protiv nekih patogenih mikroorganizama – *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* (Marchese i sur., 2016).

### **1.2.3. Eterično ulje vrste *Satureja montana* L.**

*Satureja montana* L. ili primorski vrisak, jedna je od tridesetak dosad otkrivenih biljnih vrsta roda *Satureja*, porodice Lamiaceae, koje rastu u mediteranskom području. *Satureja montana* L. rasprostranjena je u Alžiru, Portugalu, Španjolskoj, Francuskoj, Italiji, Ukrajini, južnoj Rusiji i Kavkazu. Raste i u Hrvatskoj, ponajviše u Lici, Hrvatskom primorju i Dalmaciji (Kuštrak, 2005). Eterična ulja biljnih vrsta roda *Satureja* poznata su po različitim biološkim svojstvima (antimikrobna, antiproliferativna, protuupalna, vazodilatatorna idr.), a tek nekoliko studija utvrdilo je antioksidativni i antimikrobni učinak vrste *Satureja montana* L. (Serrano i sur., 2011). Glavne sastavnice eteričnog ulja vrste *Satureja montana* L. su monoterpenoidni fenoli karvakol i timol, koji su glavni odgovorni za antibakterijsku i antifungalnu aktivnost ovog ulja prema brojnim gram negativnim i gram pozitivnim bakterijama: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* (Vitanza i sur., 2018), *Salmonella typhi*, *Streptococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, te gljivicama *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Candida rugosa*, *Saccharomyces cerevisiae* (Skočibušić i Bezić, 2004).

Eterično ulje vrste *Satureja montana* L. može inhibirati stvaranje biofilma bakterije *E. coli*, *S. aureus* i *L. monocytogenes* (Vitanza i sur., 2018).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* je oportunistički patogen, koji uzrokuje infekcije kod imunokompromitiranih bolesnika te je vrlo čest uzročnik infekcija kod hospitaliziranih pacijenata u bolničkim sredinama. Ima sposobnost prilagodbe na različite okoliše uvjete, posjeduje brojne čimbenike virulencije te urođene i stečene mehanizme rezistencije na antibiotike, a stvara i multirezistentne sojeve. Uz to, stvara biofilm, koji bakterije čini otpornijima na okolišni stres i djelovanje antibiotika, zbog čega su za liječenje biofilm infekcija potrebne veće doze antibiotika, koje vrlo često imaju toksične nuspojave (Moradali i sur., 2017). Sve navedeno otežava izbor učinkovite terapije te se javlja potreba za pronalaskom novih rješenja - otkrivanje novih oblika terapije i lijekova ili očuvanje postojećih antibiotika.

Eterična ulja poznata su po svojim antimikrobnim svojstvima, a u novije vrijeme sve se više istražuje i učinak na biofilm. Uočeno je da eterična ulja i njihove komponente pri subinhibitornim koncentracijama uspješno inhibiraju stvaranje biofilma (Čabarkapa, 2019). Ovo svojstvo sugerira da bi eterična ulja ili njihove komponente mogle imati učinak i na djelovanje antimikrobnih lijekova u eradikaciji biofilma (Vitanza i sur., 2018).

**Svrha** ovog rada je ispitati učinak eteričnog ulja vrste *Satureja montana* L. i timola pojedinačno i u kombinaciji s antibiotikom tobramicinom na antimikrobnu osjetljivost i tvorbu biofilma kod bakterije *P. aeruginosa*, što bi moglo pridonijeti pronalasku nove i očuvanju postojeće terapije.

Specifični **ciljevi** ovog rada su sljedeći:

- 1) Odrediti minimalne inhibitorne koncentracije eteričnog ulja vrste *Satureja montana* L., timola i tobramicina za bakteriju *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 modificiranom metodom dvostruke serijske mikrodilucije;
- 2) Ispitati učinak eteričnog ulja vrste *Satureja montana* L. i timola na tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa* soja ATCC 27853;
- 3) Ispitati učinak eteričnog ulja vrste *Satureja montana* L. i timola u kombinaciji s tobramicinom na prethodno formirani biofilm bakterije *P. aeruginosa* soja ATCC 27853.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Bakterije

U ovom istraživanju ispitivana je bakterijska vrsta *Pseudomonas aeruginosa*, soj ATCC 27853.

#### 3.1.2. Standardne kemikalije i otopine

- L-arginin (Merck)
- aldesol (Pliva)
- amonijev sulfat,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Sigma)
- dimetilsulfoksid, DMSO (Sigma)
- glukoza (Fluka)
- kalijev hidroksid, KOH (Sigma)
- kalijev dihidrogen fosfat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma)
- kristal violet (Kemika)
- ledena octena kiselina,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Kemika)
- magnezijev sulfat,  $\text{MgSO}_4$  (Sigma)
- ultračista voda
- vodovodna voda
- željezov(II) sulfat heptahidrat,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma)

#### 3.1.3. Eterično ulje i komponente

- eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L.
- timol (Acros Organics)

#### 3.1.4. Antibiotici

- tobramicin (Sigma)

### 3.1.5. Filteri za sterilizaciju

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

### 3.1.6. Hranjivi mediji

Korištena su 2 tekuća medija:

- LB (Luria-Bertani): 10 g/L tripton, 5 g/L kvaščev ekstrakt, 10 g/L NaCl; konačni pH=7,0 ± 0,2 (Liofilchem)
- M63 + 0,4% arginin: 2 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 13,6 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 mg/L FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,2% glukoza, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,4% arginin

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprava otopina eteričnog ulja satureje i timola

U ovom radu ispitivan je antibiofilm učinak timola, koji je komercijalno pribavljen, i eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. (dalje u tekstu kao eterično ulje satureje) dobivenog destilacijom vodenom parom korištenjem Clevenger aparature (dobiveno ljubaznošću prof. dr. sc. Sande Vladimir Knežević).

Eterično ulje satureje i timol otopljeni su u DMSO do konačne koncentracije 100 mg/mL. Tako pripremljene radne otopine razrjeđivane su dalje do željenih koncentracija kako je opisano u poglavljima 3.2.2., 3.2.3. i 3.2.4.

### 3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) eteričnog ulja satureje, timola i tobramicina za bakteriju *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 u M63 tekućem mediju s 0,4% arginina određena je modificiranom metodom mikrodilucije (Andrews, 2001). Raspon koncentracija eteričnog ulja satureje i timola iznosio je 0,5-4 mg/mL (0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL i 4 mg/mL) a tobramicina 0,5-4 µg/mL (0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL i 4 µg/mL). Eterično ulje satureje,

tobramicin, i timol razrijeđeni su dvostruko serijski u 4 epruvete s M63 + 0,4% arginin hranjivim medijem.

Epruveta za uzgoj noćne kulture s 5 mL LB medija inokulirana s malom količinom bakterijskog materijala inkubirana je 24 h na 37°C u zračnoj tresilici na 200 rpm. Iz noćne kulture napravljena je kultura s brojem bakterijskih stanica  $10^8$  CFU/mL, tj. 0,5 McF, mjerenjem optičke gustoće na 600 nm (UV/VIS Spektrofotometar UltroSpec 1000, Pharmacia) i razrjeđivanjem s LB medijem. Tako pripremljena kultura razrijeđena je svakom serijski razrijeđenom otopinom tobramicina, odnosno eteričnog ulja satureje i timola, u omjeru 1:100 te je 100 µL svakog konačnog razrjeđenja nanoseno na mikrotitarsku pločicu zaobljenog dna (Ratiolab GmbH), koja je inkubirana preko noći na 37°C. Minimalna inhibitorna koncentracija određena je kao najmanja koncentracija koja je inhibirala rast bakterija vizualno i spektrofotometrijski čitačem mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer) na 570 nm.

### **3.2.3. Ispitivanje učinka eteričnog ulja satureje i timola na stvaranje biofilma**

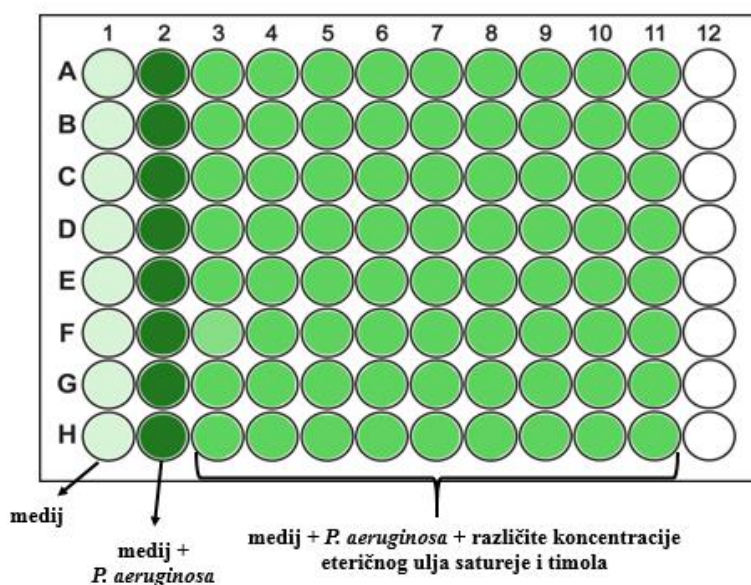
Učinak eteričnog ulja satureje i timola na stvaranje biofilma *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 ispitan je modificiranom metodom prema radu Vitanza i sur., 2018. Bakterijska kultura standardizirane optičke gustoće, koja odgovara 0,5 McFarland jedinica, pripremljena je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. Pripremljeno je 9 otopina eteričnog ulja satureje i timola u rasponu koncentracija od 0,002 do 0,5 mg/mL (0,002 mg/mL, 0,004 mg/mL, 0,008 mg/mL, 0,016 mg/mL, 0,031 mg/mL, 0,062 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL i 0,5 mg/mL) razrjeđivanjem radnih otopina ( $c=100$  mg/mL) s M63 + 0,4% arginin hranjivim medijem. Svakom tako pripremljenom otopinom bakterijska je kultura razrijeđena u omjeru 1:100 (10 µL kulture + 990 µL otopine eteričnog ulja satureje/timola/tobramicina različitih koncentracija) te je 100 µL svakog konačnog razrjeđenja nanoseno na mikrotitarsku pločicu zaobljenog dna (Ratiolab GmbH) u osam ponavljanja, koja je potom inkubirana 24 h na 37°C. Kao negativna kontrola korištena je netretirana bakterijska kultura, koja je dobivena razrjeđivanjem kulture standardizirane optičke gustoće s M63+0,4% arginin hranjivim medijem s dodatkom 1% DMSO u omjeru 1:100 (10 µL kulture + 990 µL medija). Slika 6 shematski prikazuje redoslijed nanošenja razrjeđenja bakterijske kulture i kontrola na mikrotitarsku pločicu. Nakon inkubacije, izmjerena je optička gustoća bakterijske kulture na 570 nm čitačem mikrotitarskih pločica

(Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer). Dobivenim vrijednostima je kasnije prikazan učinak eteričnog ulja satireje i timola na planktonske stanice.

Postupak bojenja i detekcije nastalog biofilma napravljen je prema prethodno opisanoj metodi (Coffey i Anderson, 2014), uz nekoliko modifikacija. Višak medija s planktonskim stanicama uklonjen je snažnim istresanjem pločice iznad posude sa staničevinom natopljenom dezinficijensom (2% Aldesol) i ispiranjem u posudi s vodovodnom vodom dva puta. U svaku je jažicu potom dodano 125  $\mu\text{L}$  0,1% kristal violeta te je pločica inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, višak boje uklonjen je snažnim istresanjem pločice iznad posude sa staničevinom, a pločice su isprane vodovodnom vodom u novoj posudi tri puta i ostavljene sušiti preko noći. Boja je otopljena dodatkom 150  $\mu\text{L}$  30% ledene octene kiseline te je pločica inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi. 125  $\mu\text{L}$  sadržaja svake jažice prebačeno je u novu mikrotitarsku pločicu s ravnim dnom (Kartell), uz prethodno miješanje pipetiranjem, te je izmjerena apsorbancija na 540 nm čitačem mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer).

Učinak na stvaranje biofilma prikazan je kao biofilm indeks (BI), koji predstavlja količinu nastalog biofilma relativnu prema ukupnom bakterijskom rastu (Niu i Gilbert, 2004), a računa se kao relativni omjer optičke gustoće odbojenog biofilma na 540 nm i optičke gustoće bakterijske kulture na 570 nm, za istu jažicu (Savoia i Zucca, 2007).

$$\text{BI} = \frac{\text{OD}_{540\text{nm}} \text{ odbojeni biofilm}}{\text{OD}_{570\text{nm}} \text{ bakterijska kultura}} \times 100$$



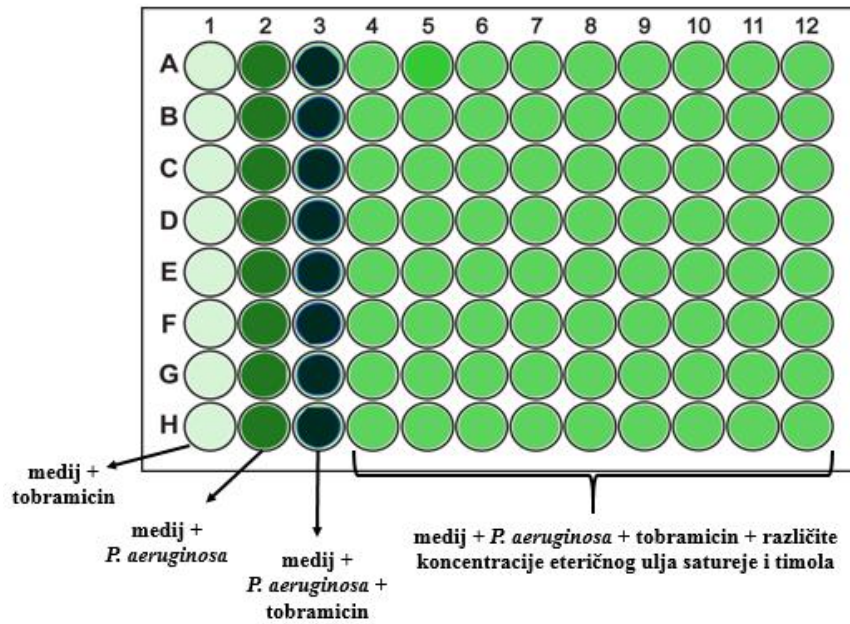
**Slika 6.** Shematski prikaz nanošenja razrijeđenja bakterijske kulture i kontrola.

### 3.2.4. Ispitivanje učinka eteričnog ulja satireje i timola s tobramicinom na formirani biofilm

Učinak eteričnog ulja satireje i timola u kombinaciji s antibiotikom tobramicinom na formirani biofilm *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 ispitivan je modificiranom metodom opisanom u radu Kaushik i sur. Bakterijska kultura standardizirane optičke gustoće, koja odgovara 0,5 McFarland jedinica, pripravljena je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. i razrijeđena u omjeru 1:100 s hranjivim medijem M63 + 0,4% arginin. Biofilm je uzgojen u 2 mikrotitarske pločice zaobljenog dna (Ratiolab GmbH) - jedna za ispitivanje učinka eteričnog ulja satireje i tobramicina i druga za ispitivanje učinka timola i tobramicina. U prvi stupac pločica naneseo je po 100 µL samog medija u osam ponavljanja, a na ostatak po 100 µL razrijeđene bakterijske kulture te su inkubirane 24 h na 37°C. Pločice su potom isprane dva puta s 200 µL sterilnog hranjivog medija M63 + 0,4% arginin.

Pripremljeno je 9 otopina eteričnog ulja satireje i timola u kombinaciji s tobramicinom, pri čemu je koncentracija eteričnog ulja satireje i timola bila u rasponu od 0,002 do 0,5 mg/mL (0,002 mg/mL, 0,004 mg/mL, 0,008 mg/mL, 0,016 mg/mL, 0,031 mg/mL, 0,062 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL i 0,5 mg/mL), a koncentracija tobramicina u svakoj otopini 2 µg/mL. Prvotno je, razrjeđivanjem u hranjivom mediju M63 + 0,4% arginin, pripravljena otopina tobramicina koncentracije 2 µg/mL. Tako pripravljenom otopinom tobramicina radne su otopine eteričnog ulja satireje i timola (c=100 mg/mL) razrjeđivane do željenih koncentracija. 150 µL svakog konačnog razrjeđenja naneseo je u rastućoj koncentraciji s lijeva nadesno na mikrotitarske pločice u osam ponavljanja. U stupac negativne kontrole, tj. netretiranih bakterijskih stanica dodano je po 150 µL sterilnog hranjivog medija M63 + 0,4% arginin, a u stupac pozitivne kontrole 150 µL otopine tobramicina koncentracije 2 µg/mL. Slika 7 shematski prikazuje sadržaj mikrotitarske pločice na kojoj je ispitivan učinak eteričnog ulja satireje i timola u kombinaciji s tobramicinom. Pločice su inkubirane 24 h na 37°C. Nakon inkubacije, izmjerena je optička gustoća bakterijske kulture na 570 nm čitačem mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer).

Daljnji postupak bojenja i detekcije nastalog biofilma napravljen je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3. Rezultati su prikazani kao količina nastalog biofilma, odnosno vrijednosti apsorbancije pri 540 nm i biofilm indeks.



**Slika 7.** Shematski prikaz sadržaja mikrotitarske pločice na kojoj je ispitivan učinak satireje i timola u kombinaciji s tobramicinom na već formirani biofilm.

### 3.2.5. Statistička analiza

Svako ispitivanje provedeno je u tri neovisna pokusa, a konačni rezultati prikazani su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija. Dobiveni rezultati analizirani su statističkim testom ANOVA, uz razinu statističke značajnosti  $p < 0,05$ .



## 4. REZULTATI

### 4.1. Minimalna inhibitorna koncentracija

Minimalne inhibitorne koncentracije eteričnog ulja satireje, timola i tobramicina za bakterijsku vrstu *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 u tekućem hranjivom M63 + 0,4% arginin mediju prikazane su u tablici 1.

**Tablica 1. Vrijednosti MIK za bakterijsku vrstu *P. aeruginosa* soja ATCC 27853**

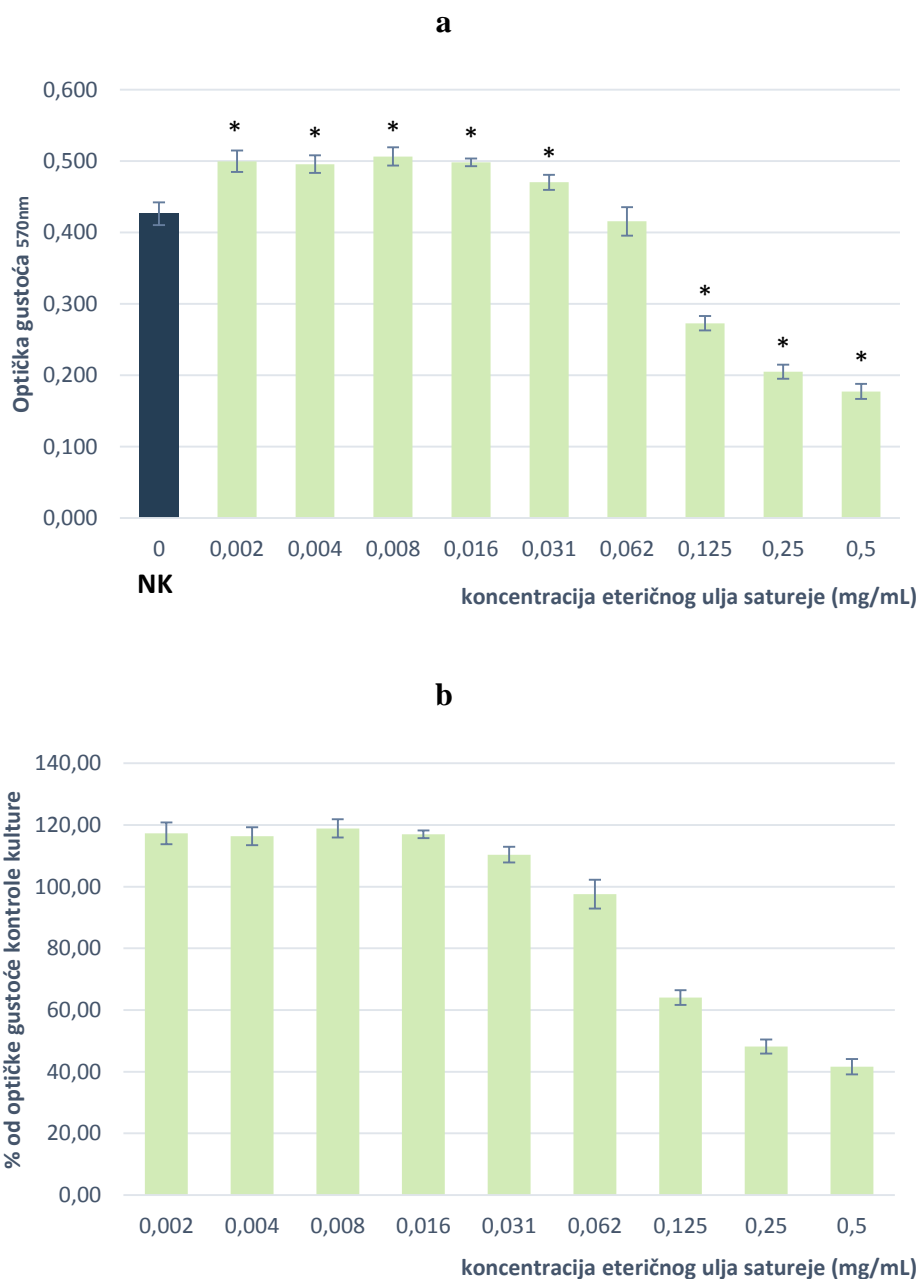
Uzorak	MIK (mg/mL)
<b>Eterično ulje satireje</b>	4
<b>Timol</b>	4
	MIK (µg/mL)
<b>Tobramicin</b>	2

Metodom mikrodilucije utvrđeno je da MIK vrijednost eteričnog ulja satireje i timola za vrstu *P. aeruginosa* soj ATCC 27853 iznosi 4 mg/mL. U ovom istraživanju korišteno je 9 subinhibitornih koncentracija, u rasponu od 0,002 do 0,5 mg/mL (0,002 mg/mL, 0,004 mg/mL, 0,008 mg/mL, 0,016 mg/mL, 0,031 mg/mL, 0,062 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL i 0,5 mg/mL), odnosno MIC/8 do MIC/2048.

Također je utvrđeno da MIK vrijednost tobramicina za istu bakterijsku vrstu u istom mediju iznosi 2 µg/mL te je antibiotik u toj koncentraciji korišten u istraživanju.

## 4.2. Učinak eteričnog ulja satureje na stvaranje biofilma bakterije *P. aeruginosa*

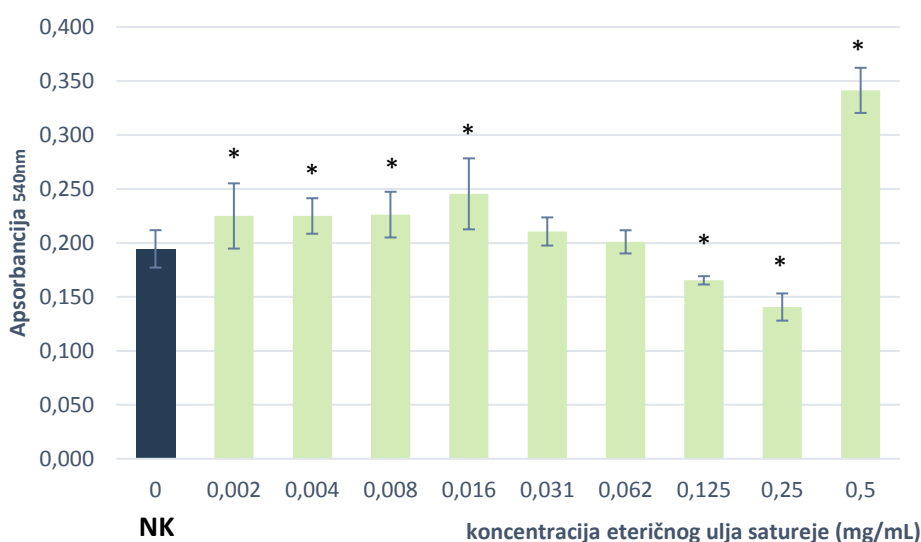
Slika 8 prikazuje učinak eteričnog ulja satureje u 9 subinhibitornih koncentracija na planktonske stanice bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853.



**Slika 8.** Učinak eteričnog ulja satureje na planktonske stanice bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853. Prikazane su aritmetičke sredine  $\pm$  standardne devijacije; \* $p < 0,05$  u odnosu na netretiranu kulturu; (a) Optička gustoća bakterijske kulture *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri 570 nm u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja satureje; NK – negativna kontrola (netretirana kultura); (b) Relativna optička gustoća bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, tj. postotak od optičke gustoće NK (netretirane kulture) u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja satureje.

Unutar ispitivanog koncentracijskog raspona primijećen je dvojak učinak eteričnog ulja satureje - inhibitorni i promotivni - ovisno o koncentraciji. Pri višim koncentracijama, točnije, u koncentracijskom rasponu 0,125-0,5 mg/mL, primijećen je značajan inhibitorni učinak; rast planktonskih stanica reduciran je za  $36\% \pm 3\%$  do  $58\% \pm 2\%$ , ovisno o koncentraciji. Smanjenjem koncentracije inhibitorni se učinak gubi. Premda je optička gustoća bakterijske kulture pri koncentraciji od 0,062 mg/mL bila nešto niža nego kod netretirane kulture, ta razlika nije bila statistički značajna. Pri još nižim koncentracijama (0,002-0,031 mg/mL) primijećen je promotivan učinak na rast planktonskih stanica, tj. porast za  $10\% \pm 3\%$  do  $17\% \pm 4\%$  u odnosu na netretiranu bakterijsku kulturu.

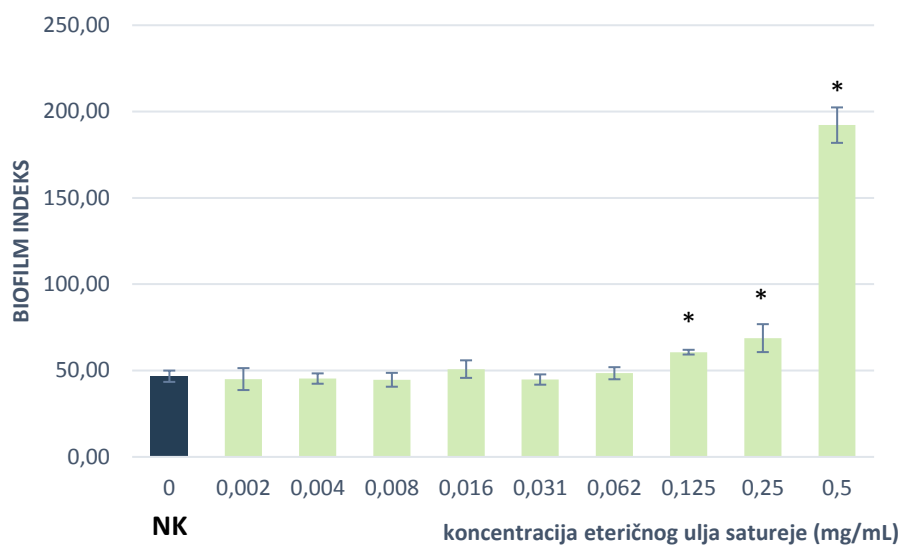
Količina nastalog biofilma u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja satureje prikazana je slikom 9.



**Slika 9.** Količina nastalog biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, prikazana kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija apsorbancije pri 540 nm u ovisnosti o koncentraciji satureje; NK – negativna kontrola (netretirana kultura); \* $p < 0,05$  u odnosu na NK.

Pri koncentracijama eteričnog ulja satureje od 0,125 mg/mL i 0,25 mg/mL količina nastalog biofilma bila je statistički značajno manja, u odnosu na netretiranu kulturu. Pri svim ostalim koncentracijama količina nastalog biofilma bila je veća, u odnosu na netretiranu kulturu, osim pri koncentracijama od 0,031 i 0,062 mg/mL, gdje nije bilo statistički značajne razlike u količini proizvedenog biofilma.

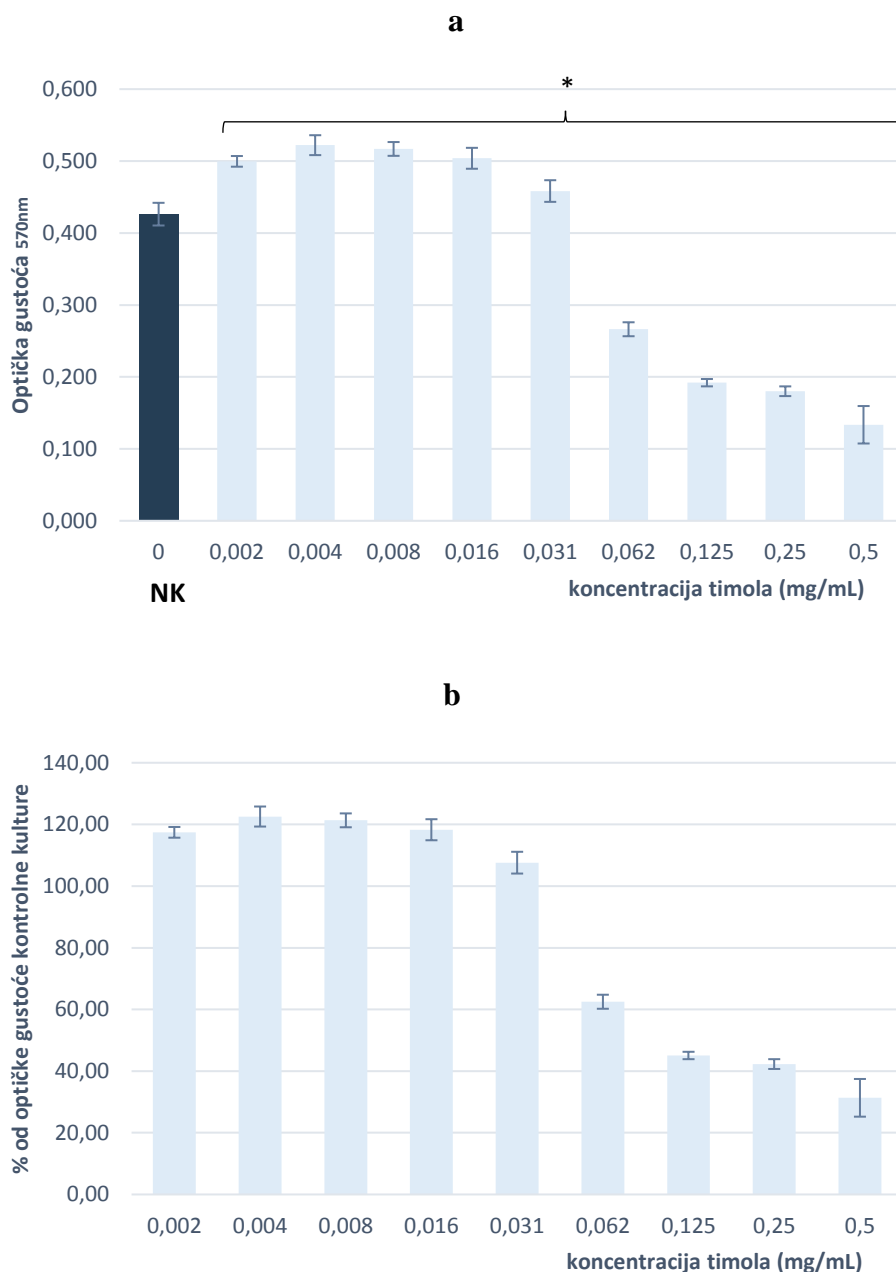
Statistički značajne razlike u biofilm indeksu bakterija tretiranih eteričnim uljem satireje, u odnosu na netretirane bakterije, utvrđene su jedino pri koncentracijama od 0,125-0,5 mg/mL - biofilm indeks je bio veći u odnosu na netretirane bakterije, što upućuje na to da, pri navedenim koncentracijama, eterično ulje satireje potiče stvaranje biofilma, a promotivni učinak je značajniji što je koncentracija satireje veća. Premda je u koncentracijskom rasponu od 0,002 do 0,008 mg/mL i pri koncentraciji od 0,031 mg/mL biofilm indeks bio manji nego kod netretiranih bakterija, ta razlika nije bila statistički značajna.



**Slika 10.** Biofilm indeks bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja satireje. Vrijednosti su prikazane kao aritmetičke sredine  $\pm$  standardne devijacije; NK – negativna kontrola (netretirana kultura); \* $p < 0,05$  u odnosu na NK.

### 4.3. Učinak timola na stvaranje biofilma bakterije *P. aeruginosa*

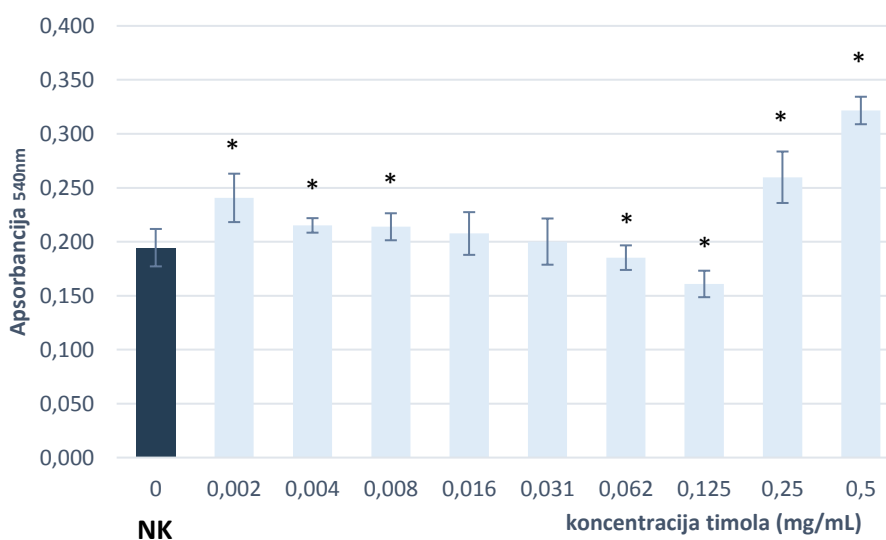
Slika 11 prikazuje učinak timola u 9 subinhibitornih koncentracija na planktonske stanice.



**Slika 11.** Učinak timola na planktonske stanice bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853. Prikazane su aritmetičke sredine  $\pm$  standardne devijacije; \* $p < 0,05$  u odnosu na netretiranu kulturu; (a) Optička gustoća bakterijske kulture *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri 570 nm u ovisnosti o koncentraciji timola; NK – negativna kontrola (netretirana kultura); (b) Relativna optička gustoća bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, tj. postotak od optičke gustoće NK (netretirane kulture) u ovisnosti o koncentraciji timola.

Statistički značajna razlika u rastu bakterijske kulture tretirane timolom u odnosu na netretiranu kulturu utvrđena je pri svim primijenjenim koncentracijama timola. Kao i u slučaju saturacije, u ispitivanom koncentracijskom rasponu primijećen je inhibitorni i promotivni učinak timola na rast planktonskih stanica, ovisno o koncentraciji. Pri većim koncentracijama timola, 0,062-0,5 mg/mL, primijećen je značajni inhibitorni učinak, koji je opadao smanjenjem koncentracije - pri koncentraciji od 0,5 mg/mL rast je reduciran za  $69\% \pm 6\%$ , dok je pri koncentraciji od 0,062 mg/mL reduciran za oko  $38\% \pm 2\%$ . Pri nižim koncentracijama (0,002-0,031 mg/mL) primijećen je promotivan učinak na rast planktonskih stanica, tj. porast za  $8\% \pm 4\%$  do  $23\% \pm 3\%$ , ovisno o koncentraciji.

Količina nastalog biofilma u ovisnosti o koncentraciji timola prikazana je slikom 12.

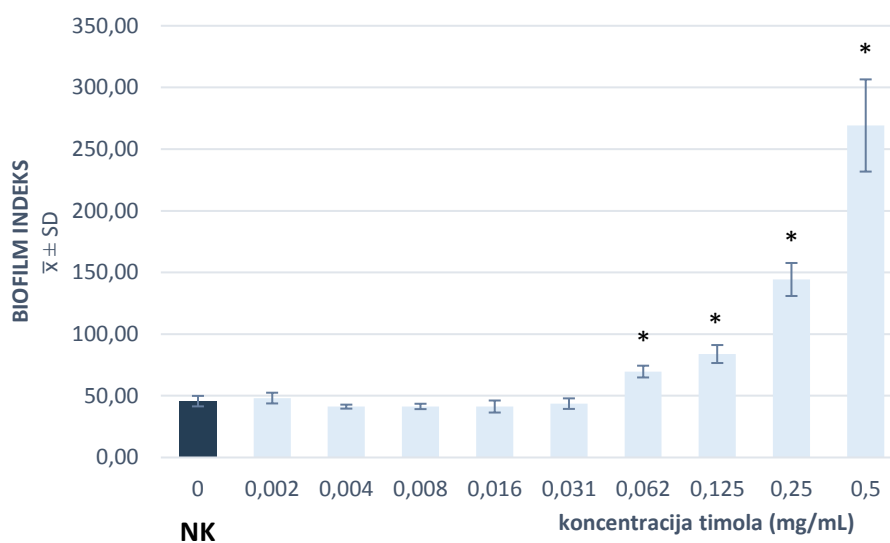


**Slika 12.** Količina nastalog biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, prikazana kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija apsorbancije pri 540 nm u ovisnosti o koncentraciji timola; NK – negativna kontrola (netretirana kultura); \* $p < 0,05$  u odnosu na NK.

Statistički značajne razlike u količini proizvedenog biofilma kultura tretiranih timolom, u odnosu na netretirane kulture, utvrđene su pri svim, osim pri koncentracijama timola od 0,016 i 0,031 mg/mL. Pri svim koncentracijama timola, osim pri 0,062 mg/mL i 0,125 mg/mL nastala je veća količina biofilma, u odnosu na netretiranu bakterijsku kulturu, pri čemu je najveća apsorbancija izmjerena pri koncentracijama od 0,25 mg/mL i 0,5 mg/mL. Primjenom timola u koncentracijskom rasponu od 0,002 do 0,031 mg/mL, količina nastalog biofilma bila je manja,

kako se koncentracija timola snižavala. No pri koncentraciji timola od 0,016 i 0,031 mg/mL ta manja količina biofilma nije bila statistički značajna.

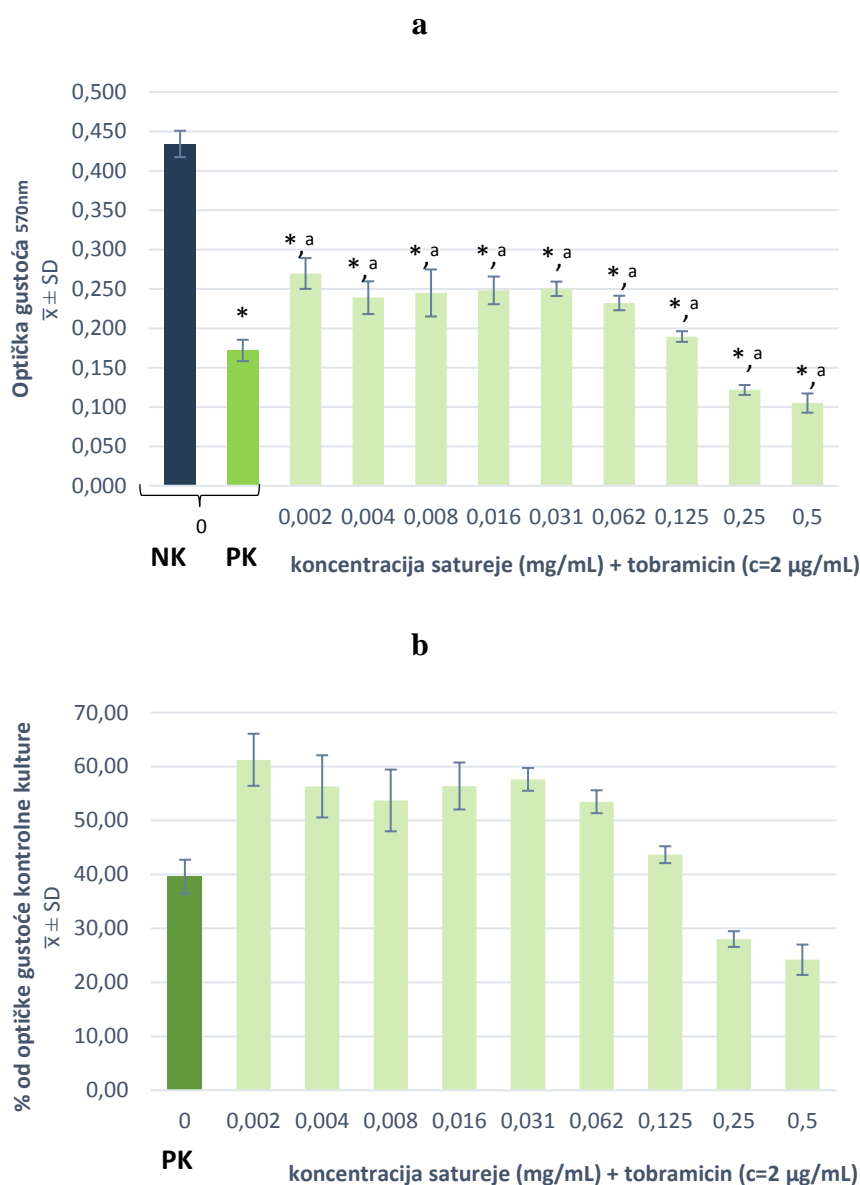
Statistički značajna razlika u biofilm indeksu bakterija tretiranih timolom, u odnosu na netretirane bakterije, zabilježena je u koncentracijskom rasponu timola 0,062-0,5 mg/mL (slika 13). Biofilm indeks bakterija tretiranih timolom u spomenutom koncentracijskom rasponu bio je veći u odnosu na netretirane bakterije, što upućuje na to da pri navedenim koncentracijama timol potiče stvaranje biofilma, a promotivni učinak je jači, što je koncentracija timola veća. U koncentracijskom rasponu od 0,004 do 0,031 mg/mL biofilm indeks bio je malo manji nego kod netretiranih bakterija, no ta razlika nije statistički značajna.



**Slika 13.** Biofilm indeks bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 u ovisnosti o koncentraciji timola. Vrijednosti su prikazane kao aritmetičke sredine ± standardne devijacije; NK – negativna kontrola (netretirana kultura); \* $p < 0,05$  u odnosu na NK.

#### 4.4. Učinak eteričnog ulja satureje i tobramicina na formirani biofilm bakterije *P. aeruginosa*

Slika 14 prikazuje učinak eteričnog ulja satureje u 9 subinhibitornih koncentracija u kombinaciji s tobramicinom koncentracije 2 µg/mL na rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, nakon što je biofilm formiran.



**Slika 14.** Učinak eteričnog ulja satureje i tobramicina na rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853. Prikazane su aritmetičke sredine ± standardne devijacije; \*  $p < 0,05$  u odnosu na netretiranu kulturu; <sup>a</sup>  $p < 0,05$  u odnosu na kulturu tretiranu samo tobramicinom;

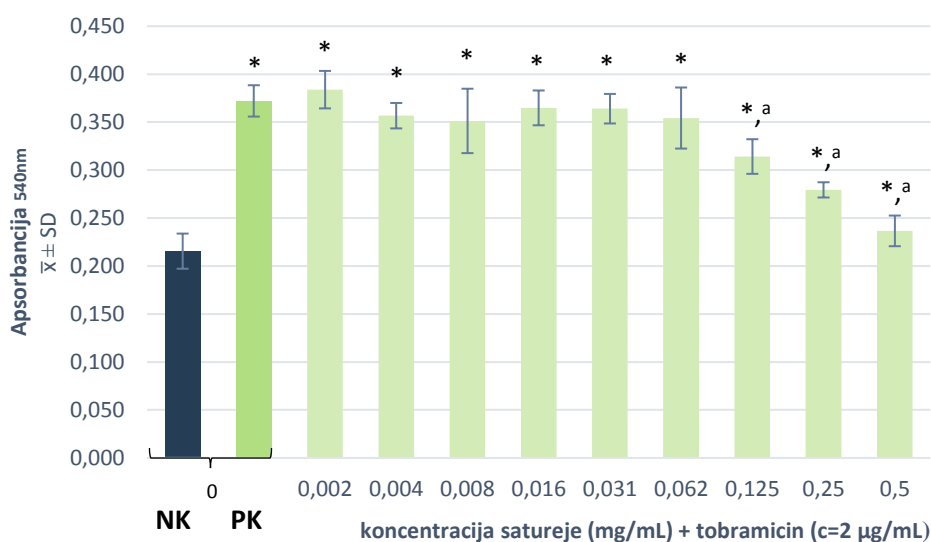
(a) Optička gustoća bakterijske kulture *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri 570 nm u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja satureje; NK – negativna kontrola (netretirana kultura); PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom);

(b) Relativna optička gustoća bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, tj. postotak od optičke gustoće NK (netretirane kulture) u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja satureje; PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom).



ANOVA testom utvrđena je statistički značajna razlika između rasta netretiranih bakterija i rasta bakterija tretiranih samo tobramicinom ili kombinacijom tobramicina i satureje svih koncentracija. Isto tako, utvrđena je i statistički značajna razlika u bakterijskom rastu između bakterija tretiranih samo tobramicinom i onih tretiranih kombinacijom tobramicina i satureje u svim koncentracijama. Sam tobramicin, u primijenjenoj koncentraciji ( $c=2 \mu\text{g/mL}$ ), inhibira rast planktonskih stanica za  $60\% \pm 3\%$ . Eterično ulje satureje, pri svim primijenjenim koncentracijama, u kombinaciji s tobramicinom koncentracije  $2 \mu\text{g/mL}$ , inhibira rast planktonskih stanica, a inhibični učinak je značajniji, što je koncentracija eteričnog ulja satureje veća. No, u koncentracijskom rasponu od  $0,002$  do  $0,062 \text{ mg/mL}$  eterično ulje satureje djeluje antagonistički u kombinaciji s tobramicinom jer umanjuje učinak samog tobramicina na planktonske stanice. Nasuprot tome, pri koncentracijama od  $0,25 \text{ mg/mL}$  i  $0,5 \text{ mg/mL}$ , primijećeno je da eterično ulje satureje u kombinaciji s tobramicinom djeluje sinergistički i pojačava inhibični učinak samog tobramicina – rast planktonskih stanica je inhibiran za  $76\% \pm 3\%$  pri koncentraciji satureje od  $0,5 \text{ mg/mL}$ .

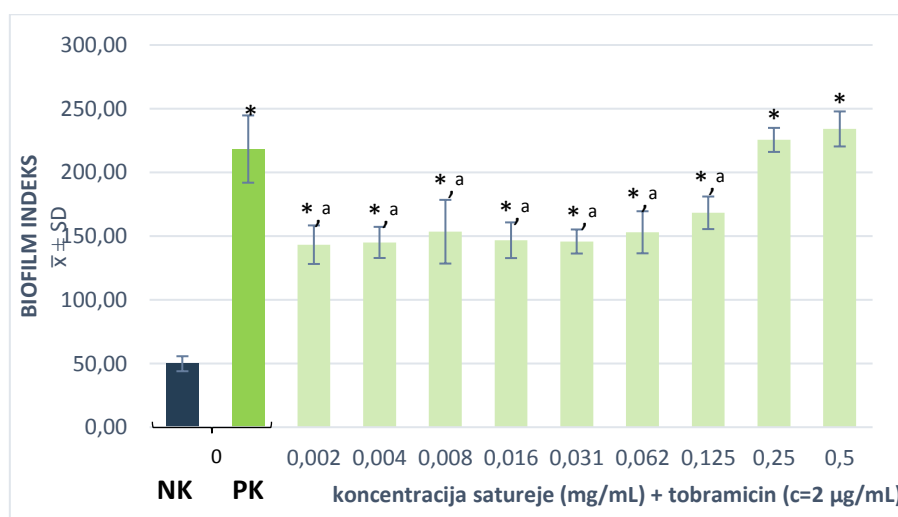
Količina nastalog biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 tretiranog eteričnim uljem satureje u kombinaciji s tobramicinom ( $c=2 \mu\text{g/mL}$ ) prikazana je slikom 15.



**Slika 15.** Količina biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 nastalog tretiranjem eteričnim uljem satureje u kombinaciji s tobramicinom, prikazana kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija apsorbancije pri  $540 \text{ nm}$  u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja satureje; NK – negativna kontrola (netretirana kultura); PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom); \*  $p < 0,05$  u odnosu na NK; <sup>a</sup>  $p < 0,05$  u odnosu na PK.

Utvrđene su statistički značajne razlike u količini biofilma nastalog nakon primjene tobramicina i kombinacije tobramicina i eteričnog ulja satureje svih koncentracija, u odnosu na količinu biofilma proizvedenu kod netretiranih bakterija. Kod pozitivne kontrole, tj. bakterija tretiranih samo tobramicinom, izmjerena je veća količina biofilma, nego kod negativne kontrole (netretirane bakterije). Veća količina biofilma, u odnosu na netretirane bakterije, nastala je i primjenom eteričnog ulja satureje u svim ispitivanim koncentracijama, u kombinaciji s tobramicinom ( $c=2 \mu\text{g/mL}$ ). Pri većim koncentracijama (od 0,125 do 0,5 mg/mL) eteričnog ulja satureje nastala je manja količina biofilma, nego kod bakterija tretiranih samo tobramicinom, dok je pri nižim koncentracijama količina nastalog biofilma bila približno jednaka kao kod bakterija tretiranih samo tobramicinom.

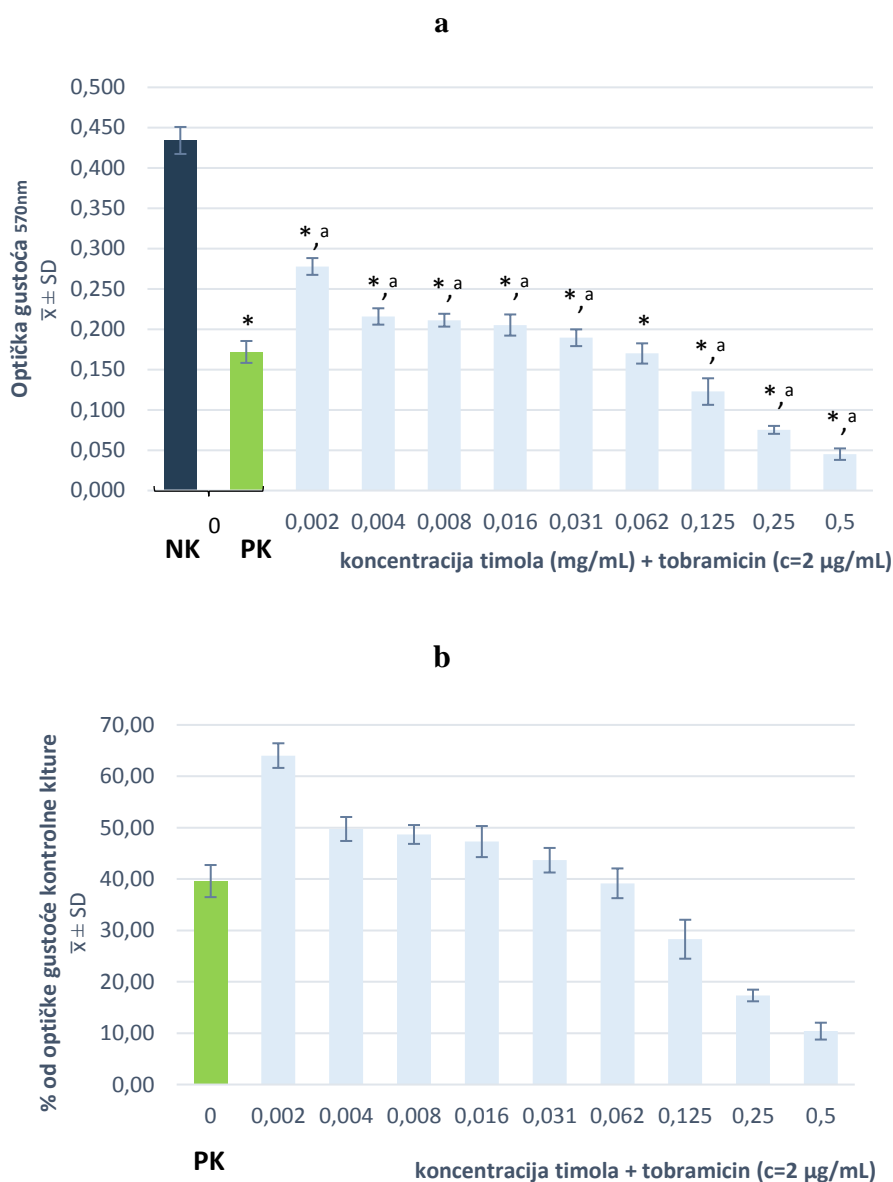
Biofilm indeks bakterija tretiranih samo tobramicinom statistički je značajno veći u odnosu na netretirane bakterije, što upućuje na to da tobramicin u primijenjenoj koncentraciji potiče daljnji razvoj postojećeg biofilma. Biofilm indeks bakterija tretiranih s tobramicinom i eteričnim uljem satureje u svim koncentracijama također je statistički značajno veći, nego kod netretiranih bakterija. No, u usporedbi s bakterijama tretiranim samo tobramicinom, statistički značajna razlika u biofilm indeksu utvrđena je samo pri kombinaciji tobramicina i satureje u koncentracijama od 0,002 do 0,125 mg/mL – biofilm indeks je bio značajno niži, odnosno, satureja je antagonizirala promotivni učinak tobramicina na biofilm.



**Slika 16.** Biofilm indeks bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 tretirane eteričnim uljem satureje u kombinaciji s tobramicinom u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja satureje. Vrijednosti su prikazane kao aritmetičke sredine  $\pm$  standardne devijacije. NK – negativna kontrola (netretirana kultura); PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom); \*  $p<0,05$  u odnosu na NK; <sup>a</sup>  $p<0,05$  u odnosu na PK.

#### 4.5. Učinak timola i tobramicina na formirani biofilm bakterije *P. aeruginosa*

Slika 17 prikazuje učinak timola u 9 subinhibitornih koncentracija u kombinaciji s tobramicinom u koncentraciji od 2 µg/mL na rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, nakon što je biofilm formiran.



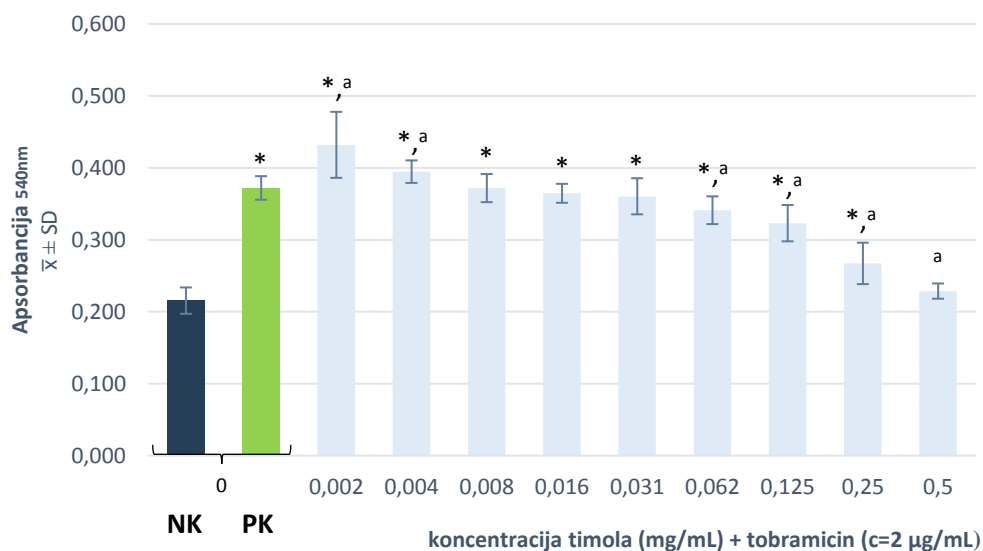
**Slika 17.** Učinak timola i tobramicina na rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853. Prikazane su aritmetičke sredine ± standardne devijacije; \*  $p < 0,05$  u odnosu na netretiranu kulturu; <sup>a</sup>  $p < 0,05$  u odnosu na kulturu tretiranu samo tobramicinom;

(a) Optička gustoća bakterijske kulture *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri 570 nm u ovisnosti o koncentraciji timola; NK – negativna kontrola (netretirana kultura); PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom);

(b) Relativna optička gustoća bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, tj. postotak od optičke gustoće NK (netretirane kulture) u ovisnosti o koncentraciji timola; PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom).

ANOVA testom utvrđena je statistički značajna razlika u rastu bakterija tretiranih samo tobramicinom i onih tretiranih kombinacijom tobramicina i timola svih koncentracija, u odnosu na netretirane bakterije. Isto tako, utvrđena je i statistički značajna razlika u bakterijskom rastu između bakterija tretiranih samo tobramicinom i onih tretiranih kombinacijom tobramicina i timola u svim koncentracijama, osim pri 0,062 mg/mL. U poglavlju 4.4. pokazano je da tobramicin u primijenjenoj koncentraciji inhibira rast planktonskih stanica za  $60\% \pm 3\%$ . Kao i kod eteričnog ulja satireje, pokazano je da kombinacija timola i tobramicina pri svim primijenjenim koncentracijama, inhibira rast planktonskih stanica. No treba naglasiti da pri nižim koncentracijama timol djeluje antagonistički i umanjuje učinak samog tobramicina. Nasuprot tome, u koncentracijskom rasponu timola od 0,125 mg/mL do 0,5 mg/mL, primijećen je značajniji inhibični učinak timola i tobramicina na planktonske stanice od samog tobramicina – rast planktonskih stanica je inhibiran za  $72\pm 2\%$  do  $90\% \pm 2\%$ , ovisno o koncentraciji.

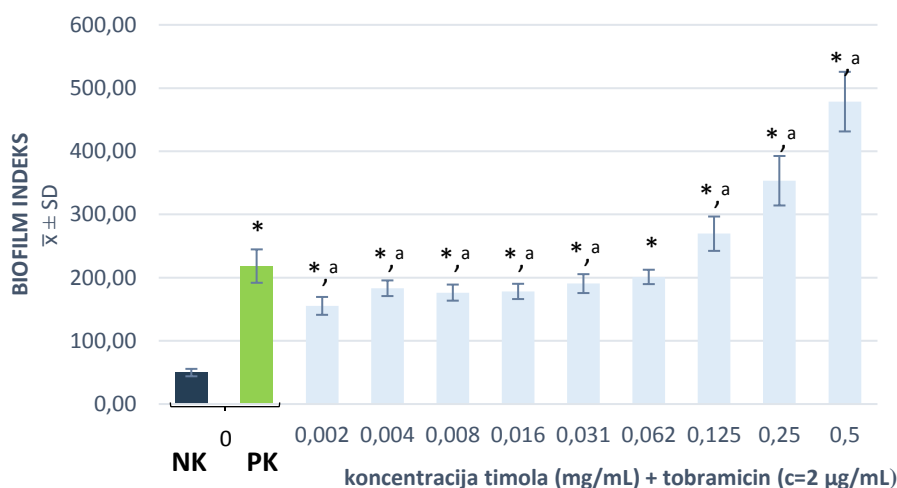
Količina nastalog biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 tretiranog timolom u kombinaciji s tobramicinom ( $c=2 \mu\text{g/mL}$ ) prikazana je slikom 18.



**Slika 18.** Količina biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 nastalog tretiranjem timola u kombinaciji s tobramicinom, prikazana kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija apsorbancije pri 540 nm u ovisnosti o koncentraciji timola; NK – negativna kontrola (netretirana kultura); PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo s tobramicinom ( $c=2 \mu\text{g/mL}$ )); \*  $p<0,05$  u odnosu na NK; <sup>a</sup>  $p<0,05$  u odnosu na PK

Utvrđene su statistički značajne razlike u količini biofilma nastalog nakon primjene tobramicina i kombinacije tobramicina i timola svih koncentracija, osim 0,5 mg/mL, u odnosu na količinu biofilma koji proizvode netretirane bakterije. Kod bakterija tretiranih samo tobramicinom, izmjerena je veća količina biofilma, nego kod netretiranih bakterija. Kao što je bio slučaj i kod eteričnog ulja satureje, primjenom kombinacije tobramicina (c=2 µg/mL) i timola svih koncentracija, nastala je veća količina biofilma, nego kod netretiranih bakterija. Pri većim koncentracijama timola (0,062 do 0,25 mg/mL) nastalo je manje, a pri nižim (0,002-0,004 mg/mL) više biofilma, nego kod bakterija tretiranih samo tobramicinom (c=2 µg/mL).

Vrlo sličan učinak na formirani biofilm primijećen je i kod timola. Prethodno je utvrđeno da tobramicin u primijenjenoj koncentraciji potiče daljnji razvoj postojećeg biofilma. Biofilm indeks bakterija tretiranih s tobramicinom i timolom u svim koncentracijama statistički je značajno veći, nego kod netretiranih bakterija. Kao i eterično ulje satrujeje, timol je pri nižim koncentracijama (0,002 - 0,031 mg/mL) antagonizirao promotivni učinak tobramicina na biofilm, dok je pri većim koncentracijama (0,125 - 0,5 mg/mL) djelovao je sinergistički s tobramicinom u promociji daljnjeg razvoja biofilma. Kombinacija tobramicina i timola koncentracije 0,062 mg/mL nije imala statistički značajan učinak na formirani biofilm, u odnosu na sam tobramicin.



**Slika 19.** Biofilm indeks bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 tretirane timolom u kombinaciji s tobramicinom u ovisnosti o koncentraciji timola. Vrijednosti su prikazane kao aritmetičke sredine ± standardne devijacije. NK – negativna kontrola (netretirana kultura); PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom); \* p<0,05 u odnosu na NK; <sup>a</sup> p<0,05 u odnosu na PK.

## 5. RASPRAVA

*Pseudomonas aeruginosa* oportunistički je patogen koji izaziva akutne i kronične infekcije, česte kod pacijenata s opeklinama i kirurškim ranama, kao i kod pacijenata s cističnom fibrozom i drugim kroničnim opstruktivnim bolestima. Jedan je od najčešćih bolničkih patogena, a uzrokuje brojne infekcije povezane s visokom stopom smrtnosti. Posjeduje urođenu rezistenciju na mnoge, a u bolničkim sredinama često razvija rezistenciju i na antipseudomonasne antibiotike. (Gužvinec i sur., 2012). Posebnu opasnost predstavlja sposobnost proizvodnje biofilma, koji se može stvarati na površini medicinskih instrumenata, plućima pacijenata s cističnom fibrozom te kroničnim ranama. Uklopljene u biofilm, bakterije postaju 10-1000 puta rezistentnije na djelovanje antibiotika od planktonskih stanica (Mah i O'Toole, 2001). Sve to ozbiljno kompromitira izbor učinkovite terapije. Antimikrobna rezistencija je danas jedan od glavnih globalnih zdravstvenih problema, zbog čega Svjetska zdravstvena organizacija naglašava nužnost pronalaska rješenja, između ostalog, otkrivanjem novih lijekova/terapija i očuvanjem postojećih antibiotika.

Eterična ulja su odavno poznata po antibakterijskim, antivirusnim, antifungalnim svojstvima. Eterična ulja iz različitih biljnih vrsta roda *Satureja* izražavaju različite stupnjeve antimikrobnih svojstava, ovisno o prisutnosti različitih komponenti, a među one s najznačajnijom aktivnošću spada i vrsta *Satureja montana* L. (Tepe i Cilkiz, 2015). Eterično ulje biljne vrste *S. montana* L. pokazalo je antimikrobna svojstva prema gram negativnim i gram pozitivnim bakterijama: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* (Vitanza i sur., 2018), kao i gljivicama, primjerice *Candida albicans* (Skočibušić i Bezić, 2004). Antimikrobnoj aktivnosti eteričnih ulja najviše pridonose glavne, najzastupljenije sastavnice. Kod biljne vrste *Satureja montana* L. to su karvakol i timol, strukturni izomeri, sličnog, dobro poznatog antibakterijskog djelovanja. (Skočibušić i Bezić, 2004). Sustavnim pregledom literature Marchese i sur. sumirali su antimikrobni učinak timola protiv velikog broja patogenih mikroorganizama. Premda je antimikrobni učinak ovih tvari dobro poznat, antibiofilm aktivnost nije opsežno istražena, stoga je ovo istraživanje provedeno kako bi se ispitao učinak biljne vrste *Satureja montana* L. i timola na biofilm *P. aeruginosa*, točnije sposobnost inhibicije stvaranja biofilma ili razaranja postojećeg biofilma. Ispitivan je učinak subinhibitornih koncentracija, jer su neke studije pokazale da upravo subinhibitorne koncentracije eteričnih ulja i njihovih komponenti mogu smanjiti adheziju bakterija i proizvodnju matriksa (Čabarkapa i sur., 2019).

U prvom dijelu ovog rada ispitivao se učinak eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. i timola na stvaranje biofilma bakterije *P. aeruginosa* soja ATCC 27853. Premda su brojna istraživanja već utvrdila antibakterijska svojstva ovih tvari, ovaj je rad, sekundarno ispitivanju učinka na biofilm, analizirao i učinak na rast planktonskih stanica, mjerenjem optičke gustoće bakterijske kulture pri 570 nm, nakon 24-satne inkubacije s otopinama eteričnog ulja satureje i timola. Količina proizvedenog biofilma mjerena je nakon bojenja kristal violetom i odbojavanja octenom kiselinom kao apsorbancija pri 540 nm, a konačni učinak na biofilm prikazan je biofilm indeksom. Značajnost biofilm indeksa leži u tome što inkorporira rast kulture i količinu stvorenog biofilma u jedan parametar, ilustrirajući relativnu sposobnost bakterija da stvaraju biofilm. To ga čini dobrim alatom za buduća istraživanja različitih tvari na razvoj biofilma (Niu i Gilbert, 2004). Zanimljivo je bilo uočiti da eterično ulje satureje, u primijenjenom koncentracijskom rasponu, djeluje inhibitorno i promotivno na rast planktonskih stanica, ovisno o koncentraciji - pri većim je koncentracijama (0,125-0,5 mg/mL) inhibirala, a pri nižim potaknula rast planktonskih stanica. S druge strane, iste koncentracije, koje su inhibirale rast planktonskih stanica, imale su suprotan, promotivni, učinak na stvaranje biofilma, dok značajan učinak nižih koncentracija na biofilm nije uočen. Niu i Gilbert primijetili su slično ponašanje kod bakterije *P. aeruginosa* soja PAO1 u odgovoru na cinamaldehyd – prvotno se smanjila, a potom pri većim koncentracijama povećala proizvodnja biofilma. Pretpostavlja se da je došlo do aktivacije odgovora induciranog stresom i moguće povećane proizvodnje egzopolisaharida, što je u konačnici rezultiralo jačim vezanjem kristal violeta (Aquino i Stuckey, 2004; Fang i sur, 2002). Dvojak učinak na rast planktonskih stanica primijećen je i u slučaju timola; veće koncentracije su inhibirale, a niže promovirale rast planktonskih stanica, s tim da je inhibitorni koncentracijski raspon bio nešto veći (0,062-0,5 mg/mL). Baš kao i eterično ulje satureje, pri istim koncentracijama koje su inhibirale rast planktonskih stanica, timol je djelovao promotivno na stvaranje biofilma. S obzirom na to da je jedna od najzastupljenijih komponenti eteričnog ulja vrste *Satureja montana* L., sličan učinak timola mogao se pretpostaviti. No, usporedbom dobivenih vrijednosti uočeno je da je inhibitorni učinak na rast bakterijske kulture i promotivni učinak na stvaranje biofilma bio značajniji u slučaju timola. To bi se moglo objasniti činjenicom da eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L., osim timola sadrži i brojne druge komponente, koje vrlo vjerojatno ulaze u složene interakcije. Međusobne interakcije mogu biti aditivne, sinergističke ili antagonističke i one u konačnici određuju učinak samo eteričnog ulja, koji se može potpuno razlikovati od pojedinačnih sastavnica (Burt, 2004; Bakkali i sur., 2008). S obzirom na suprotan učinak eteričnog ulja satureje i timola na stvaranje biofilma, u odnosu na učinak na rast planktonskih

stanica, pretpostavlja se da bi antibiofilm učinak mogao biti neovisan o antibakterijskoj aktivnosti.

U drugom dijelu ovog rada ispitivao se učinak eteričnog ulja biljne vrste *Satureja montana* L. i timola u kombinaciji s antibiotikom tobramicinom na prethodno formirani biofilm bakterije *P. aeruginosa* soja ATCC 27853. Aminoglikozidni antibiotici koriste se u liječenju planktonskih i biofilm-infekcija bakterijom *P. aeruginosa*. Inhalirani aminoglikozid tobramicin standardna je terapija u liječenju cistične fibroze. Ozbiljni problem primjene tobramicina predstavljaju ototoksične i neurotoksične nuspojave, koje su izraženije kod većih doza i dugotrajnije terapije (Prayle i sur., 2010). Stoga je smanjivanje doze i trajanja terapije tobramicinom nužno, kako bi se ublažile toksične nuspojave. U tu svrhu, nekoliko je studija dosad ispitivalo potencijalni sinergistički učinak različitih tvari s tobramicinom u eradikciji biofilma bakterije *P. aeruginosa*. Pokazano je, primjerice, da je kombinacija tobramicina i SDS-a, kao i tobramicina i triklozana, učinkovitija u eradikciji biofilma od samog tobramicina (Maiden i sur., 2018; Shin i sur., 2016). Kao i u prvom dijelu ovog rada, osim učinka ovih kombinacija na sami biofilm, ispitivan je i učinak na planktonske stanice, na način da se, nakon što je prethodno uzgojeni biofilm tretiran svim kombinacijama satureje/timola s tobramicinom i inkubiran 24 h, izmjerila optička gustoća kulture pri 570 nm. Biofilm indeks, kao indikator sposobnosti stvaranja biofilma, određen je i u ovom dijelu. Zanimljivo je bilo primijetiti da je tobramicin, u primijenjenoj koncentraciji od 2 µg/mL, koja odgovara njegovoj MIK vrijednosti za bakteriju *P. aeruginosa* ATCC 27853 u tekućem hranjivom mediju M63 + 0,4% arginin, uspješno inhibirao daljnji rast planktonskih stanica, a značajno potaknuo daljnji razvoj biofilma. Kombinacija tobramicina i eteričnog ulja satureje također je inhibirala rast planktonskih stanica, no pri većim koncentracijama satureje je djelovala sinergistički s tobramicinom, a pri manjim antagonizirala inhibitorni učinak na planktonske stanice. S druge strane, niže su koncentracije eteričnog ulja satureje antagonizirale promotivni učinak tobramicina na daljnji razvoj biofilma. Kao i u prvom dijelu, očekivao se i potvrdio sličan učinak timola, no s jednom bitnom razlikom – pri većim je koncentracijama timol postigao značajan sinergistički učinak s tobramicinom u daljnjem razvoju biofilma. Opsežna studija Kaushik i sur. pokazala je slično ponašanje bakterije *P. aeruginosa* kada se primijenila kombinacija tobramicina i bikarbonata. Naime, kombinacija tobramicina i bikarbonata pokazala je snažnu sinergiju u ubijanju planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa*, a antagonizam za daljnji razvoj biofilma.



Teže je eradicirati postojeći biofilm, nego inhibirati formaciju biofilma, što su ustvrdile i druge studije, a to samo potvrđuje činjenicu da su patogeni sposobni oduprijeti se djelovanju antimikrobnih lijekova, kada su udruženi u biofilmu.

Rezultati ovog rada pokazali su da su eterično ulje biljne vrste *Satureja montana* L. i timol pri subinibitornim koncentracijama učinkoviti u inhibiciji rasta bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, samostalno, što podupiru i druge studije, i u kombinaciji s tobramicinom. Ova svojstva sugeriraju njihov potencijal u liječenju planktonskih infekcija bakterijom *P. aeruginosa*, no nužna su opsežnija istraživanja. S druge strane, nalazi indiciraju da bi učinak na biofilm mogao biti suprotan, promotivan i potpuno neovisan od antibakterijskom učinku. Za bolje razumijevanje, u budućnosti je potrebno istražiti mehanizam djelovanja na biofilm.

## 6. ZAKLJUČAK

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

- Eterično ulje vrste *Satureja montana* L. i timol pri nekim subinhibitornim koncentracijama učinkovito inhibiraju rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, no pri drugim koncentracijama djeluju suprotno te potiču rast.
- Premda učinkovita inhibicija rasta sugerira potencijal u liječenju planktonskih infekcija uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa*, koncentracijski raspon pri kojem se postiže takav učinak vrlo je uzak.
- Eterično ulje vrste *Satureja montana* L. i timol pri subinhibitornim koncentracijama promoviraju stvaranje biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, iz čega se može pretpostaviti da bi učinak na biofilm mogao biti potpuno neovisan o antibakterijskom učinku.
- Tobramicin pri MIK vrijednosti od 2 µg/mL, samostalno i u kombinaciji s eteričnim uljem vrste *Satureja montana* L. i timolom uspješno inhibira daljnji rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, nakon što je biofilm već formiran. Pri tome veće koncentracije eteričnog ulja vrste *Satureja montana* L. i timola djeluju sinergistički s tobramicinom, a niže antagoniziraju njegov učinak na planktonske stanice.
- Tobramicin pri MIK vrijednosti od 2 µg/mL potiče daljnji razvoj prethodno stvorenog biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853. Eterično ulje vrste *Satureja montana* L. antagonizira promotivni učinak tobramicina na prethodno stvoreni biofilm, dok timol, ovisno o koncentraciji, može antagonizirati učinak tobramicina, ali i djelovati sinergistički s tobramicinom u promociji daljnjeg razvoja prethodno formiranog biofilma.
- Ovaj rad pridonijet će daljnjim naporima za pronalaskom nove i očuvanju postojeće terapije za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa*.

## 7. LITERATURA

- Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48, 5–16.
- Aquino SF, Stuckey DC. Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Res*, 2004, 38, 255–266.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46, 446-475.
- Bazargani MM, Rohloff J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Cont*, 2016, 61, 156–164.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J of Food Microbiol*, 2004, 94, 223-253.
- Burt SA, Ojo-Fakunle VT, Woertman J, Veldhuizen EJ. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS One*, 2014, 9, e93414.
- Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, Mitchell TG, McKerrow JH, Sakanari JA. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. New York, McGraw-Hill Education, 2015, str. 245-248.
- Ciofu O, Tolker-Nielsen T. Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents - How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Front. Microbiol*, 2019, 10, 913.
- Coffey BM, Anderson GG. Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate. U: *Pseudomonas Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Filloux A, Ramos JL, Humana Press, New York, NY, 2014, str. 631-641.
- Čabarkapa I, Čolović R, Đuragić O, Popović S, Kokić B, Milanov D, Pezo L. Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella* Enteritidis. *Biofouling*, 2019, 35, 361-375.
- De Kievit TR. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol*, 2009, 11, 279-88.

- Fang HH, Xu LC, Chan KY. Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Res*, 2002, 36, 4709–4716.
- Gužvinec M, Butić I, Jelić M, Bukovski S, Lucić S, Tambić Andrašević A. Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. *Infektološki glasnik*, 2012, 32, 71-80.
- Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol*, 2012, 3, 12.
- Kalenić S. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 215-220.
- Kaushik KS, Stolhandske J, Shindell O, Smyth HD, Gordon VD. Tobramycin and bicarbonate synergise to kill planktonic *Pseudomonas aeruginosa*, but antagonise to promote biofilm survival. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2016, 2, 16006.
- Kuštrak D. Farmakognozija fitofarmacija. Zagreb, Golden Marketing - Tehnička Knjiga, 2005, str. 219-225.
- Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*, 2015, 6, 26–41.
- Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol biotechnol*, 2017, 27, 1053-1064.
- 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.
- Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, 2001, 9, 34-39.
- Maiden MM, Hunt AMA, Zachos MP, Gibson JA, Hurwitz ME, Mulks MH, Waters CM. Triclosan Is an Aminoglycoside Adjuvant for Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2018, 62, e00146-18
- Marchese A, Orhan IE, Daglia M, Barbieri R, Di Lorenzo A, Nabavi SF, Gortzi O, Izadi M, Nabavi SM. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chem*, 2016, 210, 402-414.

- Miladi H, Mili D, Ben Slama R, Zouari S, Ammar E, Bakhrouf A. Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain. *Microb Pathog*, 2016, 93, 22–31.
- Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 2017, 7, 39.
- Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol*, 2014, 68, 1-12.
- Niu C, Gilbert ES. Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components That Affect Biofilm Formation and Structure. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70, 6951-6956.
- Prayle A, Watson A, Fortnum H, Smyth A. Side effects of aminoglycosides on the kidney, ear and balance in cystic fibrosis. *Thorax*. 2010, 65, 654–658.
- Sahin F, Karaman I, Güllüce M, Oğütçü H, Sengül M, Adigüzel A, Kotan R. Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. *J Ethnopharmacol*, 2003. 87, 61–65.
- Savioa D, Zucca M. Clinical and Environmental Burkholderia Strains: Biofilm Production and Intracellular Survival. *Curr Microbiol*, 2007, 54, 440-444.
- Serrano C, Matos O, Teixeira B, Ramos C, Neng N, Nogueira J, Nunes ML, Marques A. Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. *J Sci Food Agric*, 2011, 91, 1554-1560.
- Sharifi A, Mohammadzadeh A, Salehi ZT, Mahmoodi P. Antibacterial, antibiofilm and antiquorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates. *J Appl Microbiol*, 2018, 124, 379-388.
- Shin S, Ahmed I, Hwang J, Seo Y, Lee E, Choi J, Moon S, Cho DW. A Microfluidic Approach to Investigating a Synergistic Effect of Tobramycin and Sodium Dodecyl Sulfate on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Analytical Sciences*, 2016, 32, 67-73.
- Singh S, Singh SK, Chowdhury I, Singh R. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *Open Microbiol J*, 2017, 11, 53–62.
- 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.

Tepe B, Cilkiz M. A pharmacological and phytochemical overview on Satureja. *Pharm Biol*, 2015, 54, 375–412.

Upadhyay A, Upadhyaya I, Kollanoor-Johny A, Venkitanarayanan K. Antibiofilm effect of plant derived antimicrobials on *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol*, 2013, 36, 79–89.

Vitanza L, Maccelli A, Marazzato M, Scazzocchio F, Comanducci A, Fornarini S, Crestoni ME, Filippi A, Frascetti C, Rinaldi F, Aleandri M, Goldoni P, Conte MP, Ammendolia MG, Longhi C. *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. *Microb Pathog*, 2019, 126, 323-331.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

*Pseudomonas aeruginosa* je sveprisutni oportunistički patogen, koji u planktonskom obliku uzrokuje akutne, a u obliku biofilma kronične, perzistentne infekcije, česte kod pacijenata s cističnom fibrozom i dijabetičkim kroničnim ranama. Višestruki mehanizmi rezistencije i brojni drugi čimbenici pridonose izrazitoj otpornosti prema djelovanju antibiotika, što kompromitira izbor učinkovite terapije. Dobro je poznato da eterična ulja i njihove komponente imaju širok spektar antimikrobnih svojstva, međutim, novija su istraživanja utvrdila da neka eterična ulja pokazuju i antibiofilm učinak. Ovo svojstvo sugerira da bi eterična ulja i njihove komponente mogle utjecati i na učinak antibiotika u eradikciji biofilma. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati kakav učinak postiže eterično ulje vrste *Satureja montana* L. i timol na rast planktonskih stanica i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, samostalno i u kombinaciji s tobramicinom.

Učinak na rast planktonskih stanica određen je mjerenjem optičke gustoće kulture pri 570 nm. Količina nastalog biofilma određena je mjerenjem apsorbancije pri 540 nm, a konačni učinak prikazan je kao biofilm indeks. Rezultati su pokazali da su eterično ulje vrste *Satureja montana* L. i timol pri subinibitornim koncentracijama učinkoviti u inhibiciji rasta planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, samostalno, i u kombinaciji s tobramicinom. S druge strane, nalazi indiciraju da bi učinak na biofilm mogao biti suprotan, promotivan i potpuno neovisan o antibakterijskom učinku. Eterično ulje vrste *Satureja montana* L. i timol pri subinhibitornim koncentracijama promoviraju stvaranje biofilma. Eterično ulje vrste *Satureja montana* L. antagonizira promotivni učinak tobramicina pri koncentraciji koja odgovara njegovoj MIK vrijednosti na prethodno stvoreni biofilm; timol pri subinhibitornim koncentracijama antagonizira učinak, ali isto tako djeluje sinergistički s tobramicinom na prethodno formirani biofilm, ovisno o koncentraciji. Ovaj rad pridonijet će naporima za pronalaskom nove i očuvanju postojeće terapije u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa*.

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic and nosocomial pathogen that in planktonic form causes acute infection, and in biofilm form causes chronic, persistent infections, common in patients with cystic fibrosis and diabetic chronic wounds. Multiple resistance mechanisms and many other factors contribute to antibiotic resistance, compromising the choice of effective treatment. It has long been recognized that essential oils and their components have a wide range of antimicrobial properties. However, recent studies have shown that some essential oils may also have antibiofilm activity. It was suggested that essential oils and their components could have an effect on antibiotic-related eradication of biofilm. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of *Satureja montana* L. essential oil and thymol on the planktonic growth and biofilm of *P. aeruginosa* ATCC 27853, alone and in combination with tobramycin.

The effect on planktonic growth was determined by measuring optical density at 570 nm. The amount of formed biofilm was determined by measuring absorbance at 540nm and the effect on biofilm was defined as biofilm index. The results showed that *Satureja montana* L. essential oil and thymol, when used in subinhibitory concentrations, could effectively inhibit the planktonic growth of *P. aeruginosa* ATCC 27853, both alone, and in combination with tobramycin. On the other hand, the findings suggest that effect on the biofilm may be opposite and completely independent of antibacterial effect. *Satureja montana* L. essential oil and thymol, when used in subinhibitory concentrations, promote biofilm formation. *Satureja montana* L. essential oil antagonizes the promotional effect of tobramycin on preformed biofilm, when used in concentration corresponding to its MIC value. Depending on the concentration, thymol in subinhibitory concentrations either antagonizes tobramycin or synergises with it to promote biofilm survival. Results of this work will support future studies to find new and preserve the existing therapies of *P. aeruginosa* infections.



## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### Učinak eteričnog ulja vrste *Satureja montana* L. i timola na rast i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa*

Klara Andričević

#### SAŽETAK

*Pseudomonas aeruginosa* je sveprisutni oportunistički patogen, koji u planktonskom obliku uzrokuje akutne, a u obliku biofilma kronične, perzistentne infekcije, česte kod pacijenata s cističnom fibrozom i dijabetičkim kroničnim ranama. Višestruki mehanizmi rezistencije i brojni drugi čimbenici pridonose izrazitoj otpornosti prema djelovanju antibiotika, što kompromitira izbor učinkovite terapije. Dobro je poznato da eterična ulja i njihove komponente imaju širok spektar antimikrobnih svojstva, međutim, novija su istraživanja utvrdila da neka eterična ulja pokazuju i antibiofilm učinak. Ovo svojstvo sugerira da bi eterična ulja i njihove komponente mogle utjecati i na učinak antibiotika u eradikciji biofilma. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati kakav učinak postiže eterično ulje vrste *Satureja montana* L. i timol na rast planktonskih stanica i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, samostalno i u kombinaciji s tobramicinom. Učinak na rast planktonskih stanica određen je mjerenjem optičke gustoće kulture pri 570 nm. Količina nastalog biofilma određena je mjerenjem apsorbancije pri 540 nm, a konačni učinak prikazan je kao biofilm indeks. Rezultati su pokazali da su eterično ulje vrste *Satureja montana* L. i timol pri subinibitornim koncentracijama učinkoviti u inhibiciji rasta planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, samostalno, i u kombinaciji s tobramicinom. S druge strane, nalazi indiciraju da bi učinak na biofilm mogao biti suprotan, promotivan i potpuno neovisan o antibakterijskom učinku. Eterično ulje vrste *Satureja montana* L. i timol pri subinhibitornim koncentracijama promoviraju stvaranje biofilma. Eterično ulje vrste *Satureja montana* L. antagonizira promotivni učinak tobramicina pri koncentraciji koja odgovara njegovoj MIK vrijednosti na prethodno stvoreni biofilm; timol pri subinhibitornim koncentracijama antagonizira učinak, ali isto tako djeluje sinergistički s tobramicinom na prethodno formirani biofilm, ovisno o koncentraciji. Ovaj rad pridonijet će naporima za pronalaskom nove i očuvanju postojeće terapije u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa*.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 19 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 38 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: pseudomonas, biofilm, timol, satureja, eterično ulje, tobramicin, antibiofilm učinak

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. Biljana Blažeković**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Daniela Jakšić**, poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan, 2019.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### Effect of *Satureja montana* L. essential oil and thymol on growth and biofilm production of *P. aeruginosa*

Klara Andričević

#### SUMMARY

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic and nosocomial pathogen that in planktonic form causes acute infection, and in biofilm form causes chronic, persistent infections, common in patients with cystic fibrosis and diabetic chronic wounds. Multiple resistance mechanisms and many other factors contribute to antibiotic resistance, compromising the choice of effective treatment. It has long been recognized that essential oils and their components have a wide range of antimicrobial properties. However, recent studies have shown that some essential oils may also have antibiofilm activity. It was suggested that essential oils and their components could have an effect on antibiotic-related eradication of biofilm. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of *Satureja montana* L. essential oil and thymol on the planktonic growth and biofilm of *P. aeruginosa* ATCC 27853, alone and in combination with tobramycin. The effect on planktonic growth was determined by measuring optical density at 570 nm. The amount of formed biofilm was determined by measuring absorbance at 540nm and the effect on biofilm was defined as biofilm index. The results showed that *Satureja montana* L. essential oil and thymol, when used in subinhibitory concentrations, could effectively inhibit the planktonic growth of *P. aeruginosa* ATCC 27853, both alone, and in combination with tobramycin. On the other hand, the findings suggest that effect on the biofilm may be opposite and completely independent of antibacterial effect. *Satureja montana* L. essential oil and thymol, when used in subinhibitory concentrations, promote biofilm formation. *Satureja montana* L. essential oil antagonizes the promotional effect of tobramycin on preformed biofilm, when used in concentration corresponding to its MIC value. Depending on the concentration, thymol in subinhibitory concentrations either antagonizes tobramycin or synergises with it to promote biofilm survival. Results of this work will support future studies to find new and preserve the existing therapies of *P. aeruginosa* infections.

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

Thesis includes: 43 pages, 19 figures, 1 table and 38 references. Original is in Croatian language.

Keywords: pseudomonas, biofilm, *Satureja*, thymol, tobramycin, antibiofilm effect

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  
**Biljana Blažeković, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Daniela Jakšić, Ph.D.** Postdoktorand., University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2019.