

Učinak eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis* Moench i pulegona na rast i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa*

Koprivčić, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:163:219916>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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



Dora Koprivčić

**Učinak eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis*
Moench i pulegona na rast i tvorbu biofilma
bakterije *P. aeruginosa***

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2020.

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

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček koja je ponudila svoje znanje, vrijeme i pružila mnoge izrazito korisne savjete. Zahvaljujem joj na svom strpljenju i pomoći te zabavnim trenucima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svojim roditeljima i sestrama na podršci i razumijevanju tijekom studija.

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>).....	2
1.1.3. Biofilm.....	4
1.1.4. Klinički značaj.....	6
1.1.5. Antimikrobna rezistencija i liječenje.....	6
1.1.6. Mehanizmi rezistencije biofilma na antibiotike.....	8
1.2. Eterična ulja	11
1.2.1. Antibakterijski i antibiofilm učinak eteričnih ulja.....	11
1.2.2. Pulegon.....	13
1.2.3. Eterično ulje vrste <i>Calamintha officinalis</i> L.....	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Materijali	17
3.1.1. Bakterije.....	17
3.1.2. Standardne kemikalije i otopine.....	17
3.1.3. Eterično ulje i komponente.....	17
3.1.4. Antibiotici.....	17
3.1.5. Filteri za sterilizaciju.....	17
3.1.6. Hranjivi mediji.....	18
3.2. Metode	18
3.2.1. Priprava otopina eteričnog ulja kalaminte i pulegona.....	18
3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije.....	18
3.2.3. Ispitivanje učinka eteričnog ulja kalaminte i pulegona na stvaranje biofilma.....	19
3.2.4. Ispitivanje učinka eteričnog ulja kalaminte i pulegona s tobramicinom na formirani biofilm.....	21
3.2.5. Statistička analiza.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. Rezultati	24
4.1.1. Minimalna inhibitorna koncentracija.....	24
4.1.2. Učinak eteričnog ulja kalaminte na stvaranje biofilma bakterije <i>P. aeruginosa</i>	25

4.1.3. Učinak pulegona na stvaranje biofilma bakterije <i>P. aeruginosa</i>	28
4.1.4. Učinak eteričnog ulja kalaminte i tobramicina na formirani biofilm bakterije <i>P. aeruginosa</i>	31
4.1.5. Učinak pulegona i tobramicina na formirani biofilm bakterije <i>P. aeruginosa</i>	33
4.2. Rasprava	36
5. ZAKLJUČCI	43
6. LITERATURA	44
7. SAŽETAK/SUMMARY	48
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterije roda *Pseudomonas* spadaju pod aerobne i asporogene Gram-negativne štapiće, te su dio porodice *Pseudomonadaceae*. Sojevi unutar roda *Pseudomonas* posjeduju polisaharidnu kapsulu, te enzime katalazu i citokrom-oksidadu. Medicinski najznačajnija bakterija unutar roda je *Pseudomonas aeruginosa*. Ime roda *Pseudomonas* potječe od grčkih riječi 'pseudo' – lažan i 'monas' – jedinka, dok vrstu opisuje riječ 'aeruginosa' koja na latinskom znači pun bakrene hrđe, odnosno zelen. *P. aeruginosa* može rasti i razmnožavati se u gotovo svim uvjetima, s preferencijom za vlažan okoliš, te posjeduje brojne čimbenike virulencije. Najčešće uzrokuje oportunističke infekcije kod imunokompromitiranih pacijenata. Ima sposobnost preživljavanja u različitim tekućinama kao što su dezinficijensi, kreme, sapuni, tekućine za ispiranje, otopine i oprema za dijalizu, te se može pronaći u ovlaživačima zraka, sanitarnim odvodima te umivaonicima i kadama. Jednostavno se može uzgajati na različitim hranjivim podlogama na kojima tvori glatke, okrugle kolonije (Kalenić i sur., 2013).

1.1.1. Čimbenici virulencije

Strukturni čimbenici virulencije su flagela, fimbrije i lipopolisaharid. Sekrecijski čimbenici virulencije su proteini tip I sekrecijskog sustava: piocijanin, pioverdin i alkalna proteaza; tip II: proteaze, elastaze, fosfolipaza C i egzotoksin A; tip III sekrecijskog sustava: različiti egzotoksini; signalne molekule acil-homoserin laktoni; i mukoidni egzopolisaharid. U teškim infekcijama koje prati sistemska toksičnost, glavni čimbenici virulencije su lipopolisaharid i egzotoksin A. Piokelin i vodotopljivi pigment pioverdin spadaju pod siderofore, kelatore željeza koji su nužni za uspostavu i održavanje infekcije. Tablica 1 prikazuje čimbenike virulencije *P. aeruginosa* (Kalenić i sur., 2013).

Tablica 1 Čimbenici virulencije *P. aeruginosa* (preuzeto i prilagođeno iz Kalenić i sur., 2013).

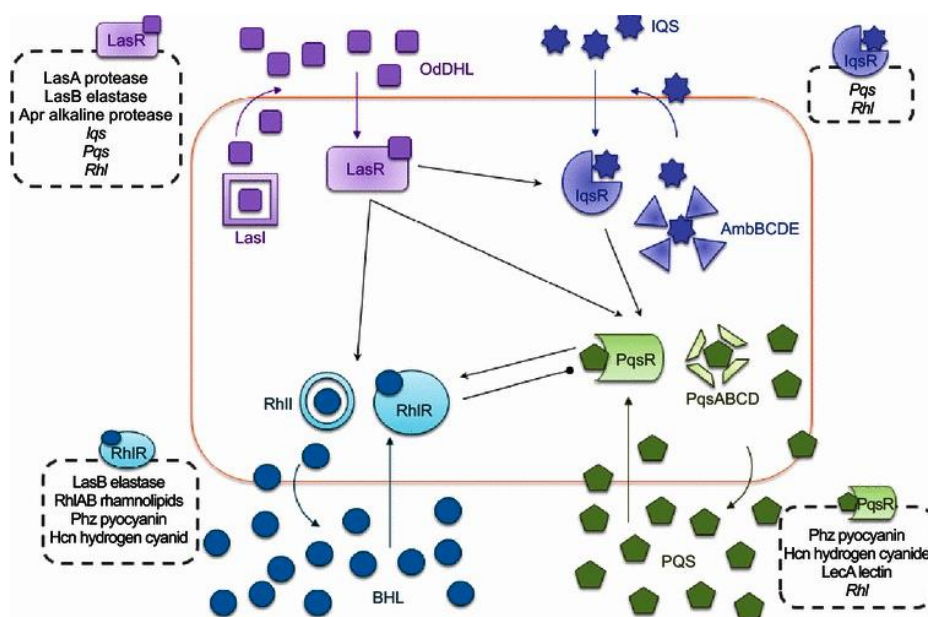
Strukturni čimbenici virulencije	Sekrecijski čimbenici virulencije	
Flagela	Tip I sekrecijskog sustava	Piocijanin
Pili (fimbrije)		Pioverdin
Lipopolisaharid		Alkalna fosfataza
	Tip II sekrecijskog sustava	Proteaze
		Elastaze
		Fosfolipaza C
		Egzotoksin A
	Tip III sekrecijskog sustava	Proteini: ExoS, ExoY, ExoT, Exo U
<i>Quorum sensing</i> signalne molekule		Acil-homoserin lakton
	Mukoidni egzopolisaharid (alginat)	

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

Bakterijska međustanična komunikacija ili engl. *quorum sensing* (QS) predstavlja sposobnost komunikacije između individualnih stanica pomoću specifičnih kemijskih signala. Individualne slobodne stanice se još nazivaju i planktonske stanice, a osim u obliku njih, mikroorganizmi mogu postojati i u obliku sesilne zajednice, tj. biofilma. Pomoću QS-a bakterije reguliraju mnoge biološke procese značajne za prilagodbu i preživljavanje. QS posreduje kolektivni odgovor ovisan o populaciji i stoga pogoduje preživljavanju zajednice. To se odvija na način da se proizvodi određena količina signalnih molekula, poznatih kao autoinduktori. Autoinduktori se proizvode ovisno u broju stanica, odnosno ovisno o gustoći populacije. Proizvodnja tih signalnih molekula rezultira regulacijom ekspresije gena. Više od 10% gena bakterije su regulirani putem QS-a, te su ti geni najčešće uključeni u proizvodnju faktora virulencije, pokretljivost bakterije, razvoj biofilma, antimikrobnu rezistenciju i prilagodbu metaboličkih puteva. *P. aeruginosa* ima opsežan metabolički kapacitet koji omogućuje stvaranje mnogih sekundarnih metabolita i polimera.

U *P. aeruginosa* postoje četiri glavna puta signalizacije ovisna o QS-u. Četiri glavna QS signalna puta su prikazani na slici 1. Oni čine hijerarhijsku mrežu čime se ostvaruje integracija više signala putem unakrsnog povezivanja između različitih QS signalnih puteva.

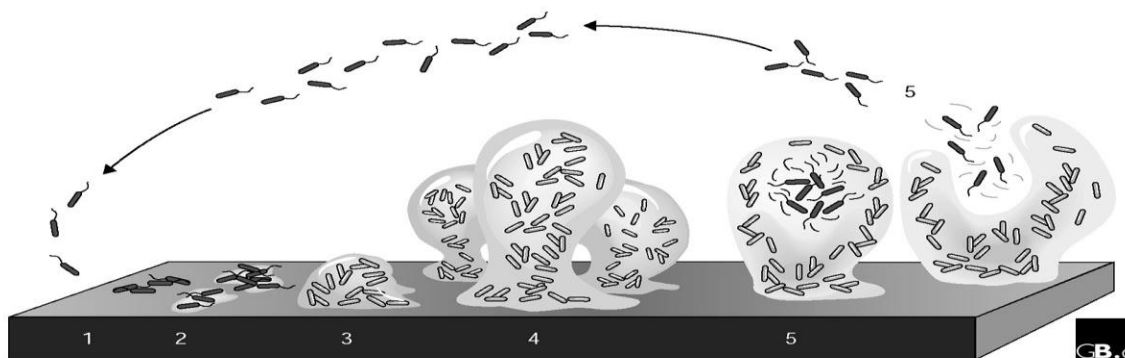
Do sada su poznata četiri signalna puta, skraćeno nazvani Las, Rhl, Pqs, and IQS. Sustavi Las i Rhl kao autoinduktore imaju acil-homoserin laktone, a sustav Pqs ima kinolon kao autoinduktor. Odgovarajući autoinduktori se sintetiziraju ovisno o vrsti stimulusa, a oni koji su prisutni u ova četiri sustava su HSL (3-okso-C12-homoserin lakton), BHL (N-butirilhomoserin lakton ili C4-HSL), PQS (2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon) i IQS (2-(2-hidrooksifenil)-tiazol-4-karbaldehide). Signalni put IQS je zadnje otkriven, te se o njemu zasad ne zna mnogo. Ostala tri signalna puta započinju tako da se proteini (LasR, RhlR, ili PqsR) aktiviraju kada osjete specifične autoinduktore i potom djeluju transkripcijski faktori i potiču sintezu proteina AI sintaze (LasI, RhlI, i PqsABCDH). U hijerarhiji ove signalne mreže LasR se nalazi na vrhu kaskade i zajedno s RhlR posreduje QS signalizaciju u ranim fazama tijekom eksponencijalnog rasta broja bakterijskih stanica, dok je signalni put PQS aktivan u kasnijoj fazi eksponencijalnog rasta. Proizvodnja AI ovisi o staničnoj gustoći pri kojoj se prelazi određeni prag, te nakon prelaska tog praga pojedinačne bakterijske stanice pokreću kolektivni odgovor. Primjerice, PQS signalni put u bakterijskoj infekciji značajno pridonosi stvaranju biofilma. Istraživanja su pokazala da mutacija PQS sustava rezultira smanjenim stvaranjem biofilma i smanjenom proizvodnjom faktora virulencije poput pirocijanina, elastaze, PA-IL lektina i ramnolipida. PQS sustav regulira otpuštanje izvanstanične DNA (eDNA) tijekom stvaranja biofilma te regulira i stvaranje membranskih vezikula. PQS sustav također utječe na razne metaboličke procese, kao što su keliranje željeza, homeostaza redoks uvjeta, te proizvodnja proteina, poput elastaze i ramnolipida. (Moradali i sur., 2017; Lee i Zhang, 2015)



Slika 1. Shematski prikaz četiri QS signalna sustava (preuzeto iz Lee i Zhang, 2015).

1.1.3. Biofilm

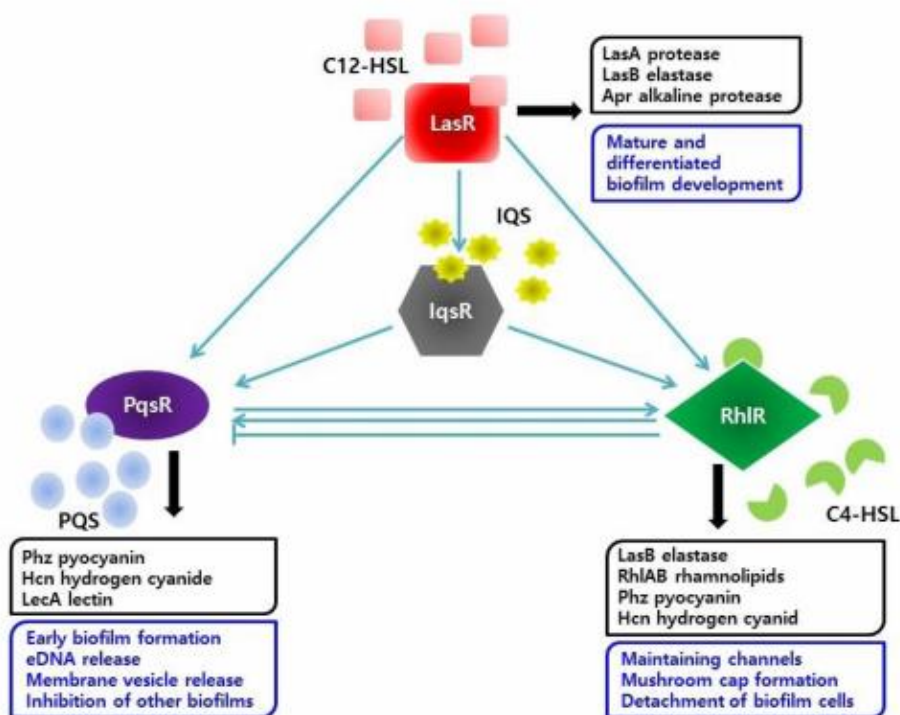
Termin 'biofilm' se koristi još od 1975. godine i definira sesilnu zajednicu mikroorganizama koji se nalaze na biotičkoj ili abiotičkoj površini, te su okruženi izvanstaničnim matriksom (engl. *extracellular matrix*, ECM). Matriks koji okružuje pojedinačne bakterijske stanice pridonosi preko 90% mase ukupnog biofilma. Matriks zapravo stvara utočište pogodno za intenzivnu interakciju između stanica i rezervoar metaboličkih i hranjivih tvari, te zalihe energije za promicanje rasta, s time da istovremeno štiti stanice od nepovoljnih okolišnih uvjeta. Matriks je primarno sastavljen od izvanstaničnih polimernih tvari (engl. *extracellular polymeric substances*, EPS), to su primarno polisaharidi, proteini, izvanstanična DNA (engl. *extracellular DNA*, eDNA) i lipidi. Razlikuje se šest razvojnih stadija bakterije *P. aeruginosa* i njenog biofilma (Slika 2). To su 1) pričvršćivanje bakterija na površinu, 2) proizvodnja ECM-a, 3) sazrijevanje biofilmskih struktura, 4) prostorna diferencijacija biofilma i 5) disperzija biofilma.



Slika 2. Stadiji nastanka biofilma (preuzeto iz Sauer, 2003.)

Nakon što se bakterije pričvrste na površine prolaze niz promjena kako bi se prilagodile novom načinu života. *P. aeruginosa* pričvršćen na površinu raste i formira mikrokolonije, te nakon nekog vremena počinje proizvoditi ECM te izgrađuje strukture i kanale. Kako biofilm sazrijeva, bakterije postaju mnogo otpornije na podražaje iz okoline, ali postaju otpornije i na djelovanje antibiotika. Kao što je ranije navedeno, ECM biofilma obično se sastoji od EPS-a, eDNA i proteina. Uloga tih komponenti ECM-a je da djeluju kao matriks, adhezivni materijal među bakterijama i zaštitna barijera. Postoje tri identificirana EPS-a: Psl, Pel i alginat. Psl, Pel i alginat spadaju u skupinu egzopolisaharida, te su ključne polimerne sastavnice biofilma. Uz egzopolisaharide, proteini kao što su pili tipa IV, fimbriji Cup, adhezivi CdrA, lektini LecAB i amiloidna vlakna Fap mogu biti dio matriksa biofilma *P. aeruginosa*. Ramnolipidi i piocijanin su također značajni u tvorbi biofilma, te je njihova proizvodnja ovisna o QS-u. Ramnolipidi spadaju pod faktore virulencije, te su im neka od

virulentnih svojstva citotoksičnost, inhibicija mukocilijarnog transporta i inhibicija cilijarne funkcije respiratornog epitela, ali su i važni u biofilmu gdje održavaju njegovu arhitekturu i omogućavaju bakterijsku pokretljivost. Arhitekturu biofilma održavaju tako da stvaraju šupljine kojima se osigurava protok vode i nutrijenata kroz matriks. Pilocijanin također spada pod faktore virulencije, ali i potiče otpuštanje eDNA, još jednu značajnu komponentu ECM-a. Zasad se ne zna mnogo o proizvodnji eDNA u biofilmu bakterija. Trenutno postoji nekoliko pretpostavka da eDNA može nastati putem aktivne sekrecije iz bakterije, nakon autolize bakterija ili se oslobađa iz malih membranskih vezikula. Razvoj i sazrijevanje biofilma je usko povezano s QS-om. Proizvodnja ključnih komponenti matriksa, alginata, polisaharida, eDNA i pilocijanina kontrolirana je direktno putem *quorum sensing* signalnog sustava. Slika 3 objašnjava ključnu ulogu triju ranije opisanih signalnih sustava u stvaranju i razvoju biofilma (Moradali i sur., 2017; Lee i Yoon, 2017).



Slika 3. Uloga QS signalnih sustava Las, Pqs i Rhl u stvaranju i razvoju biofilma bakterije *P. aeruginosa* (preuzeto iz Lee i Yoon, 2017).

1.1.4. Klinički značaj

Osim što je medicinski najznačajnija unutar svog roda, *P. aeruginosa* je također i jedan od najznačajnijih uzročnika bolničkih infekcija. Infekcije koje uzrokuje su učestalije kod hospitaliziranih i imunokompromitiranih bolesnika starije životne dobi, a te infekcije su: bakterijemije i sepse, infekcije dišnog sustava, infekcije oka, uha, kože i mekih tkiva te infekcije kostiju, zglobova i mokraćnog sustava. Poseban značaj infekcije *P. aeruginosa* je u tome što je ona glavni uzročnik morbiditeta i mortaliteta kod pacijenata s cističnom fibrozom. Formiranje mukoznog biofilma *P. aeruginosa* je znak kroničnih infekcija i pokazatelj progresije bolesti, te otpornosti na liječenje. Upravo zato, *P. aeruginosa*, i to u stadiju biofilma, dominira među mikrobnim zajednicama prisutnim u plućima bolesnika s cističnom fibrozom. Ostale infekcije povezane s biofilmom *P. aeruginosa* uključuju kroničnu infekciju rana, kronični otitis, kronični rinosinusitis, infekcije mokraćnog sustava povezane s kateterom i keratitis povezan s kontaktnim lećama. Pokazalo se da su tek formirani biofilmovi podložniji djelovanju antibiotika u odnosu na već razvijene biofilme. To ukazuje na izrazitu potrebu ranih intervencija i liječenja biofilmskih infekcija.

Također, uz to što je glavni nozokomijalni patogen, ova bakterija je rezistentna na široki spektar antibiotika. To znači da bolesnici razvijaju daljnje komplikacije i sekundarne gljivične infekcije, produžava im se boravak u bolnici, a u nekim slučajevima dolazi i do prerane smrti, pogotovo onih oboljelih od cistične fibroze.

S obzirom na sve navedeno, nije iznenađujuće da su kohortna istraživanja pokazala da liječenje infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa* predstavlja najveći teret među zdravstvenostečenim infekcijama u jedinicama intenzivne njege u Europi (Kalenić i sur., 2013; Moradali i sur., 2017; Ciofu i Tolkien-Nielsen, 2019).

1.1.5. Antimikrobna rezistencija i liječenje

Infekcije uzrokovane *P. aeruginosa* sve je teže liječiti zbog intrinzične antimikrobne rezistencije koju ova bakterija posjeduje. U cijelom svijetu je antimikrobna rezistencija u porastu, a sojevi *P. aeruginosa* su zabilježili rezistenciju na aminoglikozide, cefalosporine, fluorokinolone i karbapeneme. S obzirom na to da bakterija posjeduje mnoge molekularne mehanizme kojima ostvaruje rezistenciju na širok spektar antibiotika, sve je manje učinkovitih terapijskih opcija (Moradali i sur., 2017).

Termin antimikrobna rezistencija može se primijeniti i na bakteriju u planktonskom obliku i u obliku biofilma. Antimikrobna rezistencija se javlja zbog stečenih mutacija koje

najčešće utječu na mete antibiotika, efluks pumpe ili enzime koji moduliraju djelovanje antibiotika. Sve navedeno omogućava bakteriji da preživi tretman antibioticima, bez obzira nalazi li se u obliku biofilma. S druge strane, termin antimikrobna tolerancija označava mogućnost bakterije da preživi visoke koncentracije antibiotika samo ako se nalaze u obliku biofilma. To znači da bakterija koja se nalazi u obliku biofilma može razviti antimikrobnu rezistenciju, ali i antimikrobnu toleranciju. Tolerancija na antibiotike je posljedica mnogih fizičkih, fizioloških i genetičkih faktora, dok je antimikrobna rezistencija primarno vođena mutacijama gena. Rezistencija se najčešće javlja kada je bakterija opetovano izložena učinku antibiotika.

Kada se usporedi s genomom ostalih prokariota, genom *P. aeruginosa* je relativno velik, a izrazito velik broj gena su regulatorni geni. Upravo regulatorni geni omogućuju bakteriji prilagođavanje na različite okolišne uvjete i time su direktno povezani s antimikrobnom rezistencijom. Prijelaz iz planktonskog oblika u stanje biofilma također prati promjena ekspresije gena i povećan lateralni transfer gena. Ovakve promjene također doprinose antimikrobnoj rezistenciji (Lee i Yoon, 2017).

Posjedovanje mnogih regulatornih gena, mogućnost transfera gena, te prelazak u stadij biofilma stvara pogodne uvjete i za razvoj tzv. višestruko rezistentnih sojeva. Višestruko rezistentni sojevi nastaju kombinacijom različitih mehanizama rezistencije te je za njih karakteristično da su otporni na barem jedan lijek iz tri ili više skupina antimikrobnih lijekova (Ciofu i Tolkien-Nielsen, 2019).

Upravo je zbog nastanka biofilma potrebna pravovremena terapija, u odgovarajućem režimu doziranja, kako bi se liječile infekcije uzrokovane s *P. aeruginosa*. Antimikrobni lijekovi koji se danas koriste su: penicilini – piperacilin i karbenicilin; cefalosporini III. i IV. generacije - ceftazidim, cefoperazon i cefepim; karbapenemi - imipenem, meropenem i doripenem; monobaktam - aztreonam i fluorokinoloni - ciprofloksacin, norfloksacin i levofloksacin. U liječenju ozbiljnih infekcija koriste se aminoglikozidi - gentamicin, netilmicin i tobramicin, međutim oni se koriste kao dio kombinirane terapije. Pojavom višestruko rezistentnih sojeva u upotrebu je vraćen i kolistin (polimiksin E) kao zadnji izbor (Gužvinec i sur., 2012).

1.1.5. Mehanizmi rezistencije i tolerancije biofilma na antibiotike

Mehanizmi rezistencije koje *P. aeruginosa* posjeduje mogu biti intrinzični ili stečeni. Intrinzični su oni koji potječu od gena u bakterijskom genomu, dok stečeni mehanizmi rezistencije nastaju kao rezultat mutacija bakterijskih gena ili su dobiveni preko plazmida od drugih bakterija. Suprotno intrinzičnim mehanizmima, stečena rezistencija se javlja jedino u prisutnosti antibiotika. Bez obzira jesu li intrinzični ili stečeni, *P. aeruginosa* općenito posjeduje brojne mehanizme rezistencije na antipseudomonasne antibiotike, uključujući: 1) smanjenu propusnost vanjske membrane; 2) postojanje efluks pumpi; 3) promjenu ciljnog mjesta djelovanja antibiotika; 4) inaktivaciju antibiotika mikrobnim enzimima. S druge strane, bakterije unutar biofilma su od 10 do 1000 puta otpornije na djelovanje antimikrobnih lijekova u odnosu na planktonske stanice.

Mehanizmi mikrobne rezistencije i tolerancije biofilma kod *P. aeruginosa* su sljedeći:

1) Onemogućeno prodiranje antibiotika kroz izvanstanični matriks biofilma

Kako bi antibiotik uspio djelovati on mora doći do svoje mete, a ona je najčešće unutar same bakterijske stanice. Kod planktonskih stanica, antibiotik mora prijeći samo staničnu stijenku i membranu. Međutim kod stadija biofilma, antibiotik mora prijeći izvanstanični matriks kako bi došao do svoje mete – bakterijske stanice. Pritom je onemogućeno djelovanje prodiranje antibiotika jer se veže na sastavne komponente matriksa ili na strukture koje se nalaze na polisaharidnoj kapsuli. Dodatan problem predstavlja stvaranje agregata bakterijskih stanica, koje karakterizira prekomjerno lučenje EPS-a. Takvo prekomjerno lučenje polimera kao što su alginat, Pel i Psl je posljedica mutacija, te je nađeno u *mucA*, *wspF* i *yfiR* mutantima.

2) Smanjenje metaboličke aktivnosti

Bakterije unutar biofilma su heterogene, te se razlikuju određene subpopulacije ovisno o njihovoj metaboličkoj aktivnosti. Metabolička aktivnost bakterijskih stanica podrazumijeva iskorištavanje kisika i nutrijenata iz okoliša, te stoga ovisi i o njihovoj dostupnosti. Stanice koje se nalaze na periferiji biofilma su metabolički aktivnije u odnosu na one koje se nalaze u njegovoj unutrašnjosti. Kako su mete mnogih antibiotika povezane upravo s metaboličkom aktivnosti kod bakterija (primjerice aminoglikozidi i sinteza proteina), tako su mikrobna tolerancija i rezistencija direktne posljedice smanjenje metaboličke aktivnosti.

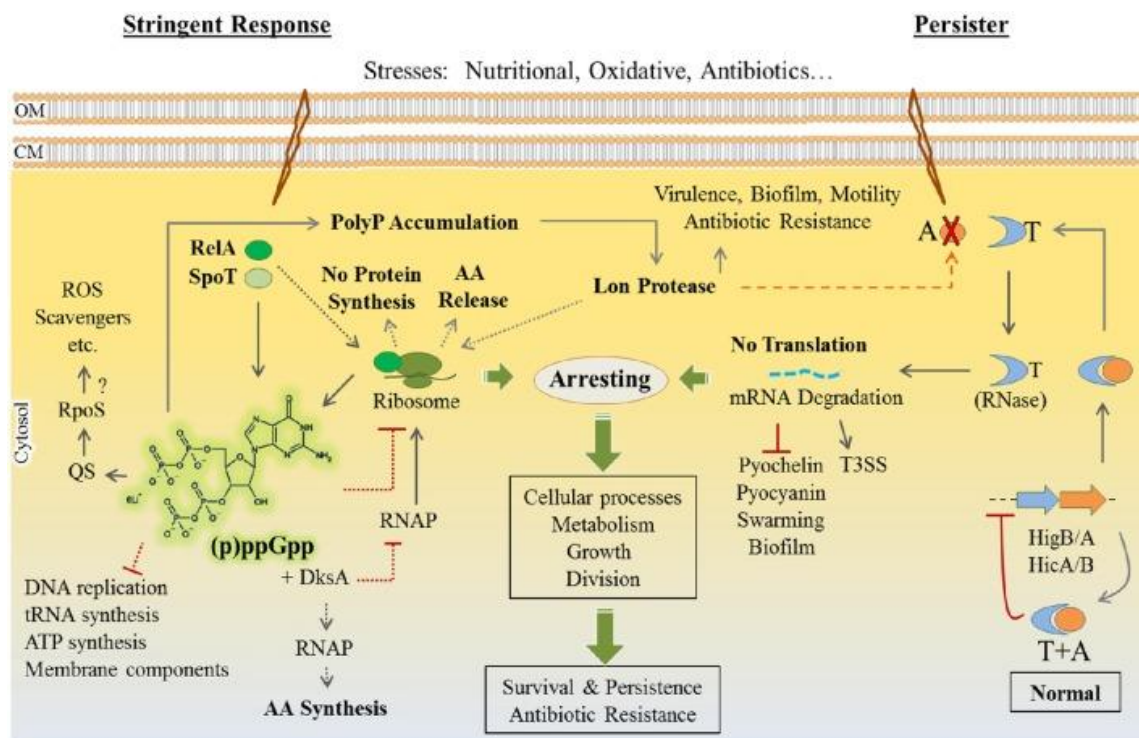
Kao posljedica smanjene metaboličke aktivnosti i smanjene dostupnosti nutrijentima i željezu kod bakterija se pokreću SOS i tzv. strogi (engl. *stringent*) odgovor. SOS odgovor

također može pokrenuti i oksidativni stres, te je za njega karakteristična indukcija ekspresije određenih gena. Ti geni poboljšavaju antioksidativni učinak unutar bakterijske stanice, a upravo je bitan baktericidni efekt mnogih antibiotika povezan sa stvaranjem reaktivnih kisikovih vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS).

Kao što je ranije spomenuto, smanjenje metaboličke aktivnosti je posljedica i smanjene dostupnosti kisika te u takvim izrazitim situacijama može značiti i prelazak *P. aeruginosa* na anaeroban način rada. To se događa duboko u biofilmu te može utjecati na djelovanje betalaktamskih antibiotika, ali i na djelovanje fluorokinolona i aminoglikozida.

3) Stvaranje perzistentnih stanica

Perzistentne stanice su u biofilmu prisutne u izrazito malenom postotku, svega 0,01%, te ih karakterizira spora dioba ili odsustvo diobe. Imaju izrazito reducirani metabolizam i staničnu aktivnost, što uključuje procese poput replikacije, translacije ili sinteze komponenti stanične stijenke. Zbog toga su manje podložne djelovanju antimikrobne terapije, te se čak mogu nakon prestanka antibiotskog tretmana vratiti u vegetativno stanje i ponovno uspostaviti infekciju. Pretpostavlja se da su perzistentne stanice nastale tako što bakterija ulazi u tzv. dormantni stadij. Otkriven je velik broj gena, primjerice: *rpoS*, *spoT*, *relA*, *dksA*, *dinG*, *spuC*, *algR*, *pilH*, *ycgM* i *pheA* koji su uključeni u stvaranje stanica perzistera. Slika 4 prikazuje stvaranje perzistentnih stanica.



Slika 4. Stvaranje perzistentnih stanica (preuzeto iz Moradali i sur., 2012).

4) Ekspresija gena specifičnih za biofilm

Postoje geni koji se eksprimiraju posebno u stadiju biofilma i stoga posreduju rezistenciju i toleranciju biofilma na antibiotike. Jedan od takvih gena je gen za transkripcijski aktivator BrlR (engl. *biofilm resistance locus regulator*). Istraživanja ukazuju na to da je BrlR transkripcijski aktivator koji utječe na ekspresiju gena koji kodiraju proteine za efluks pumpe mexAB-oprM i mexEF-oprN. Efluks pumpe imaju mogućnost izbacivanja antibiotika iz bakterijske stanice, a za to se koriste energijom iz ATP-a. Različiti oblici okolišnog stresa mogu inducirati različite efluks pumpe, primjerice MexXY-OprM se inducira oksidativnim stresom, MexEF-OprN nitrozativnim stres, te se MexCD-OprJ inducira nakon oštećenja membrane. Nadalje, pokazano je da BrlR aktivira i ekspresiju ABC transportera, pri čemu ABC transporter izravno doprinosi toleranciji biofilma na antibiotike. BrlR utječe i na ekspresiju gena koji kodiraju modifikaciju lipopolisaharida i sastav membranskih proteina, kao i na metabolizam i stvaranje energije unutar bakterijskih stanica prisutnih u biofilmu. Svi navedeni mehanizmi posreduju u nastanku antimikrobne rezistencije i tolerancije biofilma.

5) Quorum sensing

Kao što je ranije opisano, QS je usko povezan s razvojem i sazrijevanjem biofilma. Mnoge komponente matriksa biofilma, kao što su alginat, Psl i eDNA imaju protektivni učinak spram biofilma jer otežavaju penetraciju antibiotika do bakterija. Istraživanja su pokazala da mutantni s poremećenim QS signalnim sustavom imaju tanji biofilm i smanjenu proizvodnju komponenata matriksa, čime su podložniji djelovanju antibiotika. Međutim konkretna poveznica između antimikrobne rezistencije i QS-a još uvijek nije otkrivena.

Svi navedeni mehanizmi antimikrobne rezistencije i tolerancije biofilma bakterijske vrste *P. aeruginosa* su od izrazitog kliničkog značaja. Osim što je zbog njih *P. aeruginosa* postala izraziti terapijski izazov, ti isti mehanizmi su također i potencijalne mete novih antipseudomonasnih antibiotika. Međutim, kako bi se razvila učinkovita antibiofilm terapija, bit će potrebno još istraživanja i detaljnije razumijevanje molekularnih mehanizama razvoja antimikrobne rezistencije (Ciofu i Tolken-Nielsen, 2019).

1.2. Eterična ulja

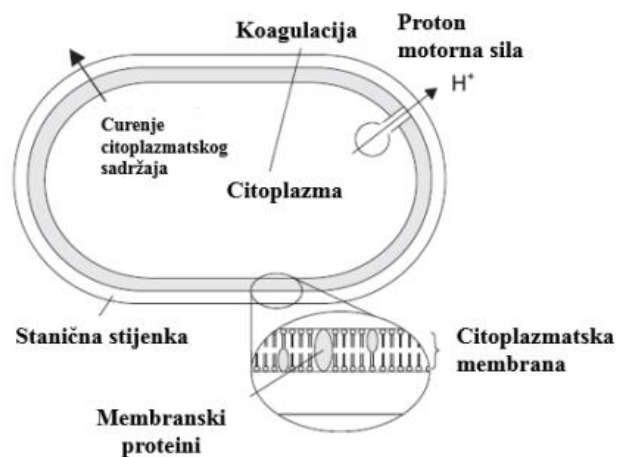
Eterična ulja su hlapljive i aromatične tekućine koje se sintetiziraju i pohranjuju u specifičnim dijelovima biljaka. Postupak sinteze prati kompleksan metabolizam koji se razlikuje među pojedinim biljnim vrstama, ali i među pojedinim biljnim organima. Uloga eteričnih ulja je zaštititi biljku od različitih insekata, stvoriti neugodan okus biljke za biljoždere ili smanjiti apetit biljožderima. Eterična ulja imaju mnoga značajna djelovanja, među kojima su antiseptičko, antibakterijsko, virustatsko, antioksidativno, antiparazitično, antimikotično i insekticidno djelovanje. Sintetiziraju se u svim biljnim organima – pupoljcima, cvjetovima, lišću, stabljici, sjemenkama, plodu, korijenu pa čak i u drvetu ili kori. Karakteristike eteričnih ulja su da imaju gustoću veću od vode, hlapljive su i lipidne tekućine, rijetko obojene, s mirisom i topljive u organskim otapalima. Kako eterična ulja nastaju unutar živog organizma kroz kompleksnu kaskadu reakcija, njihov sastav je također kompleksan. Uobičajeno su sastavljena od 20 do 60 komponenti, s time da su dvije ili tri komponente prisutne u visokom postotku (20-70%), dok su ostale komponente prisutne u tragovima. Količina i sastav eteričnog ulja se razlikuje ovisno o biljnoj vrsti i biljnom organu u kojem nastaju.

Ako promotrimo kemijsku strukturu komponenata eteričnih ulja, vidimo da ih možemo podijeliti u dvije skupine: terpenoide i fenilpropanske derivate. Uglavnom se radi o mješavini terpenoida. Terpenoidi se razlikuju ovisno o broju ugljikovih atoma, dijele se na monoterpeni ($C_{10}H_{16}$), seskviterpeni ($C_{15}H_{24}$), diterpeni ($C_{20}H_{32}$), triterpeni ($C_{30}H_{40}$) itd. Monoterpeni i seskviterpeni su najčešći terpeni, ali se uz njih u sastavu eteričnog ulja često nalaze broje komponente male molekulske mase kao što su kiseline, alkoholi, aldehidi ili laktoni. Neki primjeri komponenata su limonen, mentol, eugenol, estragol, geraniol, timol, γ -terpinen i pulegon. Ove nabrojane komponente se također ističu zbog svog antimikrobnog djelovanja (Burt, 2004; Chouhan, 2017; Macwan i sur., 2016).

1.2.1. Antibakterijski i antibiofilm učinak eteričnih ulja

Kao što je ranije spomenuto, eterična ulja mogu ispoljavati antimikrobno djelovanje. Upravo zato često pronalaze primjenu u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Samo antimikrobno djelovanje ovisi o vrsti eteričnog ulja, ali i podložnosti bakterije. Kako su eterična ulja sastavljena od brojnih komponenata pretpostavlja se da je

njihovo antimikrobno djelovanje posljedica reakcija na nekoliko različitih meta unutar stanice mikroorganizma. Zbog takve raznovrsnosti djelovanja eterična ulja su snažan alat s kojim se možemo boriti u suzbijanju postojeće i razvoja buduće antimikrobne rezistencije. Mehanizam antimikrobnog djelovanja eteričnih ulja uključuje degradaciju stanične stijenke bakterije, stvaranje štete na citoplazmatskoj membrani i uništenje membranskih proteina, koagulaciju citoplazmatskih proteina, te mogu povećati permeabilnost što posljedično uzrokuje curenje staničnog sadržaja i staničnu lizu. Također mogu smanjiti protonsku silu i količinu unutarstaničnog ATP-a (Slika 5).



Slika 5. Mehanizmi djelovanja i ciljna mjesta antibakterijskog djelovanja eteričnih ulja (preuzeto i prilagođeno iz Burt, 2004).

Hidrofobnost, kao značajna karakteristika eteričnih ulja, omogućava uljima da pregrade lipidni dvosloj koji izgrađuje membranu bakterije. To rezultira povećanjem permeabilnosti membrane i staničnom smrti mikroorganizma zbog curenja važnih iona i makromolekula iz citosola u izvanstanični prostor. S obzirom na to da je stanična stijenka Gram-negativnih bakterija kompleksnije građe s lipopolisaharidnim slojem, Gram-negativne bakterije su otpornije na djelovanje antibiotika u odnosu na Gram-pozitivne bakterije. Prema određenim istraživanjima komponente prisutne u eteričnim uljima možemo podijeliti na temelju vremena potrebnog da iskažu antimikrobno djelovanje. Dije se u dvije skupine, brzodjelujuće – karvakrol, cinamalaldehid i geraniol, njihovo djelovanje nastupa kroz 5 minuta, te sporodjelujuće – njihovo djelovanje nastupa kroz 30 do 60 minuta. (Burt, 2004; Chouhan, 2017; Macwan i sur., 2016)

U zadnje vrijeme provode se istraživanja koja pokušavaju dokazati učinkovitost eteričnih ulja na stvaranje i rast biofilma. Kao što znamo, stvaranje biofilma je regulirano putem QS-a, te je prisutno u Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Određena

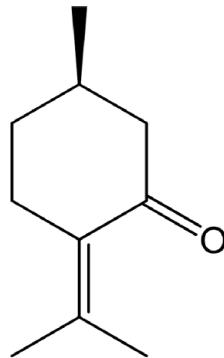
eterična ulja inhibiraju QS, te se pretpostavlja da na taj način ostvaraju antibiofilm učinak. Valja naglasiti da kako bi eterična ulja imala učinak na biofilm moraju imati sposobnost prodora u izvanstanični matriks koji okružuje bakterije u biofilmu. Jedan takav primjer je karvakrol, za koji se pretpostavlja da interferira s autoinduktorima koji služe kao signalne molekule između bakterija, te na taj način utječe na stvaranje biofilma. Istraživanje je također pokazalo da je karvakrol uspio suzbiti stvaranje biofilma preko ometanja QS-a i u subinhibitornim koncentracijama. Antibiofilm djelovanje karvakrola je ispitivano na bakterijama *Chromobacterium violaceum*, *Salmonella typhimurium* i *Staphylococcus aureus* (Burt i sur., 2014). Svoju antibiofilm aktivnost su također dokazala eterična ulja lavande, čajevca i matičnjaka na vrstama *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, dok je eterično ulje vrste *Boswellia* pokazalo djelovanje na biofilm koji su napravile bakterije vrste *Staphylococcus* (Mukherji i Prabhune, 2014). Metanolni ekstrakti eteričnog ulja vrste *Cuminum cyminum* su smanjili pokretljivost bakterija te inhibirali QS, proizvodnju EPS-a i samog biofilma kod vrsta *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* i *Serratia marcescens*. Eterično ulje vrste *Cinnamomum cassia* je također utjecalo na pokretljivost i adheziju bakterija, te je utjecalo na formiranje biofilma kod vrste *E. coli* (Borges i sur., 2013).

1.2.2. Pulegon

Pulegon ((R)-5-metil-2-(1-metiletilidin) cikloheksanon) je oksigenirani ciklički monoterpenski keton. Kemijska struktura pulegona je prikazana na slici 6. Nalazi se kao glavna komponenta u eteričnim uljima vrsti *Mentha suaveolens*, *M. piperita*, *M. pulegium*, *Micromeria thymifolia*, *Calaminta nepeta*, *Nepeta cataria* i mnogim drugim biljnim vrstama iz porodice Lamiaceae. Zajedno s karvonom i piperitonom spada pod optički aktivne cikloheksane. Komercijalno se koristi kao korigens okusa u pastama za zube, vodici za ispiranje usne šupljine, te se koristi i u aromaterapiji (Oumzil i sur., 2002; Dhingra i sur., 2011).

Pulegon je prvo izoliran iz eteričnog ulja biljne vrste *Mentha pulegium* L., po kojoj je i dobio ime. Svojstva pulegona su da je praktički netopljiv u vodi, ali se miješa s etanolom, dietil eterom i kloroformom. Kiralni je spoj s dva prirodna enantiomera, od kojih je R(+) češći. Zbog svog povoljno toksikološkog profila, pulegon ima status GRAS (*engl.* Generally Recognized as Safe) te ima odobrenje od strane američke FDA (Food and Drug Administration) i Vijeća Europe da se može koristiti u prehrambenoj industriji. Pulegon ima različita djelovanja, među kojima se najviše ističu animikrobno, antihistaminsko,

antipiretsko, hepatotoksično i hiperkolesterolemično djelovanje te djelovanje na konvulzije. Također je zabilježena inhibicija citokroma P450, kao i inhibicija lizosomalnih enzima (Božović i Ragno, 2017).



Slika 6. Kemijska struktura puleogona (preuzeto iz Božović i Ragno, 2017).

1.2.3. Eterično ulje vrste *Calamintha officinalis* Moench.

Calamintha officinalis Moench. iz porodice Lamiaceae je višegodišnja biljka koja raste u suhim i pješčanim zemljama srednje i južne Europe te sjeverne Afrike i zapadne Azije. Kao što joj i samo ime kaže, *C. officinalis* je vrlo slična ostalim 'mentama', po morfologiji i mirisnim karakteristikama. Neki od njezinih narodnih naziva su divlji bosiljak, gorska ili planinska menta, te jednostavno kalaminta (prevedeno s engleskog *calamint*). Kalaminta je uspravna, grmolika biljka s četvrtastim stabljikama, koja ima izmjeničan raspored listova (dva lista u koljencu, jedan nasuprot drugome). Listovi su poput stabljika prekriveni mekim dlačicama. Cvjeta u srpnju i kolovozu, a sami cvjetovi su pomalo neprimjetni s vijencima svijetlo ljubičaste boje (Slika 7).

Ova aromatična biljka se od davnina koristi zbog svog eteričnog ulja, koje posjeduje antimikrobna, konzervativna i ljekovita svojstva. Također ima antiseptična svojstva, pa se koristi kod uboda insekata i ubrzava zacjeljivanje rana jer djeluje kao cikatrizant. Zbog aromatičnosti eteričnog ulja, također se koristi kao korigens okusa u pastama za zube. Istraživanja su također pokazala da eterično ulje kalaminte kod glodavaca sudjeluje u inhibiciji središnjeg živčanog sustava droga, te pojačava hipnotičke učinke natrijevog pentobarbitala. Ove karakteristike također govore da bi se eterično ulje kalaminte moglo koristiti i u liječenju konvulzija. U narodu je poznat i učinak na gastrointestinalni trakt, što po farmakološkom djelovanju odgovara i ostalim biljkama iz porodice Lamiaceae. U literaturi je zabilježen antiemetički učinak, te povoljan učinak na želučane kolike i nadutost.

Literaturni podaci o sastavu eteričnog ulja vrste *C. officinalis* su vrlo oskudni. U jednom istraživanju utvrđen je sljedeći sastav eteričnog ulja - glavna komponenta je karvon (38,7%), zatim neo-dihidrokarveol (9,9%), dihidrokarveol acetat (7,6%), dihidrokarveol (6,9%), 1,8 cineol (6,4%), cis-karvil acetat (6,1%) i pulegon (4,1%). U tom je radu također dokazana i antimikrobna aktivnost eteričnog ulja kalaminte u testu difuzije diska. Tom je metodom utvrđena antimikrobna aktivnost kod vrsta *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Candida albicans* i *Aspergillus niger*. Oni su koristili biljku koja raste u Egiptu (Monforte i sur., 2011). U drugom istraživanju su odredili sljedeći sastav kalaminte: trans-kariofilen (8,55%), izomentol (2,98%), tetrahidrolinalil acetat (2,96%) i pinen (2,24%), pritom su imali biljku uzgojenu u Iranu. U drugom dijelu tog istog istraživanja otkriveno je da ekstrakt biljke sadrži značajnu moć neutraliziranja superoksidnih radikala (Moattar i sur., 2018). Istraživači koji su određivali sastav *C. officinalis* sakupljene u Maroku su utvrdili da sadrži kao glavnu komponentu 1,8-cineol (36,6%), a slijede ga pulegon (17,9%) i limonen (9,2%) (Monforte i sur., 2011). Za razliku od ranije navedenih radova i kalaminti koje su uzgajane u Africi i Aziji, istraživanje iz Rumunjske je pokazalo da je kalaminta uzgajana u Insitutu za istraživanje Bacău imala pulegon (48,75%) i *p*-menton (28,29%) kao glavne komponente (Burzo i sur., 2006). Ove varijacije sastava eteričnog ulja su posljedica mnogih različitih čimbenika. Sastav eteričnog ulja ovisi o geografskom podrijetlu i vremenu berbe biljnog materijala. Također utječu i čimbenici okoliša, poput temperature, količine sunčeve svjetlosti i relativne vlage. Ti čimbenici izravno utječu na lišće ove biljne vrste jer posjeduje epidermalne strukture poput žljezdanih trihoma, koje su direktno izložene uvjetima okoliša.



Slika 7. *Calamintha officinalis* Moench. (preuzeto iz Singh i sur., 2012).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Mikroorganizmi poput *P. aeruginosa* stvaraju biofilm, te tako razvijaju zaštitne mehanizme koji doprinose antimikrobnoj rezistenciji. *P. aeruginosa* je oportunistički patogen, te je jedan od najčešćih uzročnika nozokomijalnih infekcija. S obzirom na njihovu ulogu u patogenezi i infekciji, biofilmovi su postali meta za razvoj antimikrobnih lijekova. Sprječavanje nastanka biofilma, inhibicija njegovog daljnjeg rasta, kao i njegova eradikacija su sposobnosti koje bi antibiofilm terapija trebala posjedovati. Detaljno razumijevanje mehanizama koji sudjeluju u nastanku i rastu biofilma, ali i onih mehanizama koji sudjeluju u nastanku antimikrobnoj rezistenciji, će nam u konačnici omogućiti da razvijemo učinkovite tretmane.

Mnogi istraživači se sve više okreću ispitivanju ljekovitih svojstva biljaka, koja dobila su od velikog interesa zbog svoje male toksičnosti, farmakoloških aktivnosti, ekonomske održivosti, ali i već spomenute antimikrobne rezistencije na trenutno postojeće antibiotike. Eterična ulja posjeduju komponente različitih bioaktivnosti od čega je najznačajniji njihov antimikrobni potencijal. U mnogim je istraživanjima zabilježeno da esencijalna ulja posjeduju značajno antiseptičko, antibakterijsko, antivirusno, antioksidativno, antiparazitsko, antimikotsko i insekticidno djelovanje (Chouhan i sur., 2017). Uz to se sve više povećava broj ispitivanja antibiofilm djelovanja eteričnih ulja. (Burt SA i sur., 2014).

Svrha ovog rada je ispitati djelovanje pulegona i eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis* Moench. na stvaranje biofilma, te njihovo djelovanje u kombinaciji sa tobramicinom na već formirani biofilm. Djelovanje pulegona i eteričnog ulja ispitivat će se subinhibitornim koncentracijama, te bi dokazivanje njihovog učinka moglo pridonijeti istraživanjima terapija za infekcije uzrokovane *P. aeruginosa*.

Specifični **ciljevi** ovog rada su sljedeći:

- 1) Odrediti minimalne inhibitorne koncentracije eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis* Moench. i pulegona za bakteriju *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 modificiranom metodom dvostruke serijske mikrodilucije;
- 2) Ispitati učinak eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis* Moench. i pulegona na tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa* soja ATCC 27853;
- 3) Ispitati učinak eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis* Moench i pulegona 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 KH_2PO_4 (Sigma)
- kristal violet (Kemika)
- ledena octena kiselina, CH_3COOH (Kemika)
- magnezijev sulfat, 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 *Calamintha officinalis* Moench.
- pulegon (Extrasynthese, Genay, France)

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 kvašćev ekstrakt, 10 g/L NaCl; konačni pH=7,0 ± 0,2 (Liofilchem)
 - M63 + 0,4% arginin: 2 g/L (NH₄)₂SO₄, 13,6 g/L KH₂PO₄, 0,5 mg/L FeSO₄ x 7H₂O, 0,2% glukoza, 1 mM MgSO₄, 0,4% arginin

3.2. Metode

3.2.1. Priprava otopina eteričnog ulja kalaminte i pulegona

Ispitivan je učinak na rast i tvorbu biofilma pulegona, koji je komercijalno pribavljen, te eteričnog ulja biljne vrste *Calamintha officinalis* (dalje u tekstu kao eterično ulje kalaminte) dobivenog destilacijom vodenom parom korištenjem Clevenger aparature (dobiveno ljubaznošću prof. dr. sc. Sande Vladimir Knežević). 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 DMSO do konačne koncentracije 100 mg/mL. Potom su pripravljene radne otopine razrjeđivane do potrebnih ispitivanih koncentracija.

3.2.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

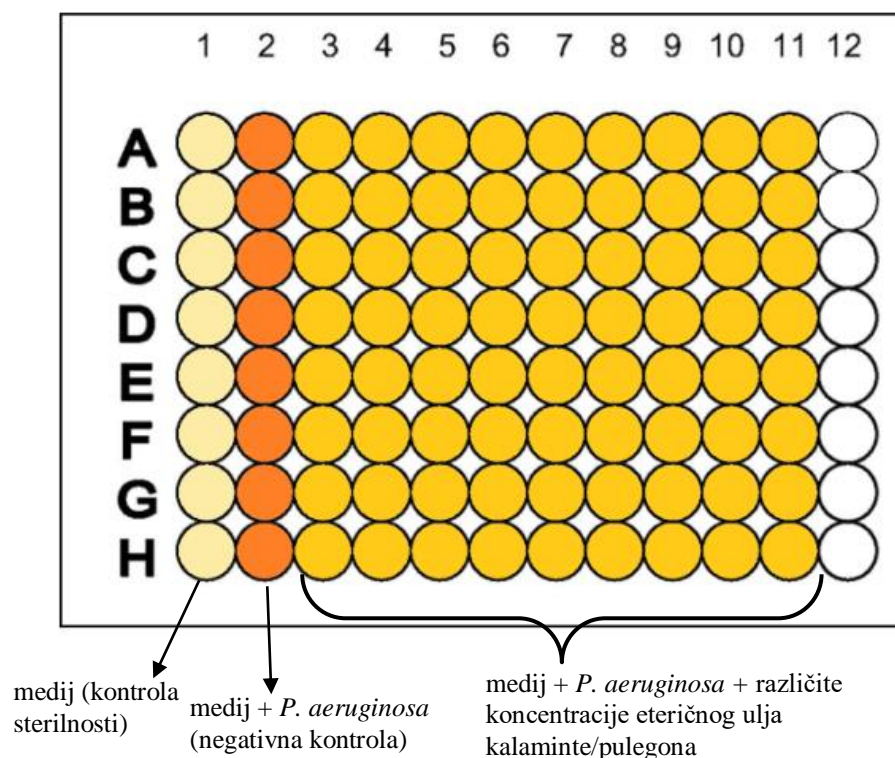
Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) eteričnog ulja kalaminte i pulegona za bakteriju *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 u M63 tekućem mediju s 0,4% arginina, je određena modificiranom metodom mikrodilucije (Andrews, 2001). Epruveta za uzgoj noćne kulture napunjena s 5 mL LB medija inokulirana je s malom količinom bakterijskog materijala, te je potom inkubirana 24 h na 37°C u zračnoj tresilici na 200 rpm. Iz noćne kulture napravljena je kultura s brojem bakterijskih stanica 10⁸ CFU/mL, tj. 0,5 McFarland jedinica. Kultura sa specifičnim brojem bakterijskih stanicama napravljena je razrjeđivanjem s LB medijom, nakon mjerenja optičke gustoće na 600 nm (UV/VIS Spektrofotometar UltroSpec 1000, Pharmacia). Pulegon i eterično ulje kalaminte pripremljeni su iz radnih otopina, te su razrijeđeni dvostruko-serijski u epruvete s koje su sadržavale hranjivi medij M63 s 0,4% arginina. Raspon koncentracija pulegona iznosio je od 0,5 do 4 mg/mL (0,5

mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL i 4 mg/mL), a eteričnog ulja kalaminte od 0,5 do 6 mg/mL (0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL i 6 mg/mL). Pripremljena kultura bakterijskih stanica je razrijeđena svim serijski razrijeđenim otopinama pulegona i eteričnog ulja kalaminte. Kulture bakterijskih stanica su razrijeđene otopinama eteričnog ulja i pulegona u omjeru 1:100. Potom je 100 µL svakog konačnog razrjeđenja nanoseno na mikrotitarsku pločicu zaobljenog dna (Ratiolab GmbH), pločica je inkubirana preko noći na 37°C. Minimalna inhibitorna koncentracija određena je kao najmanja koncentracija pri kojoj je inhibiran rast bakterija, inhibicija se detektirala vizualno i spektrofotometrijski na 570 nm čitačem mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer). Minimalna koncentracija tobramicina određena je prethodno u laboratoriju kao 2 µg/mL, te je u pokusima tobramicin korišten u toj koncentraciji (Andričević, 2019).

3.2.3. Ispitivanje učinka eteričnog ulja kalaminte i pulegona na stvaranje biofilma

Ispitivanje učinka pulegona i eteričnog ulja kalaminte na stvaranje biofilma vrste *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 odrađeno je modificiranom metodom prema radu Vitanza i sur., 2018. Noćna kultura bakterijskih stanica je razrijeđena s LB medijem do standardizirane optičke gustoće, koja odgovara 0,5 McFarland jedinica, postupak je opisan u poglavlju 3.2.2. Za potrebe ispitivanja je pripremljeno 9 otopina eteričnog ulja kalaminte i pulegona. Pulegon i eterično ulje kalaminte pripremljeni su iz radnih otopina ($c=100$ mg/mL) s M63 + 0,4% arginin hranjivim medijem, isto kao što su pripremljeni u poglavlju 3.2.2. za određivanje MIK-a. Za ispitivanje učinka su korištene subinhibitorne koncentracije. Pulegon i eterično ulje kalaminte su pripremljeni 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). 990 µL otopine eteričnog ulja kalaminte je dodano u 10 µL otopine bakterijske kulture, kako bi se postigao omjer 1:100 (bakterijska kultura:eterično ulje kalaminte/pulegon). Potom je 100 µL svakog konačnog razrjeđenja kulture i ulja nanoseno na mikrotitarsku pločicu zaobljenog dna (Ratiolab GmbH). Svako konačno razrjeđenje je nanoseno u osam ponavljanja. Mikrotitarska pločica je zatim inkubirana tijekom 24 h na 37°C. Netretirana bakterijska kultura dobivena je iz kulture standardizirane optičke gustoće, (0,5 McFarland jedinica) razrijeđene s hranjivim medijem M63+0,4% arginin s dodatkom 1% DMSO. Ta bakterijska kultura je razrijeđena u omjeru 1:100 (10 µL bakterijske kulture + 990 µL medija). Tako pripremljena netretirana kultura se koristila kao negativna kontrola, te se također nanosila na mikrotitarsku pločicu zaobljenog dna u osam ponavljanja. Otopina

hranjivog medija M63+0,4% arginin s dodatkom 1% DMSO korištena je kao kontrola sterilnosti, te je također nanosena u osam ponavljanja. Slika 8 shematski prikazuje mikrotitarsku pločicu, te se vidi redoslijed nanošenja kontrole sterilnosti, negativne kontrole te 9 otopina bakterijske kulture i eteričnog ulja/pulegona.



Slika 8. Shematski prikaz mikrotitarske pločice i nanošenja kontrola i razrjeđenih bakterijskih kultura

Nakon 24 h inkubacije, izmjerena je optička gustoća bakterijske kulture na 570 nm čitačem mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer). Dobivene vrijednosti optičke gustoće su korištene kako bi se prikazao učinak pulegona eteričnog ulja kalaminte na planktonske stanice *P. aeruginosa*. Postupak bojenja biofilma i njegova detekcija napravljeni su prema modificiranoj metodi opisanoj u radu od Coffey i Anderson, 2014. Prije bojanja, iz pločice je uklonjen višak medija u kojem su bile planktonske stanice. Višak je uklonjen snažnim istresanjem pločice iznad posude u kojoj je bila staničevinom natopljena s dezinficijensom, 2% Aldesolom. Potom je pločica dva puta isprana s vodovodnom vodom. Nakon što je uklonjen sav višak medija u svaku jažicu je dodano 125 μ L 0,1% kristal violeta. Zatim je pločica inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi kristal violet pobojao biofilm. Nakon 15 minuta inkubacije, višak kristal violeta je uklonjen prvo snažnim istresanjem pločice te potom ispiranjem tri puta vodovodnom vodom. Jažice su sada

sadržavale samo obojeni biofilm, te su ostavljene da se osuše preko noći. Obojeni biofilm je otopljen dodatkom 150 µL 30% ledene octene kiseline te je pločica ponovno inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi. Sadržaj u jažicama je potom promiješan, te je prebačeno 125 µL sadržaja u novu mikrotitarsku pločicu s ravnim dnom (Kartell). Ispitivanje učinka eteričnog ulja kalaminte i pulegona je određeno mjerenjem apsorbancije na 540 nm čitaču mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer). Rezultati su prikazani kao vrijednosti izmjerene apsorbancije na 570 nm, 540 nm, te kao biofilm indeks.

Biofilm indeks (BI) prema Niu i Gilbert, 2004 predstavlja količinu nastalog biofilma u odnosu prema ukupnom bakterijskom rastu. Biofilm indeks se računa za svaku jažicu, prema dolje navedenoj jednadžbi. Rezultat se prikazuje kao relativni omjer optičke gustoće obojenog biofilma na izmjerene na 540 nm i optičke gustoće bakterijske kulture izmjerene na 570 nm (Savoia i Zucca, 2007).

$$BI = \frac{OD_{540nm} \text{ obojeni biofilm}}{OD_{570nm} \text{ bakterijska kultura}} \times 100$$

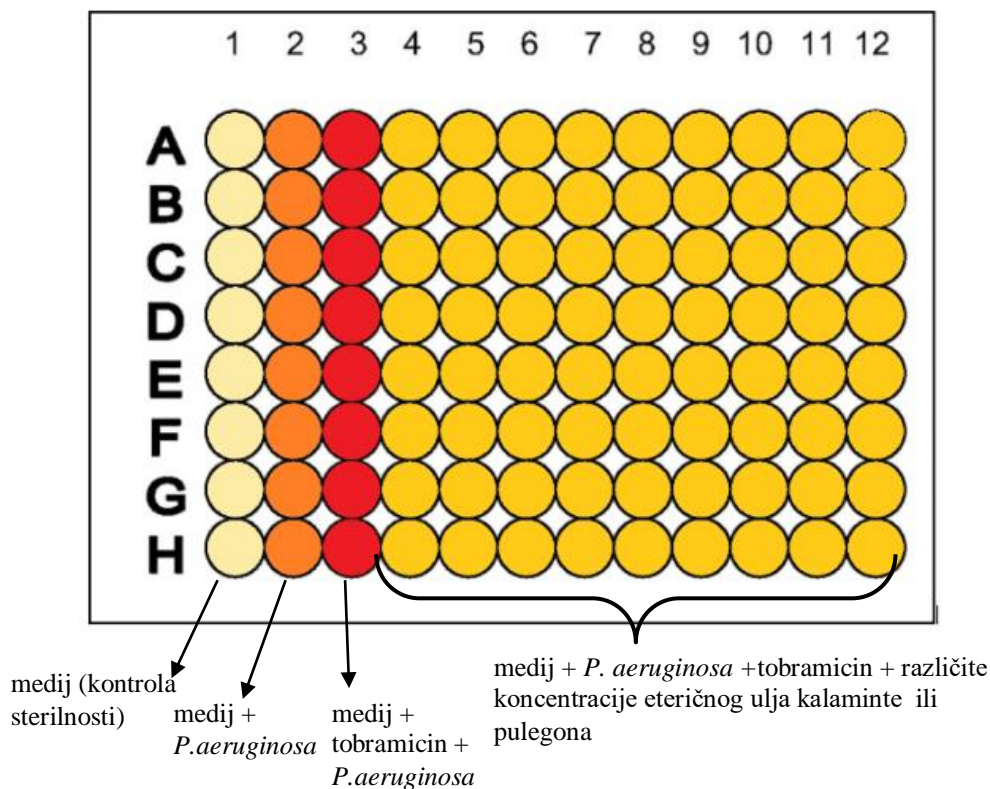
3.2.4. Ispitivanje učinka eteričnog ulja kalaminte i pulegona s tobramicinom na formirani biofilm

Ispitivanje učinka pulegona u s tobramicinom, te eteričnog ulja kalaminte s tobramicinom na već formirani biofilm vrste *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 određeno je modificiranom metodom prema radu Kaushik i sur., 2016. Bakterijska kultura, standardizirane optičke gustoće, koja odgovara 0,5 McFarland jedinica, razrijeđena je u omjeru 1:100 s hranjivim medijem M63 + 0,4% arginin. Takva bakterijska kultura nanescena je na dvije mikrotitarske pločice zaobljenog dna (Ratiolab GmbH), kako bi se razvio biofilm. Jedna mikrotitarska pločica služi za ispitivanje učinka eteričnog ulja kalaminte i tobramicina, a druga za ispitivanje učinka pulegona i tobramicina. Otopina hranjivog medija M63+0,4% arginin s dodatkom 1% DMSO korištena je kao kontrola sterilnosti, te je nanescena u osam jažica u prvom stupcu (V=100 µL). Na ostatak pločice nanesceno je po 100 µL razrijeđene bakterijske kulture, te su pločice inkubirane 24 h na 37°C. Tijekom inkubacije se razvio biofilm u jažicama. Potom je iz jažica višak medija s planktonskim stanicama izbačen snažnim potresanjem, te su pločice onda isprane dva puta sterilnim hranjivim medijem M63 + 0,4% arginin (V= 200 µL).

Potom je pripremljeno 9 otopina eteričnog ulja kalaminte/pulegona u kombinaciji s tobramicinom. Pulegon i eterično ulje kalaminte pripremljeni su iz radnih otopina (c=100 mg/mL) s M63 + 0,4% arginin hranjivim medijem, isto kao što su pripremljeni u poglavlju

3.2.2. i poglavlju 3.2.3. Pulegon i eterično ulje kalaminte su pripremljeni u rasponu koncentracija od 0,002 do 4 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, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL i 4 mg/mL). Otopina tobramicina koncentracije 2 μ g/mL pripremljena je razrjeđivanjem u hranjivom mediju M63 + 0,4% arginin. Tako pripremljena razrjeđena otopina tobramicina koristila se za razrjeđivanje radnih otopine eteričnog ulja kalaminte i pulegona ($c=100$ mg/mL) do ranije navedenih željenih koncentracija. Potom se 150 μ L svakog konačnog razrjeđenja otopine ulja i tobramicina nanosilo na mikrotitarsku pločicu, ponovno u osam ponavljanja. Netretirana bakterijska kultura dobivena je kao i u postupku opisanom u poglavlju 3.2.3 iz kulture standardizirane optičke gustoće. Tako pripremljena netretirana kultura se koristila kao negativna kontrola, te se također nanosila na mikrotitarsku pločicu zaobljenog dna u osam ponavljanja u prvi stupac ($V=150$ μ L). Kao pozitivna kontrola se koristila otopina tobramicina koncentracije 2 μ g/mL, koja je nanesena u drugi stupac mikrotitarske pločice u osam ponavljanja ($V=150$ μ L). Slika 9 shematski prikazuje mikrotitarsku pločicu, te se vidi redoslijed nanošenja kontrole sterilnosti, negativne i pozitivne kontrole te otopine bakterijske kulture i eteričnog ulja kalaminte/pulegona s tobramicinom.

Pločice na kojima su nanesene sve otopine i kontrole su inkubirane 24 h na 37°C. Nakon završetka inkubacije, izmjerena je optička gustoća bakterijske kulture na 570 nm čitačem mikrotitarskih pločica (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer). Nastali biofilm je obojen kristal violetom, otopljen u octenoj kiselini i detektiran prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3. Rezultati su prikazani kao vrijednosti apsorbancije, tj. optičke gustoće pri 540 nm što predstavlja nastali biofilm.



Slika 9. Shematski prikaz mikrotitarske pločice i nanošenja kontrola i razrjeđenih bakterijskih kultura

3.2.5. Statistička analiza

Svako od ispitivanja opisano u poglavljima 3.2.2., 3.2.3 i 3.2.4 je provedeno u tri neovisna pokusa. Konačni rezultati su prikazani preko stupčastih grafova, a vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Dobiveni rezultati analizirani su statističkim ANOVA testom i T-testom gdje su se rezultati uspoređivali s netretiranom kulturom uz razinu statističke značajnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

4.1.1. Minimalna inhibitorna koncentracija

U tablici 2. su prikazane minimalne inhibitorne koncentracije eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis* Monech (dalje u tekstu: kalaminta), pulegona i tobramicina za bakterijsku vrstu *P. aeruginosa* soja ATCC 27853 u tekućem hranjivom M63 + 0,4% arginin mediju.

Tablica 2. Vrijednosti MIK za bakterijsku vrstu *P. aeruginosa* soja ATCC 27853

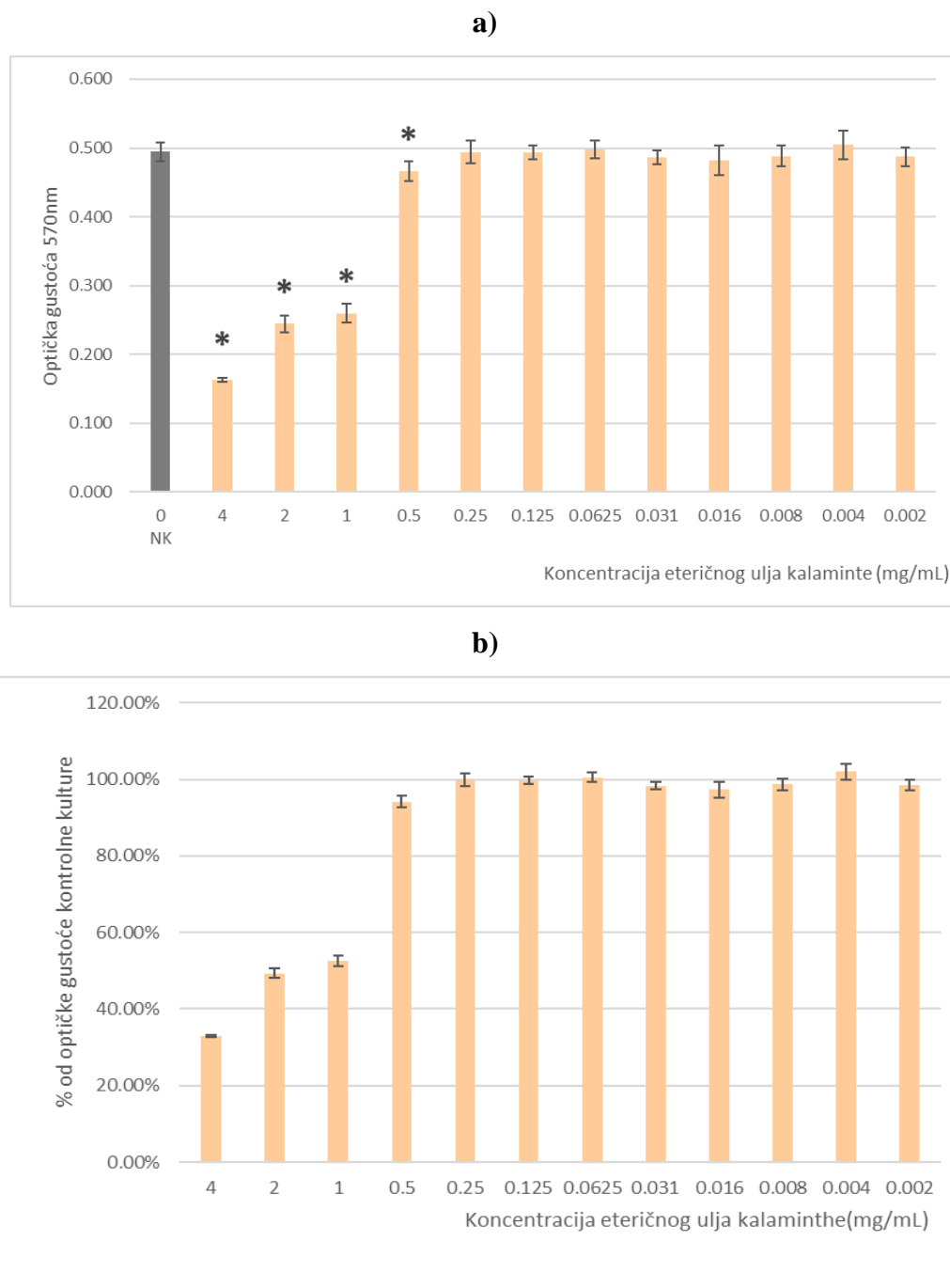
Uzorak	MIK (mg/mL)
Eterično ulje kalaminte	6
Pulegon	4
	MIK (µg/mL)
Tobramicin	2

Minimalne inhibitorne koncentracije eteričnog ulja kalaminte i pulegona su eksperimentalno određene, metodom dilucije. Utvrđeno je da MIK vrijednost za vrstu *P. aeruginosa* soj ATCC 27853 za eterično ulje kalaminte iznosi 6 mg/mL, dok za pulegon iznosi 4 mg/mL. Za određivanje MIK vrijednosti za eterično ulje korištene su koncentracije od 6 do 1 mg/mL (6 mg/mL, 4 mg/mL, 2 mg/mL i 1 mg/mL), dok je u samom istraživanju korišteno 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). Za određivanje MIK vrijednosti pulegona korištene su koncentracije od 4 do 1 mg/mL (4 mg/mL, 2 mg/mL i 1 mg/mL), dok je u samom istraživanju korišteno 9 subinhibitornih koncentracija, kao i za eterično ulje kalaminte. Subinhibitorne koncentracije korištene za pulegon su MIK/8 do MIK/2048, te za eterično ulje kalaminte MIK/12 do MIK/2048. Prilikom grafičkog prikaza rezultata objedinjeni su rezultati određivanja MIK vrijednosti i rezultati istraživanja djelovanja subinhibitornih koncentracija.

MIK vrijednost tobramicina za istu bakterijsku vrstu u istom mediju iznosi 2 µg/mL te je ta koncentracija antibiotika korištena u istraživanju (Andričević, 2019.)

4.1.2. Učinak eteričnog ulja kalaminte na stvaranje biofilma bakterije *P. aeruginosa*

Slika 10 prikazuje učinak eteričnog ulja kalaminte u ukupno 12 subinhibitornih koncentracija na planktonske stanice bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853.



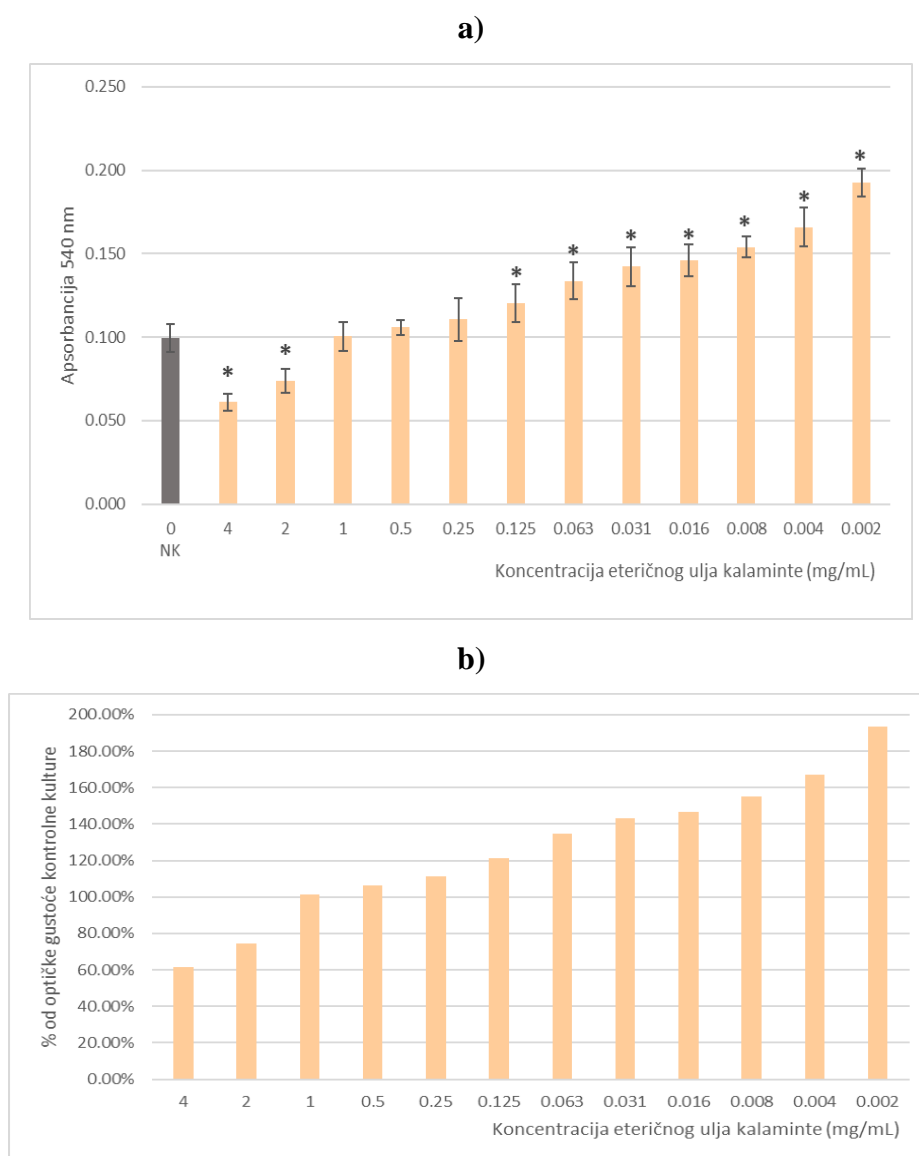
Slika 10. Učinak eteričnog ulja kalaminte na planktonske stanice bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853. Prikazane su aritmetičke sredine \pm standardne devijacije; * $p < 0,05$ u odnosu na netretiranu kulturu (NK – negativna kontrola);

(a) Optička gustoća bakterijske kulture pri 570 nm u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja kalaminte

(b) Relativna optička gustoća bakterijske kulture tj. postotak od optičke gustoće NK (netretirane kulture) u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja kalaminte.

Pri višim koncentracijama eteričnog ulja kalaminte, točnije od 4 mg/mL do 0,5 mg/mL je primijećen statistički značajan inhibitorski učinak. Rast planktonskih stanica reduciran je za $67\% \pm 1,2\%$ do $6\% \pm 1,6\%$, ovisno o koncentraciji. Smanjenjem koncentracije ispod 0.5 mg/mL eterično ulje gubi inhibitorski učinak. Premda je optička gustoća bakterijske kulture pri koncentraciji od 0,016 mg/mL bila nešto niža nego kod netretirane kulture, ta razlika nije bila statistički značajna.

Količina nastalog biofilma u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja kalaminte prikazana je slikom 11.



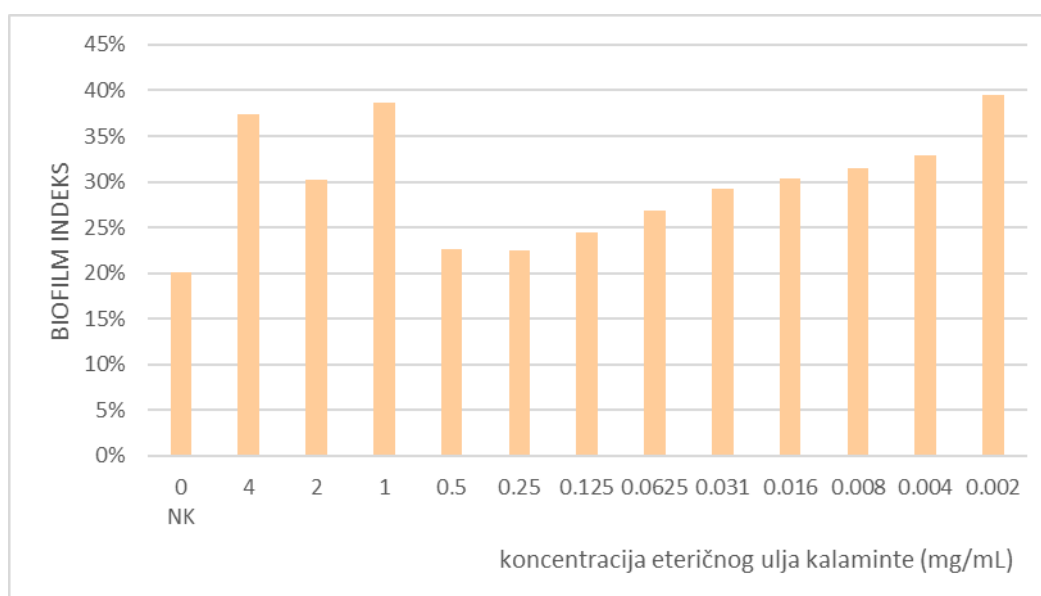
Slika 11. Količina nastalog biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, prikazana kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija apsorbancije u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja kalaminte; NK (negativna kontrola) – netretirana kultura; * $p < 0,05$ u odnosu na NK.

(a) Optička gustoća pri 540 nm u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja kalaminte

(b) Relativna optička gustoća tj. postotak od optičke gustoće NK u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja kalaminte.

Pri višim koncentracijama eteričnog ulja kalaminte od 4 mg/mL i 2 mg/mL količina nastalog biofilma bila je statistički značajno manja, u odnosu na netretiranu kulturu. Količina nastalog biofilma reducirana je za $39\% \pm 0,7\%$ i $26\% \pm 0,9\%$. Pri koncentracijama od 1 mg/mL do 0,25 mg/mL količina nastalog biofilma nije bila statistički značajno drugačija u odnosu na netretiranu kulturu. Pri svim ostalim koncentracijama količina proizvedenog biofilma bila je veća u odnosu na netretiranu kulturu. Količina nastalog biofilma povećana je od $21\% \pm 1,1\%$ do $93,64\% \pm 1,2\%$ u odnosu na netretiranu kulturu, ovisno o koncentraciji eteričnog ulja kalaminte.

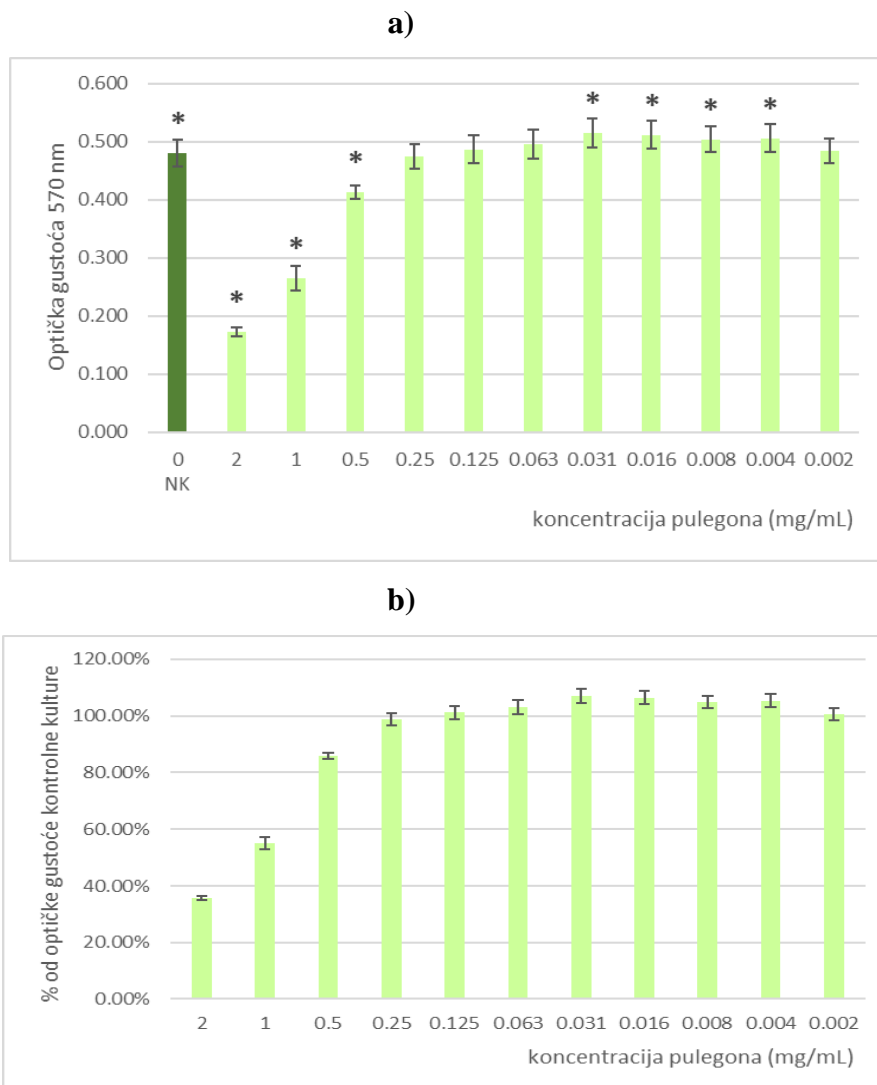
Kod prikaza rezultata putem biofilm indeksa značajnije razlike u odnosu na netretiranu kulturu vidimo kod koncentracija od 4 do 1 mg/mL, te od 0.0625 do 0.002 mg/mL. U rasponu koncentracija od 4 do 1 mg/mL porast je bio od 17 do 10%, dok je u rasponu koncentracija od 0.0625 do 0.002 porast bio od 7 do 20% u odnosu na netretiranu kulturu. Biofilm indeks je bio veći u odnosu na netretiranu kulturu u svim koncentracijama, što upućuje na to da eterično ulje kalaminte potiče stvaranje biofilma. U koncentracijskom rasponu od 0.5 do 0.125 mg/mL biofilm indeks nije bio značajno veći u odnosu na netretiranu kulturu.



Slika 12. Biofilm indeks bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja kalaminte. Vrijednosti su prikazane kao aritmetičke sredine \pm standardne devijacije; NK – negativna kontrola (netretirana kultura).

4.1.3. Učinak pulegona na stvaranje biofilma bakterije *P. aeruginosa*

Slika 13 prikazuje učinak pulegona u ukupno 11 subinhibitornih koncentracija na planktonske stanice bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853.



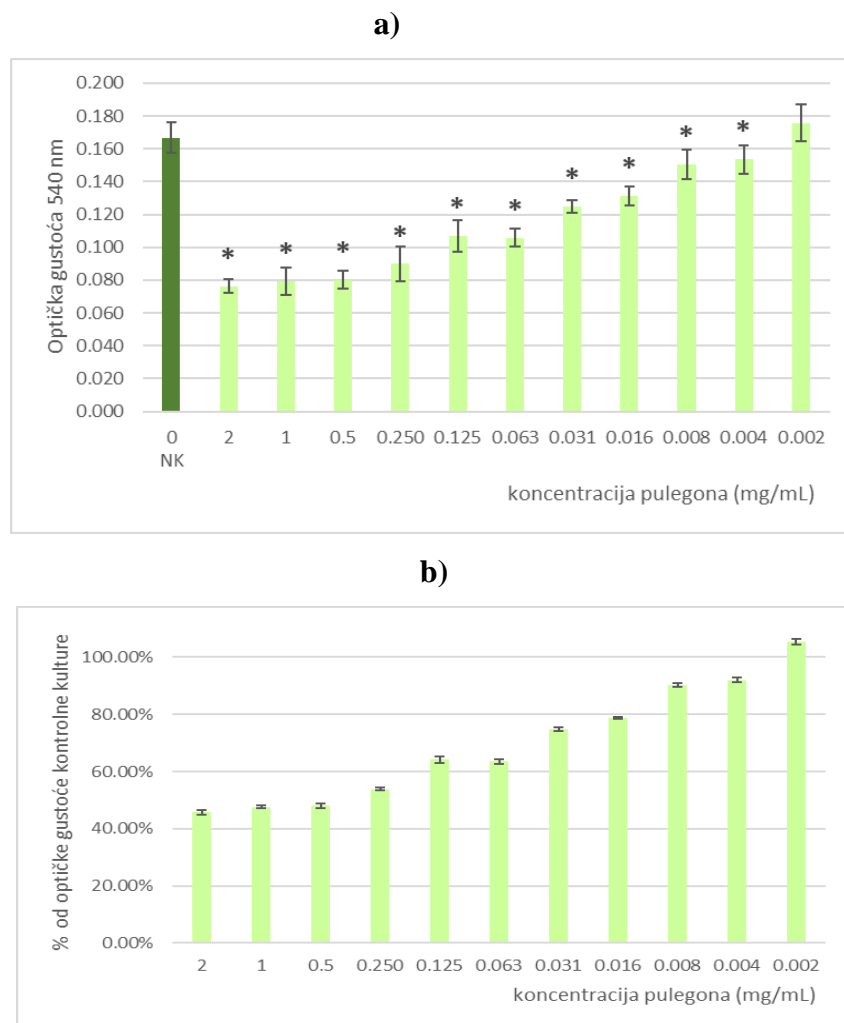
Slika 13. Učinak pulegona na planktonske stanice bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853. Prikazane su aritmetičke sredine \pm standardne devijacije; * $p < 0,05$ u odnosu na netretiranu kulturu;

- (a) Optička gustoća bakterijske kulture *P. aeruginosa* ATCC 27853 pri 570 nm u ovisnosti o koncentraciji pulegona; 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 pulegona.

Statistički značajna razlika primijećena je u koncentracijskom rasponu od 2 do 0,5 mg/mL, te u rasponu od 0,031 do 0,004 mg/mL u odnosu na netretiranu kulturu. U rasponu od 2 do 0,5 mg/mL primijećen je statistički značajan inhibitorni učinak, koji je proporcionalan koncentraciji pulegona. Rast planktonskih stanica je inhibiran za $64,2 \pm 0,7\%$

pri koncentraciji od 2 mg/mL, dok je pri koncentraciji od 0,5 mg/mL reduciran za $14,08 \pm 1,2\%$. Pri koncentracijskom rasponu od 0,25 do 0,063 nema statistički značajnih razlika u odnosu na netretiranu kulturu, tj. u tom koncentracijskom rasponu pulegon ne pokazuje ni inhibitorni niti promotivni učinak rast planktonskih stanica. U rasponu koncentracija od 0,031 do 0,004 mg/mL primijećen je statistički značajan promotivni učinak na rast planktonskih stanica. Rast planktonskih stanica je povećan od $7,08 \pm 2,5\%$ do $5,31 \pm 2,4\%$, ovisno o koncentraciji. Promotivni učinak je najviši za koncentraciju 0,031mg/mL te opada sa smanjenjem koncentracije.

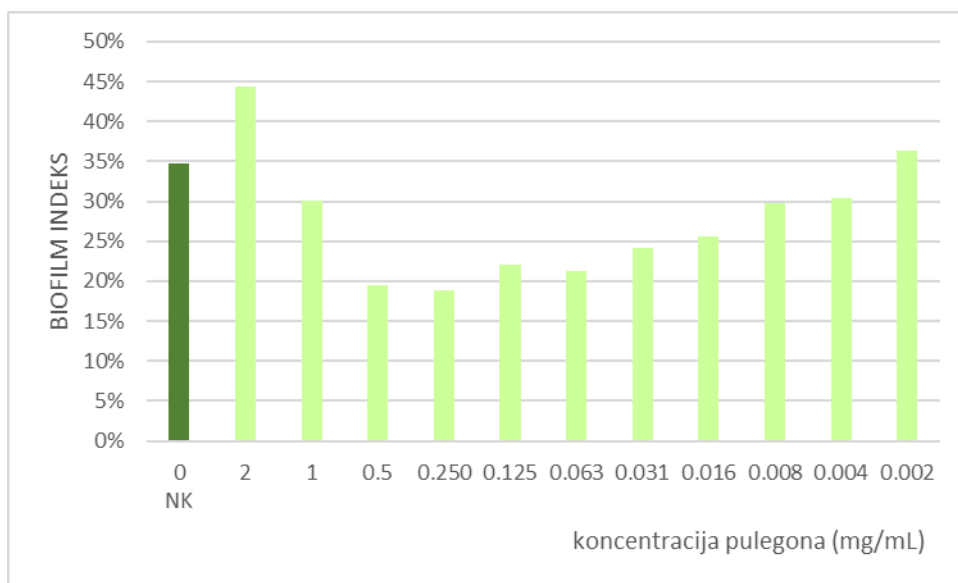
Slika 14 prikazuje količinu nastalog biofilma u ovisnosti o koncentraciji pulegona za bakteriju *P. aeruginosa* ATCC 27853.



Slika 14 Količina nastalog biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, prikazana kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija apsorbancije u ovisnosti o koncentraciji pulegona; NK (negativna kontrola) – netretirana kultura; * $p < 0,05$ u odnosu na NK.

- (a) Optička gustoća pri 540 nm u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja kalaminte
 (b) Relativna optička gustoća tj. postotak od optičke gustoće NK u ovisnosti o koncentraciji pulegona.

Statistički značajne razlike u količini proizvedenog biofilma kultura tretiranih pulegonom, u odnosu na netretirane kulture, utvrđene su pri svim koncentracijama, osim pri koncentraciji pulegona od 0,002 mg/mL. Također, pri svim statistički značajnim koncentracijama pulegona je nastala manja količina biofilma u odnosu na netretiranu bakterijsku kulturu. Inhibitorni učinak je opadao smanjenjem koncentracije pulegona, a kretao se u rasponu od $54,23 \pm 0,8\%$ do $7,95 \pm 1,1\%$.

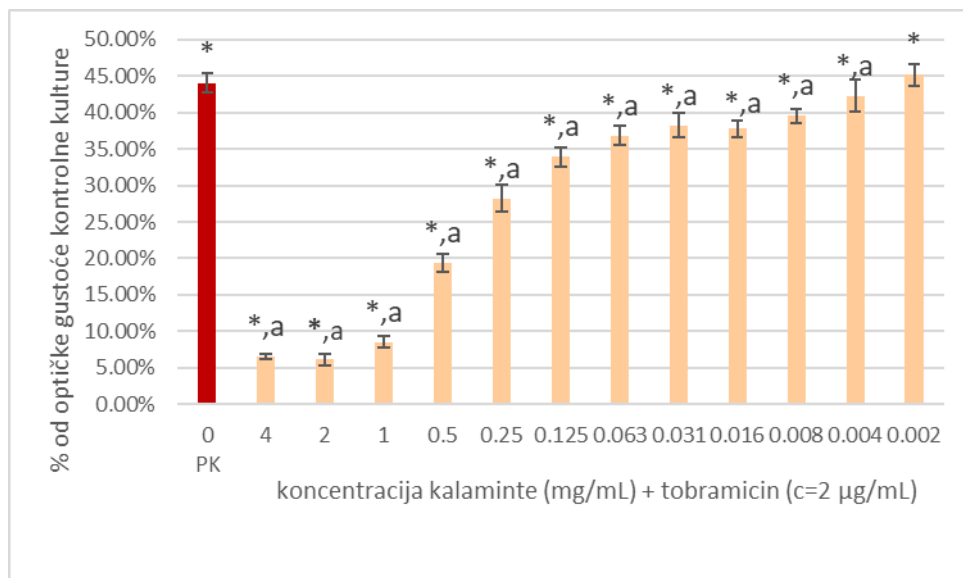


Slika 15. Biofilm indeks bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 u ovisnosti o koncentraciji pulegona. Vrijednosti su prikazane kao aritmetičke sredine \pm standardne devijacije; NK – negativna kontrola (netretirana kultura).

Na slici 15 je prikazan biofilm indeks za bakteriju *P. aeruginosa* ATCC 27853 u ovisnosti o koncentraciji pulegona. Pri koncentraciji od 2 mg/mL primijećeno je povećanje biofilm indeksa za 9% u odnosu na netretiranu kulturu, što upućuje da pri toj koncentraciji pulegon potiče stvaranje biofilma. Pri svim ostalim koncentracijama primijećeno je smanjenje biofilm indeksa u odnosu na netretiranu kulturu, to znači da u tim koncentracijama pulegon inhibira stvaranje biofilma. Smanjenje biofilm indeksa se kretalo od 4 do 16% u odnosu na netretiranu kulturu. Pri koncentraciji od 0,002 mg/mL nije primijećena razlika u odnosu na netretiranu kulturu.

4.1.4. Učinak eteričnog ulja kalaminte i tobramicina na formirani biofilm bakterije *P. aeruginosa*

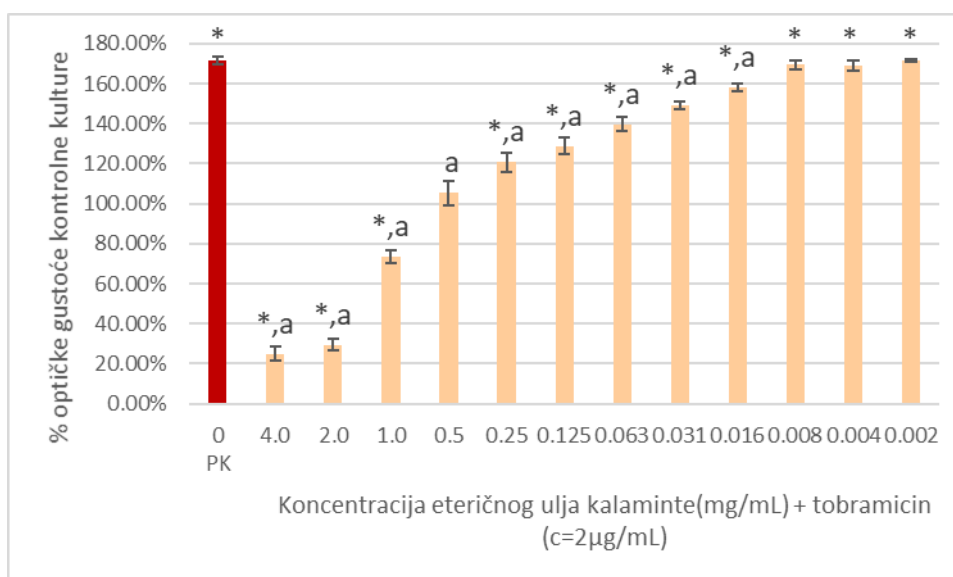
Slika 16 prikazuje učinak eteričnog ulja kalaminte u ukupno 12 subinhibitornih koncentracija u kombinaciji s tobramicinom koncentracije 2 µg/mL na rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, nakon što je biofilm formiran.



Slika 16. Učinak eteričnog ulja kalaminte i tobramicina na rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853. Prikazane su aritmetičke sredine ± standardne devijacije relativne optičke gustoće tj. postotak od optičke gustoće NK (netretirane kulture) u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja kalaminte; PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom (c=2 µg/mL)); * p<0,05 u odnosu na netretiranu kulturu; a p<0,05 u odnosu na kulturu tretiranu samo tobramicinom.

Svi rezultati su statistički značajni u usporedbi s netretiranom kulturom. Statistički značajna inhibicija u bakterijskom rastu primijećena je kod bakterija tretiranih samo tobramicinom (c=2 µg/mL), kao i kod onih tretiranih kombinacijom tobramicina i kalaminte u svim koncentracijama. Sam tobramicin inhibira rast planktonskih stanica *P. aeruginosa* za 56% ± 1,4%. Kombinacija eteričnog ulja kalaminte s tobramicinom inhibira rast planktonskih stanica od 93,44 ± 0,4% do 54,81 ± 1,5%. Inhibitorni učinak je značajniji što je koncentracija eteričnog ulja kalaminte veća, s time da pri koncentraciji eteričnog ulja kalaminte od 0,002 mg/mL u kombinaciji s tobramicinom koncentracije 2 µg/mL ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na sam tobramicin iste koncentracije. Eterično ulje kalaminte djeluje sinergistički s tobramicinom na rast bakterijske kulture.

Količina nastalog biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 tretiranog eteričnim uljem kalaminte u kombinaciji s tobramicinom (c=2 µg/mL) prikazana je na slici 17.



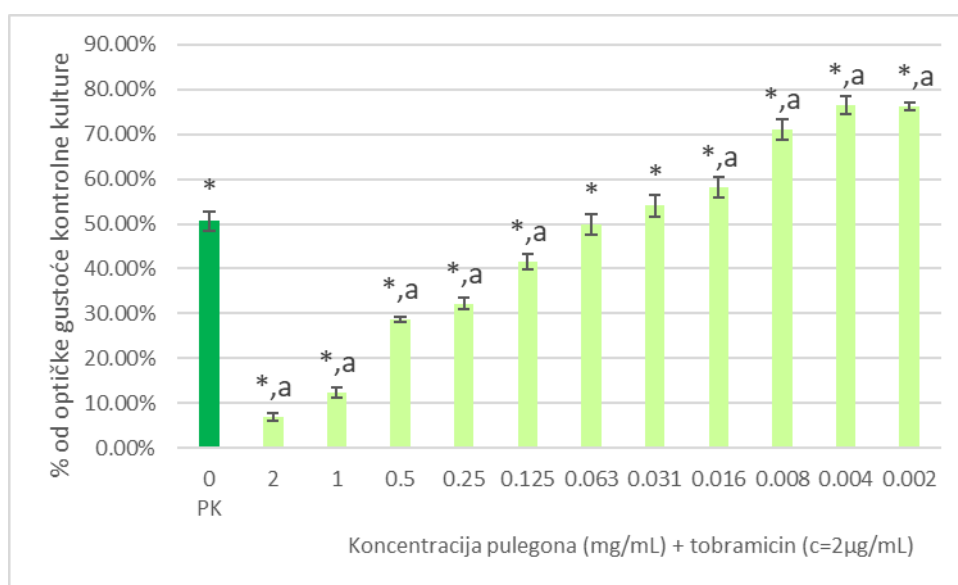
Slika 17. Količina biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 nastalog tretiranjem eteričnim uljem kalaminte u kombinaciji s tobramicinom, prikazana kao aritmetička sredina ± standardna devijacija relativne optičke gustoće bakterije u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja kalaminte; NK – negativna kontrola (netretirana kultura); PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom (c=2 µg/mL)); * p<0,05 u odnosu na NK; a p<0,05 u odnosu na kulturu tretiranu samo tobramicinom.

Statistički značajne razlike u količini biofilma su utvrđene u svim koncentracijama u odnosu na netretiranu kulturu, osim pri koncentraciji eteričnog ulja kalaminte 0,5 mg/mL. Statistički značajna razlika utvrđena je i kod pozitivne kontrole tj. bakterija tretiranih samo tobramicinom. Kod bakterija tretiranih samo tobramicinom (c=2 µg/mL) primijećeno je statistički značajno povećanje količine nastalog biofilma u iznosu od 71,59 ± 1,6%. Pretpostavljamo da tobramicin potiče stvaranje biofilma. Pri kombinacijama tobramicina (c=2 µg/mL) i eteričnog ulja kalaminte u koncentracijama od 4 do 1 mg/mL je primijećeno smanjeno stvaranje biofilma, od 74,95 ± 3,7% do 26,33 ± 3,3%, ovisno o koncentraciji eteričnog ulja. Količina nastalog biofilma je rasla sa smanjenjem koncentracije eteričnog ulja kalaminte. Pretpostavljamo da tobramicin i eterično ulje kalaminte imaju antagonistički učinak na količinu stvorenog biofilma u koncentracijama eteričnog ulja kalaminte od 4 do 1 mg/mL. Kod ispitivane kombinacije tobramicina i eteričnog ulja kalaminte koncentracije 0,5 mg/mL nije primijećena statistički značajna razlika u odnosu na netretiranu kulturu. Veća količina biofilma, u odnosu na netretiranu kulturu, je nastala i primjenom eteričnog ulja kalaminte u koncentracijama od 0,25 do 0,002 mg/mL, u kombinaciji s tobramicinom (c=2 µg/mL). Smanjenjem koncentracije eteričnog ulja kalaminte je rasla količina biofilma. Rast

biofilma je povećan za $20,85 \pm 4,7\%$ do $71,77 \pm 0,6\%$, ovisno o koncentraciji eteričnog ulja u odnosu na netretiranu kulturu. Pri nižim koncentracijama, 0,008, 0,004 i 0,002 mg/mL količina nastalog biofilma je bila približno jednaka kao kod bakterija tretiranih samo tobramicinom, tj. nema statističke razlike u odnosu na pozitivnu kontrolu.

4.1.5. Učinak pulegona i tobramicina na formirani biofilm bakterije *P. aeruginosa*

Slika 18 prikazuje učinak pulegona u ukupno 11 subinhibitornih koncentracija u kombinaciji s tobramicinom ($c=2 \mu\text{g/mL}$) na rast planktonskih stanica bakterije *P.aeruginosa* ATCC 27853, nakon što je biofilm formiran.

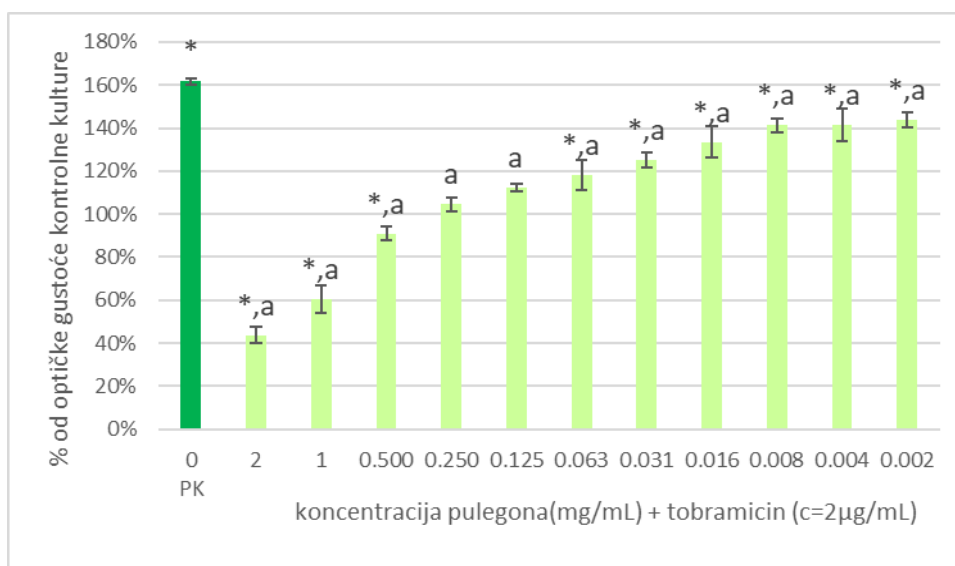


Slika 18. Učinak pulegona i tobramicina na rast planktonskih stanica bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853. Prikazane su aritmetičke sredine \pm standardne devijacije relativne optičke gustoće bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, tj. postotak od optičke gustoće NK (netretirane kulture) u ovisnosti o koncentraciji pulegona; PK – pozitivna kontrola (bakterije tretirane samo tobramicinom ($c=2 \mu\text{g/mL}$)).; * $p < 0,05$ u odnosu na netretiranu kulturu.

Primijećena je statistički značajna razlika u rastu bakterija tretiranih samo tobramicinom, kao i onih tretiranih kombinacijom tobramicina i pulegona u svim koncentracijama u odnosu na netretirane bakterije. U svim ispitivanim koncentracijama je primijećen značajniji inhibitorski učinak pulegona i tobramicina, i samog tobramicina, na rast planktonskih stanica, međutim kada uspoređujemo djelovanje različitih koncentracija pulegona primjećujemo dvojak učinak. Kod samog tobramicina rast planktonskih stanica je smanjen za $49,36 \pm 1,1\%$, u odnosu na netretiranu kulturu. To odgovara rezultatu utjecaja tobramicina na rast planktonskih stanica iz poglavlja 4.4. Kao i kod eteričnog ulja kalaminte, pokazano je da kombinacija pulegona i tobramicina pri svim primijenjenim koncentracijama

inhibira rast planktonskih stanica. No treba naglasiti da pri nižim koncentracijama pulegon djeluje antagonistički i umanjuje učinak samog tobramicina. Od koncentracije pulegona 2 mg/mL do 0,125 mg/mL primijećen je sinergistički učinak s tobramicinom u odnosu na netretiranu kulturu, te je kombinacija pulegona i tobramicina inhibirala rast planktonskih stanica $92,73 \pm 0,2\%$ do $58,49 \pm 2,4\%$, ovisno o koncentraciji pulegona. Što je bila veća koncentracija pulegona to je inhibicija rasta bila veća. Ispitivane kombinacije tobramicina i pulegona koncentracije 0,062 i 0,031 mg/mL su pokazala statistički značajnu inhibiciju rasta planktonskih stanica, u odnosu na netretiranu kulturu, ali nisu pokazala statistički značajnu razliku u odnosu na pozitivnu kontrolu, tj. bakterijsku kulturu tretiranu samo tobramicinom. S druge strane, ispitivane kombinacije tobramicina i pulegona u koncentracijama pulegona od 0,016 do 0,002 mg/mL su pokazale antagonistički učinak. Iako je i dalje prisutna statistički značajna inhibicija rasta planktonskih stanica u odnosu na netretiranu kulturu, u tim koncentracijama je prisutno i statistički značajno smanjenje inhibicije rasta planktonskih stanica, u odnosu na kulturu tretiranu samo tobramicinom. Inhibicija rasta planktonskih stanica je manja od $7,61 \pm 1,7\%$ do $25,69 \pm 1,1\%$, te je inhibicija rasta sve manja što je koncentracija pulegona manja.

Količina nastalog biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 tretiranog pulegonom u kombinaciji s tobramicinom ($c=2 \mu\text{g/mL}$) prikazana je slikom 19.



Slika 19. Količina biofilma bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853 nastalog tretiranjem pulegonom u kombinaciji s tobramicinom, prikazana kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija relativne optičke gustoće kontrolne kulture u ovisnosti o koncentraciji pulegona; 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; a $p < 0,05$ u odnosu na PK.

Kao i kod kombinacije tobramicina i eteričnog ulja kalaminte, kombinacija pulegona i tobramicina pokazuje dvojak učinak na količinu nastalog biofilma. Pretpostavljamo da sam tobramicin promovira nastanak biofilma, te je količina nastalog biofilma za $61,77 \pm 1,8\%$ veća u odnosu na netretiranu kulturu. Pri višim koncentracijama, od 2 do 0,5 mg/mL pulegon u kombinaciji s tobramicinom smanjuje količinu nastalog biofilma i to od $56,22 \pm 3,8\%$ do $8,96 \pm 3,1\%$, proporcionalno koncentraciji pulegona. Pri koncentracijama pulegona od 0,25 i 0,125 mg/mL ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na netretiranu kulturu, ali je primijećena statistički značajna razlika u odnosu na kulturu tretiranu samo tobramicinom. Ukoliko usporedimo ove rezultate s onima iz poglavlja 4.3, možemo zaključiti da se promotivni učinak tobramicina ($c=2\mu\text{g/mL}$) i inhibitorni učinak pulegona pri tim koncentracijama poništavaju. Pri nižim koncentracijama pulegona, od 0,063 do 0,002 mg/mL je primijećena statistički značajna razlika u odnosu na netretiranu kulturu, no ona pokazuje da kombinacija tobramicina i pulegona u tim koncentracijama povećava količinu nastalog biofilma, u odnosu na netretiranu kulturu. Međutim, to povećanje količine nastalog biofilma je u svim koncentracijama i dalje statistički značajno manje u usporedbi s kulturom tretiranom samo tobramicinom. To znači da i u ovom slučaju pulegon djeluje antagonistički i smanjuje količinu nastalog biofilma. Količina nastalog biofilma je manja što je koncentracija pulegona veća, te je u odnosu na kulturu tretiranu tobramicinom količina nastalog biofilma smanjena od $17,87 \pm 3,3\%$ do $43,61 \pm 7,2\%$, ovisno o koncentraciji pulegona.

4.2. Rasprava

Pseudomonas aeruginosa, Gram-negativni oportunistički patogen, danas uzrokuje široki spektar po život opasnih infekcija. Ova sveprisutna okolišna bakterija je poseban izazov kod imunokompromitiranih pacijenata, primjerice onih s cističnom fibrozom. Upravo kod pacijenata s cističnom fibrozom zbog patogeneze bolesti i mogućnosti nastanka biofilma, je *P. aeruginosa* glavni uzročnik morbiditeta i mortaliteta (Moradali i sur, 2017). Bakterijski biofilm nastaje kada se pojedinačne, planktonske, bakterijske stanice udruže i stvore zajednicu adheriranu na čvrstu podlogu i okruženu matriksom načinjenim od egzopolisahardinih komponenata. Prevencija nastanka biofilma i njegovo liječenje predstavljaju veliki izazov u medicini. Biofilm se primarno stvara na različitim vrstama medicinskih implantanata kao što su kateteri, umjetni zglobovi, leće itd. Jedna od najznačajnijih karakteristika biofilma je njegova antimikrobna otpornost. Bakterije u stadiju biofilma su 10-1000 puta rezistentnije na djelovanje antibiotika u usporedbi s planktonskim stanicama (Mah i O'Toole, 2001). Mogućnost prelaska iz planktonskog stadija u stadij biofilma, kao i općenita rezistencija bakterije *P. aeruginosa* na mnoge antibiotike, među pacijentima pobuđuje strah i skepticizam.

Eterična ulja su uglavnom pronašla svoju primjenu zbog njihovih svojstava koja su već uočena u prirodi. Tako mnoga eterična ulja imaju dokazano antibakterijsko, antimikotično, virucidno i insekticidno djelovanje. Trenutno je poznato otprilike 3000 eteričnih ulja, te ih pronalazimo u svim biljnim organima. Od njih je 300 pronašlo svoju ulogu u farmaceutskoj, prehrambenoj, sanitarnoj, kozmetičkoj i parfemskoj industriji, te se broj eteričnih ulja čija se djelovanja tek otkrivaju konstantno povećava (Bakkali i sur., 2008). Antimikrobno djelovanje eteričnih ulja dokazano je u mnogim istraživanjima. Tako su eterična ulja biljnih vrsti *Alpinia pahangensis*, *Origanum vulgare*, *Origanum dictamnus*, *Mentha piperita*, *Lavandula hybrida*, *Zataria multiflora* i *Hofmeisteria schaffneri* pokazala antimikrobno djelovanje na bakteriju *S. aureus*. Nadalje, kombinacije tih eteričnih ulja pokazuju sinergistički učinak na višestruko rezistentne sojeve *S. aureus*, koji predstavljaju veliki terapijski izazov (Chouhan i sur., 2017).

Calamintha officinalis spada u porodicu Lamiaceae te mnoge biljke iz te porodice imaju eterična ulja s antimikrobnim djelovanjem. Unutar roda *Calamintha* postoje različite vrste čija eterična ulja variraju u sadržaju i udjelu različitih komponenata. Međutim, unutar

roda *Calamintha* prevladavaju oksigenirani monoterpenoidi, poput pulegona. Općenito se unutar roda razlikuju tri glavna kemotipa, ovisno o komponenti s najvećim udjelom: 1) pulegon kemotip, 2) piperiton oksid kemotip i 3) karvon kemotip. Tako je eterično ulje vrste *Calamintha nepeta* (L.) Savi s pulegonom kao glavnom komponentom eteričnog ulja, dokazano inhibiralo rast Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, među kojima je bila i *P. aeruginosa* (Božović i Ragno, 2017). Prema podacima iz literature *C. officinalis* proizvodi relativno veliku količinu esencijalnog ulja s nizom korisnih, farmakološki aktivnih spojeva, ali neki od njih još uvijek nisu istraženi (Moattar i sur., 2018).

Eterična ulja s visokim udjelom pulegona su pokazala snažnu inhibiciju rasta Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Različita istraživanja potvrđuju da je pulegon jedna od najaktivnijih antimikrobnih komponenti eteričnih ulja (Božović i Ragno, 2017). Pulegon je pokazao potentniju biocidnu aktivnost u usporedbi s limonenom, karvonom i mentonom. Pretpostavlja se da je razlika u djelovanju posljedica i razlike u strukturi, jer pulegon za razliku od limonena ima dodatno dvostruku vezu između C4 i C7 atoma (Oumzil i sur., 2002). Također je pokazan i učinak pulegona na QS, čija je uloga u formaciji biofilma objašnjena u poglavlju 1.1.3. (Bukvički i sur., 2016).

Dok je antimikrobni učinak raznih eteričnih ulja i njihovih komponenti često istraživan, učinak na stvaranje biofilma i eradikacija biofilma nije često istraživana. Zato ovo istraživanje ispituje upravo antibiofilm učinak kalaminte i pulegona na biofilm *P. aeruginosa*. Uz određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija, ispitivane su inhibitorne, ali i subinhibitorne koncentracije eteričnog ulja kalaminte i pulegona. Učinak subinhibitorne koncentracije je ispitivan jer su Čabarkapa i suradnici pokazali da subinhibitorne koncentracije eteričnih ulja i njihovih komponenti mogu imati antibiofilm učinak, tako što smanjuju adheziju bakterija na površinu i proizvodnju izvanstaničnog matriksa (Čabarkapa i sur., 2019). Istraživanje koje je također pokazalo antimikrobno i antibiofilm djelovanje komponenata eteričnog ulja u subinhibitornim koncentracijama je pokazalo da karvakrol značajno reducira stvaranje biofilma kod tri soja vrste *S. typhimurium*, potom kod biofilma *S. aureus* i *S. epidermidis* (Burt i sur., 2014).

U prvom dijelu pokusa ispitivan je učinak eteričnog ulja *Calaminthe officinalis* Moench i pulegona na stvaranje biofilma kod vrste *P. aeruginosa* ATCC 27853. Iako je primarna zadaća bila odrediti učinak na stvaranje biofilma, također su određene i minimalne inhibitorne koncentracije, kao i učinak na planktonske stanice *P. aeruginosa*. Učinak na planktonske stanice određen je mjerenjem optičke gustoće bakterijske kulture pri 570 nm,

nakon 24-satne inkubacije s otopinama eteričnog ulja kalaminte i pulegona. Količina nastalog biofilma je izmjerena kao apsorbanacija pri 540 nm. Prvo je određena minimalna inhibitorna koncentracija eteričnog ulja kalaminte, te ona iznosi 6 mg/mL. Pri višim koncentracijama eterično ulje kalaminte je pokazalo inhibitorni učinak na planktonske stanice, dok pri subinhibitornim koncentracijama nije bilo učinka na rast planktonskih stanica. Kada je promatrana količina nastalog biofilma u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulju kalaminte pokazan je dvojak učinak. Pri višim koncentracijama je ponovno bio prisutan inhibitorni učinak koji se očitovao smanjenom količinom nastalog biofilma u odnosu na netretiranu kulturu. Međutim, pri nižim, subinhibitornim, koncentracijama (od 0,125 do 0,002 mg/mL) se povećala količina stvorenog biofilma. Zadnji prikaz rezultata je bio preko biofilm indeksa. Biofilm indeks je u svim koncentracijama bio veći u odnosu na netretiranu kulturu. To znači da iako je u nižim koncentracijama broj planktonskih stanica bio isti kao kod netretirane kulture, te bakterije su proizvodile više biofilma u odnosu na netretirane. Isto se iz biofilm indeksa može zaključiti i za više koncentracije. Iako je u višim koncentracijama (od 4 do 1 mg/mL) pokazano i smanjenje broja planktonskih stanica i smanjenje količine nastalog biofilma, biofilm indeks je veći od netretirane kulture, što ukazuje na to da te pojedine bakterije koje su preživjele antimikrobni učinak eteričnog ulja, proizvode veću količinu biofilma. Upravo kroz ovaj primjer vidimo značaj dobrog titiranja doze, pogotovo u ovakvom slučaju gdje je raspon djelovanja izrazito uzak. Nije neuobičajeno da isto eterično ulje pokazuje dvojak učinak na stvaranje biofilma. Istraživanje utjecaja cinamaldehida pokazalo je da je kod bakterije *P. aeruginosa* soja PAO1 cinamaldehyd i smanjivao, ali i povećavao proizvodnju biofilma, ovisno o ispitivanim koncentracijama. Ovakvi rezultati sugeriraju da je došlo do aktivacije odgovora izazvanog stresom zbog kojeg se povećano proizvodi egzopolisaharid, a posljedično se kristal violet i više vezao za egzopolisaharid (Niu i Gilbert, 2004).

Uz ispitivanje učinka eteričnog ulja kalaminte, u prvom dijelu pokusa ispitan je i učinak pulegona na stvaranje biofilma kod *P. aeruginosa* ATCC 27853. Određeno je da u tekućem hranjivom mediju M63 + 0,4% arginin minimalna inhibitorna koncentracija pulegona na bakteriju *P. aeruginosa* iznosi 4 mg/mL. Učinak pulegona na planktonske stanice je inhibitoran pri višim koncentracijama, dok pri nižim koncentracijama ima promotivni učinak na planktonske stanice, stoga već ovdje pri prvoj usporedbi vidimo značajnu razliku između djelovanja pulegona i eteričnog ulja kalaminte. Nadalje, kada je ispitan učinak pulegona na količinu nastalog biofilma ona je bila smanjena u svim

koncentracijama. To znači da iako u subinhibitornim koncentracijama pulegon povećava broj planktonskih stanica, ukupna količina nastalog biofilma jest manja. To je također različito u odnosu na djelovanje subinhibitornih koncentracija eteričnog ulja kalaminte na količinu nastalog biofilma. Ukoliko usporedimo učinak eteričnog ulja kalaminte i pulegona u prvom dijelu pokusa, primjećujemo da tamo gdje postoji inhibitorni učinak na rast bakterijske kulture, on je značajniji u slučaju pulegona. Biofilm indeks je bio veći od netretirane kulture jedino kod koncentracije pulegona od 2 mg/mL, što bi ukazivalo na to da pulegon u toj koncentraciji potiče stvaranje biofilma. S obzirom na to da je primijećeno da koncentracije eteričnog ulja kalaminte i pulegona imaju suprotan učinak na stvaranje biofilma, u odnosu na njihov učinak na rast planktonskih stanica, možemo pretpostaviti da je antimikrobna aktivnost, koja ubija planktonske stanice, neovisna o antibiofilm učinku, koji smanjuje količinu nastalog biofilma. U prvom dijelu pokusa su primijećene značajne razlike u djelovanju eteričnog ulja kalaminte i pulegona. Iste koncentracije pulegona, pri kojima eterično ulje kalaminte nema utjecaj na rast bakterijske kulture, potiču rast te iste bakterijske kulture. Također koncentracije pri kojima eterično ulje kalaminte uzrokuje povećanje količine nastalog biofilma, pulegon smanjuje količinu nastalog biofilma. Ovakvi se rezultati mogu objasniti činjenicom da eterično ulje kalaminte osim pulegona sadrži i brojne druge komponente, koje vrlo vjerojatno ulaze u složene interakcije. Također valja naglasiti da prema određenim istraživanjima pulegon nije glavna komponenta eteričnog ulja kalaminte, već je to karvon (Monforte i suradnici, 2011). Međusobne interakcije mogu biti aditivne, sinergističke ili antagonističke, te se one mogu ostvariti između različitih komponenata eteričnog ulja, različitih eteričnih ulja, ali i između eteričnih ulja ili njihovih komponenata u kombinaciji s antibiotikom (Chouhan i sur., 2017), što je ispitano u drugom dijelu pokusa.

U drugom dijelu se ispitivao učinak eteričnog ulja biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench i pulegona u kombinaciji s tobramicinom na već formirani biofilm bakterije *P. aeruginosa* soja ATCC 27853. U ovom dijelu pokusa korištena je kombinacija eteričnog ulja kalaminte/pulegon s tobramicinom jer je tobramicin standardna terapija u liječenju cistične fibroze. Tobramicin spada pod aminoglikozidne antibiotike, primjenjuje se inhalacijom, te se koristi u liječenju planktonskih infekcija i onih u kojima je već formiran biofilm. Ideja kombinacije tobramicina s drugim antimikrobnim komponentama je potaknuta činjenicom da tobramicin kod većih doza i dugotrajnije primjene uzrokuje ototoksične i neurotoksične nuspojave, koje su izraženije kod većih doza i dugotrajnije terapije (Prayle i sur., 2010). Također, kombinacijom različitih antimikrobnih djelatnih tvari se smanjuje

mogućnost nastanka rezistentnih sojeva jer patogeni teže steknu rezistenciju na više različitih komponenata odjedanput (Chouhan i sur., 2017). Stoga je kombinacijom tobramicina s drugim antimikrobnim tvarima moguće smanjiti dozu i trajanje terapije, a time i ublažiti toksične nuspojave, ali će se smanjiti i mogućnost nastanka rezistencije. Tako su već određene studije pokazale da kombinacija tobramicina i SDS-a ili kombinacija tobramicina i triklozana ostvaraju sinergistički učinak u eradikaciji biofilma (Maiden i sur., 2018; Shin i sur., 2016). U ovom ispitivanju je korišten tobramicin u koncentraciji od 2 µg/mL, što je njegova minimalna inhibitorna koncentracija. Kao i u prvom dijelu ispitivanja, prije određivanja učinka na sam biofilm, ispitan je učinak na planktonske stanice, tako da se na prethodno uzgojeni biofilm tretiran svim kombinacijama eteričnog ulja kalaminte i pulegona s tobramicinom, izmjerila optička gustoća kulture pri 570 nm. Zbog značajnih razlika u apsolutnim vrijednostima optičke gustoće izmjerenim u različitim ponavljanjima u ovome dijelu su rezultati izraženi samo preko relativne optičke gustoće, tj. kao postotak u odnosu na netretiranu kulturu. Prvo je promatran učinak tobramicina i eteričnog ulja biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench. Pokazano je da sam tobramicin u koncentraciji od 2 µg/mL smanjuje rast planktonskih stanica te eterično ulje kalaminte u gotovo svim koncentracijama djeluje sinergistički i dodatno smanjuje rast planktonskih stanica, s time da sposobnost inhibicije eteričnog ulja kalaminte opada smanjenjem koncentracije. Međutim, kada je u pitanju ispitivanje učinka na količinu nastalog biofilma, tu je sam tobramicin značajno povećavao količinu nastalog biofilma, u odnosu na netretiranu kulturu. Više subinhibitorne koncentracije eteričnog ulja kalaminte su smanjile količinu nastalog biofilma, u odnosu na kulturu tretiranu tobramicinom, ali i odnosu na netretiranu kulturu. S druge strane, niže subinhibitorne koncentracije eteričnog ulja kalaminte su smanjile količinu nastalog biofilma u odnosu na kulturu tretiranu tobramicinom, ali su povećale količinu nastalog biofilma u odnosu na netretiranu kulturu. Ovi se rezultati poklapaju s ispitivanjem učinka eteričnog ulja kalaminte na početni rast biofilma, te se može zaključiti da eterično ulje kalaminte i tobramicin imaju antagonistički učinak na povećanje količine biofilma, kod već formiranog biofilma. Antagonistički učinak eteričnog ulja biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench opada smanjenjem koncentracije.

Zatim je promatran učinak kombinacije pulegona i tobramicina na rast već formiranog biofilma *P. aeruginosa* ATCC 27853. Pulegon je u kombinaciji s tobramicinom djelovao inhibitorno na rast planktonskih stanica u svim subinhibitornim kombinacijama, te se pri

određenim višim koncentracijama primjećuje sinergistički učinak tobramicina i pulegona na rast planktonskih stanica. Međutim, pri nižim subinhibitornim koncentracijama, rast planktonskih stanica, iako manji u odnosu na netretiranu kulturu, veći je u odnosu na kulturu tretiranu samo s tobramicinom. To znači da pulegon u kombinaciji s tobramicinom, ali također kao što je ranije pokazano i bez tobramicina, ima dvojaki učinak, te u određenim koncentracijama smanjuje rast bakterijske kulture, a u drugim povećava. Prilikom ispitivanja učinka tobramicina i pulegona na količinu nastalog biofilma vidimo da pulegon u svim koncentracijama djeluje antagonistički i smanjuje količinu nastalog biofilma u odnosu na kulturu tretiranu samo tobramicinom. Taj rezultat odgovara rezultatu iz prvog dijela pokusa.

I u drugom dijelu ovog rada vidimo razliku između djelovanja eteričnog ulja kalaminte i pulegona. Zato treba naglasiti da cijeli rod biljnih vrsta *Calamintha* ima poprilično nestabilnu taksonomiju, te mnogo sinonima zbog čega je izrazito teško uspoređivati više istraživanja (Božović i Ragno, 2017). Kao što je i ranije naglašeno, prema određenim izvorima je karvon istaknut kao glavna sastavnica eteričnog ulja kalaminte. Karvon je također oksigenirani monoterpen s poznatom antimikrobnom aktivnošću (Monforte i sur., 2011).

Rezultati ovog rada su potvrdili teoriju koja je prisutna i u drugim studijama, a to je da je teže eradicirati već formirani biofilm, nego inhibirati stvaranje novog biofilma. Uzrok toga je već objašnjen u teoriji o toleranciji i rezistenciji koja nastaje prelaskom bakterija u stadij biofilma. U budućnosti će biti potrebno otkriti učinkovite antimikrobne lijekove koji će uspješno eradicirati biofilm. Za to će biti potrebno istražiti mehanizam nastanka biofilma, ali i mehanizam djelovanja antimikrobnih lijekova na biofilm. Pri kreiranju takve terapije bit će potreban interdisciplinarni pristup, koji će uključivati doktore medicine, ljekarnike i mikrobiologe, jer je stvaranje biofilma prije svega biološki aktivan proces, pa je i za njegovo liječenje potreban pristup iz biološke perspektive.

Ovim istraživanjem pokazano je da eterično ulje biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench i pulegon pri određenim subinhibitornim koncentracijama imaju učinak u inhibiciji rasta bakterije *P. aeruginosa* ATCC 27853, samostalno, ali i u kombinaciji s tobramicinom. S druge strane, istraživanje je također pokazalo da je učinak eteričnog ulja biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench i pulegona u kombinaciji s tobramicinom na već formirani biofilm u određenim kombinacijama suprotan, tj. promotivan. Također se pretpostavlja da je

antimikrobni učinak na planktonske stanice potpuno neovisan o učinku na biofilm. Potencijalan problem predstavlja uski raspon visokih koncentracija u kojima se iskazuje inhibitorni učinak, kao i potencijalna toksičnost tih istih koncentracija.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Eterično ulje biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench potiče bakterije na stvaranje biofilma u svim ispitivanim koncentracijama. Pri inhibitornim i višim subinhibitornim koncentracijama eterično ulje biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench ima inhibirajući učinak na planktonske stanice i smanjuje količinu nastalog biofilma. Pri nižim, subinhibitornim koncentracijama eterično ulje povećava količinu nastalog biofilma, ali ne utječe na broj planktonskih stanica.
- Pulegon pri inhibitornim i višim subinhibitornim koncentracijama ima inhibirajući učinak na planktonske stanice i smanjuje količinu nastalog biofilma. Kod primjene nižih subinhibitornih koncentracija pulegon ima promotivni učinak na rast bakterijske kulture, ali ima inhibitorni učinak na količinu nastalog biofilma.
- Tobramicin u minimalnoj inhibitornoj koncentraciji od 2 µg/mL smanjuje rast planktonskih bakterijskih stanica, ali značajno povećava količinu nastalog biofilma.
- Tobramicin u kombinaciji s eteričnim ulje biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench ima sinergistički učinak na rast planktonskih stanica, ali eterično ulje biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench ima antagonistički učinak na količinu nastalog biofilma u kombinaciji s tobramicinom. Antagonistički učinak eteričnog ulja biljne vrste *Calamintha officinalis* Moench opada smanjenjem koncentracije.
- Tobramicin u kombinaciji s pulegonom ima sinergistički učinak na rast planktonskih stanica, te u uskorm rasponu subinhibitornih koncentracija ima i sinergistički učinak na inhibiciju stvaranja biofilma. Međutim, u nižim subinhibitornim koncentracijama pulegon u kombinaciji s tobramicinom pokazuje antagonistički učinak.
- Ovaj rad će pridonijeti daljnjim naporima u pronalasku nove i očuvanju postojeće terapije za liječenje teških infekcija uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa*.

6. LITERATURA

- Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48, 5-6.
- Andričević K. Učinak eteričnog ulja vrste *Satureja montana* L. I timola na rast i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa*. *Diplomski rad*, 2019, Sveučilište u Zagrebu.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46, 446-475.
- Borges A, Abreu AC, Malheiro J, Saavedra MJ, Simões M. Biofilm prevention and control by dietary phytochemicals. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Formatex Research Center, Zurbaran, 2013
- Božović M, Ragno R. Calamintha nepeta (L.) Savi and its Main Essential Oil Constituent Pulegone: Biological Activities and Chemistry. *Molecules* 2017, 22, 290.
- Bukvički D, Cirić A, Sokolović M, Vannini L, Nissen L, Novaković M, Vujisić Lj, Asakawa Y, Marin PD. *Micromeria thymifolia* Essential Oil Suppresses Quorum-sensing Signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Prod Commun*, 2016, 11, 1903-1906.
- 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.
- Burzo I, Mihaescu D, Dobrescu A, Ambarus S, Falticeanu M, Badulescu L. Contribution to the knowledge of the composition of the essential oils from five *Calamintha* species cultivated in Romania. *Analele științifice ale Universității "Al. I. Cuza" Iași*, 2006; 52, 39-42.

- Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines (Basel)*. 2017, 4, 58.
- 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.
- Dhingra AK, Chopra B, Bhardwaj S, Dhar KL. Synthesis and Characterization of novel Pulegone derivatives as substitutes of 4-(1,1 dimethylethyl) cyclohexan-1-ol acetate. *JPR*, 2011, 4, 19-21.
- Gužvinec M, Butić I, Jelić M, Bukovski S, Lucić S, Tambić Andrašević A. Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. *Infektol glasnik*, 2012, 32, 71-80.
- 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.
- 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.
- Moattar FS, Sariri R, Giahi M, Yaghmaee P. Essential Oil Composition and Antioxidant Activity of *Calamintha officinalis* Moench. *J Appl Biotechnol Rep*, 2018, 5, 55-58.
- Monforte MT, Tzakou O, Nostro A, Zimbalatti V, Galati EM. Chemical composition and biological activities of *Calamintha officinalis* Moench essential oil. *J Med Food*, 2011, 14, 297-303.
- Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7, 39.
- Mukherji R, Prabhune A. Novel glycolipids synthesized using plant essential oils and their application in quorum sensing inhibition and as antibiofilm agents. *Scientific World J*, 2014, 1-7.
- 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.
- Oumzil H, Ghoulemi S, Rhajaoui M, Ildrissi A, Fkih-Tetouani S, Faid M, Benjouad A. Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother Res.*, 2002, 16, 727–731.
- 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.
- Sauer K. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, 2003, 4, 219.
- Savioa D, Zucca M. Clinical and Environmental *Burkholderia* Strains: Biofilm Production and Intracellular Survival. *Curr Microbiol*, 2007, 54, 440-444.

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 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.

Vitanza L, Maccelli A, Marazzato M, Scazzocchio F, Comanducci A, Fornarini S, Crestoni ME, Filippi A, Frascchetti 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.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa je oportunistički patogen, sveprisutan u okolišu, koji danas uzrokuje široki spektar po život opasnih infekcija. Ova bakterija je poseban izazov kod imunokompromitiranih pacijenata, primjerice onih s cističnom fibrozom ili s ugrađenim implantantima. Eterična ulja imaju mnoga značajna djelovanja, među kojima su antiseptičko, antibakterijsko, virustatsko, antioksidativno, antiparazitično, antimikotično i insekticidno djelovanje. Masovna upotreba antibiotika rezultirala je pojavom antimikrobne rezistencije, što je izraziti javnozdravstveni problem. Rastući interes za upotrebu esencijalnih ulja kao prirodnih antimikrobnih lijekova posebno je u porastu posljednjih godina.

Cilj ovog rada je ispitati djelovanje pulegona i eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis* Moench na stvaranje biofilma, te njihovo djelovanje u kombinaciji s tobramicinom na već formirani biofilm.

Učinak na rast bakterijske kulture je određen je mjerenjem optičke gustoće kulture pri 570 nm, dok je količina nastalog biofilma određena mjerenjem optičke gustoće pri 540 nm nakon bojanja kristal violetom. Rezultati su pokazali da su eterično ulje vrste *Calamintha officinalis* Moench pri subinhibitornim koncentracijama ima inhibirajući učinak na planktonske stanice, dok na količinu nastalog biofilma ima dvojadi učinak, i inhibirajući i promotivni, ovisno o koncentraciji eteričnog ulja. Pulegon pri subinhibitornim koncentracijama ima dvojadi učinak na rast planktonskih bakterijskih stanica, učinak je i inhibirajući i promotivni ovisno o koncentraciji, ali ipak pulegon u svim koncentracijama smanjuje količinu nastalog biofilma. Tobramicin pri koncentraciji koja odgovara njegovoj MIK vrijednosti smanjuje rast planktonskih stanica, ali povećava količinu nastalog biofilma. Eterično ulje vrste *Calamintha officinalis* Moench ima sinergistički učinak s tobramicinom na inhibiciju rasta planktonskih stanica, ali antagonizira promotivni učinak tobramicina na nastali biofilm. Pulegon u kombinaciji s tobramicinom pri subinhibitornim koncentracijama ima ponovno dvojadi učinak na rast planktonskih stanica, ali djeluje antagonistički 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 pathogen, ubiquitous in environment and causes wide range of harmful infections. This bacterium causes a difficult challenge to immunocompromised patients e.g. patients with cystic fibrosis or implants. Essential oils have many significant effects such as antiseptical, antibacterial, viral, antioxidative, antiparasitic, antifungal and insecticidal. Mass use of antibiotics has resulted in the emergence of antimicrobial resistance, which represents a public health problem. Growing interest in the use of essential oils as natural antimicrobial drugs has been encouraged by consumers who are increasingly looking for natural alternatives. The aim of this study is to examine the effect of pulegone and essential oil of *Calamintha officinalis* Moench on biofilm formation and their effect in combination with tobramycin on already formed biofilm.

The effect on bacterial growth was determined by measuring the optical density of the culture at 570 nm, while the amount of formed biofilm was determined by measuring the optical density at 540 nm after crystal violet staining. The results showed that the essential oil of *Calamintha officinalis* Moench at subinhibitory concentrations has an inhibitory effect on planktonic cells, while on the amount of formed biofilm has a dual effect, both inhibitory and promotional, depending on the concentration of essential oil. Pulegone at subinhibitory concentrations has a dual effect on the growth of planktonic bacterial cells - the effect is both inhibitory and promotional, depending on the concentration, but still pulegone in all concentrations reduces the amount of formed biofilm. Tobramycin at a concentration equal to its MIC value reduces the growth of planktonic cells, but increases the amount of formed biofilm. The essential oil of *Calamintha officinalis* Moench has a synergistic effect with tobramycin on the inhibition of planktonic cell growth, but antagonizes the promotional effect of tobramycin on the amount of formed biofilm. Pulegone in combination with tobramycin at subinhibitory concentrations again has a dual effect on planktonic cell growth, but acts antagonistically with tobramycin on the preformed biofilm. This research will contribute to efforts to find new and preserve existing therapies in the treatment of infections caused by *P. aeruginosa*.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Učinak eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis* Moench i pulegona na rast i tvorbu biofilma bakterije *P. aeruginosa*

Dora Koprivčić

SAŽETAK

Pseudomonas aeruginosa je oportunistički patogen, sveprisutan u okolišu, koji danas uzrokuje široki spektar po život opasnih infekcija. Ova bakterija je poseban izazov kod imunokompromitiranih pacijenata, primjerice onih s cističnom fibrozom ili s ugrađenim implantantima. Eterična ulja imaju mnoga značajna djelovanja, među kojima su antiseptičko, antibakterijsko, virustatsko, antioksidativno, antiparazitično, antimikotično i insekticidno djelovanje. Cilj ovog rada je ispitati djelovanje pulegona i eteričnog ulja vrste *Calamintha officinalis* Moench na stvaranje biofilma, te njihovo djelovanje u kombinaciji sa tobramicinom na već formirani biofilm. Masovna upotreba antibiotika rezultirala je pojavom antimikrobne rezistencije, što je izraziti javnozdravstveni problem. Rastući interes za upotrebu esencijalnih ulja kao prirodnih antimikrobnih lijekova posebno je u porastu posljednjih godina potaknuta jer su potrošači sve češće u potrazi za prirodnim alternativama.

Učinak na rast bakterijske kulture je određen je mjerenjem optičke gustoće kulture pri 570 nm. Dok je količina nastalog biofilma određena mjerenjem optičke gustoće pri 540 nm. Rezultati su pokazali da su eterično ulje vrste *Calamintha officinalis* Moench pri subinhibitornim koncentracijama ima inhibirajući učinak na planktonske stanice, dok na količinu nastalog biofilma ima dvojaki učinak, i inhibirajući i promotivni, ovisno o koncentraciji eteričnog ulja. Pulegon pri subinhibitornim koncentracijama ima dvojaki učinak na rast planktonskih bakterijskih stanica, učinak je i inhibirajući i promotivni ovisno o koncentraciji, ali ipak pulegon u svim koncentracijama smanjuje količinu nastalog biofilma. Tobramicin pri koncentraciji koja odgovara njegovoj MIK vrijednost smanjuje rast planktonskih stanica, ali povećava količinu nastalog biofilma. Eterično ulje vrste *Calamintha officinalis* Moench ima sinergistički učinak s tobramicinom na inhibiciju rasta planktonskih stanica, ali antagonizira promotivni učinak tobramicina na nastali biofilm. Pulegon u kombinaciji s tobramicinom pri subinhibitornim koncentracijama ima ponovno dvojaki učinak na rast planktonskih stanica, ali djeluje antagonistički 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: 49 stranica, 19 grafičkih prikaza, 2 tablice i 32 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, pulegon, *Calamintha officinalis*, eterično ulje, tobramicin, antibiofilm učinak

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

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

Dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta..

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

Rad prihvaćen: rujan 2020.

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 growth and biofilm production of *P. aeruginosa*

Dora Koprivčić

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen, ubiquitous in environment and causes wide range of harmful infections. This bacterium causes a difficult challenge to immunocompromised patients e.g. patients with cystic fibrosis or implants. Essential oils have many significant effects such as antiseptical, antibacterial, viral, antioxidative, antiparasitic, antifungal and insecticidal. The aim of this study is to examine the effect of pulegone and essential oil of *Calamintha officinalis* Moench on biofilm formation and their effect in combination with tobramycin on already formed biofilm. Mass use of antibiotics has resulted in the emergence of antimicrobial resistance, which represents a public health issue. Growing interest in the use of essential oils as natural antimicrobial drugs has been encouraged by consumers who are increasingly looking for natural alternatives.

The effect on bacterial growth was determined by measuring the optical density of the culture at 570 nm., while the amount of formed biofilm was determined by measuring the optical density at 540 nm. The results showed that the essential oil of *Calamintha officinalis* Moench at subinhibitory concentrations has an inhibitory effect on planktonic cells, while the amount of formed biofilm has a dual effect, both inhibitory and promotional, depending on the concentration of essential oil. Pulegone at subinhibitory concentrations has a dual effect on the growth of planktonic bacterial cells the effect is both inhibitory and promotional, depending on the concentration, but still pulegone in all concentrations reduces the amount of formed biofilm. Tobramycin at a concentration equal its MIC value reduces the growth of planktonic cells, but increases the amount of biofilm formed. The essential oil of *Calamintha officinalis* Moench has a synergistic effect with tobramycin on the inhibition of planktonic cell growth, but antagonizes the promotional effect of tobramycin on the amount of formed biofilm. Pulegone in combination with tobramycin at subinhibitory concentrations again has a dual effect on planktonic cell growth, but acts antagonistically with tobramycin on the previously formed biofilm. This research will contribute to efforts to find new and preserve existing therapies in the treatment of infections caused by *P. aeruginosa*.

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

Thesis includes: 49 pages, 19 figures, 2 tables and 32 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, *Calamintha officinalis*, pulegone, 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
Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Daniela Jakšić, Ph.D. Postdoctorand, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.

