

XXXI. OTDK Biológia Szekció

A majoranna (*Origanum majorana*) esszenciális olajának és főbb komponenseinek hatása a *Candida albicans* élesztőre

Készítette: CZUNI LILLA ADRIENN

Biológus MSc hallgató

I. évfolyam

Témavezetők:

Prof. Dr. PESTI MIKLÓS

Dr. GAZDAG ZOLTÁN

PTE TTK Biológia Intézet

Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék



PÉCS, 2013.

Tartalomjegyzék

1.	Irodalmi bevezetés	4
1.1.	A növényi antimikrobiális összetevők főbb csoportjai	7
1.2.	Esszenciális olajok és más növényi kivonatok antimikrobiális hatása általában	7
2.	A majoránna (<i>Origanum majorana</i>) jellemzése, antimikrobiális hatásai	9
2.1.	Rendszertani besorolása:	9
2.2.	A növény általános jellemzői	9
2.3.	<i>Origanum majorana</i> komponensei.....	10
3.	Célkitűzés	17
4.	Anyag és módszer	18
4.1.	Mikroorganizmus	18
4.2.	Anyagok	18
4.3.	Táptalajok	19
4.4.	Oldatok	20
4.5.	Módszerek	21
4.5.1.	Mikroorganizmusok fenntartása	21
4.5.2.	<i>Candida albicans</i> 33erg ⁺ törzs szaporodási görbéjének felvétele	21
4.5.3.	<i>Candida albicans</i> 33erg ⁺ törzs szaporodásgátlásának vizsgálata majoranna olajjal	22
4.5.4.	<i>Candida albicans</i> 33erg ⁺ törzs élő sejtszámának meghatározása	22
4.5.5.	Minimális gátló koncentráció meghatározása mikroplate módszerrel	23
4.5.6.	Majoranna olaj, terpinén-4-ol ill. timol és amphotericin B esetleges szinergizmusának kimutatása mikrodilúciós módszer segítségével.....	23

4.5.7.	Az olaj hatására a sejtekből kiáramló 260 nm-en abszorbeáló anyagok mérése spektrofotométerrel	24
4.5.8.A	majoranna olaj teljes antioxidáns kapacitásának mérése ABTS ^{•+} módszerrel	24
5.	Eredmények	26
5.1.	<i>Candida albicans</i> 33erg ⁺ törzs szaporodási görbéjének felvétele	26
5.2.	<i>Candida albicans</i> 33erg ⁺ törzs szaporodásgátlásának vizsgálata majoranna olajjal	27
5.3.	<i>Candida albicans</i> 33 erg ⁺ törzs pusztítási görbéje	28
5.4.	Minimális gátló koncentráció meghatározása mikroplate módszerrel	29
5.5.	Majoranna olaj, terpinén-4-ol ill. timol és az amphotericin B esetleges szinergizmusának kimutatása mikrodilúciós módszer segítségével	30
5.6.	A sejtől kiáramló 260 nm-en abszorbeáló anyagok mérése spektrofotométerrel.....	31
5.7.	Teljes antioxidáns kapacitás mérése ABTS ^{•+} gyökkel.....	32
6.	Összefoglalás	33
7.	Irodalom	35
8.	Köszönetnyilvánítás.....	37
9.	Függelék.....	38
10.	Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez	40

1. Irodalmi bevezetés

Ősi elgondolás szerint a növényeknek gyógyító erejük van. Az emberek az összes kontinensen hosszú ideje alkalmaznak lenmaglisztes borogatást és bennszülött növényi kivonatok százaival - ha nem ezreivel - inhalálnak, az őstörténet alapján. Bizonyított, hogy a Neandervölgyiek 60.000 évvel ezelőtt már használták a mályvarózsát; ezeket a növényeket még mindig széles körben használják a népgyógyászatban az egész világon. A terápiák eredménye nagyon különböző, gyakran teljes gyógyulást vagy a tünetek enyhülését figyelték meg, de magas arányban mérgezések is előfordultak.

Egyes becslések szerint 250.000-500.000 növényfaj van a Földön. Ezeknek csak relatíve kis százalékát (1-10%) használják mind emberi és mind állati táplálékként. Sokkal többet használnak azonban gyógyászati céllal. Hippocrates (i.e. 5. század) 300-400 gyógynövényt említett. Dioscorides az első században megírta *De Materia Medica* című gyógynövény katalógusát, amelyet a modern gyógyszerész könyvek prototípusának tekintenek. A Biblia megközelítőleg 30 gyógynövény leírását tartalmazza. A tömjén és a mirha köszönhetően a gyógyászati előnyeiknek óriási értéket képviseltek. Fertőzés gátló tulajdonságaik miatt szájvízként is alkalmazták őket. A középkorban az arab és ázsiai kultúrákban is újra központi téma lett a növények használata a gyógyításban. Nyugat-Európában a reneszánsz évei alatt az ókori gyógymódok megújulása zajlik le, amely nagymértékben épült a növényi gyógyszerekre.

Az 1800-as években Oliver Wendell Holmes felismerte, hogy egyes gyógyító készítmények hatástalanok, de akár veszélyesek is lehetnek. Például a higany-fürdő a szifilisz, és a veszélyes hallucinogének a tuberkulózis kezelésére. 1861-ben ezt írta Holmes: „Ha az összes jelenleg használt gyógyszert a tenger fenekére süllyesztenénk, amennyire jó lenne az emberiségnek, annyira lenne rossz a halaknak.” (HOLMES, 1861). Természetgyógyászok 1887-ben összeállították saját katalógusukat *Homeopathic Pharmacopoeia of the United States* címmel. A hivatalos orvostudomány egyre inkább fogékony a mikrobaellenes és más, növényekből származó gyógyszerek használatára, mivel a hagyományos antibiotikumok hatástalanná válnak, főleg a vírusos megbetegedésekkel szemben. Egy másik fontos oka a növényi mikrobaellenes anyagok iránti megújult érdeklődésnek, hogy az elmúlt 20 évben nagy számban haltak ki növényfajok.

Jelenleg az Egyesült Államokban az összes elkészített gyógyszereknek mindössze a negyede vagy fele tartalmaz nagyobb mennyiségű növényi eredetű anyagot, mióta megbíznak a bakteriális és gomba eredetű készítmények hatásában. 1950-es években, az antibiotikumok megjelenése óta, a növényi származékok használata antimikrobiális anyagként tulajdonképpen megszűnt. A 1990-es években történt hanyatlás után a kutatók rájöttek, hogy a mikroorganizmusokból származó antibiotikumok száma limitált. Emellett egyre több probléma került nyilvánosságra a hagyományos antibiotikumokkal való visszaélésekről. 1996-ban arról számoltak be, hogy a növényi gyógyszerek eladása 37%-kal nőtt 1995 óta. Azt remélik, hogy a társadalom is reagál a recepteken felírt olykor mérgező gyógyszerekre, és próbál áttérni a növényi származékok gyógyászati alkalmazására (COWAN, 1999).

Aromás növényeket sok évszázadon át széles körben alkalmazták a népi gyógyászatban. A rózsafát és cédrusfát használják a parfümgyártásban, italok ízesítésére a lime-ot, édesköményt és a boróka bogyó olaját, és a tárolt ételek konzerválására a citromfű olaját. A növényi olajok és kivonatok antimikrobiális aktivitása számos alkalmazás alapját képezi, beleértve a nyers és feldolgozott élelmiszerek konzerválását, a gyógyszerészetet, az alternatív gyógyászatot és a természetes terápiákat (HAMMER ÉS MTSAL., 1999). Az utóbbi évtizedekben különösen sok *in-vitro* tanulmányt végeztek a mikrobaellenes és gombaellenes aktivitásukról (PINTO ÉS MTSAL., 2006).

A gombák egyre inkább fontosak az akut vagy krónikus mélyen gyökerező humán fertőzések miatt, különösen a visszatérő nyálkahártya-, bőr-, vagy köröm fertőzéseknel, amely komoly betegséggé válhat a legyengült immunrendszerű egyéneknél. A gombaellenes vegyületekkel szemben felmerülő rezisztencia növekedése és a rendelkezésre álló gyógyszerek számának csökkenése, valamint, hogy a legtöbb szer csak gombanövekedést gátló, arra vezetett, hogy alacsony költségű és alacsony toxicitású hagyományos gyógymódok és természetes termékek között keresgéljünk, olyan gyógyászati alternatívákat az aromás növények és az esszenciális olajaik között, amiket eddig empirikusan használtak gombaellenes tulajdonságaik miatt (CAVALEIRO ÉS MTSAL., 2005).

Az esszenciális olajok illékony, természetes, komplex összetevők, erős illat jellemzi őket, az aromás növények termékei, mint másodlagos metabolitok. Először a középkorban az arabok fedezték ezt fel. Az antiszeptikus, azaz baktericid, virucid és fungicid,

gyógyszerészeti előnyeikről és kellemes illatukról ismertek, használják illatosítóként, élelmiszer tartósításban, antimikrobiális, fájdalomcsillapító, altató, gyulladás gátló, görcsoldó és helyi érzéstelenítő szerként. Az esszenciális olajokat különféle aromás növényekből vonják ki, általában a mérsékelttől a meleg vidékekig fordulnak elő, mint a mediterrán és trópusi területek. Általában gőzöléssel vagy vízdesztillációval lehet hozzá jutni. A természetben az esszenciális olajok fontos szerepet játszanak a növények védekezésében, mint antibakteriális, antivirális, antifungális anyagok és inszekticidek, a növényevőkkel szemben is védelmet nyújtanak, mivel néhány növény esetén csökkentik az étvágyat. Minden növényi szervben szintetizálódhatnak. Az aromás növények különféle illékony molekulákat tartalmaznak, mint a terpének és terpenoidok, fenolból származtatott aromás és alipatikus komponensek. *In vitro* fizikokémiai elemzések antioxidánsként jellemezték őket. Néhány esetben az esszenciális olajok által indukált intracelluláris redoxpotenciálban történő változások és a mitokondrium működési zavarai kapcsolatban lehetnek a kifejtett antigenotoxikus hatással. A felfedezések azt sugallták, legalább részben hogy az esszenciális olajok előnyös tulajdonságai a prooxidáns hatásnak köszönhetőek sejtszinten (BAKKALI ÉS MTSAL., 2008).

Tehát, az esszenciális olaj termékek kémiaiilag nem csak a molekulák számában, hanem a kivont molekula sztereokémiai típusában is különböznek az extrakció típusától függően. A kivont termék különbözhet minőségben, mennyiségben és az összetételében a klímától, a talaj összetételétől, a növényi szervtől, kortól és a vegetatív ciklus szakaszától (MASOTTI ÉS MTSAL., 2003). A legtöbb kereskedelmi forgalomba hozott esszenciális olajat gázkromatográfia és tömeg spektroszkópia vizsgálatokkal elemzik (BAKKALI ÉS MTSAL., 2008).

Jelenleg megközelítőleg 3000 esszenciális olaj ismert, közülük 300 kereskedelmi jelentőségű, főleg a gyógyszerészeti, mezőgazdasági, élelmiszer, egészségügyi, kozmetikai és parfüm iparban. A természetes termékek, mint az esszenciális olajok biológiai aktivitásának módját fontos megérteni a humán egészségügyben, mezőgazdaságban és természetben való alkalmazása miatt. Néhány közülük hatásos alternatívát jelent vagy szintetikus vegyületeket pótol a kémiai iparban, anélkül, hogy ugyanolyan másodlagos hatásokat mutatna (BAKKALI ÉS MTSAL., 2008).

1.1. A növényi antimikrobiális összetevők főbb csoportjai

A növények többnyire korlátlan mennyiségben képesek aromás vegyületek szintézisére, melyek leginkább fenolok vagy ezek oxigenizált származékai. A legtöbb másodlagos metabolit, melyekből legalább már 12000-t izoláltak, de ez is még csak 10%-a a becsült értéknek. Sok esetben ezek az anyagok védekezési mechanizmusként szolgálnak a kártevő mikroorganizmusok és rovarok ellen. Néhányuk, például a terpenoidok, adják a növények illatát, mások, a kinonok és tanninok a növényi pigmentekért felelősek. Számos vegyület a növény ízét határozza meg, mint a kapszaicin a paprika csípősségét. És néhányat gyógyszer vegyületként is hasznosítanak.

Számos emberi élettani tevékenységet, mint például a fagocita sejtek stimulálását, gazda-közvetített tumor tevékenységeket, és a széleskörű fertőzés-gátló aktivitást, a tanninoknak tulajdonították. A növényekben lévő tanninok gátolják a rovarok növekedését, és a bendős állatoknál emésztési zavarokat okoznak. Antimikrobiális aktivitása annak köszönhető, hogy inaktiválni képes a mikrobiális kötéseket, enzimeket, a sejtburkok transzport fehérjéit. A tanulmányok szerint a tanninok toxikusak lehetnek fonalas gombákra, élesztőkre és baktériumokra (COWAN, 1999).

A növények illatát adják az úgynevezett quinta essential, vagy illóolaj-frakciók. Ezek az olajok másodlagos metabolitok, melyek izoprén vázra épülő erősen dúsított vegyületek. Ezeknek az úgynevezett terpéneknek az általános kémiai szerkezete $C_{10}H_{16}$. Amikor a vegyületek további elemeket tartalmaznak, általában oxigént akkor nevezik őket terpenoidoknak. A terpének vagy terpenoidok hatásosak a baktériumok, gombák, vírusok és a protozonok ellen. 1997-ben azt írták, hogy az illóolaj-származékok vizsgálata alapján a gombák 60%-át és a baktériumok 30%-át gátolják (CHAURASIA ÉS MTSAL., 1977). A terpének hatásmechanizmusa nem teljesen ismert, de elképzelések vannak, hogy a membrán szétszakításáért a lipofil vegyületek felelősek (COWAN, 1999).

1.2. Esszenciális olajok és más növényi kivonatok antimikrobiális hatása általánosan

Hammer és munkatársai hatalmas számú esszenciális olajat és növényi kivonatot teszteltek különböző mikroorganizmusok ellen, beleértve a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokat és az élesztő gombákat. 52 növényi olaj és kivonat antibakteriális és

antifungális aktivitását vizsgálták, agar diffúziós módszert használva, *C. albicans*, *Staph. aureus* és *E. coli* ellen. A citromfű, az oregánó és a babér az összes organizmust gátolta $\leq 2,0\%$ (v/v) koncentrációnál. Összességében ez a tanulmány alátámasztja, hogy sok esszenciális olaj és növényi kivonat mutat *in vitro* antibakteriális és antifungális aktivitást (HAMMER ÉS MTSAL., 1999).

Hammer és munkatársai a *M. alternifolia* esszenciális olaját használták és megfigyelték a csíratömlő képződésének reverzibilis gátlását a *Candida albicans*-ban, ami az élesztőnek egy patogén faktora. Az olaj magas koncentrációnál teljesen megállította a gombanövekedést, míg alacsonyabb koncentrációnál megengedte a bimbózást. A sejtmembrán befolyásolása látszott a fő hatásnak, valószínűleg a monoterpének olajban mutatott lipofil tulajdonságának van fontos szerepe. Számos tanulmány igazolja a *Melaleuca alternifolia* esszenciális olaj gombaellenes aktivitását, alacsony mérgező képességgel bír a gazdaszervezetre nézve, még akkor is, ha nem mutat jelentősen erős aktivitást (HAMMER ÉS MTSAL., 2000).

Paola és munkatársai 2005-ben az esszenciális olajok és azok főbb komponenseinek *Candida albicans*al szembeni gátlását vizsgálta. 16 kereskedelmi esszenciális olajat és 42 tiszta összetevőt (alkoholok, aldehidek, ketonok, fenolok és szénhidrátok) teszteltek. A tesztelt olajok vizsgálatát gázkromatográfia/tömeg spektroszkópia módszerével végezték el. A fő komponenseket mindegyik esszenciális olajban kimutatták és a legtöbbet közülük teszteltek *Candida albicans*-al szemben. Három aktív vegyület mutatta a legmagasabb aktivitást az élesztővel szemben, MIC=50 ppm-mel. Az aldehidek közül a trans-cinnamaldehyde, a ciklikus monoterpén szénhidrátok közül a β -phellandrene, az alkoholok közül pedig a 1-dekanol. A vizsgálatok alapján a ciklikus monoterpén alkoholok gyenge aktivitást mutattak, az aciklusos monoterpén alkoholok erősebbet, a legaktívabb a vizsgált alkoholok közül a 10-szénatomos nyitott láncú 1-dekanol volt. Számos esszenciális olaj aktív a *C. albicans*-al szemben és számításba veszik a gyógyászatban való lehetséges alkalmazásuk miatt (PAOLA ÉS MTSAL., 2005).

2. A majoránna (*Origanum majorana*) jellemzése, antimikrobiális hatásai

2.1. Rendszertani besorolása:

Ország: Növények (*Plantae*)

Törzs: Zárvatermők (*Magnoliophyta*)

Osztály: Kétszikűek (*Magnoliopsida*)

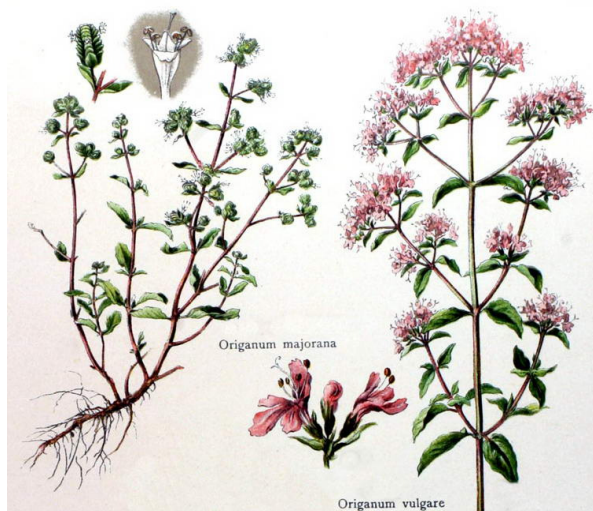
Rend: Ajakosvirágúak (*Lamiales*)

Család: Árvacsalánfélék (*Lamiaceae*)

Nemzetség: *Origanum*

Faj: *O. majorana*

(<http://hu.wikipedia.org/wiki/Majoranna>)



2.2. A növény általános jellemzői

Népies neve: majorána, kerti majoránna, majoranna, pecsenyevirág. A majoránna az árvacsalánfélék családjába tartozó, kiváló aromájú, erősen jellegzetes, kellemes illatú és hűsítő, fűszer- és gyógynövény. A Földközi-tenger partvidékéről, Észak-Afrikából származó növényt az ókorban a boldogság jelképeként tartották számon. (<http://drimmun.com/fuszerek/majoranna.html>).

Aromás, szőrös levelei vannak és kúszó, legyökerező hajtásai. Lila vagy fehér virágai késő nyáron álörvökben nyílnak. A virágzáskor gyűjtött leveléből készül maga az édeskés, csípős fűszer. Teája nyugtató, emésztésjavító hatású, szélszorulásra, fejfájásra, megfázásra, menstruációs görcsökre, herpeszre is ajánlott. A levelei és virágai lepárlásából nyert illóolaj vírusölő antioxidáns, görcsoldó, javítja a vérkeringést, késlelteti a bőr öregedését. Kozmetikumokba, illatszerekbe teszik (http://www.kert.co/egynyari_kerti_novenyek/majoranna).

0,5-1,3% illóolajat tartalmaz, melynek fő komponensei: terpinén, pinén, szabinén, 9-10% cseranyag (elsősorban rozmaringsav), keserűanyag és gyanta. Hatóanyagai könnyebben emészthetővé teszik az ételt. A népi gyógyászatban hasmenés esetén alkalmazták, vérnyomásemelő hatása is ismert (<http://drimmun.com/fuszerek/majoranna.html>).

2.3. *Origanum majorana* komponensei

Parveen és munkatársai a *Saccharomyces cerevisiae* egy monoterpénre adott válaszával foglalkozott. Monoterpenoidokat tartalmazó növényi esszenciális olajokat ősidők óta használják antifungális gyógyszerekként, de a hatásmódjukat molekuláris szinten nem ismerjük. Élesztő-alapú DNS microarrayt használtak, hogy megfigyeljék a környezeti stresszre és kémiai anyagok variációira adott globális válaszokat. Azzal a céllal, hogy megértsék az α -terpinén (egy ciklikus monoterpén) toxicitásának mechanizmusát molekuláris szinten, először, optimalizálták a terpinénnek azt a koncentrációját, ami a növekedést gátolta, körülbelül 50%-nál, mert az erős vagy gyenge gátlás észrevehetetlen reakciókat okozhat. Úgy találták, hogy 0,02% terpinén koncentráció elég ahhoz, hogy hozzávetőlegesen fél-maximális növekedési gátlást fejtsen ki (IC_{50}). Az élesztő sejteket 2 óráig 0,02% terpinénnel kezelték és mind a terpinén-kezelt, mind a kezeletlen sejtekből RNS-t készítettek elő a microarrayhez.

α -Terpinén (1-izopropil-4-metil-1,3-ciklohexadién) egy monociklikus monoterpén a citrom kellemes illatával. Általánosan jelen van a hasznos aromás növények nagyon változatos esszenciális olajaiban, mint a kardamon (*Elletaria cardamomum*), majoranna (*Origanum majorana*) és koriander (*Coriandrum sativum*), valamint a teafa olaja (*Melaleuca alternifolia*) és a pálmárózsa olaja (*Cymbopogon martini*). A népi gyógyászatban évszázadok óta elismerik a növényeket és esszenciális olajokat, mint antimikrobiális hatóanyag. Ezeknek a vegyületeknek az antimikrobiális tulajdonsága nagyrészt a monoterpéneknek, szeszkviterpéneknek és kapcsolódó alkoholoknak vagy más szénhidrogéneknek tulajdonítható. A baktericid és bakteriosztatikus aktivitáson felül a monoterpének a gombás fertőzések kezelésében is használatosak, különösen genitális és orális kandidiázisban, dermatofitózisban, stb. Ezek a tanulmányok mind kimutatták, hogy a monoterpéneket tartalmazó esszenciális olajok aktivitása szaporodásgátló és gombaölő is. A monoterpének (természetes szénhidrogének) és egyéb szintetikus szénhidrogének antimikrobiális aktivitása és toxicitása jól feljegyzett, de kölcsönhatásuk módja a sejtekkel és a toxicitás mechanizmusai nagyrészt ismeretlenek. Számos tanulmány megállapította, hogy mint lipofil hatóanyagok a hatásukat a membrán és membránba ágyazott enzimek szintjén fejtik ki (SIKKEMA ÉS MTSAL., 1994). Újabb eredményeikben leírták, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* teljes gátlása pálmárózsa olajjal történő kezelés után az élesztő sejt membránjában található zsírsavak összetételében történt változásnak köszönhető. A

membrán integritási és permeabilitási barrierjeinek bomlását a teafa olaja okozta, amely antimikrobiális hatással volt a *Candida albicans*ra és különböző baktériumokra. Azonban az élő sejtek válasza ezekre a vegyületekre molekuláris szinten még nem ismert.

A fogékony gének funkcionális kategóriái: úgy találták, hogy az α -terpinén kezelés olyan fehérjék és enzimek kifejeződését indítja el, ami kapcsolatban áll a lipid és zsírsav anyagcserével, a serkentett transzportfolyamatokkal, az aminosav anyagcserével, stb. Ahogy az általánosan használt antifungális gyógyszereknél, itt is a sejtfallal és sejtmembránnal kapcsolatos géntermékek a terpinén fő célpontjai. A represszált gének funkcionális vizsgálata azt mutatta, hogy a „fehérje szintézis”, „szénhidrát anyagcsere” és „transzkripció” kategóriákba tartozó gének gyakoribbak a terpinén-kezelt sejtekben represszáldó gének között.

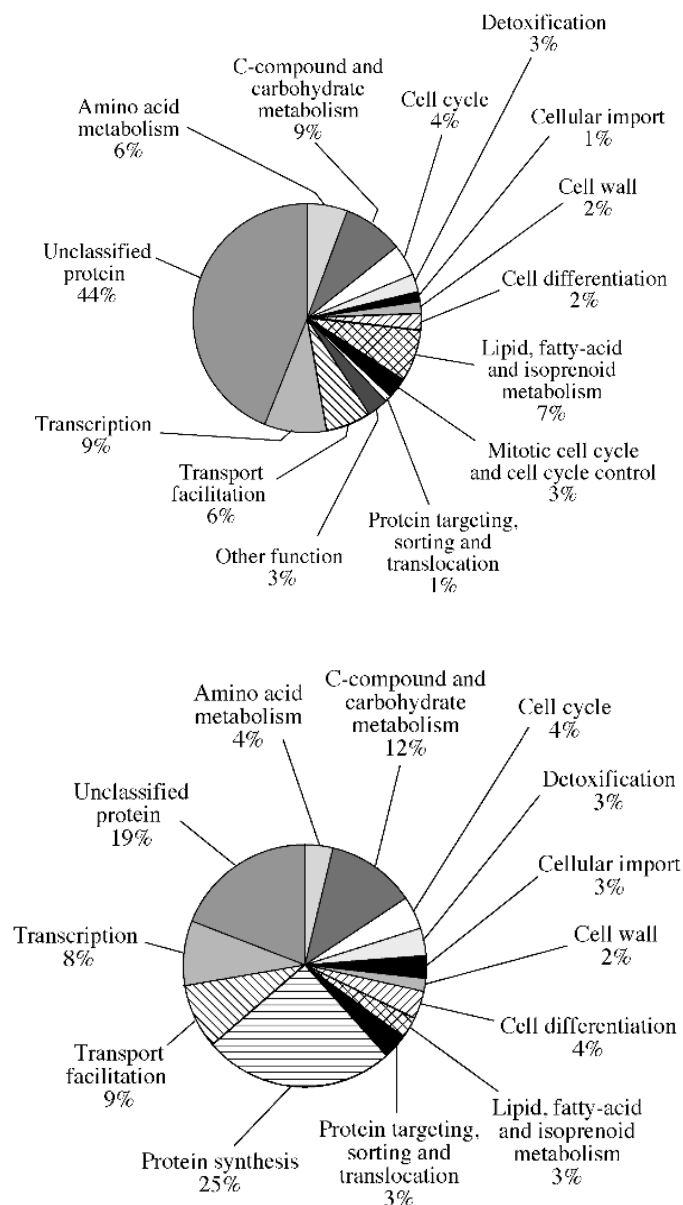
Foszfolipid bioszintézis: Eltekintve az ergosterol bioszintézis út szabályozásától számos más inozitol és lipid bioszintézissel kapcsolatos gén kifejeződése változik terpinén kezelés hatására. A legnagyobb mértékben az *INO1* gén expressziója növekedett, az inozitol a foszfatidilinozitol (PI) prekursora, ami a *S. cerevisiae* egy esszenciális membrán komponense, a celluláris szignál transzdukcióban játszik szerepet. A sejtek fel tudják venni az inozitolt a tápközegből két transzporter (*ITR1* és *ITR2*) expressziója esetén. Továbbá olyan gének expressziója is megnőtt, amelyek a foszfolipid bioszintézis útban a metilációs lépéseket katalizálják.

Sejtfalszerveződéshez kapcsolódó gének: Olyan indukált gének csoportját is megtalálták a terpinén-kezelt sejtekben, amik a sejtfal biogenezishez kapcsolódnak. A *CRH1* expressziója különbözően szabályozott a sejtciklus alatt, egy glükózidáz kódol, ami fontos szerepet játszik a sejtfal szerveződésében és karbantartásában a glükán átalakítása révén. Már ismert, hogy a *GSC1* és a *GSC2* gének fontos szerepet játszanak a glükán szintézisben. A két fehérje génjeinek kódolásában történő mutáció letális, ezért valószínűsíthetően esszenciálisak az élesztő túléléséhez. *GSC2* és *KRE1* transzkripció szintjének emelkedése azt sugallta, hogy a terpinén a sejtfal glükán szintézisét célozza, és ennek következtében megváltoztatja a sejt morfológiáját és integritását. Találtak számos olyan sejtfal mannoprotein-expresszáldó gént, ami jelentősen válaszolt a terpinén-kezelt sejtekben. Néhány a mannoproteinek közül a környezeti stresszhez való adaptálódáshoz fejeződött ki. Az egyik legjobban kifejeződő gén a terpinén-kezelt sejtekben a *DAN1* (delayed anaerobic), ami stresszre adott válasz esetén fejeződik ki, például az anaerobiózis.

Előzetes beszámolók alapján a Cwp1 (sejtfal fő mannoproteinje) expressziója alul-regulált lett az anaerob növekedési körülmények miatt, valószínűleg a terpinén váltotta ki. A kutatás azt mutatja, hogy ezek a foszforilált molekulák intracellulárisan felhalmozódnak *S. cerevisiae*-ben növekedés gátláskor. Kedvezőtlen körülmények között a sejt a foszfatáz család tagjait kódoló gének expresszióját indukálja.

A legtöbb ciklikus szénhidrát nem poláros hidrophil vegyület. A sejt választja ki az anyagcsere során, ezeknek a vegyületeknek oxidálódniuk kell polárosabb vegyületté. Ez az oxidációs reakció elsődlegesen a citokróm P450-es szupercsalád közvetítésével történik, így segít a xenobiotikumok metabolizmusában. A második citokróm P450 gén, a *CYP60*, élesztőben a terpinénnel kezelt sejtekben nagymértékben indukálódott. Elképzelhető, hogy a *CYP60* indukciója a terpinénre, a xenobiotikum rezisztencia egy mechanizmusa. Érdekesképpen, a dohány az ozmotint expresszálja, ami a gombanövekedést gátolja, védelmi mechanizmusként. Korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy a gombák rezisztenssé váltak az ozmotinra, egy gén család (PIR) indukálása miatt, ami a membránba ágyazott Hsp150 stressz fehérjét kódolja. Ezért a *HSP150* expressziójának növekedése a terpinén citotoxicitásával szemben, xenobiotikum rezisztencia egy módjaként funkcionálhat *S. cerevisiae*-ben. Ezen a megfigyelésen alapulva, feltételezhető, hogy a növények terpinént állítanak elő, hogy megvédjék magukat a patogén gombák ellen. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a terpinén vegyületeket xenobiotikumnak tekinthetjük, és válaszként a sejt drog metabolizmussal és detoxifikációval kapcsolatos gének expresszióját indukálja.

Amikor összehasonlították ezen profilokat a kezeletlen kultúra transzkripció profiljaival, kiderült, hogy 793 gén reagált a kezelésre, ebből 435 gén a terpinén kezelésre transzkripció szint növekedésével, és 358 gén az mRNS szint csökkenésével reagált. A válogatott gének microarray eredményeit Northern-blottal ellenőrizték. A *S. cerevisiae* genom szekvenciája már elkészült és a gének majdnem 70%-ának funkciója már ismert, legalább részlegesen. 192 regulátor gén funkciói még ismeretlenek, de a jellemzésük várhatóan fényt fog deríteni a gyógyszer rezisztencia és érzékenység mechanizmusára (PARVEEN ÉS MTSAL, 2004).



1. ábra: Az α -terpinénre érzékeny gének eloszlása funkció szerint csoportosítva. Felül: indukált, alul: represszált gének

A regulátor gének funkcionális vizsgálata azt mutatta, hogy az α -terpinén hatással van az ergoszterin bioszintézisre és a szterol felvételre. Emellett a terpinén toxicitására válaszul a gének transzkripcionális indukciója hatással van a lipid metabolizmusra, a sejtfal struktúrájára és funkciójára, a méregtelenítésre és a celluláris transzportra. Együttvéve, ez a tanulmány kimutatta, hogy az α -terpinén erős antifungális aktivitással rendelkezik és a hatásának módja hasonlít a jelenleg használatos antifungális gyógyszerekhez (PARVEEN ÉS MUNKATÁRSAI, 2004).

Busatta és munkatársai a majoranna olaj hatását vizsgálták kolbászban, mivel az esszenciális olajok napjainkban fokozott figyelmet kapnak mind ipari, mind tudományos körökből a bio fogyasztás iránt való növekvő érdeklődés, valamint a romlandó ételek minőségének és biztonságának biztosítása érdekében szükséges alternatív technikák miatt. Az olaj hathatóságát friss kolbáson tesztelték és érzékelési vizsgálatokat folytattak a különböző olajkoncentrációkkal kezelt terméken. Az esszenciális olaj kromatogramja azt mutatta, hogy a terpinén-4-ol a legfőbb komponens, ezt követi a γ -terpinén, *cis*-szabinén hidrát, α -terpinén, szabinén és α -terpineol. Ezt más irodalmak is megerősítik. Az összes tesztelt baktérium érzékeny a majoranna esszenciális olajra. Még a legkisebb koncentrációban alkalmazott olaj esetén is jelentős csökkenést figyeltek meg a mintában. Ez a gátló hatás valószínűleg a legfőbb komponens, a terpinén-4-ol aktivitásának köszönhető. A baktériumölő hatás magasabb olaj koncentrációnál is megfigyelhető volt, habár, ebben az esetben vele jár az íz módosulása. Talán, a fűszer koncentrációjának csökkenése segíthet, hogy kiegyensúlyozott terméket kapjanak, és kielégítsék a fogyasztók elvárásait antimikrobiális és elfogadhatósági szempontból is (BUSATTA ÉS MTSAL, 2008).

Sellami és munkatársai meghatározták az *O. majorana* L. esszenciális olajának optimális szüretelési idejét a bioaktív vegyületek legmagasabb tartalma alapján. A kinyert esszenciális olajra hatással vannak belső (pl. genetikai tényezők, fejlődési szakasz) és külső paraméterek (pl. klimatikus tényezők és a kinyerés módja). Az esszenciális olaj kémiai összetételére a szüretelési idő van a legjelentősebb hatással. Az *O. majorana* olaj 38 komponensét azonosították a különböző növekedési szakaszokban. A teljes virágzási szakaszban 26 azonosított komponens elérte az összes komponens 94.95%-át. Terpinen-4-ol (29.13%), *cis*-szabinén hidrát (24.66%), γ -terpinene (6.18%), *trans*-szabinén hidrát (5.04%), linalyl acetát (3.09%), bornil acetát (1.97%) és linalool (1.39%). *O. majorana* esszenciális olajnak két fő kemotípusa létezik: az egyik főként monoterpén alkoholokat, a másik fenolokat tartalmaz. Az első kemotípusba a terpinén-4-ol vagy önállóan, vagy más monoterpén alkoholokkal pl. *cis*- és *trans*-szabinén hidráttal együtt alkotják a fő illékony komponenseket. A második kemotípus főleg timol és/vagy karvakrol vegyületeket tartalmaz. Összehasonlítva ezeket az eredményeket az irodalomban szereplő adatokkal, a fiziológiai szakasz szignifikáns hatással bír az esszenciális olaj terméshozamára és összetételére. Luckner szerint, ahogy a növény érése halad előre egy rendezett expressziója mutatkozik a genomnak, bizonyos enzimek vagy enzim csoportok szintetizálódnak vagy aktiválódnak a növény fejlődésének bizonyos stádiumaiban (LUCKNER, 1980). Az

eredmények szerint, az *O. majoranna* föld feletti része a leggazdagabb fenolos savakban és flavonoidokban, ha késő vegetatív, teljes virágzási szakaszban gyűjtjük (SELLAMI ÉS MTSAL, 2009).

Vági és munkatársai megvizsgálták a majoranna kivonat antimikrobiális tulajdonságait a szuperkritikus technika (SFE) és a hagyományos extrakciós technikák összehasonlításával. A majoranna esszenciális olaj fő komponense a terpinén-4-ol volt az alkoholos és a szuperkritikus kivonatban is. Megközelítőleg ugyanolyan értéket figyeltek meg vízdesztilláció és SFE (szuperkritikus folyadék extrakció) alkalmazásakor. A többi jellegzetes vegyületet is meghatározták: γ -terpinén, linalool, α -terpineol, α -terpinolén, α -terpinén, β -kariofillén és spatulenol. *cis*-Szabinén hidrát csak a szuperkritikus kivonatban volt megtalálható kis mennyiségben (1,1%). Az etanolos és a szuperkritikus kivonatok is hasonló összetételt mutattak, habár az SFE kivonatban a terpinén-4-ol koncentrációja majdnem kétszer olyan magas volt, mint az etanolos kivonatban. Az SFE kivonatban kis mennyiségű (1,1%) linaloolt mutattak ki, míg ennek a mennyisége kb. 6% volt az oldószeres kivonatban és 12% az esszenciális olajban. Általában az SFE kivonat szignifikánsan erősebb gátló aktivitást mutat a tesztelt baktérium fajok ellen, mint a Soxhlet-kivonat.

Az eredmények alapján a majoranna gyógynövény majdnem összes biológiailag aktív vegyülete hatékonyan kivonható SFE-vel. A kinyert kivonat tartalmazza a gyógynövény jellemző komponenseit, beleértve a fő illékony vegyületeit, amik az illatért és ízért felelősek. A terpenoidok erős antimikrobiális aktivitással bírnak. Deans és Svoboda feljegyezte, hogy a majoranna esszenciális olajának erősebb antifungális aktivitása van, mint antibakteriális, az esszenciális olaj 1 μ l/ml-es koncentrációja gátolta az *A. niger* és *T. viridae* tesztelt gombákat (DEANS ÉS SVOBODA, 1990). Különböző ételekbe, kozmetikai és gyógyszerészeti termékekbe való keverése ígéretes természetes aromája, színe és antimikrobiális tulajdonsága miatt. A megvizsgált kivonatoknak lehet, hogy szerepük van a fonalas gombák és baktériumok elleni védekezésben, különösen az SFE kivonatnak, ami képes elnyomni a bakteriális növekedést ételben vagy kozmetikumban. További kísérletek szükségesek a szuperkritikus CO₂ kivonat élelmiszerekben, kozmetikumokban és/vagy gyógyszerészeti termékekben való alkalmazásának bevezetéséhez (VÁGI ÉS MTSAL, 2005).

Összetétel	t_R (min) ^a	TIC t_R (min) ^b	Esszenciális olaj	Soxh. Alk.	SFE
α -Pinene	4.14		5.9	0.3	
Camphene	4.58		5.8		
β -Myrcene	4.91		0.3		
β -Pinene	5.33		2.2	0.4	
α -Terpinene	6.24	10.61	3.2	2.2	2.7
<i>p</i> -Cymol	6.59		9.8	0.6	1.8
γ -Terpinene	7.18	12.44	14.0	4.1	5.3
Terpenyl-acetate	8.62		0.7		
α -Terpinolene	8.77	13.52	1.8	2.5	1.1
Linalool	9.70		12.1	6.0	1.1
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	9.91	18.86			1.1
Terpenyl-ester	10.54	21.08		1.5	0.9
Terpinen-4-ol	11.25	23.21	30.3	16.6	30.6
α -Terpineol	11.59	25.85	4.4	4.2	4.2
β -Caryophyllene	14.44	23.41	1.8	2.0	2.2
Neophytadiene	18.29	32.21		1.2	1.9
Spathulenol	24.28	37.21		9.9	9.9
Not identified	27.68	47.61		29.4	25.4

1. Táblázat: majoranna esszenciális olaj összetétele, etanolos kivonat és szuperkritikus folyadék kivonat (csúcs alatti terület %, GC és GC-MS módszerrel vizsgálva)

^a t_R a retenciós idő a GC módszertől függően (VÁGI ÉS MTSAL., 2005).

^b TIC t_R a retenciós idő a GC-MS módszer teljes ion kromatogramjáról

3. Célkitűzés

A természetes gyógymódok iránti érdeklődés újjáéledése, a gombaellenes vegyületekkel szemben felmerülő rezisztencia növekedése és a fogyasztók növekvő igénye a hatásos, biztonságos, alacsony toxicitású, természetes termékek iránt arra vezet, hogy hagyományos gyógymódok és természetes termékek között keressünk gyógyászati alternatívákat. Ez a növényi olajok és kivonatok nagy mennyiségi adatait igényli.

A növényi olajok és kivonatok antimikrobiális aktivitása számos alkalmazás alapját képezi, beleértve a nyers és feldolgozott élelmiszerek konzerválását, a gyógyszerészetet, az alternatív gyógyászatot és a természetes terápiákat.

Az esszenciális olajok vagy azok néhány összetevője hasznosak lehetnek a gombás fertőzések orvosi kezelésében, biológiai aktivitásának módját fontos megérteni a humán egészségügyben, mezőgazdaságban és természetben való alkalmazása miatt is.

Célul tűztük ki a majoranna olaj hatásának vizsgálatát a *Candida albicans* 33 erg⁺ törzsre nézve. Ennek érdekében a következő vizsgálatokat terveztük elvégezni:

- A *C. albicans* 33 erg⁺ törzs szaporodási görbe felvétele, generációs idő meghatározása,
- A majoranna olaj hatása a *C. albicans* szaporodására,
- A majoranna olaj hatása egy órás kezelés után az élesztő élő sejtszámára,
- Minimális gátló koncentráció meghatározása mikroplate módszerrel a majoranna olajra, és az olaj egyik fontos összetevőjére a terpinén-4-olra, valamint két fontos antifungális anyagra, az amphotericin B-vel és a flukonazollal szemben,
- Szinergista vagy antagonista kölcsönhatás kimutatása kombinált kezeléssel a majoranna olaj, ill. az amphotericin B, valamint a terpinén-4-ol és az amphotericin B között mikrodilúciós módszer segítségével,
- Kezelés hatására a sejtből kiáramló 260 nm-en abszorbeáló anyagok mérése spektrofotométerrel,
- valamint a majoranna olaj teljes antioxidáns kapacitásának mérése ABTS^{•+} gyökkel.

4. Anyag és módszer

4.1. Mikroorganizmus

Candida albicans 33 erg⁺ ATCC 44829

4.2. Anyagok

Név	Moláris tömeg	Gyártó/Forgalmazó
ABTS	548,7	Sigma
Adenin	135,13	Sigma
Agar		Fluka
Ammónium-szulfát (NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	Reanal
Amphotericin B		AppliChem
D-Biotin	244,32	Reanal
Dimetil-szulfoxid (DMSO)	78,13	Chemolab
Élesztő kivonat		Merck/Oxoid
Etanol	46	
Flukonazol	306,27	Sigma
Glükóz	180,16	Sigma
Kálium-perszulfát (K ₂ O ₈ S ₂)	270,3	Sigma
KH ₂ PO ₄	136,09	Reanal
Magnézium-szulfát MgSO ₄ *7H ₂ O	74,56	Reanal
Majoranna		Aromax zRt.
MOPS	209,26	Sigma
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	177,99	Chemolab
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	156,01	Reanal
Nátrium-klorid (NaCl)	58,44	Reanal/Interkémia Rt.
RPMI-1640 medium		Sigma-Alrich
Terpinén-4-ol		Sigma
Thiamine hydrochloride		Sigma
Trolox	250,3	Calbiochem

2. táblázat: Felhasznált anyagok a kísérletek során

4.3. Táptalajok

YG komplett táptalaj:

Élesztő kivonat (0,5%)	5 g
glükóz (1%)	10 g
adenin (25 µg/ml)	0,025 g
agar (2%)	20 g
desztillált víz	1000 ml

Minimál tápoldat (MM):

Glükóz (1%)	10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0,5%)	5 g
KH ₂ PO ₄ (0,1%)	1 g
MgSO ₄ *7H ₂ O (0,05%)	0,5 g
adenin (25 µg/ml)	0,025 g
biotin (2 µg/ml)	0,002 g
tiamin (400 µg/ml)	0,4 g
desztillált víz	1000 ml
pH: 6,0	

RPMI-1640 tápoldat:

RPMI-1640 (1,05%)	10,5 g
MOPS (3,45%)	34,5 g
glükóz (1,8%)	18 g
adenin (0,0025%)	25 mg
biotin (0,0002%)	2 mg
tiamin (0,04%)	400 mg

desztillált víz	1000 ml
pH: 7,0	

4.4. Oldatok

Fiziológiás sóoldat:

NaCl	8,5 g
Desztillált víz	1000 ml

Sörensen foszfát puffer: pH 6,5

A oldat: 0,2 M dinátrium-hidrogén foszfát törzsoldat:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	35,61 g
Desztillált víz	1000 ml

B oldat: 0,2 M nátrium-dihidrogén foszfát törzsoldat:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	31,21 g
Desztillált víz	1000 ml

pH 6,5-ös pufferhez:

A oldat	15,75 ml
B oldat	34,25 ml

0,1 M nátrium-foszfát puffer: pH 7,4 4°C

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8,98 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	7,8005 g
Desztillált víz	500 ml

ABTS törzsoldat:

0,1 M nátrium-foszfát puffer pufferben oldani	7 ml
---	------

ABTS	19,5 mg
Kálium-perszulfát ($K_2O_8S_2$)	3,3 mg

Beoldás után szobahőmérsékleten sötétben tárolni 12-16 órát, majd kiporciózni 1 ml-es adagokba és -20°C-on tárolni.

Trolox törzsoldat:

1 mM-os standard, mindig frissen készíteni, 96%-os etanolban oldani

Trolox 10 mM	2,503 mg
--------------	----------

Etanol	1 ml
--------	------

hígítani 10x-re

4.5. Módszerek

4.5.1. Mikroorganizmusok fenntartása

A *Candida. albicans* törzset YG táptalaj felületén ferde tenyészet formájában tartottuk fenn, 7 naponta friss tenyészetet készítettünk. A rázatás 30 °C fokon történt, 150 fordulat/perc fordulatszám. A tenyészeteket 2-8°C-os hűtőben tartottuk.

4.5.2. *Candida albicans* 33erg⁺ törzs szaporodási görbéjének felvétele

24 órás állótenyészetet készítettünk *Candida albicans* 33 erg⁺ törzsből. Egy 100 ml-es lombikba 20 ml MM tápoldatot öntöttünk és annyit mértünk bele az álló tenyészetből, hogy 595 nm-en a tenyészet optikai denzitása (OD) 0,05 legyen. Két párhuzamos lombikot indítottunk. Sejtszámolást végeztünk Bürker-kamrával, majd rázógépbbe tettük, 30°C-on, 150 rpm-en rázattuk. Meghatározott időpontokban mintát vettünk a tenyészetből steril pipettával. Az össz-sejtszámot Bürker-kamrával számoltuk, ill. a tenyészetek optikai denzitásának változását vizsgáltuk spektrofotométer segítségével. A szaporodási görbe adataiból kiszámítottuk a törzs generációs idejét a következő módon:

$$G = \frac{\log(2^{t_2-t_1})}{\log y / x}$$

G: generációs idő (h)

y: sejtszám a t_2 időpontban

x: sejtszám a t_1 időpontban

4.5.3. *Candida albicans* 33erg⁺ törzs szaporodásgátlásának vizsgálata majoranna olajjal

24 órás állótenyészetet készítettünk, 1 kacsnyi élesztőt tettünk 10 ml tápoldatba, 24 órára termosztátba helyeztük. Másnap 250 ml-es lombikba 120 ml MM tápoldatot öntöttünk, az OD-t 0,1-re állítottuk be. 10-10 ml-t átmértünk 12 db 25 ml-es lombikba. 5 ml tápoldatban vortexeltük a különböző mennyiségű olajokat, hozzáadtuk a tenyészetekhez, 5 ml tápoldattal kiöblítettük a félkémcsöveket és ezt is hozzáadtuk. Így kaptunk 20 ml 0,05-ös optikai denzitású oldatokat. Az alkalmazott olaj koncentrációk 0,25; 0,375; 0,5; 0,75 és 1 $\mu\text{l/ml}$ voltak. A lombikokat 30°C-on, 150 rpm-en ráztattuk. Meghatározott időközönként lemértük a tenyészetek OD-ját. Az eredmények alapján diagramot készítettünk.

4.5.4. *Candida albicans* 33erg⁺ törzs élő sejtszámának meghatározása

A kísérletet megelőző este felraktuk 100 ml 0,05 OD₅₉₅-ra beállított tenyészetet rázatni. Ez másnapra középlogaritmusos fázisba került (OD=1,0-1,2). Az így nyert tenyészetet öt percig 3000 fordulat/perc fordulatszámon centrifugáltuk, fiziológias sóoldatban mostuk, végül 40 cm³ tápoldatban felvettük a sejteket és 10⁷ sejt/ml-re állítottuk be a tenyészetet, ami 0,65-os OD₅₉₅-nek felel meg.

Előkészítettük a feliratozott YG táptalajt tartalmazó Petri-csészéket és a hígításokhoz szükséges 900 μl fiz. só oldatokat is bemértük a félkémcsövekbe. Az Erlenmeyer lombikokba bemértünk 10 ml MM tápoldatot, 4 félkémcsőben 5 ml tápoldatot és a majoranna olajat alaposan vortexeltük, a lombikokba öntöttük, 3 ml tápoldattal kiöblítettük és ezt is hozzáadtuk. Így kaptunk 0,25; 0,5; 0,75 és 1 $\mu\text{l/ml}$ -es oldatokat az egyes lombikokban. 0. percnél 2 ml sejtszuszpenziót pipettáztunk hozzá, azonnal kivettünk 100 μl -t és a félkémcsövekben 100-szorosára hígítottuk, a véghígításból pedig 50 μl -t szélesztettünk 3-3 Petri-csészére, 2 napos inkubálás után leszámoltuk a telepeket.

4.5.5. Minimális gátló koncentráció meghatározása mikroplate módszerrel

A kísérlethez 3 napos *Candida albicans* 33 erg⁺ törzs ferde tenyészetét használtuk. 4 ml RPMI 1640-es tápoldatba kacs segítségével annyi élesztőt helyeztünk, hogy az OD-ja 0,65-ös legyen, ez 10⁷ sejt/ml-nek felel meg előzetes számítások alapján. Ezt a szuszpenziót 2*10³ sejt/ml-re hígítottuk.

Flukonazol hígítása: 3,2 mg flukonazolt 4 ml fiz. sóban feloldottuk, egy tízszeres, majd ebből 6 felező hígítást készítettünk Koncentrációk: 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 és 0,0625 µg/ml.

Majoranna olaj hígítása: 400 µl olajat 600 µl DMSO-ban felvortexeltünk, ebből egy tízszeres és egy ötszörös hígítást készítettünk, ez a legnagyobb koncentráció. A 400 µl/ml-es oldatból 6 felező, majd ezekből 6 tízszeres és 6 ötszörös hígítást készítettünk. A koncentrációk: 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 és 0,0625 µl/ml.

Terpinén-4-ol hígítása a majorannáéval egyezik meg.

Amphotericin B hígítása: 2 mg amphotericin B-t feloldottuk 5 ml DMSO-ban és ugyanúgy hígítottuk, mint a majorannát.

A DMSO-ban történő hígításra a jobb oldódás és pontosabb hígítás érdekében volt szükség. Amit úgy oldottunk meg, hogy minden lyuk 1% DMSO-t tartalmazzon. A kontrollba is 1% DMSO került. A vak 200 µl RPMI-1640 tápoldat volt. 100 µl sejtsuszpenzió és 100 µl antifungális szer került a lyukakba. A vizsgálatok végzése 3 párhuzamosban történt.

A microplateket 30°C-on inkubáltuk 2 napig és mikroplate leolvasóval értékeltük ki, átlagolás, ill. a háttér abszorbancia levonása után az a koncentráció lett a MIC, aminek a növekedése a kontrollhoz viszonyítva csak 20% alatt volt.

4.5.6. Majoranna olaj, terpinén-4-ol ill. timol és amphotericin B esetleges szinergizmusának kimutatása mikrodilúciós módszer segítségével

A sejtsuszpenzió készítése, a majoranna, a terpinén-4-ol és az Amphotericin B hígítása a 4.5.5.-ös módszer alapján készült. Párhuzamosan 3 db 96 lyukú mikrotiter lemezen végeztük a kísérletet. A tenyésztőközeg szintén RPMI 1640 tápoldat (pH7) volt.

A kombinált kezelésnél 50 µl olajat ill. terpinén-4-olt, és 50 µl Amhotericin-B-t pipettáztunk a lyukakba és 100 µl sejtszuspenziót. A microplateket 30°C-on inkubáltuk 2 napig és mikroplate leolvasóval értékeltük ki, átlagolás, ill. a háttér abszorbancia levonása után a kapott abszorbancia viszonyítása a növekedési kontrollhoz (100%). A sztatinok és az antifungális szerek közötti interakció (IR) kiszámítása az Abbott formula alapján történt: $IR = I_{\text{observed}}/I_{\text{expected}}$

$I_{\text{expected}} = X + Y - (XY/100)$, ahol X és Y a külön-külön okozott gátlásszázalék

$0,5 < IR < 1,5$ additív hatás

$IR > 1,5$ szinergizmus

$IR < 0,5$ antagonizmus

4.5.7. Az olaj hatására a sejtekből kiáramló 260 nm-en abszorbeáló anyagok mérése spektrofotométerrel

Középlogaritmusos tenyészetet centrifugáltuk 5 percig 3000 g-n, fiz. sóval mostuk, 50 ml Sörensen foszfát pufferben felvettük és $2 \cdot 10^7$ sejt/ml sejtszámú szuszpenziót készítettünk. Különböző mennyiségű majoranna olajat adtunk hozzá, így kaptunk 20 ml 10^7 sejt/ml sejtszámú szuszpenziót. 30 percenként 1-1 ml mintát vettünk eppendorf csövekbe, 10000 g-n centrifugáltuk, megmértük a felülúszó abszorbanciáját 260 nm-en, így megkaptuk a sejtmembránon átszivárgó kis molekulású anyagok mennyiségét. Az üledéket 100 °C-os desztillált vízzel felszuszpendáltuk és fél óráig 100 °C-on inkubáltuk, majd ismét centrifugáltuk és mértük a felülúszó abszorbanciáját. Így a sejten maradt 260 nm-en abszorbeálódó anyagok mennyiségét kaptuk meg.

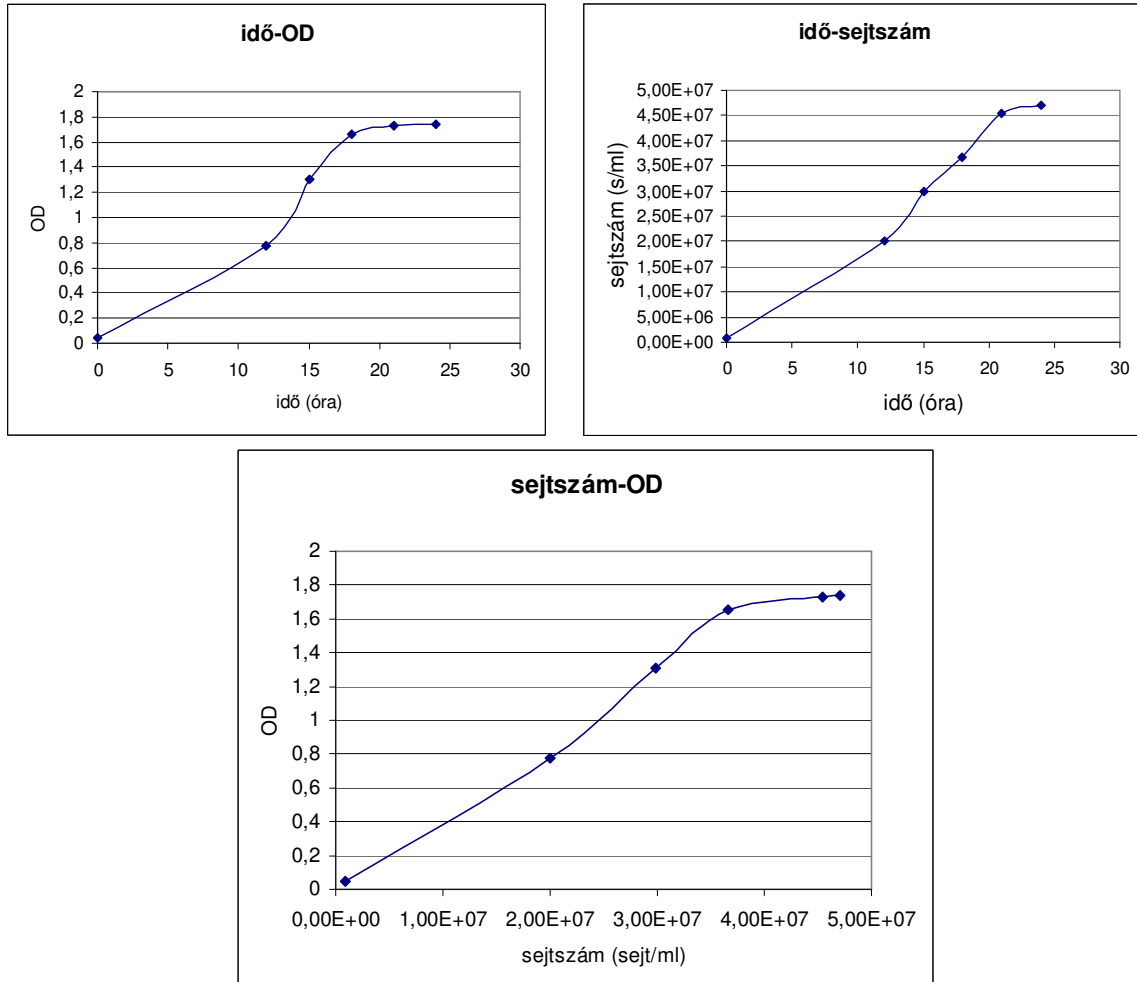
4.5.8. A majoranna olaj teljes antioxidáns kapacitásának mérése ABTS^{•+} módszerrel

0,1 M nátrium-foszfát pufferben ABTS^{•+} törzsoldatot és 1 mM-os Trolox törzsoldatot készítettünk. Méréskor *a* oldat készítéséhez 50 ml 0,1 M nátrium-foszfát pufferhez annyi ABTS törzsoldatot adunk, hogy az optikai denzitása 414 nm-en 1, 000-1,03 között legyen. Ez lesz az A_0 értéke. Trolox standard készítéséhez 5-10-15 µl trolox törzsoldatot adunk 995-990-985 µl *a* oldathoz. Gyorsan összekeverjük és 10 s után mérjük az OD-t, ez lesz A_1 érték. $\Delta A = A_0 - A_1$ -et ábrázoljuk és kalibrációs egyenest veszünk fel.

Különböző koncentrációjú majoranna olajjal és etanollal is elvégezzük a mérést 10 s és 3 perc után. Majd a kapott egyenlet segítségével és hígítás mértékével beszorozzuk az abszorbancia változást.

5. Eredmények

5.1. *Candida albicans* 33erg⁺ törzs szaporodási görbéjének felvétele



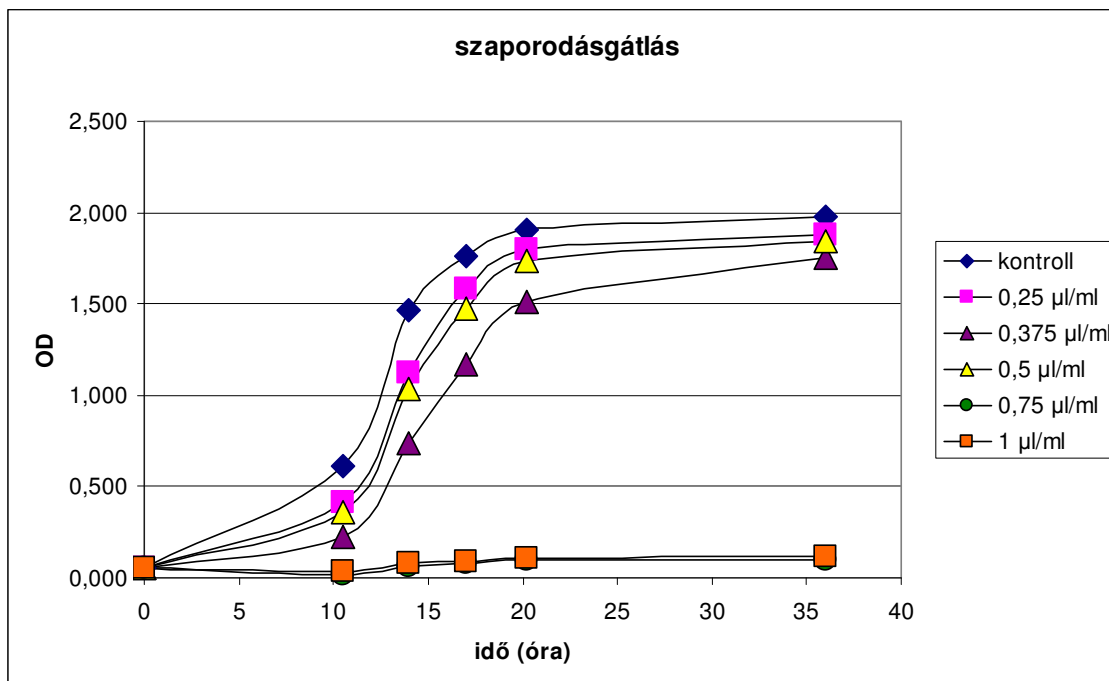
**2. ábra: *Candida albicans* 33 erg⁺ törzs szaporodási görbéi
24 órás megfigyelés**

Az össz-sejtszámot Bürker-kamra segítségével határoztuk meg, majd az így kapott sejtszámot, ill. az optikai denzitást ábrázoltuk grafikusán az idő függvényében. Majd meghatároztuk a tenyészet generációs idejét, ami 2,69 óra.

A közép logaritmikus időnek a szaporodási görbe alapján a 14. órát vettük.

5.2. *Candida albicans* 33erg⁺ törzs szaporodásgátlásának vizsgálata majoranna olajjal

A mért adatokat a Függelékben található 9. táblázat foglalja magába.

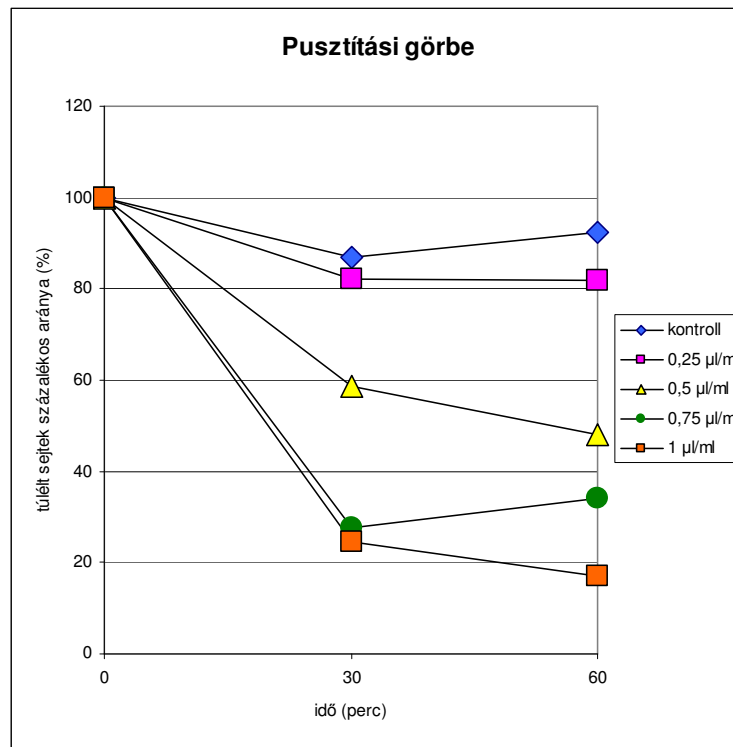


3. ábra: *Candida albicans* 33 erg⁺ törzs szaporodásgátlásának vizsgálata majoranna olajjal, 36 órás kezelés

A diagramról jól látható, hogy a 0,25; 0,375 és 0,5 µl/ml-es olajkoncentráció a kontrollhoz képest kis mértékben gátolta a *Candida albicans* szaporodását, 0,75 és 1 µl/ml-es pedig teljesen gátolta.

5.3. *Candida albicans* 33 erg⁺ törzs élő sejtszámának meghatározása

A mért adatokat a Függelékben található 10. és 11. táblázat foglalja magába.



4. ábra: *Candida albicans* 33 erg⁺ törzs pusztítási görbéje, 1 órás kezelés majoranna olajjal, 30 percenkénti mintavétel

A leszámolt Petri-csészéken lévő telepszámok nagy szórást mutatnak, ezért átlagoltuk az adatokat. A 0. percél kapott telepszámokat vettük 100%-nak, a többi időpontban kapott telepszámot elosztottuk a 0. perc értékével, így azokat is százalékban kaptuk meg. A diagram azt mutatja, hogy minden alkalmazott koncentráció telepszám csökkenést okozott a kontrollhoz képest. A 0,25 µl/ml-es koncentráció 80% közeli sejtpusztulást okozott, ezt határoztuk meg szubinhibítori koncentrációnak a későbbi kísérletek elvégzéséhez. A legnagyobb, 1 µl/ml-es koncentráció 60 perc elteltével már kevesebb, mint 20%-ra csökkentette az élő sejtszámot.

5.4. Minimális gátló koncentráció meghatározása mikroplate módszerrel

konc. (µl/ml)	majoranna			átlag	konc. (µl/ml)	terpinén-4-ol			átlag
K	0,881	0,874	0,880	0,878	K	0,952	0,921	0,942	0,938
0,125	0,733	0,724	0,781	0,746	0,25	0,746	0,683	0,809	0,746
0,25	0,629	0,771	0,799	0,733	0,5	0,709	0,682	0,730	0,707
0,5	0,560	0,657	0,719	0,645	1	0,828	0,831	0,818	0,826
1	0,394	0,468	0,608	0,490	2	0,116	0,033	0,267	0,139
2	0,057	0,050	0,054	0,054	4	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,061	0,057	0,054	0,057	8	0,001	0,002	0,001	0,001
8l	0,047	0,046	0,045	0,046	16	0,002	0,009	0,011	0,007

3. táblázat: A majoranna olaj és terpinén-4-ol minimális gátló koncentrációjának meghatározása

A majoranna olajnak és a terpinén-4-olnak is 2 µl/ml a minimális gátló koncentrációja.

konc (µg/ml)	amphotericin B			átlag	konc (µg/ml)	flukonazol			átlag
0,0625	0,755	0,848	0,883	0,829	0,0625	0,862	0,892	0,905	0,886
0,125	0,214	0,402	0,547	0,388	0,125	0,813	0,806	0,824	0,814
0,25	0,008	0,011	0,027	0,015	0,25	0,813	0,824	0,829	0,822
0,5	0,006	0,008	0,006	0,007	0,5	0,718	0,737	0,676	0,710
1	0,001	0,003	0,004	0,003	1	0,134	0,136	0,208	0,159
2	0,007	0,004	0,002	0,004	2	0,002	0,004	0,009	0,005
4	0,005	0,005	0,009	0,006	4	0,008	0,007	0,008	0,008

4. táblázat: Amphotericin B és Flukonazol minimális gátló koncentrációjának meghatározása

Az amphotericin B-nek 0,25 µg/ml és a flukonazolnak 2 µg/ml a minimális gátló koncentrációja.

5.5. Majoranna olaj, terpinén-4-ol ill. timol és az amphotericin B esetleges szinergizmusának kimutatása mikrodilúciós módszer segítségével

Az optikai denzitás értékeket, amikből az interakció értékek kerültek meghatározásra a Függelékben található 12., 13., és 14. táblázat tartalmazza.

	Amphotericin B (µg/ml)									
Majoranna (µl/ml)	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	0,008
8	0,013	0,091	0,036	0,038	0,005	0,023	0,002	0,016	0,020	0,027
4	0,007	0,000	0,001	0,000	0,003	0,015	0,092	0,132	0,146	0,286
2	0,011	0,003	0,002	0,001	0,023	0,078	0,217	0,345	0,486	0,586
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,079	0,253	0,506	0,741	0,770
0,5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,062	0,233	0,634	0,916	0,861
0,25	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,027	0,181	0,643	0,989	1,000
0,125	0,003	0,008	0,000	0,000	0,002	0,022	0,173	0,685	1,021	1,022

5. táblázat: Majoranna olaj és Amphotericin B kombinált kezelés eredményei, az Abott-formula alapján kiszámolt interakció értékek

	Amphotericin B (µg/ml)									
Terpinén-4-ol (µl/ml)	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	0,008
8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,196	0,000	0,448	0,000	0,448	0,014	0,034	0,006	0,002	0,002
2	0,017	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,014	0,002	0,029	0,074
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,102	0,256	0,302	0,409	0,472	0,728
0,5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,073	0,414	0,579	0,836	0,873	0,903
0,25	0,000	0,000	0,000	0,000	0,338	0,310	0,456	0,877	0,964	0,933
0,125	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,262	0,305	0,946	0,949	0,979

6. táblázat: terpinén-4-ol és amphotericin B kombinált kezelés eredményei, az Abott-formula alapján kiszámolt interakció értékek

	Amphotericin B (µg/ml)									
Timol (µg/ml)	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	0,008
100	0,006	0,005	0,003	0,001	0,000	0,030	0,063	0,116	0,170	0,260
50	0,005	0,000	0,000	0,000	0,072	0,330	0,342	0,380	0,390	0,397
25	0,005	0,001	0,002	0,014	0,095	0,445	0,447	0,482	0,493	0,491
12,5	0,000	0,000	0,000	0,006	0,126	0,465	0,481	0,494	0,485	0,499
6,25	0,000	0,000	0,000	0,005	0,190	0,494	0,495	0,522	0,507	0,518
3,125	0,034	0,000	0,000	0,017	0,242	0,494	0,494	0,501	0,508	0,500
1,5625	0,023	0,004	0,005	0,023	0,245	0,494	0,495	0,482	0,503	0,496

7. táblázat: Timol és Amphotericin B kombinált kezelés eredményei, az Abott-formula alapján kiszámolt interakció értékek

A késsel jelölt értékek additív hatást, a 0,5 alatti értékek antagonizmust jelentenek. Szinergizmust nem tudtunk kimutatni.

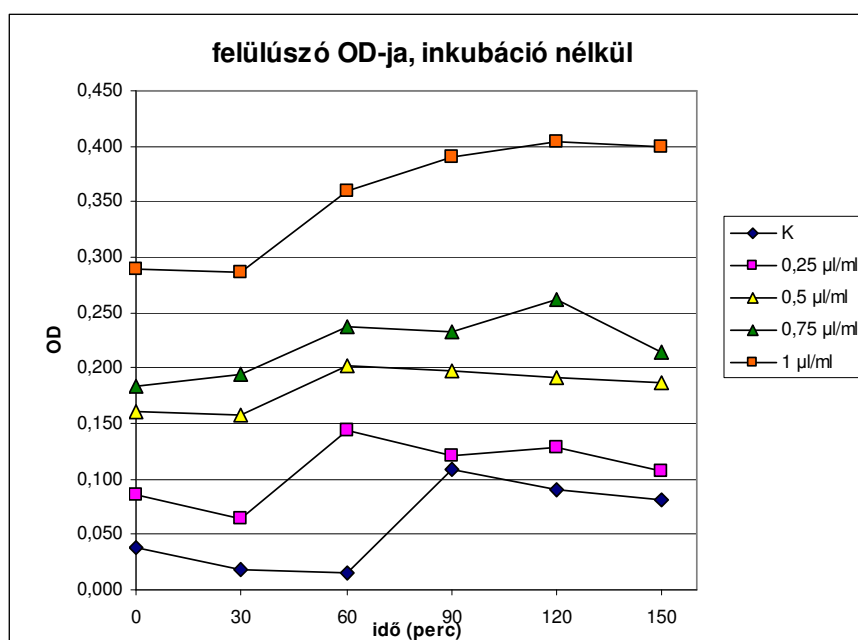
$0,5 < IR < 1,5$ additív hatás

$IR > 1,5$ szinergizmus

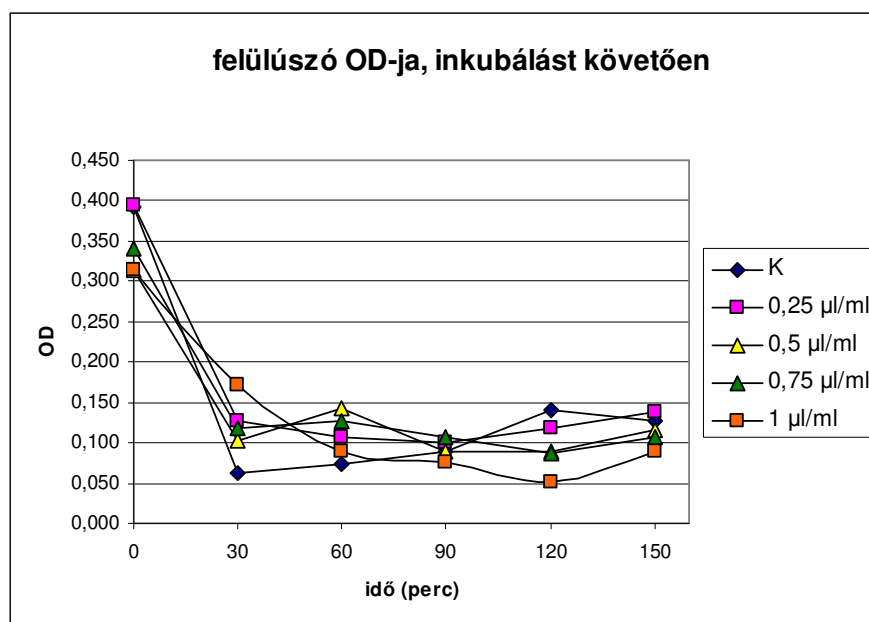
$IR < 0,5$ antagonizmus

5.6. A sejtől kiáramló 260 nm-en abszorbeáló anyagok mérése spektrofotométerrel

A mért optikai denzitás értékek a Függelékben található 15. és 16. táblázatban találhatók.



5. ábra: A pufferben megjelenő kis molekulású anyagcseretermékek mennyisége a kezelés hatására



6. ábra: A pufferben megjelenő kis molekulású anyagcseretermékek mennyisége az inkubálás hatására

Minél magasabb koncentrációjú majoranna olajjal kezeltük a sejteket, annál magasabb volt a kiáramló anyagcseretermékek mennyisége. Ez bizonyítja, hogy az olaj valószínűleg kölcsönhatásba lép a plazmamembránnal és részben átjárhatóvá teszi azt.

5.7. Teljes antioxidáns kapacitás mérése ABTS^{•+} gyökkel

Anyagok	TAC	
	ABTS ^{•+} módszer (mmol trolox Eq/L)	
<i>Origanum majorana</i>	TAC _{3min}	367,168 ± 27,2

8. táblázat: A majoranna olaj teljes antioxidáns kapacitásának mérése ABTS^{•+} módszerrel

A majoranna olaj teljes antioxidáns kapacitása 367,168 ± 27,2 mmol trolox/L egyenértékű. Az olaj tehát annak ellenére, hogy toxikus hatással rendelkezik, rendelkezik szabad gyök fogó képességgel is. Ez nem teljesen meglepő, mivel az olajban sok alkohol típusú molekula van, amelyek OH csoportja viszonylag könnyen leadhatja az elektronját egy szabad gyöknek.

6. Összefoglalás

Az eredmények alátámasztják azt az elképzelést, hogy az esszenciális olajok vagy azok néhány összetevője hasznosak lehetnek a gombás fertőzések orvosi kezelésében. Néhány közülük hatásos alternatívát jelent vagy szintetikus vegyületeket pótol a kémiai iparban, anélkül, hogy másodlagos hatásokat mutatna. Az eredmények segítenek az optimális koncentráció meghatározásában klinikai alkalmazásokhoz.

A szaporodás gátlásának vizsgálata során kapott eredmények szerint a 0,25; 0,375 és 0,5 $\mu\text{l/ml}$ -es koncentrációja a majoranna olajnak már a kontrollhoz képest is gátolta kis mértékben a *Candida albicans* szaporodását, 0,75 és 1 $\mu\text{l/ml}$ -es koncentráció teljes gátlást mutatott.

Élő sejtszám meghatározás során 1 $\mu\text{l/ml}$ -es koncentrációja az olajnak 60 perc elteltével már több mint 20%-os csökkenést idézett elő a sejtszámban. A 0,25 $\mu\text{l/ml}$ –es koncentráció 80% közeli sejtpusztulást okozott, ezt határoztuk meg szubinhibítori koncentrációnak a későbbi kísérletek elvégzéséhez.

Kísérleteink során meghatározásra kerültek minimális gátló koncentrációk. A majoranna olaj 2 $\mu\text{l/ml}$, a terpinén-4-ol szintén 2 $\mu\text{l/ml}$, a flukonazol 2 $\mu\text{g/ml}$ és az amphotericin B 0,25 $\mu\text{g/ml}$ minimális gátló koncentrációval rendelkezik *Candida albicans* 33 erg⁺ törzsön vizsgálva.

Az eddigi kísérletek során sajnos szinergizmust nem tudtunk kimutatni az amphotericin B, az olaj és a terpinén-4-ol között, de a kísérleteinket ez irányban tovább folytatjuk az olaj egyéb komponenseivel és antibiotikumokkal.

A majoranna olaj rendelkezik antioxidáns kapacitással, a troloxnál természetesen gyengébb a hatása és lassúbb is a folyamat.

Azt tapasztaltuk, hogy az olaj hatására a membrán permeabilitása nő, ezt bizonyítja a pufferben megjelenő 260 nm-en abszorbeáló aminosavak és nukleinsavak mennyisége a kezelést követően. A citoplazma membrán áteresztő képességének a megváltozása a majoranna olaj által kiváltott membránszerkezet változására enged következtetni. Ezért a továbbiakban vizsgálni kívánjuk a majoranna olajnak és a hatásosnak bizonyuló olajkomponenseknek elektron paramágneses rezonancia (EPR) spektroszkópiával a *C. albicans* 33erg⁺ plazmamembránjára kifejtett hatását. Az EPR spektroszkópia az egyik

legjobb eszköz a plazmamembrán fluiditásváltozásának a tanulmányozására, ennek ellenére nem végeztek ilyen irányú kísérleteket.

A majoranna olaj pontos összetételének a vizsgálata folyamatban van.

A leghatásosabbnak kimutatott komponensekkel humán sejtekkel tervezünk végrehajtani citotoxicitási és genotoxicitási kísérletet, így ellenőrizve, hogy a komponens hatásos az élesztőgombákkal szemben, de nem/vagy kevésbé toxikus a humán sejtekre nézve.

Meglátásunk szerint az olajkomponenseknek fontos szerepe lehet a későbbiekben, a humán gyógyászatban az *Candidák* okozta szisztémás mikózisok kezelésében, segítve az antifungális antibiotikumokat a rezisztens élesztő törzsek elpusztításában.

7. Irodalom

BAKKALI F., AVERBECK S., AVERBECK D., IDAOMAR M. (2008): Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology **46**, 446-475

BARATTA M. T., DORMAN H. J. D., DEANS S. G., FIGUEIREDO, A. C., BARROSO, J. G., & RUBERTO, G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. Flavour and Fragrance Journal **13**, 235–244.

BRAGA PC, DAL SASSO M. (2005): Morphostructural alterations of *Candida albicans* induced by thymol. A scanning electron microscopy study. J Chemother 17:109.

BUSATTA C., VIDAL R.S., POPIOLSKI A.S., MOSSI A.J., DARIVA C., RODRIGUES M.R.A., CORAZZA F.C., CORAZZA M.L., OLIVEIRA J. V., CANSIAN R.L. (2008): Application of *Origanum majoranna* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. Food Microbiology **25**, 207-211

CAVALEIRO C., PINTO E., GONCALVES M.J. AND SALGUEIRO L. (2005): Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, Aspergillus and Candida strains. Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

CHAURASIA S. C., AND VYAS K. K. (1977): In vitro effect of some volatile oil against *Phytophthora parasitica* var. *piperina*. J. Res. Indian Med. Yoga Homeopath. **1977**, 24–26.

COWAN M. M. (1999): Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews 564-582

DALLEAU S., CATEAU E., BERGÈS T., BERJEAUD J.M., IMBERT C. (2008): In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. International Journal of Antimicrobial Agents **31**, 572–576

DEANS S. G., & SVOBODA K. P. (1990). The antimicrobial properties of Marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. Flavour and Fragrance Journal **5**, 187–190.

HAMMER K. A., CARSON C. F. AND RILEY T. V. (1999): Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology **86**, 985-990

HAMMER K.A., CARSON C.F. AND RILEY T.V. (2003): Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil Journal of Applied Microbiology **95**, 853–860

HAMMER KA, CARSON CF, RILEY TV.(2000): *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. *Med Mycol* **38**, 355–362

HOLMES O. W. (1861): Currents and counter-currents in medical science, with other addresses and essays. Ticknor and Fields, Boston, Mass.

LUCKNER M. (1980): Expression and control of secondary metabolism. *Secondary Plant Products* 23-63

MASOTTI V., JUTEAU F., BESSIÉRE J. M., VIANO J. (2003): Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7115–7121.

PARVEEN M., MD. HASAN K., TAKAHASHI J., MURATA Y, KITAGAWA E., KODAMA O. és IWAHASHI H. (2004): Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**, 46–55

PINTO E., PINA-VAZ C., SALGUIERO L., GONÇALVES M. J., COSTA-DE-OLIVEIRA S., CAVALEIRO C., PALMEIRA A., RODRIGUES A. AND MARTINEZ-DE-OLIVEIRA J. (2006): Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*. **55**, 1367-1373

SELLAMI I.H., MAAMOURI E., CHAHED T., WANNES W.A., KCHOUK M.E., MARZOUK B. (2009): Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Industrial Crops and Products* **30**, 395-402

SIKKEMA J., DE BONT J. A. & POOLMAN B. (1994): Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 8022–8.

VÁGI E., SIMÁNDI B., SUHAJDA Á., HÉTHELYI É. (2005): Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International* **38**, 51–57

Világháló oldalak:

<http://hu.wikipedia.org/wiki/Majoranna>, utoljára látogatva: **2013.01.09.**

http://www.kert.co/egynyari_kerti_novenyek/majoranna, utoljára látogatva: **2013.01.09.**

<http://www.drflora.hu/?p=3768>, utoljára látogatva: **2013.01.09.**

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni **Dr. Pesti Miklós** tanszékvezetőnek a téma kijelölését és koordinálását. Köszönettel tartozom **Dr. Gazdag Zoltán** adjunktusnak a témafeldolgozás és a gyakorlati munka során nyújtott segítségért.

Köszönettel tartozom az Általános és Környezeti Mikrobiológia Tanszék minden dolgozójának és hallgatójának, hogy a laborban elméleti és gyakorlati kérdéseimmel, bizalommal fordulhattam hozzájuk.

9. Függelék

konc. (µl/ml)	idő (óra)					
	0	10,5	14	17	20,25	36
K	0,050	0,615	1,467	1,765	1,910	1,978
0,25	0,050	0,415	1,126	1,584	1,803	1,878
0,375	0,050	0,225	0,733	1,167	1,512	1,753
0,5	0,050	0,361	1,031	1,473	1,736	1,848
0,75	0,050	0,022	0,064	0,077	0,098	0,099
1	0,050	0,039	0,078	0,091	0,112	0,115

9. táblázat: *Candida albicans* 33 erg⁺ törzs szaporodásgátlásának vizsgálata, OD értékek átlagolás után

perc	K	0,25 (µl/ml)	0,5 (µl/ml)	0,75 (µl/ml)	1 (µl/ml)
0	196	326	214	178	19
	255	272	245	149	15
	241	242	276	145	19
átlag	230,6667	280	245	147	17,66667
30	226	245	143	38	2
	190	253	155	39	7
	186	192	134	45	4
átlag	200,6667	230	144	40,66667	4,333333
60	200	186	133	50	4
	213	230	117	46	2
	227	272	103	55	3
átlag	213,3333	229,3333	117,6667	50,33333	3

10. táblázat: Petri-csészéken leszámolt telepszámok

perc	K	0,25 (µl/ml)	0,5 (µl/ml)	0,75 (µl/ml)	1 (µl/ml)
0	100	100	100	100	100
30	86,99422	82,14286	58,77551	27,6644	24,5283
60	92,48555	81,90476	48,02721	34,24036	16,98113

11. táblázat: pusztítási görbe készítéséhez szükséges százalékok

Majoranna (µl/ml)	Amphotericin B (µg/ml)											
	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	0,008	0	
8	0,003	0,019	0,007	0,008	0,001	0,006	0,001	0,013	0,017	0,024	0,200	0,000
4	0,004	0,000	0,000	0,000	0,002	0,009	0,063	0,108	0,124	0,242	0,572	0,000
2	0,009	0,002	0,002	0,001	0,018	0,062	0,175	0,286	0,405	0,488	0,787	0,009
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,024	0,059	0,197	0,418	0,620	0,644	0,737	0,000
0,5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014	0,047	0,183	0,524	0,765	0,719	0,756	0,824
0,25	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,023	0,153	0,535	0,821	0,829	0,852	0,826
0,125	0,003	0,007	0,000	0,000	0,002	0,019	0,146	0,570	0,847	0,848	0,854	0,837
0	0,000	0,008	0,007	0,000	0,026	0,077	0,362	0,783	0,883	0,880	0,832	0,835

12. táblázat: Majoranna és Amphotericin B kombinált kezelés után mért optikai denzitás értékek

átlagai a háttér abszorbancia levonása után; kékkel jelölve a kontroll, szürkén a vak

	Amphotericin B (µg/ml)											
Terpinén-4-ol (µl/ml)	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	0,008	0	
8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,048
4	0,004	0,002	0,009	0,000	0,001	0,003	0,005	0,005	0,001	0,002	0,002	0,060
2	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,005	0,002	0,026	0,068	0,242	0,059
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,076	0,202	0,235	0,373	0,434	0,675	0,751	0,043
0,5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,062	0,357	0,497	0,769	0,806	0,837	0,846	0,917
0,25	0,000	0,000	0,000	0,000	0,301	0,278	0,408	0,810	0,891	0,864	0,889	0,888
0,125	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,237	0,276	0,875	0,878	0,907	0,901	0,932
0	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,201	0,149	0,861	0,890	0,930	0,950	0,944

13. táblázat: Terpinén-4-ol és Amphotericin B kombinált kezelés után mért optikai denzitás értékek

átlagai a háttér abszorbancia levonása után; késsel jelölve a kontroll, szürkén a vak

	Amphotericin B (µg/ml)											
Timol (µg/ml)	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	0,008	0	
100	0,004	0,003	0,002	0,000	0,000	0,044	0,092	0,173	0,249	0,380	0,588	0,001
50	0,004	0,000	0,000	0,000	0,090	0,529	0,558	0,628	0,635	0,646	0,750	0,001
25	0,004	0,001	0,002	0,011	0,120	0,720	0,736	0,803	0,810	0,804	0,764	0,001
12,5	0,000	0,000	0,000	0,005	0,169	0,789	0,830	0,862	0,835	0,858	0,844	0,000
6,25	0,000	0,000	0,000	0,004	0,257	0,843	0,859	0,916	0,877	0,896	0,853	0,589
3,125	0,029	0,000	0,000	0,015	0,330	0,848	0,863	0,885	0,886	0,870	0,865	0,853
1,5625	0,020	0,003	0,005	0,020	0,331	0,841	0,858	0,844	0,870	0,856	0,851	0,838
0	0,002	0,003	0,002	0,021	0,499	0,852	0,882	0,901	0,879	0,876	0,827	0,792

14. táblázat: Timol és Amphotericin B kombinált kezelés után mért optikai denzitás értékek átlagai a

háttér abszorbancia levonása után; késsel jelölve a kontroll, szürkén a vak

	0	30	60	90	120	150
K	0,038	0,018	0,015	0,109	0,090	0,081
0,25 µl/ml	0,085	0,065	0,144	0,121	0,128	0,107
0,5 µl/ml	0,160	0,158	0,202	0,198	0,191	0,186
0,75 µl/ml	0,183	0,195	0,238	0,232	0,261	0,214
1 µl/ml	0,290	0,286	0,360	0,391	0,404	0,399

15. táblázat: 260 nm-en abszorbeáló anyagok OD-ja, a sejtek lízisét megelőzően

	0	30	60	90	120	150
K	0,391	0,062	0,073	0,088	0,140	0,128
0,25 µl/ml	0,394	0,126	0,108	0,101	0,119	0,139
0,5 µl/ml	0,315	0,103	0,142	0,090	0,090	0,115
0,75 µl/ml	0,340	0,117	0,127	0,106	0,087	0,108
1 µl/ml	0,315	0,171	0,089	0,076	0,052	0,090

16. táblázat: 260 nm-en abszorbeáló anyagok OD-ja, a sejtek lízisét követően

10. Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Czuni Lilla a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- *Candida albicans* 33erg⁺ törzs szaporodási görbéjének felvétele,
- *Candida albicans* 33erg⁺ törzs szaporodásgátlásának vizsgálata majoranna olajjal,
- *Candida albicans* 33erg⁺ törzs élő sejtszámának meghatározása,
- Minimális gátló koncentrációk meghatározása mikroplate módszerrel,
- Majoranna olaj, terpinén-4-ol ill. timol és az amphotericin B esetleges szinergizmusának kimutatása mikrodilúciós módszer segítségével,
- A sejtből kiáramló 260 nm-en abszorbeáló anyagok mérése spektrofotométerrel,
- Teljes antioxidáns kapacitás mérése ABTS^{•+} gyökkel

végeztem el.

.....

aláírás

Pécs, 2013.január 09.