

**Indiai citromfű (*Cymbopogon citratus*) antimikrobás hatásának
és
potenciális terápiais lehetőségének vizsgálata pitted keratolysis
bőrfertőzés esetén**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori iskolavezető: dr. Reglődi Dóra

Programvezető: dr. Kerényi Monika

Kurdiné Schweitzer Bettina

Témavezető: dr. Schneider György

PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

Pécs, 2023.

**Indiai citromfű (*Cymbopogon citratus*) antimikrobás hatásának
és
potenciális terápiais lehetőségének vizsgálata pitted keratolysis
bőrfertőzés esetén**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori iskolavezető: dr. Reglődi Dóra

Programvezető: dr. Kerényi Monika

Kurdiné Schweitzer Bettina

Témavezető: dr. Schneider György

PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

Pécs, 2023.

1. FEJEZET: Általános bevezetés és célkitűzések

Dolgozatom témája az indiai citromfű illóolaj antimikrobás hatásának vizsgálata, amelyen belül is a pitted keratolízis (angolul Pitted keratolysis), mint bőrfelszíni fertőzés kórokozó ágensei elleni hatásra fókuszálunk. Napjaink egyik legégetőbb közegészségügyi problémája a tradicionális és a terápiában alkalmazott antibiotikumokkal szembeni rezisztencia széleskörű megléte, illetve annak világméretű terjedése. Ez a tény ösztönzi a kutatókat olyan alternatív antimikrobás hatású anyagok keresésére és alkalmazására, melyek alkalmasak lehetnek a különféle humán kórokozók által okozott fertőzések kezelésére (Swamy és mtsai, 2016). E tekintetben a növényekből nyert illóolajok és azok fő kémiai komponensei potenciális antibakteriális ágens jelöltek. Az illóolajok antibakteriális aktivitásuknak köszönhetően gátolhatják a baktériumok növekedését (bakteriosztatikus hatás) vagy okozhatják a baktérium sejt pusztulását (baktericid hatás) (Swamy és mtsai, 2016). Korábbi tanulmányok megerősítik, hogy az indiai citromfű (*Cymbopogon citratus*) illóolaja és annak fő komponense, a citrál, erős aktivitással rendelkeznek gomba- és baktériumfajok széles spektrumával szemben (Naik és mtsai, 2010; Shi és mtsai, 2017). Ezen korábbi irodalmi adatok és egy előzetes szelekció alapján koncentráltunk kísérleteinkben az indiai citromfű illóolajának antibakteriális hatására, megvizsgálva annak lehetőségét, hogy hatékony lehet-e az eddig pitted keratolízissel összefüggésbe hozott fertőző ágensekkel szemben. A pitted keratolízis egy gyakori, bőrfelszíni bakteriális fertőzés, amely a bőr legfelső rétegét, a stratum corneumot érinti, de mint azt korai esetekből ismerjük, előrehaladott állapotban a mélyebb rétegekbe is hatolhat jelentősen befolyásolva ezzel az érintettek életminőségét (Singh és Naik, 2005;

Leeyaphan és mtsai, 2019; Bunyaratavej és mtsai, 2018). Ezen lokális fertőzés jellemző tüneteire tartozik a kellemetlen lábszag, majd egyre érzékenyebbé váló érintett terület, amelyen később égő és viszkető érzés tapasztalható, majd akár folytonos fájdalom is megjelenhet (Law és mtsai, 2019). Kezelésére jelenleg antibiotikumokat használnak, amelyek közül a két leggyakoribb szer az erythromycin és a clindamycin. A sikeres terápiát követően gyakran előfordul, hogy a fertőzés nem sokkal a kezelést követően kiújul (Kaptanoglu et al., 2012). Egyes esetekben a sikertelen terápia oka a fenti szerek ellen megjelenő rezisztencia (Leung és Barankin, 2015) vagy éppen a gyors visszafertőződés.

Munkámhoz a vizsgálandó mintát egy 43 éves férfi esete szolgáltatta, akinek mindkét talpán jelen voltak a fertőzésre tipikusan jellemző gödröcskék (pits) és azok összeolvadásából keletkezett kráteres formációk. A fertőzés további tipikus jeleként jelenlevő kellemetlen szag mellett, a páciens irritáló, égő érzésről és viszketésről is beszámolt. A tünetek a nyári meleg időszakban jelentek meg. Azt is lehet tudni, hogy a páciens zárt cipőt viselt hosszabb időn át. A rendelkezésre álló irodalmi adatokból a fertőzés etiológiai ágenseiről ismereteink ugyan limitáltak, de épp ezen munka során lehetőségünk volt izolálni egy hazai esetből egy, ez eddig a PK-val összefüggésbe nem hozott baktériumfajt, amelynek vizsgálatára munkánk is jelentős mértékben koncentrált. Mivel a fertőzés lokalizációja ideális lehet alternatív antimikrobás, pl. illóolaj alapú kezelések megvalósítására, a jelen munka keretében célul tűztük ki ezen lehetőség körbejárását, melynek didaktikus céljai voltak, hogy:

- azonosítsuk az érintett talpi területekről származó baktériumfajokat és meghatározzuk az etiológiai ágens(eke)t,
- megvizsgáljuk az antibakteriális tulajdonságú illóolajok hatékonyságát, oly módon, hogy teszteljük az érintett gödrökből kitenyészett, kórokozó ágensnek valószínűsíthető baktérium izolátumon (*Bacillus thuringiensis*), illetve a pitted keratolízis kiváltásáért felelős törzsgyűjteményi baktériumfajokon,
- alaposabban megvizsgáljuk az egyik leghatékonyabb antibakteriális tulajdonsággal rendelkező, és emellett a *B. thuringiensis* spóráképzését is gátló illóolaj, az indiai citromfű olaj antimikrobás hatását,
- azonosítsuk az indiai citromfű *B. thuringiensis* elleni aktív komponenseit,
- meghatározzuk az indiai citromfű eltérő kenőcs alapokban és eltérő koncentrációban kevert *in vitro* hatékonyságát a pitted keratolízis aetiológiai ágensein,
- bőrpenetrációs modellben meghatározzuk az egyes komponensek eltérő kenőcsalapokból történő kioldódási hatékonyságát.
- teljes transzkriptomi analízissel (WTA) megvizsgáljuk az indiai citromfű illóolaj hatására bekövetkező génexpressziós mintázatváltozását *B. thuringiensis* esetében és összehasonlítsuk azokat az eritromycin jelenlétében bekövetkező változásokkal.

2. FEJEZET: Pitted keratolízis esetből izolált baktériumok jellemzése klasszikus mikrobiológiai módszerekkel

1. Anyagok és módszerek

1.1. Felhasznált baktériumok, azonosításuk

A munkám során egy 43 éves egészséges férfi talpának pitted keratolízis lézióiból izoláltunk baktériumokat. A fertőzött talp UV lámpa vizsgálatával kizártuk az erythrasma lehetőségét. Lenyomatot és kaparékot vettünk és ezen mintákat Luria Bertani (LB), brain heart infusion (BHI), véres, anaerob véres (hemin és K1 vitamintartalom), és Sabouraud agarra oltottuk, majd egy részét 24 órán keresztül aerob és emelt (5%) CO₂ jelenlétében inkubálva növesztettük, míg az anaerob véres agarokat anaerob körülmények között inkubáltuk 48 órán keresztül. A táptalajokat magunk készítettük és a rajtuk végzett baktérium növesztéseket 37 °C-on termosztátban hajtottuk végre. Az anaerob lemezeket 14 nap elteltével, míg a Sabouraud lemezeket 7 nap inkubációt követően értékeltük.

Ezután következett a baktériumok identifikációja melynek során az azonosnak tűnő morfológiájú telepekből 10-10 kolóniát oltókaccsal felvettünk, majd MALDI-TOF MS segítségével identifikáltunk (De Carolis és mtsai, 2014). Lévén, egy esetben nem hozott eredményt a MALDI TOF alapú identifikálás, ezért 16S rRNS szekvencia alapú meghatározáshoz folyamodtunk. E célból univerzális prokarióta 16S rRNS primereket (Uni16S27_F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, Uni16S1492_R: GGTTACCTTGTTACGACTT) használtunk (Tabei és Ueno, 2010). Az 1465 bp hosszú terméket felamplifikáltuk proofreading Pfu PCR enzim kittel (Thermo Scientific, F-531), majd ligáltuk a pJET1.2/blunt vector (Thermo Scientific, K1231)

segítségével. A beillesztett fragment szekvenáló primerekkel történő megszekvenálása után a hiányzó rész a Macr_16S_2 (5' GGCTAACTACGTGCCAGCAG) primer segítségével lett áthidalva. Minden szekvenálás az ABI310 rendszerrel történt az ABI Big Dye Sequencing Protocol alapján, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit-et használva (Thermo Fisher Scientific). A nyert szekvenciák összeillesztéséhez a CLC Sequence Viewer 7.6 verzióját használtuk, majd blasztoltuk az NCBI oldalán (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Az izolált törzseket törzsgyűjteményünkbe lefagyasztottuk.

1.2. Tenyésztési kondíciók

A napi kísérletekhez vizsgált baktériumok közül Müller-Hinton (MH) táptalajra oltottuk ki a *B. thuringiensis*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *Macrococcus* sp. fajokat, míg a *S. parasanguinis* és *S. mitis* fajokat véres agaron inkubáltuk CO₂ termosztátban. Az inkubációk 37 °C-on történtek 24 órán keresztül, majd ezt követően a *Streptococcusok* kivételével MH tápfolyadékban növesztettük fel a baktériumokat 37 °C-on 24 órán át. A két *Streptococcus* faj esetében a kísérletes munka napján a friss véres agarról felvett baktériumból PBS-ben készítettünk szuszpenziót, lévén ezen fajokat nem sikerült folyékony tápközegben növesztenünk.

1.3. Enzimatiszus tesztek

Az izolált baktériumok kóroktani jelentőségének megállapításához enzimatiszus aktivitásukat vizsgáltuk. Ehhez kazein-, zselatin-, lipid- és lecitinbontó képességüket figyeltük meg.

Az extracelluláris proteáz termelést módosított tej agaron teszteltük (2 % w/v pepton, 0,6 % w/v NaCl és 2 % w/v agar) (Chu, 2007).

Készítéskor az agar koncentrációra kiszámított teljes folyadékmennyiség felét adtuk a táptalaj komponensekhez desztillált víz formájában, majd autoklávozást követően került bele az előzőleg felmelegített (42 °C) 1,5 %-os tej a vízzel megegyező mennyiségben. Az izolátumokat leoltottuk a megszilárdult táptalajra és proteáz-aktivitásukat a beoltást követő 1-2 napos inkubációt követően lehetett leolvasni a pozitív izolátumok körül megjelent feltisztulási zónák megfigyelésével.

Az izolátumok lipáz-aktivitását Tween 80 agaron vizsgáltuk. Az autoklávozott alapoldatot (10 g pepton, 5 g NaCl, 0,1 g CaCl₂ és 15 g agar 1 liter desztillált víz) ~65 °C-ra lehűtöttük, majd hozzáadtunk 5 ml Tween 80 oldatot (Slifkin, 2000). A megszilárdult táptalajra leoltottuk a

vizsgált baktériumokat, majd 1-2 nap inkubációt követően értékeltük azokat a pozitív telepek körül az agarban kialakult pontszerű precipitátumok mértéke alapján.

Lecitináz-aktivitást tojássárgája felhasználásával készült agaron teszteltük. A megmosott, 70 %-os alkohollal fertőtlenített tojásokat feltörtük, majd a tojássárgákat egy steril edényben elválasztottuk és 40 % v/v-ra hígítottuk steril desztillált vízzel. Ebből 10 ml mennyiséget kevertünk az előzőleg elkészített, autoklávozott, ~55 °C-ra hűlt BHI agar 90 ml-éhez. A megszilárdult táptalajokat beoltást követően 3 napig inkubáltuk 28 °C-on. A zsírsavak keletkezését jelző turbid zónák megjelenése jelzi az enzimteszt pozitívítását (Jonit és mtsai, 2016).

Zselatin hidrolízishez széntartalmú zselatin hasábokat használtunk (Lányi, 1980). A steril hasábokat a baktériumok tápoldatos szuszpenziójához adtuk, majd nyugalmi helyzetben 3 napig

inkubáltuk 30 °C-on. A zselatinkockák integritását naponta ellenőriztük. A zselatináz termelését a szénpartikulumok cső aljára történő leülepedése jelezte (Kohn, 1953).

2. Eredmények

2.1. Enzimatiszus tesztek



B. thuringiensis erős proteáz aktivitásának detektálása tejjagaron. Jól megfigyelhető a baktérium szerpentin jellegű szélesztés menti halo jelenség megléte, mely a kiemésztett tejfehérjére és ezzel a tesztelt faj fehérjebontó enzim szekréciós képességére utal.

3. FEJEZET: Illóolaj alapú antibakteriális tesztek

1. Anyagok és módszerek

1.1. Baktérium izolátumok és tenyésztési körülmények

A *B. thuringiensis* baktériumot a 43 éves férfi talpán található léziókból izoláltuk (Schneider és Schweitzer, 2021) míg a *Kytococcus sedentarius*-t (DSM 20547) és a *Dermatophilus congolensis*-t (DSM 44180) a Német Nemzeti Törzs gyűjteményből (DSMZ) szereztük be (Leibniz Kutatóintézet, Braunschweig, Németország). A munkám során az összes baktériumot aerob körülmények között tenyésztettük. A *B. thuringiensis* baktérium (37 °C) növesztésére tripton szója táptalajt (TSA) (Oxoid, New York, NY, USA), míg a *D. congolensis* (37 °C) és *K. sedentarius* (30 °C) tenyésztésére véres agart használtunk. A minimális gátló-és baktericid koncentrációk meghatározásakor mindhárom fajnál tripton szója tápfolyadékkal (TSB) (Oxoid, New York, NY, USA) dolgoztunk.

1.2. Felhasznált illóolajok

Tizenkét illóolaj (rozsmaring (*Rosmarinus officinalis*), indiai citromfű (*Cymbopogon citratus*), szegfűszeg (*Eugenia caryophyllata*), muskotályzsálya (*Salvia sclarea*), fahéj (*Cinnamomum zeylanicum*), citronella (*Cymbopogon nardus*), eukaliptusz (*Eucalyptus globulus*), édeskömény (*Foeniculum vulgare*), fodormenta (*Mentha spicata*), borsmenta (*Mentha piperita*), citromfű (*Citrus limon*), és kakukkfű (*Thymus vulgaris*)) antibakteriális hatását teszteltük a 3 baktériumfajjal szemben. Kísérleteinkhez az AROMAX (Aromax Kft, Magyarország)

illóolajait használtuk, melyek tisztaságát a vizsgálatokat megelőzően gázkromatográfiával ellenőriztük.

1.3. Antibakteriális teszt-kicseppentéses módszer

A fenti illóolajok antimikrobiális hatását agar lemezekken végeztük kicseppentéses (drop plate) módszert alkalmazva. A kísérlet megkezdése előtt a baktériumok csíraszámait optikai denzitásuk alapján szinkronizáltuk. Ennek során 600 nm-en 0,2-re (~108 CFU/ml) állítottuk be őket előzetesen PBS-ben szuszpendálva. *B. thuringiensis* szuszpenzióból 100 µl-t TSA-ra, míg *K. sedentarius* és *D. congolensis* esetében 100-100 µl-t véres agarra szélesztettünk. Száradás után, mindegyik illóolajból 5 µl-t cseppentettünk a táptalajok felszínén lévő baktérium gyepekre. A *B. thuringiensis*-t tartalmazó TSA-, illetve a *D. congolensis*-t tartalmazó véres agarokat 37 °C-on, míg a *K. sedentarius*-t tartalmazó táptalajokat 30 °C-on inkubáltuk 24 órán keresztül. Másnap a gátlási zónák átmérőit lemértük és mm-ben kifejeztük.

Ugyanígy jártunk el a citrál és α -terpineol gátlási zónáinak meghatározásánál is. Kontrollként minden esetben erythromycin és clindamycin antibiotikumokat használtunk.

1.4. Minimális gátló koncentráció (MIC) és minimális baktericid koncentráció (MBC) meghatározása

A minimális gátló koncentráció az a legkisebb koncentráció, amely még hatásosan gátolja a baktériumok növekedését. A minimális baktericid koncentráció pedig azon legkisebb koncentráció, amely a kórokozók 99,9 %-át elpusztítja (Moreira és mtsai, 2005). A MIC és MBC értékek meghatározását az úgynevezett makrodilúciós teszt segítségével végeztük. A

különböző izolátumokat felnövesztettük, optikai denzitásukat szinkronizáltuk (OD₆₀₀=0,2) (CLSI, 1999). 5-5 ml TSB médium felhasználásával hígítási sort készítettünk: ezen médium térfogatokhoz 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 µl illóolajat adtunk, így a 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 és 12,8 mg/ml-es koncentrációkat kaptunk. A baktérium szuszpenziókból 5-5 µl-t mértünk az egyes csövekbe. A kontroll csövek vagy nem tartalmaztak baktériumot (illóolaj-tisztaság vizsgálat) vagy baktériumot és illóolajat sem (médium kontroll).

Az inkubáció 37 °C-on történt, a *K. sedentarius* kivételével (30 °C), majd a gátló koncentrációkat vizuálisan másnap (*B. thuringiensis*), illetve 3 nap múlva (*D. congolensis* és *K. sedentarius*) határoztuk meg. Az MBC-k meghatározásához alapos vortexelést követően 10 µl mennyiségeket cseppentettünk TSA és véres táptalajra azon csövekből, melyekben nem volt szabad szemmel látható bakteriális növekedés. A cseppeket párhuzamosan elfolyattuk a táptalajok felszínén, majd éjszakán át inkubáltuk őket és másnap értékeltük.

Ugyanezzel a módszerrel határoztuk meg a citrál és α -terpineol MIC és MBC értékeit is 12,8 mg/ml-0,1 mg/ml-es hígítási sort alkalmazva. Kontrollként erythromycin és clindamycin antibiotikumokat használtunk.

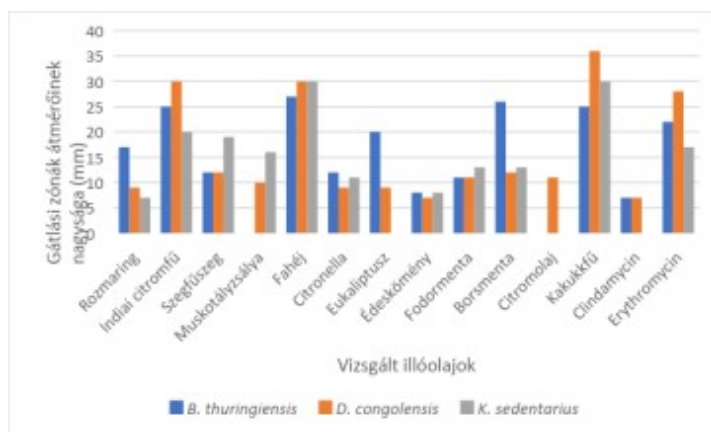
1.5. Spóra képzés-gátlás teszt

Az illóolajok sporuláció gátlásának vizsgálatához *B. thuringiensis* overnight kultúráját használtuk. Ebből 1000x-es hígítást készítettünk, majd hagytuk nőni 37 °C-on 3 órán keresztül, hogy elősegítsük az esetlegesen jelenlevő spórákból történő vegetatív

formává alakulást. Az így nyert kultúrából meghatároztuk a CFU-t, majd 5 µl szuszpenziót adtunk a teszt csövekhez, melyekbe előzőleg 5 ml TSB tápoldatot mértünk ki, illetve az indiai citromfű illóolaj adott koncentrációit: 0,5; 1; 2; 3; 4; 8; 16; 32; 64; 128 és 256 µl (végkoncentrációk: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,5; 25 és 50 mg/ml). 37 °C-on történő 24 órás inkubációt követően, 1-1 ml eket átpipettáztunk 25 ml TSB-t tartalmazó lombikokba azon csövekből, melyekben szabad szemmel nézve nem volt növekedés. 37 °C-on történő 48 órás inkubáció után 10 µl-es mennyiségeket cseppentettünk ki TSA táptalajokra az élő baktériumok detektálása végett. A kolóniák hiánya azt jelezte, hogy az eredeti 5ml-es térfogatokban sporuláció nem történt és így a baktérium túlélését sikerült meggátolni. Kísérletünket 3-szor ismételtük meg.

2. Eredmények

2.1. Antibakteriális teszt-kicseppentéses módszer



A pitted keratolízis fertőzés lehetséges etiológiai ágenseinek érzékenysége a 12 db vizsgált illóolajjal szemben. Az értékek az illóolaj gátlási zónáinak átmérőit jelzik mm-ben megadva. Clindamycin és erythromycin voltak a pozitív kontrollok (alkalmazott koncentrációk: 2 mg/ml).

2.2. Minimális gátló koncentráció (MIC) és minimális baktericid koncentráció (MBC) meghatározása

Az illóolajok antibakteriális hatását folyékony tápközegben is teszteltük a minimális gátló és baktericid koncentrációk meghatározása végett. A makrodilúciós tesztekben az összes illóolaj mutatott baktericid hatást különböző koncentrációkban mindhárom baktériumfajjal szemben.

2.3. Spóráképzés-gátlás teszt

Nem volt detektálható bakteriális növekedés 24 órás inkubáció után, amikor az indiai citromfű illóolaj koncentrációja 0,2 mg/ml (MIC érték) felett volt *B. thuringiensis* esetében. Miután 1 ml mennyiségeket vittünk át az optikailag tiszta csövekből a 25 ml tápfolyadékot tartalmazó lombikokba, további inkubációt (24 óra, 37 °C), majd konfirmáló kicseppentést követően azt kaptuk, hogy nem volt élő baktérium sejt az indiai citromfű illóolaj 12,8 mg/ml feletti koncentrációinak alkalmazása esetén. Minden más esetben, nem volt tapasztalható gátló hatás, azaz a tápoldatok turbiddá váltak a 24 órás inkubációt követően.

4. FEJEZET: Az indiai citromfű illóolaj összetétele, antibakteriális hatásának vizsgálata elválasztáson alapuló módszerekkel

1. Anyagok és módszerek

1.2. Vékonyréteg kromatográfia-direkt bioautográfia ((Thin Layer Chromatography Direct Bioautography (TLC-DB))

Az indiai citromfű illóolajának teljes összetételét és specifikus antibakteriális komponenseit 2 előre előkészített (100 °C, 30 perc) 5 × 10 cm 60 F254 TLC lemezen (Merck, Darmstadt, Németország) vizualizáltuk a korábban leírtak szerint (Kovács és mtsai, 2018), kevés módosítással. 0,2 µl-es mennyiségeket cseppentettünk a lemezek alján lévő vízszintes vékony vonalra; oldószer kontrollként etanolt használtunk. Citrált (20 mg/ml; Sigma Technology Hungary, Budapest, Magyarország) és α-terpineolt (100 mg/ml; Sigma Technology Hungary) használtunk ismert futási paramétereik miatt. A TLC lemezek kifejlesztése toluén-etil acetát 97:3 arányú elegyét tartalmazó kettős falú kamrában (CAMAG, Muttenz, Svájc).

D. congolensis esetében 1 órán keresztül, míg a másik két baktériumnál 10 másodpercig inkubáltuk a lemezeket 50 ml baktérium szuszpenzióban (TSB) (3 × 10⁸ CFU/ml). Ezután a lemezeket pára kamrában inkubáltuk (*B. thuringiensis*-nél 37 °C-on 2 óráig, *D. congolensis*-nél 37 °C-on 6 óráig, *K. sedentarius*-nál 30 °C-on 6 óráig). Másnap a lemezeket bemerítettük MTT vizes

oldatába (0,05 g/90 ml) 10 másodpercen keresztül, majd a megfelelő körülmények között pára kamrákban inkubáltuk őket a fehér foltok megjelenéséig. Az elválasztott komponensek antibakteriális aktivitását a fehér foltok kékes háttérrel szembeni megjelenése jelzi (Kovács és mtsai, 2018).

Az indiai citromfű illóolaj elválasztott komponenseinek láthatóvá tételéhez a másik (MTT-vel nem kezelt) lemezeket bemerítettük etanos vanillin-szulfursav reagensbe, majd 90 °C-on 5 percig fűtöttük. Az elválasztott komponenseket az R_f értékek szerint jellemeztük, két ismert standard (citrál, α-terpineol) és a Kovats index alapján. R_f érték definíciója: az adott komponens által megtett távolság osztva az oldószer front által megtett távolsággal. Adott rendszerre ismert hőmérsékleten ez a komponens jellemzője és segít a komponensek azonosításában (Daintith, 2008). A Kovats retenció index olyan fogalom, mely a retenció időt (adott komponens GC oszlopon eltöltött ideje) (Anjum és mtsai, 2023) átalakítja egy sokkal megbízhatóbb és megismételhető rendszerre (Idroes és mtsai, 2019).

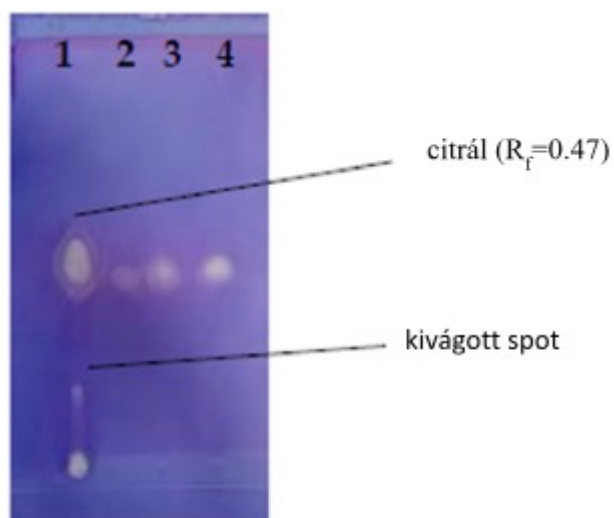
1.2. Citrál és α-terpineol antibakteriális hatásának kimutatása - kicseppentéses módszer

1.3. Antibakteriális komponensek kimutatása bioautográfiával

Az 1.2. fejezetben leírt módszert alkalmaztuk az antibakteriális komponensek kimutatására is a három vizsgált baktériumfaj esetén.

2. Eredmények

2.1. Vékonyréteg kromatográfia-direkt bioautográfia ((Thin Layer Chromatography Direct Bioautography (TLC-DB))

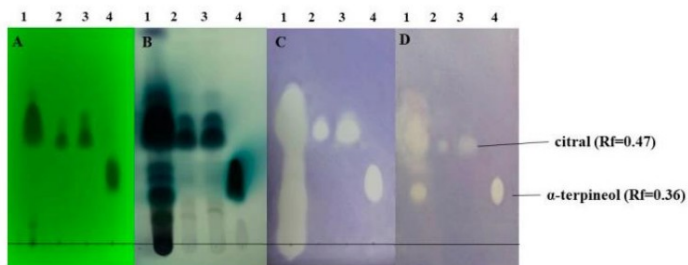


Indiai citromfű illóolaj antibakteriális aktivitású komponensei *B. thuringiensis* esetén. A lemezre felvitt illókony teszt-anyagok felvitelének sorrendje és mennyisége a következő volt: 1-indiai citromfű illóolaj (0,2 mg); 2-citrál (0,02 mg); 3-citrál (0,04 mg); 4-citrál (0,08 mg).

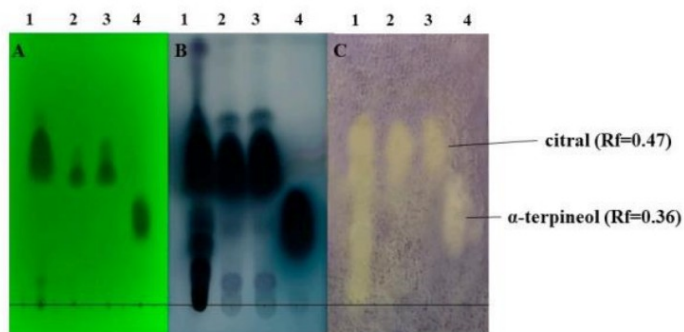
2.2. Citrál és α -terpineol antibakteriális hatásának kimutatása - kicseppentéses módszer

Szignifikáns különbséget figyeltünk meg a citrál és α -terpineol antibakteriális aktivitásában, mikor a kicseppentéses módszert alkalmaztuk. A citrál esetében nagyobb gátlási zónát mértünk mindhárom baktériumfajnál, összehasonlítva az α -terpineollal. A különbség legkifejezettebben a *D. congolensis* és *B. thuringiensis* esetében mutatkozott és minimális volt *K. sedentarius* baktériumnál.

2.3. Antibakteriális komponensek kimutatása bioautográfiával



Indiai citromfű illóolaj antibakteriális komponensei TLC-DB után. (A) Lemez UV 254 nm megvilágítás alatt, (B) TLC lemez vanilin-szulfursav kezelést követően látható fényben nézve, (C) TLC-DB kísérlet: *B. thuringiensis* bioautogramja, (D) TLC-DB kísérlet: *K. sedentarius* bioautogramja (a világos zónák jelentik az antibakteriális hatást). Mobil fázis: diklórmetán és toluén-etil acetát 93:7 v/v. A komponensek alkalmazott térfogatai a következők voltak: indiai citromfű illóolaj-6 μ l, citrál 4.5 és 6 μ l, α -terpineol-1.5 μ l. A törzsoldatok koncentrációi a következők voltak: indiai citromfű illóolaj-200 mg/ml, citrál-20 mg/ml, α -terpineol-100 mg/ml. Az illékony teszt-anyagok felvételi sorrendje és mennyisége a következő volt: 1-indiai citromfű illóolaj (1.2 mg); 2-citrál (0.09 mg); 3- citrál (0.12 mg); 4- α -terpineol (0.15 mg).



Indiai citromfű illóolaj antibakteriális komponensei TLC-DB után. (A) lemez UV 254 nm alatt, (B) lemez vanilin-szulfursav kezelést követően látható fényben nézve, (C) TLC-DB kísérlet: *D. congolensis* bioautogramja (világos zónák jelentik az antibakteriális hatást). Mobil fázis: diklórmetán és toluén-etil acetát 93:7 v/v. Az alkalmazott térfogatok a következők voltak: indiai citromfű illóolaj:1 μ l, citrál: 4.5 és 6 μ l, α -terpineol: 4.5 μ l. Az indiai citromfű illóolajat hígítás nélkül vittük fel, illetve a citrál és α -terpineol esetében a törzsoldatok koncentrációja 100 mg/ml volt. Az illékony teszt-anyagok

felvételi sorrendje és mennyisége a következő volt: 1-indiai citromfű illóolaj (hígítatlan); 2-citrál (0.45 mg); 3-citrál (0.6 mg); 4- α -terpineol (0.45 mg).

5. FEJEZET: Indiai citromfű illóolajat tartalmazó különböző kenőcsalapok *in vitro* tesztelése, kioldódási vizsgálatok

1. Anyagok és módszerek

1.1. Felhasznált kenőcsalapok

- Cremor aquosus
- Hydrogel „95%”
- Lipogel
- Vaselineum

Ezen gyógyszerári alapkrémekbe 1, 3 és 5%-ban belekevertük az indiai citromfű illóolajat, majd *in vitro* teszteléshez használtuk őket.

1.2. Antibakteriális tesztek menete

B. thuringiensis kezdeti logaritmikus tenyészetét használtuk kísérletünkhöz: a baktériumszuszpenzióból 50-50 μ l-t cseppentettünk LB agar felszínére, majd megvártuk, míg megszáradnak a cseppek. Ezután steril oltókacs segítségével felvittük a baktérium felcseppentések felszínére az illóolaj tartalmú kenőcsöket, illetve kenőcs kontrollokat (illóolaj mentesek). Egy órás inkubáció után 3 x 3 mm-es kockákat vágunk ki a kenőcsöt tartalmazó agarból steril szike segítségével, majd a mintákat 300 μ l PBS-be tettük. Alapos vortexelést követően a teljes 300 μ l mennyiségeket kiöntöttük táptalaj felszínére, majd steril üvegbottal elszélesztettük őket. Végül a Petri-csészéket betettük inkubálni 37 °C-ra és másnap leolvastuk

az eredményeket. Növekedés esetén megszámloltuk a telepeket és kiértékeljük a kapott eredményeket. Ezen in vitro kísérletet további 10 Bacillus izolátummal is elvégeztük.

1.3 Kioldódási kísérletek menete

Az eltérő kenőcsanyagokba emulgeált indiai citromfű bőrben történő penetrációjának vizsgálatához egy átfolyós rendszerű modell rendszert használtunk. Ennek során a bőrt egy szintetikus membrán volt hivatva reprezentálni, melyen keresztül a kenőcsből egy keringető rendszer segítségével kimostuk a kenőcs által tartalmazott és kioldható komponenseket és ezen folyadékból 30, 60, 90, 120 és 300 perc elteltével mintát vettünk. A mintákat összegyűjtöttük és a bennük fellelhető komponenseket GC-MS analízissel minőségi és mennyiségi analízisnek vetettük alá.

A kioldódási kísérletekhez a PAMPA permeabilitás mérések kivitelezése, hagyományos STIRWELL™ PAMPA szendvicseket (Pion Inc.) használtunk. Az adott szövetspecifikus membránt közvetlenül a mérések előtt alakítottuk ki a felső, akceptor lemez filterein. Eme bőr PAMPA (Skin PAMPA) esetén kereskedelmi forgalomban kapható lemezeket használtunk, amin már ki volt alakítva a bőr stratum corneumára jellemző lipidmátrix. A mérések előtt a Skin PAMPA membránját hidratáltuk egy éjszakán keresztül az erre a célra használatos hidratáló oldattal (Hydration Solution, Pion Inc.), és csak megfelelő hidratált állapot esetén használtuk a szendvicset. A hidratáltságról a cellák filtereinek vizuális vizsgálatával lehet meggyőződni. Mérésre alkalmas a membrán, ha fény felé fordítva annak felülete világos, ezzel szemben a nem kellőképpen hidratált membrán sötét árnyalatú. A permeabilitást a

PAMPA kísérleteket tekintve hagyományos elrendezésben vizsgáltuk, azaz a felső lemez volt az akceptor fázis, míg a donor fázist az alsó lemez alkotta. Az eltérő összetételű kenőcsöket dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk olyan koncentrációt alkalmazva, melyet az oldhatóságuk és az UV spektrofotometriás tulajdonságuk lehetővé tett (5-20 mM). 180 µl eltérő pH-jú, 1 v/v% DMSO törzsoldatot tartalmazó Britton-Robinson puffer oldatot mértünk a PAMPA szendvicsek alsó lemezének celláiba. Emellett a cellák egy-egy mágneses keverőt is tartalmaztak. A felső, akceptor lemez celláiba 200 µl pH 7,4 Britton-Robinson puffert pipettáztunk. Az oldatok párolgását megakadályozandó, nedves szűrőpapírral és egy, a PAMPA lemezekre illeszkedő műanyag fedéllel fedtük le az összeállított rendszert. A kialakított szendvicset mágneses keverőre (Gut-Box™, Pion Inc.) helyeztük, és a kevertetés intenzitását úgy állítottuk be, hogy a NKVR hozzávetőlegesen 40 µm vastagságú legyen. A mérések teljes időtartama 5 óra volt.

1.4. SPME-GC-MS analízis

Az illóolaj és a kenőcs minták vizsgálata SPME-GC-MS módszerrel történt.

SPME-GC-MS: szilárd fázisú mikroextrakciós mintavétel után gázkromatográfiás és tömegspektrometriás módszer.

10 µl illóolajat vagy 1 ml mintát vizsgáltunk 20 ml-es, szilikon/PTFE szeptummal lezárt headspace (HS) üvegben. A minta statikus gőztéranalízise szilárdfázisú mikroextrakcióval (sHS-SPME) történt, CTC Combi PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) típusú automata mintavevő alkalmazásával. A minta 5

perces 100°C-on végzett inkubálása után a 65 µm filmvastagságú StableFlex divinilbenzol/carboxen/polidimetilsziloxán (DVB/CAR/PDMS) SPME szálat (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a minta gőzterébe juttattuk, az extrakciót 20 percig végeztük 100°C-on, majd a gázkromatográf injektorába vittük, ahol a deszorbció 250°C-on történt, 1 percig. Az illóolaj esetében az injektálás split módban történt (1:90 split aránnyal), a kenőcsök és a többi folyékony minta esetében splitless módban. Végül a szálat nagy tisztaságú nitrogén gázban 250°C-on 15 percig tisztítottuk és kondicionáltuk.

Az analízist Agilent 6890N/5973N GC-MSD (Santa Clara, CA, USA) készüléssel, Supelco SLB-5MS kapilláris kolonnán (30 m × 250 µm × 0,25 µm) végeztük. A kolonna hőmérséklete egy 3 perces izoterm szakasz után 60-250 °C-ra emelkedett 8 °C/perc sebességgel, a végső hőmérsékletet 1 percig tartottuk. A vivőgáz nagy tisztaságú, 6,0 hélium, az áramlási sebesség 1,0 ml/perc (37 cm/s) volt, constant flow módban. A detektálás quadropole tömegszelektív detektorral elektronionizációs módban (70 eV), teljes scan módban (41–500 amu, 3,2 scan/s) történt. Az adatokat MSD ChemStation D.02.00.275 software (Agilent) segítségével értékeltük ki. A kvantitatív azonosítás során a komponensek retenciós idejét és tömegspektrumait standardok és a NIST 2.0 könyvtár adataival hasonlítottuk össze, a százalékos értékelést területnormalizációval végeztük.

2. Eredmények

2.1. Antibakteriális tesztek



2.2. Kenőcs kioldódási vizsgálatok

Az 1%-os indiai citromfű koncentrációjú kenőcsalapok vizsgálatát végeztük.

A 2. mintában (Hydrogel) volt csak jelen a p-Cymen-8-ol nevű komponens. A nerál komponens a lipogel és vaselinum mintákban nagyobb mennyiségben található meg, a vaselinum mintában 18,6 m/m% a mért mennyisége. A nerál a hydrogel minta kivételével mindegyik mintában előfordult. A geraniálról is elmondható, hogy a 3. és 4. mintában jelentős mennyiségben fordul elő (lipogel 19,9 és vaselinum 40,1 m/m%) és hiányzik a hydrogel mintából. A

vaselinum mintában a geraniol, a hydrogel mintában a geranil acetát és a γ

kadinén volt jelen a legnagyobb arányban. A γ -kadinén nem volt detektálható a lipogel és vasetinum mintákban.

2.3. A bőrpenetrációs modell eredményei

Az adatok alapján látszik, hogy a legtöbb illóolaj eredetű komponens a Hydrogel 95% + 1% mintáiból volt mérhető.

A p-cymen-8-ol megjelenése a limonén vagy a citrál (geraniál + nerál) bomlása miatt lehetséges. A limonén bomlásából limonén-oxidok keletkezhetnek, illetve α -terpineol. A linalool bomlásából α -terpineol, geraniol és nerol keletkezhet. Geraniol bomlásából keletkezhet linalool, α -terpineol, nerol (He és mtsai, 2018)

Mindegyik mintában megjelent egy komponens 16,5 percnél, de ennek az azonosítása nem sikerült.

6. FEJEZET: Génexpressziós vizsgálatok

1. Anyagok és módszerek

1.1. RNS izolálás

B. thuringiensis overnight kultúrájából logos fázist indítottunk. Megfelelő csíraszám elérését ($OD_{600}=0.2$) követően mintát vettünk a 0. időpontban RNS izoláláshoz, melynek meghatároztuk kezdeti CFU értékét. Ezután egy lombikba 15 μ l indiai citromfűvet mértünk; egy másikba 300 μ l eritromycin (30 mg/ml) került. Ezen kívül volt még egy, csak baktériumot tartalmazó lombik (kontroll). Hét perces, illetve 15 perces inkubációt követően 20-20 ml mintát vettünk a lombikokból és minden időpontban meghatároztuk a csíraszámot, illetve elindítottuk az RNS izolálást. A megadott időpillanatban vett mintákat lefugáltuk (4 perc, 8000 rpm) és mostuk 1-1 ml RNAprotect® Bacteria Reagent oldattal (Qiagen). Alapos vortexelés után legalább 5 percig hagytuk mindegyik csövet inkubálni. Centrifugálást követően az RNAprotect oldatot tartalmazó felülúszót pipettával óvatosan leszívtuk. Ezután 200 μ l lizozim oldatot (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100, 20 mg/ml lizozim) adtunk a csövekhez, majd alapos vortexelést követően 30 percig szobahőn inkubáltuk őket. A csövek tartalmát minden 10 percben ismét összevortexeltük. Proteináz K oldatból (20 mg/ml) 20 μ l-t adtunk mindegyik csőhöz, majd 10 percig szobahőn inkubáltuk őket.

Az inkubációs idő lejártá után 700 µl RLT puffert (Qiagen) pipettáztunk a csövekhez, melyhez 7 µl β-merkaptóetanolt is adtunk. Centrifugálást követően 500 µl felülúszóhoz 500 µl jéghideg 96%-os etanolt adtunk, majd óvatosan fel-le forgatva a csöveket, összekevertük tartalmukat. 700 µl mennyiségű mintákat Qiagen oszlopokra vittünk, majd rövid fugálási lépés után (1 perc, 8000 xg) mostuk a mintákat 500 µl RPE (Qiagen) oldattal (2x). A mosási lépések után 8000 xg-n lefugáltuk a csöveket (15 sec). Végül csináltunk egy leoldás előtti mosófolyadék mentesítést (fuga: 1 perc, 8000 xg), majd 50 µl DEPC-el kezelt vízzel leoldottunk mintáinkat (inkubáció szobahőn: 1 perc, majd fuga: 1 perc, 8000 xg).

2. Eredmények

2.1. Transzkriptomi analízis eredménye

A teljes transzkriptomi vizsgálatok megmutatták, hogy a *Bacillus thuringiensis* 5054 génjéből 2109 gént érintett az indiai citromfű hatására létrejövő környezeti tényező változása. Ebből 986 gén átírása leszabályozódott, míg 1123 gén esetében növelt expressziót tapasztaltunk. A nyert adatok számos későbbi, az indiai citromfű antibakteriális hatását alaposabban elemző vizsgálat alapját képezheti, de ezen munka keretében a nyert előzetes eredményeinket csak két fő funkcióra korlátozzuk. Ebből kitűnik, hogy az általános stressz gének fokozott expressziója tapasztalható a 7-ik és a 15. percben. A válasz a 15. perc esetében a 7. perchez képest sokszor drasztikusan emelkedik (WP_000557321.1; WP_000448820.1; WP_000522903.1). Emellett a sporulációt befolyásoló gének leszabályozódása a kontrolhoz képest inkább csak a 15 percben nyilvánul meg. Ezek érintettsége nem azonos mértékű. Emellett a

számos transzkripció és transláció faktor transzkripciója is befolyásolt eltérő mértékben és előjellel.

7. FEJEZET: Következtetések és tézisek

- A legkifejezettebb hatás az indiai citromfű, a fahéj és a kakukkfű illóolaja esetében volt tapasztalható
- A komponensek közül a nerál 26,1% és a geraniál 34,5%-át alkotja az illóolajnak. Ezek az illóolaj fő komponensei.
- Az indiai citromfű antibakteriális hatásának kifejtésében a citrál mellett az α-terpineol is hozzájárulhat az antibakteriális hatás kifejtésében, habár ezen utóbbi komponens százalékos aránya jóval kisebb, mint magáé a főkomponensé.
- Az antibakteriális tesztek megmutatták, hogy a hydrogel alap jóval karakteresebb hatást képes kiváltani, míg ezzel szemben a hidrofób kenőcs alapokba (lipogel és vaselinum) kevert IC nem hatékony.
- Ezt alátámasztandó a következő lépésben hajtottuk végre a bőrpenetrációs kísérletet, mely megmutatta, hogy az IC komponensei jóval nagyobb arányban és rövidebb idő alatt oldódtak ki a Hydrogél kenőcs alapból, mint a hidrofób alapok esetében
- Ezen eredményeink jelentősége abban áll, hogy bizonyos esetekben (pl.: bőrfelszíni fertőzések esetén) az antibiotikum tartalmú kenőcsök kiválthatók illóolaj tartalmú terapiás

szerekkel, csökkentve ezzel a környezetbe kerülő antibiotikumok mennyiségét és kismértékben ugyan, de hozzájárulva azon evolúciós nyomás csökkentéséhez, mely az antibiotikum-rezisztencia terjedésének egyik hajtóereje.

- A *Bacillus thuringiensis* 5054 génből álló genomjának 2109 gén transzkripcióját érintő stresszhelyzet fémjelzi, hogy az indiai citromfű illóolajának környezeti megjelenése megbolygatja a normális transzkripciót. Ezt a helyzetet az általános stressz gének transzkripciójának drasztikus felszabályozódása jellemzi, ami arra utal, hogy a baktérium egy általános stressz válasszal próbál reagálni, amely az idő függvényében drasztikusan fokozódik is.