

**Muskotályzsálya extraktumok és kakukkfű  
illóolajok antibakteriális hatásának optimalizálása és  
tanulmányozása légúti patogének ellen**

Doktori (Ph.D.) értekezés



**Bakó Csongor**

Gyógyszertudományok Doktori Iskola  
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezető: **Dr. Horváth Györgyi**  
PTE GYTK Farmakognóziai Intézet

Társtémavezető: **Dr. Pethő Dóra**  
Pannon Egyetem BKV Kutató Fejlesztő Központ

Pécsi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar  
Farmakognóziai Intézet

Pécs, 2024

*„Minden márványtömbben ott  
rejtőzik a szobor, csak ki kell  
szabadítani a kő fogságából.”*

Michelangelo

## Tartalom

1	<b>Bevezetés</b> .....	6
2	<b>Célkitűzések</b> .....	9
3	<b>Szakirodalmi áttekintés</b> .....	10
3.1	Antibiotikumok története.....	10
3.2	Alkalmazott antibiotikumok főbb hatásmechanizmusai.....	11
3.3	Antibiotikum-rezisztencia.....	13
3.3.1	Bakteriális légúti fertőzések jellemzői és az antibiotikum-rezisztencia kapcsolata.....	14
3.3.2	Bakteriális biofilm.....	17
3.4	Gyógynövénykivonatok antibakteriális hatása.....	21
3.5	A vizsgálatokba bevont növények.....	25
3.5.1	Muskotályzsálya ( <i>Salvia sclarea</i> L.) jellemzése.....	25
3.5.2	Kerti kakukkfű ( <i>Thymus vulgaris</i> L.) jellemzése.....	28
3.6	Modellbaktériumok jellemzése és jelentősége.....	29
3.6.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	29
3.6.2	Meticillin-rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).....	31
3.6.3	A <i>Haemophilus influenzae</i> és a <i>H. parainfluenzae</i> .....	33
4	<b>Anyag és módszer</b> .....	35
4.1	A felhasznált gyógynövények.....	35
4.1.1	Muskotályzsálya ( <i>Salvia sclarea</i> L.).....	35
4.1.2	Kakukkfű ( <i>Thymus vulgaris</i> L.).....	35
4.2	Extrakciók.....	36
4.2.1	Muskotályzsálya szuperkritikus folyadék extrakciója (SFE).....	36
4.2.2	Kakukkfű illóolaj kivonása vízgőz-desztillációval.....	39
4.3	Kísérletek során használt baktériumok tenyésztése.....	40
4.4	Kromatográfias vizsgálatok.....	40
4.4.1	Muskotályzsálya minták etanoltartalmának meghatározása.....	40
4.4.2	Kakukkfű illóolaj minták elemzése GC-MS és GC-FID technikák segítségével.....	41
4.5	Vékonyréteg kromatográfia – Direkt bioautográfia (TLC-DB).....	42
4.6	MIC meghatározás mikrodilúciós módszerrel (BMD).....	44
4.7	Biofilmgátló hatás vizsgálata.....	45
4.8	Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálat.....	45
4.9	Checkerboard-titrálás.....	46
4.10	Statisztikai elemzések.....	49
4.10.1	Statisztikai elemzés kakukkfű olajok esetén.....	49
4.10.2	Válaszfelület-modellezés (RSM) muskotályzsálya extraktumok esetén.....	49

5	<b>Eredmények</b> .....	52
5.1	Muskotályzsálya extraktumok antibakteriális aktivitásának meghatározása.....	52
5.2	SFE módszer optimalizálása.....	56
5.3	Kakukkfűolaj eredmények.....	62
5.3.1	Vízgőz-desztilláció eredményei.....	62
5.3.2	Kakukkfű illóolajának kémiai összetétele.....	62
5.3.3	TLC-DB vizsgálatok eredményei.....	63
5.3.4	Minimális gátló koncentrációk (MIC) meghatározásának eredménye.....	66
5.3.5	Biofilm vizsgálat eredményei.....	67
5.3.6	SEM vizsgálatok eredményei.....	68
5.4	Checkerboard-titrálás.....	69
6	<b>Diszkusszió</b> .....	71
7	<b>Összefoglalás</b> .....	78
8	<b>Irodalomjegyzék</b> .....	81
9	<b>Köszönetnyilvánítás</b> .....	101
10	<b>Publikációs jegyzék</b> .....	102
11	<b>Konferencia jegyzék</b> .....	103
12	<b>Melléletek</b> .....	104

## Rövidítések jegyzéke

ATCC	American Type Culture Collection (amerikai típusörzs gyűjtemény)
BHI	brain heart infusion (agy-szív tápoldat)
BMD	broth microdilution method (mikrodilúciós módszer)
CFU	colony forming unit (telepképző egységek száma)
DSM	German Collection of Microorganisms (német törzstípus gyűjtemény)
EtOH	etanol
FDA	USA Food and Drug Administration (Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala)
GC-FID	gas chromatography-flame ionization detector (lángionizációs detektorral felszerelt gázkromatográf)
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry (tömegspektrométerrel kapcsolt gázkromatográf)
GDP	gross domestic product (bruttó hazai termék)
MIC	minimal inhibition concentration (minimális gátló koncentráció)
MRSA	meticillin-rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	3-[4,5dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólium-bromid
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (Szisztematikus irodalmi áttekintések módszertana)
QS	quorum sensing
R <sub>f</sub>	retenciós faktor
RSM	response surface methodology (válaszfelület-modellezés)
SC-CO <sub>2</sub>	szuperkritikus folyadék állapotban lévő CO <sub>2</sub>
SD	standard deviation (szórásstandard deviáció)
SEM	scanning electron microscope (pásztázó elektronmikroszkóp)
SFE	supercritical fluid extraction (szuperkritikus folyadék extrakció)
SZMC	Szeged Microbiological Collection
TLC-DB	thin-layer chromatography-direct bioautography (vékonyréteg kromatográfia-direkt bioautográfia)
t <sub>R</sub>	retention time (retenciós idő)
WHO	World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

# 1 Bevezetés

Modern világunk rohamos technológiai fejlődése emberi léptékben nehezen követhető. A nyilvánvaló előnyök mellett az előttünk álló kihívások is hasonló ütemben bontakoznak ki. Ezek egy része jelentős méreteket öltött, és annyira sürgető az emberiség számára, hogy megoldásukra való összpontosítás több vezető ország stratégiai irányvonalává vált. Ide tartozik a környezetvédelem, az antibiotikum-rezisztencia elleni küzdelem és a digitalizáció (például a tervezést segítő háromdimenziós statisztikai modellek).

Az antibiotikum-rezisztencia növekvő problémája folyamatos kihívást jelent az egészségügyi szakemberek számára. A terület legújabb kutatási irányai szerint a terápiák sikertelensége számos kórokozó (pl. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Acinetobacter baumannii*, *Haemophilus* spp.) biofilmképző képességének köszönhető, amely fokozza az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájukat (Caputo et al., 2022; Eichel et al., 2020). A baktériumok extracelluláris mátrixot kezdenek kialakítani (extracelluláris poliszacharidokból, nukleinsavakból és fehérjékből áll), biofilmeket létrehozva, amelyek könnyen megtapadnak állati vagy emberi szöveteken, valamint orvostechikai eszközök (pl. kontaktlencsék, implantátumok, katéterek és söntök) felületén is (Guchhait et al., 2022; Guzmán-Soto et al., 2021). A baktériumok biofilmképző képessége tehát jelentős szerepet játszik különböző betegségekben (pl. cisztás fibrózis, fogszuvasodás, mandulagyulladás, középfülgyulladás), ezért napjainkban nagyobb figyelmet kapnak azok a kutatások, amelyek ezek felszámolására irányulnak (Rao et al., 2021).

A természetes, pl. növényi eredetű vegyületek fontos szerepet játszanak a gyógyszeriparban. Az antibiotikum-rezisztencia növekedésével egyre inkább előtérbe kerülnek a természetes vegyületek az iparágak különböző területein belül. Természetes antimikrobiális szerként az illóolajok és más növényi kivonatok alkalmazása széles körben elterjedt az élelmiszeriparban, a gyógyszeriparban és az orvostechikai eszközökkel kapcsolatban az elmúlt évtizedekben (Carpena et al., 2021). Az illóolajok és növényi kivonatok összetételét számos tényező befolyásolhatja: környezeti tényezők, vegetációs időszak, gyűjtési technika, extrakciós eljárás típusa, kemotípus és a begyűjtött növényi részek is (Détár et al., 2021; Farhat et al., 2016; Pluhár et al., 2016). Ezek a tényezők mind hatással lehetnek a kémiai összetételre, ami hatással van a biológiai aktivitásra (Souza de Oliveira et al., 2017). A legjobb terméshozam és a megfelelő

antibakteriális hatású minőség érdekében tehát szükséges a környezeti feltételek és a mikrobiológiai potenciál közötti összefüggés tisztázása is. Ezért szükségesek a megfelelően standardizálható extrakciós eljárások, analitikai vizsgálatok, valamint *in vitro* biológiai hatásvizsgálatok, amelyek segítségével értékelhető a kémiai összetétel és az antibakteriális hatás. Ma az ipar számos területén előnyben részesítik a környezetbarát extrakciós eljárásokat, mint pl. a vízgőz-desztillációt és a szuperkritikus folyadék extrakciót (SFE). Az SFE egy jól paraméterezhető eljárás, ahol főbb beállítási paraméterek kisléptékű változtatásával nagy hatást tudunk gyakorolni nem csak az extrakciós hozamra, hanem az extraktum antibakteriális hatására is. A folyamat mélyebb megértésének és optimalizálásának egyik lehetséges útja a statisztikai modellezés. Válaszfelület modellek alkalmazásával tervezhetővé válik a minőség, valamint időt és ezzel együtt pénzt spórolhatunk (Jakovljević et al., 2021; Yousefi et al., 2019).

Az ajakosok (Lamiaceae) családjának két kiemelkedő tagja a muskotályzsálya (*Salvia sclarea* L.) és a kerti kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.). Hagyományosan mind a két növényt évszázadok óta sikeresen alkalmazzák főként légúti patogénekkal szemben (Leigh-de Rapper et al., 2021). Alkalmazásuk elsősorban az aromaterápia és a természetgyógyászat keretein belül volt jelentős. Azonban számos tanulmány igazolta, hogy az illóolajaik antibakteriális hatásukat jórészt a bennük található oxigenált monoterpéneknek köszönhetik (linalool, linalil-acetát, timol, stb.) (Cui et al., 2015; Oliveira et al., 2020). Hazánkban a kerti kakukkfű termesztése növekszik, további hasznosításához értékes adatokkal szolgálhat a magánterületeken termesztett növény tudományos szempontok szerinti értékelése. Ezért kutatócsoportunk vizsgálta a különböző virágzási fenofázisban (virágzási időszak elején, teljes virágzásban, virágzási időszak végén) gyűjtött kerti kakukkfűből kivont illóolaj minták antibakteriális hatását légúti patogénekkal szemben. A konvencionális antibiotikumok „újra hasznosításának” egyik lehetséges útja növényi hatóanyagokkal való kombinációik tesztelése, valamint a különböző additív és szinergista hatások felderítése. Munkánk során aminoglikozid-típusú antibiotikumok és kakukkfű illóolajának kombinációit teszteltük légúti fertőzést okozó baktériumokkal szemben. A kombinációs kísérleteket *in vitro* checkerboard-titrálásos módszerrel vizsgáltuk.

A muskotályzsálya hazánkban nem őshonos növény. Kereskedelmi szempontból nagyüzemi módszerekkel állítják elő Oroszországban, Bulgáriában, Franciaországban és Marokkóban. Ezek az országok körülbelül 150 tonna illóolajat képesek előállítani évente, amelyet főként a parfüm-, kozmetikai és háztartás-vegyipar használ fel (Zanotti et al.,

2023). Szakirodalmazás után azt tapasztaltuk, hogy az extrakciós módszerek optimalizálásának célja szinte minden esetben az illóolaj-hozam növelése, illetve az illóolaj kémiai összetételét alkotó komponensek kívánt arányának elérése. Azonban az illóolajok és komponenseik hatásmechanizmusa még nem teljesen tisztázott. Különösen igaz ez a több komponenst tartalmazó oldószeres extraktumok esetén is. Ezért úgy gondoltuk, hogy hiánypótló lehet egy olyan metodika kidolgozása, ahol az antibakteriális hatás alapján optimalizáljuk az extrakciót, oly módon, hogy az extrakciós hozam is számolható marad. Kutatócsoportunk volt az első, aki a válaszfelület-modellezés segítségével antibakteriális hatás alapján optimalizált szuperkritikus folyadék extrakciót. Ezekhez a kísérletekhez a muskotályzsályát választottuk modellnövényként és a mikrobiológiai vizsgálatokba ugyancsak légúti patogéneket vontunk be.



## 2 Célkitűzések

A bevezetésben felvázoltak alapján az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- Szigetvár mellett (Magyarország, Baranya megye, koordináták: (46°02060.0000 É, 17°47059.9900 K) található termőterületen termesztett kakukkfű értékelése különböző fenofázisaiban (elő-fő-utóvirágzás) gyűjtött mintáiból kivont illóolajának antibakteriális hatása szempontjából.
- Muskotályzsálya szuperkritikus folyadék extrakciójának (SFE) optimalizálása antibakteriális hatás szempontjából, válaszfelület-modellezés segítségével (RSM).
- Az általunk vizsgált kakukkfű illóolajok kémiai összetételének meghatározása GC-MS (gázkromatográfia-tömegspektrometria), GC-FID (lángionizációs detektorral felszerelt gázkromatográfia) technikák segítségével.
- Muskotályzsálya extraktumok és kakukkfű illóolajok antibakteriális hatásának vizsgálata bioautográfiás módszer segítségével.
- A kakukkfű illóolaj biofilmgátló hatásának bizonyítása.
- Aminoglikozid-típusú antibiotikumok és kakukkfű illóolaj-kombinációk antibakteriális hatásának vizsgálata és feltételezett szinergista hatás felderítése.

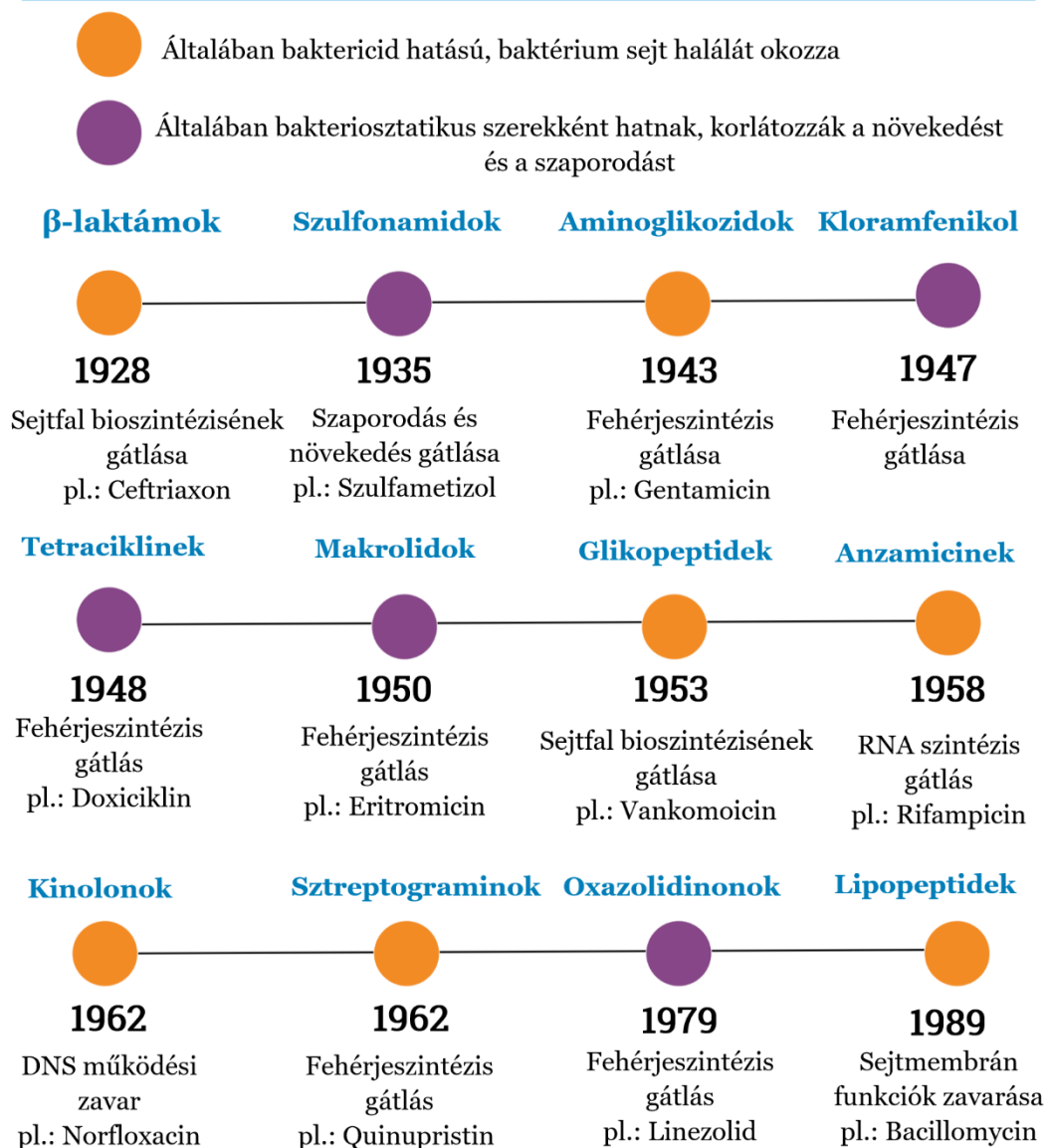
### 3 Szakirodalmi áttekintés

#### 3.1 Antibiotikumok története

Az első antibakteriális szert, a Salvarsant 1910-ben vezették be, amely a szifilisz első hatékony gyógymódjának bizonyult (Vernon, 2019). Az antibiotikumok alig egy évszázad alatt radikálisan átalakították a modern orvostudományt, és jelentős mértékben hozzájárultak az átlagos emberi élettartam 23 évvel történő meghosszabbodásához. Az antibiotikumok klinikai használatba vétele vitathatatlanul a 20. század legnagyobb orvosi áttörése volt. A fertőző betegségek kezelésén túl, az antibiotikumok számos modern orvosi eljárást tettek lehetővé, beleértve a rákkezelést, a szervátültetést és a nyitott szívűműtétet (Katz & Baltz, 2016). A penicillin 1928-as felfedezése indította el a természetes eredetű antibiotikumok kutatásának aranykorát, amely során Alexander Fleming úttörő munkája örökre átalakította a bakteriális fertőzések kezelésének módját. Az új antibiotikumok felfedezése az 1950-es években érte el csúcspontját. Azóta folyamatosan csökkent az antibiotikumok felfedezésének és sikeres fejlesztésének üteme. A 1980-as évek végétől kezdődően lényegében nem történt jelentős áttörés ezen a területen. Számos humán kórokozó gyógyszer-rezisztenciájának kialakulása elősegítette a jelenlegi válság kialakulását (Hutchings et al., 2019).

Az antibiotikumok osztályozását az 1. ábra mutatja be. Az ábrán jól látható, hogy igazán nagy áttöréssel járó felfedezés az elmúlt harminc évben nem történt, amely ellentétes tendenciát mutat a rezisztens törzsek megjelenésével.

## Antibiotikumok osztályozása



**1. ábra** Antibiotikumok osztályozása (Saját ábra)

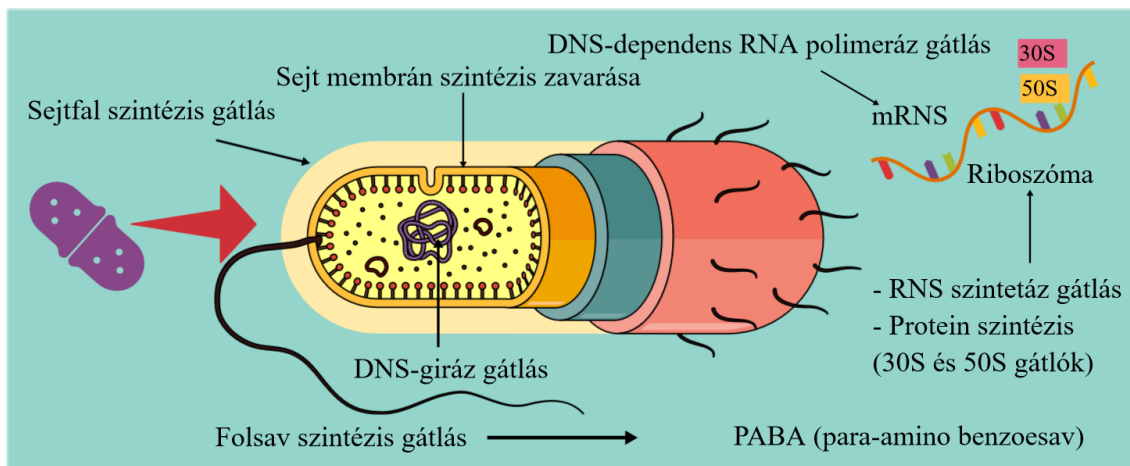
### 3.2 Alkalmazott antibiotikumok főbb hatásmechanizmusai

A riboszómák méretének kifejezésére az úgynevezett Svedberg (S) egységet használjuk. A prokarióták riboszóma mérete 70S, amely két részből áll: a 30S kisalegység és az 50S nagyalegység. A gentamicin baktericid aktivitása abban rejlik, hogy (a tetraciklinekhez hasonlóan) kötődik a baktériumok riboszomális 30S kisalegységéhez. Pontosabban, a gentamicinről úgy gondolják, hogy a 16S rRNS A-helyéhez kötődik, amely a riboszomális 30S kisalegység egyik komponense. A kötődés révén a genetikai

kód olvasása zavart szenved. A transláció megszakad, ami a baktérium fehérjeszintézisének zavarához vezet. A kloramfenikol, makrolidok és oxazolidinonok 50S nagyalegységhez kapcsolódva zavarják meg a fehérjeszintézist. A gentamicin az amikacinhoz hasonlóan aminoglikozid típusú antibiotikum (Krause et al., 2016).

A bakteriális sejtfalak térhálós peptidoglikánból állnak (Levin & Angert, 2015). Az antibiotikumok, mint például a  $\beta$ -laktámok (penicillin és származékai, cefalosporinok és karbapenemek) és a glikopeptidek (vankomicin) gátolják a peptidoglikán bioszintézist, így a sejt sebezhetővé válik az ozmotikus nyomással és az autolízissel szemben. Például a vankomicin azáltal blokkolja a sejtfalképződést, hogy a sejtfalszintézis során a sejtfal prekursor egységének D-alanil-D-alanin végéhez kapcsolódik, ami transzpeptidáz gátlást eredményez, megakadályozva a későbbi szintézist és a peptidoglikán lánc keresztkötéseinek kialakulását. Továbbá a vankomicin lecsökkenti a sejtfal membránjának permeabilitását (Wang et al., 2018). A sejtfal szintézisének megzavarására egy másik lehetséges mechanizmus, hogy a  $\beta$ -laktám antibiotikumok elfoglalják az úgynevezett penicillin-kötő fehérjék aktív helyeit. A penicillin-kötő fehérjék membránhoz rögzített enzimek, amelyek részt vesznek a bakteriális sejtfal szintézisének utolsó lépésében. Ezáltal a folyamat befejezetlen marad (Kocaoglu et al., 2015).

Az antibiotikumok jellemző hatásmechanizmusait a 2. ábra mutatja be.



**2. ábra** Antibiotikumok főbb hatásmechanizmusai (Saját ábra)

### 3.3 Antibiotikum-rezisztencia

Az antibiotikum-rezisztencia évtizedek óta a kutatások középpontjában áll. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) várakozásai szerint a rezisztens baktériumok által okozott fertőzések évente 10 millió áldozatot követelnek, ami egyes országokban a bruttó hazai termék (GDP) 2-5%-os csökkenését jelentené (Giono et al., 2020). Az antibiotikum-rezisztencia a mikroorganizmusok főként szerzett képessége, amely által lehetővé válik, hogy magas antibiotikum koncentráció mellett növekedjenek (Brauner et al., 2016). Primer rezisztencia a baktériumok természetes tulajdonságaiból fakad, és nem igényel előzetes antibiotikum-expozíciót. A *P. aeruginosa* például rendelkezik olyan fehérjékkel, amelyek aktív transzport segítségével képesek eltávolítani a számára káros antibiotikum molekulákat a baktériumsejtből (Qin et al., 2022). A szekunder rezisztencia a baktériumok evolúciós válasza az antibiotikumokkal való találkozásra. A szerzett rezisztencia genetikai változások eredményeként jön létre, például mutációk vagy horizontális géntranszfer révén (Brauner et al., 2016).

Egy antibiotikum minimális gátló koncentrációja (MIC) megmutatja, hogy milyen koncentrációban képes gátolni a baktériumtörzs szaporodását. A rezisztens baktériumok olyan antibiotikum koncentráció mellett képesek növekedni és osztódni, amely végzetes az azonos fajhoz tartozó más törzsek számára. Az antibiotikum-rezisztenciának különböző formái léteznek. Egyrészt létezik természetes intrinsic rezisztencia. A mikroba DNS-e kódol olyan struktúrákat, enzimeket, fehérjéket, amelyek semlegesítik vagy éppenséggel eltávolítják az antibiotikum molekulákat. Másrészt nagy a jelentősége a baktériumok szerzett rezisztenciájának. Ez bekövetkezhet a kromoszómális gének mutációja révén vagy a genetikai információ cseréje által horizontális géntranszfer segítségével. A genetikai információcsere legtöbbször kromoszómák, vírusok (bakteriofágok) és plazmidok átadásán keresztül történik (Huemer et al., 2020).

A súlyos, akut légúti megbetegedésekért felelős koronavírus, SARS-CoV-2, a világjárvány okozója, csak rontott a kilátásokon. Annak ellenére, hogy a SARS-CoV-2-ben szenvedő betegeknek gyakran írtak fel antibiotikumot, a bakteriális társfertőzés és a másodlagos fertőzés előfordulása a SARS-CoV-2-vel diagnosztizált és kórházi ápolásra szoruló betegeknél viszonylag alacsony (3,5-14,3%) (Langford et al., 2020). A bakteriális fertőzések gyakorisága és az antibiotikumok felírásának magas aránya közötti szakadék rávilágít arra, hogy ezeknél a betegeknél jelentős antibiotikum túlhasználat állhat fenn. Az antibiotikumok túlzott felírása SARS-CoV-2-vel fertőzött betegeknél az

antimikrobiális rezisztencia fokozódásához vezethet világszerte. A nem körültekintő és visszaélészerű antibiotikum alkalmazás kombinálva a túlterhelt egészségügyi személyzettel és kórházi infrastruktúrával egy önmagát erősítő folyamattá válhat, amely eddig is erősen romló tendenciát mutatott, még hozzá szelektíven a légúti patogének esetében. Rezisztenciájuk a SARS-CoV-2 világvárvány tartós következményeként realizálódhat (Huttner et al., 2020; Rawson et al., 2020), ami számunkra világosan mutatja a téma aktualitását. Vírusos légúti fertőzések esetén a bakteriális társfertőzések jelentősen növelik a morbiditást és a mortalitást (Gupta et al., 2008; Westblade et al., 2021). A másodlagos tüdőfertőzések gyakoriak a kritikus állapotú, kórházi betegeknél. A légúti tenyészetekben leggyakrabban azonosított baktériumok közé tartozik a *P. aeruginosa* és a *S. aureus*, amelyek antibiotikum-rezisztensek és hosszan tartó súlyos betegségeket okozhatnak. Mindemellett egyre nagyobb problémát okoznak a *Haemophilus* nemzetség tagjai is (Behzadi et al., 2021; Chong et al., 2021; Craft et al., 2019).

A születéskor várható élettartam folyamatosan növekszik Európában, köszönhetően az orvostudomány és az orvostechikai eszközök fejlődésének. Azonban társadalmunk egy jellemzően idősödő társadalom, ahol sajnálatosan az egészségben eltöltött évek száma nem nőtt arányosan az életévek számával. Az idősödő lakosság körében magas az orvosi kezelések száma, beleértve az intenzív, transzplantációs osztályokon való hosszú lábadozást, valamint a hosszú távú, életkorral összefüggő krónikus betegségek elhúzódó kezeléseit. Ennek következtében nő a nozokomiális infekciók és a pánrezisztens baktérium okozta fertőzések száma (Jeukens et al., 2019).

### 3.3.1 Bakteriális légúti fertőzések jellemzői és az antibiotikum-rezisztencia kapcsolata

A légzőrendszer egy összetett szervrendszer, amely az oxigén és szén-dioxid cseréjéért felelős. Az orrtól a tüdő alveolusáig terjed, és jellegzetes mikrobiom jellemzi. A felső légutak alatt az orrot, a szájüreget, a mandulát valamint a géget értjük. Az alsó légutak a légcsőből, hörgőkből és tüdőlebenyekből állnak. A légzőrendszerben található baktériumkolónia védelmi vonalként működik, ellenállást biztosítva a légzőszerveket megtámadó kórokozók kolonizációjával szemben. Ezek a baktériumkolóniák valószínűleg részt vesznek a légzőszervek védekezőképességének és homeosztázisának fenntartásában (Man et al., 2017).

Mivel egy egészséges felnőtt naponta több mint 7000 liter levegőt lélegzik be, a felső légúti traktus folyamatosan kitett a külső környezetből származó levegő

áramlásának. Az érkező levegővel együtt naponta  $10^4$ - $10^6$  baktériumsejt is belélegzésre kerül köbméterenként. A biológiai részecskék mellett a felső légutak ki vannak téve az atmoszférikus fizikai és kémiai tényezőknek is, ideértve a változó páratartalmat, oxigént, cigaretta füstöt és immunológiai tényezőket. Valamint az életkorral és az évszakok változásával együtt is változik légutakhoz kapcsolódó mikrobiom összetétele. Mindezek specifikus mikrokörnyezeteket alakítanak ki, például az orrüregben, az arcüregekben, a nasopharynxben és az oropharynxben (Kumpitsch et al., 2019). Az opportunisták kórokozók tünetmentesen élhetnek az emberi bőrön és orrban, de bizonyos körülmények között krónikus és lassan kialakuló, vagy akár akut és agresszív fertőzéseket is okozhatnak, ha jelentősen elszaporodnak (Zipperer et al., 2016).

Az akut alsó légúti fertőzések világszerte gyakori betegségeknek számítanak és egyedül a tüdőgyulladás évente több mint 1,3 millió gyermekhalálért felelős (Zar & Ferkol, 2014). A tüdőgyulladás leggyakoribb bakteriális okai közé tartozik a *Streptococcus pneumoniae*, a *H. influenzae* és az *S. aureus*. Ezeknek a kórokozónak, valamint a légutak más opportunisták támadóinak közös jellemzője, hogy a helyi és szisztémás betegségeket megelőzi a tünetmentes bakteriális kolonizáció vagy hordozás. Sok esetben pedig nem is a kolonizált területen jelentkezik a betegség, hanem a légzőrendszer egyéb pontjain vagy akár más szervekben. Tüdőgyulladás szövődményeként a *S. aureus* szepszis kialakulásához vezethet, a *Neisseria meningitidis* pedig a vérből az idegrendszerbe jutva agyhártyagyulladást okoz. Súlyos esetben a *S. pneumoniae* endokarditisz kialakulásához vezethet (Siegel & Weiser, 2015). A fenti sorok jól példázzák, hogy mennyire szerteágazó a baktériumok okozta légúti fertőzések. A leggyakoribb légúti patogéneket a 1. táblázat foglalja össze.

**1. táblázat** Gyakori légúti kórképek és bakteriális patogénjeik (Balázs, 2022)

	Kórkép	Baktériumok
Felső légutak	Mandulagyulladás (tonsillitis)	<i>S. pyogenes</i>
	Torokgyulladás (pharyngitis)	<b><i>H. influenzae</i></b> , <i>S. pyogenes</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>A. haemolyticum</i>
	Orrmelléküreg-gyulladás (sinusitis maxillaris)	<b><i>H. influenzae</i></b> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i>
	Gégegyulladás (laryngitis)	<b><i>H. influenzae</i></b> , <b><i>H. parainfluenzae</i></b> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>M. catharrhalis</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i>
	Középfülgyulladás (otitis media)	<b><i>H. influenzae</i></b> , <b><i>H. parainfluenzae</i></b> , <b><i>P. aeruginosa</i></b> , <i>M. catharrhalis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i>
Alsó légutak	Tüdőgyulladás (pneumonia)	<b><i>H. influenzae</i></b> , <i>S. aureus</i> , <i>L. pneumophila</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i>
	Hörghurut (bronchitis)	<b><i>H. influenzae</i></b> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>B. pertussis</i>
	Krónikus obstruktív tüdőbetegség (chronic obstructive pulmonary disease)	<b><i>H. influenzae</i></b> , <b><i>P. aeruginosa</i></b> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>M. catarrhalis</i>
	Tüdőtuberkulózis (tuberculosis)	<i>M. tuberculosis</i>

A bakteriális fertőzésekkel való küzdelemben az elsődleges eszköz az antibiotikumok használata. Azonban túlzott és sok esetben helytelen alkalmazásuk mind a humán gyógyászatban mind pedig a modern mezőgazdaságban antibiotikum-rezisztens baktériumtörzsek megjelenéséhez vezetett. A rezisztens törzsek előfordulásának gyakorisága az elmúlt néhány évben jelentős mértékben felgyorsult. Egy, a témát elemző tanulmányban hét adatbázis – PubMed, MEDLINE, EMBASE, Scopus, Cochrane, Web



of Science és CINAHL – keresési eredményeit elemezték antibiotikum-rezisztencia témájához kapcsolódó kulcsszavak segítségével. A kutatás 2019. december és 2022. május között publikált tanulmányokat vett figyelembe, PRISMA (Szisztematikus irodalmi keresések módszertana) irányelvek szerint. Ebben a vizsgálatban 23 tanulmány szerepelt, és a bizonyítékok azt mutatták, hogy az antibiotikum-rezisztencia növekedett légúti megbetegedésekhez köthetően. Ez valószínűleg a SARS-CoV-2 világjárvány következménye. Az *Acinetobacter baumannii* volt a leggyakrabban jelentett rezisztens Gram-negatív baktérium, amelyet a *K. pneumoniae*, az *E. coli* és a *P. aeruginosa* követett. A *P. aeruginosa* antibiotikum-rezisztenciája jelentősen növekedett cefotaximmal szemben. *K. pneumoniae* magas rezisztenciát mutatott a kolisztinnel szemben. A leggyakrabban jelentett Gram-pozitív baktériumok a *S. aureus* és az *Enterococcus faecium* voltak. Az *E. faecium* ellenállása az ampicillinnel, az eritromicinnel és a ciprofloxacinnal szemben volt magas. A *S. aureus* pedig eritromicinnel és tetraciklinekkel szemben volt ellenálló (Sulayyim et al., 2022).

A baktériumok gyors és hatékony alkalmazkodó képességét több tényező is segíti. A baktériumok képesek genetikai információkat cserélni azáltal, hogy horizontális géncsere útján plazmidokat, transzpozonok és más mobilis genetikai elemeket hordoznak. Ezáltal a rezisztenciát hordozó gének terjedése egyik baktériumról a másikra rendkívül gyors. Emellett könnyen alakulnak ki a baktérium számára előnyös, ellenállóképességet növelő mutációk. Azonban talán az egyik legérdekesebb és emellett rendkívüli fontosságú a biofilmképző képességük. A biofilmekben a baktériumok egy védelmet nyújtó mátrixban csoportosulnak össze, amely csökkentheti az antibiotikumok célba jutását és ezáltal hatékonyságát. Ezenkívül a biofilmekben a baktériumok közötti génátvitel és kommunikáció lehetővé teszi a rezisztenciával kapcsolatos tulajdonságok gyors terjedését. Ezt az összetett folyamatot és ennek következményét a következő fejezet mutatja be.

### 3.3.2 Bakteriális biofilm

A baktériumok túlélési mechanizmusaik részeként biofilmeket képeznek, így mindenütt jelen vannak a természetben. A bakteriális biofilmek olyan komplex, felülethez kapcsolódó baktériumközösségek, amelyeket főként poliszacharidokból, szekretált fehérjékből és extracelluláris DNS-ekből álló saját előállítású polimer mátrixok tartanak össze. Megkülönböztethetünk endogén és exogén biofilmeket (Bowler et al., 2020). Az endogén biofilmek a szervezetben belül alakulnak ki, jellemzően annak természetes

részein vagy szövetein. Az exogén biofilmek a szervezeten kívül, külső felületeken vagy mesterséges eszközökön alakulnak ki. Ezek a biofilmek gyakran okoznak problémákat, mivel nehezen eltávolíthatók és ellenállóak a tisztítási eljárásokkal és antimikrobiális kezelésekkel szemben. Megtalálhatók ipari és kórházi környezetben egyaránt, növények, illetve sziklák felületén is. Anton van Leeuwenhoek már 1683-ban megfigyelte és leírta a biofilmeket kezdetleges mikroszkópja segítségével a saját fogairól származó mintában. A „biofilm” kifejezést először 1935-ben használták a környezeti mikrobiológiában a bakteriális élet ezen uralkodó formájának leírására (Bowler et al., 2020). Bár a „biofilm” elnevezése újkeletű, valószínűleg ez a legrégebbi életforma a Földön, és a közelmúltban arról számoltak be, hogy valószínűleg a legsikeresebb is. A biofilmek dominálnak a Föld felszínén található összes élőhelyen, és hozzávetőlegesen  $1,2 \times 10^{30}$  baktériumsejt-populáció akár 80%-át is kitehetik (Flemming & Wuertz, 2019). A mikroorganizmusok biofilmképző képességnek azonban nem tulajdonítottak kellő jelentőséget a mikrobiológusok, egészen az 1970-es évek elejéig, amikor Nils Høiby összefüggést figyelt meg a perzisztáló fertőzés etiológiája és a baktériumok aggregátumai között cisztás fibrózisos betegekben (Høiby, 2017). Azóta felismerték, hogy a biofilmek számos klinikai fertőzésben szerepet játszanak (Bjarnsholt, 2013), és egyre több bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy a biofilmek hozzájárulnak a patogenezishez, különösen krónikus fertőzéseket tarthat fent (Donlan & Costerton, 2002).

A bakteriális biofilmek olyan baktériumok klaszterei, amelyek egy felülethez és/vagy egymáshoz kapcsolódnak, és egy saját maguk által előállított polimer mátrixba ágyazódnak (Lewis, 2001). A biofilm mátrixfehérjéket (pl.: fibrin), poliszacharidokat (pl.: alginát), valamint bakteriális örökítőanyagokat is tartalmaz. A bakteriális biofilm-képződés összetett folyamat, és öt fő fázisban írható le.

1. fázis: reverzibilis kötődési fázis, ahol a baktériumok nem specifikusan kötődnek a felületekhez; 2. fázis: irreverzibilis kötődési fázis, amely magában foglalja a baktériumsejtek és a felület közötti kölcsönhatást bakteriális adhezinek, például fimbriák és lipopoliszacharid felhasználásával; 3. fázis: extracelluláris polimer anyagok előállítása a tapadó baktériumsejtek által; 4. fázis: biofilm érési fázisa, amelyben a baktériumsejtek jelzőmolekulákat szintetizálnak és szabadítanak fel egymás jelenlétének érzékelésére, ami mikrokolónia kialakulásához és biofilmek éréséhez vezet; 5. fázis: szétszóródási/leválási fázis, ahol a baktériumsejtek elhagyják a biofilmeket és visszatérnek a független plankton életmódba (Muhammad et al., 2020). A mátrix által nyújtott védelem mellett a biofilmekben lévő baktériumok számos túlélési stratégiát

alkalmazhatnak, hogy elkerüljék a gazdaszervezet immunválaszát vagy kivédjék a gyógyszeres terápiát. Alvó állapotban és az immunrendszer elől rejtve maradva helyi szövetkárosodást, majd akut fertőzést okozhatnak. A biofilmen belül a baktériumok alkalmazkodnak a környezeti oxigénhiányhoz, a korlátozott mennyiségű tápanyaghoz azáltal, hogy a mátrixban elhelyezkedő baktériumok megváltozott anyagcserét folytatnak. Csökkentik a génexpressziót és lassabb fehérjetermelést produkálnak, ami alacsonyabb anyagcsere- és sejtosztódási sebességhez vezet (Vestby et al., 2020).

Ezen kívül ezek az adaptációk ellenállóbbá teszik a baktériumokat az antimikrobiális terápiával szemben. A biofilm mátrixa lehetővé teszi a baktériumközösségek közvetlen közelségét (Flemming & Wuertz, 2019), és ideális életteret biztosít az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát kódoló plazmidok sejtcseréjéhez, ezáltal potenciálisan elősegítve az antibiotikum-rezisztencia terjedését (Donlan & Costerton, 2002). A rezisztenciát adó gének horizontális géntranszfere a baktériumsejtek között a biofilmen belül, a kutatási eredmények alapján 700-szor hatékonyabb, mint a szabadon élő, planktonikus baktériumsejtek között (Flemming et al., 2016). A biofilm fizikai határként késlelteti az antibiotikum-baktérium érintkezést és az alacsonyabb koncentrációknak köszönhetően, a baktériumok időt nyernek a tolerancia kialakításához. Az antibiotikumok farmakokinetikai és farmakodinámiás paramétereit illetően a biofilmeket javasolták harmadik farmakológiai kompartmentként a vér és a fertőzés célszöve mellett. A mátrix komponenseivel, például anionos extracelluláris DNS-sel és algináttal való kölcsönhatások pozitív töltésű antibiotikum-osztályokkal, például kolisztinel vagy tobramicinnel képesek kölcsönhatásba lépni, és ennek következtében csökkentik azok aktivitását, míg a semleges antibiotikumok, mint például a ciprofloxacín, könnyebben behatolnak a biofilmekbe (Fernández-Billón et al., 2023).

A biofilm krónikus fertőzéseket okoz, például invazívan alkalmazott orvosi eszközökkel (pl. katéterek, fertőzött sebészeti implantátumok) asszociált fertőzésekben, cisztás fibrózisban, középfül-gyulladásban, csontvelő-gyulladásban, és sebfertőzéssel kapcsolatos elhúzódó fertőzések elsődleges oka lehet. A nem gyógyuló sebeket különösen összetett és kevert baktériumpopulációk jellemzik, amelyek gyakran tartalmaznak antibiotikum-rezisztens baktériumokat, valamint fenotípusosan toleráns baktériumokat biofilm formájában (Bowler et al., 2001). A baktériumok variabilitásának fő oka általában az örökítőanyaguk genetikai változékonysága. A baktériumok fenotípusának megváltozása azonban gyakran nem genetikai eredetű, hanem fiziológiai vagy környezeti változások váltják ki (pl.: biofilm belsejében). Bizonyos szabályozó

vegyületek megjelenése vagy épp hiánya indukálhatja az adaptív enzimképzést, így segítve elő a fenotípusosan toleráns baktériumok megjelenését (Bowler et al., 2012). Ezek rendkívül nyugtalanító klinikai ténymegállapítások mind a terápiás eredmények, mind a bakteriális plazmidok promiskuitása szempontjából. A sebek felszínén megjelenő biofilm *in vivo* fizikai megbontásával Wolcott és munkatársai (Wolcott et al., 2010) azonosítottak egy 24-48 órás terápiás ablakot, amely alatt az antibiotikum-terápia hatékonyabb volt. Ez azt jelzi, hogy a biofilm fizikai megbontására tervezett stratégiák elősegíthetik az antimikrobiális hatékonyságot. Az Európai Klinikai Mikrobiológiai és Fertőző Betegségek Társasága (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) 2014. évi biofilm-diagnosztikai és kezelési iránymutatásai megállapították, hogy szükség van az antibiotikumok új kombinációira „biofilm-oldó” gyógyszerekkel (Høiby et al., 2015). Kimutatták, hogy a ciprofloxacinnal kombinált bakteriofág hatékony a *P. aeruginosa* biofilm-fertőzés kezelésében cisztás fibrózisban szenvedő betegeknél (Chang et al., 2019). A biofilm-gátló és antimikrobiális szerek kombinációját tartalmazó sebkötözőről kimutatták, hogy elősegíti a gyógyulást, amennyiben a biofilm kialakulását időben megelőzik (Metcalf et al., 2016).

A korábban említett kevert fertőzések, ahol egynél több baktériumtörzs is jelen van, tovább nehezítheti a helyzetet. Számos példa van arra, hogy megnövekedett az antibiotikum-rezisztencia kevert típusú bakteriális biofilmek esetén a nem kevert biofilmekhez képest. Például egy *in vivo* polimikrobiális sebmodellben az egyfajú biofilmben növekvő *P. aeruginosa* kétszer érzékenyebb volt a gentamicin kezelésre, mint a *P. aeruginosa* ami polimikrobiális biofilmben volt jelen *S. aureus*-al, *Enterococcus faecalis*-el és *Finogoldia magna*-val együtt (Dalton et al., 2011). A mechanizmus egyelőre nem tisztázott. Egy másik biofilm fertőzési modell aminek klinikai relevanciája van tartalmazza a *M. catarrhalis*-t és a *S. pneumoniae*-t. Ezek a baktériumok szerepet játszanak a krónikus középfülgyulladás patogenezisében (Hall & Mah, 2017). Középfülgyulladásra általában amoxicillin kezelést írnak fel. Amennyiben a kezelés nem hatásos, másodvonalbeli terápiákat alkalmaznak, például amoxicillint  $\beta$ -laktamáz inhibitorral kombinálva vagy azitromicint (Harmes et al., 2013). Ebben a kétkomponensű biofilmben a *M. catarrhalis* olyan  $\beta$ -laktamázt szekretált, amely amoxicillin-rezisztenciát eredményezett a *S. pneumoniae* számára is ebben a környezetben. Egyfajta szimbiózis révén viszonzásként a *S. pneumoniae* passzívan védte a *M. catarrhalist* az azitromicin-kezeléstől egy máig tisztázatlan mechanizmuson keresztül (Hall & Mah, 2017).

### 3.4 Gyógynövénykivonatok antibakteriális hatása

A gyógynövényekkel való gyógyítás egyidős az emberiséggel. A humán gyógyítás és a természetben található gyógynövények közötti kapcsolat a távoli múltból ered. A gyógynövények felhasználásának legrégebbi írásos bizonyítékát egy Nagpurból származó sumér agyaglapon találták, amely körülbelül 5000 éves. 12 receptet tartalmazott a gyógyszerkészítéshez, több mint 250 különböző növényre utalva, amelyek közül néhány alkaloid-tartalmú, például a mák és a mandragóra. Talán ez lehetett az első megmaradt gyógynövénytar (Petrovska, 2012). A kínai gyökerekről és fűfélékről szóló „Pen T'Sao” könyv, amelyet Shen Nung császár írt Kr.e. 2500 körül, 365 drog (gyógynövények szárított részeinek) felhasználásához ad útmutatást, amelyek közül sokat még napjainkban is használnak, például: sárga tárnics, kámforfa, teafű, ginzeng, jimson gyom, fahéjkéreg és csikófark (Zink & Traidl-Hoffmann, 2015). Az Ebers-papirusz, amelyet Kr.e. 1550 körül írtak, 800 felhasználási előírás gyűjteménye 700 növényfajra, mint például gránátalma, ricinusolaj, aloe, szenna, fokhagyma, hagyma, füge, fűz, koriander, boróka stb. (Zink & Traidl-Hoffmann, 2015). Azonban hiába a több ezeréves tudás, még mindig rengeteg növényi vegyület vár felfedezésre. Valamint összetett, sokszor szinergista és antagonist hatásra támaszkodó hatásmechanizmusaik még közel sem tisztázottak kellőképpen. A standardizálható mikrobiális hatást vizsgáló analitikai módszerek fejlesztésével, illetve a hatásmechanizmusok molekuláris szintű megértésével, új lendületet adhatunk a modern antimikrobiális gyógyszerek fejlesztésének.

A növények felbecsülhetetlen értékű másodlagos metabolitforrást állítanak elő, válaszul olyan környezeti tényezőkre, mint a növényevők támadása, az abiotikus stressz vagy az interspecifikus kölcsönhatások (Yang et al., 2018). A gyógynövények másodlagos metabolizmusai által biztosított fitofarmakonok azonban a hagyományos antibiotikumokhoz képest eltérő mechanizmusokon és célhelyeken keresztül hatnak, ezért a hagyományos antibiotikumokkal való kombinálásuk lehetőséget biztosít számunkra az antibiotikum-rezisztencia visszaszorítására (Abreu et al., 2012). A közelmúltban számos tudományos áttekintés foglalta össze a növényi komponensek antibakteriális hatását. Azonban ezek a tanulmányok szinte kizárólag tiszta komponensek hatásmechanizmusára koncentrálnak, adott vegyületcsoportokon belül pl.: terpének, flavonoidok, polifenolok. Az irodalomból hiányoznak azok az átfogó tanulmányok, amelyek konvencionális antibiotikumok és tiszta növényi vegyületek, komplex extraktumok, illóolajok kombinációjának szinergizmusát, hatásmechanizmusát,

antibiotikum-rezisztencia elleni küzdelemben várható hasznát és analitikáját mélységében feldolgozná (Barbieri et al., 2017; Chandra et al., 2017; Górnjak et al., 2019; Li et al., 2019).

Az antimikrobás aktivitással rendelkező növényi vegyületek két kiemelkedő osztálya a terpének és a terpenoidok. Gyógyászati alkalmazásuk széles spektruma már régóta felkeltette az emberiség érdeklődését. A „terpén” kifejezés a fagyanta-terpentinből (németül Terpentin; latinul *Balsamum Terebinthinae*) származik, amely monomerként ismétlődő izoprén egységgel rendelkező szénhidrogéneket tartalmaz. A terpének egyszerű szénhidrogének, míg a terpenoidok a terpének módosított osztálya, különböző funkciós csoportokkal és oxidált metilcsoportokkal (Jaeger & Cuny, 2016). A terpenoidokat konvencionálisan a bennük lévő szénatomok száma alapján osztályozzák: hemiterpenoidok (C<sub>5</sub>), monoterpenoidok (C<sub>10</sub>), homoterpenoidok (C<sub>11,16</sub>), szeszkviterpenoidok (C<sub>15</sub>), diterpenoidok (C<sub>20</sub>), triterpenoidok (C<sub>30</sub>), tetraterpenoidok (C<sub>40</sub>) és politerpenoidok (C<sub>>40</sub>, magasabb rendű terpenoidok) (Boncan et al., 2020). A 300 Da alatti illékony terpén vegyületek a növényi illóolajok fő komponensei, amelyeknek kiemelt szerepe van a növények kommunikációjában. Az illékony anyagok kibocsátása nemcsak stimuláns és/vagy vonzó tulajdonság, de a növény közvetlen vagy közvetett védelemében is részt vesznek.

A karvakrol az oregánó illóolaj fő összetevője (44-78% karvakrol) (Baser, 2008). Egy hidrofób vegyület, amely a mentolhoz és a timolhoz hasonlóan könnyen abszorbeálódik a peptidoglikán membránba, így csökkenti a membrán polaritását és hatást gyakorol a fluiditásra és a permeabilitásra. A permeabilitás megváltozása a prokarióta szervezet számára nemkívánatos passzív diffúzióhoz vezet. A timol és a karvakrol egy-egy hidroxilcsoportot és egy-egy delokalizált elektronrendszert is tartalmaznak, ennek köszönhetően gyenge kationcserélő tulajdonságot tulajdonítanak a vegyületeknek. Korábban leírták, hogy a hidroxilcsoport (a benzolgyűrűhöz kötött) fontos egyes antimikrobiális vegyületek aktivitása szempontjából, és ezt az aktivitást fokozza a kettős kötések jelenléte (Breeuwer et al., 1996; De Young & Dill, 1988). A periplazma a Gram-negatív baktériumok külső és belső membránja közötti tér, amely a Gram-pozitív baktériumoknál is megtalálható, csak jóval kisebb. A membrán a citoplazma oldaláról negatív töltésű hidroxil-ionokkal, míg a periplazma felőli oldal pozitív töltésű hidrogén-ionokkal borított. A citoplazmából a NADH+H<sup>+</sup> juttatja az elektronokat és a protonokat a membránba, ahol egy elektrontranszportláncon keresztül a végső elektron akceptorra az O<sub>2</sub>-re jutnak. Így lényegében az elsődleges elektron donor

és a végső elektron akceptor között redoxpotenciál különbség alakul ki. Így jön létre a proton hajtóerő, amely az ATP-szintetáz enzimek segítségével ATP szintézisre fordítható. Azzal, hogy protonokat vonnak el, csökken a proton hajtóerő és az ATP szintézis zavart szenved. Az ATP-készletek kimerülése a sejtben lezajló alapvető folyamatok károsodásához és végül sejthalálhoz vezet (Ultee et al., 2002).

A timol a karvakol izomerje egy monoterpén fenol, amely a Lamiaceae családba tartozó növényekből, például a bazsalikomból, oregánóból, borsikafűből, méhbalzsamból és kakukkfűből kivont illóolajokban található. A timol bioszintézise a  $\gamma$ -terpinén *p*-ciménné történő aromatiszálásával kezdődik, majd a *p*-cimén hidroxilezését követően timol keletkezik (Marchese et al., 2016). A timolnak széles spektrumú antibakteriális hatása van, de a mai napig kevés tanulmány tisztázta az antibakteriális mechanizmusát. Timol-tartalmú illóolaj hatásmechanizmusának azonosítására 2D gél elektroforézist, majd MALDI-TOF módszert alkalmaztak a fehérjeprofílium elemzésére, hogy kimutathassák a *Salmonella enterica* stresszreakcióját miután szubletális koncentrációban (0,01%) tették ki az olajnak. A tanulmány kimutatta, hogy különböző szignifikáns hatások léptek fel, beleértve a fehérjék expressziójának változását. Az illóolaj-kezelés hatására bizonyos fehérjék, mint például a GroEL és a DnaK, intenzíven aktiválódnak a sejtekben. A GroEL és a DnaK fehérjék a chaperonok azaz a dajkafehérjék családjába tartoznak. A stressz hatására a fehérjék denaturálódnak, aggregálódnak. A dajka fehérjék segítenek a regenerációban. A tioredoxin-1 fehérje azonban lecsökkent a timol hatása miatt. A tioredoxin-1 döntő szerepet játszik a redox egyensúly fenntartásában. Ezáltal csökken a baktérium védekező képessége az oxidatív stresszel szemben (Aljaafari et al., 2021).

Szurokfű illóolajával végzett *in vitro* vizsgálatok során számos lehetséges hatásmechanizmust azonosítottak. Az illóolaj fő illó komponensei többek között a timol, karvakol, linalool és a linalil-acetát. A szurokfű illóolaja 0,015-0,03  $\mu$ l/ml-es koncentrációban képes volt gátolni a *S. aureus* lipáz és koaguláz enzim szintézisét. A szurokfű olaj potenciális szinergista hatását antibiotikumokkal kombinálva az efflux pumpák gátlására, a frakcionált gátló koncentráció index (FICI) mérésével igazolták. A szurokfű olaj ciprofloxacinnal és etidium-bromiddal kombinálva a PmrA efflux pumpa génextpressziójának gátlásával szinergikus aktivitást fejtettek ki a fluorokinolon-rezisztens *S. pneumoniae* klinikai izolátumokkal szemben. Ezenkívül tetraciklin és az illóolaj, karvakrol és timol kombinációja szinergikus hatást fejtett ki a *S. aureus* ellen a TetK efflux fehérje gátlásán keresztül (Soltani et al., 2021). A karvakrol és a timol (azonos delokalizált elektronrendszerrel rendelkeznek) *Bacillus cereus* elleni

antibakteriális mechanizmusának vizsgálatára liposzómális modelleket használtak. A karvakrol károsította a sejtmembránt, és csökkentette a sejtmembrán pH-gradiensét, ami a proton transzportgátlásához, az ATP raktárak kimerüléséhez és a sejthalálhoz vezetett (Khan et al., 2017).

A gazdaszervezetben lejátszódó betegség patogenezisét befolyásolják, a baktérium invazív tulajdonságai és a toxin termelésük. A baktériumok által termelt toxinok (endotoxinok és exotoxinok) patogén baktérium fő virulencia-faktoraiként működnek. A mikrobiális toxinok sokfélesége arra utal, hogy a toxigén mikroorganizmusok megjelenésében összetett evolúciós utak játszanak szerepet. Ezenkívül a bakteriális toxinok többsége a gazdasajt károsításán kívül más ismert fiziológiai szerepet nem játszik a baktériumsejtekben. (Finlay & Falkow, 1997). Biokémiaiilag a bakteriális exotoxinok gyakran fehérjék. Ezek a toxinok felszabadulnak a baktériumsejtből, ami lehetővé teszi számukra, hogy kölcsönhatásba lépjenek a fertőzés helyével vagy a fertőzés fókuszától távoli szövetekkel, és ezt követően különféle mechanizmusok révén károsítsák a gazdaszervezetet (Henkel et al., 2010). A bakteriális toxinok másik nagy csoportja az endotoxinok. A bakteriális endotoxinok a Gram-negatív baktériumok, például az *E. coli*, a *Salmonella*, a *Shigella* és a *Pseudomonas* külső membránjában jelen lévő lipopoliszacharidok. Ezek a toxinok a baktériumsejt lízisét követően szabadulnak fel (Henkel et al., 2010).

A *S. aureus* exotoxinok széles skáláját termeli, amelyek elősegítik patogenezisét a gazdaszervezetben. Ezek közé tartoznak a hemolizinek (alfa, béta, gamma és delta), nukleázok, proteázok és kollagenázok, amelyek közvetlenül segítik a gazdaszövet emésztését a baktériumok táplálása és növekedése érdekében. Ezenkívül a *S. aureus* enterotoxinokat és exfoliatív toxinokat termel, amelyek stresszt fejtenek ki a gazdaszervezet immunrendszerére és a létfontosságú szervekre (Dinges et al., 2000). *In vitro* kísérletek igazolták, hogy szegfűszeg és fahéj illóolajok (fő komponenseik: az eugenol és a fahéjaldehid) csökkentették a *S. aureus* alfa-hemolizin, enterotoxin A és enterotoxin B termelését (Qiu et al., 2010; Smith-Palmer et al., 2004). Ezen túlmenően bizonyították, hogy az eugenol csökkenti a toxintermelő gének expresszióját, beleértve a *sea*, *seb*, *tst* és *hla* géneket, amelyek a *S. aureus* toxintermelésének különböző szakaszait kódolják. Hasonló antitoxin hatást figyeltek meg magas karvakoltartalmú olajok esetében is (de Souza et al., 2010).

Az élelmiszer eredetű kórokozó a *Listeria monocytogenes* egy nem enzimatikus, citolitikus, tiol-aktivált, pórusképző toxint a Listeriolysin O-t termeli. A toxin a



legnagyobb aktivitást 5,5-ös enyhén savas pH-n mutatja (Geoffroy et al., 1987). Ez az érték a fagolizoszómák pH értékének felel meg. A toxin felszakítja a fagolizoszómát, és segíti a kórokozó kijutását és túlélését a citoplazmában. A listeriolizin O-t a hly gén kódolja, és transzkripcióját a PrfA szabályozó fehérje aktiválja (Geoffroy et al., 1987). Különböző növényi vegyületek, mint például a transz-fahéjaldehid, karvakrol és oregánó olajból nyert timol már szub-inhibitor koncentrációban csökkentették a toxint és a szabályozó fehérjét kódoló hly és prfA gének expresszióját. Anélkül, hogy ebben a koncentrációban a vegyületek gátolták volna a kórokozó növekedését (Upadhyay et al., 2012).

### 3.5 A vizsgálatokba bevont növények

#### 3.5.1 Muskotályzsálya (*Salvia sclarea* L.) jellemzése

A zsálya nemzetség fajai az Árvacsalán virágúak rendjén (Lamiales) belül az Ajakosok családjába (Lamiaceae) tartoznak. A muskotályzsálya a növénytani leírások alapján kétéves korától virágzó, de egyes esetekben három vagy több évre is megmaradó lágyszárú faj. Óshonos a Földközi-tenger északi medencéjében, valamint néhány észak-afrikai és közép-ázsiai területen, hazánkban azonban nem. Elnevezését vizsgálva a „clary” a „sclarea” szóból származik, amelynek gyökere „clarus”, ami azt jelenti, hogy tiszta. A muskotályzsálya egész növényét vagy levét hagyományosan a szemnyálkahártyájának tisztítására vagy szembetegségek kezelésére használták. Főzetként inhalálva álmatlanságot, stresszt és depressziót kezeltek vele. Az ízületi gyulladás és a heveny reuma kezelésére a muskotályzsályát leforrázzák, majd a kivonatot a fürdővízhez adják. Vizes kivonatának fogyasztása szélhajtó hatású, segíti az emésztést és étvágyjavító hatású. A muskotályzsályát szokták szájvizekben is alkalmazni, mert antiszeptikus és gyulladáscsökkentő hatással rendelkezik (Mahboubi, 2020). A lepárlás utáni extraktumból előállított szkláreol-ból, amely egy biciklikus diterpén-alkohol, ambroxánt állítanak elő, amelynek kellemes ámbrára emlékeztető illata van. Aromája nem erőteljes, de előszeretettel használják „rögzítőként” a parfümgyártás során. A szkláreol azonban kevésbé illékony, mint a monoterpének és a szeszkviterpének, és szobahőmérsékleten kristályos formában fordul elő. Ezáltal a muskotályzsálya az ámbrára helyettesítésének egy fenntartható alternatívájává vált. A muskotályzsálya illóolajának parfümökben való alkalmazhatóságát azonban nehezíti a jelentős mennyiségben megjelenő szeszkviterpének kissé tolakodó illata, amely rontja az olaj aromáját.

A muskotályzsályából jelenleg leginkább ipari biofinomítási eljárással közvetlenül a betakarítást követően állítanak elő szkláreolt (Laville et al., 2013). A muskotályzsálya biztonságos illóolaj a nőgyógyászati betegségek aromaterápiás kezelésében. A vajúadás elősegítésére muskotályzsálya illóolajat használnak, hogy fokozzák a méh izomzatának összehúzóását. Az édesanyák döntő többsége (86%) hatékony illóolajnak találta, és 70%-uk nem igényelt intravénás oxitocint (Burns et al., 2000). Ösztrogénszerű tulajdonságai miatt menstruációs görcsök esetén a fájdalom csökkentésére használják. A muskotályzsálya olaja tonikként belsőleg fogyasztva a női ciklus szabályozására, izomgörcsök és a méh problémáinak kezelésére alkalmazható (Firenzuoli et al., 2014).

A növény legnagyobb illóolaj-tartalmát teljes virágzáskor éri el. Vízgőz-desztillációval extrahált olaja 45-75%-ban linalil-acetátot, kisebb mennyiségben linaloolt és geranil-acetátot tartalmaz (Csupor & Szendrei, 2012a). A virágzatban található illóolaj összetétele különbözik a levélben található illóolajtól. Ennek a különbségnek az egyik lehetséges oka, hogy a különböző növényi részek eltérő típusú mirigyszőröket tartalmaznak. Azonban az összetételbeli különbségeket a növény földrajzi elhelyezkedése is meghatározza (Acimovic et al., 2018). A muskotályzsálya olaj (*Salviae sclareae aetheroleum*) hivatalos drog a Magyar Gyógyszerkönyvben (Ph. Hg. VIII.), amely a növény friss vagy szárított, virágzó hajtásaiból vízgőz-desztillációval nyert illóolaj.

A szakirodalomban ritkák a cikkek, amelyek a muskotályzsálya SFE extrakcióját tanulmányozzák. Kutatócsoportunkat megelőzően nem található olyan tanulmány, ami a muskotályzsálya SFE extraktumok antibakteriális hatását vizsgálta volna. Az összetételre vonatkozó vizsgálatok azt mutatták, hogy beállítási paraméterek függvényében a fő komponens arányok jelentősen változhatnak SFE extrakció alkalmazásával. Vízgőz-desztillációt alkalmazva általában a legnagyobb arányú komponens a linalil-acetát. Gohary et al. eredményei alapján az extraktumban linalil-acetát 10,3% volt jelen, linalool pedig 14,9%-ban. A fő komponens esetükben a szkláreol volt (50,0%) (El-Gohary et al., 2020). Azonban itt meg kell jegyezni, hogy a beállítások, nagyon széles skálán tudják változtatni az eredményeket. A muskotályzsálya egyik értékes vegyülete a rozmaringsav, aminek jelentős az antioxidáns hatása. Chadin et al. optimalizálta az SFE extrakciót, aminek eredményeként az extraktumban 8 mg/g rozmaringsav koncentrációt tudtak elérni (Chadni et al., 2023). Zanotti et al. pedig elsőként dolgozott ki egy több lépcsős SFE extrakciós eljárást, amelyben sikerült az illóolaj komponenseket különválasztania a szkláreoltól (Zanotti et al., 2023).

Számos tanulmány foglalkozik a muskotályzsálya különböző komponenseinek fungicid hatásaival. A muskotályzsálya illóolaj fő monoterpenjei a linalool és a linalil-acetát károsítja a plazmamembrán szerkezetét és növeli az áteresztő képességét a *Candida albicans* esetében. Ez az organelumok szivárgásához vezet az intracelluláris térbe, amelynek következtében a sejt elpusztul (Blaskó et al., 2017; Hristova et al., 2015). Azonban szintén ismert a szkláreol rozsdagomba (*Alternaria brassicicola*) ellenes hatása is. A teljes növény acetonos és kloroformos extraktumai gátló hatást mutattak többek között *Byssochlamys ellenfulva*, *Fusarium equiseti* és *Aspergillus* fajok ellen (Gülçin, Uguz, et al., 2004).

Élelmiszer csomagolására papír csomagolóanyagra impregnáltak muskotályzsálya csomagolóanyagot és vizsgálták az antibakteriális hatását agardiffúziós módszerrel. Az eredmények azt mutatták, hogy az olaj Gram-pozitív *S. aureus* és *B. subtilis* baktériumokkal szemben hatékonyabb volt. A Gram-negatív baktériumok esetében *S. abony*-val szemben volt a leghatékonyabb, de *E. coli* és *P. aeruginosa* törzsekkel szemben is mutatott aktivitást. A kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy a muskotályzsálya illóolaj élelmiszerek csomagolásában antimikrobiális szerként használható eltarthatóságának meghosszabbítása érdekében (Kostova et al., 2020). Különböző *Staphylococcus* fajokon vizsgálták a muskotályzsálya illóolajának MIC értékeit, az illóolaj fő összetevői a következők voltak: linalil-acetát (57,9%), linalool (12,4%),  $\alpha$ -pinén (4,5%),  $\alpha$ -terpineol (3,5%), szabinén (3,3%). Jelentős antibakteriális hatás jelentkezett a *S. aureus* klinikai izolátumaival szemben: MIC 3,75-7  $\mu$ l/ml. A meticillin-rezisztens (MRSA) és meticillin-érzékeny (MSSA) patogének esetében is jelentős gátló hatást tapasztaltak: MIC 3,75-5,25  $\mu$ l/ml, illetve 3,75-6,25  $\mu$ l/ml koncentrációban már gátolta a *S. sclarea* a baktériumok növekedését (Kuzma et al., 2007; Sienkiewicz et al., 2015). A kísérlet során a legkevésbé érzékeny *Staphylococcus* törzs a muskotályzsályaival szemben a *S. xylosus* volt: MIC 6,25-7,0  $\mu$ l/ml. A *S. sclarea* különböző oldószerekkel készült extraktumainak antibakteriális hatását is vizsgálták. A muskotályzsálya diklórmétánnal készült kivonata gátolta a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* növekedését MIC 37,5-150  $\mu$ g/ml koncentrációban. Az *E. coli*, a *P. aeruginosa* és a *C. albicans* törzseket kissé magasabb, 150  $\mu$ g/ml koncentrációban gátolta az extraktum. A kloroformmal és acetonnal készült zsályakivonattal szemben 30  $\mu$ g/korong koncentrációban a *S. aureus*, a *Listeria monocytogenes* és az *E. coli* törzsek esetében nem tapasztaltak gátló hatást (Kuzma et al., 2009; Raffa et al., 2005).

### 3.5.2 Kerti kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.) jellemzése

A *Thymus vulgaris* L. vagy ismertebb nevén kerti kakukkfű a Lamiaceae családba tartozó évelő, virágos növény. A Lamiaceae család tagjaként a *Thymus* nemzetség összesen 928 fajt foglal magába. A *Thymus* fajok osztályozása a kromoszómális információk alapján történik, amely a taxonómia meghatározásának fontos lépése. Ugyanis morfológiájuk sok esetben nagyon hasonló. A 'thym' görög eredetű szó, amelynek jelentése „füstölés”. Balzsamos illata miatt tömjénnel együtt égették. Eredetileg a mediterrán régióban őshonos, ma már világszerte termesztik. A növény jól fejlődik száraz meleg éghajlaton, sziklás és homokos jó vízelvezetésű talajban is, amely általában sok növény számára alkalmatlan (Rizwan, 2021). A kakukkfű egy aromás, évelő, egyenes növekedésű növény, 10-30 cm magas, elfásodó szárral rendelkezik. Félgömb alakú bokrokat formáló félcserje. Levelei kicsik, ellentétesen nőnek a száron, szürkészöld színűek, ovális alakúak és mirigyek találhatók a felületén. Levelei 5-10 mm hosszúak és 0,8-2,5 mm szélesek. Virágai fehér vagy világos lila színűek, június és július között virágzik. Illata függ illóolajának kémiai összetételétől. A közönséges kakukkfű természetes populációiban kémiai polimorfizmust mutat. A mediterrán élőhelyeken hat alapvető kemotípust írtak le illóolajának fő összetevői alapján: timol, karvakrol, linalool, geraniol,  $\alpha$ -terpineol, thujanol-4, amelyek közül a timol kemotípust széles körben alkalmazzák tradicionális gyógynövényként és fűszernövényként (György et al., 2020).

A hagyományos gyógyászatban széleskörben alkalmazták. A növény megfelelő bizonyos gyomor-bélrendszeri rendellenességek kezelésére. Vizsgálatok igazolták parazitaellenes/féreghajtó hatását, ami a monoterpének és fenolos vegyületek jelenlétének tulajdonítható (Isakakroudi et al., 2018). Továbbá helyi érzéstelenítőként alkalmazva olaja csökkentette a reumás fájdalmakat és az isiászt. Ez a fájdalomcsillapító tulajdonság főként a timolnak köszönhető, amely a legkiemelkedőbb gyulladáscsökkentő potenciállal rendelkezik az összes vizsgált komponens közül. Ezen kívül alkalmazták bőrfertőzések, magas vérnyomás, szívproblémák, folyadékviszatartás, hólyaghurut, emésztőrendszeri betegségek és ízületi gyulladások kezelésére (Patil et al., 2021).

Az illóolajok összetételét számos tényező befolyásolhatja: környezeti tényezők, vegetációs időszak, gyűjtési technika, desztillációs eljárás, kemotípus és a begyűjtött gyógynövényi részek is (Farhat et al., 2019; Pluhár et al., 2016). Ezért különböző tényezők módosíthatják a főbb vegyületek mennyiségét, emellett a biológiai aktivitás megváltozásához is vezethet. A legjobb terméshozam és a megfelelő antibakteriális hatás érdekében tehát szükséges a környezeti feltételek és a mikrobiológiai potenciál közötti

összefüggés tisztázása is. Ez alapján a különböző fenofázisban gyűjtött kakukkfű minták illóolajának kémiai összetételének és antibakteriális hatásának pontos meghatározása megkérdőjelezhetetlen. Mivel hazánkban a kakukkfű termesztése egyre népszerűbb, további hasznosításához értékes adatokkal szolgálhat a magánterületeken termesztett növény tudományos értékelése. Az ezzel kapcsolatos vizsgálatot, mint később olvasható a dolgozatban, kutatócsoportunk elvégezte.

A kakukkfű olajok közül a legtöbb preklinikai vizsgálatot *Thymus vulgaris* L.-val végezték. Mivel illóolaj-összetételük hasonló, ezért az eredményeket a másik két fajra is vonatkoztatják, amit a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv tartalmaz (*Thymus serpyllum* L. és *Thymus zygis* L.). A bélből felszívódó és tüdőben kiválasztott illóolaj-komponensek okozzák a szekretomotoros hatást. Kakukkfű hatására a bronchusok nyákszekréciója fokozódik és a pharynx csillóinak mozgása fokozódik. Egy másik vizsgálat során, tengeri malac ileumon és tracheán vizsgálták a kakukkfűben található timol és karvakol hatását. A vegyületek gátolták az acetyl-kolin, hisztamin és egyéb hasonló anyagok által kiváltott kontrakciót (Csupor & Szendrei, 2012b).

A *Thymus* fajok antibakteriális (Ács et al., 2018) és antioxidáns hatását (Petrović et al., 2017) korábban több publikáció is említette, valamint gyulladáscsökkentő képességüket (Hotta et al., 2010). A hat kemotípus közül a timol a legelterjedtebb a természetes élőhelyeken (Pluhár et al., 2016). A kakukkfű fő komponense a timol (10-64%) és a karvakol, amelyeknek jelentős szerepe van a növény antibakteriális hatásában (Tisserand & Young, 2014). A fő vegyületek mellett, más kisebb %-ban jelen lévő vegyületeket ( $\alpha$ - és  $\gamma$ -terpinent, linaloolt, kámfort stb.) azonosítottak szabad gyökfogóként, antibakteriális, antifungális ágensként vagy lipid-peroxidáció gátlóként (Hossain et al., 2022).

## 3.6 Modellbaktériumok jellemzése és jelentősége

### 3.6.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A *P. aeruginosa* egy fontos és gyakran előforduló, nem fermentáló pálcá alakú Gram-negatív baktérium. Gyakran izolálják növényekből, gyümölcsökből, talajból és vízi környezetekből, például folyókból, tavakból és úszómedencékből. Különleges körülmények között a *P. aeruginosa* azonban gyakran okoz súlyos és főleg opportunistá fertőzéseket emberben. Jellemzően a légutakat és a húgyutakat fertőzi, véráramfertőzést okoz. De gyakran okoz gondot gyulladt égési sérüléseknél és a külső hallójárat

fertőzéseinek leggyakoribb oka. A *P. aeruginosa* az orvostechnikai eszközök (katéterek, porlasztók, párástók) felületén kolonizálódik, és multidrog-rezisztens nozokomiális infekciókat okoz, mint például a lélegeztetőgéppel összefüggő tüdőgyulladás, meningoencephalitis és szepszis (Bassetti et al., 2018). A *P. aeruginosa* fertőzések kezelése nehézségekbe ütközik az antibiotikumokkal szembeni természetes és szerzett rezisztenciája miatt (Mielko et al., 2019).

A cisztás fibrózis a leggyakoribb autoszomális recesszív öröklött genetikai betegség, amelyben a gazdaszervezet immunválasza sérült. A bakteriális fertőzés előfordulása az életkorral növekszik, a betegség utolsó szakaszában a felülfertőződés elérheti a 80%-ot. Számos tanulmány kimutatta, hogy ez a fertőzés a tüdő-exacerbáció és a kórházi kezelések gyakoriságának növekedéséhez vezet a betegség gyorsabb progressziója mellett. Visszafordíthatatlan és destruktív változásokhoz vezet a légzőrendszerben, és ennek következtében krónikus légzési elégtelenséget okoz (Mielko et al., 2019). A *P. aeruginosa* patogeneziséhez hozzájárul, hogy intracelluláris és extracelluláris virulencia faktorok hatalmas repertoárjával rendelkezik (pl.: endotoxin, exotoxin és proteolitikus enzimek), és hihetetlenül összetett, egymással összefüggő szabályozó jelátviteli rendszerek szabályozzák, amelyek nagy plaszticitást adnak ennek a kórokozónak (Jurado-Martín et al., 2021).

Aggodalomra ad okot, hogy a baktériumok multidrog-rezisztenciája egyre több problémát okoz a nozokomiális fertőzések során. A WHO a karbapenem-rezisztens *P. aeruginosa*-t elsődleges prioritású, azaz „kritikus” kórokozóként jelölte meg, amellyel szemben minél előbb új terápiákra van szüksége a rezisztencia küszöbön álló közegészségügyi válságának leküzdésére.

A *P. aeruginosa* magas szintű természetes rezisztenciája a korlátozott külső membrán permeabilitáson (körülbelül 12-100-szor alacsonyabb, mint az *E. coli* esetében), aktív transzportban résztvevő fehérjéken vagy fehérje-komplexeken (efflux pumpák) és az antibiotikumokat inaktiváló endogén enzimek termelésén alapszik. Az enzimek segítségével képes módosítani az antibiotikumokat vagy célpontjaikat (Utchariyakiat et al., 2016). A szerzett rezisztencia-mechanizmusok vagy horizontális géntranszferből (pl.: aminoglikozid antibiotikum módosító és  $\beta$ -laktamáz enzimek szintéziséhez szükséges genetikai képesség megszerzése), vagy mutációs eseményekből fakadnak, amelyek az efflux pumpák vagy a  $\beta$ -laktamáz enzimek túlzott expressziójához vezet. *P. aeruginosa* biofilmjén megfigyelték, hogy a  $\beta$ -laktamázok részben membránvezikulákon keresztül választódnak ki, összhangban extracelluláris

elhelyezkedésükkel (Fernández-Billón et al., 2023). Az antibiotikumos kezelés a gyógyszercélpontok és porinok (passzív transzportozóhoz kapcsolódó fehérjék) expressziójának csökkenéséhez vagy szerkezetük módosulásához vezethet. A porinok számának csökkenésével lassítható az antibiotikum beáramlása a baktériumba. A gyógyszer molekulák aktív eltávolítása a periplazmatikus térbe pedig efflux pumpák segítségével történik. Az adaptív rezisztencia mechanizmusokat külső ingerek (például túlzott antibiotikum-expozíció) indukálják (Kunz Coyne et al., 2022).

A rugalmas biofilm kritikus fegyver a *P. aeruginosa* esetén, hogy versenyezzen, túléljen és uralkodjon a cisztás fibrózisos tüdő polimikrobiális környezetben. A *P. aeruginosa* emellett hatékonyan kolonizál számos felületet, beleértve az orvosi anyagokat (húgyúti katéterek, implantátumok, kontaktlencsék stb.) és élelmiszeripari berendezéseket (keverőtartályok, kádak és csövek) (Thi et al., 2020).

Amikor a *P. aeruginosa* baktériumsűrűség a biofilmben eléri egy küszöbszintet, aktiválódik a bakteriális quorum sensing (QS) rendszer. A QS egy bakteriális sejt-sejt kommunikációs rendszer, amely diffundálható jelmolekulákra támaszkodik. A *P. aeruginosa* QS molekulákat használ saját viselkedésének szabályozására, mint például a biofilm érzékelése, mozgékonyasága és virulenciafaktor expressziója. A *P. aeruginosa*-t tesztbaktériumként használva több tanulmány is bizonyította, hogy a baktérium által kiválasztott molekulák egy úgynevezett quinolon jelátviteli rendszert alkotnak (Lin et al., 2018). Ez a jelátviteli rendszer befolyásolja a biofilm képződést. Ezek a jelátviteli rendszerek globális szabályozó hálózatot hoznak létre, és úgy gondolják, hogy a *P. aeruginosa* genom akár 12%-ának expresszióját is szabályozzák. A bioszintetikus quinolon molekulákat kódoló gén delécioja miatt a *P. aeruginosa* hibás biofilmet képezett, és nem tudta kialakítani a vadon élő baktériumokra jellemző érett biofilm gombaszerű szerkezetét (Li et al., 2023).

### 3.6.2 Meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA)

A *P. aeruginosa*-hoz hasonlóan a *Staphylococcus aureus* is gyakori oportunista kórokozó, amely egy átlagos populációban az emberi orrnyálkahártyán 20-40%-ban megtalálható (Becker et al., 2017). A Gram-pozitív baktérium által okozott krónikus betegségek nagyon széles spektrumon mozognak, az egyszerű ételmérgezésről a halálos kimenetelű, súlyos fertőzésekig (Van Hal et al., 2012). A *S. aureus* bakteriémia előfordulási aránya évi 20-50 eset/100 000 ember, és ezeknek a betegeknek 10-30%-a belehal a fertőzésbe. Egy 2017-ben készült tanulmány szerint az Egyesült Államokban a

*S. aureus* bakterémia miatti elhalálozások éves száma 20 000 fő (Kourtis et al., 2019). Egyre több adat van a SARS-CoV-2 betegek antibiotikum-rezisztens bakteriális eredetű kombinált fertőzéseiről. 2021-ben New York-ban 4221 SARS-CoV-2 tüdőgyulladásban szenvedő felnőtt beteg közül 472 beteg (11,1%) produkált pozitív légúti tenyészetet. Ezeknél a betegeknél az MRSA a légzőszervi szövetekről származó tenyészetekben a felvételt követő 3. napon mért 0,6%-os alacsony értékről 28. napon 5,7%-ra emelkedett. Az MRSA súlyos SARS-CoV-2 esetekben gyakori nozokomiális fertőzéssé vált. Különösen magas volt a szám a gépi lélegeztetésre szoruló betegek esetében (O'Toole, 2021). A pandémia következtében világszinten ugrásszerűen nőtt a hospitalizált betegek körében a kórházban szerzett antibiotikum-rezisztens fertőzések száma, ami csak még sürgetőbbé tette az antibiotikum-rezisztenciához kapcsolódó kutatásokat.

Az MRSA rezisztenciát mutat a béta-laktámokkal szemben. A *mecA* gén, kódolja a PBP2a nevű penicillin-kötő fehérjét. Ez a fehérje azért kritikus, mert a béta-laktám típusú antibiotikumok, mint például a penicillinek, cephalosporinok, valamint a karbapenemek általában ezekhez a penicillin-kötő fehérjékhez kapcsolódnak a baktériumsejtek falán, hogy gátolják a sejtfal építését és fenntartását, ami elengedhetetlen a baktériumok túléléséhez és proliferációjához. Amennyiben a fehérje szerkezete módosul, nem lesz képes kapcsolódni antibiotikumokhoz, ezáltal biztosítja a baktériumok ellenállóságát a béta-laktámokkal szemben. Ezalól kivételt képeznek az 5. generációs cephalosporinok (Algammal et al., 2020). Genetikailag rendkívüli rugalmasságot nyújt a *S. aureus*-nak az ún. „kazettás szerkezetű” SCCmec kromoszóma felépítés. Egy mobil genetikai elemet kódol, amelyet a baktériumok horizontális géntranszferrel adnak át egymásnak. A *mecA* vagy *mecC* géneket az SCCmec kódolja, átadást követően a baktérium rezisztenssé válhat a meticillinnel és a legtöbb  $\beta$ -laktám gyógyszerrel szemben, kivéve a ceftarolint és a ceftobiprolt (Chambers & Deleo, 2009). Szerkezetileg fontos szerepet játszik az MRSA biofilmképző képessége, mivel a baktériumsejtek nagyon közel helyezkednek el egymáshoz. Ez felgyorsítja a rezisztenciát hordozó gének átvitelét horizontális géntranszfer segítségével. Az MRSA azon képessége, hogy biofilmet képez, megnehezíti a csontokat, ízületeket és protéziseket érintő fertőzések kezelését. Jelenleg a vankomicin az elsődleges terápia, de a molekula csontpermeabilitása gyenge, ezért magas, 35-46%-os a sikertelen terápia aránya (Turner et al., 2019).

A linezolid egy kémiai szintetikus oxazolidinon, amely antibakteriális szerként fejti ki hatását a *S. aureus* ellen azáltal, hogy a riboszómák 50S alegységének 23S részéhez kötődve gátolja a bakteriális fehérjeszintézist. A linezolid erős antimikrobiális



hatást fejt ki az MRSA ellen. Az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) jóváhagyta az MRSA-val összefüggő nozokomiális tüdőgyulladás kezelésére. A vankomicinnel ellentétben a linezolid hatékonyabbnak bizonyult, azonban linezolid (14 napon túl) elhúzódo alkalmazása három komolyabb mellékhatást is eredményezett: 1. Jelentős thrombocytopenia, ezért linezollal kezelt esetekben a heti teljes vérkép elengedhetetlen. 2. Mitokondriális diszfunkció, amelyet tejsavas acidózis és neuropátia okoz. 3. Szerotonin toxicitás, mivel a linezolid nem erős monoamin-oxidáz inhibitor (Algammal et al., 2020). A multidrog-rezisztens baktériumok ellen fejlesztett vegyületek esetében nem csupán a hatékonyságot kell szem előtt tartani, hanem lehetőségeinkhez mérten vissza kell szorítanunk a vele járó mellékhatásokat.

### 3.6.3 *A Haemophilus influenzae és a H. parainfluenzae*

A *Haemophilus* nemzetségbe sok faj tartozik, amelyek diverzifikált betegségeket képesek okozni mind emberben mind pedig állatokban. Ami közös ezekben a fajokban, hogy hasonló a morfológiájuk, illetve növekedésük és szaporodásuk során szükségük van vérbő származó faktorokra. A nemzetség innen kapta a nevét. Gram-negatív coccobacilusok, amelyek tokot képeznek. Tenyészetükben előfordulnak hosszú fonalak, de spórájuk, csillójuk nincsen.

A *H. influenzae*, eredetileg Pfeiffer bacilusnak nevezték felfedezőjéről, Richard Pfeifferről 1892-ben. A 20. század első felében komoly egészségügyi kockázatot jelentett a világ lakossága számára. Gyermekkori tüdőgyulladást és invazív betegségeket, valamint középfül-gyulladást és egyéb felső légúti fertőzéseket okozott. A *H. influenzae*-t hagyományosan poliszacharid sejtfall szerkezete alapján osztályozták. Ez alapján hat szerotípust tudunk megkülönböztetni, amelyeket a-tól f-ig jelölnek. Illetve vannak nem tipizálható baktériumok, amelyekben a poliszaharid tok teljesen hiányzik. A *H. influenzae* fő toktípusát célzó Hib (*H. influenzae* type b) vakcina bevezetése majdnem felszámolta a betegséget azokban az országokban, amelyek alkalmazták az oltási rendszert. A fertőzések növekvő számát nem a b típusú *H. influenzae* okozza, hanem a nem tipizálható *H. influenzae*, amelyekben nincs tok és ezért a vakcina nem nyújt ellene védelmet. Az elsővonalas kezelés ampicillin, de az ampicillin-rezisztencia folyamatosan növekszik. Ez mind a szerzett, mind a belső mechanizmusok eredménye. Komoly aggodalomra ad okot, és fokozottabb felügyeletre van szükség. Egyre több tanulmány készül az intrinsic ampicillin-rezisztencia mechanizmusának új módosításairól. Ezek ellenállóvá teszik a baktériumot a cefalosporinokkal és karbapenemekkel, azaz a jól

tolerálható gyógyszerek utolsó sorával szemben (Heinz, 2018). Az ampicillin a  $\beta$ -laktámok közé tartozik. Hatásmechanizmusuk során megzavarják a Gram-negatív baktériumok sejtfalának bioszintézisét azáltal, hogy megkötik a peptidoglikán alegységeket, a penicillinkötő fehérjéket keresztköti enzimeket (Cho et al., 2014). Bár az első rezisztencia jelentés öt évtizeddel ezelőtt 1972-ben történt (Mathies, 1972), a *H. influenzae* az esetek döntő többségében még mindig jól kezelhető antimikrobás szerekkel. Az első megfigyelt  $\beta$ -laktám-rezisztencia mechanizmusok a blaTEM-1/2 és a bla ROB-1 (Rubin et al., 1981) béta-laktamázok megszerzésén alapultak. A bla-TEM-1 az elterjedtebb gén. A *H. influenzae* képes módosítani makrolid célpontokat, mint pl.: 50S riboszomális RNS és riboszómakötő fehérjék (Peric et al., 2003). Ezt a mechanizmust egészítik ki a mindenütt jelenlévő AcrAB multidrug-efflux pumpák, amelyek alapvetően csökkentik a baktérium érzékenységét (Seyama et al., 2017). A rezisztencia növekvő tendenciája miatt a *H. influenzae* kezelési lehetőségei egyre korlátozottabbak. Az azitromicint, ami egy azalid csoportba tartozó makrolid, széles körben írják fel légúti betegségekkel szemben kifejezetten jó hatékonysággal. Azonban a rezisztencia kialakulásának elkerülése érdekében óvatosságra van szükség a túlhasználat elkerülése érdekében.

A *H. parainfluenzae* egy oportunista Gram-negatív kórokozó, amely jelen van jellemzően az emberi felső légúti és urogenitális traktusban egészséges szervezetben is. Ennek ellenére a transzportált virulenciafaktorok megszerzése és a gazdaszervezet immunrendszerének gyengülése kóros folyamatokat indíthat el. Ezt a baktériumot számos betegség, például: tüdőgyulladás, akut urethritisz, csont- és ízületi fertőzések, akut gastroenteritis fertőzések, epeúti fertőzések, oszteomielitisz, és endokarditisz kórokozójaként is azonosították (Sierra et al., 2020). Az európai országokban főként a  $\beta$ -laktámokra (Faccone et al., 2016), kloramfenikolra (Roberts et al., 1985), kotrimoxazolra, makrolidokra, tetraciklinre (Endimiani et al., 2017) és fluorokinolonokra (López-Hernández et al., 2017) rezisztens törzsek megjelenését dokumentálták. Tekintettel arra, hogy a leggyakoribb szexuális úton terjedő fertőzést okozó kórokozók a *Chlamydia trachomatis* és a *Neisseria gonorrhoeae*, a legtöbb beteget empirikusan kezelik intramuszkuláris ceftriaxon és orális azitromicin vagy doxiciklin kombinációval. A kezeléseket azonban legtöbbször megkezdik a kórokozó tenyésztése és pontos azonosítása előtt. Tehát olyan esetekben is, ahol elkerülhető lenne a túlzott antibiotikum használat. Mivel a *H. parainfluenzae* szintén jelen van a szervezetben, ezzel növekszik az esély a rezisztens törzsek kialakulására (Sierra et al., 2020).

## 4 Anyag és módszer

### 4.1 A felhasznált gyógynövények

#### 4.1.1 Muskotályzsálya (*Salvia sclarea* L.)

A növényi anyag 2019-ben a Naturix24 Ltd.-től (Dransfeld, Németország) került beszerzésre. A cég Európán belül Olaszországból és Dél-Franciaországból importálja a muskotályzsályát (Naturix24, 2019). A növények termesztési és betakarítási folyamatai megfelelnek a Helyes Mezőgazdasági Gyakorlat (Good Agricultural Practice) ajánlásainak. A begyűjtés után a növényt levegőn szárították, és Németországba szállították. A növény szára, levele és virága is feldolgozásra került. A forgalmazó nyilatkozata alapján a szkláreol tartalma viszonylag magas volt, de a vegyület aránya az illóolajban nem haladta meg a 12%-ot.

#### 4.1.2 Kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.)

A *T. vulgaris* L. gyűjtése a virágzás kezdetén (2019. május 23-án), teljes virágzásban (2019. június 6-án) és a virágzási időszak végén (2019. június 12-én) történt. Szigetvár mellett (Magyarország, Baranya megye, koordináták: (46°02060.0000 É, 17°47059.9900 K) található a gyűjtési terület. Az adott évre vonatkozó meteorológiai adatokat a 2. táblázat foglalja össze (KSH, 2023). A három virágzási fenofázis alatt összegyűjtött növényi anyagokat két részre osztottuk, az első felét (friss anyag) azonnal felhasználtuk. A második részletet pedig egy héten keresztül szárítottuk. A szárítási folyamat szobahőmérsékleten (23°C) a PTE GYTK Farmakognóziai Intézet (Pécs, Magyarország) gyógynövény szárítójában történt. A frissen gyűjtött és szárított növényi minták illóolaját vízgőz-desztillációval nyertük ki a Magyar Gyógyszerkönyv VIII. kiadása alapján.

**2. táblázat** Meteorológiai adatok a kakukkfű gyűjtési időszakából

	Május	Június
Maximum hőmérséklet	25,3°C	34,7°C
Minimum hőmérséklet	3,3°C	12,9°C
Csapadékos napok száma	18 nap	12 nap
Lehullott csapadék	152 mm	95 mm
Napsütéses órák száma	202	336

## 4.2 Extrakciók

### 4.2.1 Muskotályzsálya szuperkritikus folyadék extrakciója (SFE)

A 19. században megjelenő szerves szintézisek lehetővé tették szintetikus illatanyagok és gyógyszerhatóanyagok előállítását. Ezek a technológiák megteremtették a mai modern kozmetikai és gyógyszeripar alapjait. Azonban napjainkban a fenntartható folyamatokat preferáló fogyasztók nagy számban utasítják el a szintetikus összetevőket. Előtérbe került a természetes anyagok előállítása innovatív technológiák felhasználásával, a folyamat intenzifikálása és a környezetbarát oldószerek használata (Cvijetko Bubalo et al., 2018). A fejlett országok vezetői pedig egyre nagyobb számban állnak ki ezen törekvések mellett. A SFE egy széles körben kutatott módszer, amely képes lehet megfelelni a fogyasztói preferenciáknak és a hatósági szabályozásnak. Alkalmas lehet több hagyományos eljárás, például a kristályosítás, a szűrés, a desztilláció és a kicsapás helyett. A technológia ipari felhasználásának kutatása a 1970-es évektől erősödött fel és a 80-as években jellemzően iparilag fejlett országokban (USA, Németország, Japán) kezdtek megjelenni az első üzemek (Burger et al., 2019).

A kritikus pont környékén az anyagok olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek használatával csökkenthető a szerves oldószer használata, hatékonyabbá tehető egy folyamat vagy akár molekulák elválasztására is felhasználhatjuk.

A szuperkritikus oldószerek használatának legnagyobb előnye, hogy tulajdonságaik jól ellenőrzöttten befolyásolhatók. A diffúziós együttható, az anyagátadási tényező és az oldószer erősség is befolyásolható két független tényező, a hőmérséklet és a nyomás változtatásával. A szuperkritikus folyadék állapot a folyadék és a gázhalmazállapot között helyezkedik el. Bármely anyag szuperkritikus állapotúnak tekinthető, ha hőmérséklete és nyomása meghaladja a kritikus pontjaikat, amely módosított tulajdonságokhoz vezet: az oldószer viszkozitása inkább a gáz halmazállapothoz áll közelebb, sűrűsége azonban a folyadékéhoz. Diffúziós képessége pedig a két halmazállapot közötti értékeket vesz fel (Manjare & Dhingra, 2019). Az extrahálás után a nyomás csökkentése (az oldóképesség csökkentése révén) lehetővé teszi az extrahált molekulák könnyű visszanyerését a szuperkritikus folyadékból, majd az oldószert újra hasznosíthatjuk. Az SFE előnye, hogy az extraktumokat a lehető legkevesebb számú műveleti lépésen keresztül állítja elő, ami csökkenti a költségeket és jobb energiateljesítményt eredményez.

Számos gáz szuperkritikus folyadékként viselkedik megfelelő körülmények között pl.: etán, metán, etilén stb. Azonban az alkalmazhatóság szempontjából több praktikus tulajdonságot is figyelembe kell vennünk, úgy, mint az alacsony toxicitás és az alacsony szuperkritikus hőmérséklet. Kifejezetten fontos paraméter az extrakciós hőmérséklet hőérzékeny anyagok kinyerése esetén. A globális hatásokat és az egész extrakciós folyamatot figyelembe véve jó alternatívája lehet a hagyományosnak számító oldószeres és vízgőz-desztillációs eljárásoknak (Burger et al., 2019). A kezdeti beruházások ugyan valóban nagyobb forrásokat igényelnek, de összességében költséghatékonyabban működtethető a fent említett konvencionális megoldásoknál. Az SFE ipari méretű megvalósításának szűk keresztmetszete sok esetben a nagyon magas nyomásnak ellenálló egységek felépítésében áll. Illetve a működtetéséhez speciális tudással rendelkező humán erőforrás szükséges.

Természetes anyagok kinyeréséhez az oldószeres széles skáláját kipróbálták már, amelyek fizikai tulajdonságai néha merőben különböznek egymástól (3. táblázat).

**3. táblázat** Oldószeres fizikai jellemzői

<i>Oldószer</i>	$T_{kr}$ (°C)	$P_{kr}$ (bar)	$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	<i>Forráspont</i> (°C)
<i>Víz (H<sub>2</sub>O)</i>	374,096	220	322	100
<i>Szén-dioxid (CO<sub>2</sub>)</i>	31,1	73,8	469	-78,5
<i>Metán (CH<sub>4</sub>)</i>	-82,6	46,0	162	66
<i>Etán (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>)</i>	32,3	48,8	203	-88
<i>Propán (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>)</i>	96,8	42,4	217	-43
<i>Etilén (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)</i>	9,34	50,3	215	-103,8
<i>Propilén (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>)</i>	91,9	46,2	232	-47,7
<i>Metanol (CH<sub>3</sub>OH)</i>	239,6	80,9	272	64,7
<i>Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)</i>	240,9	61,4	276	79
<i>Aceton (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O)</i>	232,8	47,0	278	50,5

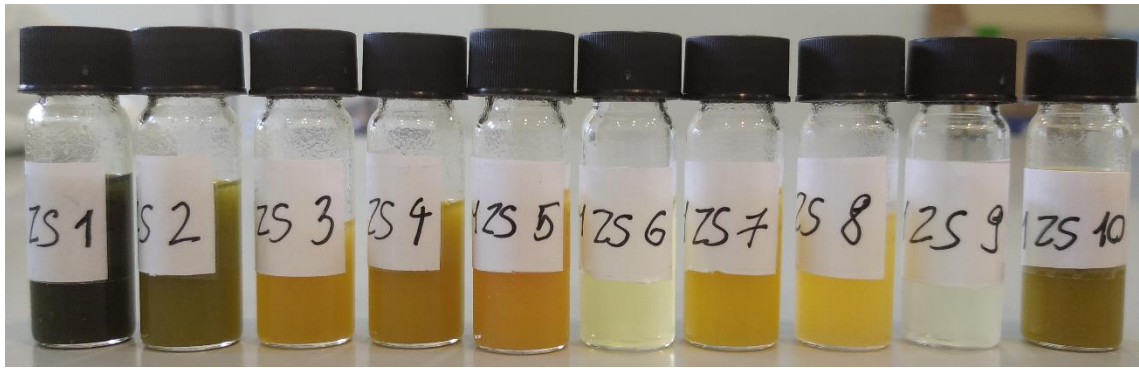
Az oldószer fiziko-kémiai tulajdonságait már a kísérlet tervezésének kezdetén figyelembe kell venni (Wang et al., 2019). A 3. táblázat mutatja, hogy számos oldószer (pl. metanol, etanol stb.) magas kritikus hőmérséklete okán nem alkalmas hőérzékeny anyagok extrahálására. Az etilén a feltüntetett fizikai tulajdonságok alapján például megfelelne a céljainknak, azonban rendkívül gyúlékony. Oldószerként a víz, a CO<sub>2</sub> és az etanol felhasználását egyik iparág sem korlátozza. A szuperkritikus szén-dioxid (SC-CO<sub>2</sub>) egy tiszta apoláris oldószer, amely alkalmas apoláros hőérzékeny vegyületek

kivonására természetes anyagokból (White et al., 2021). Polaritási szempontból leginkább a hexánhoz és a heptánhoz lehet hasonlítani. Azonban használata a szerves oldószereknél jóval biztonságosabb és kevésbé károsítja az egészséget és a környezetet. Az SC-CO<sub>2</sub> hátránya, hogy rendkívül apoláros. Polárosabb komponensek extrakciója esetén segédoldószer (koszolvens) alkalmazásával növelhetjük az oldószer polaritást. A legáltalánosabban használt koszolvens az etanol, bár sok esetben bizonyos extrahált komponensek is segédoldószerként működve növelik az oldószer polaritását (Yu et al., 2021).

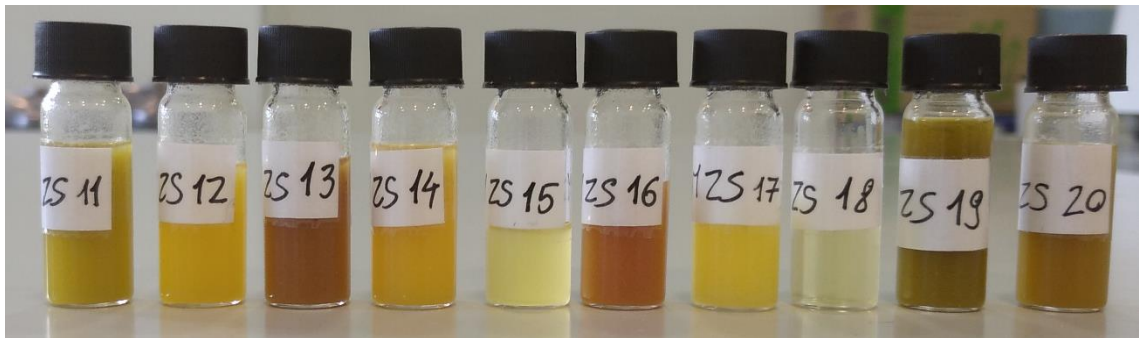
A vizsgálatokat a Pannon Egyetem BKV Kutató Fejlesztő Központjában végeztük. A szuperkritikus folyadék extrakcióhoz 99,97% (w/w) tisztaságú CO<sub>2</sub>-t (Messer Kft.) használtunk.

Az extrakciókat egy SF2000 Able & Jasco készülékkel (Jasco Kft.) végeztük el. Extrakciós edényként 30 cm × 20 mm-es, 94,2 cm<sup>3</sup> térfogatú rozsdamentes acél oszlopot használtunk. Minden mérésnél az oszlopba kb. 22 g aprított, szárított muskotályzsályát töltöttünk be. A bemérés pontos tömegét minden alkalommal feljegyeztük. Mozgófázisként 99,9%-os tisztaságú CO<sub>2</sub>-t használtunk, segédoldószerként pedig abszolút etanolt (Molar Kft.) adtunk hozzá 1-2%-os arányban. Minden extrakció 120 percig tartott, mivel az előzetes kísérletek azt mutatták, hogy az extrakciós hozam két órát követően már nem változott jelentős mértékben. A kivonatokat 15 ml-es centrifugacsövekbe gyűjtöttük, amelyek tömegét feljegyeztük. A mintákat a további feldolgozásig -10°C-on tároltuk.

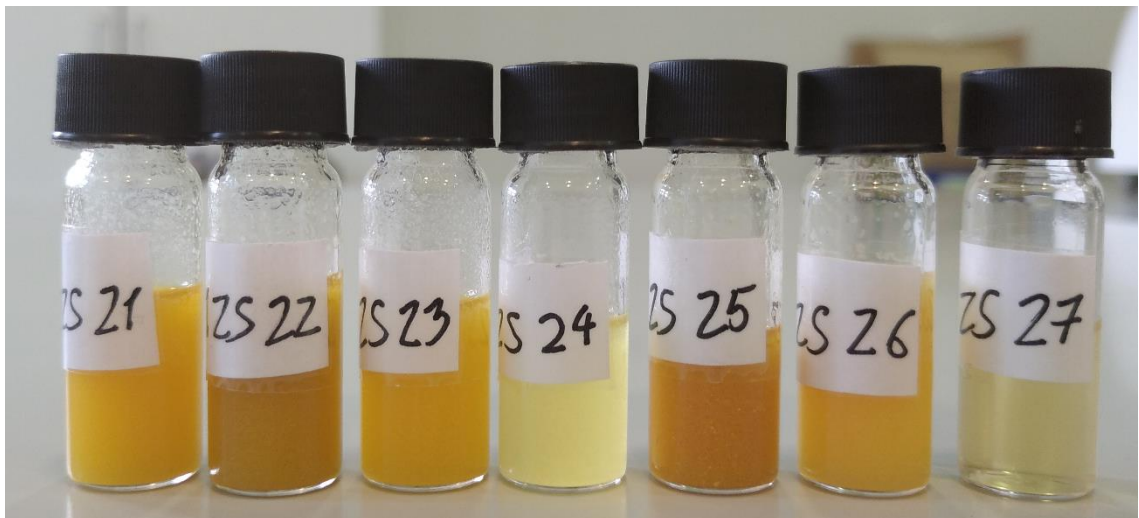
Annak érdekében, hogy a legmagasabb antibakteriális hatást a leghatékonyabb módszerrel elérjük, az extrakciókat a paraméterek folyamatos változtatásával végeztük. A paraméterek meghatározása előzetes szakirodalmi kutatások alapján történt (Fornari et al., 2012; Sovilj M et al., 2011). A hőmérséklet 40-80°C, a nyomás 10-200 MPa, a társoldószer aránya 1-2% volt. Azt, hogy a műveleti paraméterek kismértékű változtatása mennyire különböző extraktumokat eredményezett a 3.-, 4.- és 5. ábrák mutatják be.



**3. ábra** Muskotályzsálya extraktumok 1-10-ig



**4. ábra** Muskotályzsálya extraktumok 11-20-ig



**5. ábra** Muskotályzsálya extraktumok 21-27-ig

#### 4.2.2 Kakukkfű illóolaj kivonása vízgőz-desztillációval

A begyűjtött anyanövényekből az illóolaj desztillálás a Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar Farmakognóziái Intézetében történt. Az illóolajok vízgőzzel könnyen kivonhatók a különböző növényi részekből, ezért az egyik leggyakrabban használt technika a vízgőz-desztilláció. Aprítást követően 100 g herbát mértünk be üveglombikba, majd a mintához 1 liter desztillált vizet adtunk.

A lombik a vízzel és a növényi mintával a fűtőkosárba került. Folyamatos melegítés hatására a vízgőzzel a növényből az illóolaj távozik, majd a hűtött feltéttel érintkezve lecsapódik. A desztillálás során (170°C, 3,30 h) kinyert illóolajat a felhasználásig sötét üvegben 4°C-on tároltuk.

### 4.3 Kísérletek során használt baktériumok tenyésztése

A növényi extraktumok antibakteriális hatását *Haemophilus* spp., (*Haemophilus influenzae* DSM 4690; *H. parainfluenzae* DSM 8978), meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA ATCC 700698), és *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 törzseken vizsgáltuk. A vékonyréteg kromatográfiához kapcsolt direkt bioautográfia (TLC-DB) vizsgálathoz a *Haemophilus* törzseket 100 ml Brain Heart Infusion-t (BHI) (Sigma Aldrich Kft.) 1 ml B-Supplement-et (Diagon Kft.) és 15 µg/ml NAD-oldatot (1 mg/ml) tartalmazó tápközegben növesztettük. Az MRSA-t és a *P. aeruginosát* 100 ml BHI-ban tenyésztettük. Mindegyik baktériumtenyészetet rázóinkubátorban (New Brunswick Scientific Kft.) 37°C-on és 60 fordulat/perc sebességgel, 12 órán át inkubáltuk (Balázs et al., 2019).

### 4.4 Kromatográfiás vizsgálatok

#### 4.4.1 Muskotályzsálya minták etanoltartalmának meghatározása

A gázkromatográfiás vizsgálatokat a PannnonPharma Kft. műszeres analitikai laboratóriumában végeztük el. Az elemzéseket egy Agilent 6890N lángionizációs detektorral felszerelt gázkromatográf (GC-FID) készüléken végeztük, amely TR-WAX (Thermo Fisher Scientific Kft.) kapilláris oszloppal (30 m × 250 µm × 1,0 µm) volt ellátva. A GC kolonnaterének hőmérsékletét 60°C-ról (5 perc izotermikus futást követően) 240°C-ra emeltük 30°C/perc hőmérséklet gradienssel. Majd ismét 5 perc izokratikus szakasz következett. Nagy tisztaságú hidrogént (5,0) használtunk vivőgázként 2,9 ml/perc (29 cm/s) sebességgel, állandó nyomáson. Abszolút etanolt (Molar Kft.) használtuk standardként az etanol csúcs azonosítására a retenciós idő alapján. A FID mennyiségi meghatározásához külső standard technikát alkalmaztunk. 100 mg abszolút etanolt dimetil-szulfoxiddal (Molar Kft.) hígítottunk, így törzsoldatként 10 mg/ml végkoncentrációt kaptunk. A kalibrációs görbe a 0,5-2,0 mg/ml tartományt fedte le.



#### 4.4.2 Kakukkfű illóolaj minták elemzése GC-MS és GC-FID technikák segítségével

A mérésekben az olaszországi Messinai Egyetem kollégái nyújtottak segítséget számunkra. A mintákat (10 µL) 990 µl n-heptánban (1:100 hígítás) szolubilizáltuk (Merck Kft.), majd GC-MS és GC-FID rendszerbe injektáltuk a teljes azonosítás és mennyiségi meghatározás érdekében. A terpén és terpenoid vegyületek elválasztását és azonosítását egy GCMS-QP2020 műszerrel (Shimadzu Kft.) végeztük, amely 280°C-on split-splitless injektorral és AOC-20i automatikus mintavevővel volt felszerelve. Az analitok elkülönítésére egy nem poláris kapilláris oszlopot, nevezetesen SLB-5ms 30 m × 0,25 mm ID × 0,25 µm (Merck Kft.) használtunk. A kvantitatív elemzéseket GC-2010 műszerrel (Shimadzu Kft.) végeztük, amely split-splitless injektorral (280°C), FID detektorral és AOC-20i automatikus mintavevővel volt felszerelve. A kromatográfias körülmények a következő paramétereket tartalmazták: térfogatinjektálás: 0,5 µL split módban (1:10) és hőmérsékleti program: 50°C-300°C 3,0°C/perc sebességgel. Héliumot használtunk vivőgázként 30 cm/s-os lineáris sebességgel. Az MS paraméterek a következők voltak: tömegtartomány 40-550 amu; ionforrás hőmérséklete: 220°C; és interfész hőmérséklet: 250°C. A FID detektor paraméterek: 300°C-ra beállított detektor hőmérséklet (mintavételi sebesség 40 ms), a gázáramlás 40 ml/perc volt hidrogénnél, 30 ml/perc make up gáznál (nitrogén) és 400 ml/perc levegőnél. Az adatgyűjtéshez és -feldolgozáshoz a GCMS solution szoftvert (4.50 Shimadzu verzió) használtuk. FFNSC tömegspektrum könyvtárat (4.0 verzió, Shimadzu) használtuk a vegyület azonosítására. Két különböző azonosítási paramétert, nevezetesen az MS spektrális hasonlóságot és a lineáris retenció index (LRI) megfelelést alkalmaztuk (Pandur et al., 2022). A C7-C40 telített alkánokat használtunk az LRI-k kiszámításához. Standard keverék koncentrációja: 1000 µg/ml, minden komponenst hexánban (Merck Kft.) oldottunk. A GC-FID elemzéseket a LabSolution szoftverrel (5.92-es verzió, Shimadzu Kft.) végeztük és dolgoztuk fel. Minden mintát három egymást követő futtatás során elemeztünk az adatok pontosságának növelése érdekében (Micalizzi et al., 2020).

#### 4.5 Vékonyréteg kromatográfia – Direkt bioautográfia (TLC-DB)

A bioautográfia egy kromatográfias elválasztás nélkül vagy egy planár kromatográfias elválasztást követően is alkalmazható detektálási módszer, amely többek között komplex kivonatok antimikrobás hatásának vizsgálatára ad lehetőséget (Nagy et al., 2002). A mikrobiológiai kísérleteket a PTE KK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetében végeztük el.

A muskotályzsálya minták esetében kizárólag kromatográfias kifejesztés nélkül végeztük el a vizsgálatot, mivel a teljes extraktum antibakteriális hatását vizsgáltuk. A kakukkfű esetében az antibakteriális hatást vékonyréteg-kromatográfias elválasztás nélkül és vékonyréteg-kromatográfias elválasztás után is tanulmányoztuk (Balázs et al., 2019; Jesionek et al., 2017). Kakukkfű illóolajok esetében az elválasztás nélküli vizsgálat során kiválasztottuk az antibakteriális hatás szempontjából leghatékonyabb mintákat. Csak a legnagyobb aktivitású olajokkal végeztünk további vizsgálatokat, ezért csak friss növényi anyagokból desztillált kakukkfű olajokat vontunk be a TLC elválasztáshoz kapcsolódó bioautográfias kísérletekbe. A kromatográfiát 10x10 cm-es szilikagél 60 F<sub>254</sub> alumíniumlemezes vékonyréteg lemezeken (Merck Kft.) végeztük.

Muskotályzsálya minták esetén: mivel az extraktumok etanoltartalma eltérő volt, oldószertartalmukat GC-FID segítségével meghatároztuk. A kloroformos hígítás során korrigáltunk az eltérő koncentrációkkal, így a felvitt mintaoldatok koncentrációja minden esetben 10 mg/ml volt. 3,0 µL-t csepegtettünk fel a vékonyréteg-kromatográfias lemezre, az oldószer kontrollja kloroform és abszolút etanol (Molar Kft.) volt. Pozitív kontrol vankomicin (Pharmacologic) volt MRSA ellen (törzsoldat: 50 mg/ml; 0,6 µl-t vittünk fel a lemezre), gentamicin (Sandoz) pedig *P. aeruginosa*-val szemben (törzsoldat: 80 mg/2 ml; 0,75 µl-t vittünk fel a lemezre). Vékonyréteg-kromatográfias elválasztásra nem került sor, azért, mert ebben a kísérletben a teljes extraktum antibakteriális hatására voltunk kíváncsiak.

Kakukkfű minták esetén: a mintákat abszolút etanolban oldottuk (a törzsoldat 200 mg/ml volt), és 1,0 µl-t vittünk fel a vékonyréteg-kromatográfias lemezre Finnpipette pipettákkal (Merck Kft.). Az abszolút etanol volt az oldószer kontroll, és antibiotikumokat használtunk pozitív kontrollként. *Haemophilus* törzsek esetén ceftriaxont (Hospira, törzsoldat: 40 mg/ml), *P. aeruginosa* ellen gentamicint (Sandoz, törzsoldat: 40 mg/ml) alkalmaztunk. Az antibiotikus oldatokból 1-1 µl-t vittünk fel a TLC lemezre. A TLC elválasztás során a timol, mint a kakukkfű illóolaj

főkomponensének antibakteriális aktivitását is vizsgáltuk TLC-DB segítségével. A timolt (Spektrum-3D Kft.) abszolút etanolban (20 mg/ml) oldottuk. A törzsoldatból 0,2 µl-t (4 µg) vittünk fel a lemezekre. A minta felvitele után a TLC lemezeket toluol:etil-acetát (95:5 v/v) mozgófázissal fejlesztettük ki (Horváth et al., 2018). A kromatográfias kifejllesztést eluenssel történő telítést követően ikervályús kamrában (Camag Kft.) és szobahőmérsékleten (22°C) végeztük. A vékonyréteg-kromatográfias elválasztás után az adszorbens rétegeket biztonsági fülke alatt 5 percig szárítottuk, hogy az eluent teljesen eltávolítsuk. A kakukkfű illóolajok vegyületeinek megjelenítésére etanolos vanillin-kénsav reagenst használtunk. Az elválasztott vegyületeket a standard R<sub>f</sub>-értéke és színe alapján detektáltuk. A vékonyréteg-kromatográfias lemezeket 254 nm-es UV fényben is értékeltük. A bioautográfias vizsgálatra szánt TLC lemezeket nem kezeltük etanolos vanillin-kénsav reagenssel, mert ez a lépés zavarja a TLC-DB mikrobiológiai lépéseit.

Kakukkfű illóolaj vizsgálata esetében az elválasztott komponensek detektálása is megtörtént (ezzel szemben a zsálya extraktum esetében összillóolaj vizsgálatokat kivitelezünk). Az összillóolaj rétegeket, valamint az előhívás nélküli, kakukkfű illóolaj-tartalmú kifejllesztett rétegeket 100 ml-es baktériumszuspenzióba mártottuk ( $4 \times 10^7$  CFU/ml), figyelve a lemezek egyenletes impregnálására. Merítés után a rétegeket egy alacsony falú vízszintes kamrába helyeztük (kamra mérete: 20 x 14,5 x 5 cm), és 4 órán át 37°C-on inkubáltuk. Az antibakteriális hatást jelző, feltisztulási zónák láthatóvá tétele érdekében a vékonyréteg-kromatográfias lemezeket 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid (MTT, 0,05 g/75 ml) (Sigma Aldrich Kft.) vizes oldatába merítettük, 5 másodpercig, majd 37°C-on 12 órán át inkubáltuk. A TLC lemezen a metabolikusan aktív baktériumok az MTT-t formazán festékké alakították. A kékes-lila háttér előtt fehér foltok (minták gátlási zónái) a dehidrogenáz enzim aktivitásának hiányát jelezték, a vizsgált minták vagy fő vegyületük antibakteriális aktivitása miatt (Siddiquee et al., 2023). Az elválasztás nélküli minták gátlási zónáit (mm-ben kifejezve) a Motic Images Plus 2.0 programmal (2.0 verzió, Motic Kft.) mértük meg. A kakukkfű illóolaj mintákat vittük tovább checkerboard titrálásos vizsgálatra, mert a muskotályzsálya extraktumok az extrakció során koszolvensként alkalmazott etanolt tartalmaztak, amely befolyásolhatja a vizsgálat eredményét.

#### 4.6 MIC meghatározás mikrodilúciós módszerrel (BMD)

A TLC-DB eredmények alapján csak a friss növényi anyagokból desztillált kakukkfű illóolaj mintákon végeztük el, mikrodilúciós módszer segítségével ezt a vizsgálatot. Valamint a biofilmgátló hatást vizsgáló kísérleteket.

Törzsoldat készítése során egy a kakukkfű illóolajából és Brain Heart Infusion-t (BHI) (Sigma Aldrich Kft.) álló emulziót hoztunk létre. Emulgeálószerként Tween40-et (Sigma Aldrich Kft.) használtuk 1%-os koncentrációban. Kísérleteinkben a Tween40 1%-os oldat formájában történő alkalmazása, mint emulgeálószer kontroll nem mutatott gátló hatást (Kerekes et al., 2019).

A MIC értékeket mikrodilúciós teszttel határoztuk meg (Ács et al., 2018). Ehhez a vizsgálathoz 96 lyukú mikrotiterlemezeket használtunk. Mindegyik baktériumoldatból ( $10^5$  CFU/ml) 100  $\mu$ l-t mértünk a lyukakba. Az illóolajok törzsszuspenziójának koncentrációja 3, 3,5 vagy 5 mg/ml volt. A 3 mg/ml törzsoldatok közül a *Haemophilus* spp. ellen a fővirágzás és a virágzás végén gyűjtött mintákból kivont illóolajból készített szuszpenziókat használtuk, *P. aeruginosa* ellen pedig a virágzás kezdetén gyűjtött mintákból kivont illóolajból előállított szuszpenziót. A *P. aeruginosa* ellen 3,5 mg/ml koncentrációjú szuszpenziót használtunk a virágzás végi kakukkfű olaj mintából. 5 mg/ml koncentrációjú virágzás kezdetén gyűjtött kakukkfűből kivont illóolaj szuszpenziót használtunk a *Haemophilus* spp. ellen. Minden szuszpenziót BHI-ben állítottunk elő 1% Tween40 emulgens felhasználásával. Majd felező hígítási sorozatokat készítettünk. A legalacsonyabb koncentrációk: 0,0468 mg/ml 3 mg/ml szuszpenzió, 0,0546 mg/ml 3,5 mg/ml szuszpenzió és 0,0390 mg/ml 5 mg/ml szuszpenzió esetén. Negatív kontrollként a sejtszuspenziót nem tartalmazó tápoldat szolgált, az emulgens kontroll az 1%-os Tween40 oldat volt. Pozitív kontrollként kezeletlen baktériumszuspenziót alkalmaztunk. Inkubálás (24 óra, 37°C) után 600 nm-en mértük a minták abszorbanciáját (BMG Labtech, Bio-Tek Kft.). Kiszámoltuk hat ismétlés átlagát, majd a kapott értékből kivontuk a negatív kontroll átlagát. Minimális gátló koncentrációként határoztuk meg az illóolaj azon legkisebb koncentrációját, amely az inkubációs idő letelte után, a kontrollhoz viszonyítva >90%-ban volt képes a baktérium szaporodását gátolni.

#### 4.7 Biofilmgátló hatás vizsgálata

A vizsgálatot a kakukkfű illóolajával végeztük el. A biofilm-gátlást vizsgáló kísérletek során a virágzási időszak elején, teljes virágzás időszakában, valamint a virágzási időszak végén gyűjtött friss növényi anyagokból desztillált illóolaj minták minimális gátló koncentrációja/2 (MIC/2) értékeit használtuk.

A biofilmeket 96 lyukú mikrotiterlemezen készítettük el. 200  $\mu$ l baktériumtenyészetet ( $10^8$  CFU/ml) adtunk minden egyes lyukba; majd a mikrotiterlemezt 37°C-on 4 órán át inkubáltuk, hogy elősegítsük a sejtek adhézióját. Az inkubációs idő után a le nem tapadó sejteket fiziológias sóoldattal mostuk ki. Ezt követően a mikrotiter lemez lukaiban kitapadt baktériumokhoz MIC/2 koncentrációban hozzáadtuk a BHI táptalajban oldott illóolajat. Emulgensként 1%-os Tween40 oldatot alkalmaztunk. Negatív kontrollként a sejtuszuspenziót nem tartalmazó tápoldat szolgált, az oldószer kontroll az 1%-os Tween40 oldat volt. Pozitív kontrollként kezeletlen baktériumszuspenziót alkalmaztunk. A kezelések után a mikrotiter lemezt ismét 37°C-on 24 órán át inkubáltuk. Ezután a letapadó sejteket metanollal fixáltuk 15 percig. A biofilmeket 0,1%-os kristályibolya oldattal festettük 20 percig. A felesleges festéket eltávolítottuk. 33%-os ecetsavat adtunk minden egyes lyukhoz. Ezután az abszorbanciát  $\lambda = 595$  nm-en mértük mikrotiterlemez-leolvasóval (BMG Labtech SPECTROstar Nano Kft.). Minden vizsgálatból 6 ismétlést végeztünk (Balázs et al., 2019).

#### 4.8 Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálat

A morfológiai vizsgálatokat a PTE Szentágothai János Kutatóközpontjában végeztük el. A kísérletekbe a kakukkfű illóolaját vontuk be.

SEM-et használtunk a biofilmek szerkezeti módosulásának vizsgálatára. A biofilm vizsgálat eredménye alapján a friss növényi anyagból desztillált és a virágzás előtt gyűjtött kakukkfű olaj mintát vizsgáltuk. A biofilm kialakításához 5 ml *P. aeruginosa*, *H. influenzae* és *H. parainfluenzae* BHI tenyészetet ( $10^8$  CFU/ml) töltöttünk steril üvegbe. Steril fedőlemezeket helyeztünk az üvegekbe, amelyek a sejtek rögzítési felületeként szolgáltak. A lemezeket 4 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd a planktonsejteket és a BHI-t eltávolítottuk, és a lemezeket fiziológias sóoldattal öblítettük. A biofilmek kezelésére 5 ml MIC/2 koncentrációjú illóolajat adtunk hozzá. Kontrollként a kezeletlen fedőlemezeket használtuk. 24 órás, 37°C-on végzett inkubálás után a

felülűszót eltávolítottuk, és a palackokat fiziológiás sóoldattal mostuk. A mintákat az elektronmikroszkópos vizsgálatot megelőzően rögzítés céljából 2,5%-os glutáraldehid oldatban áztattuk, 2 órán át szobahőmérsékleten. A biofilmek dehidratálására különböző koncentrációjú etanol oldatokat (50, 70, 80, 90, 95, 98%) használtunk szobahőmérsékleten 30 percig. A dehidratálás következő lépése terc-butil-alkohol: abszolút etanol 1:2, 1:1 és 2:1 arányú oldatban való áztatása volt. Majd abszolút terc-butil-alkohollal 2 órán át szobahőmérsékleten vízmentesítettük. A mintákat 4°C-on 1 órán át tároltuk, majd egy éjszakán át fagyaszttva szárítottuk. A mintákat arany membránnal vontuk be, és JEOL JSM IT500-HR pásztázó elektronmikroszkóppal (Jeol Kft.) vizsgáltuk (Kerekes et al., 2013).

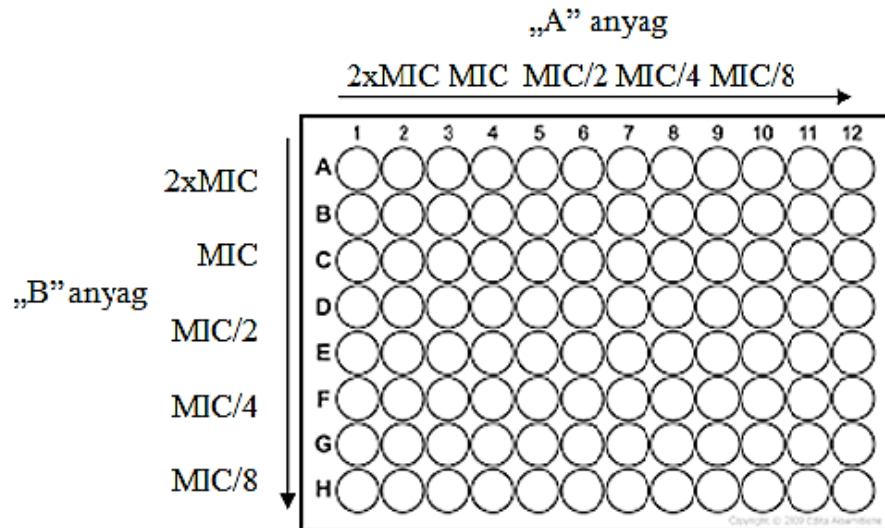
#### 4.9 Checkerboard-titrálás

Az antibiotikum-rezisztens kórokozók egyre gyakoribbak, ezért a klinikusok egyre többször kerülnek olyan helyzetbe, ahol beszűkülnek a terápiás lehetőségeik. Ezen kívül csökkent az új antibiotikumok felfedezése és gyógyszerészeti hatóságok által történő engedélyezése. Ez aktualitást adott a meglévő antibiotikumok „újrahasznosításának”, ami alapvető stratégiává vált az antibiotikum-rezisztencia elleni küzdelemben (Walsh & Wencewicz, 2014). Az a megközelítés, hogy egy gyógyszernek egy célpontja legyen, egyre kevésbé működőképes. Ugyanis a rezisztenciához szükséges képességeket viszonylag könnyen megszerzi a baktérium. Valószínűleg a széles spektrumú aktivitásnak köszönhető a növények, hogy több komponensből álló illóolajaik a mai napig képesek megvédeni őket a fitopatogén baktériumokkal szemben. A kombinációs terápiák nem újkeletűek a modern humán gyógyászat történetében. Olyan máig gyógyíthatatlan, vagy nagyon nehezen kezelhető betegségek terápiájában hoztak jelentős sikereket, mint a rák gyógyítás, a malária vagy a szerzett immunhiányos betegség, az AIDS (De Clercq, 2007; Hemingway et al., 2016; Komarova & Boland, 2013). Bár meg kell említeni, hogy még mindig a komplementer medicina körébe tartoznak. A kombinációs terápiáknak három fő célja, hogy 1) a dózisok minimalizálásával csökkenteni lehessen a toxicitást és a nemkívánatos mellékhatásokat; 2) a hatékonyság növelése a baktériummal szemben (ami lehetővé teszi a dózisok csökkentését); valamint 3) minimalizálni az antibiotikum-rezisztencia kialakulását (Rao et al., 2018).

Általában elfogadott, hogy az illóolajok elsősorban a mikroorganizmusok citoplazmatikus membránja ellen fejtik ki hatásukat. Tehát a hidrofób tulajdonság az illóolaj-komponensek fontos jellemzője. Ez lehetővé teszi, hogy felhalmozódjanak a foszfolipid membánban, megzavarva annak struktúráját, ezáltal növelve a permeabilitást. Ennek következtében az intracelluláris alkotóelemek kiáramlanak az intracelluláris térbe és a mikrobiális enzimrendszerek is sérülhetnek. Ezek a folyamatok idővel a baktérium pusztulásához vezetnek (Moreira et al., 2005). A sejtfal átjárhatóságának növelése segítheti kombinációban adott antibiotikumok hatékonyságát. Ilyen szinergizmust segítő tulajdonságok közé tartozik még, hogy az illóolaj komponensek képesek biokémiai útvonalak szekvenciális gátlására, védekező mechanizmusban résztvevő enzimek (például efflux pumpa) gátlására és az örökítőanyag károsítására. Kombinálhatunk például eltérő kémiai összetételű illóolajokat. Oregánó-bazsalikom olajának kombinációja szinergista hatást mutatott *E. coli* baktériummal szemben, bazsalikom-bergamott a *S. aureus*, oregano-bergamot a *B. subtilis* és oregano-perilla a *S. cerevisiae* fajok ellen (Lv et al., 2011). De nagy jelentőséget rejthet az antibiotikumokkal való kombináció. A kakukkfűolaj és a ciprofloxacín kombinációja szinergikus hatást fejtett ki. A kombináció hatékonyabbnak bizonyult a fekélyképző *Shigella flexneri* növekedésének gátlásában, vastagbélfekély kezelése során, valamint jelentősen csökkent a baktérium okozta gyulladás a szöveti rétegekben (Allam et al., 2015).

Annak érdekében, hogy megfigyelhessük a kakukkfű illóolaj és az antibiotikumok között kialakuló kölcsönhatásokat, checkerboard-titrálást kivitelezünk. A méréseket szintén 96 cellás mikrotiter lemezekon kivitelezük. Egy mintahely 50-50 µl BHI tápoldatban oldott, adott koncentrációjú vizsgálandó anyagot (A és B anyag), valamint 100 µl korai stacioner fázisban lévő  $10^5$  CFU/ml sejtszámú szuszpenziót tartalmazott.

Koncentrációk: 2xMIC, MIC, MIC/2, MIC/4. A mikrotiter lemezen a hatóanyagok kombinációja ellentétes irányban csökkenő kombinációk szerint valósult meg (6. ábra). A lemez elkészítése után 24 órás inkubáció következett 37°C-on. Ezt követően az abszorbancia értékeket 600 nm-en mértük az előbbieken említett mikrotiterlap olvasóval. Pozitív kontrollként kezeletlen baktérium szuszpenziót, negatív kontrollként sejtmentes táptalajt alkalmaztunk.



**6. ábra** A checkerboard-titrálás mikrotiter lemezének sematikus ábrája

Egy kombinációt 6 párhuzamos mérésben vizsgáltunk. Az eredményeket két független párhuzamos mérésből nyertük. Ahhoz, hogy a két hatóanyag közötti kölcsönhatás típusát megállapíthassuk frakcionális gátló koncentráció indexet (FICI) számítottunk ki. Amennyiben a  $FICI \leq 0,5$  a két vizsgált anyag közötti kölcsönhatást szinergistának,  $0,5 < FICI < 1$  közötti érték esetén additívnak,  $FICI > 4$  esetén antagonistának tekintettük. Ha a FICI 1 és 4 közé eső érték, a komponensek között nem volt kölcsönhatás kimutatható (Clemente et al., 2016; Langeveld et al., 2014).

$$FICI = FIC_A + FIC_B = \frac{MIC_A \text{ kombináció}}{MIC_A \text{ önálló}} + \frac{MIC_B \text{ kombináció}}{MIC_B \text{ önálló}} \quad 1. \text{ egyenlet}$$

Ahol:

- $FICI$ : frakcionális gátló koncentráció indexet
- $FIC_A$ : A komponens FICI értéke
- $FIC_B$ : B komponens FICI értéke
- $MIC_A$ : A komponens minimális gátló koncentrációja
- $MIC_B$ : B komponens minimális gátló koncentrációja



## 4.10 Statisztikai elemzések

### 4.10.1 Statisztikai elemzés kakukkfű olajok esetén

A statisztikai elemzéseket az R szoftver 4.0.2-es verziójában (R Development Core Team 2020) végeztük. A mért gátlási zónákat lineáris modellel (Chambers & Hastie, 1992) elemeztük. Modellünkben a független változókat (baktériumfajták, kakukkfű különböző fenofázisai) fix faktorként kezeltük. Az adatok normál eloszlása miatt adattranszformáció nem történt. A transzformáció szükségességének ellenőrzése (Crawley, 2014) grafikus kiértékelésen alapult. Mivel az F-próbák igazolták a szórások egyezését, statisztikai hipotézisvizsgálatot ANOVA teszttel végeztük. A páronkénti összehasonlításhoz Tukey post-hoc tesztekkel végeztünk a multcomp csomaggal (Hothorn et al., 2008), mellyel összehasonlítottuk az összes kísérleti elrendezés közötti különbséget.

### 4.10.2 Válaszfelület-modellezés (RSM) muskotályzsálya extraktumok esetén

A válaszfelület-modellezés (Response Surface Modelling-RSM) úgy írható le, mint egy olyan technika, amely magában foglalja az optimalizálási folyamat összetett számolásait. Ezzel a megközelítéssel megfelelő kísérleti terv készíthető, amely integrálja és kódolja az összes független változót. Miután bevittük a kísérletekből származó adatokat, lehetővé válik egy egyenletkészlet összeállítása, amely megadhatja a kimenet elméleti értékét. A kimenetek egy jól megtervezett regressziós elemzésből származnak, amely független változók ellenőrzött értékein alapulnak. Ezt követően a független változók új értékei alapján megjósolható a függő változó, valamint az is, hogy egyes független változók mekkora befolyással vannak a végeredményre (Mohamad Said & Mohamed Amin, 2016). Hagyományosan egy folyamat optimalizálása rendkívül aprólékos feladat, amely számos hibalehetőséget hordozhat. Kiváltképp, ha egy összetett folyamatról van szó. Ezért a hagyományos tervezés során nagyszámú kísérletet kell elvégeznünk ahhoz, hogy megismerjük a különböző műveleti paraméterek kölcsönhatásait és rangsorolni tudjuk azokat az eredményre gyakorolt hatásuk szempontjából. A szükséges kísérletek száma előre pontosan nem tudható, erősen függ az emberi tényezőtől. A termék minősége (amely egy számmal jellemezhető) folyamatosan változik a műveleti paraméterek függvényében és így egy hiperfelületet hoz létre. Ezt nevezzük válaszfelületnek. Az előre tervezett modellekkel történő optimalizálás csökkentheti a kísérletek számát és a végrehajtási időt anélkül, hogy az eredmények

pontosságát ténylegesen veszélyeztetné. Ezáltal csökkenti a kutatás-fejlesztés költségeit is, és lehetővé teszi releváns adatok megfelelő elemzését. Amennyiben a függő változó paraméterei megváltoznának, például egy hatósági szabályozás kapcsán, a modell újraszámolható. Az RSM megvalósításának három lépése van; 1. kísérlet tervezése, azaz Box Behnken és kompozíciós terv készítése; 2. statisztikai és regressziós elemzés, valamint a válaszfelület modell elkészítése és értékelése, 3. a paraméterek/változók optimalizálása (Kumar et al., 2021).

A statisztikai modellezést a Design-Expert program 12-es verziójában (Stat-Ease Inc. 2020) végeztük. A kísérlet faktorainak meghatározására egy teljes faktoriális modellt vettük alapul (Bas & Boyaci, 2007). Segítségével optimalizálhatóvá vált az extrakciós folyamat, annak érdekében, hogy a lehető legnagyobb antimikrobiális hatást érjük el a vizsgált légúti patogénekkal szemben. A faktorok a folyamatot nagymértékben befolyásoló paraméterek, a faktor-szintek pedig a faktorok által felvehető értékek. Az extrakciós nyomás  $x_1$  az extrakciós hőmérséklet  $x_2$  és a koszolvens aránya  $x_3$  (Jokić et al., 2018; Molnar et al., 2017).

A kísérleti mátrixban a következő tulajdonságoknak teljesülni kell annak érdekében, hogy a kísérleti pontokra illesztett modell paramétereire a lehető legpontosabb becslést kapjuk (Box & Behnken, 1960):

- Középpontra vonatkozó szimmetria: mindegyik faktor oszlopvektorában az elemek összege nulla.

$$\sum_{i=1}^N x_{ji} = 0 \quad 2. \text{ egyenlet}$$

Ahol:

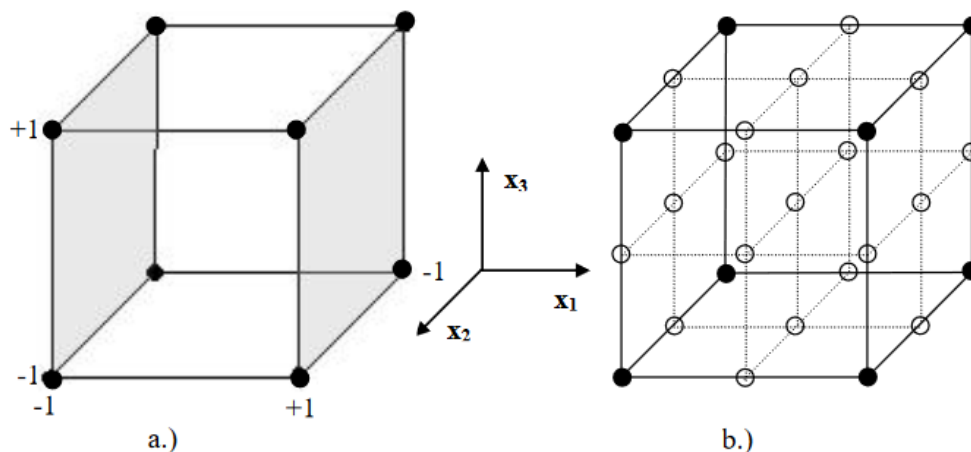
- $j$ : faktorok száma
- $i$ : faktorok szintjei
- $N$ : kísérleti beállítások száma
- $x$ : az általunk kódolt független változók
- Normális feltétel: az oszlopok elemeinek négyzetösszege egyenlő a kísérleti beállítások számával.

$$\sum_{i=1}^N x_{ji}^2 = N \quad 3. \text{ egyenlet}$$

- Ortogonális feltétel: bármely két csoportvektor skaláris szorzata 0.

$$\sum_{i=1}^N x_{ji} x_{ui} = 0, (j \neq u) \quad 4. \text{ egyenlet}$$

- Elforgathatósági feltétel: a függő változók becslésének pontossága a középponttól egyenlő távolságra egyforma és független az iránytól.



7. ábra Teljes faktoriális modell ábrázolása

A kísérlet megtervezése után a faktorok és szintek száma alapján kiválasztottuk azt a matematikai modellt, mely leginkább illeszkedik a kísérlethez (Jokić et al., 2018):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j, (i < j) \quad 5. \text{ egyenlet}$$

Ahol:

- $y$  : adott beállításnál mért biológiai hatékonyság (függő változó)
- $\beta_0$  : konstans érték
- Megadja a regressziós egyenes és a koordináta-rendszer függőleges ( $y$ ) tengelyének metszéspontját.
- $\beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$  : konstans regressziós együtthatók
- Megadja a regressziós egyenes meredekségét.
- Grafikusan jelzi, hogy a független változók egységnyi változása várhatóan milyen mértékben változtatja meg a függő változót.

A statisztikai számításokat 95%-os konfidenciaintervallumon végeztük.

4. táblázat Faktorok kódolása és a kísérleti pontok Design-Expert 12 programban

Független változók	Szimbólum	Szintek		
		Alacsony (-1)	Közép (0)	Magas (+1)
Nyomás (Mpa)	<i>A</i>	10	15	20
Hőmérséklet (°C)	<i>B</i>	40	60	80
Segédoldószer (%)	<i>C</i>	1.0	1.5	2.0

## 5 Eredmények

A következőkben először a muskotályzsályaival végzett kísérletek eredményeit mutatom be, ezt követően pedig a kakukkfüves vizsgálatok eredményeit.

### 5.1 Muskotályzsálya extraktumok antibakteriális aktivitásának meghatározása

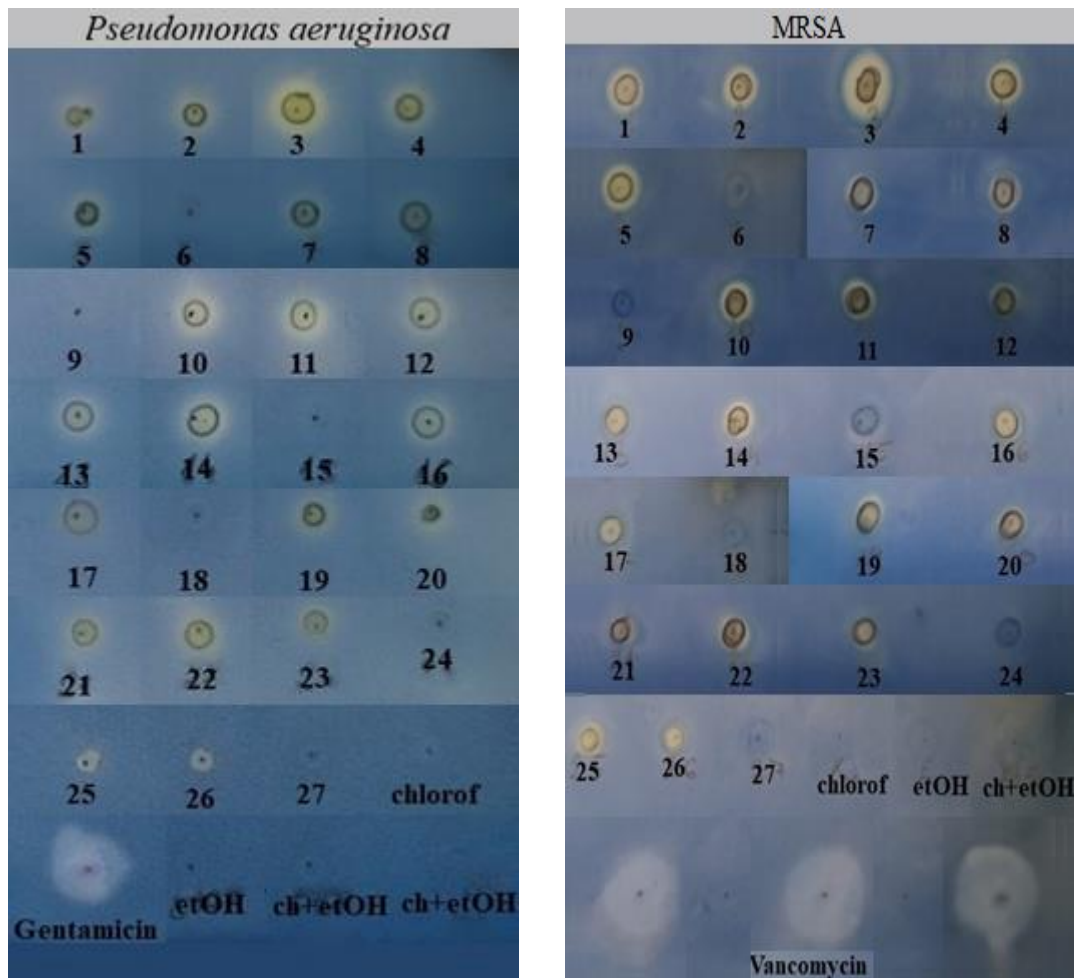
A TLC-DB módszerrel a kivonatok antibakteriális aktivitását kromatográfiás elválasztás nélkül vizsgáltuk. *P. aeruginosa* és MRSA baktériumtörzseket választottuk tesztbaktériumoknak (8. ábra). Az antibakteriális hatást a gátlási zóna átmérőjében (mm) fejeztük ki (5. táblázat, 9. ábra, 10. ábra). Ezáltal egyetlen számmal jellemezhetővé vált és később könnyedén bevihető volt a statisztikai programba a válaszfelület modell tervezése során. Kloroform és abszolút etanol (mint negatív kontrollok) esetében nem volt megfigyelhető antibakteriális aktivitás a baktériumtörzsekkel szemben. *P. aeruginosa* esetében pozitív kontrollként gentamicint alkalmaztunk (átlagos gátlási zóna 8,2 mm, SD = 0,81 mm). 20 MPa-on extrahált minták általánosságban nagyobb gátlási zónákat eredményeztek. A biológiailag aktív komponensek kinyerésének kedvezett az alacsony hőmérséklet. Minden esetben 10 MPa nyomáson készültek azok a minták, amelyeknél nem detektáltunk antibakteriális hatást. Azonban meg kell jegyezni, hogy a tesztbaktériumokkal szemben legaktívabb minta (S3) is ezen a nyomásértéken készült.

Az MRSA esetében vankomicint alkalmaztunk pozitív kontrollként (átlagos gátlási zóna 12,3 mm, SD = 0,45 mm). Összehasonlítva az eredményeket a *P. aeruginosa* eredményével, hasonló szabályszerűségeket figyeltünk meg. Az MRSA baktériumtörzssel szemben a minták többsége kevésbé volt hatékony, mint *P. aeruginosa*-val szemben. A legnagyobb gátlási zónát a hármas mintánál tapasztaltuk, 7,51 mm (SD = 0,85 mm) a *P. aeruginosa* és 7,57 mm (SD = 0,62 mm) az MRSA esetében (5. táblázat). A minta extrakciós paraméterei közül a nyomás és a hőmérséklet a legalacsonyabb (10 MPa és 40°C), a koszolvens arány pedig a legmagasabb (2% etanol) volt. Az eredmények alapján elmondható, hogy a paraméterek kis változtatásával nagy hatást gyakorolhatunk az antibakteriális hatásra.

5. táblázat Az SFE kivonatok extrakciós körülményei és gátlási zónái

Minta	<i>P. aeruginosa</i> Átmérő (mm)	<sup>1</sup> SD	MRSA Átmérő (mm)	<sup>1</sup> SD	MPa	°C	EtOH (%)
1	5,86	0,72	5,46	0,50	20	40	2
2	5,50	0,56	4,85	0,78	15	40	2
3	7,51	0,85	7,57	0,62	10	40	2
4	6,18	0,64	4,69	0,46	20	60	2
5	5,43	0,42	4,80	0,38	15	60	2
6	0,00	0,00	0,00	0,00	10	60	2
7	4,29	0,71	4,66	0,39	20	80	2
8	4,83	0,29	4,32	0,59	15	80	2
9	0,00	0,00	0,00	0,00	10	80	2
10	6,50	0,42	4,59	0,65	20	40	1,5
11	6,91	0,20	4,77	0,69	15	40	1,5
12	6,27	0,33	3,29	0,42	10	40	1,5
13	5,41	0,47	3,41	0,36	20	60	1,5
14	5,71	0,80	4,25	0,35	15	60	1,5
15	0,00	0,00	0,00	0,00	10	60	1,5
16	6,37	0,78	3,50	0,40	20	80	1,5
17	6,56	0,55	3,29	0,46	15	80	1,5
18	0,00	0,00	0,00	0,00	10	80	1,5
19	5,96	0,15	4,44	0,53	20	40	1
20	6,34	0,82	3,58	0,82	15	40	1
21	5,32	0,41	3,72	0,40	10	40	1
22	5,61	0,47	3,72	0,40	20	60	1
23	4,98	0,61	3,07	0,36	15	60	1
24	0,00	0,00	0,00	0,00	10	60	1
25	3,02	0,23	3,40	0,58	20	80	1
26	2,75	0,48	3,25	0,68	15	80	1
27	0,00	0,00	0,00	0,00	10	80	1
<b>kloroform</b>	0,00	0,00	0,00	0,00			
<sup>2</sup> kloro. + <b>EtOH</b>	0,00	0,00	0,00	0,00			
<b>EtOH</b>	0,00	0,00	0,00	0,00			
<b>vankomicin</b>	-	-	12,30	0,45			
<b>gentamicin</b>	8,26	0,81	-	-			

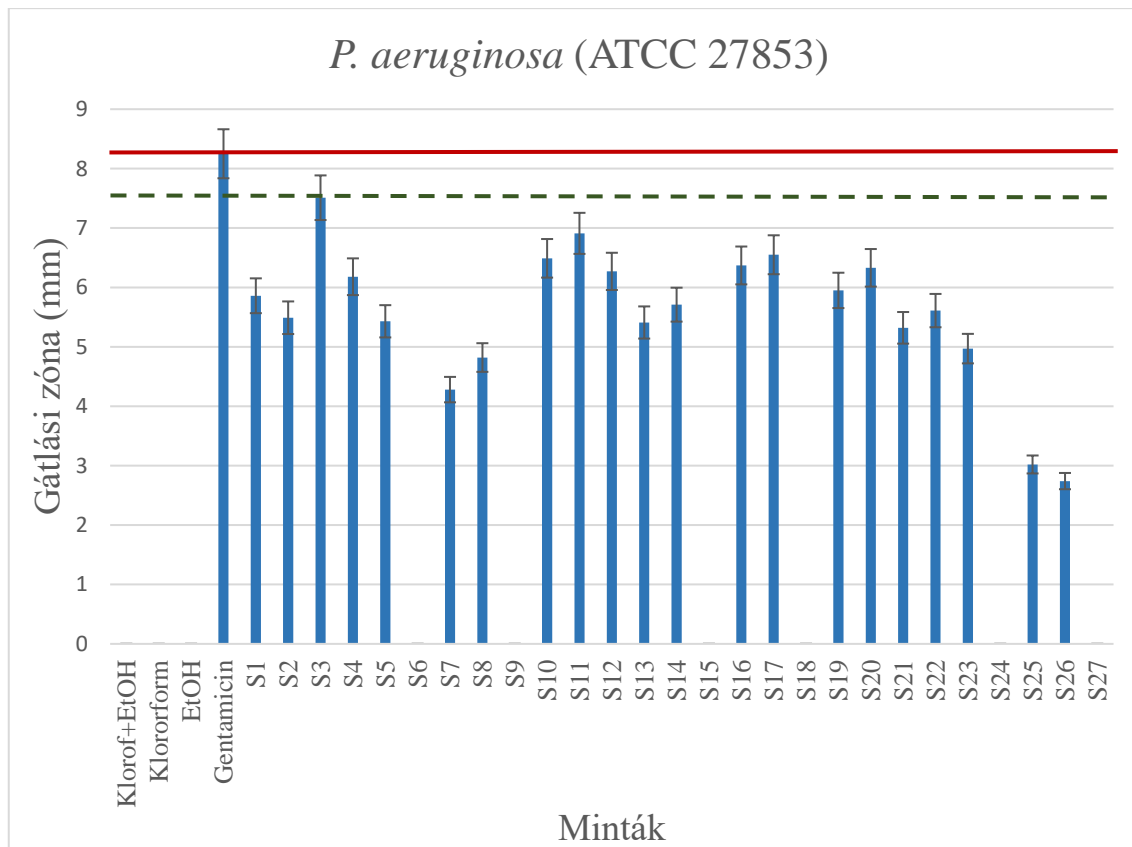
<sup>1</sup>SD = szórás; <sup>2</sup>. kloro. = kloroform



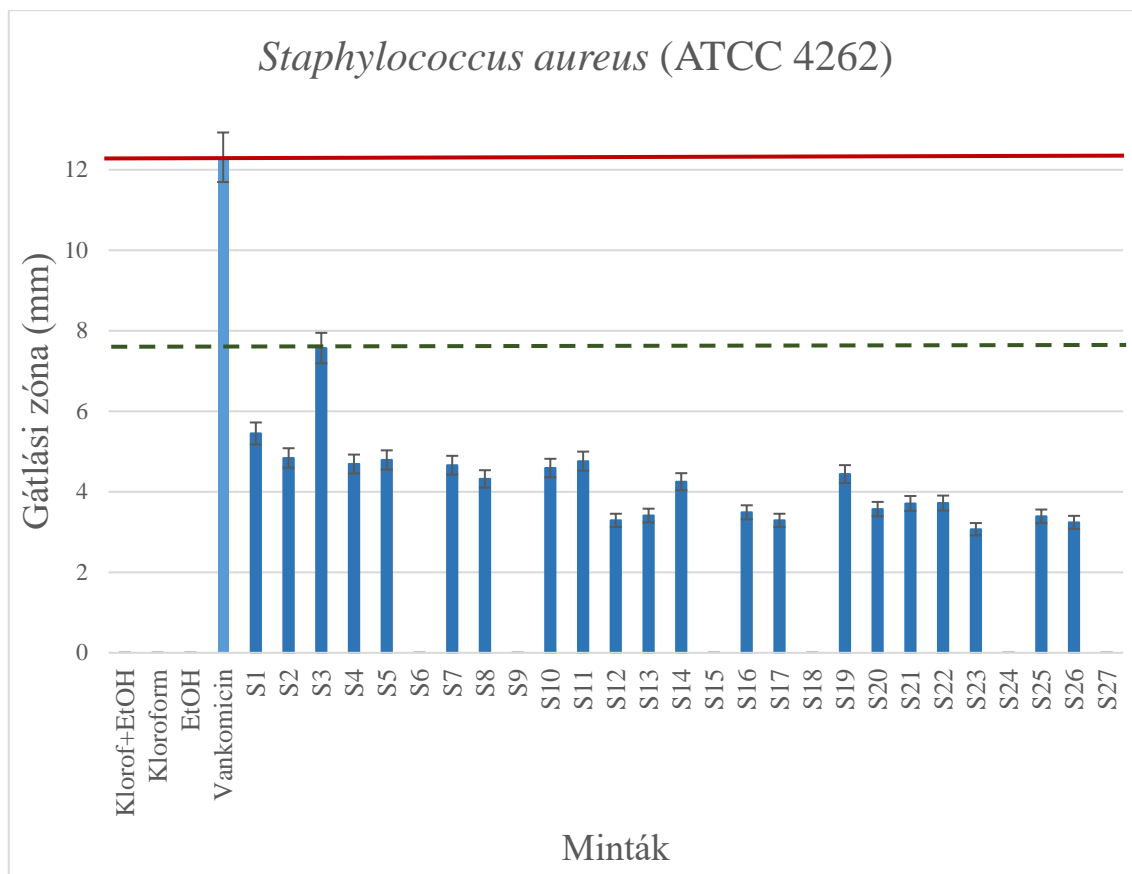
(a)

(b)

**8. ábra** (a) A muskotályzsálya SFE kivonatainak, a pozitív kontrollnak (gentamicin) és a felhasznált oldószerek (negatív kontrol) *P. aeruginosa* elleni antibakteriális aktivitásának kimutatása TLC-DB módszerrel. A minták számozása megegyezik a 5. táblázatban láthatóval. (b) A muskotályzsálya SFE kivonatainak, a pozitív kontrollnak (vankomicin) és a felhasznált oldószerek (negatív kontrol) MRSA elleni antibakteriális aktivitásának kimutatása TLC-DB módszerrel. A minták számozása megegyezik az 5. táblázatban láthatóval.



**9. ábra** A muskotályzsálya SFE kivonatainak, a pozitív kontrollnak (gentamicin) és a felhasznált oldószerek (negatív kontrol) *P. aeruginosa* elleni antibakteriális aktivitásának grafikus ábrázolása. A minták számozása megegyezik az 5. táblázatban láthatóval. — : gentamicin gátlási zónájának szintje, - - : a leeffektívebb minta gátlási zónájának szintje.



**10. ábra** A muskotályzsálya SFE kivonatainak, a pozitív kontrollnak (vankomicin) és a felhasznált oldószerek (negatív kontrol) MRSA elleni antibakteriális aktivitásának grafikus ábrázolása. A minták számozása megegyezik az 5. táblázatban láthatóval. — : vankomicin gátlási zónájának szintje, - - : a leghatékonyabb minta gátlási zónájának szintje.

## 5.2 SFE módszer optimalizálása

A kivonatok válaszfelület modelljeit a Designe-Expert 12 program segítségével készítettük el. Az 11. és a 12. ábra bemutatja, hogy bizonyos paraméterek állandó változása mellett hogyan változik a kivonat antibakteriális hatása a *P. aeruginosa* és az MRSA baktériumtörzsekkel szemben (melyet fő minőségi jellemzőnek tekintünk a vizsgálat során). Az extraktumok átlagosan hatékonyabbak a *P. aeruginosa* ellen. A válaszfelületek alakja azonban nagyon hasonló a két baktérium esetében. Ez előnyös akkor, ha olyan kivonatot szeretnénk előállítani, amely mind a két baktériummal szemben hatásos. Ugyanis ilyenkor közel esnek egymáshoz az optimális paraméter értékek. Ahogy az ábrák is mutatják, a leghatékonyabb extraktumokat alacsony hőmérsékleten (40-45°C) és magasabb nyomásértékeken (15-20 MPa) vonhatjuk ki. A legkevésbé hatékony



kivonatok 60-80°C-on és 100-120 MPa nyomáson készülhetnek. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy extrakció során a növényi anyagot óvni kell a túlzott hőközléstől. A társoldószer arányának változása volt a legkisebb hatással a válaszfelület alakjára. Tehát a három beállítási paraméter közül az EtOH aránya a folyadékban befolyásolja legkevésbé a biológiai aktivitást.

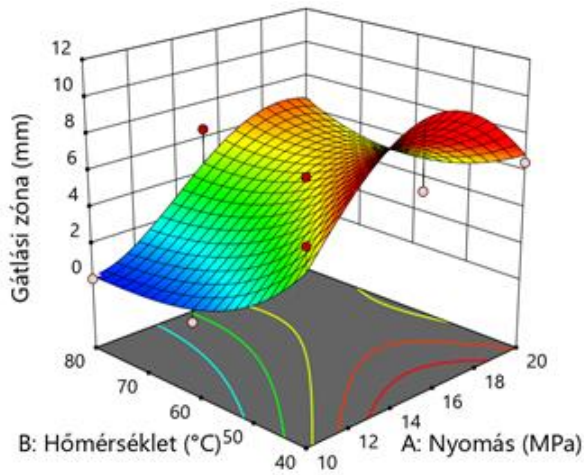
A két baktérium ANOVA tesztjének eredményeit a 6. és a 7. táblázatok tartalmazzák. Az ANOVA tesztek megerősítették, hogy az eredményeink jól illeszkednek a 3 dimenziós modellbe és alapjául szolgálhattak a válaszfelület meghatározásának. Az F-érték (mintákon belüli átlagok varianciájának a varianciahányadosa) a *P. aeruginosa* esetében 16,40, az MRSA esetében pedig 17,90, ami arra utal, hogy a modellek szignifikánsak, és csak 0,01% az esélye annak, hogy a zaj miatt magasabb F-érték keletkezik. Tehát a zaj mértéke nem befolyásolja a szórás értékeket. A prediktált  $R^2$  (*P. aeruginosa* 0,6662 és MRSA 0,6860) és a korrigált  $R^2$  (*P. aeruginosa* 0,8172 és MRSA 0,8308) értékek közötti eltérés kisebb, mint 0,2, ami azt jelzi, hogy az eredményekben jelentkező esetleges standard hiba 99,8% felderíthető a modell segítségével. A jel/zaj arányt 4-nél nagyobb arány esetén lehet elfogadni. Az arányunk a *P. aeruginosa* esetében 15,35, az MRSA esetében pedig 16,33, ami megfelelő jel/zaj viszonyt jelent. Az eredmények alapján a modell alkalmas arra, hogy megfelelő pontossággal navigálni tudjunk a tervezési térben és az adott műveleti paraméterekhez megfelelő biztonsággal prediktálni tudjuk az antibakteriális hatás értékeket.

A 13. ábra szemlélteti a mért értékek és a statisztikai számítás által előre jelzett értékek közötti erős korrelációt. A reziduálisok egyenletesen szóródnak közel az egyenes körül és nem figyelhető meg trend az adatokban. Ez azt mutatja meg számunkra, hogy a mérések szórása véletlenszerű, vagyis nincs szisztematikus hiba vagy mintázat az előrejelzésekben. Igazolja, hogy a statisztikai model számításai és a mért értékek közötti kapcsolat stabil és megbízható. Korrelációs együttható négyzete: *P. aeruginosa*  $R^2= 0,8703$ , MRSA  $R^2= 0,8799$ . A 14. ábra a tényleges és az előrejelzett értékeket szemlélteti. A futások közel az egyenes vonal mentén való elhelyezkedése azt jelzi, hogy a mért és a modellel előre jelzett értékek között minimális különbség volt. Ez arra utal, hogy a model által előrejelzett értékek nagyon közel állnak a valósághoz, és a model kellő pontossággal képes volt megjósolni a tényleges megfigyeléseket (Mohammad et al., 2019).

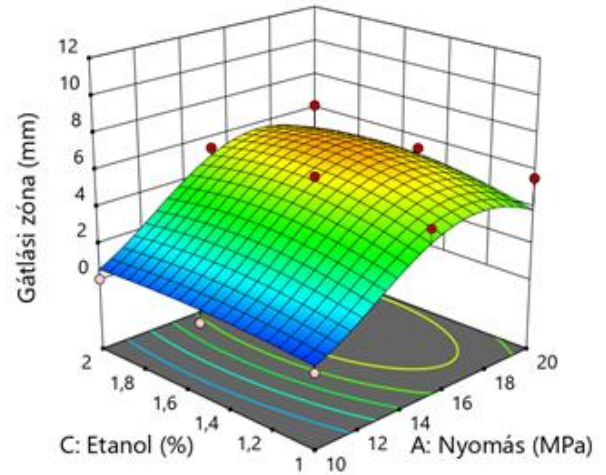
A modellezéshez szükséges statisztikai számításokat 95%-os konfidencia intervallumon végeztük el. A 0,05-nél kisebb p érték azt mutatja, hogy az adott beállítási paraméter (faktor) szignifikáns hatással van az antibakteriális hatásra. A számítások megerősítették a 3D-s ábrák vizuális következtetéseit. A Gram-negatív *P. aeruginosa* esetében két paraméter volt statisztikailag szignifikáns hatással az antibakteriális hatásra, a nyomás és a hőmérséklet ( $p < 0,0001$ ). A segédoldószer arányának változtatása azonban nem gyakorolt statisztikailag jelentős hatást az eredményre ( $p = 0,3365$ ). A Gram-pozitív MRSA esetében mindhárom beállítási paraméter statisztikailag szignifikáns hatással volt a növényi extraktum antibakteriális hatására. A segédoldószer arányának változása is kimutatható hatással volt az eredményre ( $p = 0,0434$ ). Azonban ebben az esetben is ez a paraméter befolyásolja legkisebb mértékben a végeredményt. A legnagyobb eltérést itt is a nyomás és a hőmérséklet változtatásával tudjuk elérni az antibakteriális hatás tekintetében ( $p < 0,0001$ ). Mindkét baktérium esetében elmondható, hogy a beállítási paraméterek közötti kölcsönhatások vizsgálatokor csak a nyomás és a hőmérséklet kölcsönhatása mutatott statisztikailag szignifikáns hatást az antibakteriális hatékonyságra (*P. aeruginosa*  $p = 0,0002$ , MRSA  $p < 0,0001$ ). A 3D diagramok vizuális értékelése és a statisztikai számítások alapján a nyomás és a hőmérséklet változtatásával érhetjük el a legnagyobb mértékű változást az extraktumok antibakteriális hatékonyságában.

Az optimalizálás a folyamatok kontrolálásának hatékony eszköze a megfelelő minőségű termék előállítása érdekében. Az optimális extrakciós paramétereket úgy határoztuk meg, hogy a számolásnál figyelembe vettük mindkét baktériumra gyakorolt antibakteriális hatást. Mind a két esetben a maximalizálás volt a cél. A hozam esetén ennél a számolásnál nem határoztunk meg minimum értéket. A következő eredményeket kaptuk: A számított optimális beállítási paraméterek: 18,6 MPa, hőmérséklet 40°C és EtOH arány 2%. Adott paramétereken a prediktált gátlási zónák átmérője *P. aeruginosa*: 7,95 mm és MRSA: 7,57 mm volt 3,64 m/m%-os hozam mellett. A hozam eredmények a 1. mellékletben tekinthetők meg.

Miután meghatároztuk a minták etanoltartalmát, számolhatóvá vált a tömegben mért extrakciós hozam. 22 g töltetből a legkisebb hozam 0,21 g, a legnagyobb pedig 1,55 g volt. Az extrakciós hozam a nyomás növekedésével növekedett. Az eredményeket az 1. melléklet foglalja össze.

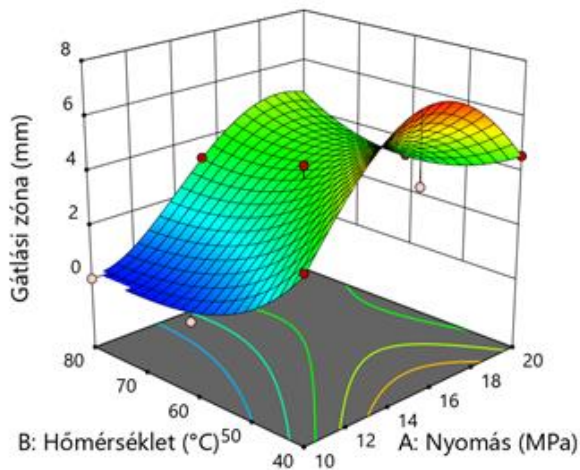


(a)

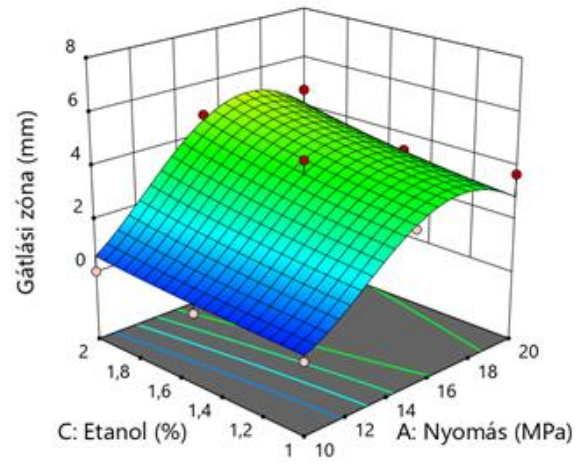


(b)

**11. ábra** (a) Muskotályzsálya extraktumok antibakteriális hatásának változása *P. aeruginosa*-val szemben extrakciós nyomás és hőmérséklet változásának függvényében. (b) Muskotályzsálya extraktumok antibakteriális hatásának változása *P. aeruginosa*-val szemben extrakciós nyomás és segédoldószer arány változásának függvényében.



(a)



(b)

**12. ábra** (a) Muskotályzsálya extraktumok antibakteriális hatásának változása MRSA-val szemben extrakciós nyomás és hőmérséklet változásának függvényében. (b) Muskotályzsálya extraktumok antibakteriális hatásának változása MRSA-val szemben extrakciós nyomás és segédoldószer arány változásának függvényében.

**6. táblázat** *P. aeruginosa* mikrobiológiai eredményeinek varianciaanalízise (ANOVA)

Adat	S of sq <sup>1</sup>	df <sup>2</sup>	S of sq átlaga	F-érték	p-érték
<b>Modell</b>	25,22	9	2,80	16,40	< 0,0001
<b>A-Nyomás</b>	9,94	1	9,94	58,15	< 0,0001
<b>B-°C</b>	5,67	1	5,67	33,17	< 0,0001
<b>C-Etanol</b>	0,1650	1	0,1650	0,9656	0,3365
<b>AB</b>	3,49	1	3,49	20,44	0,0002
<b>AC</b>	1,640E-06	1	1,640E-06	9,597E-06	0,9976
<b>BC</b>	0,0046	1	0,0046	0,0269	0,8712
<b>A<sup>2</sup></b>	4,90	1	4,90	28,66	< 0,0001
<b>B<sup>2</sup></b>	0,9233	1	0,9233	5,40	0,0297
<b>C<sup>2</sup></b>	0,2831	1	0,2831	1,66	0,2114

**$R^2 = 0,8703$ , Prediktált  $R^2 = 0,662$ , szignifikancia  $\leq 0,050$**

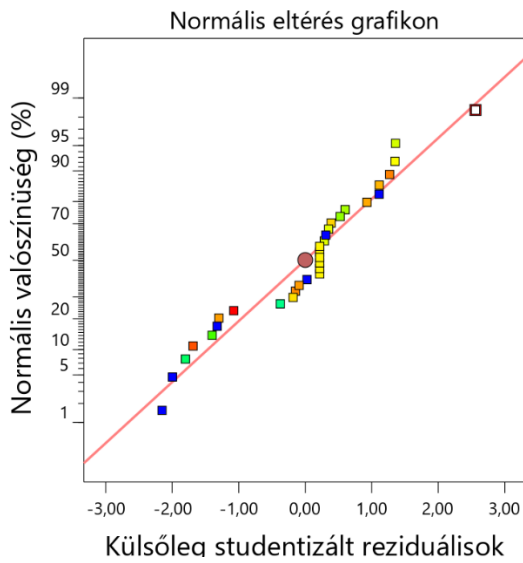
1: négyzetösszegek; 2: szabadsági fokok száma

**7. táblázat** MRSA mikrobiológiai eredményeinek varianciaanalízise (ANOVA)

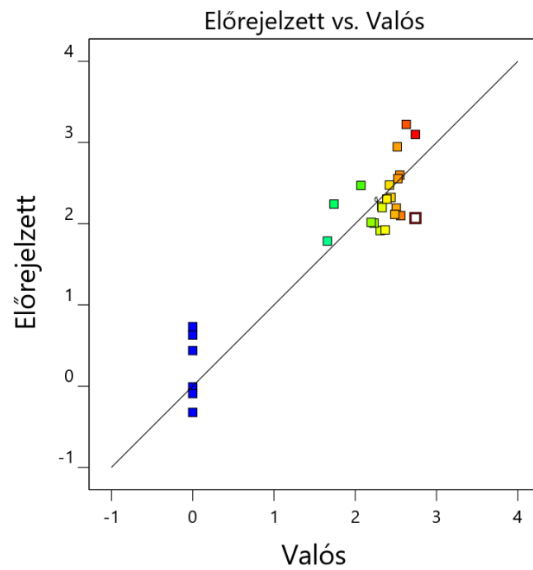
Adat	S of sq <sup>1</sup>	df <sup>2</sup>	S of sq átlaga	F-érték	p-érték
<b>Modell</b>	19,70	9	2,19	17,91	< 0,0001
<b>A-Nyomás</b>	7,88	1	7,88	64,47	< 0,0001
<b>B-°C</b>	3,86	1	3,86	31,63	< 0,0001
<b>C-Etanol</b>	0,5615	1	0,5615	4,59	0,0434
<b>AB</b>	2,78	1	2,78	22,78	< 0,0001
<b>AC</b>	0,0001	1	0,0001	0,0012	0,9724
<b>BC</b>	0,1450	1	0,1450	1,19	0,2878
<b>A<sup>2</sup></b>	4,18	1	4,18	34,18	< 0,0001
<b>B<sup>2</sup></b>	0,7909	1	0,7909	6,47	0,0185
<b>C<sup>2</sup></b>	0,0086	1	0,0086	0,0708	0,7927

**$R^2 = 0,8799$ , Prediktált  $R^2 = 0,6860$ , szignifikancia  $\leq 0,050$**

1: négyzetösszegek; 2: szabadsági fokok száma

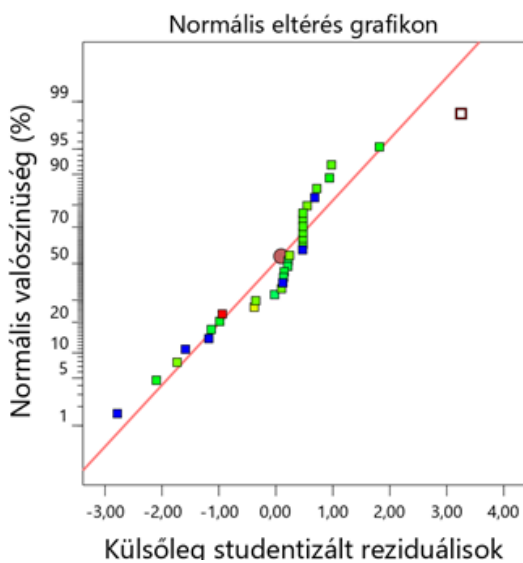


(a)

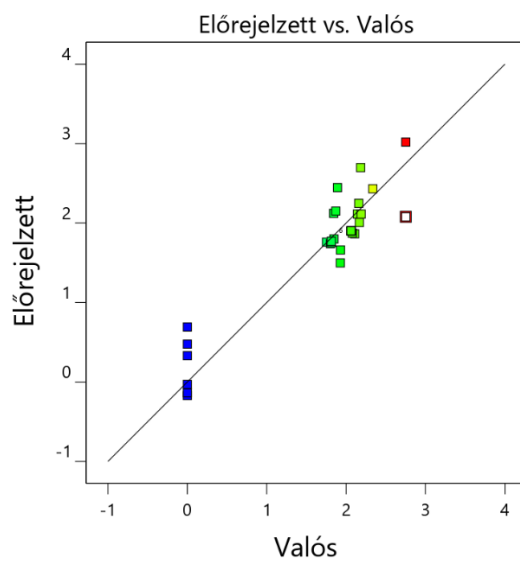


(b)

13. ábra (a) *P. aeruginosa* gátlásának normális eltérés grafikonja; (b) *P. aeruginosa* gátlásának előrejelzett vs. valós érték grafikonja.



(a)



(b)

14. ábra (a) MRSA gátlásának normális eltérés grafikonja; (b) MRSA gátlásának előrejelzett vs. valós érték grafikonja.

### 5.3 Kakukkfűolaj eredmények

#### 5.3.1 Vízgőz-desztilláció eredményei

A különböző fenofázisban gyűjtött friss és szárított növényből nyert illóolaj mennyiségeket a 8. táblázat tartalmazza.

**8. táblázat** Kakukkfű minták desztillálásának eredményei

	Gyűjtési időszakok		
	Virágzás kezdete	Teljes virágzás	Virágzás vége
Friss kakukkfű (g)	1826	1464	764
Desztillált illóolaj (μl)	8450	6350	3920
Hozam (ml/100 g)	0,46	0,43	0,51
Szárított kakukkfű (g)	963	964	1440
Desztillált illóolaj (μl)	7520	6080	7550
Hozam (ml/100 g)	0,78	0,63	0,52

#### 5.3.2 Kakukkfű illóolajának kémiai összetétele

Az azonosított vegyületeket és az illóolaj komponensek százalékos (területszázalék) értékét a 9. táblázat tartalmazza (az összes komponenst a 2. melléklet tartalmazza). Az eredményeket terület-normalizációs módszerrel határoztuk meg, gázkromatográfiás elválasztás után. A kakukkfűolajok fő összetevője a timol volt, függetlenül a begyűjtési időtől és a növény nedvességtartalmától. A legmagasabb timoltartalom (62,4%) a teljes virágzás időszakában és szárított növényi anyagokból volt kimutatható. A teljes virágzásban gyűjtött friss növényi anyagban a timol 57,1%-os értéket mutatott. Az alacsonyabb timoltartalmat a virágzás végén gyűjtött növényi anyagokban mértük (friss minta: 54,2%, szárított minta: 52,3%). A timol mellett jelentős mennyiségben van jelen a *p*-cimén és a  $\gamma$ -terpinén. A legmagasabb *p*-cimén értéket (22,7%) a szárított növényi anyagból desztillált és a virágzás végén gyűjtött illóolajokban mutattuk ki, de ez a komponens az ugyanebben a fenofázisban gyűjtött friss növényi anyagban is jelentős mennyiségben jelen volt (20,6%). A  $\gamma$ -terpinén-tartalom a friss anyagból izolált és a virágzás kezdetén gyűjtött illóolajokban (9. táblázat) volt a legmagasabb. Egyéb kisebb összetevők közé tartozik a mircén (0,7%-1,4%), az  $\alpha$ -terpinen (0,7%-1,4%), a linalool (1,4%-2,1%), a karvakrol (2,3%-3,4%) és az (*E*)-kariofillén (1,5%-2,5%).

**9. táblázat** Különböző virágzási fenofázisokban gyűjtött friss és szárított kakukkfűből kivont illóolaj minták (terület) százalékos összetétele

Komponensek	MS Sim (%)	LRI Exp	LRI Ref	1	2	3	4	5	6
$\alpha$ -Tujon	98	925	927	0,99	1,09	0,99	0,46	0,21	0,37
Mircén	96	988	991	1,45	1,34	1,28	1,17	0,71	0,84
$\alpha$ -Terpinén	98	1017	1018	1,40	1,09	0,82	1,15	0,74	0,79
$p$ -Cimén	96	1025	1025	12,89	17,44	20,64	12,46	15,02	22,78
$\gamma$ -Terpinén	95	1058	1058	15,18	7,38	6,01	13,67	5,06	5,49
Linalool	97	1099	1101	1,46	1,56	2,15	1,69	1,67	2,17
Timol	94	1294	1293	55,81	57,10	54,21	56,39	62,46	52,33
Karvakrol	94	1302	1300	2,30	2,92	2,90	2,98	3,48	3,11
( <i>E</i> )-Kariofilén	97	1421	1424	0,99	2,05	0,99	2,15	2,50	2,44
Teljes				99,77	99,76	99,65	99,69	99,69	99,49

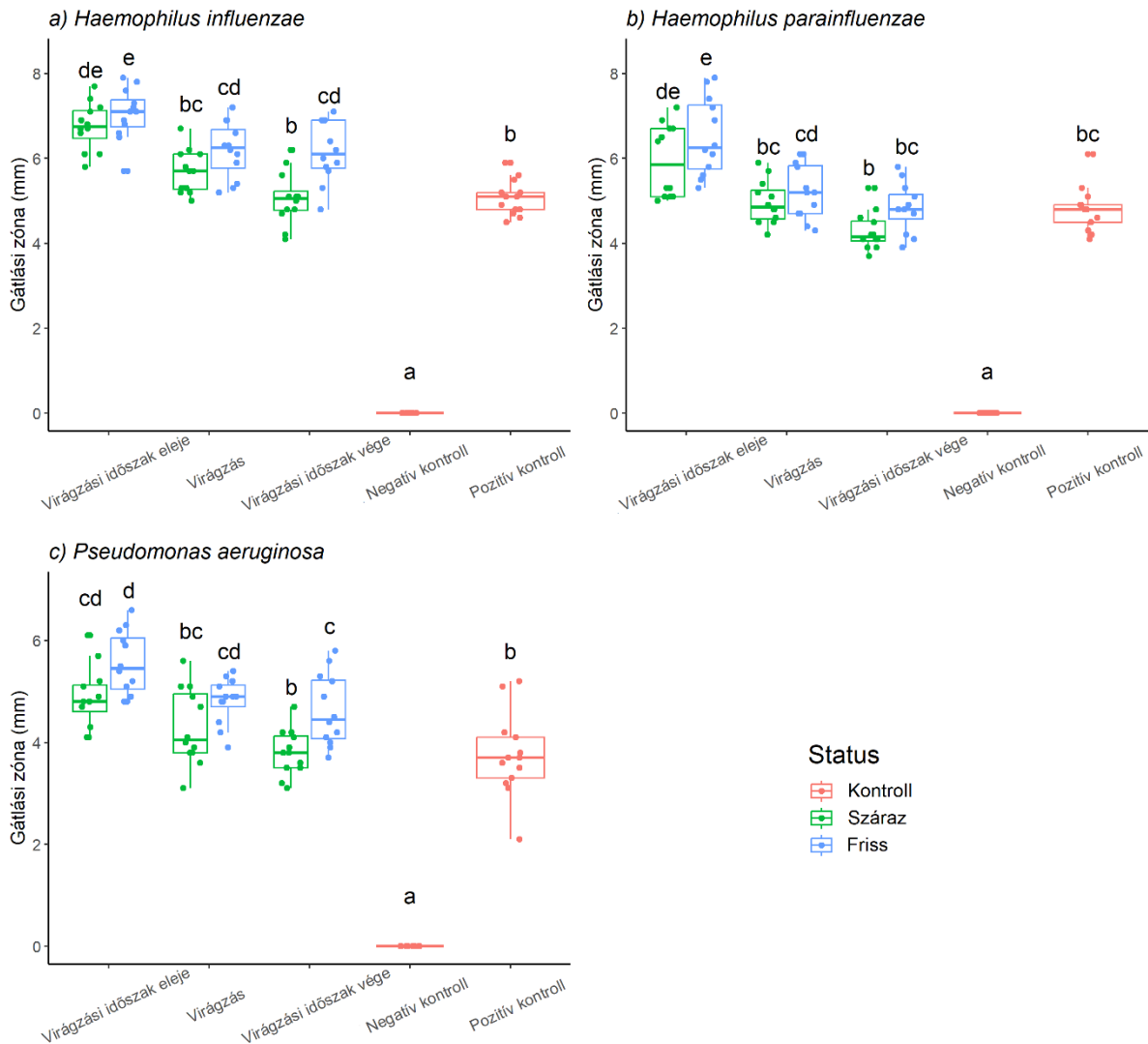
Rövidítések: MS Sim, MS spektrum hasonlóság (MS spectral similarity); LRI Exp, kísérleti lineáris retenciós index (experimental linear retention index); LRI ref, referencia lineáris retenciós index (reference linear retention index); 1. Virágzás kezdetén gyűjtött friss növényi anyag, 2. Teljes virágzásban gyűjtött friss növényi anyag, 3. Virágzás végén gyűjtött friss növényi anyag, 4. Virágzás kezdetén gyűjtött szárított növényi anyag, 5. Teljes virágzásban gyűjtött szárított növényi anyag, 6. Virágzás végén gyűjtött szárított növényi anyag. A táblázatból az 1% arányt el nem érő komponenseket nem tartalmazza. A teljes táblázatot a 2. melléklet tartalmazza.

### 5.3.3 TLC-DB vizsgálatok eredményei

A TLC-DB módszerrel a kakukkfű illóolajok antibakteriális hatását vizsgáltuk *Haemophilus* spp. és *P. aeruginosa* baktériumtörzsekkel szemben. A kísérleteket először kromatográfiás elválasztás nélkül végeztük. A komponensek szeparációja nélküli vizsgálatok során (15. ábra) a „teljes” extraktum (desztillált kakukkfű illóolaj) antibakteriális hatására voltunk kíváncsiak. A gátlási zónák átmérőjét mm-ben fejeztük ki. Az illóolajok törzsoldatából 1  $\mu$ l-t (0,2 mg hígítatlan olajnak felel meg) vittünk fel a TLC lemezre. A *Haemophilus* spp. érzékenyebb volt a kakukkfű olajára, mint a *P. aeruginosa*. Az abszolút etanol negatív kontrollként nem gátolta egyik baktériumtörzs növekedését sem. Az antibiotikum minta 1  $\mu$ l-es oldata (ceftriaxon *Haemophilus* spp.

ellen, gentamicin *P. aeruginosa* ellen) hatásos volt a vizsgált baktériumokkal szemben. Általánosságban elmondható, hogy a friss növényi anyagokból származó kakukkfűolajok nagyobb antibakteriális aktivitást mutattak, mint a szárított növényi anyagokból származó kakukkfűolajok. A friss növényből desztillált és a virágzás kezdetén gyűjtött kakukkfű illóolaj bizonyult a leghatékonyabbnak a vizsgált patogénekkal szemben: (*Haemophilus influenzae* - 7,04 mm, a *H. parainfluenzae* - 6,5 mm és a *P. aeruginosa* - 5,5 mm). A friss növényi anyagból desztillált, a teljes virágzás idején és a virágzás végén gyűjtött kakukkfű illóolajoknak is volt antibakteriális hatása (teljes virágzásban: *H. influenzae* - 6,3 mm, *H. parainfluenzae* - 5,2 mm, *P. aeruginosa* - 4,9 mm; virágzás végén: *H. influenzae* - 6,15 mm, *H. parainfluenzae* - 4,8 mm, *P. aeruginosa* - 4,5 mm). A legkisebb gátlási zónákat szárított anyagból desztillált és a virágzás végén gyűjtött illóolajok esetén kaptuk (*H. influenzae* - 5 mm, *H. parainfluenzae* - 4,8 mm, *P. aeruginosa* - 3,7 mm). Összességében levonhatjuk a következtetést, hogy a friss növényi mintákból desztillált illóolajok hatékonyabbnak bizonyultak, mint a szárított növényi anyagokból származók. Továbbá a virágzási fenofázis tekintetében a virágzás kezdetén gyűjtött növényi anyagok illóolaja volt a leghatékonyabb. Az antibiotikum kontrollok hatékonyabbak voltak, mint a kakukkfű illóolaj mintái a vizsgálatban használt koncentrációkkal. A legjobb antibakteriális hatást a virágzás kezdetén gyűjtött minták mutatták. Ennek oka valószínűleg az illóolajok komponenseinek additív és szinergikus hatása lehetett (Sovilj M et al., 2011; Zhao & Zhang, 2013). A timol és a *p*-cimén antibakteriális hatását Gömöri és munkatársai külön-külön és kombinációban is vizsgálta. A timol önmagában nagyobb antibakteriális hatást mutatott, mint a *p*-cimén önmagában vagy a két komponens bármilyen arányú kombinációja. A csökkent timol- és megnövekedett *p*-cimén- és  $\gamma$ -terpinén tartalmú illóolajok azonban egyes esetekben magasabb antimikrobiális aktivitást mutataak (Gömöri et al., 2018). Ezt az általunk kapott eredmények is alátámasztják.

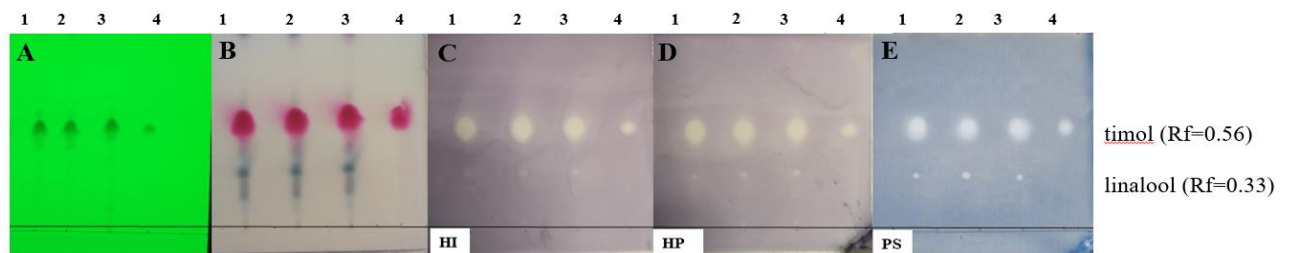




**15. ábra** TLC-DB-vel végzett kakukkfű illóolajok antibakteriális aktivitása (TLC kromatográfias kifejlesztés nélkül). A gátlási zónák átmérőjét mm-ben fejeztük ki. Negatív kontroll: abszolút etanol; pozitív kontroll: ceftriaxon a *Haemophilus* spp. ellen, gentamicin a *P. aeruginosa* ellen (0,04 mg antibiotikumnak felel meg); 1 µl illóolajmintát (amely 0,2 mg hígítatlan EO-nak felel meg) alkalmaztunk. A kisbetűk (a–e) páronkénti összehasonlítást mutatnak a Tukey post-hoc teszt alapján,  $p < 0,05$ .

A TLC-DB kromatográfias elválasztást követően alkalmas arra, hogy az antibakteriálisan aktív komponensek hatását egymástól szeparáltan tudjuk vizsgálni. Az elválasztás nélküli TLC-DB kísérleteket előzetes szűrőnek tekintettük. Az eredménye alapján csak a friss növényi anyagból desztillált illóolajokat vontuk be a kromatográfias elválasztással végzett TLC-DB-be. A kakukkfű illóolajokban a timol komponens ( $R_f = 0,56$  mellett), valamint annak standardja az összes vizsgált baktérium ellen mutatott aktivitást.  $R_f = 0,33$  értéken további biológiai aktivitást detektáltunk. Ez megegyezik a

linalool Rf értékével Wagner és Bladt (Wagner & Bladt, 2001) alapján (16. ábra). Mivel a linalool relatív mennyisége alacsony volt a mintákban (1,56%-2,17%), koelúcióra gyanakszunk más antibakteriálisan aktív komponensekkel.



**16. ábra** Antibakteriálisan aktív komponensek a friss növényi anyagból desztillált kakukkfű illóolajokban kromatográfias elválasztást követően. (A) TLC lemez UV 254 nm-en, (B) TLC lemez vanillin-kénsav reagenssel végzett kezelés után és látható fényben dokumentálva, (C) TLC-DB vizsgálat: Bioautogramok *H. influenzae* használatával, (D) TLC-DB vizsgálat: Bioautogramok *H. parainfluenzae* használatával, (E) TLC-DB vizsgálat: Bioautogramok *P. aeruginosa* felhasználásával (a világos zónák antibakteriális hatást jeleznek)

#### 5.3.4 Minimális gátló koncentrációk (MIC) meghatározásának eredménye

A TLC-DB eredmények alapján csak a friss növényi anyagokból desztillált kakukkfű illóolaj mintákat használtuk fel ebben a vizsgálatban és a biofilm-gátlást vizsgáló kísérletekben. A kakukkfű illóolaj kezelésre legérzékenyebb törzsek a *H. influenzae* és a *H. parainfluenzae* voltak. Növekedésüket az illóolajok 0,156-0,187 mg/ml MIC értékeken gátolták (10. táblázat). A *P. aeruginosa* esetében magasabb, 1,5-1,75 mg/ml MIC értékeket mértünk. A leghatékonyabb illóolaj a virágzás kezdetén gyűjtött növényi anyagból desztillált volt. A biofilm-gátlást vizsgáló kísérletben MIC/2 értékeket használtunk (Kerekes et al., 2013).

**10. táblázat** A kakukkfű illóolajok MIC és MIC/2 értékei (mg/ml) és az antibiotikumok (gentamicin és amikacin) MIC és MIC/2 értékei (µg/ml)

	<b>Gyűjtési időszak</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>MIC érték</b>	Virágzás kezdete	0,156	0,156	1,500
	Teljes virágzás	0,187	0,187	1,750
	Virágzás vége	0,187	0,187	1,750
<b>MIC/2 érték</b>	Virágzás kezdete	0,078	0,078	0,750
	Teljes virágzás	0,0935	0,0935	0,875
	Virágzás vége	0,0935	0,0935	0,875
<b>MIC érték</b>	Gentamicin	---	---	6,30
	Amikacin	3,10	1,60	---
<b>MIC/2 érték</b>	Gentamicin	---	---	3,15
	Amikacin	1,55	1,30	---

**1:** *H. influenzae*, **2:** *H. parainfluenzae*, **3:** *P. aeruginosa*

### 5.3.5 Biofilm vizsgálat eredményei

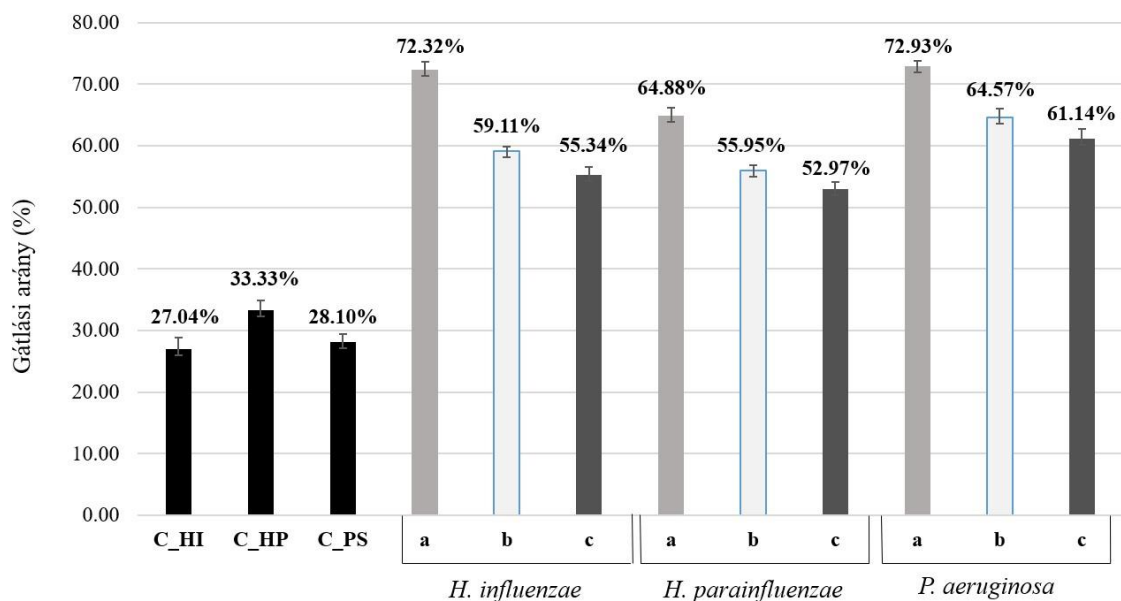
A biofilm gátlási vizsgálatban az illóolaj minták aktivitását a gátlási ráta mutatja meg, melyet a következő egyenlet alapján számoltunk:

$$\text{Gátlási ráta} = \left(1 - \frac{S}{C}\right) * 100 \quad \text{6. egyenlet}$$

Ahol:

- S = minták abszorbanciájának átlaga;
- C = a kontrol minta átlagos abszorbanciája

Eredményeink azt mutatták, hogy mindegyik frissen gyűjtött kakukkfű illóolaj minta gátolja a biofilm képződést (17. ábra). A virágzás kezdetén gyűjtött, friss kakukkfűből desztillált illóolaj volt a leghatékonyabb az összes vizsgált baktérium ellen. Ez az olaj mutatta a legmagasabb gátlást, 72,93%-ot *P. aeruginosa* ellen. A *H. influenzae* és a *H. parainfluenzae* esetében 72,32%-os és 64,88%-os gátlási rátát számoltunk.

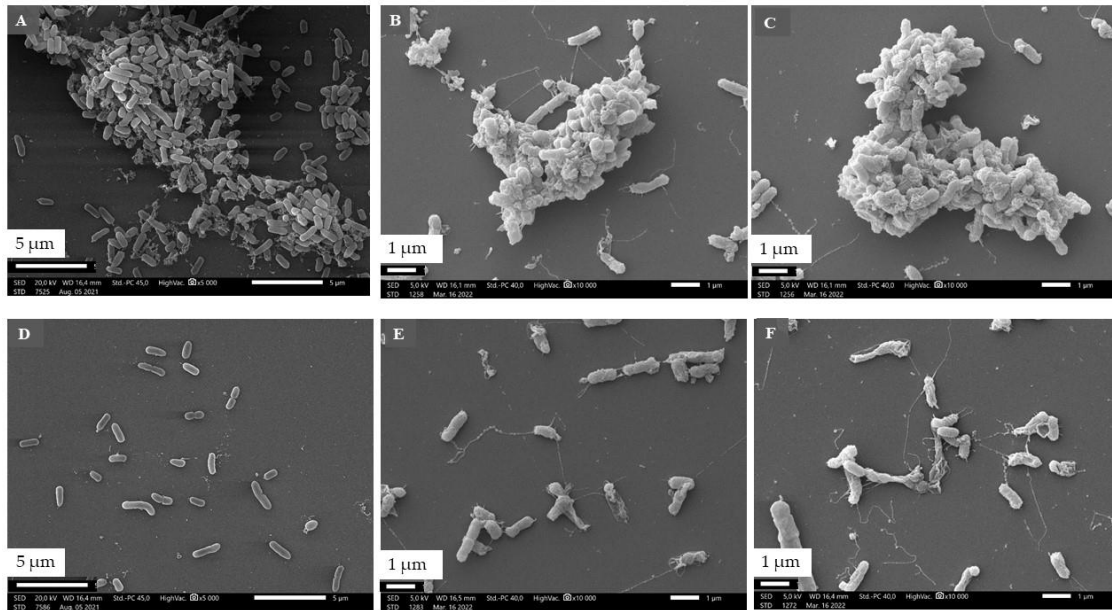


**17. ábra** Friss növényi anyagból és különböző virágzási fenofázisokban gyűjtött kakukkfű mintákból desztillált illóolajok biofilmgátló hatása. a: virágzási időszak elején gyűjtött növényből származó illóolaj, b: teljes virágzás időszakában gyűjtött növényből származó illóolaj, c: virágzási időszak végén gyűjtött növényből származó illóolaj.

### 5.3.6 SEM vizsgálatok eredményei

A TLC-DB és a biofilm-gátlást vizsgáló kísérletek eredményeire alapozva a SEM vizsgálatba csupán a virágzási időszak kezdetén gyűjtött és friss kakukkfűből desztillált illóolajat vontuk be.

A kontroll minták képei (illóolaj-kezelés nélkül, 18. ábra A-C) egy érett, háromdimenziós biofilm jellegzetes morfológiai elemeit mutatják. Az illóolaj kezelés (18. ábra D-F) azt eredményezte, hogy a baktériumsejtek a felülethez tapadtak, de nem alkottak biofilm-specifikus struktúrákat. Illetve sejtfal-degradációkat is megfigyelhettünk.



**18. ábra** *P. aeruginosa* (A, D), *H. influenzae* (B, E) és *H. parainfluenzae* (C, F) biofilmjeinek pászttázó elektronmikroszkópos felvételei. A-C: A baktériumtörzsek kontroll mintái: A - *P. aeruginosa*, B - *H. influenzae*; C - *H. parainfluenzae*. D-F: illóolajjal kezelt minták (MIC/2 koncentrációban): D - *P. aeruginosa*, E - *H. influenzae*; F - *H. parainfluenzae*

#### 5.4 Checkerboard-titrálás

A minimális gátló koncentráció méréseinkre alapozva checkerboard-titrálás módszerével végeztünk szinergiaméréseket. Az aminoglikozidok közé tartozó antibiotikumok (gentamicin, amikacin) és kakukkfű illóolaj-kombinációinak antibakteriális hatását vizsgáltuk Gram-negatív légúti patogéneken. A vizsgálathoz a virágzás kezdetén gyűjtött és frissen desztillált illóolaj mintákat használtuk fel. Az eredményeket FIC indexértékeként (FICI) ábrázoltuk. Az eredmények összefoglalását a 11. táblázat tartalmazza. A *H. influenzae* esetében nem tapasztaltunk kölcsönhatást, azonban a *H. parainfluenzae* esetében már additív hatás tapasztalható. A *H. parainfluenzae* esetében az illóolaj MIC/4 koncentrációja és az amikacin MIC/2 koncentrációja elegendő volt a 90%-os baktérium pusztulás eléréséhez. Tehát az illóolaj egyértelműen segítette az antibiotikum hatékonyságát, de ez a hatás még nem nevezhető szinergizmusnak, a FICI értékelés alapján. Azonban *P. aeruginosa* esetében már egyértelműen szinergista hatás látható. A megfelelő hatás eléréséhez elegendő volt mind a két komponens MIC/4 koncentrációját kombinálni.

**11. táblázat** Kombinációs vizsgálatok eredményei

Kombináció		MIC mg/ml		MIC µg/ml		FICI	Baktérium
		Komponens 1		Komponens 2			
Komponens 1	Komponens 2	MIC <sub>A</sub>	MIC <sub>B</sub>	MIC <sub>A</sub>	MIC <sub>B</sub>		
Kakukkfű olaj	Amikacin	0,156	0,078	3,100	1,550	1,00	<i>H. influenzae</i>
Kakukkfű olaj	Amikacin	0,156	0,039	1,600	0,800	0,75	<i>H. parainfluenzae</i>
Kakukkfű olaj	Gentamicin	1,500	0,375	6,300	1,575	0,49	<i>P. aeruginosa</i>

FICI: fracionális gátló koncentráció index;  $0,5 < \text{FICI} < 1$  közötti érték esetén additívnak,  $\text{FICI} > 4$  esetén antagonistának tekintettük a kombinációt. Ha a FICI 1 és 4 közé eső érték, a komponensek között nem volt kölcsönhatás kimutatható.

## 6 Diszkusszió

Balázs és munkatársai által kidolgozott TLC-DB módszer alkalmasnak bizonyult hidrofil minták, pl. illóolajok, *Haemophilus* spp.-al szembeni aktivitás vizsgálatára (Balázs et al., 2019). Az összegyűjtött tapasztalatok felhasználásával a módszert az MRSA és a *P. aeruginosa* törzsekkel is elvégeztük, különös figyelmet fordítva a korábban kritikusnak talált paraméterekre (pl. inkubációs idő, a baktérium tenyésztéséhez szükséges agar összetétele stb.). Ezen paraméterek jelentősen befolyásolhatják a TLC-DB módszer hatékonyságát és ismételhetőségét (Horváth et al., 2013). A módszer univerzális alkalmazhatóságát bizonyítja, hogy két egymástól eltérő típusú növényi kivonaton is sikerrel tudtuk alkalmazni. Kakukkfű esetén vízgőz-desztillációval nyert illóolaj minták, a muskotályzsálya esetében pedig a szuperkritikus folyadék extrakcióval nyert minták antibakteriális hatását értékeltük. A TLC-DB egy dinamikusan fejlődő módszer. Napjainkban a SARS-CoV-2 elleni növényi hatóanyagok felderítésére és azonosítására alkalmazzák széles körben (Wang et al., 2021).

Az irodalmi adatokat tekintve SC-CO<sub>2</sub> extrakciót a mi kutatócsoportunk optimalizált először válaszfelület-modellezés (RSM) segítségével a kivonatok biológiai hatékonysága szempontjából. Alkalmaztak már sikeresen RSM módszert muskotályzsálya extrakciójának optimalizálására, de abban az esetben antioxidánsok dúsítása volt a cél az extraktumban (Chadni et al., 2023; Gülçin et al., 2004; Mahboubi, 2020). Számunkra az antibakteriális hatás volt az elsődleges szempont, de a metodikát úgy alkottuk meg, hogy a hozamok is számolhatók maradjanak. Az antibakteriális hatást a gátlási zóna átmérőjében (mm) fejeztük ki. Ezáltal egyetlen számmal jellemezhetővé vált ez a hatás és később könnyedén bevihető volt a statisztikai programba. A vizsgálati modell tervezésekor a minél részletgazdagabb eredmények érdekében egy teljes faktoriális modellt választottunk, ami három paraméter és három beállítási szint vizsgálata esetén 27 különböző beállítást jelentett. A gyakorlatban részfaktoriális modellek segítségével a kísérletek száma nagymértékben csökkenthető (Moghadam & Samimi, 2022). Vizsgálatunk során az extraktumok modellbaktériumokkal szembeni biológiai aktivitását tekintettük a fő minőségi jellemzőnek. Azért ezeket a baktériumokat választottuk modellbaktériumként, mert egyrészt korábban már bizonyították, hogy a muskotályzsálya extraktumok hatékonyak ellenük (Mahboubi, 2020), másrészt a légúti betegségek sok embert érintenek világszerte. Több olyan tanulmány is megtalálható, ahol a kivonatok kémiai összetételét hasonlították össze annak függvényében, hogy

hidrodesztillációval vagy SC-CO<sub>2</sub> extrakcióval készítették őket. Majd következtetéseket vontak le a két extrakció közti különbségekre. Az eredmények azonban sok esetben ellentmondásosak. Ronyai és munkatársai azt találták, hogy a vízgőz-desztillációval előállított olaj egyik fő komponense a linalil-acetát mennyisége magasabb arányban van jelen (10,3%), mint az SFE-kivonatban (8,2%) (Ronyai et al., 1999). Egy másik kutatásban azonban éppen ellenkező trend figyelhető meg. A linalil-acetát mennyisége a hidrodesztillált olajban 15,9%, az SFE-kivonatban pedig 23,6% volt (Simandi et al., 1996). Az eltérés oka, hogy az SC-CO<sub>2</sub> extrakció során eltérő műveleti paramétereket alkalmaztak. Összehasonlítás csak azonos műveleti paraméterek mellett lehetséges. Eredményeink is alátámasztják, hogy a SC-CO<sub>2</sub> extrakció egy jól kontrollálható kivonási folyamat, amelyben a műveleti paraméterek megválasztása kritikus hatással van az extraktumra. Nem könnyű összefüggéseiben szemlélni a paraméterek kölcsönhatásait. Eredményeink azt mutatják, hogy erre kiváló eszköz a statisztikai modellezés. Kísérleteink során a vizsgált légúti kórokozókkal szemben 3 kritikus paraméter hatását sikerült modelleznünk RSM segítségével.

Eredményeinkből látható, hogy a nyomás növelése jótékony hatással van a biológiai aktivitásra. A küszöb, ahol a muskotályzsálya kivonat biológiailag aktív komponensei kioldódni kezdenek az extraháló folyadékba, 10 mPa nyomás felett kezdődik. Számítottunk rá, hogy a nyomás növelésével az aktív komponensek is feldúsulnak a mintában. Korábbi tanulmányok arra a következtetésre jutottak, hogy a nyomás növekedésével a folyadék sűrűsége is nő, ami az apoláris komponensek oldhatóságának növekedését eredményezi. (Ixtaina et al., 2010; Sodeifian et al., 2017). A magasabb nyomástartomány másik pozitív tulajdonságaként említik, hogy a SC-CO<sub>2</sub>-ből kisebb térfogat is elegendő az extrakcióhoz, mert sok esetben növeli a hozamot (Mcnally & Wheeler, 1988). Mindkét tesztbaktérium esetében a modellezés azt mutatja, hogy az alacsony, 40°C körüli hőmérséklet előnyös az antibakteriális aktivitás szempontjából. Korong diffúziós módszerrel vizsgálták kínai fahéj SC-CO<sub>2</sub> kivonatok antibakteriális hatását *P. aeruginosa* és *S. aureus* törzsekkel szemben. A vizsgálatok során arra a megállapításra jutottak, hogy a magas nyomáson és alacsony hőmérsékleten készült extraktumok antibakteriális hatása a legjobb a vizsgált baktériumtörzsekkel szemben (Capuzzo et al., 2013). Ezt a megállapítást a mi eredményeink is alátámasztják. Az alacsonyabb hőmérséklet a hődegradáció elkerülése szempontjából kedvező. (Fornari et al., 2012). Vízgőz-desztilláció alkalmazásakor ez a hatás elkerülhetetlen. Poláris társoldószer szükséges a nagyobb tömegű és polárisabb molekulák oldhatóságának



javításához. Ezen kívül a segédoldószer használata szintén csökkenthető, ha emeljük a hőmérsékletet (Shi et al., 2009).

Az SC-CO<sub>2</sub> extrakció során a fő műveleti paraméterek kombinációjának helyes megválasztása kritikus. Az extrakciós hozam és a zsályakivonat antibakteriális hatása az extrakció körülményeitől függően érzékenyen változtatható. Az extrakció során alkalmazott nyomás és hőmérséklet volt a legnagyobb hatással a végtermék minőségére. Az RSM lehetővé teszi az SC-CO<sub>2</sub> extrakció optimalizálását és a folyamat statisztikai alapon történő mélyebb megértését. Karnozin sav és karnozol SC-CO<sub>2</sub> extrakciós hozamának optimalizálására már sikeresen alkalmazták az RSM-et orvosi zsályából. A kivonatok azonban csak *Bacillus subtilis*-el szemben voltak hatékonyak, *S. aureussal* és *P. aeruginosa*-val szemben nem érték el az elvárt hatást. A növényi extraktumok hatása összetett, egy-egy komponens koncentrációjából nem mindig lehet helyes következtetést levonni. Ebből kifolyólag jó megoldásnak tartjuk az antibakteriális hatás alapján optimalizálni az extrakciót. Az általunk használt modell a következő eredményeket prediktálta: *P. aeruginosa*: 7,95 mm, MRSA: 7,51 mm. 3,64 m/m%-os hozam mellett.

Az illóolaj-tartalmú gyógynövények termesztése világszerte egyre nagyobb méreteket ölt. A gyógynövények termőföld specifikus elemzése, tudományos értékelése nagyon üdvözlendő és értékes adatokkal szolgál a növények begyűjtésének időzítésével kapcsolatban. Eredményeink bizonyítják, hogy a kakukkfű illóolájának kémiai összetétele és biológiai aktivitása is eltérő a különböző virágzási fenofázisokban. Vizsgálatunk során Magyarországon, Baranya megyében termesztett, eltérő időpontban gyűjtött kakukkfű mintákból kivont illóolaj mintákat elemeztünk. Kutatócsoportunk értékelte és hasonlította össze először régióink ezen területén, a különböző virágzási fenofázisban gyűjtött kakukkfű mintákból kivont illóolaj minták antibakteriális hatását. A kakukkfű hazánkban kedvelt gyógynövény, termesztéséhez az éghajlati viszonyok kedvezőek. A GC-MS és GC-FID eredmények alapján az illóolaj mintákban a timol volt a fő komponens, de jelentős mennyiségben *p*-cimén és *γ*-terpinen vegyületek szintén jelen voltak, amely megfelel az irodalomban eddig közölt adatokkal (Posgay et al., 2022). A TLC-DB vizsgálatok alapján a kakukkfű illóolaj mintái minden vizsgált baktérium ellen hatékonyak voltak. A *Haemophilus* spp. érzékenyebb volt az illóolajokkal szemben, mint a *P. aeruginosa*. Általánosságban elmondható, hogy a friss növényi mintákból desztillált illóolajok hatékonyabbnak bizonyultak, mint a szárított növényi anyagokból desztillált minták. Ez megegyezik a korábbi tapasztalatokkal (Chan et al., 2012). A különböző fenofázisban gyűjtött kerti kakukkfű mintákat túlnyomórészt illóolaj és

timol hozamuk alapján értékelték. Korábbi eredmények azt mutatták, hogy vagy a teljes virágzási fázisban a legmagasabb az illóolaj timol aránya, vagy nincs szignifikáns különbség (Hosseinzadeh et al., 2015; Kuete, 2017; Salehi & Hadipanah, 2014). Ez egybevág az általunk kapott eredményekkel. Mintáinkban a kakukkfű illóolajok fő összetevője a timol volt, azonban ez a vegyület nem kizárólagosan felelős a biológiai hatásért. Az aktív komponensek aránya a szárított és a frissen desztillált minták esetében hasonlóan változott (Pandur et al., 2022). A *p*-cimén aránya például a virágzás kezdetén és fővirágzáskor alacsonyabb volt a friss és a szárított minták esetében is, mint a virágzás végén gyűjtött mintákban. A legmagasabb timoltartalmat a teljes virágzási időszakban szedett és frissen feldolgozott (9. táblázat) mintákból mértük. A  $\gamma$ -terpinen aránya az illóolajokban a virágzás kezdetén majdnem háromszor olyan magas volt, mint a későbbi virágzási fenofázisokban gyűjtött minták esetén. A legjobb antibakteriális hatást a virágzás kezdetén gyűjtött minták mutatták. Ennek oka valószínűleg az illóolajok komponenseinek additív és szinergikus hatása lehetett (Sovilj M et al., 2011; Zhao & Zhang, 2013). A timol és a *p*-cimén antibakteriális hatását Gömöri és munkatársai külön-külön és kombinációban is vizsgálta. A timol önmagában nagyobb antibakteriális hatást mutatott, mint a *p*-cimén önmagában vagy a két komponens bármilyen arányú kombinációja. A csökkent timol- és megnövekedett *p*-cimén- és  $\gamma$ -terpinén tartalmú illóolajok azonban egyes esetekben magasabb antimikrobiális aktivitást mutatnak (Gömöri et al., 2018). Ezt az általunk kapott eredmények is alátámasztják.

Esetünkben a  $\gamma$ -terpinén aránya jelentősen megnőtt a virágzás kezdetén gyűjtött növényi anyagokban. Azonban a timoltartalom kissé alacsonyabb volt, mint a teljes virágzáskor. A  $\gamma$ -terpinén magas aránya a virágzás kezdeti szakaszában logikus, mivel a karvakrol bioszintézisének prekursor molekulája. A linaloolt is azonosítottuk aktív összetevőként a TLC-DB segítségével, amely kapcsolódik a kromatográfiás elválasztáshoz. A „Ph.Eur. 01/2012:1374 Thyme oil” című cikkely részletezi a kakukkfű illóolajának kémiai összetételét, különös tekintettel fő komponenseire. A gyógyszerkönyvi előírás szerint a  $\gamma$ -terpinén aránya nem haladhatja meg a 12%-ot az olajban. Csak a virágzás kezdetén gyűjtött növényi minta esetében volt magasabb a  $\gamma$ -terpinén-tartalom (13,67%), amely a legjobb antibakteriális hatást mutatta. Valójában majdnem minden minta magas timoltartalommal rendelkezik, mivel a gyógyszerkönyvi cikkelyben a felső határérték 55%. Az egyetlen minta, amely megfelel a gyógyszerkönyv kémiai összetételre vonatkozó követelményeinek, a virágzás végén gyűjtött növényi

minták olaja. Bár meg kell jegyezni, hogy a TLC-DB vizsgálat során elválasztás nélkül, a virágzás végén gyűjtött minták mutatták a legalacsonyabb antibakteriális hatást.

Több tanulmány összehasonlította a különböző kemotípusokkal rendelkező *Thymus* sp.-et. A kakukkfű minták antimikrobiális aktivitását különböző kórokozókval szemben vizsgálták, beleértve a *P. aeruginosa* és a *Haemophilus* spp-t (Althunibat et al., 2016; Wińska et al., 2019). Két kemotípus, a *Thymus vulgaris* timol és a *T. vulgaris* karvakrol, mutatta a legerősebb antibakteriális hatást ezekkel a baktériumokkal szemben. A geraniol és a thujanol-4/terpineol-4 kemotípusok kevésbé voltak hatékonyak a *P. aeruginosa*-val szemben (Schmidt et al., 2012). Az eredményeink alátámasztják az előző eredményeket, amelyek szerint a kakukkfű illóolaj a timol kemotípusban hatékony a tesztelt baktériumokkal szemben.

Kutatócsoportunk alátámasztotta már a kakukkfű biofilm képződést gátló képességét (Balázs et al., 2019; Horváth et al., 2019) *Haemophilus* spp. és *Streptococcus* törzsekkel szemben, azonban *P. aeruginosa*-val szemben még nem. Valamint nem ált rendelkezésünkre olyan irodalom, ami a virágzási fenofázisok aspektusából vizsgálta volna a gátló hatást. Míg az antibiotikumok elpusztítják a szabadon lévő plankton sejteket, a biofilmben lévő baktériumok képesek túlélni, illetve krónikus és antibiotikum-rezisztens fertőzéseket okozni (Balázs et al., 2021; Hammond et al., 2014). Ezek a tulajdonságok elősegítik a mikrobiális túlélést antagonista környezetben, beleértve a gyógyszer- és a gazdaszervezet immunválaszával szembeni rezisztenciát (Das, 2019). A *P. aeruginosa*-val kapcsolatban kimutatták, hogy nő azon tüdőfertőzések virulenciája, amelyek során orális konvencionális organizmusok és a *P. aeruginosa* közötti kölcsönhatások következtében létrejött biofilm is jelen volt (Sibley et al., 2008). A kakukkfű illóolaja csökkenti a bakteriális sejtmembránok hidrofóbicitását, valamint a proteináz és hemolizin termelést, ezáltal megakadályozza a bakteriális biofilm képződését. Vizsgálatok igazolták, hogy a kakukkfű illóolaj alacsony koncentrációban képes gátolni a *P. aeruginosa* biofilm képző képességét, függetlenül az izolálás helyétől és a törzs antibiotikum-rezisztenciájától, amelyet a mi eredményeink is alátámasztanak (Van et al., 2022). *Haemophilus* spp. törzsek érzékenységét kakukkfű illóolajjal szemben más kutatócsoportok is leírták (Balázs, 2022). A *H. influenzae*-t és a *P. aeruginosa*-t egyre gyakrabban izolálják nozokomiális infekciók során. Kevert fertőzések *in vitro* körülmények között kiegészítették egymás hiányosságait és egyfajta szinergista kevert biofilmet hoztak létre (Liu et al., 2010). Ezért kiemelten fontos, hogy a hagyományos antibiotikum terápiát kiegészítsük biofilm gátlására alkalmas gyógymódokkal.

A *Haemophilus* spp. és *P. aeruginosa* biofilm formáló képessége fontos szerepet játszik az általuk okozott betegség patomechanizmusában és az antibiotikum-rezisztens tulajdonság kialakulásában. A biofilm gátlási vizsgálat eredményei kiegészítik a TLC-DB vizsgálatból levont konklúziókat, ugyanis mindkét kísérletben a friss növényi anyagból desztillált és a virágzás kezdetén gyűjtött kakukkfű illóolaj minta volt a leghatékonyabb az összes vizsgált baktériummal szemben. Kerekes és munkatársai eredményeihez hasonlóan konfokális lézer pásztázó elektronmikroszkóppal megjelenített SEM képeink is azt mutatták, hogy az érett biofilm háromdimenziós szerkezete szétesett a illóolaj kezelést követően (Kerekes et al., 2019).

A kombinációs vizsgálatok során sikerült feltárnunk szinergista hatásokat, amelyek a későbbi fejlesztések során hasznosak lehetnek. A kísérletbe a virágzás elején gyűjtött kakukkfű illóolaját vontuk be. Kombinációként pedig aminoglikozidok közé tartozó antibiotikumokat, gentamicint és amikacint választottunk. Tesztbaktériumok pedig a biofilmvizsgálatok során használt Gram-negatív baktériumok voltak. Polikationos szerkezetüknek köszönhetően az aminoglikozidok először a baktériumok felszínén található anionos vegyületekhez tudnak kötődni. Gram-negatív baktériumok esetén ezek a vegyületek lipopoliszacharidok, foszfolipidek és a külső membrán fehérjék lehetnek (Ramirez & Tolmasky, 2017). Ezek a kölcsönhatások növelik a külső lipid membrán permeabilitását, ami ahhoz vezet, hogy az aminoglikozid-molekulák passzív transzporttal juthatnak a periplazmatikus térbe (Vanhoof et al., 1995). Majd egy energiafüggő folyamatban, a működő elektrontranszport rendszer segítségével jutnak az antibiotikumok a citoplazmába. Ahol kapcsolódni tudnak a baktérium 30S kisalegységéhez és zavart okoznak a fehérjeszintézisben. Ennek következtében a membrán integritása további zavarokat szenved és öngerjesztő folyamatként a baktérium pusztulásához vezet (Muir et al., 1984; Ramirez & Tolmasky, 2017).

Azért választottuk a *T. vulgaris* illóolajának, amikacinnal és gentamicinnel való kombinációját *Haemophilus* spp és *P. aeruginosa*-val szemben, mert nem találtunk még erre vonatkozó kísérletet az irodalomban. Valószínűsítettük, hogy minél hatékonyabb a bakteriális sejtfal integritásának megzavarása, annál könnyebben keletkezhet zavar a fehérjék bioszintézisében és vezethet a baktériumsejt pusztulásához. A *Haemophilus* spp. eredendően érzékenyebbek voltak mind magával az amikacinnal szemben, mind pedig a kakukkfű illóolajával szemben. Ezért ezeknél a törzseknél találtuk a legkisebb kölcsönhatást. A *H. influenzae* esetében nem tapasztaltunk kölcsönhatást (FICI = 1), azonban a *H. parainfluenzae* esetében már additív hatás tapasztalható.

A *H. parainfluenzae* esetében az illóolaj MIC/4 koncentrációja és az amikacin MIC/2 koncentrációja elegendő volt a 90%-os baktérium pusztulás eléréséhez. Tehát az illóolaj egyértelműen segítette az antibiotikum hatékonyságát, de ez a hatás még nem nevezhető szinergizmusnak, a FICI értékelés alapján (FICI = 0,75). A *P. aeruginosa* azonban ellenállóbbnak bizonyult mind a gentamicinnel, mind pedig magával az illóolajjal szemben. Ebben az esetben valószínűleg a sejtfal integritásának felbontása szinergista hatást okozott. Azonban a megfelelő hatás eléréséhez elegendő volt mind a két komponens MIC/4 koncentrációját kombinálni. A FIC index ebben az esetben 0,49 volt. Korábban már a *Thymus* nemzetség olyan fajainak olaját is vizsgálták kombinációban gentamicinnel, amelyek timoltartalma alacsonyabb volt. Ezért néha értéktelenebbnek is tartják ezeket a fajokat, bár az eredmények ezt cáfolják. A *T. maroccanus* és a *T. broussonetii* esetében is egyértelműen szinergista hatást mutattak ki (FICI = 0,18 és FICI = 0,28) (Fadli et al., 2012). Eredményeink alátámasztják, hogy a *Thymus* nemzetség fajai értékes alternatívák lehetnek *P. aeruginosa* elleni gentamicin terápia esetén. Valamint, hogy a timoltartalom messze nem az egyetlen minőségi jellemzője az illóolaj antibakteriális hatásának.

## 7 Összefoglalás

Az antibiotikum-rezisztencia terjedése az egyik legnagyobb, még megoldatlan kihívás az egészségügy számára. A rezisztens baktériumok okozta fertőzések elhúzódó antibiotikum terápiákat igényelnek, amelyek csak tovább növelik a rezisztencia kialakulásának lehetőségét. Valamint jelentősen megnövelik a terápia költségeit. A helyzet súlyosságát mutatja, hogy a legújabb előrejelzések alapján az antibiotikum-rezisztens baktériumok okozta fertőzések 2050-re több áldozatot követelnek világszerte, mint az összes daganatos megbetegedés együttvéve (Shams et al., 2023). Az utolsó komoly áttörést pedig az antibiotikum terápiák területén 80-as évek végén érték el. A növényi kivonatok kiváló kiegészítői lehetnek a konvencionális antibiotikum terápiáknak, a megfelelő terápiás eljárások kidolgozását követően. Biofilm-gátló képességüknek köszönhetően megakadályozható lenne elhúzódó, perzisztens fertőzések kialakulása. Valamint hagyományos antibiotikumokkal kombinációban adagolva szinergista hatást fejthetnek ki. A terápiák kidolgozásához mindenképp megfelelő extrakciós módszerekre és standardizált *in vitro* vizsgálati módszerekre van szükségünk. Ugyanakkor állatkísérletes modellek is alátámasztották már a hatékonyságukat (Reichling, 2020). Munkánk során a muskotályzsálya és a kakukkfű megfelelő modellnövénynek bizonyultak.

Új tudományos eredményeinket az alábbiakban foglaljuk össze:

1. Meghatároztuk a muskotályzsálya extraktumok antibakteriális hatását TLC-DB módszerrel, *Haemophilus* spp., MRSA és *P. aeruginosa* törzsekkel szemben. MRSA baktériumtörzsek általánosságban kevésbé voltak érzékenyek, mint a *P. aeruginosa*. A legnagyobb átlagos gátlási zónát a hármaskör mintánál tapasztaltuk, 7,51 mm (SD = 0,85 mm) a *P. aeruginosa* és 7,57 mm (SD = 0,62 mm) az MRSA esetében. A mérések kis szórása stabil alapot nyújtott a későbbi 3D modell készítéséhez.

A *Haemophilus* törzsek érzékenyebbek voltak a kakukkfű olajára, mint a *P. aeruginosa*. A friss növényből desztillált és a virágzás kezdetén gyűjtött kakukkfű illóolaj bizonyult a leghatékonyabbnak a vizsgált patogénekkal szemben: (*Haemophilus influenzae* - 7,04 mm, a *H. parainfluenzae* - 6,5 mm és a *P. aeruginosa* - 5,5 mm). Az elválasztás nélküli TLC-DB kísérleteket előzetes szűrőnek tekintettük. Az eredmények alapján csak a friss növényi anyagból desztillált illóolajokat vontuk be a

kromatográfiás elválasztással végzett TLC-DB-be, amelynek során a timolt azonosítottuk, mint fő antibakteriális komponens.

2. Elsőként optimalizáltunk SC-CO<sub>2</sub> extrakciót antibakteriális hatás szempontjából válaszfelület-modellezés (RSM) segítségével. Eredményeink világosan mutatják, hogy a fő műveleti paraméterek kombinációjának helyes megválasztása kritikus az antibakteriális hatás szempontjából. Módszerünk nagy előnye, hogy az antibakteriális hatás meghatározása mellett az extrakciós hozam továbbra is számolható maradt. Az extrakció során alkalmazott nyomás és hőmérséklet volt a legnagyobb hatással a végtermék minőségére és mennyiségére. Az RSM lehetővé teszi az SC-CO<sub>2</sub> extrakció optimalizálását és a folyamat statisztikai alapon történő mélyebb megértését.

3. Elsőként végeztük el a Szigetvár mellett (Magyarország, Baranya megye, koordináták: (46°02060.0000 É, 17°47059.9900 K) található termőterületen termesztett kakukkfű illóolajának antibakteriális hatása szempontjából történő értékelését, figyelembe véve a virágzási fenofázisokat. A legjobb antibakteriális hatást a virágzás kezdetén gyűjtött minták mutatták. A hozameredmények alapján, a virágzás kezdetén történő betakarítás nem jár hozamvesztéssel a területen. A termelő komparatív előnyre tehet szert a versenytársakkal szemben, ha korábban megkezdheti a betakarítást.

4. Sikerült meghatároznunk virágzási fenofázisonként a *Thymus vulgaris* illóolajok kémiai összetételét. A virágzási fenofázisok egyértelműen hatással vannak a kakukkfű illóolajának kémiai összetételére és ezáltal az antibakteriális hatására is. A  $\gamma$ -terpinén aránya az olajokban a virágzás kezdetén majdnem háromszor olyan magas volt, mint a későbbi virágzási fenofázisokban gyűjtött minták esetén. A timol aránya a fővirágzás esetén gyűjtött minták esetén volt a legmagasabb. A csökkent timol- és megnövekedett *p*-cimén- és  $\gamma$ -terpinén-tartalmú minták nagyobb antibakteriális aktivitással rendelkeztek.

5. A biofilm vizsgálat segítségével bizonyítottuk, hogy mindegyik frissen gyűjtött kakukkfű illóolaj minta gátolja a biofilm képződést. A virágzás kezdetén gyűjtött, friss kakukkfűből desztillált illóolaj volt a leghatékonyabb az összes vizsgált baktérium ellen. Ez az olaj mutatta a legmagasabb gátló arányt, 72,93%-ot *P. aeruginosa* ellen. A *H. influenzae* és a *H. parainfluenzae* esetében 72,32%-os és 64,88%-os gátlási arányt számoltunk. A SEM vizsgálatok megerősítették, hogy a baktériumsejtek a felülethez tapadtak, de nem alkottak biofilmspecifikus struktúrákat. Illetve sejtfal degradációkat is megfigyelhettünk.

6. Először vizsgáltuk *Thymus vulgaris* illóolaját kombinációban amikacinnel és gentamicinnel *Haemophilus* spp. és *P. aeruginosa* törzsekkel szemben. Kombinációs vizsgálatokon keresztül sikeresen bizonyítottuk, hogy a kakukkfű illóolaja nem csupán a biofilmgátláson keresztül képesek segíteni az antibiotikumok hatását, hanem additív és szinergista hatások révén is. Gentamicin és kakukkfű illóolaj kombinációjával szinergista hatást mutattunk ki *P. aeruginosa*-val szemben.



## 8 Irodalomjegyzék

- Abreu A. C., McBain A. J., Simões, M. (2012): Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat Prod Rep.* 29(9): 1007-1021.
- Acimovic M., Kiproviski B., Rat M., Sikora V., Popovic V., Koren A., Brdar-Jokanovic, M. (2018): *Salvia sclarea*: Chemical composition and biological activity. *JATEM.* 1: 18-28.
- Algammal A. M., Hetta H. F., Elkelish A., Alkhalifah D. H. H., Hozzein W. N., Batiha G. E. S., Mabrok M. A. (2020): Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infection and Drug Resistance.* 13: 3255-3265.
- Aljaafari M. N., Alali A. O., Baqais L., Alqubaisy M., Alali M., Molouki A., Lim, S.H. E. (2021): An overview of the potential therapeutic applications of essential oils. *Molecules.* 26(3): 628.
- Allam N. G., Eldrieny E. A., Mohamed A. Z. (2015): Effect of combination therapy between thyme oil and ciprofloxacin on ulcer-forming *Shigella flexneri*. *JIDC.* 9(05): 486-495.
- Althunibat O. Y., Qaralleh H., Al-Dalin, S. Y. A., Abboud M., Khleifat K., Majali I. S., Jaafraa A. (2016): Effect of thymol and carvacrol, the major components of *Thymus capitatus* on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Pure. Appl. Microbiol.* 10(1): 367-374.
- Ács K., Balázs V. L., Kocsis B., Bencsik T., Böszörményi A., Horváth, G. (2018): Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC Complement. Altern. Med.* 18(1): 1-9.
- Balázs L. V. (2022). Illóolajok antibakteriális hatásának vizsgálata in vitro módszerekkel. Doktori értekezés. University of Pécs, Department of Pharmacognosy. Pécs.
- Balázs V. L., Horváth B., Kerekes E., Ács K., Kocsis B., Varga A., Horváth G. (2019): Anti-*Haemophilus* activity of selected essential oils detected by TLC-Direct Bioautography and biofilm inhibition. *Molecules.* 24(18): 3301.
- Balázs V. L., Nagy-Radványi L., Filep R., Kerekes E., Kocsis B., Kocsis M., Farkas Á. (2021): In vitro antibacterial and antibiofilm activity of Hungarian honeys against respiratory tract bacteria. *Foods.* 10(7): 1632.

- Barbieri R., Coppo E., Marchese A., Daglia M., Sobarzo-Sánchez E., Nabavi S. F., Nabavi S. M. (2017): Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiol Res.* 196: 44-68.
- Bas D., Boyaci I. H. (2007): Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.* 78(3): 836-845.
- Baser H. C. B. (2008): Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr. Pharm. Des.* 14: 3106-3119.
- Bassetti M., Vena A., Croxatto A., Righi E., Guery, B. (2018): How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context*, 7: 1-18.
- Becker K., Schaumburg F., Fegeler C., Friedrich A. W., Köck R., Study, P. M. (2017): *Staphylococcus aureus* from the German general population is highly diverse. *Int. J. Med. Microbiol.* 307(1): 21-27.
- Behzadi P., Baráth Z., Gajdács M. (2021): It's not easy being green: A narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics.* 10(1): 42.
- Bjarnsholt T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS.* 121: 1-58.
- Blaskó Á., Gazdag Z., Gróf P., Máté G., Sárosi S., Krisch J., Pesti M. (2017): Effects of clary sage oil and its main components, linalool and linalyl acetate, on the plasma membrane of *Candida albicans*: an in vivo EPR study. *Open J. Apoptosis.* 22(2): 175-187.
- Boncan D. A. T., Tsang S. S. K., Li C., Lee I. H. T., Lam H.-M., Chan T.-F., Hui J. H. L. (2020): Terpenes and terpenoids in plants: interactions with environment and insects. *Int. J. Mol. Sci.* 21(19): 7382.
- Bowler P., Murphy C., Wolcott R. (2020): Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? *Antimicrobial Resistance & Infection Control.* 9(1): 1-5.
- Bowler P. G., Duerden B. I., Armstrong D. G. (2001): Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(2): 244-269.
- Bowler P. G., Welsby S., Towers V., Booth R., Hogarth A., Rowlands V., Jones S. A. (2012): Multidrug-resistant organisms, wounds and topical antimicrobial protection. *Int. Wound J.* 9(4): 387-396.

- Box G., Behnken D. (1960): Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*. 2(4): 455-475.
- Brauner A., Fridman O., Gefen O., Balaban N. Q. (2016): Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* 14(5): 320-330.
- Breeuwer P., Drocourt J., Rombouts F. M., Abee, T. (1996): A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6-)-carboxyfluorescein succinimidyl ester. *AEM*. 62(1): 178-183.
- Burger P., Plainfossé, H. Brochet X., Chemat F., Fernandez X. (2019): Extraction of natural fragrance ingredients: history overview and future trends. *Chem. Biodiversity* . 16(10): e1900424.
- Burns E., Blamey C., Lloyd A. (2000): Aromatherapy in childbirth: An effective approach to care. *Br. J. Midwifery*. 8(10): 639-643.
- Caputo L., Capozzolo F., Amato G., De Feo V., Fratianni F., Vivenzio G., Nazzaro F. (2022): Chemical composition, antibiofilm, cytotoxic, and anti-acetylcholinesterase activities of *Myrtus communis* L. leaves essential oil. *BMC Complement. Med. Ther.* 22(1): 142
- Capuzzo A., Maffei M., Occhipinti A. (2013): Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. *Molecules*. 18(6): 7194-7238.
- Carpena M., Nuñez-Estevez B., Soria-Lopez A., Garcia-Oliveira P., Prieto M. A. (2021): Essential oils and their application on active packaging systems: A Review. *Resources*. 10(1): 7.
- Chadni M., Isidore E., Lagalle F., Langlait M., Dosso A., Ioannou I. (2023): Optimization of the supercritical extraction of rosmarinic acid from clary sage residue and the antioxidant activity of the extracts. *J. Supercrit. Fluids*. 193: 105830.
- Chambers H. F. Deleo F. R. (2009): Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* 7(9): 629-641.
- Chambers J. M., Hastie T. J. (1992): Linear models. In Chapter 4 of *Statistical Models* Wadsworth & Brooks/Cole 1992 (1992): 96-138.
- Chan E. W. C., Kong L. Q., Yee K. Y., Chua W. Y., Loo, T. Y. (2012): Antioxidant and antibacterial properties of some fresh and dried Labiatae herbs. *Free Radicals and Antioxidants*. 2(3): 20-27.

- Chandra H., Bishnoi P., Yadav A., Patni B., Mishra A., Nautiyal A. (2017): Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials—A review. *Plants*. 6(4): 16.
- Chang R. Y. K., Das T., Manos J., Kutter E., Morales S., Chan H.-K. (2019): Bacteriophage PEV20 and ciprofloxacin combination treatment enhances removal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm isolated from cystic fibrosis and wound patients. *The AAPS Journal*. 21(3): 1-8.
- Cho H., Uehara T., Bernhardt G., Thomas G. (2014): Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell*. 159(6): 1300-1311.
- Chong W. H., Saha B. K., Ramani A., Chopra A. (2021): State-of-the-art review of secondary pulmonary infections in patients with COVID-19 pneumonia. *Infection*, 49(4): 591-605.
- Clemente I., Aznar M., Silva F., Nerín C. (2016): Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. *Innov. Food. Sci. Emerg. Technol.* 36: 26-33.
- Craft K. M., Nguyen J. M., Berg L. J. Townsend S. D. (2019): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *MedChemComm*, 10(8): 1231-1241.
- Crawley M. J. (2014). *Statistics: An Introduction Using*. Second edition. Wiley. India.
- Cui H., Zhang X., Zhou H., Zhao C., Lin L. (2015): Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil. *Botanical Studies*. 56(1): 164
- Csupor D., Szendrei K. (2012a). Muskotályzsálya (*Salvia sclarea*). In *Gyógynövénytár (Útmutató a korszerű gyógynövény-alkalmazáshoz)*. Medicina Könyvkiadó Zrt. pp. 349-350.
- Csupor D., Szendrei K. (2012b): Kakukkfű (*Thymus sp.*). In *Gyógynövénytár (Útmutató a korszerű gyógynövény-alkalmazáshoz)*. Medicina Könyvkiadó Zrt. pp. 203-208.
- Cvjetko Bubalo M., Vidović S., Radojčić Redovniković I., Jokić S. (2018): New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food Bioprod. Process.* 109: 52-73.

- Dalton T., Dowd S. E., Wolcott R. D., Sun Y., Watters C., Griswold J. A., Rumbaugh K. P. (2011): An in vivo polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. PLoS ONE. 6(11): e27317.
- Das S. (2019): Biofilm-mediated diseases of the heart and lungs. In biofilms in human diseases: treatment and control. Springer International Publishing. (pp. 137-149)
- De Clercq E. (2007). The design of drugs for HIV and HCV. Nat. Rev. Drug Discov. 6(12): 1001-1018.
- de Souza E. L., de Barros J. C., de Oliveira C. E., da Conceição M. L. (2010): Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. Int. J. Food Microbiol. 137(2-3): 308-311.
- De Young L. R., Dill K. A. (1988): Solute partitioning into lipid bilayer membranes. Biochemistry. 27(14): 5281-5289.
- Dinges M. M., Orwin P. M., Schlievert P. M. (2000): Exotoxins of *Staphylococcus aureus* Clin. Microbiol. Reviews. 13(1): 16-34.
- Donlan R. M., Costerton J. W. (2002): Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Reviews. 15(2): 167-193.
- Détár E., Zámboři-Németh É., Gosztola B., Harmath A., Ladányi M., Pluhár Z. (2021): Ontogenesis and harvest time are crucial for high quality lavender – Role of the flower development in essential oil properties. Ind. Crops Prod . 163: 113334.
- Eichel V., Schüller A., Biehler K., Al-Ahmad A., Frank U. (2020): Antimicrobial effects of mustard oil-containing plants against oral pathogens: an in vitro study. BMC Complement. Med. Ther. 20(1): 156.
- El-Gohary A. E., Amer H. M., Salama A. B., Wahba H. E., Khalid K. A. (2020): Characterization of the essential oil components of adapted *Salvia sclarea* L. (Clary sage) plant under Egyptian environmental conditions. J. Essent. Oil-Bear. Plants. 23(4): 788-794.
- Endimiani A., Allemann A., Wüthrich D., Lupo A., Hilty M. (2017): First report of the macrolide efflux genetic assembly (MEGA) element in *Haemophilus parainfluenzae*. Int. J. Antimicrob. Agents. 49(2): 265-266.
- Faccione D., Lopez-Ruitti P., Vazquez M., Guerriero L., Lucero C., Galletti P., Corso A. (2016): Molecular characterization of a clinical *Haemophilus parainfluenzae*

isolate with cefotaxime resistance and decreased susceptibility to fluoroquinolones. *Infect. Genet. Evol.* 44: 507-509.

- Fadli M., Saad, A. Sayadi S. Chevalier J., Mezrioui N.-E. Pagès J.-M., Hassani, L. (2012). Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection–bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine.* 19(5): 464-471.
- Farhat M. B. Jordán M. J., Chaouch-Hamada R., Landoulsi A., Sotomayor J. A. (2016): Phenophase effects on sage *Salvia officinalis* L. yield and composition of essential oil. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants.* 2016(3): 87–93.
- Farhat M. B. Sotomayor J. A. Jordá M. J. (2019): *Salvia verbenaca* L. essential oil: Variation of yield and composition according to collection site and phenophase. *Biochem. Syst. Ecol.* (1): 35-43.
- Fernández-Billón M., Llambías-Cabot A. E., Jordana-Lluch E., Oliver A. Macià M. D. (2023): Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biofilm.* 5: 100129.
- Finlay B. B., Falkow S. (1997): Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(2): 136-169.
- Firenzuoli F., Jaitak V., Horvath G., Bassolé I. H. N., Setzer W. N., Gori, L. (2014): Essential oils: new perspectives in human health and wellness. *eCAM.* 1-2.
- Flemming H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Flemming H.-C., Wuertz, S. (2019): Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 17(4): 247-260.
- Fornari T., Vicente G., Vázquez E., García-Risco M. R., Reglero G. (2012): Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A.* 1250: 34-48.
- Geoffroy C. Gaillard J. L., Alouf J. E., Berche, P. (1987): Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity.* 55(7): 1641-1646.
- Giono C. S., Santos P. J. I., Morfín O. M. Alcántar C. M. D. (2020): Antimicrobial resistance. Its importance and efforts to control it. *Gaceta de Mexico.* 156(2):171-178.

- Guchhait K. C., Manna T., Barai M., Karmakar M., Nandi S. K., Jana D., Ghosh C. (2022): Antibiofilm and anticancer activities of unripe and ripe *Azadirachta indica* (neem) seed extracts. *BMC Complement. Med. Ther.* 22(1):42.
- Gupta R. K., George R., Nguyen-Van-Tam J. S. (2008): Bacterial pneumonia and pandemic influenza planning. *Emerg. Infect. Dis.* 14(8): 1187-1192.
- Guzmán-Soto I., McTiernan: C., Gonzalez-Gomez: M., Ross A., Gupta K., Suuronen E. J., Alarcon E. I. (2021): Mimicking biofilm formation and development: Rec. prog. in. *iScience.* 24(5): 102443.
- György Z., Incze N., Pluhár Z. (2020): Differentiating *Thymus vulgaris* chemotypes with ISSR molecular markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 92: 104118.
- Górniak I., Bartoszewski R., Króliczewski J. (2019): Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews.* 18(1): 241-272.
- Gömöri C., Vidács A., Kerekes E. B., Nacsá-Farkas E., Böszörményi A., Vágvölgyi C., Krisch J. (2018): Altered antimicrobial and anti-biofilm forming effect of *Thyme* essential oil due to changes in composition. *Nat. Prod. Commun.* 13(4): 1934578X1801300.
- Gülçin I., Uguz M., Oktay M., Beydemir Ş., Küfrevioğlu Ö. I. (2004): Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of Clary sage (*Salvia sclarea* L.). *Turk. J. Agric. For.* 28: 25-33.
- Hall C. W., Mah T.-F. (2017): Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews,* 41(3): 276-301.
- Hammond E. N., Donkor E. S., Brown C. A. (2014): Biofilm formation of *Clostridium difficile* and susceptibility to Manuka Honey. *BMC Complement. Med. Ther.* 14(1): 329.
- Harmes K., Blackwood R. A., Burrows H., Cooke J. M., Van Harrison R., Passamani P. (2013): Otitis media: diagnosis and treatment. *American family physician.* 88(7): 435-440.
- Heinz E. (2018): The return of Pfeiffer's bacillus: Rising incidence of ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *Microbial Genomics.* 4(9):e000214.

- Hemingway J., Shretta R., Wells T. N. C., Bell D., Djimdé A. A., Achee N. Qi G. (2016): Tools and strategies for malaria control and elimination: What do we need to achieve a grand convergence in malaria? PLOS Biology. 14(3): e1002380.
- Henkel J. S., Baldwin M. R., Barbieri J. T. (2010): Molecular, clinical and environmental toxicology. Toxins from bacteria. Experientia Supplementum 100. pp. 1-29.
- Horváth B., Balázs V. L., Varga A., Böszörményi A., Kocsis B., Horváth G., Széchenyi A. (2019): Preparation, characterisation and microbiological examination of Pickering nano-emulsions containing essential oils, and their effect on *Streptococcus mutans* biofilm treatment. Scientific Reports. 9(1): 16611.
- Horváth B., Pál S., Széchenyi, A. (2018): Preparation and in vitro diffusion study of essential oil Pickering emulsions stabilized by silica nanoparticles. Flavour Fragr. J. 33(6): 385-396.
- Horváth G., Ács K., Kocsis B. (2013): TLC-Direct bioautography for determination of antibacterial activity of *Artemisia adamsii* Essential Oil. J. AOAC Int. 96(6): 1209-1213.
- Hossain M. A., Alrashdi Y. B. A., Touby S. A. (2022): A review on essential oil analyses and biological activities of the traditionally used medicinal plant *Thymus vulgaris* L. IJSM. 103-111.
- Hosseinzadeh S., Jafarikukhdan A., Hosseini A., Armand R. (2015): The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: A review of *Thymus vulgaris*. Int. J. Clin. Med. 06(09): 635-642.
- Hothorn T., Bretz F., Westfall P. (2008): Simultaneous inference in general parametric models. Biometrical Journal. 50(3): 346-363.
- Hotta M., Nakata R., Katsukawa M., Hori K., Takahashi S., Inoue H. (2010): Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  and suppresses COX-2 expression. Journal of Lipid Research. 51(1): 132-139.
- Hristova Y., Wanner J., Jirovetz L., Stappen I., Iliev I., Gochev V. (2015): Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Hyssopus officinalis* L. from Bulgaria against clinical isolates of *Candida* species. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 29(3): 592-601.



- Huemer M., Mairpady S., Brugger S. D., Zinkernagel A. S. (2020): Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO reports*. 21(12): e51034.
- Hutchings M. I., Truman A. W., Wilkinson B. (2019): Antibiotics: past, present and future. *Curr. Opin. Microbiol.* 51, 72-80.
- Huttner B. D., Catho G., Pano-Pardo J. R., Pulcini C., Schouten J. (2020): COVID-19: don't neglect antimicrobial stewardship principles! *Clinical Microbiology and Infection*. 26(7): 808-810.
- Høiby N. (2017): A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS*. 125(4): 272-275.
- Høiby N., Bjarnsholt T., Moser C., Bassi G. L., Coenye T., Donelli G., Williams C. (2015): ESCMID\* guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical Microbiology and Infection*. 21: S1-S25.
- Isakakroudi N., Talebi A., Allymehr M., Tavassoli M. (2018): Effects of essential oils combination on sporulation of Turkey (Meleagris gallopavo) *Eimeria oocysts*. *Arch. Razi. Inst.* 73(2): 113-120.
- Ixtaina V. Y., Vega A., Nolasco S. M., Tomás M. C., Gimeno M., Bárzana E., Tecante A. (2010): Supercritical carbon dioxide extraction of oil from Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.): Characterization and process optimization. *J. Supercrit. Fluids*. 55(1): 192-199.
- Jaeger R., Cuny, E. (2016): Terpenoids with Special Pharmacological Significance: A Review. *Nat. Prod. Commun.* 11(9): 1934578X1601100.
- Jakovljević M., Jokić S., Molnar M., Jerković I. (2021): Application of deep eutectic solvents for the extraction of carnosic acid and carnosol from sage (*Salvia officinalis* L.) with response surface methodology optimization. *Plants*. 10(1): 80.
- Jesionek W., Majer-Dziedzic B., Choma M. I. (2017): TLC-Direct bioautography as a method for evaluation of antimicrobial properties of *Thymus vulgaris* L. and *Salvia officinalis* L. essential oils of different origin. *J. Liq. Chromatogr. Relat.* 40: 292–296.
- Jeukens J., Freschi L., Kukavica-Ibrulj I., Emond-Rheault J.-G., Tucker N. P., Levesque R. C. (2019): Genomics of antibiotic-resistance prediction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1435(1): 5-17.

- Jokić S., Molnar M., Jakovljević M., Aladić K., Jerković I. (2018): Optimization of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Salvia officinalis* L. leaves targeted on oxygenated monoterpenes,  $\alpha$ -humulene, viridiflorol and manool. *J. Supercrit. Fluids.* 133: 253-262.
- Jurado-Martín I., Sainz-Mejías M., Mcclean S. (2021): *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *Int. J. Mol. Sci.* 22(6): 3128.
- Katz L., Baltz R. H. (2016): Natural product discovery: past, present, and future. *J. Ind. Microbiol.* 43(2-3): 155-176.
- Kerekes E.-B., Deák É., Takó M., Tserennadmid R., Petkovits T., Vágvölgyi C., Krisch J. (2013): Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* 115(4): 933-942.
- Kerekes E. B., Vidács A., Takó M., Petkovits T., Vágvölgyi C., Horváth G., Krisch J. (2019): Anti-biofilm effect of selected essential oils and main components on mono- and polymicrobial bacterial cultures. *Microorganisms.* 7(9): 345.
- Khan S. T., Khan M., Ahmad J., Wahab R., Abd-Elkader O. H., Musarrat J., Al-Kedhairi A. A. (2017): Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *AMB Express.* 7(1):49
- Kocaoglu O., Tsui H.-C. T., Winkler M. E., Carlson E. E. (2015): Profiling of  $\beta$ -lactam selectivity for penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 59(6): 3548-3555.
- Komarova N. L., Boland, C. R. (2013): Calculated treatment. *Nature.* 499(7458): 291-292.
- Kostova I., Lasheva V., Fidan H., Georgieva D., Damyanova S., Stoyanova A. (2020): Effect of clary sage (*Salvia sclarea* L.) essential oil on paper packaging materials. *Ukrainian Food J.* 9(2): 287-297.
- Kourtis A. P., Hatfield K., Baggs J., Mu Y., See I., Epton E., Cardo D. (2019): Vital signs: Epidemiology and recent trends in methicillin-resistant and in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections — United States. *MMWR.* 68(9): 214-219.

- Krause K. M., Serio A. W., Kane T. R., Connolly L. E. (2016): Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6(6): a027029.
- KSH (2023) A pécsi megfigyelőállomás időjárési adatai. [STADAT – 5.8. A pécsi megfigyelőállomás időjárési adatai \(ksh.hu\)](https://stadat.ksh.hu)  
Letöltés dátuma: 2023. december 19.
- Kuete V. (2017). *Thymus vulgaris*. Medicinal spices and vegetables from Africa. Chapter 28. Academic Press. pp. 599-609.
- Kumar M., Dahuja A., Tiwari S., Punia S., Tak Y., Amarowicz R., Kaur, C. (2021): Recent trends in extraction of plant bioactives using green technologies: A review. *Food Chem.* 353: 129431.
- Kumpitsch C., Koskinen K., Schöpf V., Moissl-Eichinger C. (2019) The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. *BMC Biology.* 17(1): 87.
- Kunz Coyne A. J., El Ghali A., Holger D., Rebold N., Rybak M. J. (2022): Therapeutic strategies for emerging multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infectious Diseases and Therapy.* 11(2): 661-682.
- Kuźma Ł., Kalemba D., Różalski M., Różalska B., Więckowska-Szakiel M., Krajewska U., Wysokińska H. (2009): Chemical composition and biological activities of essential oil from salvia sclarea plants regenerated in vitro. *Molecules.* 14(4): 1438-1447.
- Kuźma Ł., Różalski M., Walencka E., Różalska B., Wysokińska H. (2007): Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant *Staphylococci*. *Phytomedicine.* 14(1): 31-35.
- Langeveld W. T., Veldhuizen E. J. A., Burt S. A. (2014): Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Crit. Rev. Microbiol.* 40(1): 76-94.
- Langford B. J., So M., Raybardhan S., Leung V., Westwood D., Macfadden D. R., Daneman N. (2020): Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* 26(12): 1622-1629.
- Laville R., Castel C., Fattarsi K., Roy C., Legendre L., Delbecq C., Fernandez X. (2013): Low sclareol by-product of clary sage concrete: chemical analysis of a waste product of the perfume industry. *Flavour Fragr. J.* 28(2): 93-101.

- Leigh-de Rapper S., Tankeu S. Y., Kamatou G., Viljoen A., van Vuuren S. (2021): The use of chemometric modelling to determine chemical composition-antimicrobial activity relationships of essential oils used in respiratory tract infections. *Fitoterapia*. 154: 105024.
- Levin P. A., Angert E. R. (2015): Small but mighty: Cell size and bacteria. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7(7): a019216.
- Lewis K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(4) 999-1007.
- Li J., Liu D., Tian X., Koseki S., Chen S., Ye X., Ding T. (2019): Novel antibacterial modalities against methicillin resistant. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 59(1): 153-161.
- Li P., Yin R., Cheng J., Lin J. (2023). Bacterial biofilm formation on biomaterials and approaches to its treatment and prevention. *Int. J. Mol. Sci.* 24(14): 11680.
- Lin J., Cheng J., Wang Y., Shen X. (2018): The *Pseudomonas quinolone* signal (PQS): not just for quorum sensing anymore. *Front. cell. infect. microbiol.* 8: 230.
- Liu L., Chu L., Liu Q., Wang C., Xia Y., Peng X. (2010): A comparative study on biofilm formation of nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Pseudomonas aeruginosa* under single culture or co-culture. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4(3): 180-184.
- Lv F., Liang H., Yuan Q., Li C. (2011): In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Res. Intern.* 44(9): 3057-3064.
- López-Hernández I., Machuca J., Díaz de Alba P., Sarvisé C., Gómez F., Rodríguez-Martínez J. M., Pascual, A. (2017): Molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Haemophilus parainfluenzae* clinical isolates in Spain. *Microb. Drug Resist.* 23(8): 935-939.
- Mahboubi M. (2020): Clary sage essential oil and its biological activities. *Advances in Traditional Medicine.* 20 (4) 517–528.
- Man W. H., de Steenhuijsen Piters W. A. A., Bogaert D. (2017): The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat. Rev. Microbiol.* 15(5): 259-270.
- Manjare S. D., Dhingra K. (2019): Supercritical fluids in separation and purification: A review. *Mater. Sci. Energy Technol.* 2(3): 463-484.

- Marchese A., Orhan I. E., Daglia M., Barbieri R., Di Lorenzo A., Nabavi S. F., Nabavi S. M. (2016): Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*. 210: 402-414.
- Mathies A. W., Jr. (1972). Penicillins in the treatment of bacterial meningitis. *J. R. Coll. Physicians Lond.* 6(2): 139-146.
- McNally M. E. P., Wheeler, J. R. (1988). Increasing extraction efficiency in supercritical fluid extraction from complex matrices Predicting extraction efficiency of diuron and linuron in supercritical fluid extraction using supercritical fluid chromatographic retention. *J. of Chromatography. A.* 447: 53-63.
- Metcalf D., Parsons D., Bowler P. (2016). A next-generation antimicrobial wound dressing: a real-life clinical evaluation in the UK and Ireland. *J. Wound Care.* 25(3): 134-138.
- Micalizzi G., Ragosta E., Farnetti S., Dugo P., Tranchida P. Q., Mondello L., Rigano F. (2020). Rapid and miniaturized qualitative and quantitative gas chromatography profiling of human blood total fatty acids. *Anal. Bioanal. Chem.* 412(10): 2327-2337.
- Mielko K. A., Jabłoński S. J., Milczewska J., Sands D., Łukaszewicz M., Młynarz P. (2019): Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35(11):178.
- Moghadam H., Samimi M. (2022): Effect of condenser geometrical feature on evacuated tube collector basin solar still performance: Productivity optimization using a Box-Behnken design model. *Desalination.* 542: 116092.
- Mohamad Said K. A., Mohamed Amin M. A. (2016): Overview on the Response Surface Methodology (RSM) in extraction processes. *J. Appl. Sci. Process Eng.* 2(1): 8-17.
- Mohammad S. F., Feng Y., Yang G. (2019): Optimization of cell culture and cell disruption processes to enhance the production of thermophilic cellulase FnCel5A in *E.coli* using response surface methodology. *PLOS ONE.* 14(1): e0210595.
- Molnar M., Jerković I., Suknović D., Bilić Rajs B., Aladić K., Šubarić D., Jokić S. (2017): Screening of six medicinal plant extracts obtained by two conventional methods and supercritical CO<sub>2</sub> extraction targeted on coumarin content, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity and total phenols content. *Molecules.* 22(3): 348.

- Moreira M. R., Ponce A. G., del Valle C. E., Roura S. I. (2005): Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Food Sci. Technol.* 38(5): 565-570.
- Muhammad M. H., Idris A. L., Fan X., Guo Y., Yu Y., Jin X., Huang T. (2020): Beyond risk: Bacterial biofilms and their regulating approaches. *Front Microbiol.* 11: 928.
- Muir M. E., Van Heeswyck R. S., Wallace B. J. (1984): Effect of growth rate on streptomycin accumulation by *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium*. *Microbiology.* 130(8): 2015-2022.
- Nagy S., Kocsis B., Kőszegi T., Botz, L. (2002): Optimization of conditions for culture of the test bacteria used for direct bioautographic detection. 1. The gram-positive test bacterium *Bacillus subtilis*. *J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC.* 15(2): 132-137.
- O'Toole R. F. (2021). The interface between COVID-19 and bacterial healthcare-associated infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 27(12): 1772-1776.
- Oliveira R. C., Carvajal-Moreno M., Correa B., Rojo-Callejas F. (2020): Cellular, physiological and molecular approaches to investigate the antifungal and anti-aflatoxigenic effects of thyme essential oil on *Aspergillus flavus*. *Food Chem.* 315: 126096.
- Pandur E., Micalizzi G., Mondello L., Horváth A., Sipos K., Horváth, G. (2022): Antioxidant and anti-Inflammatory effects of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils prepared at different plant phenophases on *Pseudomonas aeruginosa* LPS-activated THP-1 macrophages. *Antioxidants.* 11(7): 1330.
- Patil S. M., Ramu R., Shirahatti P. S., Shivamallu C., & Amachawadi R. G. (2021): A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological aspects of *Thymus vulgaris* L.. *Heliyon.* 7(5): e07054.
- Peric M., Bozdogan B. L., Jacobs M. R., Appelbaum P. C. (2003): Effects of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Ant. Antimicrob. Agents Chemother.* 47(3): 1017-1022.
- Petrović S., Ušjak L., Milenković M., Arsenijević J., Drobac M., Drndarević A., Niketić M. (2017): *Thymus dactyloides* as a new source of antioxidant and antimicrobial metabolites. *J. Funct. Foods.* 28: 114-121.

- Petrovska B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.* 6(11): 1-5.
- Pluhár Z., Szabó D., Sárosi S. (2016): Effects of different factors influencing the essential oil properties of *Thymus vulgaris* L. *Plant Science Today.* 3(3): 312.
- Posgay M., Greff B., Kapcsándi V., Lakatos E. (2022): Effect of *Thymus vulgaris* L. essential oil and thymol on the microbiological properties of meat and meat products: A review. *Heliyon.* 8(10): e10812.
- Qin S., Xiao W., Zhou C., Pu Q., Deng X., Lan L., Wu M. (2022): *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct. Target. Ther.* 7(1): 199.
- Qiu J., Feng H., Lu J., Xiang H., Wang D., Dong J., Deng X. (2010): Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(17): 5846-5851.
- Raffa R., Iannuzzo J., Levine D., Saeid K., Schwartz R., Sucic N., Young J. (2005): Bacterial communication ("Quorum Sensing") via ligands and receptors: A novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312: 417-423.
- Ramirez M., Tolmasky M. (2017): Amikacin: Uses, resistance, and prospects for inhibition. *Molecules.* 22(12): 2267.
- Rao G. G., Li J., Garonzik S. M., Nation R. L., Forrest A. (2018): Assessment and modelling of antibacterial combination regimens. *Clin. Microbiol. Infect.* 24(7): 689-696.
- Rao H., Choo S., Rajeswari Mahalingam S. R., Adisuri D. S., Madhavan P., Md. Akim A., Chong, P. P. (2021): Approaches for mitigating microbial biofilm-related drug resistance: A focus on micro- and nanotechnologies. *Molecules.* 26(7), 1870.
- Rawson T. M., Moore L. S. P., Castro-Sanchez E., Charani E., Davies F., Satta G., Holmes A. H. (2020): COVID-19 and the potential long-term impact on antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 75(7): 1681-1684.
- Reichling J. (2020): Anti-biofilm and virulence factor-reducing activities of essential oils and oil components as a possible option for bacterial infection control. *Planta Medica,* 86(08): 520-537.

- Rizwan, B. (2021). Therapeutic potential of *Thymus vulgaris*: A Review. *The Annals of Research*. 3:147-161.
- Roberts M. C., Actis L. A., Crosa J. H. (1985): Molecular characterization of chloramphenicol-resistant *Haemophilus parainfluenzae* and *Haemophilus ducreyi*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 28(2): 176-180.
- Ronyai E., Simandi B., Lemberkovics E., Veress T., Patiaka D. (1999): Comparison of the volatile composition of clary sage oil obtained by hydrodistillation and supercritical fluid extraction. 11:(1) 69-71.
- Rubin L. G., Medeiros A. A., Yolken R. H., Moxon E. R. (1981): Ampicillin treatment failure of apparently beta-lactamase-negative *Haemophilus influenzae* type b meningitis due to novel beta-lactamase. *Lancet*. 2(8254): 1008-1010.
- Salehi S., Hadipanah A. (2014): Effect of harvest time on yield and quality of *Thymus vulgaris* L. essential oil in Isfahan province, Iran. *Agric. Conspec. Sci*. 79, 115-118.
- Schmidt E., Wanner J., Höferl M., Jirovetz L., Buchbauer G., Gochev V., Geissler M. (2012): Chemical composition, olfactory analysis and antibacterial activity of *Thymus vulgaris* chemotypes geraniol, 4-thujanol/terpinen-4-ol, thymol and linalool cultivated in southern France. *Nat. Prod. Commun*. 7(8): 1934578X1200700833.
- Seyama S., Wajima T., Nakaminami H., Noguchi N. (2017): Amino acid substitution in the major multidrug efflux transporter protein AcrB contributes to low susceptibility to azithromycin in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 61(11). 128/aac.01337-17.
- Shams S., Lima C., Xu Y., Ahmed S., Goodacre R., Muhamadali H. (2023): Optical photothermal infrared spectroscopy: a novel solution for rapid identification of antimicrobial resistance at the single-cell level via deuterium isotope labeling. *Frontiers in Microbiology*. 14: 161.
- Shi J., Yi C., Xue S. J., Jiang Y., Ma Y., Li D. (2009): Effects of modifiers on the profile of lycopene extracted from tomato skins by supercritical CO<sub>2</sub>. *JJ. Food Eng*. 93(4): 431-436.
- Sibley C. D., Parkins M. D., Rabin H. R., Duan K., Norgaard J. C., Surette M. G. (2008): A polymicrobial perspective of pulmonary infections exposes an enigmatic pathogen in cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 105(39): 15070-15075.



- Siddiquee Z., Parveen R., Ahmad S. (2023): Effect-directed assays and biological detection approaches coupled with Thin-Layer Chromatography as an evolving hyphenated technique: A Comprehensive Review. *Comb. Chem.* 26(15): 2679-2717.
- Siegel S. J., Weiser J. N. (2015): Mechanisms of bacterial colonization of the respiratory tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 69(1): 425-444.
- Sienkiewicz M., Głowacka A., Poznańska-Kurowska K., Kaszuba A., Urbaniak A., Kowalczyk E. (2015): The effect of clary sage oil on staphylococci responsible for wound infections. *Advances in Dermatology and Allergology*: 1: 21-26.
- Sierra Y., González-Díaz A., Tubau F., Imaz A., Cubero, M., Càmarà, J., . . . Ardanuy, C. (2020). Emergence of multidrug resistance among *Haemophilus parainfluenzae* from respiratory and urogenital samples in Barcelona, Spain. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39(4), 703-710. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03774-x>
- Simandi, B., Kery, A., Lemberkovics, E., Oszagyan, M., Ronyai E., Mathe I., Hethelyi, E. (1996): Supercritical fluid extraction of medicinal plants. In *High Pressure Chemical Engineering, Proceedings of the 3rd International Symposium on High Pressure Chemical Engineering*. Elsevier. pp. 357-362
- Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. (2004): Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and  $\alpha$ -toxin by *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 53(10): 1023-1027.
- Sodeifian G., Sajadian S. A., Saadati Ardestani N. (2017): Experimental optimization and mathematical modeling of the supercritical fluid extraction of essential oil from *Eryngium billardieri* : Application of simulated annealing (SA) algorithm. *J. Supercrit. Fluids.* 127: 146-157.
- Soltani S., Shakeri A., Iranshahi M., Boozari M. (2021): A Review of the phytochemistry and antimicrobial properties of. *Iran J. Pharm. Res.* 20(2): 268-285.
- Souza de Oliveira L. G., Ribeiro D. A., Saraiva M.E., Goncalves de Macêdo D., J., G. Menezes, I. R. (2017): Chemical variability of essential oils of *Copaiferalangsdorffii* Desf. indifferent phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. *Ind. Crop. Prod.* 97: 455–464.
- Sovilj M., Branislava G. Spasojević Đ., (2011): Critical review of supercritical fluid extraction of selected spice plant materials. *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* 30(2): 197.

- Sulayyim H. J. A., Ismail R., Hamid A. A., Ghafar N. A. (2022): Antibiotic resistance during COVID-19: A Systematic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 19(19): 11931.
- Thi M. T. T., Wibowo D., Rehm B. H. A. (2020): *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* 21(22): 8671.
- Tisserand R., Young, R. (2014): 2 - Essential oil composition. *Essential Oil Safety (Second Edition)*. Churchill Livingstone. pp. 5-22
- Turner N. A., Sharma-Kuinkel B. K., Maskarinec S. A., Eichenberger E. M., Shah P. P., Carugati M., Fowle, V. G. (2019): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat. Rev. Microbiol.* 17(4): 203-218.
- Ultee A., Bennik M. H. J., Moezelaar R. (2002): The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4), 1561-1568.
- Upadhyay A., Johny A. K., Amalaradjou M. A., Ananda Baskaran S., Kim K. S., Venkitanarayanan K. (2012): Plant-derived antimicrobials reduce *Listeria monocytogenes* virulence factors in vitro, and down-regulate expression of virulence genes. *Int. J. Food. Microbiol.* 157(1): 88-94.
- Utcharyakiat I., Surassmo S., Jaturanpinyo M., Khuntayaporn P., Chomnawang M. T. (2016): Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complement. Altern. Med.* 16(1):158
- Van Hal S. J., Jensen: S. O., Vaska V. L., Espedido B. A., Paterson D. L., Gosbell I. B. (2012): Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Microbiol. Rev.* 25(2): 362-386.
- Van L. T., Hagiú I., Popovici A., Marinescu F., Gheorghe I., Curutiu C., Lazar V. (2022): Antimicrobial efficiency of some essential oils in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Plants*. 11(15), 2003.
- Vanhoof R., Sonck P., Hannecart-Pokorni E. (1995): The role of lipopolysaccharide anionic binding sites in aminoglycoside uptake in *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* 35(1): 167-171.
- Vernon G. (2019): Syphilis and salvarsan. *Br. J. Gen. Pract.* 69(682): 246-246.
- Vestby L. K., Grønseth T., Simm R., Nesse L. L. (2020): Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*. 9(2): 59.

- Wagner H., Bladt, S. (2001): Plant drug analysis. In a Thin Layer Chromatography atlas. Second edition. S. Berlin. Heidelberg.
- Walsh C. T., Wencewicz, T. A. (2014): Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. *J. Antibiotics*. 67(1): 7-22.
- Wang F., Zhou H., Olademehin O. P., Kim S. J., Tao P. (2018): Insights into key interactions between vancomycin and bacterial cell wall structures. *ACS Omega*. 3(1): 37-45.
- Wang M., Zhang Y., Wang R., Wang Z., Yang B., Kuang H. (2021): An Evolving Technology That integrates classical methods with continuous technological developments: Thin-Layer Chromatography Bioautography. *Molecules*. 26(15): 4647.
- Wang X., Xie X.-a., Sun J., Liao, W. (2019): Effects of liquefaction parameters of cellulose in supercritical solvents of methanol, ethanol and acetone on products yield and compositions. *Bioresource Technology*. 275: 123-129.
- Westblade L. F., Simon M. S., Satlin M. J. (2021): Bacterial coinfections in coronavirus disease 2019. *Trends Microbiol*. 29(10): 930-941.
- White M. T., Bianchi G., Chai L., Tassou S. A., Sayma A. I. (2021): Review of supercritical CO<sub>2</sub> technologies and systems for power generation. *Appl. Therm. Eng.* 185: 116447.
- Wińska K., Mączka W., Łyczko J., Grabarczyk M., Czubaszek A., Szumny, A. (2019): Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? *Molecules*. 24(11): 2130.
- Wolcott R. D., Rumbaugh K. P., James G., Schultz G., Phillips P., Yang Q., Dowd S. E. (2010): Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time-dependent therapeutic window. *J. Wound Care*. 19(8): 320-328.
- Yang L. Wen K.-S., Ruan X., Zhao Y.-X., Wei F., Wang Q. (2018): Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*. 23(4): 762.
- Yousefi M., Rahimi-Nasrabadi M., Pourmortazavi S. M., Wysokowski M., Jesionowski T., Ehrlich H., Mirsadeghi S. (2019): Supercritical fluid extraction of essential oils. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 118: 182-193.
- Yu A., Su W., Lin X., Zhou N. (2021): Recent trends of supercritical CO<sub>2</sub> Brayton cycle: Bibliometric analysis and research review. *Nucl. Eng. Technol*. 53(3): 699-714.

- Zanotti A., Baldino L., Scognamiglio M., Reverchon E. (2023) Supercritical fluid extraction of essential oil and sclareol from a clary sage concrete. *Molecules*. 28(9): 3903.
- Zar H. J., Ferkol T. W. (2014): The global burden of respiratory disease—impact on child health. *Wiley Online Library*. Vol. 49, pp. 430-434
- Zhao S., Zhang D. (2013): Supercritical fluid extraction and characterisation of *Moringa oleifera* leaves oil. *Separation and Purification Technology*. 118: 497-502.
- Zink A., Traidl-Hoffmann C. (2015): Green tea in dermatology-myths and facts. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 13(8): 768-775.
- Zipperer A., Konnerth M. C., Laux C., Berscheid A., Janek D., Weidenmaier C., Marschal M. (2016): Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature*. 535(7613): 511-516.

## 9 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, **Dr. Horváth Györgyinek** PTE GYTK Farmakognóziai Intézet igazgatójának és **Dr. Pethő Dórának**, a Pannon Egyetem BKV Kutató Fejlesztő Központ docensének, tanácsaikért és irányításukért, amellyel segítették eddigi munkámat.

Hálás szívvel mondok köszönetet **Dr. Balázs Viktória Lillának**, egyetemi adjunktusnak, a támogatásért, biztató szavaiért, az iránymutatásért és mindazért, amivel hozzájárult a szakmai fejlődésemmel. Egy életre szóló élmény volt a közös munka.

Köszönettel tartozom **Dr. Pál Szilárnak**, PTE GYTK Gyógyszertechnológiai és Biofarmáciai Intézet igazgatójának, hogy megtanította nekem a válaszfelület-modellezés alapjait.

Szeretnék köszönetet mondani **Takács Gyöngyinek**, a Pannon Egyetem laboratóriumi munkatársának, a rengeteg segítségért a szuperkritikus folyadék extrakciós kísérletek kivitelezésében és tervezésében.

Köszönettel tartozom **Pallos József Péternek**, a PannonPharma Kft. ügyvezető igazgatójának, aki mindvégig támogatta a szakmai fejlődésemet és egy holisztikus szemléletmódot mutatott számomra. Valamint azon munkatársaimnak, akik segítségével nélkül nem sikerült volna elkészítenem ezt a dolgozatot.

Köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy mindvégig mellettem álltak és támogattak.

## 10 Publikációs jegyzék

Az értekezés alapját képező publikációk:

**Bakó Cs**, Balázs V.L., Kerekes E., Kocsis B., Nagy D.U., Szabó P, Micalizzi G., Mondello L., Krisch J., Pethő D., Horváth Gy. (2023): Flowering phenopases influence the antibacterial and antibiofilm effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil. ***BMC Complementary Medicine and Therapies***. 23:168. [IF: 2,838]

**Bakó Cs.**, Balázs V.L., Takács Gy., Pallos J.P., Pál Sz., Kocsis B., Rippelné Pethő D., Horváth Gy. (2021): Combination of analytical and statistical methods in order to optimize antibacterial activity of clary sage supercritical fluid extracts. ***MOLECULES***. 26:6449. [IF: 4,148]

## 11 Konferencia jegyzék

**Bakó Cs.,** Balázs V.L., Takács Gy., Pallos J.P., Pál Sz., Kocsis B., Rippelné Pethő D., Horváth Gy. (2021) Muskotályzsályából nyert szuperkritikus folyadék extraktum biológiai aktivitásának optimalizálása analitikai és statisztikai módszerek kombinálásával. Fiatal Gyógynövénykutatók Fóruma. 2022. június 17. In: Book of Abstracts p. 6.

**Bakó Cs.,** Balázs V.L., Takács Gy., Pallos J.P., Pál Sz., Kocsis B., Rippelné Pethő D., Horváth Gy. (2021): Muskotályzsálya (*Salvia sclarea* L.) szuperkritikus fluid extraktumok biológiai aktivitásának optimalizálása válaszfelület-modellezés segítségével. METT25- A Magyar Elválasztástudományi Társaság jubileumi konferenciája. Egerszalók, Magyarország. 2021. október 18-20., In: Book of Abstracts p. 7.

## 12 Mellékletek

### 1. melléklet Muskotályzsálya SFE kivonatok etanoltartalma és extrakciós hozama

<b>Minták</b>	<b>Extrakt + EtOH (g)</b>	<b>EtOH (m/m%)</b>	<b>Extrakciós hozam (g)</b>	<b>Extrakciós hozam (m/m%)</b>
<b>1</b>	6,794	83,31	1,13	5,12
<b>2</b>	5,1064	88,72	0,58	2,68
<b>3</b>	3,9711	94,75	0,21	0,97
<b>4</b>	5,0402	84,48	0,78	3,70
<b>5</b>	5,757	85,15	0,85	3,96
<b>6</b>	4,8512	88,19	0,57	2,84
<b>7</b>	6,6173	86,42	0,90	4,45
<b>8</b>	4,116	91,78	0,34	1,70
<b>9</b>	6,2144	93,92	0,38	1,90
<b>10</b>	4,9519	85,05	0,74	3,51
<b>11</b>	6,6124	89,55	0,69	3,33
<b>12</b>	4,8933	87,10	0,63	2,94
<b>13</b>	4,0805	79,60	0,83	4,08
<b>14</b>	5,3441	87,87	0,65	3,05
<b>15</b>	1,9945	86,31	0,27	1,36
<b>16</b>	3,8984	79,71	0,79	3,75
<b>17</b>	3,835	85,67	0,55	2,61
<b>18</b>	3,3985	85,48	0,49	2,17
<b>19</b>	6,7074	76,87	1,55	7,37
<b>20</b>	5,3505	75,38	1,32	6,40
<b>21</b>	4,1491	76,68	0,97	4,73
<b>22</b>	3,8839	81,51	0,72	3,48
<b>23</b>	3,8192	78,77	0,81	3,89
<b>24</b>	3,4193	88,26	0,40	1,92
<b>25</b>	2,9835	75,13	0,74	3,57
<b>26</b>	4,3975	77,56	0,99	4,50
<b>27</b>	3,3701	76,50	0,79	3,54



**2. melléklet** Különböző virágzási fenofázisokban gyűjtött friss kakukkfűből készült és gyűjtött illóolaj minták (terület) százalékos összetétele

<b>Komponensek</b>	<b>MS Sim (%)</b>	<b>LRI Exp</b>	<b>LRI Ref</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Triciklén	94	922	923	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02
$\alpha$ -Tujon	98	925	927	0,99	1,09	0,99	0,46	0,21	0,37
$\alpha$ -Pinén	97	933	933	0,61	0,63	0,69	0,50	0,37	0,55
Kámfor	97	949	953	0,39	0,39	0,50	0,33	0,25	0,42
Szabinén	95	972	972	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
Pent-4-enil propanoát	94	974	974	0,03	0,01	0,01	0,04	0,01	0,01
$\beta$ -Pinén	92	977	978	0,20	0,20	0,21	0,15	0,12	0,15
Vinil-amil-karbinol	95	979	978	0,27	0,34	0,42	0,36	0,34	0,51
3-Oktanon	93	984	986	0,03	0,03	0,03	0,04	0,02	0,03
Mircén	96	988	991	1,45	1,34	1,28	1,17	0,71	0,84
3-Oktanol	96	997	999	0,04	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03
$\alpha$ -Fellandré	96	1006	1007	0,15	0,12	0,10	0,13	0,08	0,08
$\delta$ -3-Karén	96	1009	1009	0,08	0,08	0,08	0,07	0,05	0,06
$\alpha$ -Terpinén	98	1017	1018	1,40	1,09	0,82	1,15	0,74	0,79
<i>p</i> -Cimén	96	1025	1025	12,89	17,44	20,64	12,46	15,02	22,78
Limonén	96	1029	1030	0,29	0,30	0,34	0,27	0,22	0,31
$\beta$ -Fellandré	94	1030	1031	0,07	0,10	0,08	0,08	0,08	0,11
Eukaliptol	97	1032	1032	0,62	0,70	0,75	0,50	0,67	0,90
( <i>Z</i> )-, $\beta$ -Ocimén	90	1034	1035	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01
( <i>E</i> )-, $\beta$ -Ocimén	95	1045	1046	0,03	0,02	0,02	0,04	0,02	0,02
$\gamma$ -Terpinén	95	1058	1058	15,18	7,38	6,01	13,67	5,06	5,49
3-Metil-butyl-2-enil butanoát	90	1063	1068	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05
( <i>Z</i> )-Szabinén hidrát	93	1070	1069	0,26	0,33	0,59	0,21	0,31	0,21
Terpinolén	96	1086	1086	0,09	0,09	0,08	0,10	0,10	0,11
<i>p</i> -Cimén	94	1091	1093	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	0,05
Linalool	97	1099	1101	1,46	1,56	2,15	1,69	1,67	2,17
( <i>E</i> )-Szabinén hidrát	94	1102	1099	0,11	0,13	0,18	0,10	0,14	0,11
3-Metil-butyl-3-enil-3-metil-butanoát	90	1110	1114	tr	tr	0,02	tr	0,01	0,02
( <i>Z</i> )-, <i>p</i> -Ment-2-én-1-ol	96	1126	1124	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,05
Kámfor	97	1149	1149	0,27	0,25	0,36	0,26	0,29	0,33
Borneol	98	1173	1173	0,48	0,44	0,66	0,49	0,51	0,85
Terpinén-4-ol	92	1182	1184	0,66	0,75	0,63	0,67	0,67	0,87
Hex-(3 <i>Z</i> )-enil-Butirát	92	1184	1187	0,01	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04
<i>p</i> -Cimén-8-ol	93	1189	1189	0,02	0,04	0,05	0,04	0,05	0,08
$\alpha$ -Terpineol	97	1197	1195	0,12	0,15	0,15	0,13	0,16	0,21
( <i>Z</i> )-, Dihidro-karvon	94	1200	1198	0,03	0,05	0,05	0,05	0,06	0,07
<i>Kapriz-aldehid</i>	95	1206	1208	0,01	0,01	0,01	0,01	nd	nd
Timol-metil-éter	94	1230	1229	0,19	0,50	0,62	0,57	0,43	0,53
Karvakrol-metil-éter	96	1239	1239	0,27	0,36	0,37	0,35	0,32	0,32
Citrál	96	1242	1238	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Karvon	95	1249	1246	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02
Citrál	97	1274	1268	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02
Timol	94	1294	1293	55,81	57,10	54,21	56,39	62,46	52,33
Karvakrol	94	1302	1300	2,30	2,92	2,90	2,98	3,48	3,11
Timol acetát	93	1345	1348	0,04	0,02	Nd	0,03	0,01	nd
Eugenol	95	1354	1357	0,09	0,09	0,12	0,02	0,01	0,05

Komponensek	MS Sim (%)	LRI Exp	LRI Ref	1	2	3	4	5	6
$\alpha$ -Ylangene	92	1371	1371	Nd	nd	Nd	0,02	0,02	0,02
Izobornil propionát *	93	1376	1377	0,04	0,04	0,06	0,07	0,09	0,10
$\alpha$ -Kopén *	88	1377	1375						
$\beta$ -Bourbonén	95	1385	1382	0,02	0,03	0,03	0,03	0,04	0,06
(Z)-Jázmon	93	1394	1394	Nd	0,01	0,01	tr	0,01	tr
(E)-Kariofilén	97	1421	1424	1,56	2,05	1,92	2,15	2,50	2,44
$\beta$ -Kopén	94	1431	1433	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03
Aromadendrén	94	1441	1438	Nd	nd	Nd	0,04	0,01	0,01
$\alpha$ -Humulén	97	1457	1454	0,05	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07
(Z)-Muurolo-4(14), 5-dién	94	1464	1466	tr	0,01	0,01	0,01	0,01	tr
Geranil propionát	97	1468	1471	0,09	0,05	0,05	0,08	0,07	0,06
Cadina-1(6),4-dién	91	1473	1474	Nd	nd	Nd	0,01	0,02	tr
$\gamma$ -Muuroolén	92	1476	1478	0,05	0,07	0,06	0,14	0,14	0,12
$\alpha$ -Amorfén	90	1481	1482	Nd	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02
Germakrén D	95	1482	1480	0,11	0,07	0,04	nd	nd	nd
$\beta$ -Szelinén	94	1491	1492	tr	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
$\gamma$ -Amorfén	87	1494	1490	0,02	0,02	0,02	0,06	0,05	0,04
$\alpha$ -Szelinén	89	1497	1501	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02
$\alpha$ -Muuroolén	93	1500	1497	0,03	0,03	0,03	0,05	0,06	0,05
$\delta$ -Amorfén	89	1505	1506	nd	nd	0,02	0,02	0,01	tr
$\gamma$ -Kadinén	95	1515	1512	0,06	0,12	0,10	0,16	0,24	0,17
$\delta$ -Kadinén	94	1520	1518	0,11	0,13	0,11	0,26	0,27	0,22
(E)-Kalaménén	90	1522	1527	0,02	0,04	0,03	0,03	0,07	0,06
(E)-Cadina-1,4-diene	93	1534	1536	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02
$\alpha$ -Kadinén	95	1539	1538	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02
$\alpha$ -Kalakorén	91	1543	1544	Nd	nd	Nd	tr	0,01	0,01
Geranil butirát	97	1554	1559	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03
Kariofilén oxid	93	1585	1587	0,27	0,37	0,47	0,52	0,70	0,70
Humulén epoxid II	89	1613	1613	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01
1-,10-di- <i>epi</i> -Kubenol	89	1618	1614	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03	0,01
<i>epi</i> - $\gamma$ -Eudezmol	95	1626	1624	0,05	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03
$\alpha$ -Kadinol	94	1645	1641	0,06	0,17	0,12	0,07	0,17	0,05
Kadin-4-en-10-ol	95	1658	1659	0,04	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01
Teljes				99,77	99,76	99,65	99,69	99,69	99,49

Rövidítések: MS Sim, MS spektrum hasonlóság (MS spectral similarity); LRI Exp, kísérleti lineáris retenciós index (experimental linear retention index); LRI ref, referencia lineáris retenciós index (reference linear retention index); nd, nem észlelt; tr, kimutatási határ; A \* koelúciót jelöl az SLB-5-ms oszlopon. 1. Virágzás kezdetén gyűjtött friss növényi anyag, 2: Teljes virágzásban gyűjtött friss növényi anyag, 3. Virágzás végén gyűjtött friss növényi anyag, 4: Virágzás kezdetén gyűjtött szárított növényi anyag, 5. Teljes virágzásban gyűjtött szárított növényi anyag, 6.: Virágzás végén gyűjtött szárított növényi anyag.