

**Illóolajok és komponenseik kölcsönhatásának, valamint  
antibakteriális tulajdonságának vizsgálata légúti megbetegedést  
okozó baktériumtörzseken**

Ph.D. értekezés tézisei



**dr. Ács Kamilla**

Gyógyszertudományok Doktori Iskola  
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika  
Biológiailag aktív anyagok izolálása és vizsgálata alprogram  
Programvezető: Prof. Dr. Deli József

Témavezető:  
Dr. Horváth Györgyi Ph.D.

Pécsi Tudományegyetem  
Gyógyszerésztudományi Kar  
Farmakognóziai Intézet  
Pécs

**2018**

## 1. Bevezetés

A légúti megbetegedések az ősztől késő tavaszig terjedő időszakban kialakuló, csaknem minden életkort érintő, nehezen kezelhető kórképek. Az elsődleges fertőzések hátterében vírusok, baktériumok és gombák egyaránt állhatnak, ezenfelül további problémát jelent az igen gyakori bakteriális felülfertőződés veszélye is. Napjainkban a hatékony terápia megtalálását nagyban nehezítik az elmúlt évek nem megfelelő, illetve túlzott antibakteriális terápiának köszönhetően az egyre nagyobb számban megjelenő rezisztens törzsek. A klasszikus antibiotikumok ennek következtében sok esetben csökkent hatékonyságúak, nem ritkán teljesen hatástalanokká válnak a korábban még érzékeny törzsekkel szemben is. Az egészségügy részéről ezért folyamatos igény mutatkozik olyan új terápiás lehetőségek és hatóanyagok felfedezésére, amelyek kiegészítve, vagy akár helyettesítve az antibakteriális terápiát fel tudják venni a harcot az ellenálló mikrobákkal szemben.

Az illóolajok több komponensből álló, hidrofób növényi kivonatok, amelyek antimikrobás hatása már régóta ismert és alkalmazott a gyógyászatban. Illékony karakterükből adódóan inhaláció útján könnyen lejutnak a légutakba, összetételüknek köszönhetően több támadásponton képesek a baktériumok elpusztítására. Manapság a betegek részéről tapasztalt nagy érdeklődés a természetes gyógymódok és gyógynövények iránt fokozottan indokoltá teszi ezen lehetőségek részletesebb megismerését a gyakorló szakemberek számára is. Fontos kiemelni, hogy az illóolajok döntő többségének használata tradicionális felhasználáson alapul, így sok esetben nem rendelkezünk elegendő adattal hatásuk, adagolásuk illetve biztonságos alkalmazásuk tekintetében.

Bár az illóolajok antimikrobás hatásának értékelése számos kutatás alapját képezte az elmúlt évtized során, a vizsgálatok a klasszikus antimikrobás vizsgálómódszerek alkalmazásával főként az illóolaj folyékony halmazállapotban történő vizsgálatára irányultak. Az illóolajok gyógyászati alkalmazása elsősorban inhaláció révén valósul meg, amely során a meghatározott hőmérsékleten képződött gőztér illékony komponensei fejtik ki hatásukat. Ezt a gyakorlati alkalmazást modellezi legjobban az *in vitro* körülmények között megvalósítható gőzteres (vapor phase) módszer, azonban jelenleg kevés ilyen vizsgálat áll rendelkezésünkre, amelyekbe légúti baktériumokat vontak be

Az antibiotikum-rezisztencia kezelési nehézségei esetén az új terápiás alternatívák felkutatása mellett lehetőséget nyújthat a már bizonyítottan aktív anyagok egymással és egyéb szerekkel való kombinációja, ezáltal az antibakteriális hatásösségük fokozása. Ennek megfelelően az elmúlt évtizedekben egyre jelentősebb az illóolajok és komponenseik egymással, valamint klasszikus antimikrobás szerekkel történő kombinációjának feltérképezése különböző patogének esetében.

## 2. Célkitűzések

A fent említettek alapján kutatásunk célja volt:

- Néhány kereskedelmi forgalomban beszerezhető illóolaj (kakukkfű, szegfűszeg, fahéjkéreg, borsmenta, citronella, eukaliptusz, erdeifenyő), valamint egy Mongóliában honos illóolaj-tartalmú gyógynövény (*Artemisia adamsii* Besser) antimikrobás hatásának értékelése légúti kórokozók ellen.
- Az illóolajok és az általuk kialakított gőztér kémiai összetételének meghatározása GC-FID, GC-MS és sHS-SPME-GC-MS módszerekkel.
- A klasszikus *in vitro* csőhígítás módszer alkalmazása mellett törekedtünk az illóolajok természetének leginkább megfelelő, valamint az inhaláltatás körülményeit legjobban modellező módszerekkel is tesztelni mintáinkat. Ezért

direkt bioautográfiás, valamint gőzteres technika segítségével is vizsgáltuk mintáink antibakteriális hatását.

- Célunk volt a módszerek bizonyos mértékű összevetése is annak érdekében, hogy megállapítsuk, az adott illóolaj folyékony állapotban közvetlenül, vagy az illékony komponensek által kialakított gőztér segítségével tud hatékonyabb antibakteriális hatást kifejteni.
- Végül az antibakteriális hatás vizsgálata során hatásos illóolajokból és komponenseikből összeállított kombinációk tesztelése bioautográfia és checkerboard módszerekkel, fókuszálva a légutakban előforduló rezisztens baktériumtörzsekre.

Eredményeink az illóolajok terápiás felhasználásának bővíthetősége mellett hiteles információként szolgálhatnak a gyakorló szakemberek és betegek számára, ezenfelül a gyógyszerfejlesztés szempontjából is előnyök lehetnek a légúti megbetegedés kezelésére alkalmas új készítmények tervezése során.

### 3. Vizsgálati anyagok és módszerek

#### 3.1 A vizsgálatok során alkalmazott illóolajok

Vizsgálatainkba a fahéjkéreg (*Cinnamomum zeylanicum* Nees.), szegfűszeg (*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry), kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.), eukaliptusz (*Eucalyptus globulus* Labill.), erdeifenyő (*Pinus sylvestris* L.), borsmenta (*Mentha × piperita* L.) és citromella (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle) illóolajokat vontuk be. A minták az Aromax Zrt.-től kerültek beszerezésre. Az illóolajok összetételét és minőségüket gázkromatográfiás módszerrel határoztuk meg.

Kutatásunk során egy Mongóliában honos gyógynövény, az *Artemisia adamsii* Besser illóolajának vizsgálatára is lehetőségünk volt. A növényi anyag begyűjtését és azonosítását Dr. Tserennadmid Rentsenkhand biológus (National University of Mongolia, School of Biology) végezte el számunkra. A drog illóolaj-tartalmának meghatározására vízgőz-desztillációt végeztünk a VII. Magyar Gyógyszerkönyvnek megfelelően. A módszer során, közvetlenül a felhasználást megelőzően aprított 25,0 g tömegű, abszolút száraz droghoz 500 ml vizet adva, a forrástól számított 3 órán át végeztük a desztillálást.

#### 3.2 Analitikai vizsgálatok

##### 3.2.1 A gázkromatográfiás analízis paraméterei

Az illóolajok gázkromatográfiás vizsgálatát a budapesti Semmelweis Egyetem Farmakognóziái Intézetében Dr. Böszörményi Andrea végezte el számunkra. A mérések során lángionizációs (flame ionization detector – FID), valamint tömegspektrometriás (mass spectrometry – MS) detektálások történtek. Az adatokat MSD ChemStation D.02.00.275 software (Agilent) használatával értékeltük. A kvantitatív meghatározás során a komponensek retenciós idejét és tömegspektrumait standardok és a NIST 2.0 könyvtár adataival hasonlítottuk össze, a százalékos értékelést területnormalizációval végeztük el.

*A GC-MS és GC-FID elemzésének körülményei:*

Illóolajaink GC-MS és GC-FID vizsgálatának paraméterei: Az injektálás 250°C-on történt, split módban, 1:50 split aránnyal (Aromax olajok) illetve 280°C-on 0,7 mg/ml, splitless módban (*A. adamsii*). Az analízist Agilent 6890N/5973N GC-MSD (Santa Clara, CA, USA) készülékkel, Agilent HP-5MS, Agilent SLB-5MS kapilláris kolonnákon (30 m × 250 µm × 0.25

$\mu\text{m}$ , GC-MS), valamint Rt- $\beta$ -DEXm kolonnán ( $30\text{ m} \times 250\ \mu\text{m} \times 0.25\ \mu\text{m}$ ; GC-FID) végeztük. A kolonna hőmérséklete Aromax illóolajok esetén: 3 perces izoterm szakasz után  $60\text{-}250^\circ\text{C}$ -ra emelkedett  $8^\circ\text{C}/\text{perc}$  sebességgel, a végső hőmérsékletet 1 percre tartottuk. Az oszlop hőmérséklete *A. adamsii* illóolaja esetén: 3 perces izoterm szakasz után  $60\text{-}200^\circ\text{C}$ -ra emelkedett  $8^\circ\text{C}/\text{perc}$  sebességgel, amelyet  $10^\circ\text{C}/\text{perc}$  sebességgel emelkedő  $200\text{-}250^\circ\text{C}$ -os szakasz követett, a végső hőmérsékletet 15 percre tartottuk. Vivőgáz: hélium, áramlási sebessége  $1,0\ \text{ml}/\text{perc}$  ( $37\ \text{cm}/\text{s}$ ) volt, constant flow módban. A tömegspektrometriás detektálás quadrupole tömegszelektív detektorral történt. A lángionizációs detektor hőmérséklete  $240^\circ\text{C}$  volt. GC-FID mérés esetén a vivőgáz nitrogén volt ( $6,8\ \text{ml}/\text{perc}$ ).

### 3.2.2 Statikus gőztéranalízis szilárd fázisú mikroextrakcióval (sHS-SPME)

Az eljárást a következő protokoll szerint hajtottuk végre:  $10\ \mu\text{l}$  illóolajat  $20\ \text{ml}$ -es, szilikon/PTFE szeptummal lezárt HS üvegbe mértünk. Az analízis során a minta vételezése CTC Combi PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) típusú automata mintavevő alkalmazásával történt. A minta 5 perces  $40$  és  $100^\circ\text{C}$ -on végzett inkubálása után a  $65\ \mu\text{m}$  filmvastagságú StableFlex polidimetilsziloxán/divinil-benzol (PDMS/DVB) SPME szálát (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a minta gőzterébe juttattuk, majd az extrakciót 20 percre végeztük  $40^\circ\text{C}$ -on és  $100^\circ\text{C}$ -on. Ezután az SPME szálát a gázkromatográf injektorába vittük át, ahol a deszorpció  $250^\circ\text{C}$ -on történt, 1 percre. Az injektálást split módban kiviteleztük,  $1:30$  aránnyal. Végül a szálát nagy tisztaságú nitrogén gázban  $250^\circ\text{C}$ -on 15 percre tisztítottuk és kondicionáltuk. Az *A. adamsii* illóolajminta esetén SPME analízist nem végeztünk.

## 3.3 Illóolajok antibakterális hatásának vizsgálata

### 3.3.1 A vizsgált mikroorganizmusok áttekintése

Kutatásainkba elsősorban olyan humán patogén mikroorganizmusokat vontunk be, amelyek a légutakat érintő kórképek kialakulásában játszanak fontos szerepet. Ezen felül két antibiotikum-rezisztens törzssel is dolgoztunk, amelyek elsősorban az immunszupresszált betegek körében kiemelt jelentőségűek. Klinikai mintákból izolált törzsek: meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA, 4262) multirezisztens *Pseudomonas aeruginosa* (R-*P. aeruginosa*, 34205) és *Streptococcus pyogenes* (116). Ezenfelül a német és amerikai törzsgyűjteményből *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. pneumoniae* (DSM 20566), *S. mutans* (DSM 20533), *Haemophilus influenzae* (DSM 4690), *H. parainfluenzae* (DSM 8978), *Moraxella catarrhalis* (DSM 9143) törzseket használtunk fel kísérleteinkben.

### 3.3.2 Tesztbaktériumok antibiotikum érzékenységének meghatározása

A mikroorganizmusok antibiotikum érzékenységének meghatározására Kirby-Bauer korongdiffúziós módszert alkalmaztuk CLSI és a Manual of Clinical Microbiology által leírt követelményeknek megfelelően. A korongok felhelyezése után 15 percen belül a Petri-csészéket  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk 16-18 órán át, majd látható fényben értékeltük a kialakult gátlási zónákat. A következő antibiotikumokkal szembeni érzékenységet vizsgáltuk: amikacin, amoxicillin/klavulánsav, ceftazidim, cefepim, ciprofloxacín, eritromicin, gentamicin, imipenem, kolisztin, levofloxacín, meropenem, oxacillin, penicillin, piperacillin/tazobaktám, trimetoprim/szulfametoxazol, tobramicin, vankomicin (OXOID Ltd.).

### 3.3.3 Az antibakteriális hatás *in vitro* vizsgálómódszerei

A csőhígítás, direkt bioautográfia, valamint a gőztéranalízis módszerét alkalmaztuk illóolajaink antimikrobás hatásának értékelésére. Az előbbi két módszer főként az illóolajok folyékony állapotban való vizsgálatára, míg a gőzteres vizsgálatok során az illékony komponensek mikroorganizmusok növekedésére gyakorolt gátló hatását értékeltük. Eredményeinket a csőhígítás és bioautográfia esetén a terápiában is alkalmazott antimikrobás szerek hatásával vetettük össze. Az *A. adamsii* illóolaját a rendelkezésre álló korlátozott mintamennyiség miatt csak a direkt bioautográfia módszerével volt lehetőségünk vizsgálni.

### 3.3.3.1 Direkt bioautográfias vizsgálatok

Az *A. adamsii* illóolajának antimikrobás hatását a komponensek elválasztását követően valamint azok elválasztása nélkül is értékeltük. A rétegek előkészítése az illóolaj összehatásának értékeléséhez a következők szerint történt: abszolút etanollal (Molar Chemicals Ltd., Halásztelek) 200 µl/ml-es törzsoldatot készítettünk, amelynek 3 és 5 µl-ét szilikagél rétegre (Merck TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 5 x 10 cm) vittük fel. Kontrollként vankomicin 1 mg/ml-es törzsoldatának 4 µl-e került felhasználásra. A komponensek aktivitásának értékelése az alábbiak szerint valósult meg: az illóolaj törzsoldatának 1, 3 és 5 µl-ét pontban 10 x 10 cm-es szilikagél rétegre vittük fel üvegapilláris (Hirschmann Laborgerate GmbH & Co. KG, Eberstadt, Germany) segítségével. A rétegen az 1,8-cineol és tujon standard (Sigma Aldrich Ltd.) 10 µl/ml-es oldatának 2 µl-ét is alkalmaztuk. A kifejlesztés szobahőmérsékleten (23°C), telített gőzterű kromatográfias kamrában (CAMAG, Muttenz, Switzerland) toluol és etil-acetát 93:7 (v/v) arányú elegyével történt.

Aromax olajok esetén a hatás értékelése kromatográfias elválasztás nélkül valósult meg a következő paraméterekkel: az illóolajok 5-10-20-30 mg/ml-es abszolút etanollal készült oldatának 5 µl-ét üvegapilláris segítségével szilikagél rétegre (5 x 10 cm) vittük fel. A referenciaként alkalmazott antibiotikumokból (vankomicin, polimixin B, ciprofloxacín) steril desztillált víz felhasználásával 0,25-0,5 mg/ml-es törzsoldatokat készítettünk, amelyekből 1 µl került felvitelre. Az oldószer aktivitásának kizárása érdekében kontrollként 5 µl abszolút etanolt alkalmaztunk.

#### *Bioautográfias folyamatok kivitelezése:*

Elsőként a folyékony táptalajba oltott baktérium-szuszpenzió csíraszám beállítása (~ 4 x 10<sup>7</sup> CFU/ml) történt optikai denzitásmérés alapján (600 nm-en 0,4-hez közelítő értékre). Ezután az előkészített rétegeket 10 másodpercig a suszpenzióba merítettük, majd pára kamrában (20x14,5x5 cm) 37°C-on 17 órán át inkubáltuk. A detektáláshoz MTT festéket [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid, Sigma Aldrich Ltd., Budapest] alkalmaztunk, amelyet újabb 2 órás inkubálás követett. Az értékelést ezt követően látható fényben végeztük. A gátlási zónák átmérőit Motic Images Plus 2.0 programmal értékeltük ki. Minden esetben három párhuzamos vizsgálatot végeztünk.

### 3.3.3.2 A csőhígítás módszere

Az Aromax olajai és folyékony Müller-Hinton (MHA) táptalaj segítségével 50 µl/ml-es kezdő koncentrációból kiindulva felező módszerrel hígítási sorozatot készítettünk 0,0075 µl/ml végkoncentráció eléréséig. A kísérlet megkezdését megelőzően minden illóolajat Millex-GV filteren szűrtünk át (filter unit: 0,22 µm, Millipore, Ireland). Az illóolaj homogén eloszlásának érdekében 10%-os Tween 80 oldat (Reanal Kft., Budapest) 20 µl-ét adagoltuk a hígítás megkezdése előtt a kezdő koncentrációhoz. *Moraxella catarrhalis* esetén a Tween 80 helyett frissen desztillált dimetil-szulfoxid (DMSO, Reanal Kft., Budapest) 10%-os oldatát

használtuk fel a poliszorbáttal megegyező módon. A hígítást követően minden csőhöz  $4 \times 10^7$  CFU/ml csíraszámú baktérium-szuszpenzió 10 µl-ét adtuk, majd homogenizáltuk a csövek tartalmát. Negatív kontrollként kezeletlen, valamint 20 µl szolubilizáló szert tartalmazó táptalajt használtunk. *H. influenzae* és *H. parainfluenzae* esetén a mikrobák növekedéséhez szükséges faktorokat (X és V faktor, Bacto Supplement B, DIFCO, USA) 15 µg/ml-es koncentrációban a táptalajhoz adtuk.

A referencia antibiotikumok aktivitásának tesztelése hasonló elrendezéssel valósult meg, 100 µg/ml-es koncentrációból kiindulva. Ebben az esetben szolubilizáló szert nem alkalmaztunk, kontrollként baktériummal beoltott kezeletlen táptalajt használtunk. Összehasonlítás céljából vankomicin, gentamicin, imipenem amoxicillin/klavulánsav és amikacin antibiotikumokat alkalmaztunk.

A csöveket alapos homogenizálást követően 24 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk, majd 10 µl-t újabb alapos kevertetést követően a mikroorganizmusnak megfelelő szilárd táptalaj felszínére szélesztettük. A táptalajokat ezután újabb 48 órán át ismét 37°C-os inkubálásnak vetettük alá. Ezt követően került meghatározásra az adott minta mikroorganizmussal szembeni minimális gátló (MIC), valamint minimális baktericid koncentrációja (MBC). Minden esetben három párhuzamos vizsgálatot végeztünk.

### 3.3.3.3 A vapor phase technika paraméterei

Vizsgálataink Kloucek és munkatársai (2012) által korábban bemutatott vapor phase technikán alapultak. Eltérés, hogy táptalajt nem öntöttünk a gőztér kifejlesztése használt négyosztatú 90 mm átmérőjű Petri-csésze tetejébe (VWR, Debrecen). Minden rekeszbe 5 ml-nyi megfelelő táptalaj került (MHA táptalaj, 5%-os birka véres agar, csokoládé agar), amelynek felszínére a baktériumok  $10^5$  CFU/ml csíraszámú szuszpenziójának 20 µl-e került elszélesztésre. Kiemelendő, hogy egy vizsgálat során egyszerre három különböző mikrobát vizsgáltunk, ennek megfelelően a Petri-csésze negyedik osztatát kezeletlen kontrollként, a kontamináció ellenőrzése céljából, szabadon hagytuk. Abszolút etanolban hígítva az adott illóolajból törzsoldatot (0,5-195 µl/ml) készítettünk, amelyből 500 µl-t 84 mm átmérőjű szűrőpapírkorongra (Albet-Hahnemühle, Germany) vittünk fel. Az oldószert ezután fél percig szobahőmérsékleten elpárologtattuk, majd a korongot a Petri-csésze rekeszeinek osztatára helyeztük. Illóolajaink így közvetlenül a táptalaj felszínével nem kerültek kapcsolatba, a légtérbe párologó komponenseik hatását modelleztük. A Petri-csészéket parafilmrel (Sigma Aldrich Ltd., Budapest) zártuk le, majd 37°C-on 48 órás inkubálást követően meghatároztuk a MIC értékeket.

## 3.4 Illóolajok és illó komponenseik kölcsönhatásának vizsgálata

Az illóolajok és komponenseik kombinációjának vizsgálatához a checkerboard, valamint a direkt bioautográfia módszerét alkalmaztuk. A kísérletet az aktibakteriális hatás tesztelésénél kapott eredmények tükrében a fahéjkéreg, a szegfűszeg, a kakukkfű, a citronella, a borsmenta illóolaja, valamint főkomponenseik a *transz*-fahéjaldehid, az eugenol, a timol, a mentol, a geraniol, a citronellál és a citrál (geraniál és nerál keveréke) (Sigma Aldrich Kft.) kombinációival végeztük. A vizsgáltokba bevont törzsek: MRSA (4262), *R-P. aeruginosa* (34205), valamint *P. aeruginosa* (ATCC 27853) voltak.

### 3.4.1 A direkt bioautográfias módszer vizsgálati körülményei

A vizsgálatok során elsőként az adott mikroorganizmus esetén antibakteriális hatással rendelkező komponensek kimutatását, majd azok minimális detektálható dózisének (MDD) meghatározását végeztük el.

#### 3.4.1.1 Mikrobiológiailag aktív komponensek meghatározása

Az adott illóolaj 100 µl-ének 500 µl abszolút etanollal készült törzsoldatából, valamint a főkomponensek 40 mg/ml-es oldatából 0,6 µl-t 20 x 10 cm-es szilikagél rétegre vittünk fel automata pipetta segítségével (Finnpipette, Thermo Fisher) 2 párhuzamos vizsgálatban.. A rétegeket telített gőzterű kromatográfiás kamrában fejlesztettük ki 8 cm-es frontávolságig. Mobilfázisként fahéjolaj kivételével minden esetben a toluol és etil-acetát 93:7 (v/v%) arányú elegyét használtuk. Fahéjolaj esetén a mozgófázis etanollal stabilizált metilén-klorid volt (Molar Chemicals Kft.). Az elválasztást, valamint az ezt követő oldószer elpárologtatását szobahőmérsékleten (22°C) végeztük.

A rétegekkel ezután a 3.3.3.1. fejezetben leírt bioautográfiás folyamatokat hajtottuk végre, a festés előtti inkubációs időt 4 órára csökkentve.

#### 3.4.1.2 Minimális detektálható dózis meghatározása

A gátlási zónát eredményező aktív komponensek 10-20-30-40-50-60 mg/ml koncentrációjú abszolút etanollal készült törzsoldatainak 0,2-0,4-0,6-0,8-1,0-1,2-1,5 µl-es mennyiségét szilikagél rétegre vittük fel, amelyekkel ezután a 3.4.1.1. fejezetben említett bioautográfiás folyamatokat hajtottuk végre.

#### 3.4.1.3 A kölcsönhatást vizsgáló módszer paraméterei

Az előzetes vizsgálatok alapján MRSA esetén az eugenol-mentol, *transz*-fahéjaldehyd-mentol, timol-mentol, geraniol-timol, *P. aeruginosa* esetén az eugenol-mentol, *transz*-fahéjaldehyd-mentol, timol-mentol, geraniol-timol, citrál-timol, citronellál-timol, citronellál-citrál, citrál-geraniol, citronellál-geraniol kombinációk vizsgálatára került sor. *R-P. aeruginosa*-val szemben a *transz*-fahéjaldehyd-timol, eugenol-timol, *transz*-fahéjaldehyd-eugenol kombinációi kerültek tesztelésre. A mintafelvitelek után a 3.4.1.1. fejezetben említett bioautográfiás eljárásnak megfelelően kezeltük a rétegeket. Minden esetben 4 párhuzamos vizsgálatot végeztünk. A gátlási zónák átmérőit Motic Images Plus 2.0 programmal értékeltük ki.

#### 3.4.2. Statisztikai analízis

A direkt bioautográfiás kölcsönhatás vizsgálatok eredményeinek statisztikai analízisét R Studio 1.1.383 (R verziószám: 3.4.3) program Mann-Whitney-Wilcoxon tesztje segítségével végeztük el. A vizsgálatok célja a kombinációk eredményességének detektálása, vagyis az önálló (nem kombinált) komponensek gátlási zónáitól (ZOI) való pozitív eltérés kimutatása volt. Az elemzés során a nullhipotézis  $H_0: \mu_{\text{kombinációZOI}} - \mu_{\text{komponensZOI}} = 0$ , az alternatív hipotézis  $H_1: \mu_{\text{kombinációZOI}} - \mu_{\text{komponensZOI}} > 0$  volt.

#### 3.4.3 A checkerboard módszer vizsgálati körülményei

##### 3.4.3.1. MIC értékek meghatározása

A fahéjolajjal, a szegfűszegolajjal, a citromlajjal, a borsmentaolajjal és a kakukkfűolajjal valamint ezek főkomponenseivel készült kombinációkat checkerboard módszerrel teszteltük *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ellen. A vizsgálatok a Szegedi Tudományegyetem,

Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszékével együttműködésben történtek. Rezisztens humán patogén baktériumtörzsekkel ebben a tesztszerben nem volt lehetőségünk kísérletek elvégzésére. Elsőként az adott komponens, illetve illóolaj MIC értékének meghatározását végeztük el. A vizsgálati anyagok koncentráció-tartománya 100-0,1 mg/ml között volt. A mikroorganizmusok szuszpenziójából ( $10^5$ /ml sejtszám) 100  $\mu$ l-t adva a 100  $\mu$ l mennyiségű vizsgálati mintát tartalmazó tápközegekhez, a tenyészeteket 24 órán át inkubáltuk 37°C-on. A mérések 96 cellás steril, polisztirol mikrotiter lemezekben (VWR International Kft.) történtek. Az illó komponenseket nem tartalmazó sejtuszuszpenziós tápoldat pozitív kontrollként, a sejtmentes tápoldat negatív kontrollként szolgált. Ezt követően 600 nm-en mértük a minták abszorbanciáját mikrotiterlap olvasóval (SPECTROstar Nano Microplate reader, BMG Labtech). Azt a koncentrációt tekintettük MIC értéknek, ahol a pozitív kontroll abszorbanciájához képest 10%-ra csökkent értékeket mértünk. A vizsgálatok 2 párhuzamos elrendezés szerint történtek.

#### 3.4.3.2. A checkerboard mérés paraméterei

A mérések 3 párhuzamosban történtek 96 cellás steril, polisztirol mikrotiter lemezekben, mintahelyenként 200  $\mu$ l végtérfogatban. Egy mintahely 50-50  $\mu$ l MHA tápoldatban vizsgálandó anyagot valamint 100  $\mu$ l  $10^5$ /ml sejtszámú szuszpenziót tartalmazott. A tesztekhez az illóolajok és komponenseik törzsoldataiból felező hígítási sort készítettünk 1%-os Tween 40 oldat (Sigma Aldrich Kft.) és MHA táptalaj segítségével 2 x MIC, MIC, MIC/2, MIC/4 és MIC/8 koncentrációkban. A mikrotiter lemezen a hatóanyagok kombinációja ellentétes irányban csökkenő koncentrációk szerint valósult meg. A lemez elkészítése után 24 órás inkubáció következett 37°C-on. Ezt követően az abszorbanciaértékeket 600 nm-en mértük mikrotiterlap olvasóval. Kontrollként illó komponens nem tartalmazó baktérium szuszpenziót, valamint sejtmentes táptalajt alkalmaztunk. Egy kombinációt egy lemezen 4 párhuzamos mérésben vizsgáltunk. A két hatóanyag közötti kölcsönhatás típusának megállapításához frakcionális gátló koncentráció indexet (FICI) számítottunk ki. Amennyiben a FICI  $\leq 0,5$  a két szer közötti kölcsönhatást szinergistának,  $0,5 < \text{FICI} < 1$  közötti érték esetén additívnak, FICI  $> 1$  esetén antagonistának tekintettük. Ha a FICI 1 és 4 közé eső érték, a komponensek között nem volt kölcsönhatás kimutatható.

## 4. Eredmények és következtetések

### 4.1 Az *Artemisia adamsii* illóolaj-tartalmának meghatározása

A drogból desztillált illóolaj mennyisége 0,56 ml volt 100 g abszolút száraz drogra vonatkoztatva. Az illóolaj jellegzetes ürmös illatú és halványsárga színű volt eltérően a nemzetség más tagjaiétól. Ezért feltételeztük, hogy a drog nem tartalmaz proazulén-származékokat, amelyet a későbbi gázkromatográfiás vizsgálatok is megerősítettek.

### 4.2 Az analitikai vizsgálatok eredményei

#### 4.2.1 A GC-FID és GC-MS analízis eredményei

*Az A. adamsii* illóolajának vizsgálata:

Az illóolaj fő komponense az  $\alpha$ -tujon (64,4%) volt. Ezen felül kisebb mennyiségben 1,8-cineol (15,2%),  $\beta$ -tujon (7,1%), *p*-cimol (1,5%), linalool (0,4%), terpinén-4-ol (1,5%) és spatulenol (1,8%) jelenlétét sikerült kimutatni.



Ellentétben korábbi publikációkkal, esetünkben a limonén komponens nem volt detektálható az illóolajban, amely vélhetően a gyógynövény begyűjtési helyének eltéréseiből adódhatott.

#### *Az Aromax illóolajok vizsgálata:*

Mindegyik illóolaj esetében a komponensek több mint 96%-át sikerült azonosítanunk. A fahéjkéreg illóolajában a fő komponens a *transz*-fahéjaldehid volt (74%), kisebb mennyiségben (1,4-5,3%) eugenol, limonén, 1,8-cineol, fahéj-acetát és linalool komponensek fordultak elő. A citronella esetén a citronellal (36,2%) volt kimutatható, mint fő komponens, azonban nagyobb mennyiségben (13,6-25,3%) citronellol és geraniol is megtalálható volt az illóolajban. A szegfűszeg olajának eugenol komponense 88,6%-ban, míg az eukaliptusz olajában az 1,8-cineol (= eukaliptol) 84,8%-ban volt jelen. Korábbi irodalmakhoz képest kis eltérés mutatkozott eukaliptusz mintánk  $\alpha$ -pinén és *p*-cimol tartalmában. A borsmenta illóolaja 50,4%-ban mentolt tartalmazott fő komponensként. Mintánk izomentol komponensének mennyisége (4,3%) meghaladta az irodalomban megadott határértékeket (0,2-1,2%). Az erdeifenyő olajban  $\alpha$ -pinént azonosítottuk fő komponensként (39,4%), azonban kamfén-, és limonén-tartalmára vonatkozóan jelentős eltéréseket tapasztaltunk a korábbi publikációk eredményeihez képest.

A kakukkfű illóolajában a timol volt kimutatható a legnagyobb mennyiségben (46,3%). Az illóolaj linalool és *p*-cimol összetevője nagyobb százalékban, míg karvakrol és  $\gamma$ -terpinén alkotója a korábban közölt irodalmi adatokhoz képes kisebb mennyiségben volt jelen.

#### 4.2.2 Az sHS-SPME-GC-MS eredményei

A vizsgálat során a minták analízise 40°C-on és 100°C-on valósult meg. A 40°C-os inkubációs hőmérsékletet azért alkalmaztuk, mivel a mikrobiológiai gőzteres vizsgálatokban is ezt megközelítő paramétert használtunk (37°C).

Fahéj olaj esetén 40°C-on és 100°C-on egyaránt az illóolaj fő komponense, a fahéjaldehid (45,9-52,1%) dominált a gőztérben. Ezenfelül 5% feletti mennyiségben, 40°C-os inkubálásnál, a légtérben *p*-cimol,  $\alpha$ -pinén, 1,8-cineol, limonén, linalool és  $\beta$ -kariofillén volt kimutatható. Fahéj-acetátot csak kis mennyiségben (1,9% és 3%) detektáltunk a gőztérben mindkét hőmérsékleten.

A citronellaolajban a citronellál (40,0-42,3%) mellett 10% feletti mennyiségben limonén és nerol volt kimutatható 40°C-on. Citronellol komponens hasonló arányban egyedül a 100°C-on történő inkubáció esetén volt jellemző. A GC-FID-del kimutatott geraniol komponens a gőztéranalízis során csak igen kis mennyiségben volt kimutatható (0,8% és 0,9%). 1-3%-ban szeszkviterpén komponensek ( $\beta$ -elemén,  $\beta$ -muurolén,  $\beta$ -kadinén) is jelen voltak a gőztérben mindkét hőmérsékleten.

Az eukaliptuszolaj esetén 40°C-on és 100°C-on is az 1,8-cineol (91,0% és 91,7%) valamint kisebb százalékban (3,6% és 4,4%) a  $\gamma$ -terpinén dominált.

A szegfűszeg illóolajában az analízis során, hasonlóan a GC-FID eredményeihez, úgy találtuk, hogy mindkét hőmérsékleten az eugenol, a  $\beta$ -kariofillén és az  $\alpha$ -humulén volt jelen nagyobb mennyiségben. A komponensek aránya a két hőmérséklet esetén közel azonosnak tekinthető.

Az erdeifenyő olajában, 40°C-on történt inkubáció esetén, az  $\alpha$ - és  $\beta$ -pinén mellett elsősorban limonén és  $\delta$ -3-karén volt kimutatható 10% feletti mennyiségben.

A kakukkfűolaj vizsgálatánál a timolon kívül a *p*-cimol jelenléte határozta meg a gőztér összetételét. Emellett kiemelendő az 1,8-cineol, linalool és  $\gamma$ -terpinén 3%-ban, illetve 6%-ban való jelenléte is.

Borsmentaolaj esetén a mentol (27,2% és 33,2%) és származékai mellett az 1,8-cineolt azonosítottuk jelentős mennyiségben (16,4% és 17,4%).

Megállapítható, hogy az sHS-SPME-GC-MS analízis során a GC-FID vizsgálattal egybevágó eredményeket kaptunk az illóolajok fő komponenseinek előfordulása tekintetében. Ennek ellenére meg kell jegyeznünk, hogy számos esetben a lángionizációs detektálás során nagyobb százalékban azonosított komponensek nem fordultak elő 1% feletti mennyiségben a vizsgált illóolajok által kialakított gőzterekben, illetve kisebb eltérések mutatkoztak a 40°C-on és 100°C-on történt inkubációk esetében. A különbségek abból adódhatnak, hogy különböző hőmérsékleten az egyes illóolaj-komponensek eltérő forráspontúak és illékonyaságúak.

### 4.3 Tesztbaktériumok antibiotikum érzékenységének értékelése

A korongdiffúziós vizsgálatok célja volt, hogy az antimikrobás tesztek során megfelelő antibiotikum kerüljön kiválasztásra, amellyel összehasonlíthatjuk illóolajaink aktivitását. A vizsgálatok segítségével ezen felül meghatároztuk a betegből izolált törzsek klasszikus szerekkel szembeni rezisztenciáját is.

Ennek megfelelően MRSA esetén a vankomicint és gentamicint, *Haemophilus* törzsek esetén az amikacint, *Streptococcusok* és *M. catarrhalis* ellen az imipenemet választottuk ki. A *Pseudomonas* törzsek ellen a Polimixin B, ciprofloxacin és gentamicin mellett döntöttünk.

### 4.4 Az illóolajok antibakteriális hatásának értékelése

#### 4.4.1 Direkt bioautográfiás vizsgálatok

*Az A. adamsii illóolajának bioautográfiás vizsgálata:*

Az illóolaj magas  $\alpha$ -tujon-tartalma valószínűleg nem tenné lehetővé annak jelentős mellékhatások nélküli inhalációs alkalmazását, azonban mindenképpen érdemesnek tartottuk hatását feltérképezni MRSA esetén, amely kórházi környezetben gyakran előfordul.

Az összillóolaj abszolút etanollal készült hígítása gátló hatást mutatott MRSA esetén. A 3 és 5  $\mu$ l törzsoldat (0,558 mg és 0,903 mg hígítatlan illóolaj) által kialakított gátlási zónák átmérője 4,5 mm illetve 5,5 mm volt. A rétegre felvitt 0,004 mg vankomicin esetén 7 mm-es gátlási zónát detektáltunk. Ebből következik, hogy illóolajunkból nagyobb mennyiségre lenne szükség az antibiotikumhoz megközelítőleg azonos hatás elérése érdekében.

Az illóolaj egymástól vékonyréteg-kromatográfiás eljárással elkülönített összetevőinek aktivitásának vizsgálata esetén azt tapasztaltuk, hogy gátlási zónát a 0,15-0,45 közötti retenciós értékkel rendelkező terpén-alkohol komponensek mutattak. Ebből következően nem az illóolaj fő komponense ( $\alpha$ -tujon) és a GC vizsgálat szerint 15,2%-ban jelen lévő 1,8-cineol tehetők felelőssé az antibakteriális hatás kiváltásáért. Feltételezésünket igazolta, hogy a felvitt tujon illetve 1,8-cineol standard esetén fehér gátlási zóna nem volt észlelhető. Ennek megfelelően valószínűsítjük, hogy MRSA esetén az antibakteriális hatás főként az illóolaj minor vegyületeihez köthető.

Antibiotikum hatásával összevetve az illóolaj ugyan kevésbé mutatkozott aktívnek, azonban felületi fertőtlenítőként eredményesen alkalmazható szer lehet. Ennek igazolására, valamint a hatásos koncentráció meghatározására további kutatások szükségesek.

*Az Aromax illóolajok bioautográfiás vizsgálata:*

A kereskedelmi forgalomban kapható illóolajaink bioautográfiás vizsgálata főként az el nem választott illóolajok antibakteriális vizsgálatára irányultak. Illóolajaink aktivitását MRSA, *R. P. aeruginosa* és kevésbé rezisztens *P. aeruginosa* esetén vizsgáltuk meg.

MRSA esetén a szegfűszeg illóolaja eredményezte a legnagyobb gátlást (9,5 mm), amelyet aktivitásban az eukaliptusz, a kakukkfű és fahéj illóolaja követett. Borsmenta és citromella illóolaj esetén kisebb antibakteriális hatás (4,4-4,8 mm) csak a magasabb koncentrációk alkalmazása esetén volt megfigyelhető. Ezzel szemben az erdeifenyő illóolaja még magasabb koncentráció esetén sem mutatott gátlást a baktériummal szemben.

R-*P. aeruginosa*-val végezve vizsgálatokat a fahéj illóolaját találtuk a legjobbnak, a kakukkfű és szegfűszeg olaja esetén egyenértékű hatást (6,3 mm) figyeltünk meg. A többi illóolaj esetén eredményes gátlás nem volt kimutatható a baktériummal szemben. A kevésbé rezisztens *P. aeruginosa* törzset vizsgálva az előző esetben leírtakhoz hasonlóan a fahéj illóolaja volt a legerősebb antibakteriális hatású (9,3 mm). A szegfűszeg és kakukkfű olaja ugyancsak jelentős gátlást mutatott (7,3-8,0 mm). Az erdeifenyő olaja esetén egyedül a *P. aeruginosa*-val szemben detektáltunk nagyon alacsony aktivitást (3,8 mm). Ez esetben a borsmenta és citromella illóolaja hasonló aktivitást mutatott, az eukaliptusz illóolaj azonban nem eredményezett gátlást még a magasabb koncentrációkban sem. Fontos megemlíteni, hogy a vizsgálatok során oldószer-kontrollként alkalmazott abszolút etanol egyetlen esetben sem mutatott aktivitást így igazolható, hogy mintáink antibakteriális hatásáért az illóolajok komponensei tehetők felelőssé.

Pozitív kontrollként antibiotikumokat használtunk, MRSA esetén vankomicint, *Pseudomonas* törzseknél ciprofloxacint és polimixin B-t. MRSA vizsgálatokor 0,25 µg vankomicint használva 3,8 mm, 0,5 µg ciprofloxacint alkalmazva *P. aeruginosa*-nál 7 mm átmérőjű gátlást detektáltunk. A ciprofloxacint várakozásainknak megfelelően nem volt aktív R-*P. aeruginosa* ellen. Polimixin B tekintetében megfigyeltük, hogy tesztrendszerünkben az antibiotikum csupán 2 mm-es gátlást eredményezett. Ez esetben a gátlási zóna mérete nem változott a koncentráció emelésével, így feltételezzük, hogy valamilyen külső körülmény miatt az elégtelen diffúzióknak köszönhetően nem tudta kifejteni kellő hatását az antibiotikum.

Illóolajaink tekintetében kiemelő, hogy mindegyik aktívnek bizonyult legalább egy általunk vizsgált törzssel szemben, azonban aktivitásuk jelentős különbséget mutatott. MRSA esetén a szegfűszeg illóolaja, míg *Pseudomonas* törzsek esetén a fahéj illóolaja bizonyult a legaktívabbnak. Mintáink alacsonyabb hatékonyságúnak bizonyultak a vizsgált referencia antibiotikumokhoz képest, azonban aktivitásuk hasonlóképpen a terápiában alkalmazott szerekhez, koncentrációtól való függést mutatott.

#### 4.4.2 A csőhígítás módszerének eredményei

*S. pyogenes*-szel szemben leghatásosabbnak a szegfűszeg illóolaja mutatkozott (MIC: 0,1 mg/ml), amelyet aktivitásban a citromella és borsmenta illóolaja követett (MIC: 0,17 mg/ml és 0,35 mg/ml). Közel azonos aktivitásúnak találtuk a fahéjkéreg és kakukkfű olaját. Az eukaliptusz és erdeifenyő illóolaja nagyobb mennyiségben bizonyult aktívnek *S. pyogenes* ellen. A *S. pneumoniae* esetén a citromella és fahéjkéreg olaja kisebb koncentrációban gátló hatást fejtett ki (MIC: 0,06-0,09 mg/ml). A kakukkfű-, a szegfűszeg- és a borsmentaolajok MIC: 0,11-0,35 mg/ml tartományban bizonyultak aktívnek. Az eukaliptuszolajból a fahéjkéregolajhoz képest több mint húszszoros mennyiségre volt szükségünk az eredményes gátlás eléréséhez.

A kakukkfű illóolaját a *Streptococcus*-ok közül a *S. mutans*-szal szemben értékeltük a legaktívabbnak. A baktériummal szemben a fahéjkéreg, a citromella, a szegfűszeg is antibakteriális hatásúnak bizonyult (MIC: 0,17-0,41 mg/ml). Erdeifenyő esetén csak magasabb koncentrációban tapasztaltunk antibakteriális hatást. *Haemophilus* törzseknél a fahéjkéreg illóolaja volt a leghatékonyabb (MIC: 0,06 mg/ml). Kiemelő, hogy mind a *H. influenzae* mind a *H. parainfluenzae* törzsek esetén a kakukkfű, a szegfűszeg és a borsmenta illóolaja antimikrobás aktivitásban nem mutatott különbséget. Ezzel szemben a citromella és

eukaliptusz illóolajok *H. parainfluenzae* ellen hatékonyabbnak bizonyultak. Az erdeifenyő illóolaja Gram-negatív baktériumaink közül egyedül a *H. parainfluenzae*-vel és *M. catarrhalis*-szal szemben mutatott jelentősebb aktivitást (MIC: 0,34 mg/ml).

*P. aeruginosa* esetén magasabb illóolaj-koncentrációt alkalmazva a kakukkfű, a szegfűszeg és az eukaliptusz esetén szintén eredményes antibakteriális hatást detektáltunk. A borsmenta, a citronella és erdeifenyő illóolaja még nagyobb mennyiségben is csak bakteriosztatikus hatást fejtett ki erre a baktériumra.

MRSA-val szemben a borsmenta és erdeifenyő olajának kivételével minden illóolaj aktívnak mutatkozott, amelyek közül legalacsonyabb MIC értékével (0,1 mg/ml) a szegfűszeg emelkedett ki.

R-*P. aeruginosa* esetén a fahéjkéreg illóolaját találtuk leghatékonyabbnak, a többi illóolaj csupán bakteriosztatikus hatással rendelkezett. A csőhígítás során negatív kontrollként alkalmazott szolubilizálószer, valamint illóolajjal nem kezelt táptalajt tartalmazó cső esetén sem tapasztaltunk gátló hatást az adott baktérium növekedésére.

Referencia antibiotikumokkal összehasonlítva elmondható, hogy illóolaj mintáinkból az azonos hatás eléréséhez sokkal nagyobb mennyiségre lenne szükség, ennek megfelelően nem bizonyultak hatékonyabbnak a klasszikus terápiás szerekhez képest. Eredményességük azonban semmiképpen sem hanyagolható el, főként a rezisztenciával rendelkező mikroorganizmusok esetén, tekintettel arra, hogy velük szemben komplex összetételüknek és feltételezhetően több támadáspontú hatásmechanizmusuknak köszönhetően nehezebben alakul ki rezisztencia.

#### 4.4.3 A vapor phase technika eredményei

A gőzteres vizsgálatok során a mikroorganizmusok növekedését egyedül az illékony komponensek által kialakított gőztér befolyásolta. A kontrollként alkalmazott szűrőpapír és oldószer nem befolyásolta a baktériumok szaporodását. A 48 órás inkubációs periódust követően az Aromax illóolajok aktivitásának értékelésére meghatároztuk azt a legkisebb gátló koncentrációt (MIC:  $\mu\text{l/l}$ ), amely szabad szemmel vizsgálva teljes mértékben képes volt meggátolni az adott baktérium növekedését.

MRSA esetén a bioautográfiás és csőhígításos eredményeinkkel ellentétben a fahéjkéreg illóolaja által kialakított gőztér mutatkozott a legeredményesebbnek (MIC: 31,25  $\mu\text{l/l}$ ). Szintén jelentős hatást sikerült elérnünk a kakukkfű és szegfűszeg olaját magasabb koncentrációkban alkalmazva. MRSA ellen a borsmenta és citronella olaját azonos mértékben találtuk aktívnak (MIC: 375  $\mu\text{l/l}$ ), míg az eukaliptusz-, és az erdeifenyő olaj a legmagasabb koncentrációban sem eredményezett teljes gátlást.

Multirezisztens *P. aeruginosa*-val szemben egyedül a fahéjkéregolaj magas koncentrációja mutatkozott hatékonyan (MIC: 125  $\mu\text{l/l}$ ), amely megfigyelésünk egybecseng a csőhígítás során tapasztaltakkal. Ezzel szemben az antibiotikumokra érzékeny *P. aeruginosa* esetén a fahéjkéreg és a kakukkfű olajának aktivitása között nem tapasztaltunk különbséget (MIC: 31,25  $\mu\text{l/l}$ ). A bioautográfiás és csőhígításos tapasztalatokkal ellentétben a szegfűszeg, eukaliptusz és borsmenta olaja nem mutatott jelentős antibakteriális hatást a baktériummal szemben.

A *Streptococcus* törzsek ellen a fahéjkéregolaját találtuk a legaktívabbnak, legmagasabb MIC értékeket a *S. mutans*-szal szemben detektáltunk, amely jól bizonyítja a baktérium erős ellenálló képességét. Szegfűszeg esetén csak nagyobb mennyiség (MIC: 150-500  $\mu\text{l/l}$ ) alkalmazásánál tapasztaltunk antimikrobás hatást. Az eukaliptusz olaját 1200  $\mu\text{l/l}$ -es koncentrációban adva egyedül a *S. pneumoniae* növekedésének gátlása volt megfigyelhető. *H. influenzae* esetén minden illóolaj hatékonyan bizonyult (MIC: 15,62-500  $\mu\text{l/l}$ ). Kiemelendő, hogy az erdeifenyő illóolaja egyedül ezzel a mikroorganizmussal szemben mutatott jelentős

növekedés gátlást (MIC: 500 µl/l), amely tapasztalat részben egybevág a csóhígítás során megfigyeltekkel. *H. parainfluenzae* esetén az erdeifenyő kivételével szintén minden vizsgált olaj hatékony gátlást eredményezett, a MIC értékek azonban meghaladták a *H. influenzae* esetén tapasztaltakat.

*M. catarrhalis* növekedését 25 µl/l-es koncentrációban egyformán volt képes gátolni a fahéjkéreg és citronella olaja is. Szintén kis mennyiséget alkalmazva erőteljes hatással rendelkezett a kakukkfű és borsmenta olaja is. Szegfűszeg és eukaliptusz esetén egyedül a magasabb koncentrációkban mutatkozott aktivitás.

Az általunk alkalmazott módszer nagy előnye, hogy egyszerre több mikroorganizmussal szemben is megfigyelhető ugyanazon illóolaj aktivitása a vizsgálati körülmények változtatása nélkül. Kisebb hátrányt jelent azonban, hogy elsősorban azonos táptalajt és szaporodási körülményeket igénylő mikroorganizmusokat ajánlott egy elrendezésben vizsgálni. A vapor phase vizsgálatok során a tesztbaktériumok mindegyikével szemben a fahéjkéreg illóolaja bizonyult a leghatékonyabbnak, a meghatározott gátló koncentrációk azonban a mikroorganizmusnak megfelelően igen nagy változékonyságot mutattak (MIC: 15,62-125 µl/l). Ezen kívül erős antibakteriális hatással rendelkezett a legtöbb baktériummal szemben a kakukkfű, a szegfűszeg, a borsmenta és a citronella illóolaja is. Eukaliptuszolaj esetén egyedül a Gram-negatív *Haemophilusok* és *M. catarrhalis* esetén detektáltunk jelentős aktivitást. Korábbi tanulmányok szerint a Gram-pozitív törzsekhez képest a Gram-negatív baktériumok kevésbé fogékonyak az illóolajokra, köszönhetően a baktériumok antimikrobás szerekllel szembeni védekezési mechanizmusainak és külső membránjuk felépítésében lévő különbségnek (Burt 2004, Doran et al. 2009). Eredményeink Inouye és kutatócsoportjának megfigyeléseivel összhangban (2001) inkább ennek a megfigyelésnek az ellenkezőjét látszanak igazolni, mivel az általunk meghatározott MIC értékek a Gram-negatív baktériumok többségénél, kivéve *R-P. aeruginosa*-t, alacsonyabbnak bizonyultak a Gram-pozitív törzsekével összehasonlítva. *H. influenzae* esetén kiemelendő, hogy egyedül ezzel a törzsszel szemben mutatott aktivitást az összes vizsgált illóolajunk, köztük az inkább bakteriosztatikus hatással rendelkező erdeifenyő olaj is.

## 4.5 Illóolajok és illó-komponensek kölcsönhatásának értékelése

### 4.5.1 A direkt bioautográfiás vizsgálatok eredményei

#### 4.5.1.1 Aktív illóolaj-komponensek kimutatása, minimális detektálható dózisuk meghatározása

MRSA ellen a fahéjolajban lévő fahéjaldehidet, szegfűszeg esetén az eugenolt, borsmentaolajban a mentolt, kakukkfű esetén a timolt, citronellaolajban egyedül a geraniolt találtuk aktívnek. *P. aeruginosa* esetén hasonló aktivitás volt megfigyelhető, emellett a citronellaolaj két másik komponense a citronellál és citrál esetén is tapasztaltunk gátlást. *R-P. aeruginosa* ellen csupán a fahéjaldehid, timol és eugenol komponensek bizonyultak hatékonyak.

A komponensek minimális detektálható dózisának meghatározására a kombinációinak összeállítása miatt volt szükségünk. *R-P. aeruginosa*-val szemben a látható gátlás eléréséhez nagyobb mennyiségre volt szükség az adott hatóanyagokból (0,012-0,036 mg). Az illóolajokkal végzett vizsgálatokkal ellentétben a fahéjaldehid esetén enyhébb aktivitást detektáltunk a többi komponenshez viszonyítva. Ennek alapján feltételezhető, hogy a fahéjolaj aktivitásához a kisebb mennyiségben jelenlévő komponensek is hozzájárulnak. Citrál és citronellál komponensekre a *P. aeruginosa* nagyobb érzékenységet mutatott MRSA-hoz viszonyítva, amely egybecseng az összillóolajolaj antibakteriális hatásának vizsgálatokor tapasztaltakkal.

#### 4.5.1.2 Illóolaj-komponensek kölcsönhatásának értékelése

A direkt-bioautográfias módszert, tudomásunk szerint ez idáig még nem alkalmazták arra, hogy anyagok kombinációit teszteljék. Mivel a direkt módszer alkalmasnak bizonyult az antibakteriális hatás gyors és hatékony vizsgálatára, valamint a hatóanyagok aktivitási különbségeinek kimutatására, úgy véltük, mindenképpen érdemes ebből a szempontból is feltérképezni a tesztrendszer alkalmazhatóságát. Meghatároztuk a vizsgálati minták alkotóinak külön-külön létrehozott, valamint kombinációjuk esetén kifejtett gátlását. A mérési eredményeket ezután Mann-Whitney-Wilcoxon féle statisztikai analízisnek vetettük alá.

Ennek megfelelően *P. aeruginosa* esetén a mentol-timol keveréke, R-*P. aeruginosa* vizsgálatakor a *transz*-fahéjaldehid-timol kombinációja, MRSA esetén mentol-*transz*-fahéjaldehid, mentol-eugenol elegye esetén mutattunk ki nagyobb hatékonyságot. A mentol-*transz*-fahéjaldehiddel, valamint a citromlaj komponenseinek egymással illetve timollal való kombinációjának kölcsönhatása tudomásunk szerint ez idáig nem került vizsgálatra a fent említett baktériumok ellen. A timol és mentol kombinációját MRSA ellen tesztelve esetünkben nem jelentkezett kifejezett antagonisták kölcsönhatás, az eugenol és mentol kombinációja ezen felül jelentős aktivitást mutatott. A geraniol és timol kombinációja MRSA ellen nem bizonyult aktívnak.

A citromlaj kevésbé aktív komponenseinek egymással és geraniollal való kombinációi esetén szintén nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, amelynek alapján feltételezzük, hogy a citromlaj és citrál komponens csak kisebb mértékben járul hozzá az eredményes hatás kifejtéséhez.

#### 4.5.2 A checkerboard módszer eredményei

A direkt bioautográfias vizsgálatokban kapott eredmények alátámasztása céljából *P. aeruginosa* esetén a komponensek közötti kölcsönhatás vizsgálatára checkerboard-titrálást végeztünk. Ezen felül az adott komponens nagy mennyiségben tartalmazó illóolajokat és kombinációikat is bevontuk vizsgálatunkba. A tesztek eredményeként meghatároztuk az egyes kombinációk FICI értékét.

A direkt-bioautográfias vizsgálatokkal egybevetve a checkerboard módszerrel is a mentol és timol komponensek (FICI: 0,38) között észleltünk szinergista kölcsönhatást. Ezen felül a mentol eugenollal (FICI: 0,38), valamint a borsmentaolaj kakukkfűolajjal (FICI: 0,25) készített keverékében szintén szinergista hatást detektáltunk. Érdekeség, hogy a borsmenta- és szegfűszeg olaj között kölcsönhatást nem tudtunk kimutatni (FICI: 1,50). A mentol *transz*-fahéjaldehiddel készített keverékében az alkotók között nem észleltünk kölcsönhatást, míg a borsmenta- és fahéjolaj esetén additív hatást (FICI: 0,63) regisztráltunk. Ennek megfelelően feltételezzük, hogy a kedvezőbb hatás kialakításában a kisebb százalékban jelen lévő illóolaj-komponensek jelentős szereppel rendelkeznek. Citromlaj- és kakukkfűolaj, valamint citromlaj és timol között sajnálatos módon nem tapasztaltunk a baktériumok szaporodására gyakorolt megfelelő aktivitást, amely lehetővé tenné FICI értékük meghatározását.

A direkt-bioautográfias tesztek és checkerboard-titrálások eredményit összegezve elmondható, hogy *P. aeruginosa* esetén a legaktívabbnak a mentol-timol, valamint a borsmenta-kakukkfű kombinációját találtuk, a komponensek között szinergista hatás volt kimutatható.

## 5. Összefoglalás

Kutatásunk eredményeit az alábbiakban foglaljuk össze:

1. Gázkromatográfias vizsgálatunkban meghatároztuk az eddig kevésbé kutatott *Artemisia adamsii* illóolajának összetételét.

2. Direkt bioautográfia módszerét alkalmazva elsőként igazoltuk az *A. adamsii* illóolajának MRSA-ellenes aktivitását. Elsőként mutattuk ki, hogy az antibakteriális hatás nem az illóolaj fő komponenseihez köthető, hanem annak kisebb százalékban jelen lévő terpén-alkohol összetevőjéhez.
3. Elsőként írtuk le a citronella illóolaj MRSA ellenes hatását direkt bioautográfias rendszerben.
4. Ugyancsak elsőként igazoltuk illóolajaink által képzett gőzterek antibakteriális hatékonyságát antibiotikum-rezisztens baktériumtörzsekkel (MRSA, *R-P. aeruginosa*) szemben. A vizsgált illóolajok közül a fahéjkéreg bizonyult a leghatékonyabbnak (MIC: 31,25-125 µl/l), azonban erős gátló hatással rendelkezett a kakukkfű, a szegfűszeg és a borsmenta, valamint a citronella illóolaja által kialakított gőztér is. *R-P. aeruginosa* esetén kizárólag a fahéjkéreg esetén volt észlelhető antibakteriális hatás.
5. Az általunk alkalmazott vapor phase tesztrendszerrel sikeresen optimalizáltuk különleges táptalajigényű légúti baktériumtörzsek esetén is, ezáltal elsőként detektáltuk a fahéjkéregolaj, a kakukkfű és a szegfűszeg gőzterének antibakteriális hatását *H. parainfluenzae*-vel szemben. A *Cymbopogon nardus* illóolaj antibakteriális hatásának gőztérben történő értékelését elsőként végeztük el légúti baktériumok ellen. Az általunk vizsgált illóolajok antibakteriális hatását *S. mutans* és *M. catarrhalis* ellen gőzteres tesztrendszerben elsőként írtuk le.
6. A borsmentaolaj által kialakított gőztér antibakteriális hatását első ízben írtuk le *H. parainfluenzae* ellen, amelyet összevetve a *H. influenzae*-vel szemben kifejtett gátlással az illóolaj jelentős különbséget mutatott. Várakozásainkkal ellentétben a légúti panaszok enyhítésére a borsmenta mellett leggyakrabban alkalmazott eukaliptusz és erdeifenyő illóolaja tesztrendszerünkben a Gram-pozitív baktériumok és *P. aeruginosa* ellen hatástalannak bizonyult. Kiemelendő hogy az erdeifenyő olajának gőztere egyedül *H. influenzae* ellen eredményezett gátlást, valamint az eukaliptusz olaja is csupán magasabb koncentrációban volt aktív a *Haemophilus* törzsek és a *M. catarrhalis* ellen.
7. Csőhígítós vizsgálataink során az illóolajat folyékony közegben vizsgálva elsőként írtuk le a citronella és erdeifenyő olajának antibakteriális hatását *H. influenzae* esetén. A fent említett olajok mellett a szegfűszeg, a kakukkfű és a borsmenta olajának aktivitását szintén elsőként vizsgáltuk *H. parainfluenzae*-vel szemben. Eredményeink tükrében mindenképpen kiemelendő, hogy a szegfűszeg illóolaja elsősorban a csőhígítás esetén rendelkezett nagyobb aktivitással MRSA és *S. pyogenes* ellen. A kakukkfű olaja ehhez hasonlóan *S. mutans* és *M. catarrhalis* tekintetében nagyobb hatékonyságot mutatott a vapor phase technika eredményeihez viszonyítva. Ennélfogva úgy véljük, hogy a szegfűszeg és kakukkfű olaja inkább folyékony állapotban és a kezelendő felülettel kialakított direkt kontaktusban alkalmazható eredményesebben. Ezzel szemben a gőzteres vizsgálatokban legnagyobb aktivitást mutató fahéjkéregolaj alkalmazása inhaláció útján ajánlott alacsony koncentrációban alkalmazva.
8. Az illóolajok és komponensei kölcsönhatásának vizsgálatára első ízben alkalmaztuk a direkt bioautográfia módszerét. Statisztikai analízissel együtt alkalmazva úgy véljük, a módszer a hatékony kombinációk gyors és költséghatékony tesztelésére megfelelőnek tekinthető. Hátránya, hogy a komponensek közötti additív hatások nehezen határozhatók meg vele.
9. Kölcsönhatást vizsgáló tesztek során elsőként vizsgáltuk a borsmentaolaj kakukkfű-, fahéj- és szegfűszegolajjal, valamint a kakukkfűolaj citronellaolajjal alkotott kombinációját *P. aeruginosa* esetén checkerboard-titrálással. A mentol fahéjaldehiddel, a citrál, citronellál és geraniol egymással illetve timollal alkotott keverékeinek aktivitását szintén első ízben értékeltük az említett baktériummal szemben. Rezisztens *P. aeruginosa* esetén a *transz*-fahéjaldehid timollal és eugenollal, valamint az eugenol timollal készített

kombinációjának hatékonyságát elsőként kíséreltük meg értékelni. A mentol-eugenol, illetve mentol-*transz*-fahéjaldehid keverék fokozott aktivitását MRSA esetén szintén nem mutatták ki ez idáig.

Kutatásunk eredményei igazolják, hogy az általunk vizsgált illóolajok és komponenseik kombinációinak egy része jelentős antibakteriális hatással rendelkezik multirezisztens törzsek esetén is. Ezért az antibakteriális terápia hatékony kiegészítői lehetnek az orvosi/gyógyszerészi gyakorlatban. Azonban további citotoxicitási vizsgálatok elvégzése szükséges az illóolajok biztonságos alkalmazásának igazolásához, valamint *in vitro* és *in vivo* kifejtett hatásmechanizmusuk részletes megismerése szempontjából. Eredményeink kiindulási alapul szolgálhatnak új, illóolaj-tartalmú, légúti kórképek kezelésére szánt gyógyszerek fejlesztéséhez is.

Az illóolajok antibakteriális hatásvizsgálatával foglalkozó közlemények és saját megfigyeléseink alapján megfontolandó lenne ezen felül, hogy a Szabványos Vénymintákban található illóolajokat tartalmazó készítmények receptúrái módosításra kerüljenek.

A jövőben az aktív komponensek kombinációinak ígéretes eredményeit mindenképpen érdemes más légúti patogének bevonásával is bővíteni, illetve az eredményeket *in vivo* vizsgálatok tervezéséhez felhasználni. Ezen felül szükséges lenne a rezisztens törzsekre fókuszálva a klasszikus antimikrobás szerek és illó komponensek kombinációs terápiájának vizsgálatára is nagyobb hangsúlyt fektetni.

## 6. Hivatkozások jegyzéke

Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223-253.

Doran A.L., Morden W.E., Dunn K., Edwards-Jones V. (2009). Vapor-phase activities of essential oils against antibiotic sensitive and resistant bacteria including MRSA. *Letters in Applied Microbiology*. 48. 387-392.

Inouye S., Nishiyama Y., Yamaguchi H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 47: 565-573.

Kloucek P., Smid J., Frankova A., Kokoska L., Valterova I., Pavela R. (2012). Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. *Food Research International*. 47: 161-165.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondok köszönetet témavezetőmnek Dr. Horváth Györgyi egyetemi docensnek, aki munkám szakmai támogatását töretlen lelkesedéssel és odaadással végezte. Külön köszönöm Dr. Kocsis Bélának és Dr. Kocsis Bélánénak, hogy a PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetében a mikrobiológiai vizsgálatok kidolgozásában, optimalizálásában és megvalósításában elengedhetetlen segítséget és iránymutatást nyújtottak számomra. Hálásan köszönöm Dr. Böszörményi Andreának a gázkromatográfiás analízisek kivitelezésében és értékelésében nyújtott segítségét, amellyel disszertációm szakmai szempontból történő gazdagítását tette lehetővé. Kiemelt köszönet illeti Dr. Kerekes Erikát az SZTE TTIK Mikrobiológiai Intézetéből a checkerboard vizsgálatok betanításakor tanúsított végtelen



türelméért, valamint azok kivitelezésében nyújtott hatalmas segítségéért. Ezúton köszönöm Farkas Richárdnak a PTE Közgazdaságtan és Ökonometria Intézetéből a statisztikai analízisek kivitelezését és értékelését. Köszönettel tartozom ezen felül, Dr. Tserennamid Rentsenkhandnak az *A. adamsii* Besser azonosításáért, valamint begyűjtéséért, továbbá a lehetőségért, hogy módomban állt megvizsgálni ezt az eddig kevésbé kutatott gyógynövényt. Ezúton fejezem ki hálám barátomnak és kollégámnak Balázs Viktória Lillának, aki a kölcsönhatás vizsgálatok értékelése során nélkülözhetetlen segítségemre volt. Köszönettel tartozom továbbá Prof. Dr. Deli Józsefnek a PTE GYTK Farmakognóziai Intézet vezetőjének, hogy lehetővé tette munkám sikeres kimenetelét az intézetben, valamint minden kollégámnak, aki hozzájárult vizsgálataim megvalósulásához. Külön köszönet illeti Dr. Bencsik Tímeát, aki amelelt, hogy segítségemre volt a mikrobiológiai módszerek megismerésének és elsajátításának egy részében, hasznos észrevételeivel a dolgozat alapjául szolgáló műveket is mindig jó szándékú javaslatokkal és építő kritikákkal látta el. Ezen felül szeretném megköszönni kedves barátaim és szerető családom kiemelkedő támogatását és mérhetetlen türelmét, az ő inspirációjuk és bátorításuk nélkül dolgozatom nem jöhetett volna létre.

A PhD dolgozatban bemutatott kutatási tevékenység anyagi támogatásáért köszönet illeti az Astellas Pharma Kft.- Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Ifjú Kutató Programját.

## 8. Publikációs jegyzék

### 8.1 Az értekezés alapját képező publikációk

Horváth Gy., **Ács K.**, Kocsis B. (2013). TLC-Direct bioautography for determination of antibacterial activity of *Artemisia adamsii* essential oil. *Journal of AOAC International* 96 (6): 1209-1213. IF: 1,385

**Ács K.**, Bencsik T., Böszörményi A., Kocsis B., Horváth Gy. (2016). Essential oils and their vapors as potential antibacterial agents against respiratory tract pathogens. *Natural Product Communications*. 11(11):1709-1712. IF: 0,773

**Ács K.**, Balázs V.L., Kocsis B., Bencsik T., Böszörményi A., Horváth Gy. (2018). Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens.  
*Közlésre benyújtva*

### 8.2 Egyéb publikációk

Horváth Gy., **Ács K.** (2015). Essential oils in the treatment of respiratory tract diseases highlighting their role in infections: a review. *Flavour and Fragrance Journal*. 30: 331-341. IF: 1,693

**Ács K.**, Bencsik T., Horváth Gy. (2016). Illóolajok szerepe a légúti megbetegedések alternatív terápiájában. *Gyógyszerészet*. 60: 280-288.

**Ács K.**, Kocsis B., Balázs V.L., Kerekes E., Csikós E., Varga A., Krisch J., Vágvölgyi Cs., Horváth Gy. (2018). Illóolajok, illóolaj-komponensek és antibiotikumok együttes alkalmazásának lehetőségei légúti infekciók esetén. *Gyógyszerészet*. 62: 73-79.

Ács K. (2017). A kamilla és illóolajának gyógyászati alkalmazása. Aromatika magazin. 4(1): 6-9.

Ács K. (2017). A borsosmenta illóolajának gyógyászati alkalmazása. Aromatika magazin. 4(4): 26-29.

Horváth Gy., Farkas Á., Papp N., Bencsik T., Ács K., Gyergyák K., Kocsis B. (2016): Chapter 3 - Natural Substances from Higher Plants as Potential Anti-MRSA Agents. In: Attar-Rahman (szerk.). Studies in Natural Products Chemistry. Amszterdam. Elsevier. 47: 63-110.

Horváth Gy., Bencsik T., Ács K., Kocsis B. (2016). Chapter 12 - Sensitivity of ESBL-producing Gram-negative bacteria to essential oils, plant extracts, and their isolated compounds In: Kon K., Rai M. (szerk.). Antibiotic Resistance. Mechanisms and New Antimicrobial Approaches. San Diego: Academic Press. 239-269.

### 8.3 Konferencia absztraktok

#### 8.3.1 Konferencia előadások absztraktjai

Ács K., Böszörményi A., Lemberkovics É., Vágvölgyi Cs., Galgóczy L., Tserennadmid R., Krisch J., Kocsis B., Horváth Gy. (2013). Phytochemical characterisation and microbiological evaluation of a mongolian medicinal plant (*Artemisia adamsii* Besser). 10<sup>th</sup> János Szentágothai Transdisciplinary Conference and Student Competition. Pécs.

Ács K., Böszörményi A., Lemberkovics É., Kocsis B., Vágvölgyi Cs., Galgóczy L., Krisch J., Tserennadmid R., Horváth Gy. (2014). Egy mongol gyógynövény (*Artemisia adamsii* Besser) fitokémiai és mikrobiológiai jellemzése. Fiatal Gyógynövénykutatók Fóruma. Budakalász.

Ács K., Bencsik T., Böszörményi A., Kocsis B., Horváth Gy. (2014). Illóolajok antimikrobás hatásának vizsgálata multidrog-rezisztens baktériumtörzseken. Cholnoky László Szakkollégium Nyitónap. Pécs.

Ács K., Bencsik T., Böszörményi A., Kocsis B., Horváth Gy. (2014). Illóolajok antimikrobás hatásának vizsgálata multidrog-rezisztens baktériumtörzseken. A Magyar Biológiai Társaság Botanikai Szakosztálya és a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Gyógynövény Szakosztályának közös előadóülése. Budapest. Botanikai Közlemények. 101(1-2): 291-292.

Ács K., Kocsis B., Böszörményi A., Horváth Gy. (2015). Antibacterial evaluation of some essential oils with vapour-phase technique. 4<sup>th</sup> Interdisciplinary Doctoral Conference. Pécs.

Ács K., Balázs L.V., Kocsis B., Böszörményi A., Schneider Gy., Móricz Á., Ott P.G., Horváth Gy.: TLC-bioautography: an appropriate test for detection of antibacterial activity of essential oils. 40<sup>th</sup> Symposium Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds. Katowice-Szczyrk.

Ács K., Balázs L.V., Böszörményi A., Kocsis B., Horváth Gy. (2017). A fahéj- és a szegfűszeg illóolaj antimikrobás hatásának vizsgálata rezisztens baktériumtörzseken. DKK17-Doktoranduszok a Klinikai Kutatásokban Konferencia. Pécs.

#### 8.3.2 Poszter prezentációk absztraktjai

**Ács K.**, Molnár P., Böszörményi A., Lemberkovics É., Vágvolgyi Cs., Galgóczy L., Krisch J., Tserennadmid R., Horváth Gy.: Adatok egy mongol gyógynövény (*Artemisia adamsii* Besser) fitokémiai jellemzéséhez. XII. Magyar Gyógynövény Konferencia. Szeged. Gyógyszerészet Supplementum 55: S23.

**Ács K.**, Molnár P., Böszörményi A., Lemberkovics É., Vágvolgyi Cs., Galgóczy L., Tserennadmid R., Krisch J., Horváth Gy. (2013). Phytochemical characterisation of a mongolian medicinal plant (*Artemisia adamsii* Besser). 2<sup>nd</sup> International Doctoral Workshop on Natural Sciences. Pécs.

**Ács K.**, Böszörményi A., Lemberkovics É., Kocsis B., Vágvolgyi Cs., Galgóczy L., Krisch J., Tserennadmid R., Horváth Gy. (2014). Egy mongol gyógynövény (*Artemisia adamsii* Besser) illóolajának fitokémiai és mikrobiológiai értékelése. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV. Budapest. Gyógyszerészet Supplementum. 4: S80.

Horváth Gy., Jesionek W., **Ács K.**, Böszörményi A., Lemberkovics É., Kocsis B. (2014). TLC-Bioautography as an appropriate tool for detection of antibacterial activity of essential oils. 9<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products. Lublin.

**Ács K.**, Bencsik T., Kocsis B., Horváth Gy. (2014). *In vitro* antibacterial activity of essential oils against multidrug-resistant strains. 45<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils. Isztambul. Natural Volatiles & Essential Oils. Special Issue. 1: 162.

Horváth Gy., Jesionek W., **Ács K.**, Böszörményi A., Lemberkovics É., Kocsis B. (2014). TLC-bioautográfia: a rétegekromatográfia szerepe illóolajok antibakteriális hatásának vizsgálatában. Elválasztástudományi Vándorgyűlés. Egerszalók.

**Ács K.**, Kulcsár K., Kocsis B., Böszörményi A., Horváth Gy. (2015). Vapour-phase method: a possible solution for *in vitro* antimicrobial evaluation of volatile substances. 46<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils. Lublin. Natural Volatiles & Essential Oils. Special Issue. 2(3): 54.

Horváth Gy., **Ács K.**, Jesionek W., Choma I., Böszörményi A., Kocsis B. (2015). Role of thin layer chromatography in detection of antibacterial activity of essential oils. International Congress and Annual Meeting of Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. Budapest. Planta Medica: Natural Products and Medicinal Plant Research. 81: 1549.

**Ács K.**, Kocsis B., Böszörményi A., Horváth Gy. (2016). Essential oil vapors as potential agents against *Haemophilus* species. 47<sup>th</sup> International Symposium On Essential Oils, Nice, p.45.

Reza Ashraf A., Csikós E., **Ács K.** Böszörményi A., Kereskai L., Kocsis B., Kemény Á., Csekő K., Helyes Zs., Horváth Gy. (2016). Thyme essential oil inhalation decreases endotoxin-induced acute airway inflammation and hyperreactivity in a mouse model. 47<sup>th</sup> International Symposium On Essential Oils, Nice, p.48.

Csikós E., Reza Ashraf A., **Ács K.** Böszörményi A., Kereskai L., Kocsis B., Kemény Á., Csekő K., Helyes Zs., Horváth Gy. (2016). Effect of cinnamon and citronella essential oil in endotoxin-evoked acute airway inflammation mouse model. 47<sup>th</sup> International Symposium On Essential Oils, Nice, p.63.

Balázs V.L., **Ács K.**, Kocsis B., Böszörményi A., Horváth Gy. (2017). Antibacterial evaluation of clove, peppermint and thyme essential oil against *Haemophilus* species. 48<sup>th</sup> International Symposium On Essential Oils. Natural Volatiles & Essential Oils Special Issue. 4(3): 141, P-68.

Balázs V.L., **Ács K.**, Kocsis B., Böszörményi A., Horváth Gy. (2017). Antibacterial effect of cinnamon bark, clove, thyme and peppermint oil against respiratory tract pathogens. 7<sup>th</sup> BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences. Balatonfüred. *Acta Pharmaceutica Hungarica*. 87(3-4): p. 173.