

**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

1 Bevezetés

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.

Az antibiotikum-rezisztencia növekedésével egyre inkább előtérbe kerülnek a természetes vegyületek az iparágak különböző területein. 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. Ezek a tényezők mind hatással lehetnek a kémiai összetételre, ami hatással van a biológiai aktivitásra. 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 parameterezhető 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.

Az ajakosok (Lamiaceae) családjának két kiemelkedő tagja a muskotályzsfalya (*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.) (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.

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 Anyag és módszer

3.1 A felhasznált gyógynövények

3.1.1 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.

3.1.2 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 1. 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.

1. 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

3.2 Extrakciók

3.2.1 Muskotályzsálya szuperkritikus folyadék extrakciója (SFE)

A vizsgálatokat a Pannon Egyetem BKV Kutató Fejlesztő Központjában végeztük. A szuperkritikus folyadék extrakcióhoz 99,97% (w/w) tisztaságú CO₂-t (Messer Kft.) használtunk.

Az extrakciókat egy SF2000 Able & Jasco készülékkel (Jasco Kft.) végeztük el. Extrakciós edényként 30 cm × 20 mm-es, 94,2 cm³ térfogatú rozsdamentes acél oszlopot

használtunk. Minden mérésnél az oszlopba kb. 22 g aprított, szárított muskotályzsályát töltöttünk be. A bemérés pontos tömegét minden alkalommal feljegyeztük. Mozgófazisként 99,9%-os tisztaságú CO₂-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 kivonatokot 15 ml-es centrifugacsövekbe gyűjtöttük, amelyek tömegét feljegyeztük. A mintákat a további feldolgozásig -10°C-on tároltuk.

Kakukkfű esetében a begyűjtött anyanövényekből az illóolaj desztillálás a PTE GYTK Farmakognóziai 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.

3.3 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. aeruginosa*-t 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).

3.4 Kromatográfiás vizsgálatok

3.4.1 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 vékonykoncentrációt kaptunk. A kalibrációs görbe a 0,5-2,0 mg/ml tartományt fedte le.

3.4.2 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 kromatográfiás 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 verzió, Shimadzu Kft.) használtuk. FFNSC tömegspektrum könyvtárát (4.0 verzió, Shimadzu Kft.) használtuk a vegyület azonosítására. Két különböző azonosítási paramétert, nevezetesen az MS spektrális hasonlóságot és a lineáris retenciós index (LRI) megfelelést alkalmaztunk (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).

3.5 Vékonyréteg kromatográfia – Direkt bioautográfia (TLC-DB)

A mikrobiológiai kísérleteket a PTE KK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetében végeztük el.

A muskotályzsálya minták esetében kizárólag kromatográfiás kifejlesztés nélkül végeztük el a vizsgálatot, mivel a teljes extraktum antibakteriális hatását vizsgáltuk. A kakukkfű esetében az antibakteriális hatást vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás nélkül és vékonyréteg-

kromatográfiás elválasztás után is tanulmányoztuk (Balázs et al., 2019). 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 a friss növényi anyagokból desztillált kakukkfű olajokat vontunk be a TLC elválasztáshoz kapcsolódó bioautográfiás kísérletekbe. A kromatográfiát 10x10 cm-es szilikagél 60 F₂₅₄ alumíniumlemezes vékonyrétegeken (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-kromatográfiás 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: 40 mg/ml; 0,75 µL-t vittünk fel a lemezre).

Kakukkfű minták esetén: a mintákat abszolút etanolban oldottuk (a törzsoldat 200 mg/ml volt), és 1,0 µL-t vittünk fel a vékonyréteg-kromatográfiás 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 lemezre. A minta felvitele után a TLC lemezeket toluol:etil-acetát (95:5 v/v) mozgófázissal fejlesztettük ki (Horváth et al., 2018). A kromatográfiás kifejlesztést eluenssel történő telítést követően ikervályús kamrában (Camag Kft.) és szobahőmérsékleten (22°C) végeztük. A vékonyréteg-kromatográfiás 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 Rf-értéke és színe alapján detektáltuk. A vékonyréteg-kromatográfiás lemezeket 254 nm-es UV fényben is értékeltük. A bioautográfiás 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. Az összillóolaj rétegeket, valamint az előhívás nélküli, kakukkfű illóolaj-tartalmú kifejlesztett rétegeket 100 ml-es baktériumszuszpenzióba mártottuk (4×10^7 CFU/ml). 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-kromatográfiás 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 háttérhez képest megjelent 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.

3.6 MIC meghatározás mikrodilúciós módszerrel (BMD)

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

A minimális gátló koncentrációkat mikrodilúciós módszer segítségével határoztuk meg.

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.

3.7 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 biofilmek kialakításához 96 cellás mikrotiter lemezt alkalmaztunk. A kezelést követően kristályibolya oldattal festettük meg a biofilmeket. Ezután az abszorbanciát $\lambda = 595$ nm-en mértük mikrotiterlemez-leolvasóval (BMG Labtech SPECTROstar Nano Kft.). Minden vizsgálatból 6 ismétlést végeztünk (Balázs et al., 2019).

3.8 Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálat

A morfológiai vizsgálatokat a PTE Szentágotthai 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. A biofilmeket előkészítettük a SEM protokolnak megfelelően. Ezt követően a mintákat arany membránnal vontuk be, és JEOL JSM IT500-HR pásztázó elektronmikroszkóppal (Jeol Kft.) vizsgáltuk (Kerekes et al., 2013).

3.9 Checkerboard-titrálás

Annak érdekében, hogy megfigyelhessük a kakukkfű illóolaj és az antibiotikumok között kialakuló kölcsönhatásokat, checkerboard-titrálást kivitelezünk. A méréseket szintén 96 cellás mikrotiter lemezekon kivitelezünk. Egy mintahely 50-50 μ l BHI tápoldatban oldott, adott koncentrációjú vizsgálandó anyagot (A és B anyag), valamint 100 μ l 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. 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. Az eredményeket két független párhuzamos mérésből nyertük.

3.10 Statisztikai elemzések

3.10.1 Statisztikai elemzés kakukkfű olajok esetén

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

3.10.2 Válaszfelület modellezés (RSM) muskotályzsálya extraktumok esetén

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. 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).

2. 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

4 Eredmények

4.1 Muskotályzsálya extraktumok antibakteriális aktivitásának meghatározása

A TLC-DB módszerrel a kivonatok antibakteriális aktivitását kromatográfias elválasztás nélkül vizsgáltuk. *P. aeruginosa* és MRSA baktériumtörzseket választottuk tesztbaktériumoknak. Az eredményeket a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat Az SFE kivonatok extrakciós körülményei és gátlási zónái

Minta	<i>P. aeruginosa</i>		MRSA		MPa	°C	EtOH (%)
	Átmérő (mm)	¹ SD	Átmérő (mm)	¹ SD			
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

Minta	<i>P. aeruginosa</i>		MRSA		MPa	°C	EtOH (%)
	Átmérő (mm)	¹ SD	Átmérő (mm)	¹ SD			
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
kloroform	0,00	0,00	0,00	0,00			
² kloro. + EtOH	0,00	0,00	0,00	0,00			
EtOH	0,00	0,00	0,00	0,00			
vankomicin	-	-	12,30	0,45			
gentamicin	8,26	0,81	-	-			

¹SD = szórási; ² kloro. = kloroform

4.2 SFE módszer optimalizálása

Az extrakciók során kapott eredmények statisztikai elemzése igazolta, hogy az adatok alkalmasak a modellek elkészítéséhez és az optimális paraméterek meghatározásához.

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.

4.3 Kakukkfűolaj eredmények

4.3.1 Vízgőz-desztilláció eredményei

A különböző fenofázisban gyűjtött friss és szárított növényből nyert illóolaj mennyiségeket a 4. táblázat tartalmazza.

4. 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

4.3.2 Kakukkfű illóolajának kémiai összetétele

Az eredményeket az 5. táblázat foglalja össze.

5. táblázat Különböző virágzási fenofázisokban gyűjtött friss és szárított kakukkfűből kivont illóolaj minták százalékos összetétele

Komponensek	MS Sim (%)	LRI Exp	LRI Ref	Gyűjtési időszakok					
				1	2	3	4	5	6
<i>α</i> -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
<i>α</i> -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
<i>γ</i> -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 retenció index (experimental linear retention index); LRI ref, referencia lineáris retenció 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 táblázat az 1%-ot el nem érő komponenseket nem tartalmazza.

4.3.3 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, mert a „teljes” illóolaj (kakukkfű illóolaj) antibakteriális hatására voltunk kíváncsiak. A gátlási zónák átmérőjét mm-ben fejeztük ki. Az illóolajok törzsoldatából 1 µl-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 µl-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 a 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 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 γ -terpinén tartalmú illóolajok azonban egyes esetekben magasabb antimikrobiális aktivitást mutataak (Gömöri et al., 2018). Ezt az általunk kapott eredmények is alátámasztják.

A TLC-DB kromatográfiás 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 kromatográfiás elválasztással végzett bioautográfiás vizsgálatokba. A kakukkfű illóolajokban a timol komponens ($R_f = 0,56$), valamint annak standardja az összes vizsgált baktérium ellen mutatott aktivitást. $R_f = 0,33$ értéken további biológiai aktivitást detektáltunk. Ez megegyezik a linalool R_f értékével Wagner

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

4.3.4 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.

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

Gyűjtési időszak		1	2	3
	Virágzás kezdete	0,156	0,156	1,50
MIC érték	Teljes virágzás	0,187	0,187	1,750
	Virágzás vége	0,187	0,187	1,750
	Virágzás kezdete	0,078	0,078	0,75
MIC/2 érték	Teljes virágzás	0,093	0,093	0,87
	Virágzás vége	0,093	0,093	0,87
MIC érték	Gentamicin	---	---	6,30
	Amikacin	3,10	1,60	---
MIC/2 érték	Gentamicin	---	---	3,15
	Amikacin	1,55	1,30	---

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

4.3.5 Biofilm vizsgálat eredményei

Eredményeink azt mutatták, 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 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.

4.3.6 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) egy érett, háromdimenziós biofilm jellegzetes morfológiai elemeit mutatták. Az illóolaj kezelés azt eredményezte, hogy a baktériumsejtek a felülethez tapadtak, de nem alkottak biofilmspecifikus struktúrákat. Illetve sejtfal degradációkat is megfigyelhettünk.

4.3.7 Checkerboard-titrálás

A minimális gátló koncentráció méréseinkre alapozva checkerboard-titrálás módszerével végeztünk kombinációs kísérleteket. 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 eredmények összefoglalását a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat Kombinációs vizsgálatok eredményei

Kombináció		MIC mg/ml		MIC µg/ml		FICI	Baktérium
		Komponens 1		Komponens 2			
Komponens 1	Komponens 2	MIC _A	MIC _B	MIC _A	MIC _B		
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 additív, $\text{FICI} > 4$ esetén antagonistának tekintettük a kombinációt. Ha a FICI 1 és 4 közé eső érték, a komponensek között nem volt kölcsönhatás kimutatható.

5 Új eredmények, Összefoglalás

1. Meghatároztuk a muskotályszálya 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 hármas 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 volt 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-CO₂ 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-CO₂ 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 megkezdi a betakarítást.

4. Sikertelenül 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 γ -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 γ -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 gátlási rátát, 72,93%-ot *P. aeruginosa* ellen. A *H. influenzae* és a *H. parainfluenzae* esetében 72,32%-os és 64,88%-os gátlási rátát számoltunk. A SEM vizsgálatok megerősítették, hogy a baktériumsejtek a felülethez tapadtak, de nem alkottak biofilmspecifikus struktúrákat. Illetve sejtfal degradációkat is megfigyelhettünk.

6. Először vizsgáltuk a *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.

6 Irodalomjegyzék

- 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.
- 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.
- 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.
- Hothorn T., Bretz F., Westfall P. (2008): Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*. 50(3): 346-363.
- Jokić S., Molnar M., Jakovljević M., Aladić K., Jerković I. (2018): Optimization of supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. leaves targeted on oxygenated monoterpenes, α -humulene, viridiflorol and manool. *J. Supercrit. Fluids*. 133: 253-262.
- 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.
- KSH (2023) A pécsi megfigyelőállomás időjárési adatai. [STADAT – 5.8. A pécsi megfigyelőállomás időjárési adatai \(ksh.hu\)](#)
Letöltés dátuma: 2023. december 19.
- 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.
- 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.
- 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.
- Wagner H., Bladt, S. (2001): Plant drug analysis. In a Thin Layer Chromatography atlas. Second edition. S. Berlin. Heidelberg.

7 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, **Dr. Horváth Györgyinek** PTE GYTK Farmakognóziái 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 fejlődésemhez. Egy életre szóló élmény volt a közös munka.

Köszönettel tartozom **Dr. Pál Szilárnak**, PTE GYTK Gyógyszer technológiai 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 nem sikerült volna elkészítenem ezt a dolgozatot.

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

8 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]

9 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.