

Брага П. К.

---

Миланский университет - Италия  
Факультет фармакологии, медицинский колледж

## **Тимол: антибактериальная, противогрибковая и антиоксидантная активность**

Адгезия – существенная предпосылка для патогенеза бактериальных и грибковых инфекций, так как микроорганизмы должны закрепиться на клетках слизистой оболочки, чтобы размножиться и создать колонии, прежде чем могут быть обнаружены определенные симптомы заболевания. Это особенно верно в случае женских мочеполовых инфекций, таких как инфекции мочевыводящих путей, бактериальный вагиноз и вагинит. Сообщалось, что тимол, компонент эфирного масла тимьяна, оказывает определенное действие на различные микроорганизмы и может влиять на адгезивность микроорганизмов, главный определяющий фактор бактериальной и грибковой вирулентности. Тимол значительно уменьшает адгезию *Escherichia coli* к эпителиальным клеткам влагалища при концентрациях в пределах от 1/2 МПК (минимальной подавляющей концентрации) до 1/32 МПК, а также адгезию *Staphylococcus aureus* при концентрациях в пределах от 1/2 МПК до 1/16 МПК. *Candida albicans* особенно приспособлены к закреплению на эпителиальных клетках влагалища (ЭКВ), эндотелиальных клетках, растворимых факторах и внеклеточном матриксе, но их инкубация с тимолом уменьшает их адгезию к ЭКВ в диапазоне концентраций тимолола от 1/2 МПК до 1/8 МПК, причем просматривается существенная линейная зависимость.

Производные фенола, в частности, тимол, также играют важную роль ввиду его антиоксидантной активности. Во время дыхательных выбросов и цитолиза микроорганизмов нейтрофилы продуцируют реактивные разновидности кислорода, выпуск которых может вызвать окислительный стресс и повреждение тканей. Использование люминол-зависимой хемилюминесценции показало, что тимол, инкубированный с человеческими нейтрофилами, значительно уменьшает выброс окислителя – до 2,73  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , это очень низкая концентрация.

Наряду с другими результатами, имеющими отношение к адгезии бактерий и грибов, антиоксидантная активность тимолола полезна для выработки стратегии защиты против вагиноза и вагинита. Проявление одной молекулой всех трех видов активности – антибактериальной, противогрибковой и антиоксидантной – может дать и синергетические эффекты.

В целом, антибиотики и микостатики хорошо работают против бактериальных или грибковых инфекций, но прогрессивный рост сопротивляемости бактерий и грибов стимулировал поиск новых терапевтических подходов.

Многие исследователи сконцентрировались на изучении эфирных масел растений, поскольку сначала эмпирически, а теперь и с научным обоснованием было обнаружено, что они действуют на микроорганизмы тем или иным способом (1-5).

За прошлые 20 лет было выполнено – с использованием современных фармакологических методов – более 600 исследований, которые подтвердили противомикробное действие эфирных масел в отношении различных бактерий и грибов (1). Эфирные масла растений представляют собой очень сложные смеси различных компонентов (терпены, альдегиды, спирты, ациклические сложные эфиры и т. д.), относящиеся к разным хемотипам. Во многих исследованиях было показано, что эфирные масла тимьяна обладают сильным противомикробным действием (6-10), главным образом, из-за высокого содержания в них фенола (7, 11, 12).

Тимол, один из основных компонентов тимьянового масла с фенольной структурой, обладает полезной противомикробной активностью в отношении различных микроорганизмов (1, 13, 14), но его способность влиять на такой важный определяющий фактор вирулентности, как бактериальная и грибковая адгезивность, еще не исследована. Изучение адгезии бактерий и грибов к слизистым оболочкам человека очень важно, так как адгезия способствует выживанию огромного количества микроорганизмов, обитающих в среде. Недавно было клинически подтверждено, что при отсутствии адгезии ни бактерии, ни грибки не могут расти и формировать колонии, а если нет колонизации, то нет инфекции и нет болезни (15, 16).

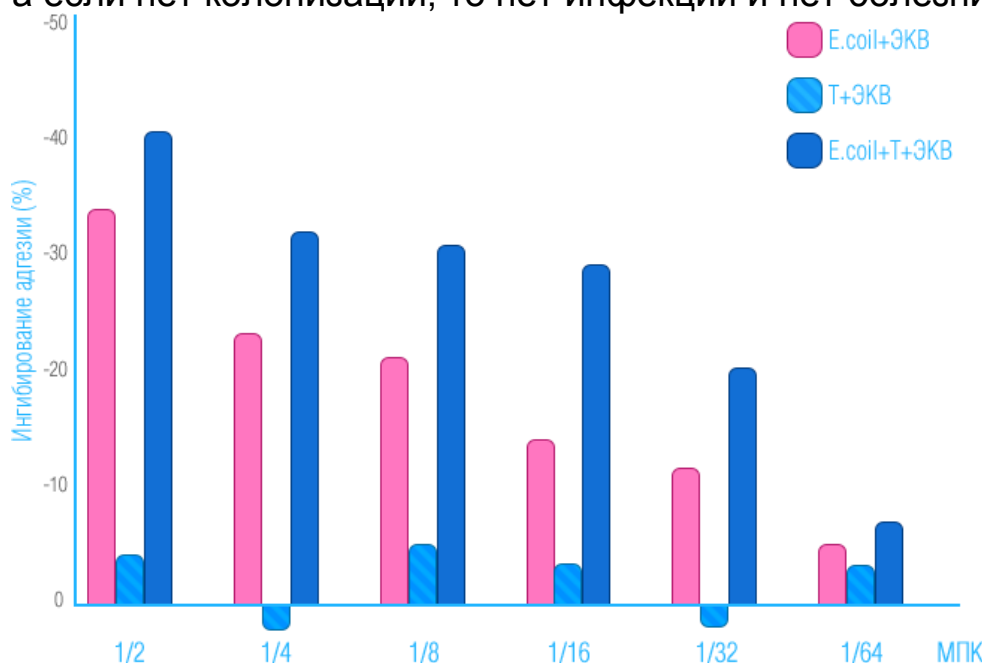


Рис. 1 – Зависимость степени уменьшения адгезии *E. coli* к вагинальным клеткам от концентрации тимола (при разных концентрациях ниже МПК).

Поскольку поверхности слизистых оболочек в мочеполовых, дыхательных и желудочно-кишечных путях являются основными путями проникновения микроорганизмов и участками, к которым они могут прикрепиться и зафиксироваться в человеческом организме, патогенные механизмы бактериальной и грибковой адгезии были широко изучены.

Сейчас общепризнано, что бактериальная и грибковая адгезия к эпителиальным клеткам слизистой оболочки является основной предпосылкой и обязательным первым шагом в патогенезе многих бактериальных и грибковых инфекций. Это особенно верно в случае женских мочеполовых инфекций, таких как инфекции мочевыводящих путей, бактериальный вагиноз и вагинит (17).

При нормальных условиях микрофлора влагалища здоровых женщин представляет собой естественную экосистему, в которой патогенные и непатогенные микроорганизмы сбалансированы. От инфекций мочевыводящих путей, бактериального вагиноза и дрожжевого вагинита страдает приблизительно 1 000 000 000 человек в мире каждый год (17). Способствует этому нарушение экологического баланса местной микрофлоры и колонизация микроорганизмов в промежности, влагалище и периуретральных областях, с дальнейшим распространением на мочевой пузырь. Один из общих подходов к исправлению этой ситуации – использование антибиотиков или микостатиков, которые пока ещё могут уменьшать адгезию бактерий и грибов к клеткам слизистых оболочек человека (15, 16) даже при концентрациях ниже подавляющих.

Тем же самым методом было исследовано влияние тимола на адгезию бактерий и грибов к эпителиальным клеткам влагалища (ЭКВ).

В первом исследовании адгезии грамотрицательных и грамположительных бактерий значения МПК тимола для трех штаммов *Escherichia coli* варьировались от 125 до 245  $\mu\text{г}/\text{мл}$  (среднее  $\pm$  SD=  $181\pm 60$   $\mu\text{г}/\text{мл}$ ), а МПК для трех штаммов *Staphylococcus aureus* составляла 175  $\mu\text{г}/\text{мл}$ . Эти значения МПК имеют тот же порядок, как и значения 100  $\mu\text{г}/\text{мл}$  (13\_15) и 250  $\mu\text{г}/\text{мл}$  (18), полученные другими авторами.

Учитывая различные начальные значения адгезии разных штаммов, базовые значения адгезии были нормализованы к 100, а результаты были выражены в процентах. На рисунке 1 показано влияние разных концентраций тимола ниже МПК на адгезию *E. coli* к человеческим ЭКВ. Концентрация 1/2 МПК вызвала самое большое подавление, а с уменьшением концентрации тимола от 1/2 до 1/64 МПК

адгезия постепенно восстанавливалась до начального уровня. Различия были статистически значимыми в диапазоне концентраций от 1/2 МПК до 1/32 МПК. На Рис. 1 также показаны результаты, полученные при инкубации ЭКВ с разными концентрациями тимола ниже МПК перед [инкубацией] с необработанными *E. coli*. В этом случае адгезия бактерий существенно не отличалась от контрольных значений. Это свидетельствует о том, что тимол не действует на вагинальные клеточные рецепторы.

В третьей серии экспериментов, где *E. coli*, вагинальные клетки и тимол инкубировались вместе, было обнаружено значительное уменьшение адгезии при концентрациях тимола между 1/2 МПК и 1/32 МПК (Рис. 1) (19). На Рис. 2А и 2В представлены снимки, полученные на сканирующем электронном микрографе. На них показаны примеры адгезии *E. coli* на человеческих ЭКВ при базовых условиях (без тимола) и когда бактерии и клетки инкубировались с тимолом при концентрации тимола 1/2 МПК (19).

Уменьшение адгезии наблюдалось также в случае штаммов *S. aureus*. Как и ожидалось, концентрации тимола 1/2 МПК (Рис. 3) вызвали самое большое уменьшение, но степень уменьшения оставалась статистически значимой только до концентрации 1/16. Действие тимола на клетки ЭКВ (перед их инкубацией с необработанными *S. aureus*) не привело к изменению адгезии по сравнению с контрольными значениями, а при совместной инкубации *S. aureus*, вагинальных клеток и тимола уменьшение адгезии было значительным в диапазоне концентраций тимола от 1/2 МПК до 1/16 МПК (рис. 3) (19). На Рис. 4А и 4В представлены снимки, полученные на сканирующем электронном микрографе. На них показаны примеры адгезии *S. aureus* на человеческих ЭКВ при базовых условиях (без тимола) и когда бактерии и клетки инкубировались с тимолом при концентрации тимола 1/2 МПК (19).

*Тимол: антибактериальная, противогрибковая и антиоксидантная активность*

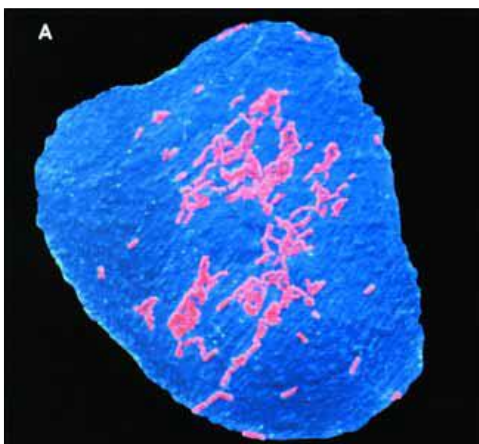


Рис 2. А) Снимок, полученный на сканирующем электронном микрографе (СЭМ). В отсутствии тимола на вагинальных эпителиальных клетках наблюдается большое число закрепившихся *E. coli*.

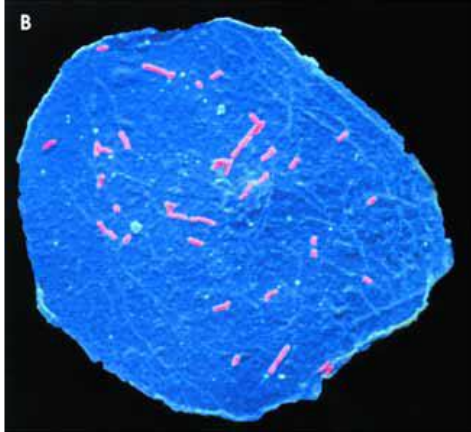


Рис. 2 В) Пример значительного сокращения количества закрепившихся *E. coli*. после инкубации с тимолом при концентрации 1/2 МПК.

Такая же методология использовалась для оценки влияния тимола на адгезию четырех штаммов *Candida albicans* к вагинальным эпителиальным клеткам. Для трех штаммов значения МПК тимола были 125  $\mu\text{г/мл}$ , а для одного штамма – 150  $\mu\text{г/мл}$  (среднее значение равно 131,25  $\pm$  12,5  $\mu\text{г/мл}$ ). Когда тимол с концентрацией ниже МПК инкубировали с ЭКВ, а затем эти клетки ЭКВ инкубировали с необработанными *Candida albicans*, адгезия всех штаммов существенно не отличалась от контрольных значений. Это свидетельствует о том, что тимол не действует на вагинальные клеточные рецепторы (рис. 5). Во второй серии экспериментов уменьшение адгезивности было максимальным при концентрации тимола  $\frac{1}{2}$  МПК, а с уменьшением концентрации тимола уровень адгезии постепенно восстанавливался до средних контрольных значений. Значительное уменьшение среднего количества клеток *Candida*, закрепившихся на ЭКВ, наблюдалось до концентрации тимола  $\frac{1}{8}$  МПК (рис. 5). В заключительной серии экспериментов, в которых совместно инкубировались штаммы *Candida*, ЭКВ и тимол, самое большое уменьшение адгезии вызвала концентрация тимола  $\frac{1}{2}$  МПК, а степень уменьшения оставалась статистически значимой до  $\frac{1}{8}$  МПК (рис. 5) (20).

На Рис. 6А и 6В представлены снимки, полученные на сканирующем электронном микрографе. На них показаны примеры адгезии *Candida spp* на человеческих ЭКВ при базовых условиях (без тимола) и когда грибки и клетки инкубировались стимулом при концентрации тимола  $\frac{1}{2}$  МПК (20).

Продукты, содержащие эфирное масло растений и предназначенные для нормализации состояния микрофлоры влагалища, теперь доступны в Великобритании, США, Австралии и Европе (21, 22, 23).

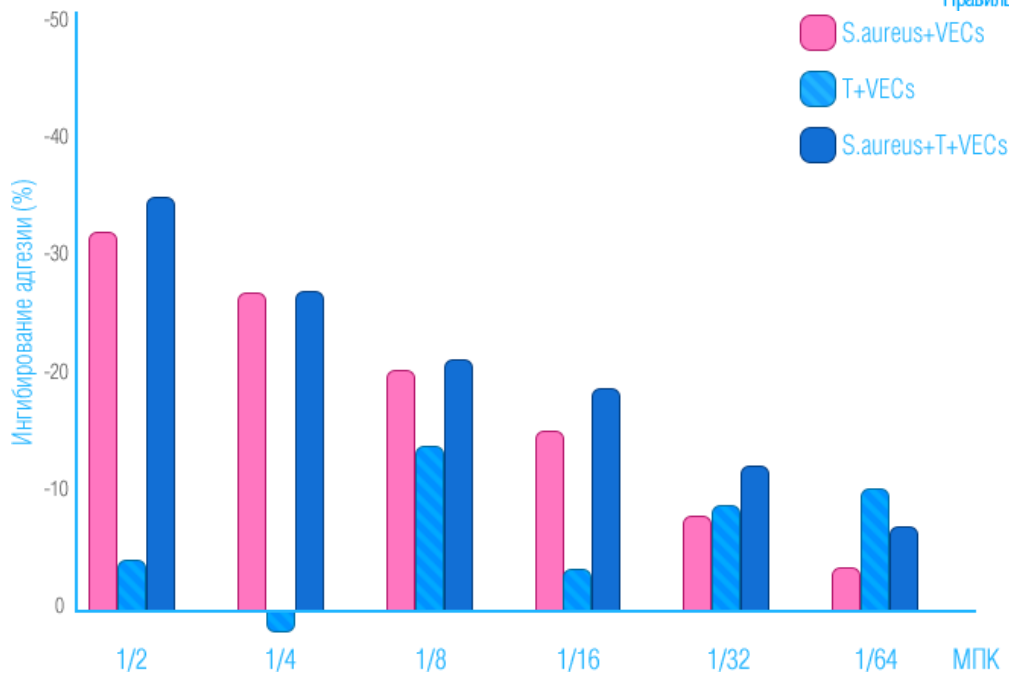


Рис. 3 Зависимость степени уменьшения адгезии S.aureus к вагинальным клеткам от концентрации тимола (при разных концентрациях ниже МПК).

Монотерпены – вещества, полученные присоединением к изопрен-hydrocarbure (2-метил-1,3-бутадиену) двух или более молекул изопрена (24). Они могут быть найдены в составе многих эфирных масел, включая тимол. Интерес к выделенным монотерпенам рос из-за их полезных фармакологических свойств, и особенно это относится к тимолу, который широко известен как противомикробный и противогрибковый агент (24).

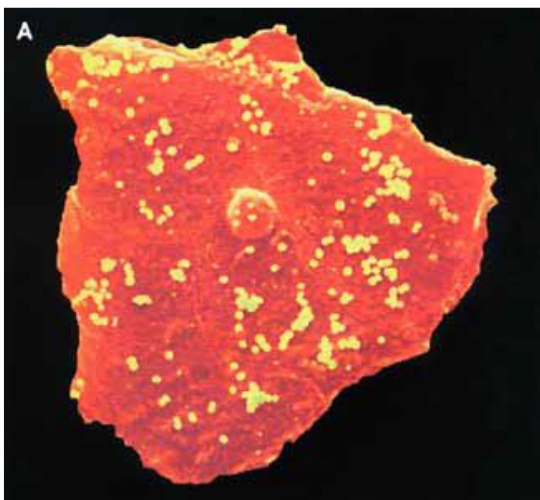


Рис 4. А) Снимок, полученный на сканирующем электронном микрографе (СЭМ). В отсутствии тимола на вагинальных эпителиальных клетках наблюдается большое число закрепившихся S.aureus.

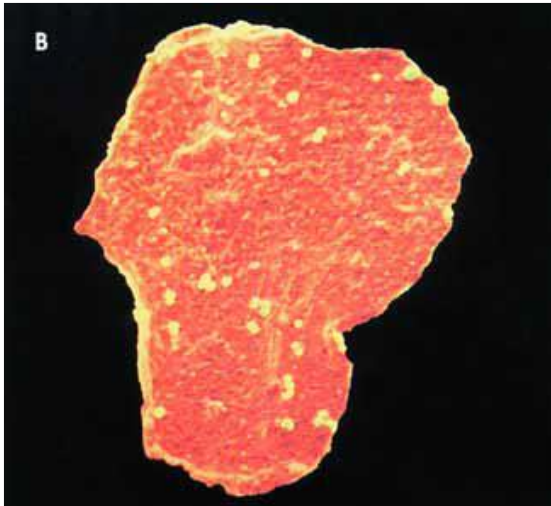


Рис. 4 В) Пример значительного сокращения количества закрепившихся *S.aureus* после инкубации с тимолом при концентрации 1/2 МПК.

С биофизической точки зрения тимол обладает амфипатическими и/или гидрофобными свойствами, что предполагает его способность действовать на структуру клеточных мембран и электростатику поверхности, приводя, таким образом, к асимметрии в жесткости мембраны (24). Это предположение было подтверждено наблюдением, что терпены внедряются между жирными цепями ацилов, формируя двойной липидный слой мембраны (25, 26), нарушают липидную упаковку и вызывают изменения в свойствах и функциях мембраны (26, 27, 28), увеличивая ее текучесть и изменяя ее проницаемость (28, 29). Терпены также подавляют дыхание в *Candida*, оказывая неблагоприятное действие на митохондрии (28).

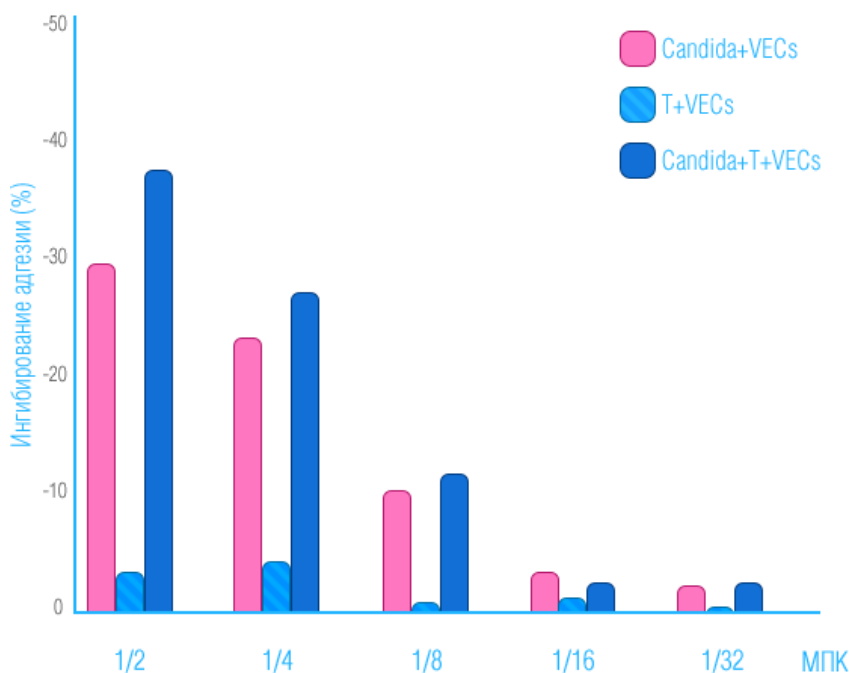


Рис. 5 Зависимость степени уменьшения адгезии *S.albicans* к вагинальным клеткам от концентрации тимола (при разных концентрациях ниже МПК).



Поскольку бактериальные и грибковые клетки должны сохранять свою структуру нетронутой и должны иметь подходящий поверхностный волокнистый слой, чтобы закрепляться на клетках (30, 31, 32), любое вещество, которое изменяет их структуру (тимол – в данном случае), способно также изменить их адгезивность.

Наши результаты показывают, что концентрации тимола ниже МПК могут повлиять на механизмы адгезии бактерий и грибов к человеческим ЭКВ (19, 20).

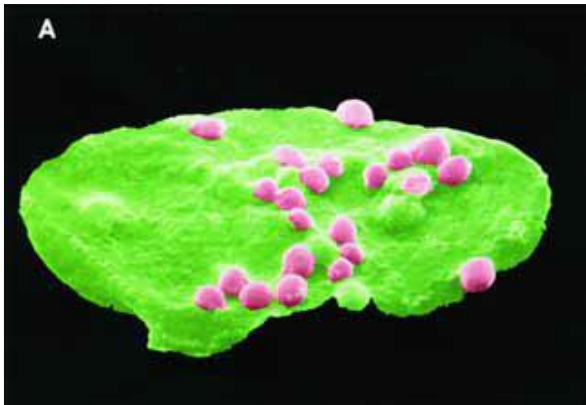


Рис 6. А) Снимок, полученный на сканирующем электронном микрографе. В отсутствие тимола на вагинальных эпителиальных клетках наблюдается большое число закрепившихся *C. albicans*.

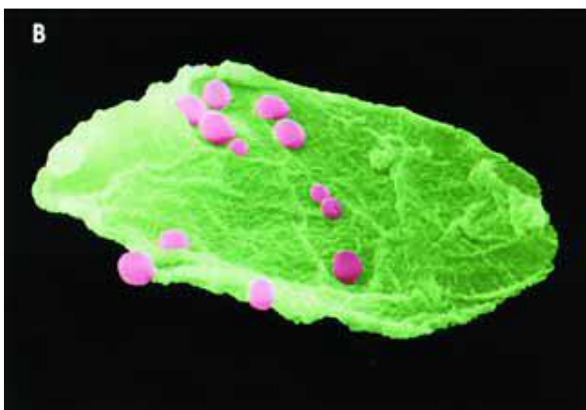


Рис. 6 В) Пример значительного сокращения количества закрепившихся клеток *C. albicans* после инкубации с тимолом при концентрации 1/2 МПК.

Производные фенола, такие, как тимол, проявляют также антиоксидантную активность. Это важно, потому что бактериальная или грибковая инфекция обычно приводит к пополнению полиморфно-ядерных нейтрофилов (PMNs), главных переносчиков воспаления в клетке. Во время дыхательных выбросов и цитолиза микроорганизмов, PMNs продуцируют реактивные разновидности кислорода, выпуск которых может вызвать окислительный стресс и повреждение тканей.

Таким образом, терапевтические стратегии уменьшения повреждения клеток от действия окислителей во время воспаления и дыхательного выброса PMN включают устранение причины, усиление внутриклеточной противокислительной системы и введение антиоксидантных агентов. Этот последний подход интересен тем, что может быть легко принят, и поэтому мы исследовали, может ли тимол

повлиять на продуцирование O<sub>2</sub> и на реактивные разновидности кислорода, выпущенные во время дыхательных выбросов нейтрофилами. Для исследования использовался метод люминол-зависимой хемилюминесценции, а в качестве стимулирующего агента – растворимый N-формил-метионил-лейцил-фенила-ланин (fMLP).

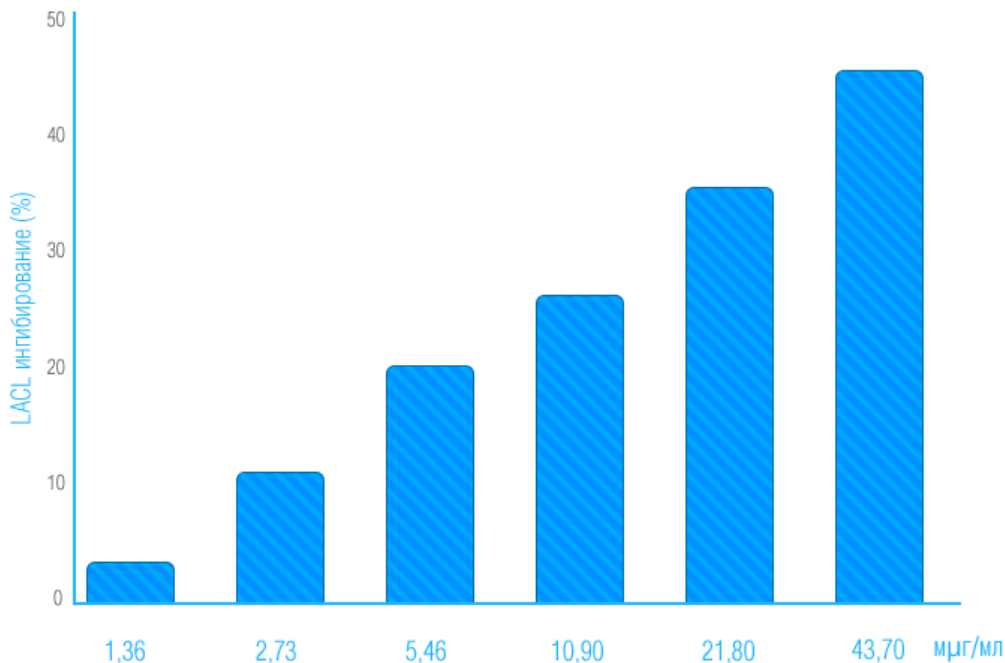


Рис. 7 Влияние различных концентраций тимола на LACL дыхательного выброса PMN при стимуляции fMLP.

Тимол, инкубированный с человеческими нейтрофилами, значительно уменьшил окислительные выбросы до 2,73 мг/мл, это очень низкая концентрация (рис. 7) (33).

Антиоксидантная активность тимола приписывается его фенольной структуре (34, 35, 36, 37), а противooksидлительная активность самих фенольных соединений объясняется их окислительно-восстановительными свойствами, которые могут играть важную роль в адсорбировании и нейтрализации свободных радикалов или разложении пероксидов (37). Карвакрол – еще одно вещество с фенольной структурой, найденное в различных концентрациях в эфирных маслах разновидностей тимьяна. Он также обладает противooksидлительной активностью (34, 35, 36, 37). Наряду с другими результатами, имеющими отношение к адгезии бактерий и грибов, антиоксидантная активность тимола полезна для выработки стратегии защиты при вагинозе и вагините с использованием новых препаратов вместо антибиотиков или микостатиков, так как проявление одной молекулой всех трех видов активности – антибактериальной, противогрибковой и антиоксидантной – может дать и синергетические эффекты.

## ССЫЛКИ

- HAMMER K.A., CARBON C.F., RILEY T.V.: *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*. J Appl Microbiol, 86:985-990, 1999.
- DORMAN H.J.D., DEANS S.G.: *Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils*. J Appl Microbiol, 88:308-316, 2000.
- KALEMBA D., KUNICKA A.: *Antibacterial and antifungal properties of essential oils*. Curr Med Chem, 10:813-829, 2003.
- SMITH-PALMER A., STEWART J., FYFE L.: *Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against fire important food-borne pathogens*. Lett Appl Microbiol, 26:118-122, 1998.
- HULIN V., MATHOT A.G., MAFART P.D.L.: *Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes*. Science Aliments, 18:563-582, 1998.
- RASOOLI I., MIRMOSTAFA S.A.: *Antibacterial properties of Thymus pubescens and Thymus serpyllum essential oils*. Fitoterapia, 73:244-250, 2002.
- COSENTINO S., TUBEROSO C.I.G., PISANO B., et al.: *In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils*. Lett Appl Microbiol, 29:130-135, 1999.
- MARINO M., BERSANI C., COMI G.: *Antimicrobial activity of the essential oils of Tymus vulgaris L. measured using bioimpedometric method*. J Food Protect, 62:1017-1023, 1999.
- TACCONI E., PORTALUPPI P., CAMANA M.G., et al.: *Le proprietà antimicrobiche dell'estratto di timo: confronto dell'attività esercitata su patogeni e su un simbionte umano (Lactobacillus acidophilus)*. Riv Ostet Ginecol Pratica e Med Perinatale, 18:1-4, 2003.
- PORTALUPPI P., CAMANA M.G., TACCONI E., et al.: *Comparative experimental study on antibacterial and antimicrobial activity of Thymus vulgaris and econazole*. Giorn It Microbiol Medica e Odont Clin, 7:1-8, 2003.
- JULIANO C., MATTANA A., USAI M.: *Composition and invitro antimicrobial activity of essential oil Thymus herbabarona Loisel growing wild in Sardinia*. J Essential Oil Res, 12:516-522, 2000.
- KING A.D., BAYNE H.G., JURD L., CASE C.: *Antimicrobial properties of natural phenols and related compounds: Obtusastylene and dihydroobtusastylene*. Antimicrob Agents and Chemother, 1:263-267, 1972.
- KNOBLOCH K., PAULI A., IBERL B., et al.: *Antibacterial and antifungal properties of essential oil components*. J Essential Oil Res, 1:119-128, 1989.
- HELANDER I.M., ALAKOMI H.L., LATVA-KALA K., et al.: *Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria*. J Agr Food Chem, 46:3590-3595, 1998.
- BRAGA P.C.: *Effects of subinhibitory concentrations of seven macrolides and four fluoroquinolones on adhesion of Staphylococcus aureus to human mucosal cells*. Chemotherapy, 40:304-310, 1994.
- BRAGA P.C., PIATTI G.: *Favourable effects of subMIC rifloxacin concentrations in decreasing the pathogen host cell adhesion*. Pharmacol Res, 28:11-19, 1993.
- REID G., BRUCE A.W., FRASER N., et al.: *Oral probiotics can resolve urogenital infections*. FEMS Immun Med Microbiol, 30:49-52, 2001.
- DIDRY N., DUBREUIL L., PINKAS M.: *Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria*. Pharmacol Acta Helv, 69:25-28, 1994.
- DAL SASSO M., CULICI M., GUFFANTI E.E., MUCCIM., BRAGA P.C.: *Thymol inhibitory activity on Escherichia coli and Staphylococcus aureus adhesion to human vaginal cells*. J Essent Oil Res (submitted), 2005.
- CULICI M., CAPRETTI V., DAL SASSO M., GUFFANTI E.E., MUCCI M., BRAGA P.C.: *Evaluation of thymol inhibition of Candida Albicans adhesiveness to human vaginal cells*. GIMMOC (in press), 2005.
- HAMMER K.A., CARSON C.F., RILEY T.V.: *In vitro activity of essential oils, in particular Melaleuca alternifolia (Tea tree) oil and tea tree oil products against Candida spp.* J Antimicrob Chemother, 42:591-595, 1998.
- BARNES B.: *The development of topical applications containing tea tree oils for vaginal conditions*. In: Modern Phytotherapy. The Clinical Significance of Tea Tree Oil and other Essential oils. Proceedings of a Conference in Sydney, September 17, 1989, Vol. I, pp. 27-35, 1989. Australian Tea Tree Industry Association, Coraki, Australia.
- BLACKWELL A.L.: *Tea tree oil and anaerobic (bacterial) vaginosis*. Lancet, 337:330, 1991.
- SANCHEZ M.E., TURINA A., GARCIA D.A., VERONCIA NOLAN M., PERILLO M.A.: *Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity*. Colloid Surface B (Biointerfaces), 34:77-86, 2004.
- HAMMER K.A., CARSON C.F., RILEY T.V.: *Antifungal effects of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and its components on Candida albicans, Candida globrata and Saccharomyces cerevisiae*. J Antimicrob Chemother, 53:1081-1085, 2004.
- SIKKEMA J., DE BONT J.A.M., POOLMAN B.: *Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons*. Microb Rev, 59:201-222, 1995.
- BARD M., ALBRECHT M.R., GUPTA N., et al.: *Geraniol interferes with membrane functions in strains of Candida and Saccharomyces*. Lipids, 23:534-538, 1988.
- URIBE S., RAMIREZ J., PENA A.: *Effects of pinene on yeast membrane functions*. J Bacteriol, 161:1195-1200, 1985.
- SHAPIRO S., GUGGENHEIM B.: *The action of thymol on oral bacteria*. Oral Microbiol Immunol, 10:241-246, 1995.
- BENNIS S., CHAMI F., CHAMI N., BOUCHIKI T., REMMAL A.: *Surface alterations of Saccharomyces cerevisiae induced by thymol and eugenol*. Lett Appl Microbiol, 38:454-458, 2004.
- SANDIN R.L., ROGERS A.L., FERNANDEZ M.I., BERREKE E.S.: *Variations in affinity to Candida albicans invitro among human buccal epithelial cells*. J Med Microbiol, 24:151-155, 1987.
- DOUGLAS L.J.: *Adhesion of Candida species to epithelial surfaces*. Crit Rev Microbiol, 15:27-43, 1987.
- BRAGA P.C.: *Personal communication*, 2005.
- AESCARCH R., LOLIGER J., SCOTT B.C., MURCIAA., BUTLER J., HALLIWELL B., ARUOMA O.I.: *Antioxidant action of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol*. Food Chem Toxicol 32:31-36, 1994.
- KEKHUIJZEN P.N.R.: *Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease*. Eur Resp J, 23:629-636, 2004.
- TEISSEDE P.I., WATERHOUSE A.I.: *Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances indifferent essential oil varieties*. J Agric Food Chem 48:3801-3805, 2000.
- ZHENG W., WANG S.Y.: *Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs*. J Agric Food Chem, 49:5165-5170, 2001.