Giorn. It. Ost. Gin. Vol. XXVII - n. 7-8
июль - август 2005

Тимол: антибактериальная, противогрибковая и антиоксидантная активность

БРАГА П. К. (BRAGA P. C.)

АННОТАЦИЯ
Тимол: антибактериальная, противогрибковая и антиоксидантная активность
Брага П. К. (Braga P. C.)

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 тимола 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 μг/мл, это очень низкая концентрация.

Наряду с другими результатами, имеющими отношение к адгезии бактерий и грибков, антиоксидантная активность тимола 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.

Ключевые Слова: Тимол - Бактерии - Грибки - Антиадгезивный эффект - Антиоксидантный эффект.

В целом, антибиотики и микостатики хорошо работают против бактериальных или грибковых инфекций, но прогрессивный рост сопротивляемости бактерий и грибков 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).

Миланский университет - Италия
Факультет фармакологии, медицинский колледж
Статья, представленная на 12-ом Всемирном конгрессе по репродукции человека
10-13 марта 2005, Венеция, Италия
© Авторские права 2005, компания CIC Edizioni Internazionali, Рим

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 грибков (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 тимьяново-

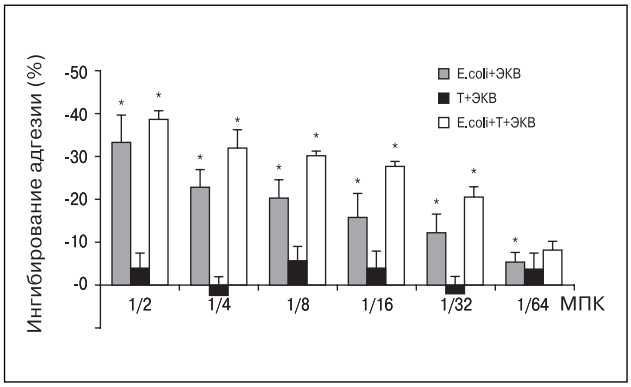

Рис. 1 – Зависимость степени уменьшения адгезии E. coli к вагинальным клеткам от концентрации тимола (при разных концентрациях ниже МПК).

го 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 грибков 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).

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 грибков к клеткам слизистых оболочек человека (15, 16) даже при концентрациях ниже подавляющих.

Тем же самым методом было исследовано влияние тимола на адгезию бактерий и грибков 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 μг/мл (среднее ± SD = 181±60 μг/мл), а МПК для трех штаммов Staphylococcus aureus составляла 175 μг/мл. Эти значения МПК имеют тот же порядок, как и значения 100 μг/мл (13-15) и 250 μг/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 приме-

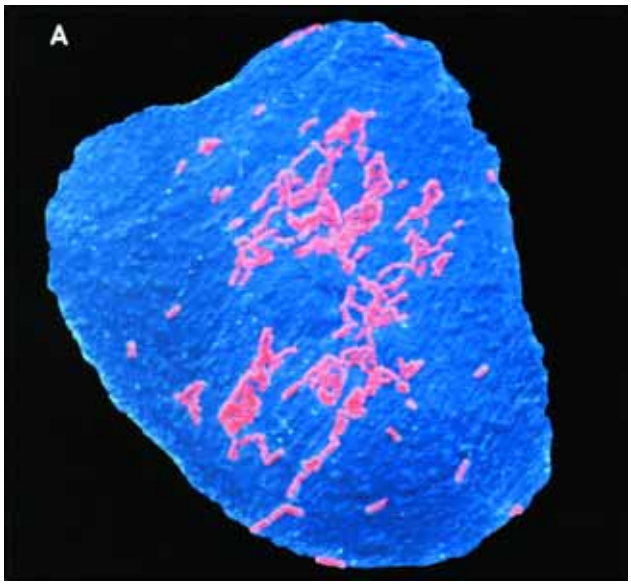

Рис 2. - А) Снимок, полученный на сканирующем электронном микрографе (СЭМ). В отсутствии тимола на вагинальных эпителиальных клетках наблюдается большое число закрепившихся E. coli.

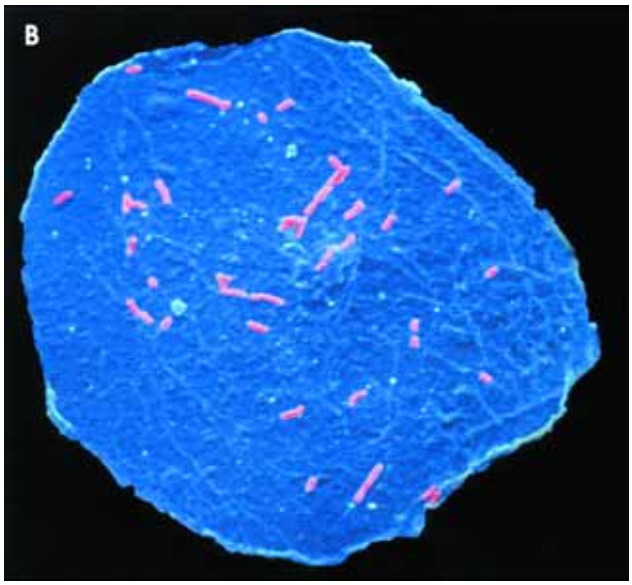

Рис. 2 - В) Пример значительного сокращения количества закрепившихся E. coli. после инкубации с тимолом при концентрации 1/2 МПК.

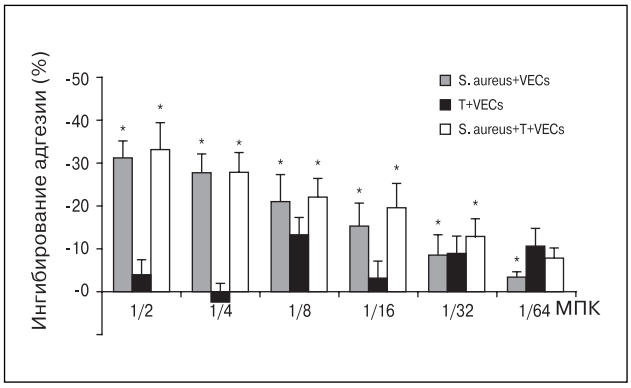

Рис. 3 - Зависимость степени уменьшения адгезии S. aureus к вагинальным клеткам от концентрации тимола (при разных концентрациях ниже МПК).

ры 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).

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 μг/мл, а для одного штамма - 150 μг/мл (среднее значение равно 131,25 ± 12,5 μг/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 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 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 1/2 МПК, а степень уменьшения оставалась статистически значимой до 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 с тимолом при концентрации тимола 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).

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).

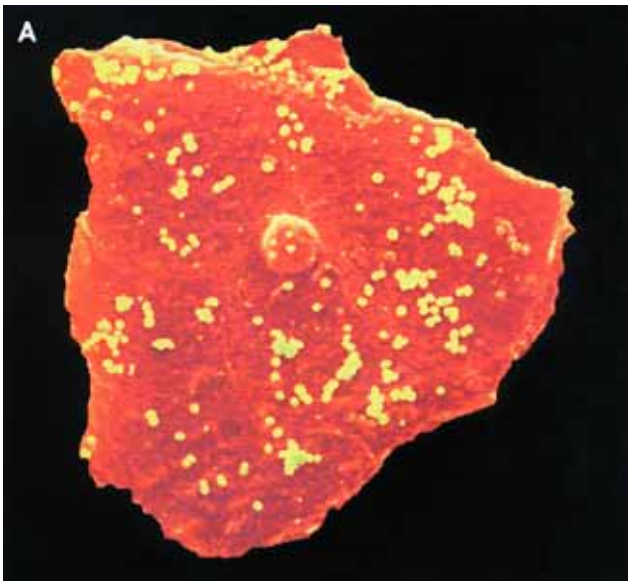

Рис 4. - А) Снимок, полученный на сканирующем электронном микрографе (СЭМ). В отсутствии тимола на вагинальных эпителиальных клетках наблюдается большое число закрепившихся S.aureus.

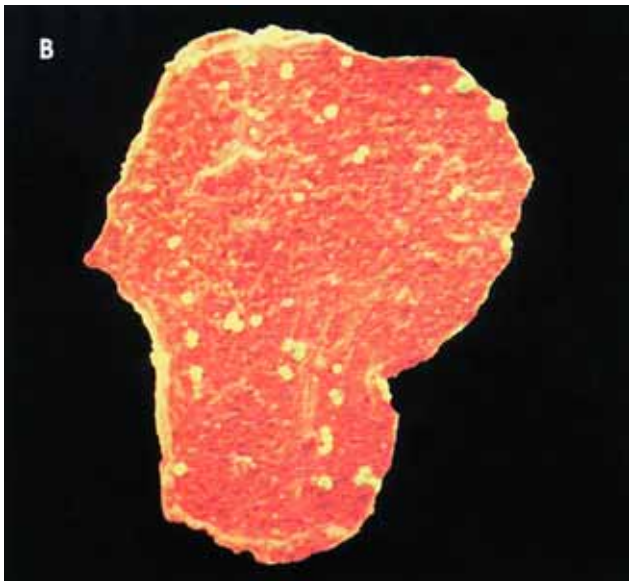

Рис. 4 - В) Пример значительного сокращения количества закрепившихся S.aureus после инкубации с тимолом при концентрации 1/2 МПК.

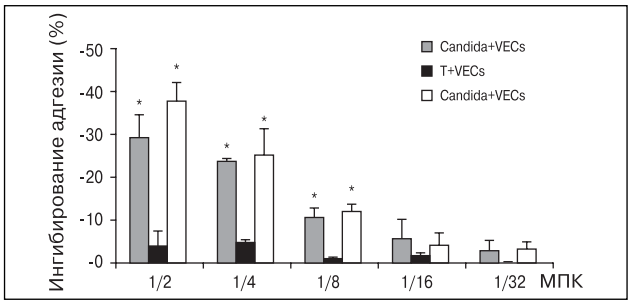

Рис. 5 - Зависимость степени уменьшения адгезии C. albicans к вагинальным клеткам от концентрации тимола (при разных концентрациях ниже МПК).

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).

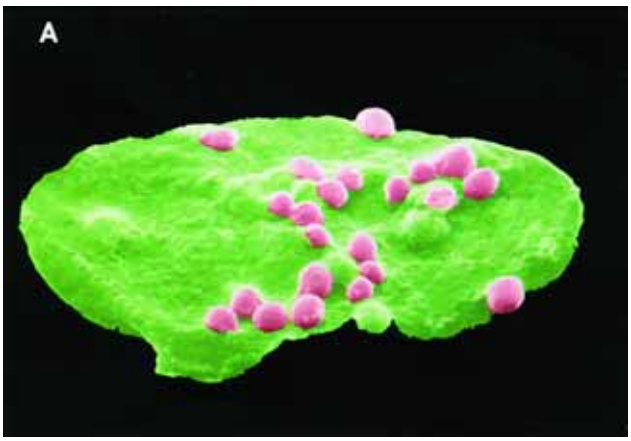

Рис 6. - А) Снимок, полученный на сканирующем электронном микрографе. В отсутствии тимола на вагинальных эпителиальных клетках наблюдается большое число закрепившихся C. albicans.

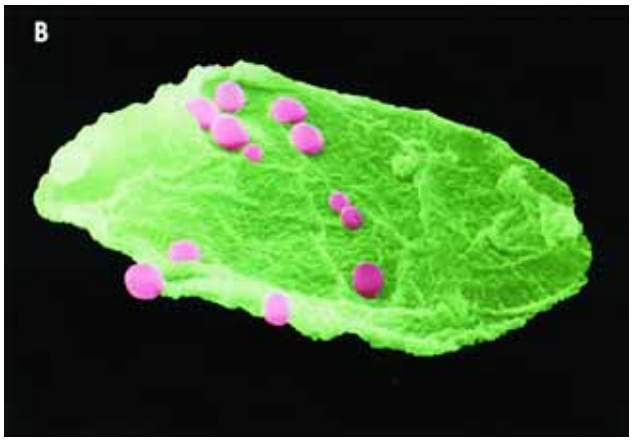

Рис. 6 - В) Пример значительного сокращения количества закрепившихся клеток C. albicans после инкубации с тимолом при концентрации 1/2 МПК.

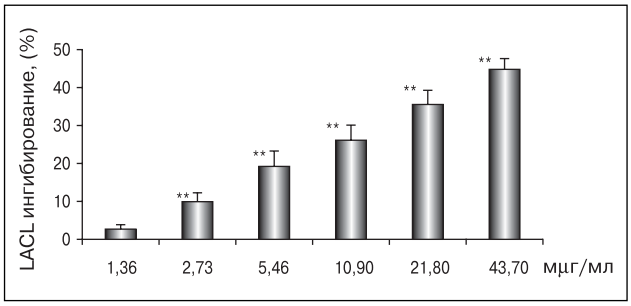

Рис. 7 - Влияние различных концентраций тимола на LACL дыхательного выброса PMN при стимуляции fMLP.

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 грибков к человеческим ЭКВ (19, 20).

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 противоокислительной 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_2 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-фенилаланин (fMLP).

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

Антиоксидантная активность тимола приписывается его фенольной структуре (34, 35, 36, 37), а противоокислительная 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 противоокислительной активностью (34, 35, 36, 37). Наряду с другими результатами, имеющими отношение к адгезии бактерий и грибков, 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

1. HAMMER K.A, CARBON C.F., RILEY T.V.: *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J ApplMicrobiol, 86:985-990, 1999.*
2. DORMAN H.J.D., DEANS S.G.: *Antimicrobial agents fromplants: antibacterial activity of plant volatile oils. J ApplMicrobiol, 88:308-316, 2000.*
3. KALEMBA D., KUNICKA A:*Antibacterial and antifungalproperties of essential oils. Curr Med Chem, 10:813-829, 2003.*
4. SMITH-PALMER A, STEWART J., FYFE L.:*Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against fireimportant food-borne pathogens. Lett Appl Microbiol, 26:118-122, 1998.*
5. HULIN V., MATHOT A.G., MAFART P.D.L.: *Les pro-priŭtŭs antimicrobiennes des huiles essentielles et composŭs d'aromes. Science Aliments, 18:563-582, 1998.*
6. RASOOLI I., MIRMOSTAFA S.A: *Antibacterial propertiesof Thymus pubescens and Thymus serpyllum essential oils.Fitoterapia, 73:244-250, 2002.*
7. 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.*
8. MARINO M., BERSANI C., COMI G.: *Antimicrobial activity of the essential oils of Tymus vulgaris L. measured usingbioimpedometric method. J Food Protect, 62:1017-1023, 1999.*
9. TACCONI E., PORTALUPPI P., CAMANA M.G., *et al.:Le proprieta antimicrobiche dell'estratto di timo: confrontodell'attivita esercitata su patogeni e su un simbionte umano(Lactobacillus acidophilus). Riv Ostet Ginecol Pratica e MedPerinatale, 18:1-4, 2003.*
10. PORTALUPPI P., CAMANA M.G., TACCONI E., *et al.: Comparative experimental study on antibacterial and antimico-tic activity of Thymus vulgaris and econazole. Giorn It Microbiol Medica e Odont Clin, 7:1-8, 2003.*
11. *JULIANO C., MATTANA A., USAI M.: Composition and invitro*

antimicrobial activity of essential oil Thymus herba-baronaLoisel growing wold in Sardinia. J Essential Oil Res, 12:516-522, 2000.

12. KING A.D., BAYNE H.G., JURD L., CASE C.: *Antimicrobial properties of natural phenols and related compounds: Obtusastyrene and dihydroobtusastyrene. AntimicrobAgents and Chemother, 1;263-267, 1972.*
13. KNOBLOCH K., PAULI A, IBERL B., *et al.: Antibacterialand antifungal properties of essential oil components. J EssentialOil Res, 1:119-128, 1989.*
14. HELANDER I.M., ALAKOMI H.L., LATVA-KALA K., *etal.: Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. J Agr Food Chem, 46:3590-3595, 1998.*
15. BRAGA P.C.: *Effects of subinhibitory concentrations of seven-macrolides and four fluoroquinolones on adhesion ofStaphy loco ccus aureus to human mucosal cells. Chemotherapy, 40:304-310, 1994.*
16. BRAGA P.C., PIATTI G.: *Favourable effects of sub-MICrufloxacin concentrations in decreasing the pathogen-host celladhesion. Pharmacol Res, 28:11-19, 1993.*
17. *REID G., BRUCE A.W., FRASER N., et al.: Oral probioticscan resolve urogenital infections. FEMS Immun MedMicrobiol, 30:49-52, 2001.*
18. DIDRY N., DUBREUIL L., PINKAS M.: *Activity of thymol,carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria.Pharmacol Acta Helv, 69:25-28, 1994.*
19. DAL SASSO M., CULICI M., GUFFANTI E.E., MUCCIM., BRAGA P.C.: *Thymol inhibitory activity on Escherichiacoli and Staphylococcus aureus adhesion to human vaginal cells.J Essent Oil Res (submitted), 2005.*
20. CULICI M., CAPRETTI V., DAL SASSO M., GUFFANTIE.E., MUCCI M., BRAGA P.C.: *Evaluation of thymol inhibition of Candida Albicans adhesiveness to human vaginal cells.GIMMOC (in press), 2005*
21. HAMMER K.A, CARSON C.F., RILEY T.V.: *In vitro activity of essential oils, in particular Melaleuca alternifoglia (Teatree) oil and tea tree oil products against Candida spp. JAntimicrob Chemother, 42:591-595, 1998.*
22. BARNES B.: *The development of topical applications containing tea tree oils for vaginal conditions. In: ModernPhytotherapy. The Clinical Significance of Tea Tree Oil andother Essential oils. Proceedings of a Conference in Sydney,September 17, 1989, Vol. I, pp. 27-35, 1989. Australian TeaTree Industry Association, Coraki, Australia.*
23. BLACKWELL A.L.: *Tea tree oil and anaerobic (bacterial)vaginosis. Lancet, 337:330, 1991.*
24. SANCHEZ M.E., TURINA A, GARCIA D.A,VERONCIA NOLAN M., PERILLO M.A.: *Surface activityof thymol: implications for an eventual pharmacological activity.Colloid Surface B (Biointerfaces), 34:77-86, 2004.*
25. HAMMER K.A, CARSON C.F., RILEY T.V.: *Antifungaleffects of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and its components on Candida albicans, Candida globrata and Saccharomyces cere-visiae. J Antimicr Chemother, 53:1081-1085, 2004.*
26. *SIKKEMA J., DE BONT J.A.M., POOLMAN B.: Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microb Rev,59:201-222, 1995.*
27. BARD M., ALBRECHT M.R., GUPTA N., *et al.: Geraniolinterferes with membrane functions in strains of Candida andSaccharomyces. Lipids, 23:534-538, 1988.*
28. *URIBE S., RAMIREZ J., PENA A.: Effects of ?-pinene onyeast membrane functions.J Bacteriol, 161:1195-1200, 1985.*
29. SHAPIRO S., GUGGENHEIM B.: *The action of thymol onoral bacteria. Oral Microbiol Immunol, 10:241-246, 1995.*
30. BENNIS S., CHAMI F., CHAMI N., BOUCHIKI T., REMMAL A: *Surface alterations of Saccharomyces cerevisiaeinduced by thymol and eugenol. Lett Appl Microbiol, 38:454-458, 2004.*
31. SANDIN R.L., ROGERS A.L., FERNANDEZ M.I., BERREKE E.S.: *Variations in affinity to Candida albicans inwitro among human buccal epithelial cells. J Med Microbiol,24:151-155, 1987.*
32. DOUGLAS L.J.: *Adhesion of Candida species to epithelial surfaces. Crit Rev Microbiol, 15:27-43, 1987.*
33. BRAG A P.C.: *Personal communication, 2005.*
34. AESCBARCH R., LOLIGER J., SCOTT B.C., MURCIAA, BUTLER J., HALLIWELL B., ARUOMA O.I.: *Antioxi-dant action of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone andhydroxytyrosol. Food Chem Toxicol 32:31-36, 1994.*
35. 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.*
36. TEISSEDRE 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.*
37. ZHENG W, WANG S.Y.: *Antioxidant activity and phenolic-compounds in selected herbs. J Agric Food Chem, 49:5165-5170, 2001.*