
Marko Barić

Uticaj timola na membransku permeabilnost i antibiotsku osetljivost *E. coli*

*Sve je veće interesovanje za upotrebu antimikrobnih supstanci ekstrahovanih iz biljaka u formi esencijalnih ulja, koje bi mogle da posluže kao alternativni izvor novih lekova. Među njima, najveću antimikrobnu aktivnost pokazuju ona ulja koja sadrže u velikim koncentracijama fenolne komponente poput timola. Cilj ovog rada bio je da se ispita uticaj timola na membransku permeabilnost kod *E. coli* i antibiotsku osetljivost. Permeabilnost citoplazmatske membrane ispitana je konfokalnom mikroskopijom, a uticaj timola na antibiotsku toleranciju ispitan je postavljanjem antibiogram testa. Dobijeni rezultati ukazuju na povećanu permeabilnost ćelijske membrane, kao i povećanu osetljivost tretiranih bakterija na aminoglikozide.*

Uvod

Escherichia coli je gram-negativna bakterija koja pripada familiji Enterobacteriaceae. Sojevi ove bakterije dele se na apatogene, uslovno patogene i patogene. Uslovno patogeni sojevi bakterije *E. coli* su stanovnici gastrointestinalnog trakta, a u patogene sojeve ubrajaju se oni koji uzrokuju bolesti različitih organskih sistema (gastrointestinalni i urinarni).

Sa povećanjem broja mikroorganizama rezistentnih na antibiotike, raste potreba za razvojem novih metoda za odbranu od istih. Jedno od mogućih rešenja jeste kombinovanje postojećih antibiotika sa esencijalnim uljima ekstrahovanim iz biljaka, koja u velikim koncentracijama sadrže fenolne komponente kao što su karvakrol, eugenol i timol, zbog njihovog potencijalnog siner-

gističkog delovanja. Mnoga istraživanja pokazala su aditivna ili sinergistička dejstva između esencijalnih ulja i već poznatih antibiotika, potencijalno redukujući potrebu za prekomernom upotrebom antibiotika (Langeveld *et al.* 2014). Timol je monoterpenoidni fenol u esencijalnim uljima ekstrahovanim prvobitno iz biljaka porodice Lamiaceae, a kasnije i Verbenaceae, Scrophulariaceae, Ranunculaceae, i Apiaceae. Strukturalno je veoma sličan karvakrolu za koga je poznato da iskazuje jako antimikrobno dejstvo (Marchese *et al.* 2016). Na osnovu hemijskih karakteristika i mehanizama dejstva drugih fenola, može se pretpostaviti timolov mehanizam delovanja. On podrazumeva narušavanje integriteta ćelijske membrane i transporta materija kroz nju, kao i povećanje njene permeabilnosti (Burt 2004). Smatra se da tretiranje ćelija esencijalnim uljima dovodi do povećanja količine nezasićenih masnih kiselina, povećavajući razmak između fosfolipida membrane, a samim tim i njenu fluidnost, i permeabilnost (Nazzaro *et al.* 2013).

Aminoglikozidni antibiotici, kao što su gentamicin, amikacin ili streptomycin, primenjuju se u lečenju infektivnih oboljenja već nekoliko decenija, međutim u poslednje vreme su sve manje u upotrebi, zbog velikog broja bakterija koje su na njih rezistentne. Mehanizam dejstva aminoglikozida podrazumeva ulazak u ćeliju, prolazak kroz ćelijsku membranu, a zatim vezivanje za 30s subjedinice ribozoma i narušavanje sinteze proteina (Leggett *et al.* 2017).

Cilj ovog rada je bio ispitivanje uticaja povećane membranske permeabilnosti uzrokovane timolom na osetljivost *E. coli* na antibiotike iz grupe aminoglikozida, beta laktamske antibiotike, hloramfenikol i antiseptike.

Marko Barić (2000) Svetozar Miletić, Somborska 10, učenik 3. razreda Srednje medicinske škole u Subotici

MENTOR: Nikola Mitović, student treće godine Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

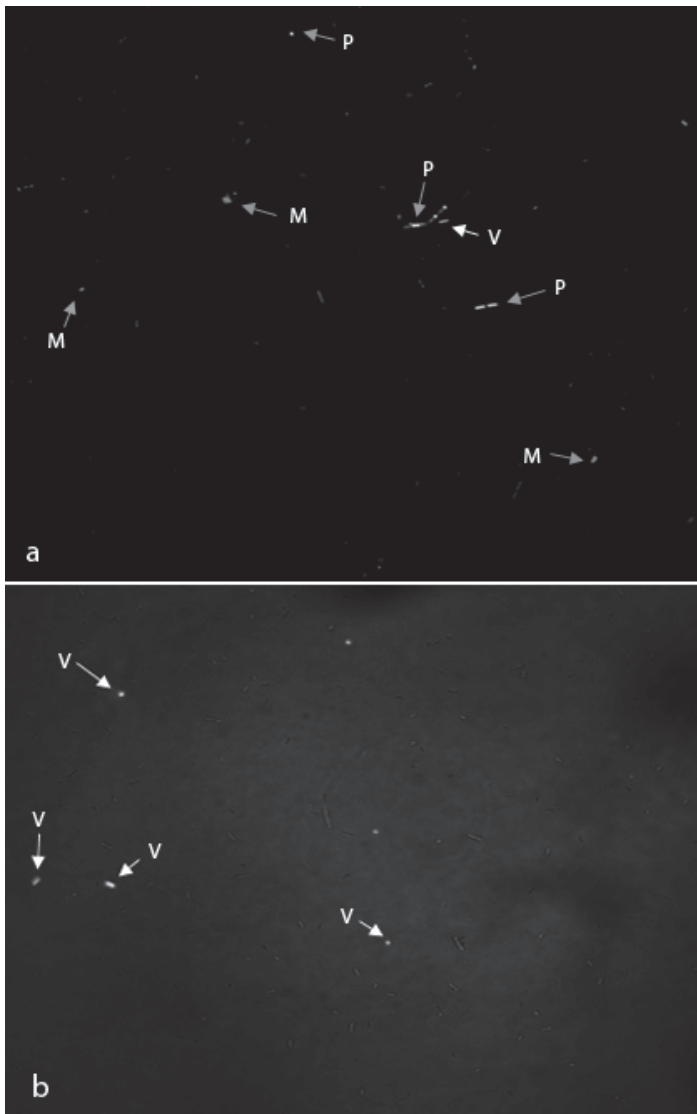
Materijal i metode

Ispitivanja su rađena na *E. Coli*, uzgajanoj na LB podlozi. Za izradu antibiograma korišćene su Mueller-Hinton podloge i diskovi impregnirani antibioticima iz grupe aminoglikozida (gentamicin koncentracije 15 µg/mL), beta laktamskih antibiotika (cefpodoxime), antiseptika (pipedinska kiselina) i antibiotika koji deluju na 50s subjedinicu ribozoma (chloramphenicol).

Napravljeno je 300 mL bioreaktora sa LB podlogom u koju je inokulisana *E. coli*, sa ras-

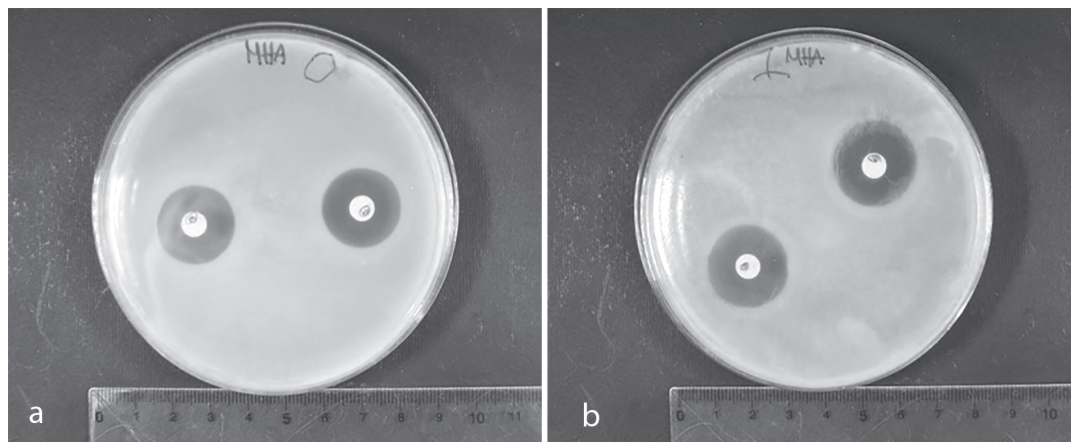
tvorom timola u koncentraciji 0.4 µg/mL, rastvorenom u 1.5% DMSO. Bioreaktor je stavljen na klackalicu u inkubator radi obezbeđivanja konstantnog mešanja i aerisanja svih bakterija u bioreaktoru.

Vizuelizacija permeabilneta. Konfokalnom mikroskopijom ispitana je permeabilnost citoplazmatske membrane kod bakterijskih kultura tretiranih subinhibitornom dozom timola. Preparati za konfokalnu mikroskopiju pripremljeni su dodajući u 1 mL kulture bakterija iz bioreaktora 10 µL cyber green boje i 15 µL propidijum jodida, rastvorenog u 1 M tris-HCl-u u



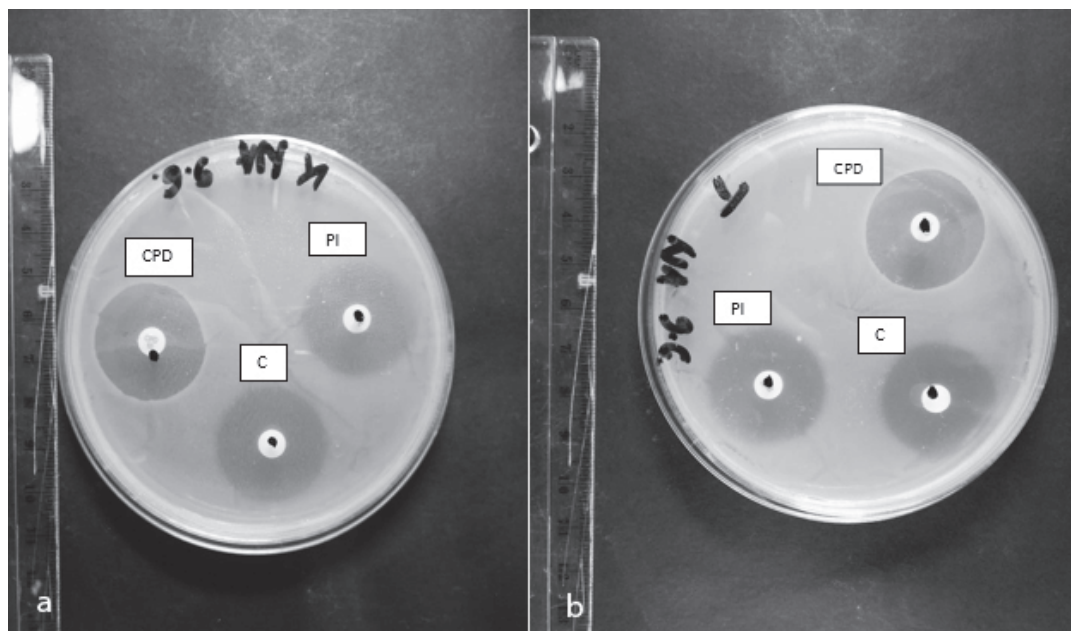
Slika 1. Rezultati konfokalne mikroskopije timolom tretiranih kultura (a) i kontrolnih grupa (b). Strelicama su označene ćelije kod kojih je permeabilnost membrane povećana (P), vijabilne ćelije (V) i mrtve ćelije (C).

Figure 1. Confocal microscopy of bacterial cultures treated with thymol (a) and control groups (b). Cells with increased membrane permeability are labeled with the letter P, viable cells with the letter V and dead cells with the letter C.



Slika 2. a) Antibiogram dobijen koristeći timolom netretirane kulture *E. coli* i gentamicin;
 b) Antibiogram dobijen koristeći kulture *E. coli* tretirane subinhibitornom koncentracijom timola i gentamicin.

Figure 2. a) Antibiograms made using *E. coli* cultures and gentamicin;
 b) Antibiograms made using gentamicin and *E. coli* cultures treated with subinhibitory concentrations of thymol.



Slika 3. Antibiogrami dobijeni za kontrolne grupe (a) i grupe tretirane subinhibitornom koncentracijom timola (b) koristeći antibiotike: CPD – cefalosporine (cefepodoxime), C – hloramfenikol i PI – pipemidinsku kiselinu.

Figure 3. Antibiograms made using control groups (a) and cultures treated with subinhibitory concentrations of thymol (b), using the antibiotics: CPD – cephalosporine (cefepodoxime), C – chloramphenicol and PI – pipemidic acid.

koncentraciji 1 mg/mL. Uzorak je vorteksovao i stavljen na inkubaciju 10 minuta. Isto je ponovljeno sa kontrolnom grupom, to jest bakterijskim kulturama netretiranih timolom. Finalni uzorci pripremljeni su stavljanjem kapi iz oba uzorka na po dva pokrovna stakalca, koja su zatim pokrivena predmetnim staklom. Preparati su posmatrani na konfokalnom mikroskopu, na 450–490 nm (Kirchhoff i Cypionka 2017).

Uticaj timola na antibiotsku osetljivost. Uticaj timola na osetljivost bakterija na antibiotike ispitan je metodom antibiograma, postavljajući diskove sa antibioticima iz grupe aminoglikozida (gentamicin), cefalosporina (cefpodoxime), pipemidinske kiseline i hloramfenikola i upoređivanjem zona inhibicije kod timolom tretiranih kultura i kontrolne grupe. Svi antibiogrami rađeni su u triplikatima, a zone inhibicije merene koristeći program ImageJ.

Rezultati

Vizuelizacija permeabiliteta. Konfokalnom mikroskopijom potvrđeno je da timol u subinhibitornoj koncentraciji dovodi do poremećaja integriteta ćelijske membrane i povećanja njene permeabilnosti, što je omogućilo prodor propidijum jodida u ćelije (slika 1). Obe korišćene boje vezuju se za bakterijsku DNK, međutim cyber green boja deluje prolazeći kroz membrane ćelija, bez obzira na stepen njihove permeabilnosti, dok propidijum jodid prolazi isključivo kroz oštećene membrane. Bakterijske ćelije sa povećanjem permeabilnosti plazmatske membrane obojene su u narandžasto-crvenu boju, dok su vijabilne bakterije zelene.

Uticaj timola na antibiotsku osetljivost. Merenja zone inhibicije na antibiogramima rađena su pomoću programa ImageJ. Dobijeni rezultati ukazuju na povećanje osetljivosti na gentamicin kod kultura tretiranih timolom (slika 2). S druge strane, antibiogrami u kojima je korišćen cefalosporin (cefpodoxime), pipemidinska kiselina i hloramfenikol ne pokazuju povećanje zone inhibicije kod timolom tretiranih kultura (slika 3).

Diskusija i zaključak

Dobijeni rezultati ukazuju na povećanje antibiotske osetljivosti na gentamicin kod bakterija tretiranih subinhibitornom koncentracijom ti-

mola. Potencijalno objašnjenje za povećanu osetljivost jeste lakši prodor aminoglikozida kroz citoplazmatsku membranu, izazvan narušavanjem protonske motorne sile, zbog povećanog efluksa protona u uslovima povećane permeabilnosti. Iako tačan mehanizam prodora aminoglikozida kroz citoplazmatsku membranu još uvek nije poznat, zna se da je on energetski zavisao i da povećanje protonske motorne sile dovodi do ubrzanog infliksa molekula aminoglikozida u ćeliju (Allison *et al.* 2011). Povećana membranska permeabilnost verovatno je rezultat insercije timola u lipidni dvosloj, što narušava strukturu membrane i dovodi do povećanog efluksa protona i jona kalijuma, i narušava membranski potencijal. Zona inhibicije kod cefalosporina ostaje nepromenjena, što je i očekivano, i objašnjivo samim mehanizmom dejstva cefalosporina, koji podrazumeva vezivanje za peptidyl-D-Ala4-D-Ala5 ekstremitete prekursora peptidoglikana na površini ćelije (Mainardi *et al.* 2008). Hloramfenikol deluje vezivanjem za 50s subjedinicu ribozoma i na taj način remeti sintezu proteina. Još uvek nije poznat tačan mehanizam infliksa hloramfenikola u ćeliju, međutim poznato je da povećanje koncentracije magnezijumovog jona negativno utiče na njegov transport kroz ćelijsku membranu. Jedan od pretpostavljenih mehanizama njegovog transporta jeste prosta difuzija kroz ćelijsku membranu (Abdel-Sayed 1987). Rezultati našeg rada, međutim, ukazuju da sâmo povećanje membranske permeabilnosti ne dovodi do povećanja osetljivosti bakterija na hloramfenikol.

U ovom istraživanju, rezultati upućuju na to da timol utiče na osetljivost *E. coli* na antibiotike iz grupa aminoglikozida povećavanjem permeabiliteta ćelijske membrane olakšavajući ulazak aminoglikozida u ćeliju.

Literatura

Abdel-Sayed S. 1987. Transport of chloramphenicol into sensitive strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **19** (1): 7.

Allison K. R., Brynildsen M. P., Collins J. J. 2011. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*, **473** (7346): 216.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International journal of food microbiology*, **94** (3): 223.

Kirchhoff C., Cypionka H. 2017. Propidium ion enters viable cells with high membrane potential during live-dead staining. *Journal of microbiological methods*, **142**: 79.

Langeveld W. T., Veldhuizen E.J., Burt S. A. 2014. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical reviews in microbiology*, **40** (1): 76-94.

Leggett E. J. 2017. Aminoglycosides. U *Infectious Diseases* (ur. J. Cohen *et al.*), volume 2. Elsevier, str. 1233-1238.

Mainardi J. L., Villet R., Bugg T. D., Mayer C., Arthur M. 2008. Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS microbiology reviews*, **32** (2): 386.

Marchese A., Orhan I. E., Daglia M., Barbieri R., Di Lorenzo A., Nabavi S. F., et al. 2016. Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. *Food chemistry*, **210**: 402.

Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, **6** (12): 1451.

Marko Barić

Effect of Thymol on Membrane Permeability and Antibiotic Susceptibility of *E. coli*

There is an ever growing interest for the use of antimicrobial substances extracted from plants in the form of essential oils that could potentially be an alternative source of medicaments. Essential oils extracted from plants exhibiting the strongest antimicrobial activity contain a high concentration of phenolic compounds such as thymol. The aim of this project was to examine the effect of thymol on membrane permeability and the antibiotic susceptibility of *E. coli*. Membrane permeability was studied using confocal microscopy, and antibiotic susceptibility was studied using antibiogram tests. The results indicate an increase in membrane permeability caused by thymol and antibiotic susceptibility of bacteria to aminoglycosides. 