

Növényi kivonatok és illóolajok antimikrobiális és citotoxikus hatásainak vizsgálata

Doktori (Ph.D.) Tézis

Das Sourav, M. Pharm.

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Prof. Dr. Kőszegi Tamás, M.D, Ph.D., Dr. Habil.

A Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Pintér Erika, Ph.D., Dr. Habil., D.Sc.

Programvezető:

Prof. Dr. Botz Lajos , Ph.D., Dr. Habil.



Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ

Laboratóriumi Medicina Intézet

Pécs, 2020

I. BEVEZETÉS

1. Illóolajok és felhasználásuk

Az illó, vagy esszenciális olajokat (EO) az emberiség történelme során széles körben használták a népi gyógyászatban. Az EO-k összetett vegyületek keverékei, alkotóelemeik változatos, egyedi összetételben és koncentrációban lelhetők fel bennük. Legfontosabb összetevőik a terpenoidok, például monoterpének, szeszkviterpének, diterpének, de tartalmaznak még savakat, alkoholokat, aldehideket, alifás szénhidrogéneket, aciklusos észtereket vagy laktonokat, ritka nitrogén- és kén tartalmú vegyületeket, kumarint, és fenilpropanoidok másodlagos homológjait is [1–4]. Az EO-k a biológiai hatások széles skálájával rendelkeznek, beleértve antioxidáns, antimikrobiális, tumorellenes, gyulladáscsökkentő, és vírusellenes aktivitásokat. Számos tanulmányban vizsgálták azokat a mechanizmusokat, melyek az illóolajok baktériumsejtekre gyakorolt hatását magyarázhatják, azonban még mindig nem bizonyított, hogy az illóolajok pontosan miként hatnak egy mikrobiális sejtre [5,6]. Az illóolajok jellemző tulajdonsága a hidrofobicitás, amely felelőssé tehető a mikrobiális sejtek szerkezetének károsításáért, illetve a sejtártya permeabilitásának fokozásáért [7,8].

2. Az *Artemisia annua* L. és másodlagos metabolitjai

Az eredetileg az *Artemisia annua* L.-ből származó, szeszkviterpén-laktonok családjába tartozó artemizinin (Ar) közismert maláriaellenes hatásairól, szabad gyököket képez az intra-parazita vas-endoperoxid csoportok hasításával és malária specifikus fehérjéket alkilez, ezáltal hozzájárul a *Plasmodium* fajok elleni védekezéshez [1,3].

A szkopoletin (Sc, 6-metoxi-7-hidroxi-kumarin) egy fenolos vegyület, amelyet több növényből, köztük az *Artemisia annua* L.-ből izoláltak. A Sc tumorellenes és anti-angiogenezis tulajdonságokkal rendelkezik: beindítja a sejtciklus leállítását, illetve elősegíti az apoptózist az emberi prosztata tumorsejtekben és leukémiás sejtvonalakban [5–7]. Korábban már vizsgálták az Ar és a Sc gombaellenes hatásait, beleértve az anti-*Candida* aktivitást is, ugyanakkor az irodalomban nem található részletes adatok a minimum effektív koncentrációjú Ar-el illetve Sc-vel kezelt *Candida* fajok életképességéről és biofilm-képző sajátságairól [4–6]. Ezen felül korábban még nem végeztek olyan kísérleteket, amelyekben Ar- és Sc-kezelt *Candida* fajokat élő/elhalt sejtet megkülönböztető kettős jelölésű gyors fluoreszcens módszerrel, valamint a sejtek metabolikus aktivitásának követésével vizsgálták volna.

3. Mesterséges, illetve természetes tartósítószer használata az élelmiszeriparban

A természetesség fontosságának felismerése a kémiai tartósítószerektől mentes élelmiszerek felé fordította a fogyasztók figyelmét. A hőkezelés, a szárítás, a fagyasztás, a hűtés, a besugárzás, a módosított atmoszférájú csomagolás és az antimikrobiális szerek vagy sók hozzáadása csak néhány a hagyományos módszerek közül, melyekkel megakadályozható a mikrobák szaporodása az élelmiszerekben [7–9]. A nátrium-benzoát, a kálium-szorbát, és a nitritek általánosan használt kémiai tartósítószer a kereskedelemben, főként a gyümölcslevek, tejtermékek, édességek, hús- és húsipari termékek, stb. tartósítására használják őket [3,10]. A kémiai tartósítószer káros hatásaival kapcsolatban egyre több bizonyíték lát napvilágot, emiatt folyamatos nyomás nehezedik a gyártókra, hogy csökkentsék a mesterséges tartósítószer használatát [11]. A kémiailag tartósított élelmiszerek fogyasztásával járó egészségügyi kockázatok elkerülésének érdekében jó alternatívát jelenthet a természetes antimikrobiális vegyületek, például a bakteriocinok, a kitozánnal fermentált összetevők és a növényi antimikrobiális szerek használata az élelmiszerek tartósítására. E tekintetben a növényi kivonatok, illóolajok és peptidek széles spektrumú aktivitást mutatnak [11,12]. Számos vizsgálatot végeztek szerte a világon a növényi termékek hatékonyságának bizonyítására, a növényekből izolált jelentős antimikrobiális és gyógyító hatással rendelkező különféle vegyületek másodlagos metabolitoknak tekinthetők [13,14].

4. *Candida* fajokkal kapcsolatos fertőzések

Immunhiányos állapotú egyéneknél a *Candida* fajok súlyos fertőzést válthatnak ki. Ezen felül a *Candidák* képesek gyorsan alkalmazkodni a gazdaszervezetben található mikrokörnyezeti körülmények változásaihoz, melyeket a gasztrointesztinális-traktus pH értékének és tápanyag ellátottságának ingadozása alakít ki [15]. Ezen tényezők egyensúlyának felborulása a *Candida* fajok abnormális szaporodását válthatja ki, ami candidiasist eredményez [14,15]. A *Candida* fajok megtámadják a bél epitélium barriereit, a bél limfoid szövetében, a Peyer-plakkokban található M-sejteken keresztül a véráramba juthatnak [3,8].

A candidiasis növekvő előfordulási aránya, illetve a fajspecifikus hatékonyságú gombaellenes szerek alkalmazásának korlátozott lehetőségeiből adódó nehézségek miatt nagy szükség van legalábbis a gombás fertőzések megelőzésére.

5. Kísérleti és alkalmazás-alapú nehézségek

5.1. Az EO-k stabilitásával és lipofilicitásával kapcsolatos problémák

Az EO-k penészgombákkal és baktériumokkal szembeni természetes hatékonyságuk ellenére nagyon illékonyak és hajlamosak oxidatív károsodásra, ha fénynek, oxigénnek vagy magas hőmérsékletnek vannak kitéve [15]. Az illóolajok kémiai összetevői könnyen átalakulnak oxidációval, izomerizációval, ciklizációval vagy dehidrogenézéssel, ezen reakciókat enzimatis vagy egyéb kémiai folyamatok is kiválthatják, és általában minőségromlással járnak. Ezen kívül, az EO-knak számos mellékhatása lehet, még akkor is, ha külsőleg alkalmazzák őket, ezek közül az allergiás reakciók a leggyakoribbak (sok EO például bőrkiütést okozhat). Néhány közülük mérgező lehet, ha a bőrön keresztül felszívódik, belélegzik vagy lenyelik őket [9,14]. Egy másik súlyos probléma az EO-kal erősen lipofil jellegük, ami lehetetlenné teszi biológiai hatásaik mérését vizes környezetben. Számos vizsgálat típust, köztük a hagyományos tápoldat hígítási módszert, a korongdiffúziós módszert és a bioautográfiás vizsgálatot használják az EO-k antimikrobiális aktivitásának mérésére. A kutatók számos esetben tettek erőfeszítést az illóolajok lipofil jellegéből adódó nehézségeinek leküzdésére, általában valamilyen feltételezeten megfelelő oldószerekben/detergensokban hígított EO-k alkalmazásával. A természetükből adódóan lipofil, illékony vegyületek, például EO-k esetében változó polaritású oldószereket alkalmaznak, DMSO-t, etanolt és metanolt használnak leggyakrabban. Korábbi vizsgálatok azonban beszámoltak maguknak az oldószereknek (DMSO, etanol és más, mikrobiális vizsgálatok esetében használt oldószerek) antimikrobiális hatásáról, illetve azoknak az EO-k valódi antimikrobiális aktivitására gyakorolt hatásairól [3,15].

5.2. Megbízható kvantitatív és kvalitatív kísérleti adatok hiánya

Az antimikrobiális hatás mérését akadályozó másik nagy probléma az, hogy a baktérium- és gombakoloníák nem mindig jól láthatóak, ami megnehezíti a növekedés pontos számszerűsítését. A megfelelő életképességi vizsgálati módszerek hiánya akadályozza a már meglévő antibiotikumok tesztelését és új gyógyszerek kifejlesztését [13,14]. Jelenleg, a mikroszkópos számlálás és a kvantitatív PCR (qPCR) tekinthetők a legmegbízhatóbb módszereknek a mikrobák mennyiségi vizsgálataihoz. A manuális, számláló kamrákat alkalmazó eszközökkel történő mikroszkópos sejtszámlálást elsősorban a mikrobiális életképesség jellemzésére használják in vitro, de ez nagyon időigényes és mikrotiter lemezen nehezen végrehajtható. Számos gyors kolorimetriás vizsgálati eljárást alkalmaznak, a

mikrobiális enzim aktivitások, a sejtmembrán integritás, a sejtproliferáció, a metabolikus aktivitás, illetve a sejtek életképességének, és antibiotikum-érzékenységének meghatározására [12]. Ezek a vizsgálatok azonban vagy korlátozott érzékenységek, vagy nehézkesek, és nem végezhetőek el nagy áteresztőképességű formátumban.

II. FŐBB CÉLOK

- **A növényi eredetű szekunder metabolitok, illóolajok és aktív komponenseik oldhatósága a vizes vizsgálati rendszerekben általában nagyon gyenge. Ezért az antioxidáns és antimikrobiális tulajdonságok jellemzését gyakran detergens, poláros protikus/aprotikus és nem poláros oldószerek hozzáadásával végzik.**

Ezen okból új (potenciális) gyógyszer formulázások kifejlesztését tűztük ki célul módosított ciklodextrinokkal és nanoemulziókkal vizes vizsgálati rendszerekhez, amelyek adalékanyagok nélkül használhatók antioxidáns és antimikrobiális vizsgálatokhoz. Jellemeztük a ciklodextrin kapcsolt EO-k és tiszta EO-komponensek csapdázási hatékonyságát és termodinamikai tulajdonságait is.

- **Az élő/elhalt mikrobák számszerűsítésére nincs gyors, nagy áteresztőképességű vizsgálat.**

Megkíséreltünk létrehozni egy lemezolvasó alapú, gyors élő/elhalt mikrobiális életképesség vizsgálaton alapuló technikát fluoreszcens kettős jelölési módszer alkalmazásával.

- **A mikrogomba biofilmek kialakulása komoly problémát jelent, és csak néhány természetes anti-biofilm tulajdonságú vegyületet ismerünk, amely megoldást adhat a növekvő mikrobiális gyógyszerrezisztenciára. Tehát szükséges olyan új természetes vegyületeket találnunk, amelyek képesek szembeszállni a mikrobiális gyógyszerrezisztenciával a biofilmekben.**

Célul tűztük ki az *Artemisia annua* L.-ből izolált artemizinin és szkopoletin antimikrobiális és biofilm-károsító aktivitásának vizsgálatát, hogy feltárjuk azok hatását a mikrobiális biofilmek életképességére, metabolikus aktivitására és oxidatív stressz egyensúlyára.

- **Csak néhány tanulmányt találhatunk, amelyekben a növényi kivonatok antimikrobiális aktivitását vizsgálták azok MIC alatti koncentrációjában.**

Célunk az illóolajok és a tiszta növényi kivonatok antimikrobiális hatásainak jellemzése volt azok minimális effektív koncentrációjának (MEC₁₀) tartományában, különféle

módszerek alkalmazásával (metabolikus aktivitás, oxidatív stressz mérése, élő/ elhalt sejtek számszerúsítése, sejtölő aktivitás mérése az expozíciós idő függvényében).

- **Az antimikrobiális hatások pontos meghatározása a biofilmekben még mindig kihívást jelent.**

Ezért többparaméteres fluoreszcens technikák kidolgozására törekedtünk, amelyek lehetővé teszik, hogy megismerjük az általunk vizsgált növényi kivonatok lehetséges hatásmechanizmusát kifejezett (érett) biofilmekben.

III. MÓDSZERTAN

1. Minták és a kísérletek során használt készítmények

A RAMEB-EO/tiszta komponensek tanulmányhoz kakukkfű olajat, citrom balzsam olajat, levendula olajat, borsmenta olajat, timolt, mentolt, linaloolt, citrált és borneolt használtunk. Biológiai kísérleteket is végeztünk artemizinnel és szkopoletinnel (az *Artemisia annua* L. másodlagos metabolitjai). Továbbá az *Artemisia annua* L. illóolaj, és a kamillaolaj felület módosított szilícium-dioxid-nanoemulzióit (Horváth Barbara és munkatársai készítették a Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszertechnikai és Biofarmáciai Intézetében. Részletek a Ref. [11,15] alatt és Ph.D. tézisében “Pickering Emulziók a gyógyszerészeti technológiában”; előkészítés alatt) szintén tanulmányoztuk.

2. A kísérletekben felhasznált mikroorganizmusok

Vizsgálataink során *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis* és *Candida krusei* törzseket használtunk, melyek a Szegedi Mikrobiológiai Gyűjteményből, Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Intézet (SZMC) és a Pécsi Tudományegyetem Biológiai Intézetének Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszékéről (PMC) származtak.

3. A SYBR Green I/Propidium jodid mikrobiális életképességi vizsgálat kifejlesztése és optimalizálása

Röviden összefoglalva, *S. pombe*, *E. coli*, vagy *S. aureus* tenyészeteket készítettünk, melyeket log fázisig növesztettünk tápoldatban. Az egyes csövekben lévő mikrobiális szuszpenziót centrifugálással üleptítettük. Az összes mintát szobahőmérsékleten inkubáltuk 15 percig, majd

újra centrifugáltuk. A kezelt és a kezeletlen mintákat is 96 lyukú, átlátszó, síkaljú általános sejttenyésztő lemezekre pipettáztuk. Előre elkészített SYBR Green I/PI festék keveréket pipettáztunk a mintákat tartalmazó lyukakba, és alaposan összekevertük azokat. A lemezeket sötétben inkubáltuk 10 percig. A mikrobiális életképesség kiértékeléséhez a 96 lyukú mikrotiter lemezekben lévő minták fluoreszcencia intenzitását kétféle monokromátor beállításon (490 nm/525 nm és 530 nm/620 nm) mértük.

$$\% \text{ Halott sejtek}_{D\acute{o}zis} = 100 - \left\{ \left(\frac{D\acute{o}zis_{G/R}}{Kontroll_{G/R}} \right) \times 100 \right\}$$

ahol, $D\acute{o}zis_{G/R}$ a zöld, és a piros fluoreszcencia intenzitás aránya egy adott dózis estében, míg a $Kontroll_{G/R}$ a zöld és a piros fluoreszcencia aránya az élő kontroll esetében. A kalibrálást élő/ elpusztult mikrobák keverékével végeztük.

Áramlási citometriás elemzésünk során SYBR Green I és propidium-jodid kettős festéssel értékeltük az élő és az elpusztult sejtek arányát, ahogyan a plate leolvasós kísérletek esetében is. Az áramlási citometriás méréseket FACS Canto II eszközön végeztük FACS Diva V6.0 szoftverrel.

4. A RAMEB-EO teljes antioxidáns kapacitásának (TAC) mérése

A difenil-2-2-pikril-hidrazil (DPPH) vizsgálatot a korábbi tanulmányunkban leírt eljárás szerint hajtottuk végre, kisebb módosításokkal [9]. Röviden, a DPPH törzsoldatot 96% -os etanollal, míg a Trolox antioxidáns standard hígítási sorozatát, és az EO - RAMEB hígításokat PBS-sel készítettük el. Acetát puffert (pH 5,5), a standard/minta hígításait és a DPPH-t 96 lyukú általános mikrotiter lemezekbe pipettáztuk. Az abszorbanciát 517 nm-en mértük lemez olvasóval, 30 perc inkubációs időt követően. A TAC értékeket 50% -os gátlási kapacitásként adtuk meg (IC_{50}).

Az erősített kemilumineszcenciás (ECL) TAC reakciót 96 lyukú fehér Optiplate-ben hajtottuk végre. Trolox/vak/minta és peroxidáz alapú (POD-ECL) reagenst pipettáztunk minden lyukba. Az ECL reakció elindításához jéghideg citromsavban oldott H_2O_2 -ot injektáltunk a lyukakba a mikroplate-leolvasó automatizált adagolójával. A lumineszcencia intenzitást 10 percig követtük. A módszert a standardok fénykibocsátása segítségével kalibráltuk, a minták esetében kapott eredményeket beszoroztuk a hígítási faktorial, és μM Trolox ekvivalensben fejeztük ki (TE) [14]. Végül az oxigéngyök kioltó kapacitás (ORAC) méréséhez egy korábban ismertetett eljárást használtunk [8,9] módosításokkal. Röviden, a reakciókat 2,2'-azobisz (2-metilpropionamidin) dihidroklorid (AAPH) oldat mikroplate-be történő injektálásával indítottuk el, a plate ezen kívül vakot/standardot/mintát és pufferelt Na_2 -fluoreszcein indikátort

tartalmazott. A fluoreszcencia intenzitás kioltását 80 percen keresztül követtük 490/520 nm-es szűrő beállításokkal és a teljes fénykibocsátást mint AUC-ot számítottuk. A vak AUC-értékét levontuk a standardok/minták értékeiből, és a nettó AUC-ot alkalmaztuk a továbbiakban az antioxidáns kapacitás számításaiban [3,5].

5. A RAMEB-EO/illóolaj komponensek, a másodlagos metabolitok és a Pickering-EO emulziók minimális gátló koncentrációinak (MIC) meghatározása

A vizsgált vegyületek MIC értékeit külön-külön határoztuk meg, egy általunk korábban publikált protokoll szerint [9]. Röviden, a log fázisban lévő sejteket a vizsgálati anyagok széles koncentráció skálán mozgó hígításaival inkubáltuk, módosított RPMI 1640 közegben, a megfelelő kontrollok alkalmazása mellett. Az abszorbanciát plate-leolvasóval mértük. A lemezolvasóval kapott abszorbancia értékeket a növekedési kontrollhoz (Gc) viszonyítva százalékos értékekben fejeztük ki (Gc, 100%). Az adatokra nem lineáris dózis-válasz görbét illesztettünk, így meghatározva azt a dózist, amely $\geq 80\%$ (MIC₈₀) vagy $\geq 90\%$ (MIC₉₀) növekedésgátlást eredményez. A MIC₈₀ vagy MIC₉₀ értékeket a mindenkor szükséges kísérleti elrendezések alapján számítottuk.

6. A másodlagos metabolitok és a Pickering-EO emulziók minimális effektív koncentrációjának (MEC₁₀) meghatározása

A MEC₁₀ koncentráció a $\leq 10\%$ növekedés gátlását eredményező koncentrációt jelenti, melyet az általunk korábban publikált protokoll szerint határoztunk meg [11,12,15]. A logaritmikus növekedési fázis közepén lévő tenyészeteket a tesztvegyületek széles koncentráció tartományával kezeltük, módosított RPMI 1640 tápközegben, egy órán át. A kezelés nélküli, beoltott tápközeg növekedési kontrollnak tekintettük. A telepkepző egységek mennyiségi meghatározásához a hagyományos Petri-csésze szélesztéses módszert alkalmaztuk. A telepkepzési adatokat százalékokká konvertáltuk, és az adatokra nem lineáris dózis-válasz görbét illesztettünk, melynek segítségével meghatároztuk azt a koncentrációt, amely körülbelül 90%-os mikrobajel-növekedést eredményezett összehasonlítva a kezeletlen mikrobiális sejtpopulációkkal, egy óra kezelést követően.

7. A mikrobiális ROS, peroxid és szuperoxid képződés vizsgálata

7.1. A Pickering-EO emulziók kombinált ROS generálása

A kombinált reaktív oxigéngyök képződés (ROS) számszerűsítéséhez egy korábbi protokollunkat követtük [11,15]. Röviden, a ROS mérésekhez a közép-log fázisú sejteket összegyűjtöttük és centrifugáltuk, majd újra szuszpendáltuk PBS-ben. A sejtek festését 2', 7'-diklór-fluoreszcein-diacetáttal végeztük. A sejteket centrifugálást követően újra-szuszpendáltuk módosított RPMI 1640 tápoldatban, ezt a vizsgálandó vegyületek MEC₁₀ koncentrációjával történő egy órás kezelés követte, majd mértük a fluoreszcencia intenzitás adatokat.

7.2. A másodlagos metabolitok és a Pickering-EO emulziók által előidézett peroxid, és szuperoxid képződés vizsgálata

A peroxid és a szuperoxid képződés méréséhez, dihidrorodamin 123-at, illetve dihidroetidiumot használtunk fluoreszcens markerként, ezeket a mérés előtt mosást és PBS-ben történő újra-szuszpendálást követően a sejtmintáinkhoz adtuk. A kombinált ROS, a peroxid, és a szuperoxid-termelés százalékos növekedését a növekedési kontroll esetében tapasztalt fluoreszcens jelintenzitásához való viszonyítással adtuk meg [4,15].

8. Változások a szuszpenzióban nöövő (planktonikus) mikrobiális sejtek esetében

8.1. A másodlagos anyagcseretermékek és Pickering-EO emulziók okozta változások a metabolikus aktivitásban, az élő/elpusztult sejtarány és a telepképzés vizsgálata

A metabolikus aktivitás, illetve az élő/elpusztult sejtarány vizsgálatához, kezeletlen, és a teszt vegyülettel kezelt mintákat vettünk különböző időközönként, melyeket centrifugáltunk és újra-szuszpendáltunk PBS-ben. A fluoreszcenciát fluoreszcencia spektrofotométer/mikroplate leolvasóval mértük, 96 lyukú Optiplate-ekben a metabolikus aktivitás meghatározásához. A zöld/vörös fluoreszcencia arányt minden mintára és minden dózusra meghatároztuk, a korábban használt képletünk segítségével az elpusztult mikrobiális sejtek százalékos arányát, illetve az alkalmazott dózusra adott választ ábrázoltuk teszt vegyületeink esetében [9]. A korábban közzétett protokollunkat követtük a mikrobák telepképződésében bekövetkező változások meghatározásához [4].

8.2. Az *Artemisia* EO-Pickering emulziók hatására bekövetkező változások az intracelluláris ATP mennyiségében, és a teljes fehérjetartalomban

A planktonikus mikrobiális sejtek intracelluláris ATP tartalmának méréséhez a gyártó utasításait követtük. Röviden összefoglalva, centrifugálást követően, mind a kezelt, mind a kezeletlen mintákat PBS-be szuszpendáltuk, és frissen felolvasztott BacTiter-Glo reagenssel 96 lyukú Optiplate-ekbe pipettáztuk. A mikroplate-eket sötétben, 4 °C-on 15 percig rázattuk, a lumineszcenciát multimód plate olvasóval mértük.

A planktonikus sejtek teljes fehérjetartalmának meghatározásához a Bradford módszert adaptáltuk [5,8]. A vizsgált vegyülettel történő kezelés során különböző időközönként vettünk mintákat, centrifugáltuk azokat, majd újraszuszpendáltuk üvegyöngyöket tartalmazó, 1 M-os NaOH oldatban. A sejtfeltáró ciklust háromszor ismételtük meg, majd centrifugáltuk a mintákat. A felülúszóban található mikrobiális sejtlyizátumot külön centrifuga csövekbe gyűjtöttük. Az abszorbanciát 595 nm-en mértük többfunkciós lemezolvasóval, a fehérje tartalmat BSA standard kalibrációs görbéből számoltuk és mg/l-ben adtuk meg, a kapott értékeket a 0 órás mintákhoz viszonyítottuk [3,4].

9. A másodlagos metabolitok és az *Artemisia* EO-Pickering-emulziók hatása az érett *Candida* biofilmekre

9.1. A biofilmek előállítása, kezelések

Az érett *Candida* biofilmekben alkalmazott kezeléseket, illetve kezelési körülményeket korábban publikált munkánkból vettük át [12]. Röviden összefoglalva, 24 órás késői log fázisban lévő *C. albicans* és nem-*albicans* fajok tenyészetait használtuk a mikroplate-eken, módosított RPMI 1640 tápoldatban, 24 órán át, 30 °C-on történő biofilm képzéshez. A mikroplate-eket PBS-sel mostuk, majd ismét inkubáltuk, a vizsgálandó vegyületeket MEC₁₀ koncentrációban tartalmazó módosított RPMI 1640 tápoldattal, további 24 órán át 30 °C-on.

9.2. A biofilmek teljes biomassza mennyiségének változásai

A biofilmek teljes biomasszájának mennyiségében bekövetkező változásokat az általunk korábban publikált kristály ibolyás festési módszer segítségével határoztuk meg [11,12]. 24 órás inkubációt követően a vizsgált mintákat tartalmazó felülúszót kipipettáztuk, a lyukakat PBS-sel mostuk. A felülúszót eltávolítottuk, és 0,1% (w/v-os), abszolút etanolban oldott kristályibolyát pipettáztunk minden lyukba. Az abszorbanciát 590 nm-en mértük többfunkciós lemezolvasó segítségével.

9.3. A biofilmek metabolikus aktivitásának mérése

A mikrogomba biofilmek metabolikus aktivitásának meghatározására a korábban publikált protokollunk szerinti resazurin alapú fluoreszcens technikát alkalmaztuk [11,12]. Kétszáz mikroliter resazurint tartalmazó steril PBS-t pipettáztunk a lyukakba, ezt követően a plate-eket 30 °C-on inkubáltuk 40 percig. A százalékos metabolikus aktivitás mértékét a növekedési kontroll esetében tapasztalt, 100%-nak tekintett fluoreszcencia értékhez viszonyítva adtuk meg.

9.4. A biofilmek mikrobiális életképességének vizsgálata

A biofilmekben található élő/elpusztult sejtarány meghatározásához egy korábban publikált módszert követtünk [9]. Száz mikroliter SYBR Green I/PI oldatot pipettáztunk a mikroplate mélyedéseibe, amelyek kezelt és kezeletlen gomba biofilmeket tartalmaztak PBS-ben. Fluoreszcencia spektrofotométer/mikroplate leolvasót használtunk a SYBR Green I és PI fluoreszcencia intenzitásának mérésére, a korábban leírtak szerint.

9.5. Az *Artemisia* EO-Pickering-emulziók hatása az intracelluláris ATP mennyiségére és a teljes fehérjetartalomra *Candida* biofilmekben

Az érett *Candida* biofilmek intracelluláris ATP mennyiségének mérése során a gyártó utasításait követtük. Röviden, a vizsgálandó vegyületekkel végzett 24 órás kezelést követően a planktonikus sejteket kipipettáztuk, a biofilmeket PBS-sel mostuk, majd BacTiter-Glo reagenst pipettáztunk a mikroplate minden mélyedésébe. A mikroplate-eket sötétben rázattuk. A lemezek tartalmát 96 lyukú fehér Optiplate-ekre vittük át, a lumineszcenciát többfunkciós lemezolvasóval mértük.

A fehérjetartalom méréséhez a Bradford-módszert használtuk [3,5]. Röviden, a vizsgálandó vegyületekkel történő 24 órás kezelést követően, a planktonikus sejteket eltávolítottuk, majd a biofilmeket PBS-sel mostuk. A biofilmeket a Petri-csészékből sejtkaparó segítségével 1M-os, NaOH-ot és üveggyöngyöket tartalmazó, steril centrifuga csövekbe kapartuk ki. A sejtfeltárást 3 ciklusban hajtottuk végre, a gombasejt-lizátumot tartalmazó felülúszót kipipettáztuk, és NaOH-ban hígítottuk. Az összes mérési eredményt egy BSA standard kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg, és a növekedési kontrollhoz viszonyítva, mg/l-ben adtuk meg. A teljes fehérjetartalmat a mikroplate-ek felületére vonatkoztattuk, annak érdekében, hogy valódi ATP/TP értékeket kapjunk.

10. Statisztikai elemzés

Az összes adatot átlag \pm szórás formában adtuk meg. A grafikonokat, és statisztikai elemzéseket az OriginPro 2016 program (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) segítségével végeztük.

Valamennyi kísérletet hat egymástól független alkalommal hajtottunk végre, három technikai ismétlésben, az adatokat egyutas ANOVA teszttel elemeztük. A <0,05 alatti P értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A minimális gátló koncentrációt (MIC₈₀ és MIC₉₀) és a minimális effektív koncentrációt (MEC₁₀) egy nemlineáris dózis-válasz görbe függvény alkalmazásával számítottuk az alábbiak szerint:

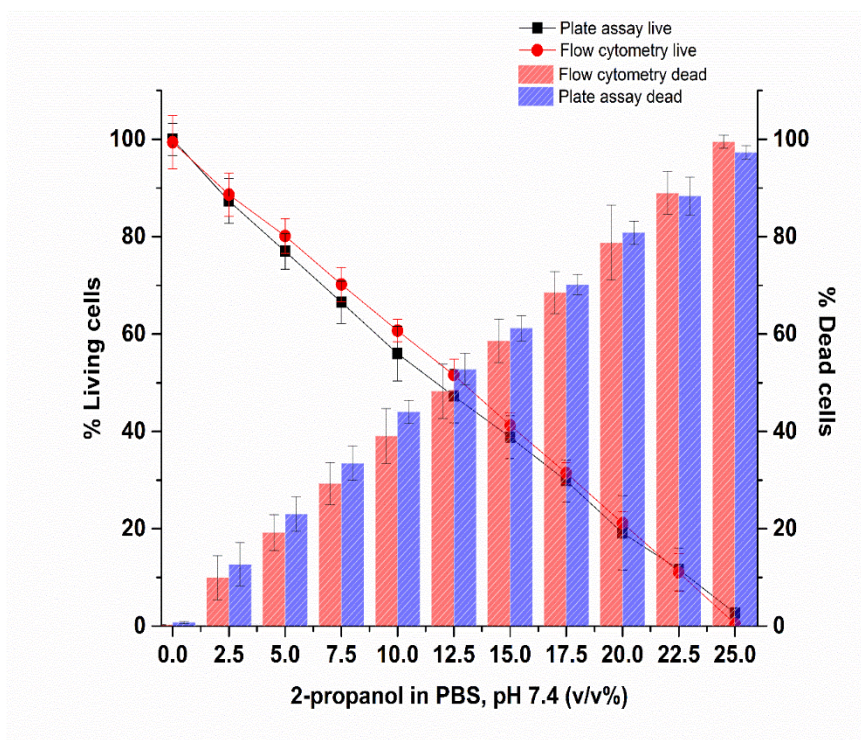
$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\text{LOG}_x 0 - x)p}}$$

ahol A_1 , A_2 , $\text{LOG}_x 0$, és a p az alsó, a felső és a középső aszimptóták, illetve a görbe meredeksége. A minimális gátló koncentrációkat (MIC₈₀ és MIC₉₀) a kísérleti elrendezéstől függően választottuk meg.

IV. EREDMÉNYEK

1. A SYBR Green I/PI mikrobiális életképességi vizsgálat kidolgozása és optimalizálása

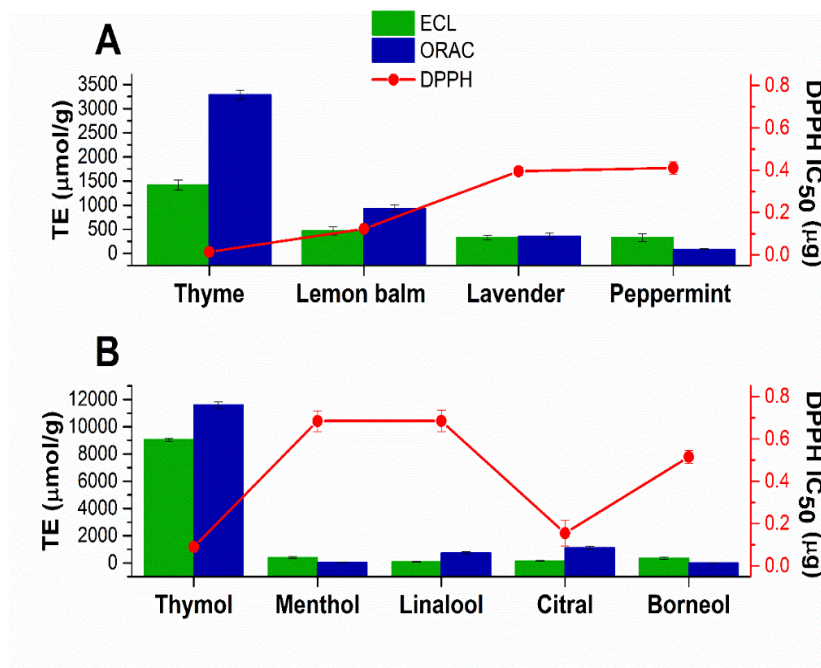
Annak értékelésére, hogy a SYBR Green I/propidium-jodid festés alkalmazható-e a gyors plate olvasós életképességi vizsgálatokhoz, *S. pombe* tenyészetet különböző koncentrációjú 2-propanollal kezeltünk. A mikroplate módszert áramlási citometriával validáltuk. Összefoglalva, a mikrobiális életképességet, az elpusztult sejtek százalékos arányának összehasonlításával értékeltük mind lemezolvasó használatával, mind áramlási citometriás módszerekkel. Megállapítottuk, hogy az optimalizált SYBR Green I/propidium-jodid vizsgálat megbízható a mikrobák életképességének gyors becslésére a lemezolvasó technika esetében is (1. ábra).



1. ábra: Az élő/elpusztult sejtarány eredmények összehasonlítása a lemezolvasó módszer és az áramlási citometriás vizsgálatok esetében, SYBR Green I/propidium-jodid kettős festéssel *S. pombe*-én. Hat független kísérletet hajtottunk végre három technikai ismétléssel (átlag \pm SD).

2. A RAMEB-EO-k és komponenseik teljes antioxidáns kapacitása (TAC)

A kakukkfűolaj és annak timol komponensének antioxidáns aktivitása bizonyult a legnagyobbnak, amelyet a citromfűolaj, a levendulaolaj és a borsmentaolaj követett (2. ábra). A korábbi irodalmi adatok szerint a kísérleteink során használnál magasabb EO koncentrációk szükségesek a megfelelő antioxidáns kapacitás eléréséhez [1–4]. Megállapítottuk, hogy a RAMEB kapcsolt EO-k esetében, figyelemre méltó antioxidáns kapacitás érhető el kisebb mennyiségek használata ellenére is.



2. ábra: A vizsgált EO-RAMEB (A) és EO komponens-RAMEB (B) komplexek antioxidáns kapacitásai. A kiválasztott RAMEB enkapszulált EO-k és komponenseik hatásait ORAC, ECL és DPPH vizsgálatok segítségével határoztuk meg. Hat független kísérletet hajtottunk végre, három technikai ismétléssel (átlag ± SD).

3. A RAMEB-EO/komponensek, a másodlagos metabolitok és a Pickering-EO emulziók minimális gátló koncentrációja (MIC)

A RAMEB-kakukkfűolajról kiderült, hogy ennek az olajnak van a legjobb MIC értéke a *S. pombe*, az *E. coli* és a *S. aureus* törzsekkel szemben, ezt követi a citromfűolaj, a borsmentaolaj és a levendulaolaj. A kamilla EO Pickering-emulzióról (C_{Pe}) kimutattuk, hogy erősebb antibakteriális és gombaellenes hatásokkal (MIC_{90}) rendelkezik *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pombe*, *C. albicans*, és *C. tropicalis* törzsekkel, szemben a Tween80-as (C_{T80}) vagy etanolos (C_{Et}) oldatokkal ($P < 0,01$).

Az artemizinin MIC_{90} értékei jelentősen alacsonyabbnak bizonyultak, mint a szkopoletiné *C. dubliniensis*szel, *C. krusei*vel és *C. parapsilosissal* szemben ($P < 0,01$).

A Pickering *Artemisia annua* EO nanoemulzió (AEP) magasabb antimikrobiális aktivitást mutatott, átlagosan tizenkétszer kisebb koncentrációban, mint az etanolban oldott illóolaj (AEE) ($P < 0,01$).

4. A kamilla Pickering-EO emulziók és az *Artemisia* másodlagos metabolitok minimális effektív koncentrációja (MEC₁₀)

Adataink azt sugallják, hogy a C_{Pe} hatásosabban elpusztítja a kiválasztott baktériumokat és gombákat 60 perc kezelést követően a C_{T80} és C_{Et} esetében kapott értékekhez viszonyítva ($P < 0,01$). Az Ar és a Sc hasonló MEC₁₀ értéket mutattak a vizsgált planktonikus *Candida* fajok esetében. Ami az emulgeált *Artemisia* EO-t illeti, a dózisfüggő sejt túlélési arány görbék (CFU meghatározás alapján) szignifikánsan magasabb pusztítási aktivitást mutattak 60 perces kezelést követően, mint az AET és az AEE esetében ($P < 0,01$).

5. A szekunder metabolitok és a Pickering-EO emulziók hatása a planktonikus sejtek oxidatív egyensúlyára

A kamilla C_{Pe} hatására növekedést tapasztaltunk a ROS, a peroxid, valamint a szuperoxid képződésében is, mind a Gram-pozitív és negatív baktériumok esetében, összehasonlítva a C_{T80}-al és a C_{Et}-vel, 60 perces kezelési idő után ($P < 0,01$).

Fokozottabb szuperoxid gyök (O₂^{•-}) képződést figyeltünk meg a *C. glabrata*, a *C. guilliermondii* és a *C. parapsilosis* törzseknél 60 perces Ar és Sc kezelést követően, mint más tesztelt *Candida* fajokban. Az Ar által kiváltott teljes O₂^{•-} képződés mértéke szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a Sc ezen hatása.

Ezen kívül, az *Artemisia* AEP hatékonyan növelte a kombinált ROS, a peroxid és a szuperoxid képződést, mind a Gram-pozitív, mind a negatív baktériumokban és a gombákban, összehasonlítva az AET-tel és az AEE-vel ($P < 0,01$). Az AEE mindössze három-négyszeres növekedést okozott az oxidatív stressz mértékében a növekedési kontrollhoz képest (Gc).

6. A megcsapdázott EO-k és a szekunder metabolitok hatása a planktonikus mikrobákra

6.1. A mikrobiális életképességben megfigyelt változások

Eredményeink azt sugallják, hogy a komplexált borsmentaolaj kevésbé hatékony a *S. pombe* elpusztításában, összehasonlítva az *E. coli* és a *S. aureus* esetében tapasztalt élő/elpusztult sejtaránnyal, ugyanazon koncentrációknál. A kakukkfűolaj mindhárom esetben hatékonyabbnak bizonyult, a sejtek több mint 90%-át pusztította el, amelyet a citrál követett, ami 90% -os gátlást okozott.

A C_{Pe} is jelentősen csökkentette a vizsgált baktériumok és gombák életképességét, összehasonlítva a Gc-vel 16 és 36 órás kezeléseket követően ($P < 0,01$), míg a C_{T80} és C_{Et}

kevésbé voltak hatékonyak, mint a C_{Pe} , a százalékos életképesség átlagos értékei $\geq 60\%$, illetve 70% voltak.

A 8 órás Ar és Sc kezelés az életképesség $\leq 50\%$ körüli csökkenését eredményezte *C. parapsilosis* és *C. krusei* sejtekben a vizsgálathoz használt kontrollokhoz viszonyítva ($P < 0,01$).

Az életképes sejtpopuláció 50% -os csökkenése átlagosan $9,9 \pm 0,71$ illetve $17,09 \pm 0,45$ órás AEP kezelést követően volt megfigyelhető a Gram-pozitív és -negatív baktériumok illetve a gombák esetében. Összehasonlítva az AEP-vel az AET-nél késleltetett hatást figyeltünk meg az 50% -os átlagos életképtelenséget mutató mikrobiális populációk létrejöttében ($P < 0,01$).

6.2. A metabolikus aktivitásra és a telepkepződésre gyakorolt hatások

A 16 és 36 órás kezelést követő sejtpusztulás ötven százaléka C_{Pe} hatására következett be a vizsgált baktériumok és gombák esetében, valamint 48 órás kezelés után ez a vegyület bizonyult a legeredményesebbnek a *C. albicans* élő telepszámának csökkentésében. A C_{Et} a C_{Pe} -hez képest átlagosan kétszer nagyobb koncentrációban volt képes hasonló sejtpusztító hatást kiváltani ($P < 0,01$).

Az Ar és a Sc a tesztelt *Candida* fajok metabolikus aktivitását 8 órás kezelés után átlagosan kétszeresére, majd 16 órás kezelés után háromszorosára csökkentette, összehasonlítva a megfelelő kontrollokkal. A planktonikus sejtpopuláció jelentős, $\leq 50\%$ -os csökkenését figyeltük meg a kontrollokhoz viszonyítva a *C. glabrata*, a *C. guilliermondii* és a *C. parapsilosis* esetében is 16 órás Ar, Sc és caspofungin gombaellenes szer (Cs) kezelést követően.

A metabolikus aktivitás, és a telepkepződés szignifikáns, 50% -os csökkenését figyeltük meg az AEP-vel kezelt baktériumok és gombák esetében. Összehasonlítva az AEP-vel, az AET kezelésnél késleltetett hatást figyeltünk meg az 50% -os metabolikus aktivitás csökkenés létrejöttében ($P < 0,01$).

6.3. Artemisia-EO Pickering emulzió hatására bekövetkező változások a mikrobiális intracelluláris ATP mennyiségében

Bár a planktonikus sejtekben az összes fehérjetartalom (TP) időbeni változását nem figyeltük meg, az AEP-vel kezelt minták esetében az ATP/TP arány 60% -os csökkenést mutatott a 0 órás mintákhoz képest ($P < 0,01$).

7. A másodlagos metabolitok és a Pickering-EO emulziók hatásai érett *Candida* biofilmekre

7.1. A biofilm teljes biomassájára és életképességére gyakorolt hatás

Eredményeink igazolták, hogy az Ar jelentősen hatékonyabban bontja meg a komplex, extracelluláris mátrix-borított biofilm szerkezetet és pusztítja el a szesszilis (felszínhez kitapadó) sejtpopulációt, a Sc-hez képest, saját MEC₁₀ koncentrációkkal, 24 órás kezelést követően vizsgálva a vegyületek hatását. Másrészt a Sc-kezelés drámai csökkenést eredményezett a teljes biomassza mennyiségében, beleértve a sejtek leválását a polisztirol felületről *C. albicans*, *C. dubliniensis* és *C. glabrata* esetében.

Jelentős, 40%-os metabolikus aktivitás csökkenés volt megfigyelhető az AEP kezelt érett, *Candida* fajok által képzett biofilmekben a Gc-hez képest, 24 órás kezelési időt követően.

7.2. Az *Artemisia* EO-Pickering emulzió hatása a *Candida* biofilmek intracelluláris ATP és teljes fehérjetartalmára

Az AEP kezelt érett *Candida* biofilm minták jelentős csökkenését mutattak a metabolikus aktivitás, és az intracelluláris ATP-termelés tekintetében 24 órás kezelést követően, összehasonlítva az AET és AEE kezelések átlagával ($P < 0,01$). Az összes fehérje (ami a sejtszámot tükrözi, TP) nem változott szignifikánsan a kezelések hatására, ugyanakkor az AEP-vel kezelt érett *Candida* biofilm minták esetében az ATP/TP arány szignifikáns 60% -os csökkenését mutatott a Gc-hez viszonyítva ($P < 0,01$).

V. MEGBESZÉLÉS

A RAMEB-csapdázott illóolajok és komponenseik TAC-ja 35–40% -kal nagyobb stabilitást mutatott, mint a korábban közölt adatok [2,3,5], ami arra utal, hogy a RAMEB inklúziós komplex megvédheti az illóolajok aktív összetevőit a reaktív oxidatív környezet hatásaitól. Az élő/elpusztult sejtarány meghatározására szolgáló plate olvasó módszer hitelességét áramlási citometriával igazoltuk azonos fluoreszcens festések használata mellett. Eredményeink alátámasztják azt az elképzelést, hogy a RAMEB-EO inklúziós komplexek segíthetnek leküzdeni az illóolajok élelmiszeriparban való alkalmazásának korlátait azáltal, hogy csökkentik illékonyágukat, az élelmiszer feldolgozás vagy tárolás során keletkező veszteséget, és fokozzák reaktívgyök megkötő és antimikrobiális aktivitásukat.

A Pickering nanoemulziós kamilla EO (C_{Pe}) készítmény használata során nagyobb mikrobiális növekedésgátló hatást és ennek következtében alacsonyabb MIC értékeket figyeltünk meg a

klasszikus C_{T80} és C_{Et} készítményekhez képest. A C_{Pe} képes jelentősebb mértékű oxidatív stresszt generálni, mint hagyományos emulziós vagy etanolos formái, ami anyagcserezavarokhoz, és a sejtfal sérüléséhez, végül sejthalálhoz vezetett a szubinhibitoros koncentrációknál [8].

A tanulmányban bemutatott adatok apoptózis-szerű folyamatok indukciójára utalnak a vizsgált *Candida* fajokban, ennek oka lehet az élesztőgombákban apoptózist kiváltó, vagy szabályozó reaktív oxigéngyökök (ROS) felhalmozódása [4,6]. Újszerű, többparaméteres vizsgálataink során precízen tudtuk értékelni a gombasejtek drog érzékenységet, a sejtpusztítási képességet planktonikus sejtekben és az érett biofilmekben egyaránt, összehasonlítva eredményeinket a klasszikus proliferációs vizsgálatokkal [5].

Elemzéseink alapján az *Artemisia* EO nanoemulzió (AEP) erősebb antimikrobiális aktivitást (MIC) mutatott alacsonyabb koncentrációban, összehasonlítva a detergens és etanol alapú formulázásokkal (AET és AEE). Adataink az AEP hatékony mikrobaölő aktivitását is bizonyítják a kiválasztott baktériumokon és gombákon. Összességében elmondható, eredményeink azt bizonyítják, hogy az AEP forma megkönnyíti a behatolást az *Artemisia* illóolaj számára a *Candida* biofilmekbe és sejtekbe egyaránt, illetve elősegíti az oxidatív stressz indukálását, melynek hatására a sejtmembrán integritása megbomlik, ez a Pickering nanoemulziós cseppek nagy adszorpciós hatékonyságának köszönhető.

VI. ÖSSZEFOGLALÓ, ÚJSZERŰ EREDMÉNYEK

- Termodinamikailag stabil új ciklodextrin alapú illóolaj/tiszta komponens komplexeket fejlesztettünk ki, nagy csapdázási hatékonysággal. Ennek eredményeként megbízhatóbb és időben tartósabb adatokat kaphattunk a komplexált különféle illóolajok/tiszta komponensek antioxidáns és antimikrobiális tulajdonságainak elemzéséhez.
- Kidolgoztunk és optimalizáltunk egy életképességén alapuló gyors mikroplate módszert az élő/elpusztult mikrobák számszerűsítéséhez fluoreszcens kettős festési módszer alkalmazásával. A vizsgálatot áramlási citometriával hitelesítettük, és sikeresen létrehoztunk egy gyors, megbízható és nagy teljesítményű antimikrobiális hatások elemzésre szolgáló protokollt.
- Képesek voltunk növelni a különféle illóolajok/komponenseik antioxidáns és antimikrobiális potenciálját a ciklodextrines csapdázás segítségével, a nem komplexált formáikhoz viszonyítva. A RAMEB komplexált EO-k és alkotóelemeik teljes

antioxidáns kapacitása és mikrobaellenes tulajdonságai 5-6-szor jelentősebbek voltak, mint azok hagyományos kiszerezési formái.

- Sikeresen hoztunk létre felületmódosított szilícium-dioxid nanoemulzió alapú készítményeket illóolajok és összetevőik, valamint növényi másodlagos metabolitok felhasználásával, ez a művelet fokozza azok vízoldhatóságát és megkönnyíti biológiai tulajdonságaik jellemzését.
- Karakterizálni tudtuk az illóolajok, és a tiszta növényi kivonatok antimikrobiális hatásait a minimális effektív koncentrációjuknál (MEC_{10}) különféle módszerekkel (metabolikus aktivitás mérése, oxidatív stressz mérése, élő/elpusztult sejtarány diszkriminációs vizsgálat, pusztítási aktivitás a kezelési idő függvényében). Eredményeink azt mutatják, hogy a Pickering EO nanoemulziók nagyobb növekedés gátló hatással rendelkeznek alacsonyabb MIC értékekkel, mint a hagyományos apoláris oldószer és detergens alapú készítmények. Ezen felül, a Pickering EO nanoemulziók a minimális effektív koncentrációjuk esetében (MEC_{10}) 3-5-ször nagyobb mértékű oxidatív stresszt voltak képesek kiváltani a sejtekben, amit sejtes anyagcsere zavarok és sejtfalkárosodás követett.
- Megvizsgáltuk az artemizinin és a szkopoletin (az *Artemisia annua* L. másodlagos anyagcseretermékei), antimikrobiális és anti-biofilm hatásait, illetve hogy miként befolyásolják a sejtek életképességét, metabolikus aktivitását, és az oxidatív stressz egyensúlyát a mikrobiális biofilmekben és planktonikus sejtekben egyaránt. Adataink arra utalnak, hogy a vizsgált vegyületek MEC_{10} koncentrációja hatékonyan bontja meg a sejtek oxidatív egyensúlyát és csökkenti az anyagcsere aktivitását, majd apoptózis szerű folyamatokat indukál a vizsgált *Candida* fajokban.
- Számos multiparametrikus fluoreszcens technikát vezettünk be az *Artemisia annua* L. Pickering EO nanoemulziók (AEP) antimikrobiális hatásainak vizsgálatához kapcsolódó kihívások leküzdésének érdekében mind a biofilm, mind a planktonikus sejtek esetében, illetve vizsgáltuk azok lehetséges hatásmechanizmusait (metabolikus aktivitás mérése, oxidatív stressz mérése, élő/elpusztult sejtdiszkriminációs vizsgálat, a sejten belüli ATP/összes fehérjetartalom mérése). Az AEP esetében a hagyományos detergens- és apoláris oldószer alapú készítményekhez képest hatékonyabb mikroba ellenes hatást figyeltünk meg. Összességében, a megfigyeléseink alapján elmondható, hogy a Pickering nanoemulzió megkönnyítette az *Artemisia annua* L. illóolaj

behatolását a biofilmekbe és a mikrobiális sejtekbe, növelte azok hatékonyságát az oxidatív stressz kiváltásában és a sejtfal károsításának folyamatában.

VII. HIVATKOZÁSOK

1. Manion, C.R.; Widder, R.M. Essentials of essential oils. *American Journal of Health-System Pharmacy* **2017**, *74*, e153–e162.
2. Omonijo, F.A.; Ni, L.; Gong, J.; Wang, Q.; Lahaye, L.; Yang, C. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition* **2018**, *4*, 126–136.
3. McKay, D.L.; Blumberg, J.B. A Review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research* **2006**, *20*, 519–530.
4. Lis-Balchin, M. *Aromatherapy science: a guide for healthcare professionals*; Pharmaceutical Press: London ; Chicago, 2006; ISBN 978-0-85369-578-3.
5. Bhargava, K.; Conti, D.S.; da Rocha, S.R.P.; Zhang, Y. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. *Food Microbiology* **2015**, *47*, 69–73.
6. Oussalah, M.; Caillet, S.; Salmiéri, S.; Saucier, L.; Lacroix, M. Antimicrobial Effects of Alginate-Based Films Containing Essential Oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* Present in Bologna and Ham. *Journal of Food Protection* **2007**, *70*, 901–908.
7. Perricone, M.; Arace, E.; Corbo, M.R.; Sinigaglia, M.; Bevilacqua, A. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Frontiers in Microbiology* **2015**, *6*, 76.
8. Guo, J.; Gao, Z.; Li, G.; Fu, F.; Liang, Z.; Zhu, H.; Shan, Y. Antimicrobial and antibiofilm efficacy and mechanism of essential oil from Citrus Changshan-huyou Y. B. chang against *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **2019**, *105*, 256–264.
9. Das, S.; Gazdag, Z.; Szenté, L.; Meggyes, M.; Horváth, G.; Lemli, B.; Kunsági-Máté, S.; Kuzma, M.; Kőszegi, T. Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated β cyclodextrin – captured essential oils. *Food Chemistry* **2019**, *278*, 305–313.
10. Wang, T.; Li, B.; Si, H.; Lin, L.; Chen, L. Release characteristics and antibacterial activity of solid-state eugenol/ β -cyclodextrin inclusion complex. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2011**, *71*, 207–213.
11. Das, S.; Horváth, B.; Šafranko, S.; Jokić, S.; Széchenyi, A.; Kőszegi, T. Antimicrobial Activity of Chamomile Essential Oil: Effect of Different Formulations. *Molecules* **2019**, *24*, 4321.
12. Das, S.; Czuni, L.; Báló, V.; Papp, G.; Gazdag, Z.; Papp, N.; Kőszegi, T. Cytotoxic Action of Artemisinin and Scopoletin on Planktonic Forms and on Biofilms of *Candida* Species. *Molecules* **2020**, *18*, 476.
13. Silhavy, T.J.; Kahne, D.; Walker, S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2010**, *2*, a000414–a000414.
14. Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R.L. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology* **2012**, *3*, 12.
15. Das, S.; Vörös-Horváth, B.; Bencsik, T.; Micalizzi, G.; Mondello, L.; Horváth, G.; Kőszegi, T.; Széchenyi, A. Antimicrobial Activity of Different Artemisia Essential Oil Formulations. *Molecules* **2020**, *25*, 2390.

VIII. KÖZLEMÉNYEK FELSOROLÁSA

1. A tézishez kapcsolódó folyóirat közlemények

- **Das Sourav**, Gazdag Zoltán, Szente Lajos, Meggyes Mátyás, Horváth Györgyi, Lemli Beáta, Kunsági-Máté Sándor, Kuzma Mónika, Kőszegi Tamás. Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated β cyclodextrin – captured essential oils, *FOOD CHEMISTRY* 278 pp. 305-313., 9 p. (2019). **IF: 6.306**
- **Das Sourav**, Horváth Barbara, Šafranko Silvija, Jokić Stela, Széchenyi Aleksandar, Kőszegi Tamás. Antimicrobial activity of chamomile essential oil: Effect of different formulations, *MOLECULES* 24: 23 Paper: 4321, 18 p. (2019). **IF: 3.267**
- **Das Sourav**, Czuni Lilla, Báló Viktória, Papp Gábor, Gazdag Zoltán, Papp Nóra, Kőszegi Tamás. Cytotoxic action of artemisinin and scopoletin on planktonic forms and on biofilms of *Candida* species, *MOLECULES* 25: 3 Paper: 476, 18 p. (2020). **IF: 3.267**
- **Das Sourav**, Vörös-Horváth Barbara, Bencsik Tímea, Micalizzi Giuseppe, Mondello Luigi, Horváth Györgyi, Kőszegi Tamás, Széchenyi Aleksandar, Antimicrobial activity of different Artemisia essential oil formulations, *MOLECULES* 25: 10 Paper 2390, 27p. (2020). **IF: 3.267**

2. A tézishez nem kapcsolódó folyóirat közlemény

- Csepregi Rita, Temesfői Viktória, **Das Sourav**, Alberti Ágnes, Tóth Csenge Anna, Herczeg Róbert, Papp Nóra, Kőszegi Tamás, Cytotoxic, Antimicrobial, Antioxidant Properties and Effects on Cell Migration of Phenolic Compounds of Selected Transylvanian Medicinal Plants, *ANTIOXIDANTS* 9: 2 Paper 166. 29p. (2020). **IF: 5.014**

Kumulatív impakt faktor: 21.121

3. A tézishez kapcsolódó konferencia szereplések

- **Das Sourav**, Gazdag Zoltán, Sente Lajos, Meggyes Mátyás, Horváth Györgyi, Kőszegi Tamás. Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated β cyclodextrin complexed Essential Oils. International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences. IC-ANMBES (2018) p. 112., 1 p.
- **Das Sourav**, Czuni Lilla, Balo Viktoria, Papp Gabor, Gazdag Zoltan, Koszegi Tamás. Anti-biofilm and cytotoxic activities of artemisinin and scopoletin on *Candida* spp. in combination with caspofungin. 46th Annual Conference on Yeasts May 7-10 2019 Slovakia Programme and Abstracts (2019) p. 60., 1 p.

4. A tézishez nem kapcsolódó konferencia szereplések

- Kócsó József Dániel, **Das Sourav**, Kovács Melinda, Gazdag Zoltán, Kőszegi Tamás, Papp Gábor. Cytotoxic effect and peroxide generation of deoxynivalenol and zearalenone alone or in combination on fission yeast. XVI. János Szentágothai Multidisciplinary Conference and Student Competition – Abstracts Pécs, Hungary: János Szentágothai Scholastic Honorary Society, Faculty of Sciences, University of Pécs, (2019) p. 244., 1 p.
- Bouchelaghem Sarra, **Das Sourav**, Gazdag Zoltán, Fekete Csaba, Kőszegi, Tamás, Naorem Romen, Papp Gábor. Antimicrobial activities of Hungarian propolis alone and in combination with antibiotics and its antibiofilm activity on *Staphylococcus aureus*. XVI. János Szentágothai Multidisciplinary Conference and Student Competition – Abstracts Pécs, Hungary: János Szentágothai Scholastic Honorary Society, Faculty of Sciences, University of Pécs, (2019) p. 16., 1 p.
- Balo Viktoria, Czuni Lilla, **Das Sourav**, Fekete Csaba, Papp Gábor, , Peter Urbán, Kőszegi, Tamás, Gazdag Zoltán. Examination of the antibiotic sensitivity and biofilm forming ability of various *Candida* strains. 46th Annual Conference on Yeasts May 7-10 2019 Slovakia Programme and Abstracts (2019) pp. 58., 1 p.

IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Kőszegi Tamás professzor úrnak, aki megismertette velem az orvostudományi kutatásokat, és sok éven át oktatott. Kritikus gondolkodása, a laboratóriumi medicina terén szerzett szakértelme és lenyűgöző személyisége nagymértékben inspirált és fejlesztett.

Hálás vagyok Prof. Dr. Miseta Attilának nagylelkű támogatásáért, és azért, hogy lehetővé tette kutatásaim elvégzését a Laboratóriumi Medicina Intézetben és a Szentágotthai János Kutatóközpontban.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Botz Lajos professzornak, aki lehetővé tette, hogy csatlakozhassam az általa vezetett doktori programhoz kutatásim és tanulmányaim folytatására.

Köszönetet mondok Dr. Fekete Csaba professzornak, hogy kutatást folytathattam a Pécsi Tudományegyetem Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszékén.

Köszönetet mondok prof. Dr. Kunsági-Máté Sándornak, Dr. Lemli Beátának, Dr. Gazdag Zoltánnak, Dr. Papp Gábornak, Dr. Papp Nórának és Dr. Horváth Györgyinek módszertani és technikai támogatásukért.

Őszintén köszönöm Dr. Aleksandar Széchenyinek hogy megosztotta velem a Pickering emulziókkal és azok alkalmazásával kapcsolatos úttörő megállapításait, amelyek számos kutatási elképzelésünk alapját képezték.

Nagyon hálás vagyok, hogy Horváth Barbarának műszaki, módszertani , és analitikai segítségéért melyekkel támogatta a kutatásomat.

Hálával tartozom Dr. Kuzma Mónikának, Dr. Luigi Mondello professzornak és Dr. Giuseppe Micalizzi-nek a GC-MS elemzésekkel kapcsolatos felbecsülhetetlen műszaki útmutatásukért és támogatásukért.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Bencsik Tímeának, aki megismertetett a természetes anyagok izolálásának izgalmas területével.

Hálás vagyok kollégáimnak, Das-Báló Viktóriának, Temesfői Viktóriának, Csepregi Ritának, Czuni Lillának és Meggyes Mátyásnak biztató, kreatív ötleteikért és barátságukért.

Végül hálás vagyok családomnak és barátaimnak kritikai észrevételeikért és szeretetteljes gondoskodásukért, amelyek segítettek ennek a munkának a befejezésében.

Investigation of antimicrobial and cytotoxic actions of plant extracts and essential oils

Doctoral (Ph.D.) Thesis

Sourav Das, M. Pharm.

Doctoral School of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Tamás Kőszegi, M.D., Ph.D., Dr. Habil.

Leader of Doctoral School:

Prof. Dr. Erika Pintér, Ph.D., Dr. Habil., D.Sc.

Program Leader:

Prof. Dr. Lajos Botz, Ph.D., Dr. Habil.



University of Pécs Clinical Center
Department of Laboratory Medicine
Pécs, 2020

I. INTRODUCTION

1. Essential oils and their uses

Essential oils have been widely used in folk medicine throughout the history of humankind. EOs are mixtures of complex compounds with variable individual chemical composition and concentrations that include primarily terpenoids, like monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, acids, alcohols, aldehydes, aliphatic hydrocarbons, acyclic esters or lactones, rare nitrogen- and sulfur-containing compounds, coumarin, and homologs of phenylpropanoids [1–4]. The biological actions of EOs cover a wide range of effects, including antioxidant, antimicrobial, antitumor, anti-inflammatory, and antiviral activity. Mechanisms that explain the action of essential oils on bacterial cells have been studied, but it is still not possible to state with certainty how the essential oils act on a microbial cell [5,6]. The typical hydrophobic characteristics of essential oils are responsible for the breakdown of bacterial structures, which leads to increased permeability through the bacterial cell membrane [7,8].

2. *Artemisia annua* L. and its secondary metabolites

Artemisinin (Ar), belonging to a family of sesquiterpene lactones originally derived from *Artemisia annua* L. is well-known for its anti-malarial actions by forming free radicals through cleavage of intra-parasitic iron-endoperoxide groups and by alkylation of specific malarial proteins mediating eradication of *Plasmodium* species [1,3].

Scopoletin (Sc, 6-methoxy-7-hydroxycoumarin) is a phenolic compound isolated from several plants including *Artemisia annua* L. The Sc possesses anti-tumor and anti-angiogenesis properties by initiating cell cycle arrest and facilitating apoptosis in human prostate tumor cells and leukemia cell lines [5–7]. Although anti-fungal effects including the anti-*Candida* activity of Ar and Sc were already studied, yet no detailed data are found in the literature on *Candida* species' viability and biofilm formation treated with Ar and Sc at their minimum effective concentration [4–6]. Moreover, there are no experimental results obtained by using double-stain rapid fluorescent assays for live/dead cellular discrimination along with metabolic activity determination for Ar- and Sc-exposed *Candida* species.

3. Usage of artificial vs. natural preservatives in the food industry

The perception of naturalness drives the consumer towards foods without chemical preservatives. Thermal processing, drying, freezing, refrigeration, irradiation, modified

atmosphere packaging, and addition of antimicrobial agents or salts are some conventional methods to prevent the growth of microbes in foods [7–9]. Some chemical preservatives such as sodium benzoate, potassium sorbate, and nitrites have been used commercially in fruit juices, dairy products, confectionery, meat, and meat products, etc. [3,10]. Due to growing evidence about the harmful effects of chemical preservatives, there is continuous pressure to reduce the amount of added preservatives in foods [11]. To avoid the health risks associated with the consumption of chemically enriched foods, natural antimicrobial compounds like bacteriocins, chitosan-fermented ingredients, and plant antimicrobials provide another alternative for preserving food. Plant extracts, essential oils, and peptides exhibit a broad-spectrum activity [11,12]. Several studies have been conducted around the globe to prove the efficacy of plant products, and various compounds isolated from these plants are secondary metabolites that possess antimicrobial and medicinal properties [13,14].

4. *Candida* species-related infections

In certain individuals with immune-compromised status, the *Candida* species might induce consequent infection. Also, *Candida* species can rapidly adapt to the host's micro-environmental circumstances caused by pH and nutritional changes in the gastrointestinal tract [15]. Environmental imbalance because of nutritional change or pH shifting facilitates the abnormal growth of *Candida* species which results in candidiasis [14,15]. *Candida* species attack the gut epithelium barriers to reach the bloodstream via micro-fold cells that are found in the gut-associated lymphoid tissue of Peyer's patches in the small intestine promoting intestinal infections [3,8].

Because of the increasing incidence of candidiasis and the difficulties in its treatment due to the limited options in the use of antifungal drugs with species-specific efficacy, there is an ultimate need for at least prevention of fungal infections.

5. Experimental and application-based problems

5.1. Stability and lipophilicity associated problems of EOs

Despite the natural appeal and interesting effectiveness against both molds and bacteria, EOs are highly volatile and prone to oxidative damage when exposed to light, oxygen, and temperature [15]. Chemical component groups of essential oils are readily converted by oxidation, isomerization, cyclization, or dehydrogenation, which are reactions that can be enzymatically or chemically triggered, and these processes are usually associated with a loss of quality. Also, there might be several side effects of EOs even if topical administration is applied

and, among these, allergic reactions are the most frequent (many EOs can cause, e.g., rashes on the skin). Some of them can be poisonous if absorbed through the skin, breathed, or swallowed [9,14]. Another serious problem is the highly lipophilic nature of EOs, which makes it impossible to measure their biological effects in an aqueous environment. Several assays including the conventional broth dilution method, disk diffusion method, and bioautography assay are used to measure the antimicrobial activity of EOs. Efforts have been made to overcome the lipophilic nature of the oils usually by application of EOs diluted in seemingly suitable solvents/detergents. In the case of natural lipophilic volatile compounds like EOs, solvents of varying polarity, e.g., DMSO, ethanol, and methanol, are most commonly used. However, previous studies have reported the antimicrobial effects of the solvents themselves (DMSO, ethanol, and other solvents in various microbial assays) or their influence on the true antimicrobial effects of EOs [3,15].

5.2. Lack of reliable quantitative and qualitative experimental data

Another major problem that hinders the measurement of the antimicrobial activity studies is the lack of clearly visible bacterial and fungal colonies which makes precise quantification of the growth, difficult. Lack of a convenient viability testing method has hampered antibiotic testing and new drug discovery [13,14]. Presently, microscopic counting and quantitative PCR (qPCR) are the main and reliable assays for quantification of microbes. Manual microscopic counting using a counting chamber is mainly used to characterize microbial viability in vitro, but it is very time-consuming and is hard to perform in a microtiter plate. Several rapid colorimetric assays have been used to determine microbial enzymatic activity, cell membrane integrity, cell proliferation, metabolic activity, cell viability, and antibiotic susceptibility [12]. However, these assays either have limited sensitivity or are cumbersome and cannot be performed in a high throughput format.

II. MAJOR OBJECTIVES

- **The solubility of the plant-derived secondary metabolites, essential oils, and their active components in the aqueous test systems is usually very poor. That is why the characterization of the antioxidant and antimicrobial properties is often performed by adding detergents, polar protic/aprotic, and non-polar solvents.**

Therefore, we aimed to develop new drug formulations with modified cyclodextrins and nanoemulsions for aqueous test systems that could be used for antioxidant and antimicrobial assays without additives. We also characterized the entrapment efficiency

and the thermodynamic properties of the cyclodextrin-captured EOs and pure EO components.

- **There is no existing rapid, high throughput assay for live/dead microbial viability testing.**

We have tried to establish a rapid live/dead microbial viability microplate assay technique using a double-stain fluorescent method.

- **Formation of fungal biofilms is a major problem and there are only a few natural anti-biofilm compounds that could overcome increasing microbial drug resistance. So, there is a need to find some new natural compounds that can compete with microbial drug resistivity in biofilms.**

We aimed to investigate the antimicrobial and biofilm degradation activities of artemisinin and scopoletin (isolated from *Artemisia annua* L.) to reveal their effects on cellular viability, metabolic activity, and oxidative stress balance of microbial biofilms.

- **There are only a few attempts to measure the antimicrobial activity of plant extracts at their concentration below the MIC.**

We aimed to characterize the antimicrobial effects of essential oils and pure plant extracts at their Minimum Effective Concentrations (MEC₁₀) by various methods (metabolic activity, oxidative stress, live/dead discrimination assay, killing activity vs. exposure time).

- **The exact measurement of the antimicrobial assay in the biofilms is still a challenge.**

That is why we have aimed to develop multiparametric fluorescent techniques to evaluate the possible mode of action of our studied plant extracts in mature biofilms.

III. METHODOLOGIES

1. Samples and formulations used in the experiments

For our RAMEB-EO/component studies, we have used thyme oil, lemon balm oil, lavender oil, peppermint oil, thymol, menthol, linalool, citral, and borneol. We have also conducted biological experiments on artemisinin and scopoletin (secondary metabolites of *Artemisia annua* L.). Furthermore, the surface-modified silica nanoemulsions of *Artemisia annua* L. essential oil and chamomile oil (prepared by Barbara Horváth and her colleagues at the Institute of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs.

Details can be found in Ref. [11,15] and in her Ph.D. thesis “Pickering Emulsions in Pharmaceutical Technology”; in preparation) were also studied.

2. Microorganisms used in the experiments

In our studies, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* obtained from Szeged Microbial Collection, Department of Microbiology, University of Szeged, Hungary (SZMC) and from Department of General and Environmental Microbiology, Institute of Biology, University of Pecs, Hungary (PMC) were used for the experiments.

3. Development and optimization of SYBR Green I/Propidium iodide microbial viability assay

Briefly, cultures of either *S. pombe*, *E. coli*, or *S. aureus* were grown to log phase in nutrient broth. The microbial suspension in each tube was pelleted by centrifugation. All samples were incubated at room temperature for 15 minutes then were re-centrifuged. Both treated and untreated samples were pipetted into 96-well transparent flat bottom general plates. Premixed SYBR Green I/PI dye was pipetted into the wells containing the samples and mixed thoroughly. The plates were incubated in the dark for 10 minutes. For the evaluation of microbial viability, fluorescence intensities of the samples in the 96-well microtiter plates were measured at two monochromatic settings (490 nm/525 nm and 530 nm/620 nm, respectively).

$$\% \text{ Dead cells}_{Dose} = 100 - \left\{ \left(\frac{Dose_{G/R}}{Control_{G/R}} \right) \times 100 \right\}$$

where, $Dose_{G/R}$ is the green to red ratio of a specific dose and $Control_{G/R}$ is the green to red ratio of the living control. Calibration was done by using mixtures of live/dead microbes.

In our flow cytometric analysis, we assessed the ratio of living and dead cells using SYBR Green I and propidium iodide double staining as in the case of the plate reader experiments. Flow cytometric measurements were performed on a FACS Canto II instrument using FACS Diva V6.0 software.

4. Measurement of total antioxidant capacity (TAC) of RAMEB-EOs

The diphenyl-2-2 picryl-hydrazyl (DPPH) assay has been performed following the procedure described previously with modifications [9]. Briefly, the DPPH stock was prepared in 96% ethanol and serial dilutions of Trolox antioxidant standards and EOs - RAMEB dilutions were

prepared in PBS. Acetate buffer of pH 5.5 followed by standard/sample dilutions and DPPH were pipetted into 96-well general microtiter plates. Absorbance was measured at 517 nm by a plate reader after 30 min incubation. TAC values were given as 50% inhibition capacity (IC₅₀). The enhanced chemiluminescence (ECL) TAC reaction was performed in 96-well white Optiplates. Trolox/blank/sample and peroxidase based (POD-ECL) reagent were pipetted into each well. For initiation of the ECL reaction, ice-cold H₂O₂ in citric acid was injected into the wells by the automated dispenser of a microplate reader. Luminescence was followed for 10 min. The method was calibrated by using the light output of standards, samples' calculated results were multiplied by the dilution factor, and expressed as μ M Trolox equivalent (TE) [14]. Lastly, for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), we used a standard procedure described previously with modifications [8,9]. In brief, the reactions were started by injecting 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) solution in the microplate containing the blank/standard/sample and buffered Na₂-fluorescein indicator. The quenching of fluorescence intensities was monitored for 80 minutes using 490/520 nm filter settings and total light outputs as AUC was calculated. The AUC of the blank was subtracted from that of the standards/samples and netAUC was further used in the antioxidant capacity calculations [3,5].

5. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of RAMEB-EOs/components, secondary metabolites and Pickering-EO emulsions

The MICs of the tested compounds were separately evaluated according to our previously published protocol [9]. Briefly, log phased cells with test compounds and appropriate controls were incubated at a wide concentration range in modified RPMI 1640 medium. The absorbance was measured by a plate reader. The absorbance values obtained by the plate reader were converted to percentages and were compared to the growth control (Gc, 100%). The data were fitted by a non-linear dose-response curve fitting method to estimate the dose producing $\geq 80\%$ (MIC₈₀) or $\geq 90\%$ (MIC₉₀) growth inhibition. Either MIC₈₀ or MIC₉₀ were calculated depending on our methodological requirements.

6. Determination of minimum effective concentrations (MEC₁₀) of the secondary metabolites and Pickering-EO emulsions

The MEC₁₀ concentration means $\leq 10\%$ growth inhibition and was obtained according to our previously published protocol [11,12,15]. The test compounds of a wide concentration range were used to treat mid-log phased cells in modified RPMI 1640 medium for an hour. Inoculated growth medium without any treatment was considered as growth control. For the colony-

forming unit quantification, the conventional Petri-dish spreading method was followed. The colony formation data were converted to percentages and the data were fitted using a non-linear dose-response curve fitting method to evaluate the drug concentrations producing approximately 90% microbial cell population growth when compared to the untreated microbial cell populations after one hour of treatment.

7. Evaluation of microbial ROS, peroxide and superoxide generation

7.1. Combined ROS generation of the Pickering-EO emulsions

For the quantification of the combined reactive oxygen species generation (ROS), we have followed our previous protocol [11,15]. Briefly, for the ROS measurements, mid-log phased cells were collected and centrifuged and were re-suspended in PBS. The staining of the cells was done with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate. The cells were re-suspended in modified RPMI 1640 medium after centrifugation followed by treatment with test compounds at their respective MEC₁₀ concentrations for one hour and fluorescence data were measured.

7.2. Peroxide and superoxide generation by the secondary metabolites and the Pickering-EO emulsions

For the measurement of peroxide and superoxide generation, Dihydrorhodamine 123 and Dihydroethidium were used as the fluorescent markers, with an exception that they were added to the cell samples before the measurement after washing and re-suspending in PBS. The percentage increase in the combined ROS, peroxide, and superoxide generation was measured by comparing the fluorescent signals obtained from the growth controls [4,15].

8. Changes in the microbial planktonics' behavior

8.1. Changes in metabolic activity, live/dead microbial discrimination and colony-formation by the secondary metabolites and Pickering-EO emulsions

For the metabolic activity and live/dead discrimination, untreated, test compound-treated samples were taken at different time intervals and were centrifuged and re-suspended in PBS. The fluorescence was measured with a fluorescence spectrophotometer/microplate reader in 96-well Optiplates for the metabolic activity measurements. The green to red fluorescence ratio for each sample and each dose was established and the % of the dead microbial cells with the response to the applied dose were plotted against the applied test compounds using our previous formula [9]. We followed our published protocol for determining the changes in colony formation of the microbes [4].

8.2. Intracellular ATP and total protein content of *Artemisia* EO-Pickering emulsion

The instructions provided by the manufacturer were followed for the intracellular ATP measurement of the microbial planktonics. In brief, after the centrifugation, both treated and untreated aliquots were suspended in PBS and freshly prepared BacTiter-Glo reagent was pipetted onto the samples in 96-well Optiplates. The microplates were shaken in the dark at 4 °C for 15 min and the luminescence was measured using a multimode plate reader.

For the total protein content of the planktonics, we adapted the Bradford protein assay method [5,8]. The test compound-treated samples were collected at different time intervals and were centrifuged followed by re-suspension in 1M NaOH containing glass beads. Cell disruptor cycles were repeated three times and then the samples were centrifuged. The supernatants' microbial cell lysates were collected in separate centrifuge tubes. The absorbance was measured at 595 nm by a multimode plate reader and was calculated in terms of mg/L from a BSA standard calibration curve and was compared to the 0 h samples [3,4].

9. Effects of secondary metabolites and *Artemisia* EO-Pickering emulsion on preformed mature *Candida* biofilms

9.1. Preparation of mature biofilm and treatments

The effects on the mature *Candida* species biofilms and the treatment conditions were adapted from our previously published work [12]. Briefly, 24 h-old late-log phased *C. albicans* and non-*albicans* species in modified RPMI 1640 medium were used to form biofilms in the microplates before the treatments for 24 h at 30 °C. The microplates were washed in PBS followed by re-incubation in modified RPMI 1640 medium containing test compounds at MEC₁₀ concentrations for a further 24 h at 30 °C.

9.2. Changes in total biofilm biomass

The change in the biofilm biomass was determined by our previously published crystal violet assay [11,12]. After 24 h of incubation, the supernatant containing the test samples was pipetted out and the wells were washed with PBS. The supernatant was removed and 0.1% w/v crystal violet in absolute ethanol was pipetted into each well. The absorbance was measured at 590 nm by a multimode plate reader.

9.3. Metabolic activity of the biofilms

A resazurin-derived fluorescent technique was adapted from our previously published protocol to determine the metabolic activity in the fungal biofilms [11,12]. Two hundred microliters of

sterile PBS containing resazurin were pipetted into the wells and were incubated at 30 °C for 40 min. The percentage of metabolic activity measurements were evaluated based on the fluorescence values recorded by the growth control, which was considered to be 100%.

9.4. Microbial viability assay of the biofilms

For the discrimination of the live/dead fungal cells in the biofilms, we have followed a method previously published [9]. One hundred microliters of SYBR Green I/PI working solutions were pipetted into the wells of the microplate containing submerged fungal biofilms (both treated and untreated) in PBS. A fluorescence spectrophotometer/microplate reader was used to measure the fluorescent intensities for SYBR Green I and PI as described earlier.

9.5. Effects of *Artemisia* EO-Pickering emulsion on *Candida* biofilms' intracellular ATP and total protein contents

The instructions provided by the company were followed for the intracellular ATP measurement of the *Candida* mature biofilms. In brief, after 24 h of the treatment with the test compounds, the planktonic cells were pipetted out, followed by rinsing the biofilm and pipetting PBS and BacTiter-Glo reagent into every well of the microplate. The microplates were shaken in the dark. The content of the microplates was transferred to 96-well white Optiplates and the luminescence was measured using a multimode plate reader.

For the protein assay we have adapted the Bradford method [3,5]. Briefly, after 24-hour treatment of the mature biofilms with test compounds, the planktonic cells were pipetted out and biofilms were rinsed with PBS. The biofilms were scraped out from the Petri-dishes using a cell scraper into sterile centrifuge tubes containing 1M NaOH and glass beads. Cell disruption was performed in 3 cycles and the supernatants' fungal cell lysates were pipetted out and were diluted in NaOH. All the measurements were calculated in terms of mg/L from a BSA standard calibration curve and were compared to the growth control. Total protein contents were referred to as the surface area of the microplates to obtain the valid ATP/TP values.

10. Statistical analyses

All data were given as mean \pm SD. Graphs and statistical analyses were conducted using OriginPro 2016 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA). All experiments were performed independently six times in triplicates and data were analyzed by a one-way ANOVA test. *P*-values of <0.05 were considered statistically significant. The minimum inhibitory concentrations (MIC₈₀ and MIC₉₀) and the minimum effective concentration (MEC₁₀) were calculated using a non-linear dose-response curve function as follows:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(LOG_x 0 - x)p}}$$

where, A_1 , A_2 , $LOG_x 0$, and p is the bottom asymptote, top asymptote, center, and hillslope of the curve have been considered. Either MIC_{80} or MIC_{90} were calculated depending on our methodological requirements.

IV. RESULTS

1. Development and optimization of SYBR Green I/PI microbial viability assay

To evaluate if the SYBR Green I/propidium iodide staining can be used for rapid plate reader viability assay, *S. pombe* was subjected to treatment with different concentrations of 2-propanol. The microplate method was validated by flow cytometry. In summary, we have evaluated the microbial viability to compare the percentage of dead cells by both plate reader and flow cytometry methods. We found the optimized SYBR Green I/propidium iodide assay to be reliable for the rapid estimation of the viability of microbes using the plate reader technique (Figure 1).

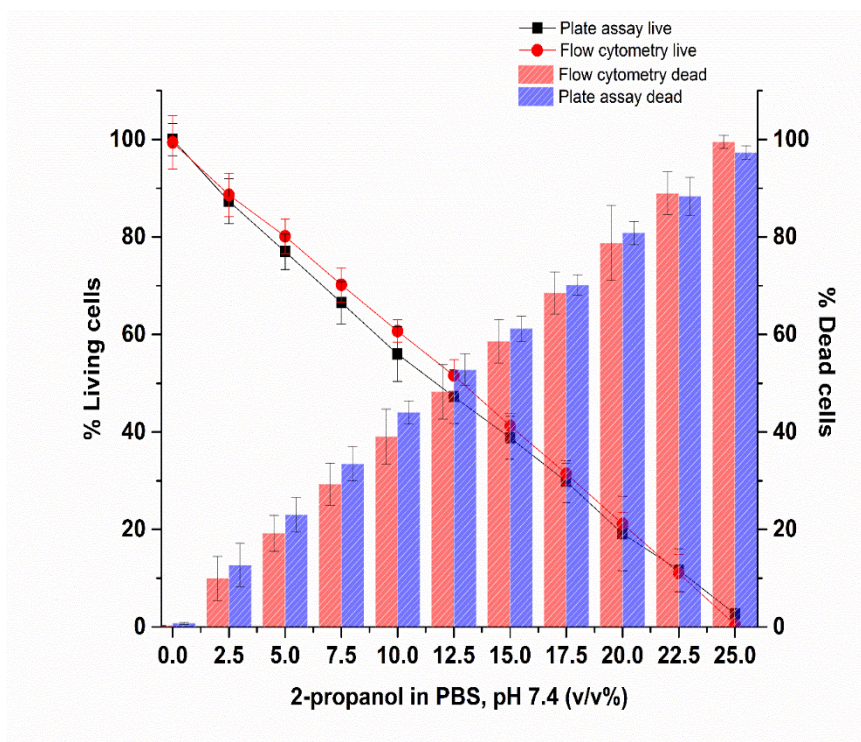


Figure 1. Comparison of the live/dead discrimination results between the plate reader assay and the flow cytometric assay using SYBR Green I/propidium iodide double staining on *S. pombe*. Six independent experiments with three technical replicates were performed (mean \pm SD).

2. Total antioxidant capacity (TAC) of RAMEB-EOs and their components

The antioxidant activity obtained by thyme oil and its component thymol was found to be the highest followed by lemon balm oil, lavender oil, and peppermint oil (Figure 2). Previous data reported a higher concentration of EOs than were used in our experiments to produce suitable antioxidant activity [1–4]. We found, that when EOs are captured by RAMEB, a remarkable antioxidant capacity is achieved despite the use of smaller amounts of them.

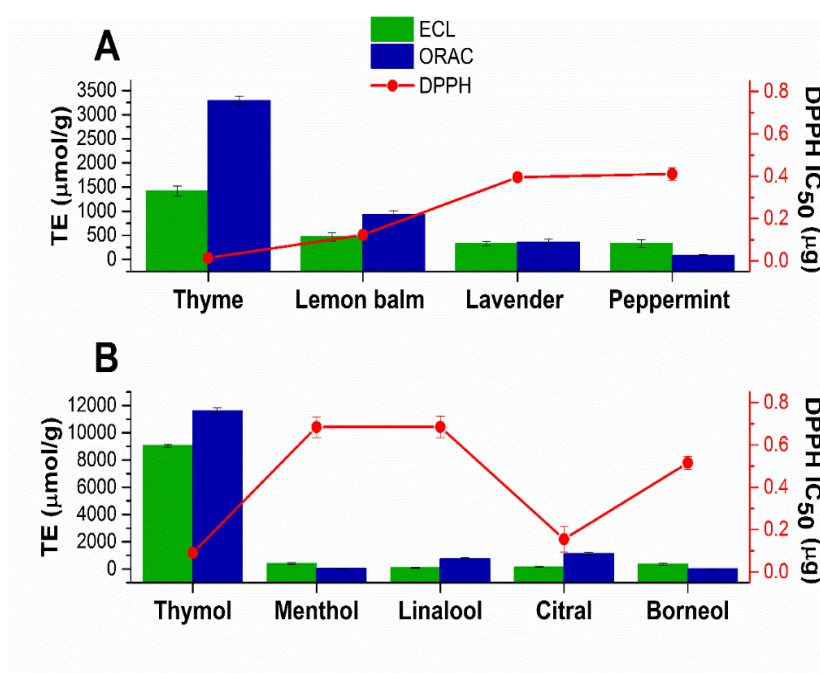


Figure 2. Antioxidant capacities of investigated EO-RAMEB (A) and EO components RAMEB (B) complexes. The effects of selected RAMEB packed EOs and their components were measured by ORAC, ECL, and DPPH assays. Six independent experiments with three technical replicates were performed (mean \pm SD).

3. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of RAMEB-EOs/components, secondary metabolites and Pickering-EO emulsions

The RAMEB-thyme oil was found to have the best MIC against *S. pombe*, *E. coli*, and *S. aureus* respectively, followed by lemon balm oil, peppermint oil, and lavender oil, in this order.

The chamomile EO Pickering emulsion (C_{Pe}) has been shown to have good antibacterial and antifungal activities (MIC_{90}) on *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pombe*, *C. albicans*, and *C. tropicalis*, respectively when compared to Tween80 (C_{T80}) or ethanolic (C_{Et}) counterparts ($P < 0.01$).

The artemisinin MIC_{90} values were significantly lower than those of scopoletin in the case of *C. dubliniensis*, *C. krusei*, and *C. parapsilosis* ($P < 0.01$).

The Pickering *Artemisia annua* EO nanoemulsion (AEP) showed higher antimicrobial activity at an average of twelve-fold less concentration when compared to the free essential oil in ethanol (AEE) ($P < 0.01$).

4. Minimum effective concentrations (MEC₁₀) of chamomile Pickering-EO emulsions and *Artemisia* secondary metabolites

Our data suggest an effective killing activity of C_{Pe} on selected bacteria and fungi after 60 min of treatment when compared to C_{T80} and C_{Et} ($P < 0.01$). Also, the Ar and Sc have shown similar MEC₁₀ for the tested planktonic *Candida* spp. As for the emulsified *Artemisia* EO the expressed dose-dependent cell survival rate curves (by CFU quantification) after 60 min exposure showed a significantly higher killing activity of AEP when compared to AET, and AEE ($P < 0.01$).

5. Effects of secondary metabolites and Pickering-EO emulsions on the oxidative balance of planktonic cells

The chamomile C_{Pe} showed an increment of ROS, peroxide, and superoxide generation in both Gram-positive and negative bacteria when compared to C_{T80} and C_{Et} in 60 min ($P < 0.01$).

Higher superoxide radical (O₂^{•-}) generation was observed in *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, and *C. parapsilosis* compared with other tested *Candida* spp. after the treatment with Ar and Sc for 60 min. The overall O₂^{•-} generation induced by Ar was found to be significantly higher than that of Sc.

Also, the *Artemisia* AEP caused an effective increase in the combined ROS, peroxide, and superoxide generations as well, in both Gram-positive and negative bacteria and fungi when compared to AET and AEE ($P < 0.01$). The AEE has generated a three to four-fold increment in oxidative stress compared to the growth control (Gc).

6. Effects of captured EOs and secondary metabolites on the microbial planktonics' behavior

6.1. Changes observed in the microbial viability

Our findings suggest that complexed peppermint oil is less effective in killing *S. pombe* when compared to the percentage of dead/compromised cells of *E. coli* and *S. aureus* at the same concentration. Thyme oil was found to be more effective in killing 90% of cells in all three cases followed by citral which showed 90% inhibition.

The C_{Pe} also significantly decreases the viability of the tested bacteria and fungi when compared to Gc after 16 and 36 h of treatments in bacteria and fungi respectively ($P < 0.01$), whereas

C_{T80} and C_{Et} were less effective than C_{Pe} with mean percentage viabilities of $\geq 60\%$ and 70% , respectively.

Ar and Sc showed a reduction in viability around $\leq 50\%$ after 8 h of treatment on *C. parapsilosis* and *C. krusei* compared with the controls used for the study ($P < 0.01$).

The 50% reduction in the viable cell population was reached at an average of 9.9 ± 0.71 h and 17.09 ± 0.45 h in the case of the Gram-positive and -negative bacteria, and fungi under AEP exposure. A delayed effect was observed in the case of AET to initiate a 50% mean non-viability in the microbial populations when compared to AEP ($P < 0.01$).

6.2. Effects on metabolic activity and colony formation

Fifty percent of cell death occurred by C_{Pe} at 16 and 36 h in the case of bacteria and fungi and was most effective in reducing living colonies in the case of *C. albicans* after 48 h of treatment. At an average of a two-fold higher concentration, C_{Et} was able to show a killing effect compared to C_{Pe} ($P < 0.01$).

Ar and Sc showed an average reduction in the metabolic activities of tested *Candida* spp. to two-fold after 8 h of treatment followed by three-fold after 16 h of treatment when compared with their respective controls. A prominent reduction of $\leq 50\%$ of the planktonic cell population, when compared to the controls, was also observed in the case of *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, and *C. parapsilosis* after 16 h of Ar, Sc, and caspofungin antifungal (Cs) exposures.

A significant 50% decrement in the metabolic activity and colony-formation was observed in the case AEP treated bacteria and fungi respectively. The AET treatment showed a significant delay in reducing metabolic activity by 50% when compared to AEP treated samples ($P < 0.01$).

6.3. Changes in the microbial intracellular ATP by Artemisia EO Pickering emulsion

Although no significant change in the total protein content (TP) over time in the planktonic cells was observed, a significant 60% decrement in the ATP/TP ratio was found in the case of the AEP treated samples when compared to the 0 h samples ($P < 0.01$).

7. Effects of secondary metabolites and Pickering-EO emulsions on mature *Candida* biofilms

7.1 Effects on total biofilm biomass and viability

Our results demonstrated that Ar is more effective in disrupting the preformed complexed, extracellular matrix-covered biofilm structure and killing the sessile (surface-attached) cell population as well compared to Sc at their respective MEC₁₀ concentrations after 24 h exposure.

On the other hand, Sc treatment showed a dramatic decrement in the total biomass including cell loss from the polystyrene surface in the case of *C. albicans*, *C. dubliniensis*, and *C. glabrata*.

A significant 40% reduction in the metabolic activity of the AEP treated mature biofilm-attached *Candida* species after 24 h was observed when compared to Gc.

7.2. Effects of Artemisia EO-Pickering emulsion on Candida biofilms' intracellular ATP and total protein contents

The AEP treated samples have shown a significant reduction in the metabolic activity and intracellular ATP production after 24 h in the mature *Candida* biofilms, when compared to AET and AEE treatments ($P < 0.01$). Total protein (reflecting the number of cells, TP) did not change significantly during the treatments, but a significant 60% reduction of the ATP/TP ratio was found in the case of the AEP treated mature biofilm-attached *Candida* samples when compared to the Gc ($P < 0.01$).

V. DISCUSSION

The TAC of the essential oils and their components encapsulated in RAMEB showed 35–40% higher stability than the previously reported data [2,3,5], which suggests that the inclusion complex with RAMEB may protect the active components of the essential oils against the effect of reactive oxidative environments. The validity of the live/dead microbial discrimination plate reader method was verified by flow cytometry using identical fluorescence staining conditions. Our results support the idea that RAMEB-EO inclusion complexes could overcome the limitations of essential oils' application in food industry by reducing their volatility and losses during food processing or storage and enhancing their radical scavenging and antimicrobial activity.

Using Pickering nanoemulsion formulation of chamomile EO (C_{Pe}) we observed higher microbial growth inhibitory action of C_{Pe} and consequently lower MICs compared to classical C_{T80} and C_{Et} formulations. The C_{Pe} was able to generate higher oxidative stress compared to the conventional emulsion and ethanolic solution followed by metabolic interference and cell wall disruption and finally caused cell death at sub-inhibitory concentration [8].

Data presented in this study suggest the induction of apoptosis-like processes in the tested *Candida* spp. that may be due to the accumulation of reactive oxygen species (ROS) that induce or regulate the apoptosis in yeasts [4,6]. Our novel multiparametric evaluations have more

precisely highlighted the fungal susceptibility, killing ability in planktonic cells and inside the mature biofilm as well, compared with those of the classical proliferation assays [5].

Based on our analyses, *Artemisia* EO nanoemulsion (AEP) has shown stronger antimicrobial activity (MICs) at lower concentrations compared to that of detergent and ethanolic solubilizations (AET and AEE). Our data also suggest an effective microbial killing activity of AEP on selected bacteria and fungi. Overall, our findings demonstrated that the AEP formulation facilitates the penetration of *Artemisia* essential oil through *Candida* biofilms and cells, inducing oxidative stress and disruption of the cell membrane integrity due to the high adsorption efficacy of Pickering nanoemulsion droplets.

VI. SUMMARY, NOVEL FINDINGS

- We have developed thermodynamically stable novel cyclodextrin based essential oils/component complexes with high encapsulation efficiency. As a result, we could produce more reliable and sustainable data for the antioxidant and antimicrobial analyses of encapsulated various essential oils/pure components.
- We have developed and optimized a rapid microplate live/dead microbial viability assay technique using a fluorescent double-staining method. The assay was validated by flow cytometry, and we successfully established the protocol for a fast, reliable, and high throughput antimicrobial analysis.
- We were able to increase the antioxidant and antimicrobial potentials of various essential oils/components with the cyclodextrin encapsulation when compared to their un-complexed forms. The total antioxidant capacity and the antimicrobial properties of the RAMEB encapsulated EOs and their components were 5-6 times higher than those of the uncaptured EOs.
- We have successfully created surface-modified silica nanoemulsion based formulations of the essential oil(s) along with their components and plants' secondary metabolites for their enhanced aqueous solubility and better characterization of their biological properties.
- We were able to characterize the antimicrobial effects of essential oils and pure plant extracts at their Minimum Effective Concentrations (MEC_{10}) by various methods (metabolic activity, oxidative stress, live/dead discrimination assay, killing activity vs. exposure time). Based on our results, the Pickering EO nanoemulsions have shown higher growth inhibitory actions at lower MIC compared to the apolar solvent and

conventional detergent-based formulations. Furthermore, at the minimum effective concentrations (MEC_{10}), the Pickering EO nanoemulsions were able to generate 3-5 times higher cellular oxidative stress followed by metabolic interference and cell wall disruption.

- We have investigated the antimicrobial and anti-biofilm actions of artemisinin and scopoletin (secondary metabolites of *Artemisia annua* L.) and have revealed their effects on cellular viability, metabolic activity, and oxidative stress balance of microbial biofilms and planktonics, as well. Our data suggest that the MEC_{10} concentrations of the treating compounds are effective to initiate oxidative imbalance and reducing metabolic activities followed by the induction of apoptosis-like process in the tested *Candida* species.
- We have introduced several multiparametric fluorescent techniques to overcome the challenges associated with the measurements of the antimicrobial assay of the *Artemisia annua* L. Pickering EO nanoemulsions (AEP) on biofilms and on planktonics, and have investigated their possible mode of action (metabolic activity, oxidative stress, live/dead discrimination assay, and intracellular ATP/total protein content). An effective microbial killing activity has been observed in the case of AEP when compared to the conventional detergent and apolar solvent-based formulations. Overall, our observations demonstrated that the Pickering nanoemulsions facilitated the *Artemisia annua* L. essential oil to penetrate through the biofilms and the cells, inducing oxidative imbalance and disruption of the cell wall integrity.

VII. REFERENCES

1. Manion, C.R.; Widder, R.M. Essentials of essential oils. *American Journal of Health-System Pharmacy* **2017**, *74*, e153–e162.
2. Omonijo, F.A.; Ni, L.; Gong, J.; Wang, Q.; Lahaye, L.; Yang, C. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition* **2018**, *4*, 126–136.
3. McKay, D.L.; Blumberg, J.B. A Review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research* **2006**, *20*, 519–530.
4. Lis-Balchin, M. *Aromatherapy science: a guide for healthcare professionals*; Pharmaceutical Press: London ; Chicago, 2006; ISBN 978-0-85369-578-3.
5. Bhargava, K.; Conti, D.S.; da Rocha, S.R.P.; Zhang, Y. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. *Food Microbiology* **2015**, *47*, 69–73.

6. Oussalah, M.; Caillet, S.; Salmiéri, S.; Saucier, L.; Lacroix, M. Antimicrobial Effects of Alginate-Based Films Containing Essential Oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* Present in Bologna and Ham. *Journal of Food Protection* **2007**, *70*, 901–908.
7. Perricone, M.; Arace, E.; Corbo, M.R.; Sinigaglia, M.; Bevilacqua, A. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Frontiers in Microbiology* **2015**, *6*, 76.
8. Guo, J.; Gao, Z.; Li, G.; Fu, F.; Liang, Z.; Zhu, H.; Shan, Y. Antimicrobial and antibiofilm efficacy and mechanism of essential oil from Citrus Changshan-huyou Y. B. chang against *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **2019**, *105*, 256–264.
9. Das, S.; Gazdag, Z.; Szenté, L.; Meggyes, M.; Horváth, G.; Lemli, B.; Kunsági-Máté, S.; Kuzma, M.; Kőszegi, T. Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated β cyclodextrin – captured essential oils. *Food Chemistry* **2019**, *278*, 305–313.
10. Wang, T.; Li, B.; Si, H.; Lin, L.; Chen, L. Release characteristics and antibacterial activity of solid-state eugenol/ β -cyclodextrin inclusion complex. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2011**, *71*, 207–213.
11. Das, S.; Horváth, B.; Šafranko, S.; Jokić, S.; Széchenyi, A.; Kőszegi, T. Antimicrobial Activity of Chamomile Essential Oil: Effect of Different Formulations. *Molecules* **2019**, *24*, 4321.
12. Das, S.; Czuni, L.; Báló, V.; Papp, G.; Gazdag, Z.; Papp, N.; Kőszegi, T. Cytotoxic Action of Artemisinin and Scopoletin on Planktonic Forms and on Biofilms of *Candida* Species. *Molecules* **2020**, *18*, 476.
13. Silhavy, T.J.; Kahne, D.; Walker, S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2010**, *2*, a000414–a000414.
14. Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R.L. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology* **2012**, *3*, 12.
15. Das, S.; Vörös-Horváth, B.; Bencsik, T.; Micalizzi, G.; Mondello, L.; Horváth, G.; Kőszegi, T.; Széchenyi, A. Antimicrobial Activity of Different *Artemisia* Essential Oil Formulations. *Molecules* **2020**, *25*, 2390.

VIII. LIST OF PUBLICATIONS

1. Articles related to this thesis

- **Das Sourav**, Gazdag Zoltán, Szenté Lajos, Meggyes Mátyás, Horváth Györgyi, Lemli Beáta, Kunsági-Máté Sándor, Kuzma Mónika, Kőszegi Tamás. Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated β cyclodextrin – captured essential oils, *FOOD CHEMISTRY* 278 pp. 305-313., 9 p. (2019). **IF: 6.306**
- **Das Sourav**, Horváth Barbara, Šafranko Silvija, Jokić Stela, Széchenyi Aleksandar, Kőszegi Tamás. Antimicrobial activity of chamomile essential oil: Effect of different formulations, *MOLECULES* 24: 23 Paper: 4321, 18 p. (2019). **IF: 3.267**
- **Das Sourav**, Czuni Lilla, Báló Viktória, Papp Gábor, Gazdag Zoltán, Papp Nóra, Kőszegi Tamás. Cytotoxic action of artemisinin and scopoletin on planktonic forms and on biofilms of *Candida* species, *MOLECULES* 25: 3 Paper: 476, 18 p. (2020). **IF: 3.267**
- **Das Sourav**, Vörös-Horváth Barbara, Bencsik Tímea, Micalizzi Giuseppe, Mondello Luigi, Horváth Györgyi, Kőszegi Tamás, Széchenyi Aleksandar, Antimicrobial activity of different Artemisia essential oil formulations, *MOLECULES* 25: 10 Paper 2390, 27p. (2020). **IF: 3.267**

2. Article not related to this thesis

- Csepregi Rita, Temesfői Viktória, **Das Sourav**, Alberti Ágnes, Tóth Csenge Anna, Herczeg Róbert, Papp Nóra, Kőszegi Tamás, Cytotoxic, Antimicrobial, Antioxidant Properties and Effects on Cell Migration of Phenolic Compounds of Selected Transylvanian Medicinal Plants, *ANTIOXIDANTS* 9: 2 Paper 166. 29p. (2020). **IF: 5.014**

Cumulative impact factor: 21.121

3. Conference presentations related to this thesis

- **Das Sourav**, Gazdag Zoltán, Sente Lajos, Meggyes Mátyás, Horváth Györgyi, Kőszegi Tamás. Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated β cyclodextrin complexed Essential Oils. International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences. IC-ANMBES (2018) p. 112., 1 p.
- **Das Sourav**, Czuni Lilla, Balo Viktoria, Papp Gabor, Gazdag Zoltan, Koszegi Tamás. Anti-biofilm and cytotoxic activities of artemisinin and scopoletin on *Candida* spp. in combination with caspofungin. 46th Annual Conference on Yeasts May 7-10 2019 Slovakia Programme and Abstracts (2019) p. 60., 1 p.

4. Conference presentations not related to this thesis

- Kócsó József Dániel, **Das Sourav**, Kovács Melinda, Gazdag Zoltán, Kőszegi Tamás, Papp Gábor. Cytotoxic effect and peroxide generation of deoxynivalenol and zearalenone alone or in combination on fission yeast. XVI. János Szentágothai Multidisciplinary Conference and Student Competition – Abstracts Pécs, Hungary: János Szentágothai Scholastic Honorary Society, Faculty of Sciences, University of Pécs, (2019) p. 244., 1 p.
- Bouchelaghem Sarra, **Das Sourav**, Gazdag Zoltán, Fekete Csaba, Kőszegi, Tamás, Naorem Romen, Papp Gábor. Antimicrobial activities of Hungarian propolis alone and in combination with antibiotics and its antibiofilm activity on *Staphylococcus aureus*. XVI. János Szentágothai Multidisciplinary Conference and Student Competition – Abstracts Pécs, Hungary: János Szentágothai Scholastic Honorary Society, Faculty of Sciences, University of Pécs, (2019) p. 16., 1 p.
- Balo Viktoria, Czuni Lilla, **Das Sourav**, Fekete Csaba, Papp Gábor, , Peter Urbán, Kőszegi, Tamás, Gazdag Zoltán. Examination of the antibiotic sensitivity and biofilm forming ability of various *Candida* strains. 46th Annual Conference on Yeasts May 7-10 2019 Slovakia Programme and Abstracts (2019) pp. 58., 1 p.

IX. ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my gratitude to Prof. Dr. Tamás Kőszegi who introduced me to medical research and has tutored me throughout many years. He inspired and raised me through his critical thinking, expertise in laboratory medicine, and fascinating personality.

I am grateful to Prof. Dr. Attila Miseta for his generous support and for allowing me to perform research at the Department of Laboratory Medicine and the János Szentágothai Research Center.

I would like to thank Prof. Dr. Lajos Botz for allowing me to get enrolled in his doctoral program to pursue my research studies.

I wish to thank Prof. Dr. Csaba Fekete for allowing me to continue my research at the Department of General and Environmental Microbiology, University of Pécs.

I thank Prof. Dr. Sándor Kunsági-Máté, Dr. Beáta Lemli, Dr. Zoltán Gazdag, Dr. Gábor Papp, Dr. Nóra Papp and Dr. Györgyi Horváth for their methodological and technical support.

I sincerely thank Dr. Aleksandar Széchenyi for his pioneer findings regarding the Pickering emulsions and their applications which created the basis of many of our research ideas.

I am very grateful to Barbara Horváth for her technical, methodological, and analytical supports for my research.

I am indebted to Dr. Mónika Kuzma, Prof. Dr. Luigi Mondello, and Dr. Giuseppe Micalizzi for their invaluable technical guidance and research support regarding GC-MS analyses.

I would like to thank Dr. Tímea Bencsik for introducing me to the exciting field of natural product isolation methodologies.

I am thankful to my colleagues, Viktória Das-Báló, Viktória Temesfői, Rita Csepregi, Lilla Czuni and, Mátyás Meggyes, for their encouraging creative ideas and friendship.

Finally, I am grateful to my family and friends, for their critical insights and loving care, which helped me to complete this work.