

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Jánosity Anna

Budapest

2022



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

**A karvakrol efflux mechanizmushoz köthető rezisztenciamódosító
hatásának elemzése prediktív mikrobiológiai módszerekkel *Escherichia
coli* törzsek esetében**

Jánosity Anna

Budapest

2022

Doktori Iskola

Megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

Tudományága: Élelmiszertudomány

Vezetője: **Simonné Dr. Sarkadi Livia, DSc**

MATE, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Táplálkozástudományi Tanszék

Témavezetők:

Kiskó Gabriella, PhD

MATE, Élelmiszertudományi és -Technológiai Intézet, Élelmiszer-mikrobiológia, higiénia és -biztonság Tanszék

Baranyi József, PhD

Debreceni Egyetem, Táplálkozástudományi Intézet

A jelölt a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....

A doktori iskola vezetője

.....

Témavezető

.....

Témavezető

TARTALOMJEGYZÉK

1 BEVEZETÉS	1
2 CÉLKITŰZÉSEK	3
3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	4
3.1 Felhasznált mikroorganizmusok.....	4
3.2 Felhasznált anyagok	4
3.3 Mérési módszerek.....	5
3.4 Adatok elemzése.....	6
4 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	10
4.1 Az antimikrobás szerek MIC értéke	10
4.2 Egyéni sejtek lappangási idejének eloszlása optimális szaporodási feltételek mellett... 10	
4.3 A karvakrol koncentrációfüggő hatása az <i>E. coli</i> törzsek lappangási idejére.....	11
4.4 Fluoreszcens vizsgálatok: karvakrol hatása az <i>E. coli</i> efflux mechanizmusára és membrán integritására	11
4.5 Antibiotikum-érzékenységi tesztek a karvakrol és öt különböző antibiotikum kombinációjával.....	13
5 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	15
6 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	17
7 FONTOSABB REFERENCIÁK.....	21
8 PUBLIKÁCIÓK.....	25

1 BEVEZETÉS

A prediktív mikrobiológia célja a mikrobák környezeti tényezőkre adott válaszreakcióinak leírása matematikai modellek segítségével. Továbbá ezen ismeretek felhasználásával a célkitűzés az élelmiszerek mikrobiológiai biztonságának és minőségének biztosítása (McMeekin és mtsai. 1993). Azonban az utóbbi időben a prediktív modellezési módszerek alkalmasnak bizonyultak antibakteriális kezelések leírására és optimalizálására is (Jánosity és mtsai. 2021). A multidrog-rezisztens (MDR) mikroorganizmusok terjedése az elmúlt évtizedben számos nehézséget okozott, beleértve az élelmiszeriparon keresztül terjedő kórokozó baktériumokat is. Emellett kihívást jelent az új antimikrobás szerek fejlesztése az egyre több szerrel szemben kialakuló patogén baktériumok multidrog rezisztenciája miatt. Napjainkra az antibiotikum-rezisztencia globális fenyegetéssé vált, amely veszélyezteti az élelmiszerbiztonságot és a közegészséget egyaránt. Az antibiotikumok helytelen és túlzott használata a rezisztencia rohamos fejlődését eredményezte. Ennek következményeként, a MDR kórokozók által okozott halálos esetek száma 2050-re elérheti akár az évi 10 milliós nagyságrendet (Sharma és mtsai. 2019; Sun és mtsai. 2019).

A baktériumok számos mechanizmus által képesek antibiotikum-rezisztenciát kialakítani, de az egyik legfontosabb az aktív efflux pumpa mechanizmus. Az efflux pumpák minden baktériumban megtalálhatók, felelősek a toxikus anyagok sejtekből való eltávolításáért, így beleértve az antibiotikumok kiszorítását is (Teelucksingh és mtsai. 2020). Ebből kifolyólag a bakteriális efflux pumpák fontos szerepet játszanak az antibiotikum-rezisztenciában, továbbá a baktériumok patogenitásában és a biofilm képzésében. Az efflux pumpák aktivitásának mérésére számos módszer létezik (Blair és Piddock 2016; Spengler és mtsai. 2017), mint például érzékenységi vizsgálatok, direkt és indirekt fluoreszcencia mérések, valamint a közelmúltban alkalmazott áramlási citometria vagy tömegspektrometriai módszerek.

Az efflux pumpa inihitorok (EPI) alkalmazása ígéretes lehetőséget nyújt az antibiotikumok hatékonyságának helyreállításában, illetve fokozásában. Az efflux mechanizmust gátolni képes, kis méretű molekulák fejlesztése egy aktív és gyorsan növekvő kutatási terület. Az EPI-k származhatnak szintetikus vagy természetes forrásból. Azonban a szintetikus efflux inihitorok fő hátránya toxikus tulajdonságuk, ami megakadályozza klinikai alkalmazásukat. Az illóolajokat és komponenseiket ősidők óta használják antibakteriális, gombaellenes, vírusellenes, rákellenes tulajdonságaik miatt. Továbbá ezen természetes antimikrobás szerek kimagasló eredményeket mutattak a MDR baktériumok ellen. Az illóolajok és komponenseik

fő célpontja a bakteriális membránpermeabilitás megváltoztatása ezáltal a membránintegritás csökkentése (Chouhan és mtsai. 2017; Elshafie és Camele 2017). Következésképpen az illóolajok alkalmasak lehetnek új, alternatív efflux pumpa inhibitor molekulák kifejlesztésére.

A karvakrol egy fenolos monoterpén, amelyet számos aromás növény termel, mint például a kakukkfű vagy oregánó. A karvakrolt élelmiszer-adalékanyagként pékárukban, fagyasztott tejtermékekben, rágógumikban, édességekben, szósókban és italokban már alkalmazták. Számos korábbi publikáció számolt be a karvakrol antimikrobás- és potenciális efflux-gátló hatásáról (Khan és mtsai. 2017; Magi és mtsai. 2015; Sharifi-Rad és mtsai. 2018). Ezen tény alapján a karvakrol efflux inhibitorként való alkalmazása, koncentrációjának optimalizálása és különböző antibiotikumokkal való kombinációja ígéretes módszer lehet az antibiotikumok aktivitásának helyreállítása és fokozása során.

2 CÉLKITŰZÉSEK

Doktori disszertációm célja átfogó képet nyújtani a karvakrol (i) efflux pumpa inhibitoroként való használatáról és rezisztencia-gyengítő hatásáról, (ii) optimális inhibitor koncentrációjáról a baktériumok fiziológiai állapota szerint, valamint (iii) antibiotikumokkal kombinált hatásáról. Ezen célok eléréséhez prediktív modellezési módszereket alkalmaztam, és a következő feladatokat tűztem ki:

- Olyan kísérletek kidolgozása, amelyek a Buss da Silva és mtsai. (2019) által bemutatott elméleti módszer gyakorlati megvalósítását nyújtják. Ezáltal egy megbízható és pontos mérési módszer kifejlesztése az egysejtes koncentráció eléréséhez és ezek szaporodás kinetikájának méréséhez.
- Az Enterobacteriaceae család tagjait alkalmazva bebizonyítani, hogy az *E. coli* törzsek miért alkalmasak modell mikroorganizmusként akár egysejtszintű mérések során is.
- A karvakrol rezisztencia visszaszorító aktivitásának meghatározása a következők szerint:
 - ❖ A karvakrol koncentrációfüggő lappangási idő meghosszabbító hatásának leírása *E. coli* törzsek esetében, és annak megállapítása, hogy mely koncentráció felett hosszabbítja meg jelentősen a baktériumok lappangási idejét.
 - ❖ Tanulmányozni a karvakrol efflux gátló hatását etídiium-bromid (EtBr) akkumulációs vizsgálatokon keresztül, meghatározni a karvakrol optimális koncentrációját, amely a legmagasabb fluoreszcens festék felhalmozódást indukálja, ami közvetve az efflux-gátlásra utal.
 - ❖ Mindeközben meghatározni a karvakrol koncentrációfüggő membrándegradációs hatását.
 - ❖ A prediktív modelleket felhasználva megbízható elemzési módszert nyújtani mindkét típusú fluoreszcens vizsgálatához.
 - ❖ Annak vizsgálata, hogy az *E. coli* efflux mechanizmusa függ-e a mikroba fiziológiai állapotától.
 - ❖ Annak vizsgálata, hogy a karvakrol optimális inhibitor koncentrációja eltér-e a különböző fiziológia állapotú *E. coli* tenyészeteknél.
 - ❖ Meghatározni a karvakrol hatékonyságát (optimális efflux inhibitor koncentrációs tartományból) különböző antibiotikumokkal kombinálva (szubinhibitor koncentrációban alkalmazva), hogy milyen mértékben képes fokozni a kombinált kezelés az antibiotikumok aktivitását.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Felhasznált mikroorganizmusok

A bakteriális efflux mechanizmus és a membrán integritás változásainak tanulmányozása során kettő *Escherichia coli* törzset vizsgáltam: a ŽM 370 (ATCC 11229), egy klinikai, patogén izolátumot a Ljubljanoi Egyetem törzsgyűjteményéből és az *E. coli* ŽM 513 (VF 3584), a Ljubljanoi Egyetem Állatorvosi Karáról származó tatárbifsztekből származó élelmiszer eredetű izolátumot. A fent említett *E. coli* törzsek mellett az *E. coli* ATCC 25922 (QC) törzs került a vizsgálandó izolátumok közé az antimikrobás érzékenységi vizsgálatoknál és a karvakrol lappangási fázis elnyújtó hatásának vizsgálatánál. A vizsgált referencia törzs a Budapesti Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Országos Gyűjteményéből származott. Az egyéni sejtek vizsgálata során alkalmazott mikrobák: *E. coli* VF 3584, *E. coli* ATCC 25922, továbbá *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028, ATCC 13311 törzsek (Budapesti Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Országos Gyűjteménye), valamint *Shigella sonnei* HNCMB 20044 klinikai izolátum (Országos Epidemiológiai Központ, Budapest 20044/99702) voltak.

3.2 Felhasznált anyagok

A karvakrol (5-izopropil-2-metil-fenol, Merck KGaA Darmstadt, Németország) természetes vegyület hatását vizsgáltam (1) EtBr felhalmozódásra, (2) bakteriális membrán integritásra, (3) és a lappangási idő tartományára. Ezenkívül a karvakrol (4) koncentrációfüggő aktivitását a kombinált kezelések során öt antibiotikummal vizsgáltam, melyek a (i) gentamicin-szulfát és (ii) cefotaxim-nátriumsó (Sigma-Aldrich, Chemie, Steinheim, Németország); (iii) vankomicin-hidroklorid (a MedChem Express, Monmouth Junction, New Jersey, USA), (iv) eritromicin és (v) ciprofloxacín-hidroklorid (a Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) voltak.

A gentamicin-szulfát, a cefotaxim-nátriumsó, a vankomicin-hidroklorid és a ciprofloxacín-hidroklorid törzsoldatai steril vízben, az eritromicin törzsoldat DMSO-ban (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Németország) lett elkészítve. A karvakrol abszolút etanolban (EtOH) lett hígítva. Az alkalmazott efflux szubsztrát EtBr (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Németország) volt. A tesztek során alkalmazott szintetikus inhibitorok: az NMP (törzsoldata EtOH-ban készült) és a PaβN (törzsoldata steril vízben készült) (CHESS GmbH, Mannheim, Németország) voltak. A membránpermeabilitás változásai a LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (L-7012; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) felhasználásával vizsgáltam.

A fluoreszcens próbák előkészítésénél a tenyészetek újraoldásához foszfáttal pufferolt sóoldatot (PBS) használtam (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Egyesült Királyság).

3.3 Mérési módszerek

A karvakrol és az antibiotikumok minimális gátló koncentrációjának (MIC) meghatározásához mikrohígítási módszert alkalmaztam (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2021). A MIC végpontok leolvasása 24 órás 37 °C-os inkubáció után történt (Cuenca-Estrella és mtsai. 2002), és a MIC értékeket mg/ml-ben voltak kifejezve.

Az egyéni sejtek lappangási idejének vizsgálata indirekt módszer alkalmazásával történt. Az egyéni sejtek által generált szubpopulációk detektálási idejének mérésével az az idő került meghatározásra, amely ahhoz szükséges, hogy a szaporodó baktériumok elérjék az adott detektálási szintet ($5 \cdot 10^7$ - 10^8 sejt/ml). A mérések célja (i) Buss da Silva és mtsai. (2019) tanulmányának gyakorlati megvalósítása, (ii) meghatározni, hogy a detektációs idő hogyan függ a kezdeti sejtszámtól, illetve (iii) a mikroba törzsektől. A turbidimetriás mérések előtt a stationer fázisú sejtuszuszenziók Mueller-Hinton táplevesben lettek hígítva. A kísérletek során a célkitűzés az volt, hogy a kezdeti koncentráció kb. 1-3 sejt/cella legyen a mikrotiter lemezekon, azaz 1-3 sejt/200 μ l. A kísérletek során sikerült kidolgozni egy hígítási módszert, amellyel a kívánt sejtszám elérhető. A baktériumszuszenzió kezdeti koncentrációja $OD_{600}=0,1$ lett beállítva (Analytik Jena Specord 200 Plus Spectrophotometer).

Az EtBr felhalmozódás és a membrán integritás mérése során az adatok VarioskanLUX multimode mikrotiterlemez olvasó (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) segítségével lettek detektálva, követve Kovač és mtsai. (2015) leírását néhány apróbb módosítással. Az inokulumok tripton-szója levesben (TSB - Tryptic Soy Broth) $OD_{600}=0,1$ -es értékre lettek beállítva. Három fiziológiai állapotot különböztethetünk meg: a gyorsan-, lassan- és nem szaporodó fázist.. Ezek eléréséhez a tenyészetek 37 °C-on 0,5; 4; illetve 12-16 órán át lettek inkubálva, mely időintervallumok az OD szaporodási görbék alapján kerültek meghatározásra. Az inkubálást követően a különböző fiziológiai állapotokból származó sejttenyészetek $OD_{600} = 0,2$ értékre lettek beállítva PSB-ben, ami kb. 10^9 CFU/ml koncentrációnak felel meg, biztosítva az azonos koncentrációt. A hígítás után a karvakrolos kezelés következett 17 teszt koncentráció alkalmazásával. A kezelések a karvakrol MIC-értékének arányában lettek meghatározva. A kiválasztott 17 teszt koncentráció a karvakrol 0,1 és 0,5 MIC közötti szub-inhibitor tartományból lett választva, amelyek 30 mg/l és 150 mg/l karvakrolnak felelnek meg. A kezelés 7,5 mg/l lépésközökkel növekedett.

Hasonlóképpen került tesztelésre két szintetikus efflux inhibitor, az NMP 100, 200 és 300 mg/l koncentrációkban, illetve a Pa β N gátló hatása 22 mg/l koncentrációban (Kurinić és mtsai. 2012). Utolsó lépésben a fluoreszcens festékek (EtBr vagy LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability kit) lettek hozzáadva a kezelt és a nem kezelt tenyészetekhez. A mérésekből három függő és két független ismétlés készült fekete mikrotiter lemezeken. Referencia mérésenként, az intracelluláris EtBr felhalmozódás, kezelések hiányában is meg lett vizsgálva. A mérések során a relatív fluoreszcencia (RFU-relative fluorescent unit, λ_{ex} =500 nm és λ_{em} =608 nm mellett) értékek az idő függvényében lettek detektálva. A LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability kit segítségével a karvakrol membrán integritásra gyakorolt hatását lehetett vizsgálni. Az RFU értékek 1 óra alatt 60 másodperces intervallumokban lettek rögzítve, λ_{ex} =481 nm és λ_{em} =510 nm hullámhosszúságok mellett. Negatív kontrollként a hőkezelt tenyészetek membránintegritása került meghatározásra (80 °C-on 15 perces kezelést követve).

A karvakrol detektálási időre gyakorolt hatását turbidimetriás mérésekkel vizsgáltam. Az alkalmazott szubinhibitor koncentrációk 45-120 mg/L (0,15-0,4 MIC) között változtak, 7,5 mg/L-es lépésközökkel. A turbidimetriás mérések 620 nm-en (Microplate Reader, Sunrise, Tecan, Svájc), Mueller-Hinton levesben lettek vizsgálva 37 °C-on 18 órán keresztül. A lemezek leolvasására 30 percenként, 30 másodperces rázatási idő elteltével került sor. A mérések során T_{det} értékek George és munkatársainak tanulmánya (2015) szerint történtek, ahol az inokulum kezdeti koncentrációja $5 \cdot 10^5$ CFU/ml volt.

Az antimikrobás érzékenységi tesztek során a kombinált kezelések hatékonyságának leírása volt a cél. Az antibiotikumok és a karvakrol együttes aktivitásának meghatározása mikrohígításos módszer alkalmazásával történt, egy robotpipettor epMotion 5075 Automated Pipetting System (Eppendorf AG, Hamburg, Németország) használatával. Az előkészítést követően a mikrotiter lemezek 37 °C-on 24 órán át voltak inkubálva majd a lemezek 620 nm-en kétszer lettek leolvasva, mindkét esetben 30 másodperces rázatást követve, mikrotiter lemez olvasóval (Sunrise, Tecan, Svájc). A műanyag, lapos aljú, 96 lyukú mikrotiter lemezek egy speciálisan ezekre a mérésekre kifejlesztett elrendezéssel lettek összemérve. Minden kísérleti beállításból (5 antibiotikum 3 *E. coli* törzzsel szemben) kettő függő és három független mérés készült, összesen 45 lemez eredményét kiértékelve.

3.4 Adatok elemzése

Az elsődleges modellekben az EtBr felhalmozódás- és membránintegritás-változását az F_S (fluoreszcens jel) értékek időbeli változása írta le minden egyes karvakrol koncentrációnál. Az

elsődleges modelleiben (A) az EtBr-felhalmozódásos adatokra telítődési modellek lettek illisztve illetve (B) illetve disszipációs modellek a membrán integritás változásának leírására:

$$Fs(t) = Fs_0 + (Fs_{max} - Fs_0) \cdot (1 - e^{-r \cdot t}) + \varepsilon \quad (\text{A})$$

$$Fs(t) = Fs_0 - (Fs_0 - Fs_{min}) \cdot (1 - e^{-r \cdot t}) + \varepsilon \quad (\text{B})$$

Az $Fs(t)$ az Fs egy t időpontban való értéke, amely a t_0 kezdeti időponttól eltelt időt jelenti; Fs_0 a kezdeti időpontban mért fluoreszcens jel; az Fs_{max} az elméleti (aszimptotikus) maximuma a jelnek; Fs_{min} pedig az elméleti minimuma; és r az az exponenciális ráta (sebesség), amellyel az $Fs(t)$ függvény az Fs_{max} vagy Fs_{min} értékhez konvergál, a fluoreszcens vizsgálat típusától függően. Végül ε a véletlenszerű mérési hiba.

A másodlagos modellekben a legmagasabb (Fs_{max}) és a legalacsonyabb (Fs_0) illesztett Fs értékek aránya lett kiválasztva a karvakrol EPI hatékonyságának kvantifikálására. Ennek a paraméternek a természetes alapú logaritmusa lett ábrázolva a másodlagos modellekben a karvakrol koncentráció, x , függvényében minden törzsnél és növekedési fázisnál modellezve egy aszimmetrikus, konvex, bi-lineáris függvényvel:

$$y_{EP}(x) = \ln \frac{Fs_1}{Fs_0} = B_s(x) = y_{opt} \cdot \begin{cases} \frac{(x-x_{min})}{(x_{opt}-x_{min})} & (x_{min} \leq x \leq x_{opt}) \\ \frac{(x_{max}-x)}{(x_{max}-x_{opt})} & (x_{opt} \leq x \leq x_{max}) \end{cases} .$$

Az x_{min} , x_{opt} , x_{max} paraméterek a bi-lineáris függvényt meghatározó minimum, optimum és maximum kezelési koncentrációk. Az első tartományban az $\frac{Fs_1}{Fs_0}$ arány nagyobb volt, mint 1 (azaz az Fs értékek nőttek a mérés során). A hányados értéke y_{opt} , ami az optimális karvakrol koncentráció mellett volt detektálható. Továbbá az s a B_s jelölés indexében azt jelzi, hogy a bi-lineáris függvény várhatóan függ a baktériumok fiziológiai állapotától. F-teszt segítségével lett vizsgálva, hogy (i) a független mérések által generált modellek összevonhatóak-e, illetve, (ii) hogy a két független ismétlés modelljeiben kapott optimális inhibitor koncentrációk megegyeznek-e.

$$F = \frac{RSS_1 - RSS_2}{n(p_2) - n(p_1)} \bigg/ \frac{RSS_2}{N - np_2}$$

A karvakrol koncentrációfüggő hatását az *E. coli* törzsek lappangási idejére $5 \cdot 10^5$ CFU/mL kezdő inokulum-koncentráció mellett vizsgáltam. Az elemzések során, az elsődleges modellben a mért OD értékek az idő (h) függvényében lettek ábrázolva, ahol detektációs idő (T_{det}) értékek lineáris interpolációval lettek meghatározva, rögzített detektációs szinten (OD=0,15). A másodlagos modellekben a T_{det} értékeket a karvakrol kezelések függvényében ábrázolva, a változók közötti kapcsolat leírására egy hatvány függvény bizonyult alkalmasnak:

$$T_{det} = \beta_0 * (121 - x)^{\beta_1} + \varepsilon \quad ,$$

ahol x az alkalmazott karvakrol kezelést jelöli, ε a modell hibatagja, β_0 és β_1 a modell paraméterei. Négy független ismétlés lett generálva mind a három *E. coli* törzssel, azonos mérési beállításokkal. Az értékelés során F-teszt (Motulsky és Christopoulos 2004) döntötte el, hogy a négy független ismétlés adatkészlete összevonható-e.

$$\text{Ratio of relative differences of SS values} = \frac{(ABS(SS_{merged} - SS_{sep}))}{SS_{sep}}$$

$$df_{relative\ differences} = \frac{df_{merged} - df_{sep}}{df_{sep}}$$

$$F = \frac{\text{Ratio of the relative differences of SS values}}{df_{relative\ differences}}$$

A nemlineáris regressziós modellek diagnosztikáját az R statisztikai programban végeztem (package: moments - <https://CRAN.R-project.org/package=moments>).

A lappangási idő elnyújtása (LE – lag time extension), mintegy a stressztényezőkre adott válasz, túlélési előnyöket képes biztosítani a baktériumok számára. A lappangási idő elnyújtását karvakrol kezelésék függvényében Li és mtsai. (2016) módszere szerint elemeztem:

$$LE = \frac{\lambda_C}{\lambda_0} \quad ,$$

ahol λ_C a mikroorganizmus lappangási ideje egy adott karvakrol koncentráció (C) mellett, λ_0 pedig a kezeletlen tenyészet lappangási ideje, pozitív kontrollként mérve.

A kombinált kezelések hatékonyságát vizsgálva az OD-értékek végpontját kétszer rögzítettem mikrotiter lemez olvasó segítségével. Az OD értékek a két függő mérés átlagát véve, a kontrollok alapján lettek normalizálva. Ilyen módon a baktériumok szaporodása százalékosan (%) kifejezhető:

$$Bacterial\ growth\ (\%OD) = \frac{OD_x - OD_{min}}{OD_{max} - OD_{min}} \cdot 100$$

A többváltozós statisztikai elemzés során IBM SPSS Statistics 27-es verzióját használtam. A MANOVA a kombinált kezelések közötti különbségeket vizsgálta. A függő változók a bakteriális OD növekedési (%OD) értékek voltak, a faktorváltozók pedig a kezelés kombinációk vancomycin, gentamicin, eritromicin, cefotaxim és ciprofloxacin antibiotikumok MIC-aránya (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625) együtt alkalmazva a karvakrol kezelésekkel (0, 75, 90, 105 mg /L).

4 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 Az antimikrobás szerek MIC értéke

A karvakrol MIC értékét mikrohígítós módszerrel határoztam meg. A karvakrol MIC értéke 300 mg/l *E. coli* ATCC 11229 és *E. coli* VF 3584 törzsek esetében, a referencia törzsnél pedig alacsonyabb, 270 mg/l MIC értéket lehetett kimutatni. A mért értékek megegyeznek az irodalmi adatokkal (Dos Santos Barbosa és mtsai. 2021). Az antibiotikumok MIC értékét is hasonlóan határoztam meg, amely eredmények a szakirodalomban közölt tartományon belül mozognak (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2022).

4.2 Egyéni sejtek lappangási idejének eloszlása optimális szaporodási feltételek mellett

A kórokozók alacsony kezdeti sejtszám melletti szaporodási kinetikáját vizsgálva sztochasztikus matematikai modellekre van szükség az egyéni sejtek variabilitásának leírásához és értelmezéséhez. A turbidimetriás mérések segítségével detektált T_{det} értékek (OD=0,15) adatai szolgálták a lappangási idő közvetett leírására. A kísérletek elvégzéséhez egy speciális hígítási módszert dolgoztam ki (Buss da Silva és mtsai. 2019 gyakorlati megvalósításként) ahhoz, hogy a mikrotiter lemez cellájába 1-3 sejt jusson a legalacsonyabb koncentrációként, amely optimális az egyéni sejtek vizsgálatához.

A szuszpenziók kezdeti koncentrációja OD₆₀₀=0,1 értékre állítottam, amelyből négy egymást követő decimális hígítást, majd szükség szerint 11-13 bináris hígítást készítettem a kívánt sejtkoncentráció eléréséhez (mely kb. 1,6 sejt/cella). A felező hígítási tagok száma függ a mikrobatörzsektől, ezért a bináris hígítások számánál egy tartomány lett megadva.

A kezdeti sejtkoncentráció sejt/cella értékekre két fajta becslést alkalmaztam (i) a hagyományos telepszámlálási módszert (c^*) és (ii) az üres cellák arányából (ρ^*) számított értéket, amely az eloszlás paramétere. A vizsgálatok során nem volt kimutatható szignifikáns különbség (F=0,78, p = 0,39, Fcrit=4,20) a két módszerrel kapott becslések között (ρ^* és c^* értékek). Így a gyorsabb és költséghatékonyabb becslés értéke, ρ^* használható a sejtek kezdeti számának meghatározására alacsony inokulumszint esetén.

Egyéni sejt szinten vizsgálódva olyan információkat lehet nyerni, amelyek fontos kérdéseket vethetnek fel élelmiszer-biztonsági szempontból, emellett az eredmények könnyen összehasonlíthatóak a populációs szintű adatokkal. Az *E. coli*, *Shigella sonnei* és *Salmonella enterica* subs. *enterica* mikrobák mind az Enterobacteriaceae család tagjai. Ebből kifolyólag egyéni sejt szinten vizsgálódva (megcélözva a 1,6 sejt/cella kezdeti koncentrációt) sem vártunk

nagy eltérést a mikrobák lappangási idejének eloszlásában. Azonban a vizsgálatok alapján nagy variabilitást lehetett megfigyelni a T_{det} értékekben kb. 20 sejt/cella kezdeti koncentráció alatt. Az *E. coli* törzsek mutatták a legalacsonyabb szórást a többi mikroorganizmushoz képest. A továbbfejlesztett mérési módszer segítségével pontosan be lehet állítani a kezdeti koncentrációt 1-3 sejt/cella értékekre. A beállítások és az értékek ismételhetőek voltak, és az alkalmazott bináris hígítási faktort jól reprezentálták a kezdeti sejtszám értékek. Élelmiszerbiztonsági szempontból a patogén és indikátor baktériumok jelenléte fontos az élelmiszerekben. Az egyéni viselkedést figyelembe véve az eredményeknek nagy jelentősége lehet a kockázatok becslésében és az élelmiszerek biztonságos tárolási idejének kiszámításában.

4.3 A karvakrol koncentrációfüggő hatása az *E. coli* törzsek lappangási idejére

A kísérletek során az *E. coli* lappangási idejének időtartamát szubinhibitor karvakrol kezelések függvényében vizsgáltam turbidimetriás méréseken keresztül. A T_{det} arányosan változik a baktériumok lappangási idejével. Elmondható, hogy a növekvő karvakrol koncentrációval együtt nő a baktériumok lappangási ideje, ami az antimikrobás kezelésre adott védelmi válasznak tekinthető. Először lett leírva a T_{det} és karvakrol kezelések kapcsolata egy hatványfüggvény segítségével. Minden mérési beállításból négy független ismétlés volt, azonban az ismétlések során generált függvényeket nem lehetett összevonni, mivel az egyes illesztések jósága egyik esetben sem volt alacsonyabb, mint 70%. A karvakrol lappangási időre gyakorolt hatása százalékosan is meg lett határozva az LE értékek felhasználásával. Megállapítható, hogy a 65-112 mg/l karvakrol koncentrációk 20-40%-kal növelték a T_{det} értékeket. A törzsek között azonban voltak különbségek; a klinikai izolátum tűnt a legellenállóbbnak a kezelésekkal szemben. Mivel a karvakrol törzsoldata EtOH-ban készült, ezért annak hatását is teszteltem, a tenyészethez adva 4, 6, illetve 8 μ l térfogatban. Az EtOH-os kezelés enyhe növekedését indukálta a T_{det} értékekben, a kezelésekre az *E. coli* ATCC 25922 törzs reagált a legérzékenyebben. Azonban egyik vizsgált EtOH koncentráció sem hosszabbította meg szignifikánsan az *E. coli* törzsek lappangási idejét: $p=0,08$ (*E. coli* ATCC 25922); $p=0,22$ (*E. coli* VF 3584); $p=0,38$ (*E. coli* ATCC 11229).

4.4 Fluoreszcens vizsgálatok: karvakrol hatása az *E. coli* efflux mechanizmusára és membrán integritására

A fluoreszcens vizsgálatok előtt turbidimetriás mérések segítségével meghatároztam az egyes fiziológiai állapotok eléréséhez szükséges inkubációs időket. A görbék meredeksége alapján az *E. coli* tenyészetek 0,5; 4 és 14 órás inkubáció után érték el a különböző fiziológiai állapotokat.

Így a fluoreszcens mérések előtt a tenyészetek ezen inkubációs idők után kerültek feldolgozásra.

Az etídium-bromid (EtBr) felhalmozódásos mérésekkel a karvakrol koncentrációfüggő efflux gátló hatását sikerült bemutatni. Továbbá az újonnan bevezetett kísérleti és numerikus eljárással a karvakrol optimális efflux inhibitor koncentrációját is meg lehetett határozni. Az EtBr akkumulációs mérésekkel kapott időbeli F_5 (relatív fluoreszcens jel) értékekre telítési függvényeket lehetett illeszteni, míg a karvakrol membrándegradációs hatását disszipációs függvényekkel lehetett leírni (elsődleges modellek).

A másodlagos modellekben, az elsődleges modell paraméterek a kezelések függvényében lettek ábrázolva. Az eredmények alapján elmondható, hogy a karvakrol növekvő koncentrációjával monoton negatív hatást fejtett ki a bakteriális membrán integritásra. A másodlagos modellekben a y_{EP} értékeket ábrázolva a karvakrol kezelés függvényében, egy konvex mintázat rajzolódott ki, amely alapján elmondható, hogy a karvakrol EtBr felhalmozódásra gyakorolt hatása bi-lineáris modellel írható le. A bi-lineáris modell töréspontja a karvakrol optimális EPI koncentrációját becsüli meg. F-teszt igazolta, hogy (i) a bi-lineáris illeszkedés jelentős modellfejlődést mutat a lineáris illesztéshez képest és (ii) a független ismétlések maximuma (optimális inhibitor koncentráció) azonos. További kísérletek során ezen elemzési módszerrel sikerült kimutatni, hogy a karvakrol optimális EPI-koncentrációja függ a baktériumtenyészet fiziológiai állapotától. A bakteriális efflux mechanizmus kevésbé volt aktív a gyorsan és lassan növekvő fázisokban, mint a stacioner szakaszban. Az első két szakaszban alacsonyabb, 50 mg/L körüli karvakrol koncentráció is elegendő volt az efflux gátlásához. Azonban a stacioner fázisban az efflux mechanizmus aktívabbnak bizonyult, így a karvakrol optimális inhibitor értéke 75-95 mg/l körüli értékre volt becsülhető.

A baktériumok efflux mechanizmusát a különböző fiziológiai állapotokban kezelések nélkül is bemutattam. A gyorsan és lassan növekvő fázisban a baktériumok nem tudták teljesen kiszorítani az EtBr-t a sejtekből, ami arra enged következtetni, hogy az efflux mechanizmus is gyengébb, mint a stacioner szakaszban, ahol a mérések során a festék nem halmozódott fel a sejtekben. Ezen szakaszban a baktériumok feltehetően már egy fejlettebb rezisztencia mechanizmussal rendelkeznek. A bemutatott értékelési módszer egy szintetikus inhibitor, az NMP segítségével lett validálva. A tesztelt illóolaj komponens azonban magasabb efflux gátló aktivitást mutatott, mint a tesztelt NMP vagy PaβN szintetikus inhibitorok. Összefoglalva, a karvakrol efflux pumpa gátló koncentrációját sikerült optimalizálnom a fiziológiai állapot

függvényében és kimutatnom, hogy magasabb gátló hatással rendelkezik, mint a tesztelt szintetikus inhibitorok.

4.5 Antibiotikum-érzékenységi tesztek a karvakrol és öt különböző antibiotikum kombinációjával

A fluoreszcens mérések eredményei alapján a karvakrol ígéretesnek bizonyult a bakteriális rezisztencia visszaszorítására, 50 és 95 mg/l-es koncentrációk között. Ezért a karvakrol 75, 90 és 105 mg/l koncentrációt teszteltem kombinálva a különböző mechanizmusú és molekulaméretű antibiotikumok szub-MIC koncentrációival (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 MIC). Az érzékenységi kísérletek során öt antibiotikumot teszteltem. Az alkalmazott többváltozós statisztikai módszer, a MANOVA segítségével egyszerre több tényező hatásának egyidejű értékelésére nyílt lehetőség. A többváltozós, átfogó teszt azt mutatta (Wilks lambda (λ) tesztértékekkel), hogy az antibiotikumok hatása minden faktorszinten (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 MIC) szignifikáns ($\lambda < 0,195$, $p < 0,001$). Ez azt jelenti, hogy az antibiotikumok csoportjai között, azaz a baktériumszaporodásra gyakorolt hatásuk között, jelentős különbség van a kombinált kezelések esetében is. Szignifikánsnak bizonyult az *E. coli* törzsek hatása is ($\lambda < 0,558$, $p < 0,42$), valamint a két tényező kölcsönhatása ($\lambda < 0,183$, $p = 0,016$). A faktorok kölcsönhatása csak 0,5 és 0,25 szub-MIC antibiotikum szinten volt szignifikáns.

Az antibiotikumok minden faktorszinten és kombinációban szignifikáns hatást gyakoroltak a baktériumok szaporodására ($F(4;10) > 3,75$, $p < 0,014$). Azonban a vizsgált törzsek szintjén, az alanyok közötti hatásokat értékelve néhány kezelési kombináció nem váltott ki szignifikánsan eltérő válaszokat. Az antibiotikum között azok legalacsonyabb koncentrációjánál (0,0625 MIC) lehetett legkevésbé különbséget tenni. A törzsek hatása kevésbé volt szignifikáns, egyetlen olyan eset volt, ahol a törzsek eltérően reagáltak: 0,125 MIC antibiotikumot 75 mg/L karvakrollal kombinálva ($F(2;38) = 3,319$, $p = 0,05$).

A kombinált kezelésekben nem volt tapasztalható domináns különbség a három törzs válaszai között. A baktériumok válaszreakcióit vizsgálva azonban különbségek mutatkoztak meg a karvakrollal kombinált öt antibiotikum kezelés tekintetében. Ha az antibiotikum kezelés 90 vagy 105 mg/l karvakrol kezeléssel volt kombinálva, akkor jelentősen csökkent a baktériumok szaporodása a nem kombinált, csak antibiotikumos kezeléshez képest. A 75 mg/l-es karvakrol kevésbé tűnt hatékonyak az antibiotikumokkal együtt alkalmazva.

Végeredményben, a karvakrol növelte az *E. coli* törzsek érzékenységét az összes vizsgált antibiotikummal szemben. Bár a legjobb kezelési kombinációkat a cefotaxim, a gentamicin és

az eritromicin antibiotikumokkal sikerült bemutatni. Ezen antibiotikumok mindegyike a bakteriális fehérje- és sejtfalszintézist gátolja, így nem meglepő, hogy a karvakrol ezekkel a gyógyszerekkel kombinálva működött a leghatékonyabban. A legkevésbé hatékony kombinált kezelés a ciprofloxacín karvakrollal történő kombinációja volt, de még ebben az esetben is átlagosan 50%-kal nőtt a ciprofloxacín gátlási aránya 105 mg/l karvakrollal kombinálva.

5 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Az antibiotikumok használata milliók életét mentette és menti meg napjainkban is, azonban a baktériumoknak az alkalmazott antibiotikumok jelentős részével szemben sikerül rezisztenciát kifejleszteniük. A gyorsan fejlődő bakteriális rezisztencia miatt új stratégiákra van szükség a kialakuló veszélyhelyzet kezelésére. Az új megoldást a kis molekulájú inhibitorok jelenthetik, melyek gátolják az antibiotikumok sejtől való kiszorítását. A természetes illékony vegyületek egy része, mint a karvakrol, antimikrobás hatásuk mellett efflux gátló hatással is rendelkezik. Mindazonáltal kimutatták, hogy a karvakrol szinergensen működhet egyes antibiotikumokkal, például az eritromicinnel, penicillinnel, és ampicillinnel (Magi és mtsai. 2015; Langeveld és mtsai. 2014; Ventola 2015).

A jelenlegi tanulmányban kapott eredmények szintén azt sugallják, hogy a karvakrol ígéretes efflux inhibitoroként működhet. Kijelenthető, hogy a karvakrol növeli a baktériumok érzékenységét a különböző antibiotikumokkal szemben. Mindazonáltal antimikrobás hatása miatt azonban a karvakrol védekező sejtválaszt is kiválthat, ami hosszú távon további bakteriális rezisztenciát eredményez. Ezért létfontosságú az inhibitorok antibiotikumokkal kombinált kezelése során az optimális koncentráció alkalmazása.

A prediktív mikrobiológiai modellek alkalmasak voltak az EtBr felhalmozódásos mérések értékelésére. Ezen indirekt módszerrel kapott adatok a karvakrol efflux modulációs aktivitásának leírására szolgáltak. Az eredmények értékelése során a másodlagos modellekben a karvakrol koncentrációfüggő EPI hatásának leírására a bi-lineáris modell bizonyult a legalkalmasabbnak. Az illesztett modellek töréspontja megmutatta a karvakrol optimális inhibitor koncentrációját. Így ezen továbbfejlesztett értékelési módszert alkalmazva meghatározható az inhibitorok optimális koncentrációja, hiszen a bemutatott elemzési módszer egy szintetikus inhibitor alkalmazásával validált. Azonban érdemes $5 \leq$ kezelési koncentrációt tesztelni az inhibitorok pontos koncentrációjának meghatározásához. A stationer fázisú tenyészetek esetében sikerült kimutatni, hogy az efflux mechanizmus fokozott, feltételezve, hogy a sejtek alkalmazkodnak a különböző stresszfaktorokhoz.

A membránintegritásos mérések során kimutatható volt a karvakrol növekvő koncentrációjával arányos bakteriális membránra gyakorolt monoton negatív hatás. A vizsgált mikroorganizmusok, az *E. coli* törzsek patogenitásukkal szorosan összefüggő, peritrich elrendezésű flagellákkal és hosszú fimbriákkal rendelkeznek. Ezen túlmenően a baktériumok felületén specifikus fimbriák – pilusok találhatóak, amelyek a célsejtekhez tapadnak, és

különböző specifikus gazdahámsejteket kolonizálhatnak. Mivel a karvakrol hatással van a membránpermeabilitásra, érdemes lenne transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vagy pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek segítségével is megvizsgálni a természetes antimikrobás anyag hatását a vizsgált EPI koncentrációkban, továbbá az *E. coli* morfológiai változásait.

A kombinált kezelések során a karvakrol a cefotaximmal, gentamicinnel és eritromicinnel működött a legjobban, egyes esetekben a MIC-értékek felére csökkenése is megfigyelhető volt. Ezek a 800 g/mol-nál alacsonyabb molekulatömegű antibiotikumok a baktérium membránját és fehérjeszintézisét támadják. Ezért annak bizonyítására, hogy a kombinált kezelés sikeressége az antibiotikumok mechanizmusától és molekulaméretétől függ, több antibiotikum bevonása szükséges a jövőbeni vizsgálatoknál. Hasonlóképpen szinergens hatást mutatott ki Obaidat és mtsai. (2011) a karvakrol és a tetraciklin között, Gram-negatív baktériumok ellen. A hatást a bakteriális sejtfa fokozott permeabilitásával magyarázták, miáltal sikeresebb volt a tetraciklin beáramlása a bakteriális sejtfaon keresztül. Hasonlóképpen a karvakrol és az eritromicin szinergiáját mutatták ki Magi és mtsai. (2015), eritromicin-rezisztens A csoportú *Streptococcus* törzsek ellen. Ezek az eredmények a szinergizmus ígéretes működését jelzik, így további vizsgálatokra van szükség a karvakrol és az antibiotikumok kombinálására. A szinergens hatás mögött meghúzódó mechanizmus megértése biztonságos gyógyszerkombinációk kifejlesztéséhez vezethet. Kevés tanulmány foglalkozik a karvakrol metabolizmusával, biohasznosulásával és a komponens által célzott szövetek vizsgálatával, mely szintén azt jelzi, hogy további, állati modelleket és emberi vizsgálatokat is magába foglaló kutatásokra van szükség (Sharifi-Rad és mtsai. 2018).

Másrészt Kiskó és Roller (2005) a karvakrol és egy másik illóolaj-komponens, a p-cimén szinergikus kölcsönhatását írták le. Így érdemes lenne e két természetes komponens rezisztencia-gyengítő hatását is tesztelni.

Doktori disszertációmban sikerült jellemezni egy ígéretes efflux-gátló vegyület, a karvakrol aktivitását. A karvakrol képes volt növelni a baktériumok antibiotikumokkal szembeni érzékenységét, így a szintetikus EPI szerek potenciális alternatívája lehet. A bakteriális érzékenység megértése és számszerűsítése nélkülözhetetlen a kombinált kezeléseknél, hiszen ezen kezelések kulcsfontosságúak lehetnek a gyorsan terjedő antibiotikum-rezisztencia leküzdésében.

6 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Dolgozatomban az új tudományos eredmények négy pontban, és hat alpontban foglalhatók össze.

1. Baktériumok szaporodási kinetikájának mérése egyéni sejt szinten turbidimetriás mérésekkel

a. Az egyéni sejtek szaporodás-kinetikájának vizsgálatához egy specifikus hígítási módszert sikerült kidolgozni (Jánosity és mtsai. 2022). Az egyéni sejtek szaporodás-kinetikájának méréséhez az optimális kezdeti koncentráció kb. 1,6 sejt/cella, melyet elméletben bizonyítottak Buss da Silva és társai (2019). A mikrotiterlemez celláiban az ajánlott, 1-3 sejt eléréséhez az inokulum kezdeti koncentrációja $OD_{600}=0,1$ -re lett állítva, amelyből négy egymást követő decimális hígítás, majd 11-13 bináris hígítás készült, figyelembe véve, hogy a hígítási arány függ az adott mikrobától. Így az ezen kidolgozott hígítási módszerrel rendkívül pontos és megismételhető volt a kezdeti sejt számbeállítás. Továbbá, sikerült megállapítani, hogy a sejtek kezdeti átlagos számának becsült értéke nem tér el szignifikánsan a hagyományos telepszámlálási módszer és az üres cellák arányából kiszámított Poisson-paraméterrel (ρ^*) kapott érték esetében. Így a bemutatott módszer alkalmazásával nincs szükség a hagyományos technikára a kezdeti koncentrációk meghatározásához, ami költség- és időhatékony lehet a laboratóriumi munkát tekintve.

b. Turbidimetriás mérések során a detektált T_{det} ($OD=0,15$) értékek arányosak a baktériumok lappangási idejével. Mérések során sikerült megállapítani, hogy az *E. coli* alkalmas, mint modell mikroorganizmus, még az egyéni sejt szintű méréseknél is. A vizsgálatok során mind az pröt mikroorganizmus az Enterobacteriaceae család tagja volt, így alacsony sejtkoncentrációról indulva sem volt várt nagy különbség a lappangási idők eloszlásában. Azonban sikerült kimutatni, hogy kb. 20 sejt/cella és ennél alacsonyabb koncentráció esetén a *Salmonella enterica* törzsek T_{det} értékeinek varianciája magasabb volt, mint az *E. coli* törzseké. Továbbá, *Shigella sonnei* esetében kétszer nagyobb lappangási idő eloszlást lehetett mérni, mint az *E. coli* törzsek esetében.

2. Fluoreszcens vizsgálatok a bakteriális efflux aktivitás és a membránintegritás változásának leírására, továbbá a karvakrol, egy természetes antimikrobás szer inhibitor aktivitásának leírása

a. A karvakrol efflux gátló aktivitása EtBr akkumulációs mérések során lett kvantifikálva, új módszerként pedig az eredmények értékelése során prediktív mikrobiológiai módszerek kerültek alkalmazásra (Jánosity és mtsai. 2022). A következő elemzést sikerült kidolgozni a fluoreszcens mérések elemzéséhez. Az elsődleges modellekben az EtBr felhalmozódás- és membránintegritás-változását az F_s (fluoreszcens jel) értékek időbeli változása írta le minden egyes karvakrol koncentrációnál. Az elsődleges modellekeben (A) az EtBr-felhalmozódásos adatokra telítődési modellek lettek illisztve illetve (B) illetve disszipációs modellek a membrán integritás változásának leírására:

$$Fs(t) = Fs_0 + (Fs_{max} - Fs_0) \cdot (1 - e^{-r \cdot t}) + \varepsilon \quad (A)$$

$$Fs(t) = Fs_0 - (Fs_0 - Fs_{min}) \cdot (1 - e^{-r \cdot t}) + \varepsilon \quad (B)$$

Az $F_s(t)$ az F_s egy t időpontban való értéke, amely a t_0 kezdeti időponttól eltelt időt jelenti; Fs_0 a kezdeti időpontban mért fluoreszcens jel; az Fs_{max} az elméleti (aszimptotikus) maximuma a jelnek; Fs_{min} pedig az elméleti minimuma; és r az az exponenciális ráta (sebesség), amellyel az $F_s(t)$ függvény az Fs_{max} vagy Fs_{min} értékhez konvergál, a fluoreszcens vizsgálat típusától függően. Végül ε a véletlenszerű mérési hiba.

A másodlagos modellekben a legmagasabb (Fs_{max}) és a legalacsonyabb (Fs_0) illesztett F_s értékek aránya lett kiválasztva a karvakrol EPI hatékonyságának kvantifikálására. Ennek a paraméternek a természetes alapú logaritmus lett ábrázolva a másodlagos modellekben a karvakrol koncentráció, x , függvényében minden törzsnél és növekedési fázisnál modellezve egy aszimmetrikus, konvex, bi-lineáris függvénnyel:

$$y_{EP}(x) = \ln \frac{Fs_1}{Fs_0} = B_s(x) = y_{opt} \cdot \begin{cases} \frac{(x-x_{min})}{(x_{opt} - x_{min})} & (x_{min} \leq x \leq x_{opt}) \\ \frac{(x_{max}-x)}{(x_{max} - x_{opt})} & (x_{opt} \leq x \leq x_{max}) \end{cases} .$$

Az x_{min} , x_{opt} , x_{max} paraméterek a bi-lineáris függvényt meghatározó minimum, optimum és maximum kezelési koncentrációk. Az első tartományban az $\frac{Fs_1}{Fs_0}$ arány nagyobb volt, mint 1

(azaz az F_s értékek nőttek a mérés során). A hányados értéke y_{opt} , ami az optimális karvakrol koncentráció mellett volt detektálható. Továbbá az s a B_s jelölés indexében azt jelzi, hogy a bi-lineáris függvény várhatóan függ a baktériumok fiziológiai állapotától. Így az adatok elemzése során bebizonyosodott, hogy bi-lineáris függvénnyel írható le az elsődleges modell paraméterek és a karvakrol koncentráció függőhatása. A függvény konvex tulajdonsága a karvakrol egy optimális EPI koncentrációjára utalt. Pozitív kontrollként ez a modellezési megközelítés egy szintetikus efflux inhibitor, az NMP eredményeivel is validálásra került. Emellett, ugyanezzel a modellezési módszerrel sikerült leírni a karvakrol monoton negatív hatását a sejtek membránintegritásán: minél magasabb a karvakrol koncentráció, annál jelentősebb a membránkárosodás.

b. Először sikerült bemutatni, hogy egy efflux inhibitor (a doktori értekezésben karvakrol) optimális inhibitor koncentrációja függ a baktériumok fiziológiai állapotától. Három fiziológiai állapotot vizsgáltunk: a gyors, lassú és nem növekvő fázisokat. A gyorsan és lassan növekvő fázisokban a karvakrol optimális EPI koncentrációja 44-56 mg/l közé, míg a nem növekvő fázisban 76-94 mg/l értékek közé esett, *E. coli* törzsek esetében. Hasonlóképpen megállapítást nyert, hogy az *E. coli* kezelés nélkül is ellenállóbb az utoljára említett fázisban, mivel a baktériumok ekkor egy aktívabb efflux mechanizmussal rendelkeznek.

3. Az *E. coli* lappangási idejének meghatározása karvakrol kezelések függvényében

a. Először sikerült bemutatni optikai denzitásos mérésekkel, hogy *E. coli* törzsek lappangási ideje hogyan függ a karvakrol kezelés mértékétől. Sikerült bemutatni, hogy hatványfüggvénnyel írhatóak le a T_{det} értékek (melyek arányosak a baktériumok lappangási idejével) a karvakrol kezelések függvényében. Az elemzések során, az elsődleges modellben a mért OD értékek az idő (h) függvényében lettek ábrázolva, ahol detektációs idő (T_{det}) értékek lineáris interpolációval lettek meghatározva, rögzített detektációs szinten (OD=0,15). A másodlagos modellekben a T_{det} értékeket a karvakrol kezelések függvényében ábrázolva, a változók közötti kapcsolat leírására a következő hatvány függvény lett kidolgozva:

$$T_{det} = \beta_0 * (121 - x)^{\beta_1} + \varepsilon$$

ahol x az alkalmazott karvakrol kezelést jelöli, ε a modell hibatagja, β_0 és β_1 a modell paraméterei. Továbbá, a lappangási idő 20%-os növekedése volt tapasztalható a 64-70 mg/l

karvakrol kezelések hatására egyaránt, kivéve a klinikai izolátumnál (*E. coli* ATCC 11229), ahol 92 mg/l karvakrol indukálta ugyanezt a válaszreakciót.

4. Antimikrobás érzékenységi tesztek: a karvakrol és az antibiotikumok kombinációjának hatékonyságának leírására

a. Az utolsó részben bemutatásra került, hogy a karvakrol szubinhibitor koncentrációi hogyan növelik az *E. coli* érzékenységét ciprofloxacín, cefotaxim, eritromicin, gentamicin és vancomycin antibiotikumokkal szemben. A szub-MIC antibiotikumokos kezeléseket 90 vagy 105 mg/l karvakrolos kezeléssel kombinálva szignifikánsan sikerült csökkenteni a baktériumok szaporodását a homogén antibiotikum kezeléshez képest. Továbbá az is kimutatható volt, hogy a karvakrol a cefotaxim, gentamicin és eritromicin antibiotikumokkal együtt működött a legjobban, a MIC-értékek felére való csökkenése is megfigyelhető volt. Ezáltal elmondható, hogy a karvakrol azon antibiotikumok aktivitását fokozta a leginkább, amelyek (i) molekulatömege 800 g/mol alatt volt, és (ii) a bakteriális fehérje- és sejtfalszintézist célozták.

7 FONTOSABB REFERENCIÁK

Blair, J.M., & Piddock L.J. (2016) 'How to Measure Export via Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps', *mBio* 7(4), e00840-16. doi: 10.1128/mBio.00840-16. PMID: 27381291; PMCID: PMC4958252.

Buss da Silva, N., Carciofi, B.A.M., Ellouze, M., & Baranyi, J. (2019) 'Optimization of turbidity experiments to estimate the probability of growth for individual bacterial cells', *Food Microbiology*, 83, pp. 109–112. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.003>.

Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017) 'Antimicrobial Activity of Some Essential Oils- Present Status and Future Perspectives', *Medicines*, 4(3), pp. 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>.

Cuenca-Estrella, M., Lee-Yang, W., Ciblak, M.A., Arthington-Skaggs, B.A., Mellado, E., Warnock, D.W., & Rodriguez-Tudela J.L. (2002) 'Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of candida species', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11), pp. 3644–3647. doi: 10.1128/AAC.46.11.3644-3647.2002.

Dos Santos Barbosa, C.R., Scherf, J.R., de Freitas, T.S., de Menezes, I.R.A., Pereira, R.L.S., Dos Santos, J.F.S., de Jesus, S.S.P., Lopes, T.P., de Sousa Silveira, Z., de Moraes Oliveira-Tintino, C.D., Júnior, J.P.S., Coutinho, H.D.M., Tintino, S.R., & da Cunha, F.A.B. (2021) 'Effect of Carvacrol and Thymol on NorA efflux pump inhibition in multidrug-resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* strains', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 53(4), pp. 489-498. doi: 10.1007/s10863-021-09906-3.

Elshafie, H.S., & Camele, I. (2017) 'An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health', *BioMed Research International*, 2017(9268468), pp. 14 doi: 10.1155/2017/9268468.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2021): Broth microdilution - EUCAST reading guide version 3.0, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/mic_determination/?no_cache=1. Internet search engine: Google. Keywords: EUCAST broth microdilution method. Date: 02.09.2021.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2022): Clinical breakpoints - breakpoints and guidance, Clinical breakpoints - bacteria (v 12.0) - file for screen (1 Jan, 2022).

https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ Internet search engine: Google. Keywords: EUCAST MIC of antibiotics. Date: 02.05.2022.

George, S.M., Métris, A., & Baranyi, J. (2015) 'Integrated kinetic and probabilistic modeling of the growth potential of bacterial populations', *Applied and environmental microbiology*, 81(9), pp. 3228–3234. <https://doi.org/10.1128/AEM.04018-14>.

Jánosity, A., Klančnik, A., Kiskó, G., Možina, S.S., & Baranyi, J. (2021) 'Determining optimum carvacrol treatment as a cardinal value of a secondary model', *International Journal of Food Microbiology*, 354(2021), 109311. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109311>.

Jánosity, A., Vajna, B., Kiskó, G., & Baranyi, J. (2022) 'Distribution of bacterial single cell parameters and their estimation from turbidity detection times', *Food Microbiology*, 104(2022), 103972, ISSN 0740-0020, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103972>

Khan, S.T., Khan, M., Ahmad, J., Wahab, R., Abd-Elkader, O.H., Musarrat, J., Alkathlan, H.Z., & Al-Kedhairi, A.A. (2017) 'Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*', *AMB Express*, 7(1), 49. doi: 10.1186/s13568-017-0344-y.

Kovač, J., Šimunović, K., Wu, Z., Klančnik, A., Bucar, F., Zhang, Q., & Smole Možina, S. (2015) 'Antibiotic Resistance Modulation and Modes of Action of (-)- α -Pinene in *Campylobacter jejuni*', *PLoS ONE*, 10(4), e0122871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122871>.

Kurinčič, M., Klančnik, A., & Smole Možina, S. (2012) 'Effects of efflux pump inhibitors on erythromycin, ciprofloxacin, and tetracycline resistance in *Campylobacter* spp. isolates', *Microbial Drug Resistance*, 18(5), pp. 492-501. doi: 10.1089/mdr.2012.0017.

Langeveld, W.T., Veldhuizen, E.J., Burt, S.A. (2014) 'Synergy between essential oil components and antibiotics: a review', *Critical Reviews in Microbiology*, 40(1), pp. 76-94. doi: 10.3109/1040841X.2013.763219.

Li, B., Qiu, Y., Shi, H., & Yin, H. (2016) 'The importance of lag time extension in determining bacterial resistance to antibiotics', *Analyst*, 141(10), pp. 3059-67. doi: 10.1039/c5an02649k. PMID: 27077143.

Magi, G., Marini, E., & Facinelli, B. (2015) 'Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A *Streptococci*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 165. doi: 10.3389/fmicb.2015.00165.

Magi, G., Marini, E., & Facinelli, B. (2015) 'Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A *Streptococci*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 165. doi: 10.3389/fmicb.2015.00165.

McMeekin, T.A., Olley, J., Ross, T. and Ratkowsky, D.A. (1993). Predictive Microbiology. Theory and Application. Taunton, New York, USA: Research Studies Press; Wiley, 340. p. ISBN 10: 0863801323.

Motulsky, H., & Christopoulos, A. (2004): 'Using global fitting to test a treatment effect in one experiment. 160–165 p. In: Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression, Chapter 27, Oxford, UK: Oxford University Press, 352p. ISBN 0195171802.

Sharifi-Rad, M., Varoni, E.M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W.N., Del Mar Contreras, M., Salehi, B., Soltani-Nejad, A., Rajabi, S., Tajbakhsh, M., & Sharifi-Rad, J. (2018) 'Carvacrol and human health: A comprehensive review', *Phytotherapy Research*, 32(9), pp. 1675-1687. doi: 10.1002/ptr.6103.

Sharma, A., Gupta, V.K., & Pathania, R. (2019) 'Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside', *Indian Journal of Medical Research*, 149(2), pp. 129-145. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_2079_17.

Spengler, G., Kincses, A., Gajdács, M., & Amaral, L. (2017) 'New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria', *Molecules*, 22(3), 468. <https://doi.org/10.3390/molecules22030468>.

Sun, D., Jeannot, K., Xiao, Y., & Knapp, C.W. (2019) 'Editorial: Horizontal Gene Transfer Mediated Bacterial Antibiotic Resistance', *Frontiers in Microbiology*, 10, 1933. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01933>.

Teelucksingh, T., Thompson, L.K., & Cox, G. (2020) 'The Evolutionary Conservation of *Escherichia coli* Drug Efflux Pumps Supports Physiological Functions', *Journal of Bacteriology*, 202(22), e00367-20. doi: 10.1128/JB.00367-20. PMID: 32839176; PMCID: PMC7585057.

Ventola, C.L. (2015) 'The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats', *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), pp 277–283. PMID: 25859123; PMCID: PMC4378521.

8 PUBLIKÁCIÓK

Jánosity, A., Vajna, B., Kiskó, G., & Baranyi, J. (2022) ‘Distribution of bacterial single cell parameters and their estimation from turbidity detection times’, *Food Microbiology*, 104(2022), 103972, ISSN 0740-0020, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103972> , **D1**

Jánosity, A., Klančnik, A., Kiskó, G., Možina, S.S., & Baranyi, J. (2021) ‘Determining optimum carvacrol treatment as a cardinal value of a secondary model’, *International Journal of Food Microbiology*, 354(2021), 109311. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109311> , **Q1**

Sajó I. E., Bakos, L. P., Szilágyi, I. M., Lendvay, G., Magyar, J., Mohai, M., Szegedi, A., Farkas, A., **Jánosity, A.,** Klébert, S., Kótai, L. (2018) ‘Unexpected Sequential NH₃/H₂O Solid/Gas Phase Ligand Exchange and Quasi-Intramolecular Self-Protonation Yield [NH₄Cu(OH)MoO₄], a Photocatalyst Misidentified before as (NH₄)₂Cu(MoO₄)₂’, *Inorganic Chemistry* 57(21), 13679–13692. <http://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b02261>

Fekete, F., Lazar, K., Keszler, A. M., **Janosity, A.,** Li, Z. B., Szilágyi, I. M., Kótai L. (2018) ‘Recycling the industrial waste ZnFe₂O₄ from hot-dip galvanization sludge’, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 1863–1872. <http://doi.org/10.1007/s10973-018-7849-8>.

Sajó, I. E., Kovács, G. B., Pasinszki, T., Bombicz, A. P., May, Z., Szilágyi, I. M, **Jánosity, A.,** Banerji, K. K., Kant, R., Kótai, L. (2018) ‘The chemical identity of ‘[Ag(py)₂]MnO₄‘ organic solvent soluble oxidizing agent and new synthetic routes for the preparation of [Ag(py)_n]XO₄ (X= Mn, Cl, Re, n=2-4) complexes’, *Journal of Coordination Chemistry* 71(16–18), 2884–2904. <http://doi.org/10.1080/00958972.2018.1493464>.

Kótai, L., Kocsis, T., **Jánosity, A.,** Kovács, I., Banerji, K. K., Keszler, A. M. (2018) ‘A convenient cost-effective method for recyclization of the aqueous waste effluent of car-painting industry’, *European Chemical Bulletin* 7: (2) pp. 81-83.

KONFERENCIA ELŐADÁSOK

Jánosity, A., Surányi, B., Ladányi, M., Kiskó, G., Baranyi, J., Burtscher, J., Domig, K. J. (2022) 'Carvacrol makes *E. coli* more susceptible to antibiotics', *ASM Microbe*, Poster presentation, Washington, D.C., USA.

Jánosity, A., Vajna, B., Kiskó, G., & Baranyi, J. (2021) 'Growth Kinetics Of Foodborne Pathogens And The Probability Of Growth At Single Cell Level'. *World Microbe Forum*, iPoster presentation: <https://wmf2021-asm.ipostersessions.com/Default.aspx?s=BF-A9-7E-99-F0-C5-78-65-AA-F6-8A-56-09-EE-E8-FA>.

Jánosity, A., Klančnik, A., Kiskó, G., Možina, S.S., Baranyi, J. (2019) 'Predicting the effect of carvacrol on the efflux pump activity in *Escherichia coli*', *11th International Conference on Predictive Modelling in Food*, Oral presentation, Instituto Politécnico de Braganca, Braganca, Portugal.

Jánosity, A., Klančnik, A., Kiskó, G., Možina, S. S, Baranyi, J. (2019) 'Carvacrol against the multidrug resistance', *SZIENtific meeting for young researchers - Ifjú Tehetségek Találkozója (ITT)*, Poster presentation, Szent István University, Budapest, Hungary.

Šimunović, K., Klančnik, A., **Jánosity, A.**, Tušek-Žnidarič, M., Bucar, F., Kiskó, G., Možina, S. S. (2016) Adaptation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the natural compounds carvacrol and p-cymene and its impact on their antimicrobial susceptibility, In: Theodor, *Escherich Symposium on Medical Microbiome Research*, Poster presentation, 3rd Theodor Escherich Symposiumon Medical Microbiome Research, Graz, Austria.