

**Babeş-Bolyai Tudományegyetem
Biológia és Geológia Kar
Magyar Biológiai és Ökológiai Intézet
Orvosi biológia szak
I.év**

37. OTDK Biológia Szekció

Rézkomplexek hatásának vizsgálata a *Staphylococcus aureus* és a *Serratia marcescens* baktériumtörzsek fejlődésére és aktivitására

Témavezető tanár
Dr. Papp Judit egyetemi adjunktus

Végzős hallgató
Karsai Noémi

Kolozsvár
2024

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	5
I. Irodalmi áttekintés.....	6
I.1. A nehézfémek.....	6
I.1.1. A nehézfémek citotoxikus hatásai.....	7
I.1.2. A réz.....	10
I.1.2.1. A réz bejutása a sejtekbe.....	10
I.1.2.2. A réz transzportja.....	11
I.1.3. A baktériumok nehézfém-rezisztenciája.....	12
I.2. A fémkomplexek.....	13
I.2.1. A fémkomplexek meghatározása és szerkezete.....	14
I.2.2. A fémkomplexek biológiai hatása.....	15
I.2.3. A fémkomplexek citotoxikus hatásai.....	17
I.2.4. Rézkomplexek.....	18
I.3. A biofilmek.....	22
I.3.1. A biofilmek képződése.....	22
I.4. A kísérletekben használt baktériumok jellemzése.....	24
I.4.1. A <i>Staphylococcus aureus</i>	24
I.4.1.1. A <i>Staphylococcus</i> génusz.....	24
I.4.1.2. A <i>Staphylococcus aureus</i>	24
I.4.1.3. A <i>Staphylococcus aureus</i> patogenitása.....	25
I.4.1.4. A <i>Staphylococcus aureus</i> Gram-pozitív sejtfalának szerkezete.....	26
I.4.1.5. A <i>Staphylococcus aureus</i> antibiotikum-rezisztenciája.....	27
I.4.1.6. A <i>Staphylococcus aureus</i> fertőzések kezelése.....	27
I.4.2. A <i>Serratia marcescens</i>	27
I.4.2.1. A <i>Serratia</i> génusz.....	27
I.4.2.2. A <i>Serratia marcescens</i>	28
I.4.2.3. A <i>Serratia marcescens</i> patogenitása.....	29
I.4.2.4. A <i>Serratia marcescens</i> Gram-negatív sejtfalának szerkezete.....	29
I.4.2.5. A <i>Serratia marcescens</i> antibiotikum-rezisztenciája.....	30
I.4.2.6. A <i>Serratia marcescens</i> által okozott fertőzések kezelése.....	30
II. Célkitűzések és hipotézisek.....	31
III. Anyagok és módszerek.....	32
III.1. A vizsgálatokban használt fémkomplexek.....	32
III.2. Az antibakteriális hatás vizsgálata.....	32
III.2.1. A vizsgálathoz használt táptalajok.....	33
III.2.2. A fejlődés gátlásának vizsgálata Kirby-Bauer korongdiffúziós módszerrel.....	33
III.2.3. A fejlődésgátlás és a pigmenttermelés gátlásának vizsgálata mikrodilúciós módszerrel.....	34
III.2.4. A biofilmképzés mértékének vizsgálata a fluoreszcein-diacetátot hidrolizáló aktivitás alapján.....	35
III.3. Az adatok statisztikai feldolgozása.....	36
IV. Eredmények és kiértékelésük.....	38
IV.I. A korongdiffúziós módszer által kapott gátlási zónák átmérőinek összehasonlítása.....	38
IV.I.I. A <i>Staphylococcus aureus</i> fejlődésére vonatkozó eredmények.....	38
IV.I.II. A <i>Serratia marcescens</i> fejlődésére vonatkozó eredmények.....	40
IV.II. A mikrodilúciós módszerrel kapott fejlődésgátlás mértékének összehasonlítása.....	42
IV.II.I. A <i>Staphylococcus aureus</i> fejlődése a hatóanyagok jelenlétében.....	42
IV.II.II. A <i>Serratia marcescens</i> fejlődése és pigmenttermelése a hatóanyagok jelenlétében.....	46
IV.III. A rézkomplexek hatása a bakteriális biofilmképzésre.....	49
IV.III.I. A <i>Staphylococcus aureus</i> biofilmképzése a hatóanyagok jelenlétében.....	49
IV.III.II. A <i>Serratia marcescens</i> biofilmképzése a hatóanyagok jelenlétében.....	52
Következtetések.....	54
Kitekintések.....	55
Köszönetnyilvánítás.....	55
Irodalomjegyzék.....	56

Bevezetés

A multirezisztens baktériumtörzsek által okozott egyre gyakoribb fertőzések, a különböző felületeken képzett mikrobiális biofilmek és a fokozódó antibiotikum-rezisztencia szükségessé tette új, más mechanizmusú antibakteriális anyagok kutatását és gyógyászati, biotechnológiai alkalmazását.

A szerves fémkomplexek alkalmasak lehetnek a baktériumok fejlődésének és aktivitásának gátlására. A nehézfémek kis koncentrációja a szervezetben különböző biokémiai és élettani funkciók fenntartásához szükséges, de nagy koncentrációban toxikus hatást fejtenek ki. Fontosak az orvostudományban, de eddig kevés figyelmet fordítottak a potenciális antimikrobiális vegyületeként való alkalmazásukra. A fémek több módon károsíthatják a baktériumsejteket, a legtöbb esetben a sejtet elpusztítják vagy növekedését gátolják.

A réz az egyik legszélesebb körben használt nehézfém. A szerves ligandumot tartalmazó réz(II)-komplexek antibakteriális hatással rendelkeznek, számos kutatás irányul új rézkomplexek fejlesztésére és potenciális alkalmazásuk vizsgálatára.

A mikroorganizmusoknak több olyan sajátosságuk van, amely sikeressé teszi őket a fertőzési folyamatokban. A gyors szaporodó- és alkalmazkodóképesség, a rezisztencia kialakításának lehetősége, valamint a biofilmképzés jelentősen befolyásolják a mikroorganizmusok patogenitását. A biofilmek gyakran okoznak problémát kórházi környezetben, a használt eszközök nem megfelelő sterilizálása esetén vagy abban az esetben, ha különböző orvosi eszközökön (protéziseken, szondákon) alakulnak ki. A biofilmek jellegzetessége, hogy sokkal ellenállóbbak a különböző kedvezőtlen környezeti feltételekkel szemben, ezért a kutatók új lehetőségeket keresnek a baktériumok biofilmképzésének korlátozására.

Jelen dolgozat célja különböző réztartalmú fémkomplexek hatásának vizsgálata a Gram-negatív *Serratia marcescens*, illetve a Gram-pozitív *Staphylococcus aureus* baktériumtörzsek fejlődésére és egyes jellegzetes mikrobiális folyamatokat szabályozó kommunikációs rendszerek működésére. A vizsgált mikroorganizmusok általánosan elterjedtek a természetben és a humán mikrobiom részét képezik, ugyanakkor jelentős nozokomiális fertőzéseket okozó, gyakran multirezisztens fakultatív patogének. A *Staphylococcus aureus* Gram-pozitív, míg a *Serratia marcescens* Gram-negatív sejtfálszerkezettel rendelkezik, ezért feltételeztük, hogy a fémkomplexek eltérő mértékben hatolnak be és gátolják a növekedésüket, illetve az aktivitásukat.

I. Irodalmi áttekintés

I.1. A nehézfémek

A fémek olyan szilárd halmazállapotú anyagok (kivétel a higany), amelyek nagy elektromos vezetőképességgel rendelkeznek és elvesztik elektronjaikat, hogy kationokat alakítsanak ki. A fémeknek 3 csoportját lehet megkülönböztetni: fémek, félfémek és nehézfémek. Biológiai funkciójuk és hatásuk alapján a fémek 3 csoportba sorolhatók: esszenciálisak, toxikusak és nem esszenciálisak.

Az esszenciális fémek ismert biológiai funkciókkal rendelkeznek, ilyenek a Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo. A vas és a réz az oxigén- és elektrontranszportban vesznek részt, a kobalt a sejtanyagcserében, a cink a hidroxilezésben, a vanádium és a mangán az enzimszabályozásban és működésben, a króm a glükóz hasznosításában, a nikkell a sejtnövekedésben, az arzén a metabolikus növekedésben, míg a molibdén a redoxreakciók katalizálásához, a szelén pedig az antioxidáns működésben és hormontermelésben szükséges.

A toxikus fémeknek nem ismert a biológia funkciójuk, ilyenek a Ag, Cd, Sn, Au, Hg, Ti, Pb, Al. Súlyos toxikus hatásai vannak, mint a rák, agy-, gyomor-, vese-, máj-, szív-, központi idegrendszer-, bőrkárosodás, degeneratív csontbetegség, endokrin betegségek,

amelyek gyakran halálos kimenetelűek. Bizonyos fémek belélegzése, akár finom porként, akár füstként, fémfüst-láznak nevezett állapotot okozhat (Lemly 1997; Rusyniak et al. 2010).

A harmadik kategóriába a nem esszenciális, nem toxikus fémek tartoznak, melyeknek nem ismert a biológiai funkciójuk (Gomathy & Sabarinathan 2010).

A nehézfémek 5g/cm^3 -nél nagyobb fajlagos sűrűségű, kevésbé reaktív fémek. Kis koncentrációjuk a szervezetben különböző biokémiai és élettani funkciók fenntartásához szükséges, de nagy koncentrációban toxikus hatást fejtenek ki. A legközönségesebb nehézfémek a periódusos rendszer $4d^{10}$ és $5d^{10}$ -es osztályaiba tartoznak, ilyen a higany, a tallium, az ón, az ólom, a réz stb. (Jaishankar et al. 2014). Egy átlagos 70 kg-os emberi test körülbelül 0,01%-a nehézfémről áll.

Egyes nehézfémek biocid hatása már az ókorban ismert volt. A platina, az ózmium, a réz, a ruténium és más nehézfémek a rákellenes kezelésekben használatosak. Az antimon (protozoon-ellenes), a bizmut (fekélyellenes), az arany (arthritis-ellenes) és a vas (malária-ellenes) szintén fontosak az orvostudományban (Desoize 2004; Lima et al. 2013).

A nehézfémkomplexek jelenleg klinikai fejlesztés alatt állnak a rák, a malária és a neurodegeneratív betegségek kezelésére, azonban csak kevés figyelmet fordítottak a potenciális antimikrobiális vegyületként való alkalmazásukra (Frei et al. 2020).

A szerves molekulák azért nem olyan hatékonyak, mint a fémkomplexek, mert az élő szervezetekben a DNS-től a fehérjékig és az anyagcseretermékekig, a kémia nagy része leginkább a szénen és néhány egyéb elemen alapul (Frei 2020).

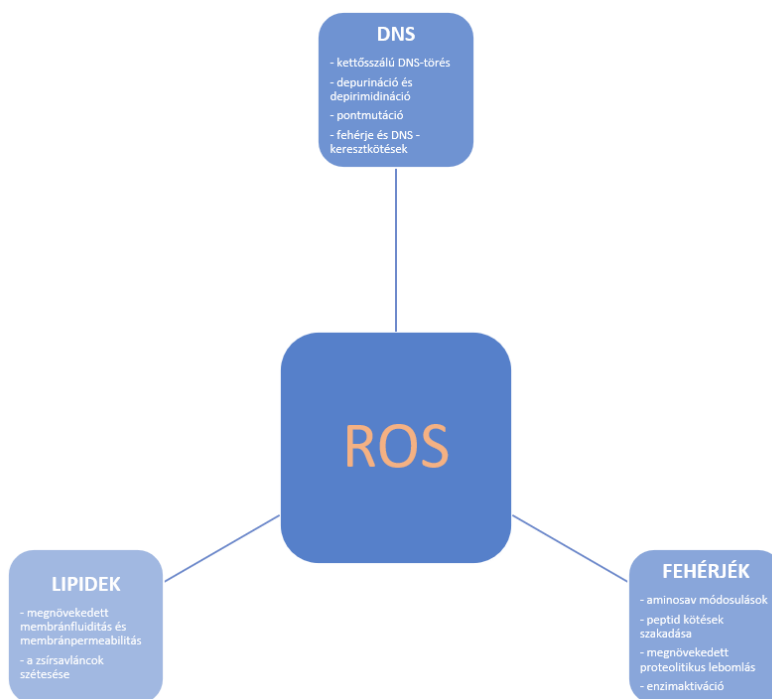
I.1.1. A nehézfémek citotoxikus hatásai

A különböző vegyületek antimikrobiális hatása attól függ, hogy milyen kölcsönhatások játszódnak le a hatóanyag és a baktériumok között, milyen változások érik a baktériumokban, amelyek módosíthatják a kezdeti fémkomplexet, mielőtt a vegyület elpusztítja a sejteket. Több általános hatásmechanizmus is elképzelhető és ezek valószínűleg a vegyületek különböző osztályai között változnak. Egy vegyület lehet részben labilis, azaz egyes ligandumok különböző körülmények között kicserélődhetnek és így egy olyan vegyület jön létre, amely képes megkötni egy bakteriális célpontot, illetve önmagában reaktív vagy toxikus. A felszabaduló ligandumok is felelősek lehetnek az aktivitásért, ugyanakkor az aktivitás lehet teljesen fémmediált is és a ligandumváz csupán hordozóként szolgál az aktív fémion szállítására.

A fémek több módon károsíthatják a baktériumsejteket, a legtöbb esetben a sejtet elpusztítják vagy növekedését gátolják. Ilyen mechanizmusok a reaktív oxigénformák (ROS) létrehozása és az antioxidáns raktárak kimerítése, a fehérjék nem megfelelő működésének és az enzimek aktivitásbeli csökkenésének előidézése, a membrántranszport károsítása, a tápanyagok feldolgozásában okozott zavar, valamint a DNS károsítása. A leggyakoribb mechanizmusok, amelyek a toxikus hatásért felelősek, a következők:

Reaktív oxigénformák keletkezése

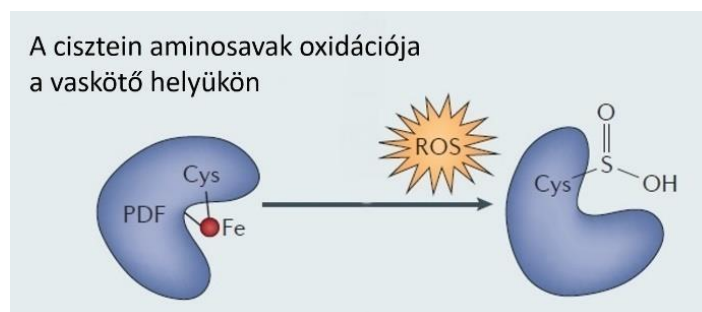
Az átmeneti fémek köztől függően több oxidációs állapotban létezhetnek. Amikor az egyik oxidációs állapotból egy másikba alakulnak, reaktív oxigénformák keletkeznek (Fenton reakció, például pH változás miatt). A Fenton-reakciók során létrejött reaktív oxigénformák jelenléte vagy a bázisok mutációja a DNS-t károsítja. Ezek nagyon instabil vegyületek, könnyen reakcióba lépnek más molekulákkal, károsítva ezzel a sejteket (1. ábra). A reaktív oxigénformák DNS törést, pontmutációkat, a zsírsavláncok szétesését, valamint a peptidkötések szakadását okozhatják. Azoknak a transzkripciós faktoroknak, amelyek az antioxidánsok (ROS-semlegesítő enzimek és vitaminok) átírását szabályozzák a fémionok homeosztázisának fenntartásában is szerepük van (Lemire et al. 2013).



1. ábra: A reaktív oxigénformák károsító hatásai biológiai rendszerekben

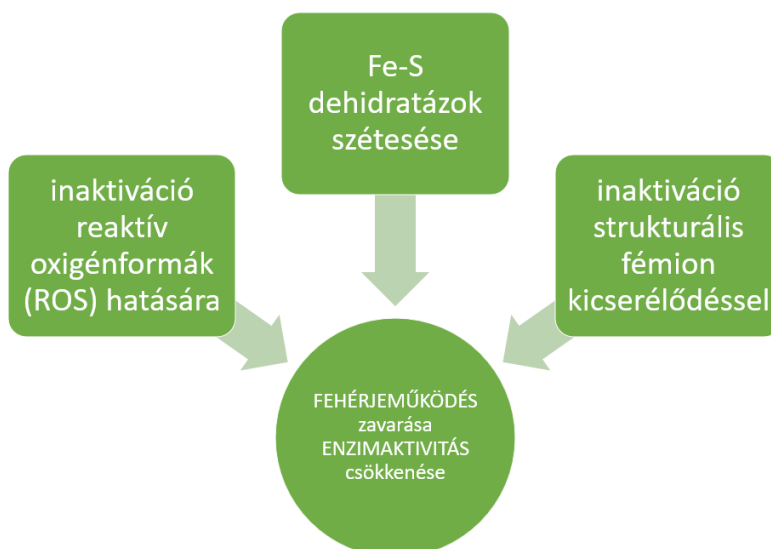
A fehérjék működésének zavara és az enzimaktivitás csökkenése

Az *E. coli* baktériummal végzett kísérletek kimutatták, hogy a fehérjék szerkezetében kevés aminosav érzékeny a fémion által katalizált oxidációra, ezek az aminosavak általában szomszédosak a fehérjék fémkötő helyével. A fémek több módon vezethetnek működészavarhoz, például az általuk képzett reaktív oxigénformák oxidálhatják a cisztein aminosav vaskötő helyeit (2. és 3. ábra) (Lemire et al. 2013).



2. ábra: A peptid-deformiláz enzim (PDF) reaktív oxigénformák (ROS) hatására bekövetkező inaktivációja (Lemire et al. 2013)

A toxikus fémionokra a bakteriális Fe-S dehidratázok is nagyon érzékenyek, inaktivációjuk történhet direkt módon, ahol maga a fémion bontja fel a vas-kén rácsok szerkezetét, kiszakítva a vasionokat, valamint indirekt inaktivációval, reaktív oxigénformákkal. Továbbá, a fémionok közvetlenül bekötődhetnek a fehérjék szerkezetébe és az enzimek katalitikus helyére, így ezeknek megszűnik a funkciójuk. Például a δ -aminolevulinsav-dehidratáz enzim (ALAD) katalitikus helyén lévő Zn(II) ion Pb(II) ionnal történő helyettesítése erős enzimaktivitás-gátláshoz vezet, mert az ólom bekötődése a katalitikus hely károsodásához és az enzim szerkezetében bekövetkező változásokhoz vezet. Erre egy másik példa az *E. coli* fruktóz-1,6-difoszfát aldoláz (FbaA) enzimének az inaktivációja a cink ionoknak nikkel ionokkal való helyettesítésével.



3. ábra: A fehérje működésének zavara és az enzimaktivitás csökkenése

A membránfunkciók sérülése

A plazmamembrán minden élőlény fontos szerkezeti része, melynek fő feladata a sejt elhatárolása a külvilágtól, a transzportfehérjéken keresztüli anyagtranszport és ezáltal a sejt belső homeosztázisának fenntartása, ugyanakkor a baktériumok esetében az elektrontranszportlánc is itt található, mivel nem rendelkeznek belső mitokondriális membránnal. A bakteriális membránok elektronegatív csoportokkal rendelkező poliméreket tartalmaznak, melyek a fém kationok adszorpciós helyeként szolgálnak, ezért a plazmamembrán az egyik olyan célpont, ahol a fémek kifejthetik baktericid hatásukat. Kutatások kimutatták, hogy egyes fémionok (pl. ezüst) az elektrontranszportlánc NADH-kinon-oxidoreduktáz (NQR) enzimét károsítják, megszüntetve a NQR által létrehozott Na^+ koncentrációgradienst. A *Vibrio cholerae* baktérium esetében azt figyelték meg, hogy az ezüst-ionok lyukakat ütöttek a plazmamembránon, megszüntetve ezzel az ATP-t termelő protongradienst.

Az asszimilációs folyamatok megzavarása

Egyes fémek gátolják bizonyos esszenciális anyagok felvételét és a metabolikus útvonalakat, így toxikus hatásuk a növekedés gátlásán keresztül nyilvánul meg. A *Pseudomonas aeruginosa* baktérium esetén kimutatták, hogy a gallium gátolja a vasfelvételt azáltal, hogy a Ga(III) ion képes represszálni a PvdS transzkripció faktort, amely a specifikus vasfelvevő transzporter gének átírásáért felelős. Azt is kimutatták, hogy a *S. cerevisiae*-ban a króm a szulfát felvételét gátolja és kimeríti az intracelluláris kénkészletet (Lemire et al. 2013).

I.1.2. A réz

A réz az egyik legszélesebb körben használt nehézfém a biológiai rendszerekben, a természetben oxidok és szulfidok formájában fordul elő. A réz jelenléte a mikroorganizmusok számára fontos, mert a rézionok különböző enzimek működéséhez nélkülözhetetlenek, ezek az elektronszállításban fontosak, de részt vesznek a sejtek metabolikus folyamataiban és a sejtösszetétel fenntartásában, ugyanakkor a réz nagyobb koncentrációban rendkívül mérgező az élő szervezetekre.

I.1.2.1. A réz bejutása a sejtekbe

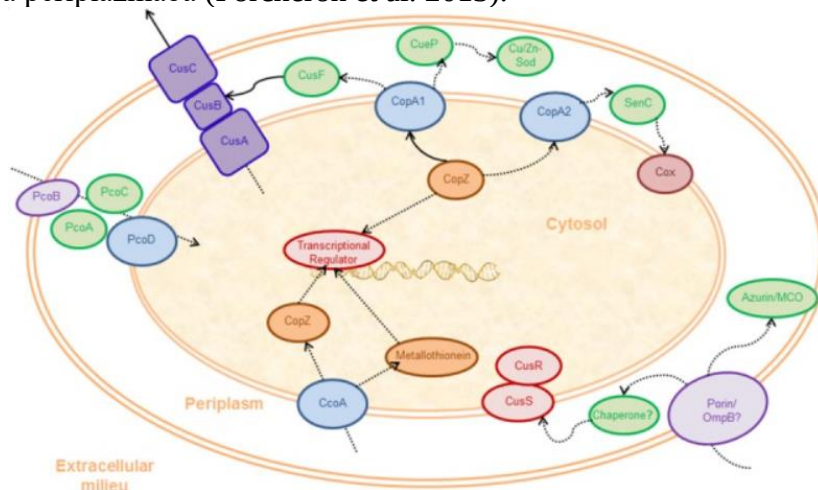
Nem teljesen tisztázott, hogy a réz hogyan jut be a bakteriális citoplazmába. Elképzelhető, hogy az OmpC porinok teszik lehetővé a Cu^{2+} és a Cu^{1+} átjutását a külső membránon keresztül, biztosítva a réz homeosztázisát a sejtekben (Argüello et al. 2013).

I.1.2.2. A réz transzportja

Bakteriális sejtekben P-típusú ATP-ázok, réz chaperonok és metalloenzimek vesznek részt a réz transzportjában (4. ábra).

E.coli-ban a réz felvétele csökken a ComC membránfehérje miatt, ennek a membránfehérjének homológjai számos más Gram-negatív baktériumnál megtalálhatóak, mivel fontos szerepet játszanak a réz homeosztázisában. A legismertebb réz-specifikus, homeosztázist biztosító genetikai rendszerek a *cop*, a *cut*, a *pco*, a *cus* (Cu-sensing) és a *cue* (Cu-efflux) operonok.

A Cu^{1+} ionok egy még ismeretlen mechanizmuson jutnak át a citoplazmába, azt feltételezik, hogy Zn^{2+} felvételi rendszerével vagy valamilyen ATP-ázzal kerülnek a citoplazmába. A patogén enterobaktériumok esetén a rézionok felvételénél fontosabb ezek elvezetése azért, hogy ne tudjon megkötődni a metalloproteinek természetes ligandumainak helyére. A réz exportja P1B-típusú ATP-áz pumpák segítségével történik, amelyek a citoplazmából a periplazmába szállítják a rezet, ezek a pumpák monomerek és 3 domént tartalmaznak. Például az *E. coli* baktérium esetén CopA ATP-áz pumpálja a Cu^{1+} ionokat a citoplazmából a periplazmába (Porcheron et al. 2013).



4. ábra: A réz homeosztázisában résztvevő rendszerek egy Gram-negatív baktériumsejtben (Hernández-Montes et al. 2012)

I.1.3. A baktériumok nehézfém-rezisztenciája

A klinikai fejlesztés alatt álló gyógyszerek, amelyek az antimikrobiális szerek közel 75%-át teszik ki, a már ismert és alkalmazott antibiotikumok származékai, ami azt jelenti, hogy ezekre valószínűleg hatnak a már meglévő mikrobiális rezisztencia-mechanizmusok (Frei et al. 2020).

A baktériumok idővel kifejlesztettek olyan mechanizmusokat, amelyekkel semlegesíteni tudják az antibiotikumok károsító hatását, illetve a magas nehézfém-koncentrációk elviselésére képesek. A baktériumok toleranciája/rezisztenciája sok tényezőtől függhet, például a sejtbe történő fémion-transzport típusától, a fémrezisztenciáért felelős gének helyétől vagy a fémion celluláris metabolizmusban betöltött szerepétől. A baktériumok nehézfém-rezisztenciája 5 mechanizmuson alapul:

- a fémek bejutásának megakadályozása;
- a fémionok aktív szállítása;
- a fémek extracelluláris megkötése;

- a fémek intracelluláris megkötése;
- a fémionok redukciója.

A fémek bejutásának megakadályozása

A baktériumok sejtfala és plazmamembránja megakadályozhatja a fémionok sejtekbe való bejutását. A különböző taxonómiai csoportba tartozó baktériumok a sejtfal ionizálható csoportjaival adszorbeálják a fémionokat, ez egy passzív folyamat, mivel a holt baktériumok sejtfala és plazmamembránja is képes fémion megkötésére. A plazmamembrán átjárhatóságának változása is megakadályozza a fémionok bejutását a sejtbe. A fémionok felhalmozódásának van egy kezdeti szakasza, amely gyors, sejtfal általi, nem specifikus adszorpció, míg a következő szakasz egy lassú, aktív transzport, mely a fémionokat szállítja a citoplazmába. A porinokat nem tartalmazó *E. coli* mutánsok membránfehérjei például hidrofил vegyületek csatornáiként működnek és alacsony ezüst felhalmozódást mutatnak. Kimutatták, hogy a biofilmben lévő sejtek szignifikánsan nagyobb rezisztenciát mutattak, mint az egyedülálló baktériumsejtek, valamint, hogy a biofilm külső rétegeiben kisebb a sejtek rezisztenciája.

A fémionok aktív szállítása

A baktériumok többsége ezt a mechanizmust használja, amely során efflux pumpák segítségével, aktív transzporttal, kijuttatják a sejtekből a nehézfémeket, ehhez az ATP hidrolízisét vagy elektrokémiai grádienszt használva fel. A transzporterek RND- (resistance, nodulation, cell division), CDF- (cation diffusion facilitator) és P- típusú ATP-ázok. A Gram-negatív baktériumoknál P- típusú ATP-ázok és CDF fehérjék játszanak szerepet a fémek szállításában. A P- típusú ATP-ázok olyan fémionokat szállítanak, melyek nagy affinitással rendelkeznek a szulfhidril csoportok iránt, a CDF fehérjék kétvegyértékű fémek ionjait szállítják.

A fémek extracelluláris megkötése

A folyamat során fémionok halmozódnak fel a periplazma és a külső membrán komponensei segítségével vagy a fémionok mikrobiális folyamatok révén átalakulnak oldhatatlan fémkomplexekké.

A fémek intracelluláris megkötése

A fémionok fémkomplexek képzése révén megkötődnek a sejtek citoplazmájában. A fémkötő peptidek (metallotioneinek és fitokelatinok) a fémionokat szulfhidril csoportokkal kötik össze, ezeket a fémkötő fehérjét a *smtA* és *smtB* gének kódolják. A rézre rezisztens *Pseudomonas syringae* baktériumtörzsek rézfüggő fehérjét szintetizálnak, amelyek rézfelhalmozódás esetén kék színűvé válnak, ilyen fehérjék a CopA és a CopB, amelyek periplazmatikus fehérjék és a CopC, amely egy külső membránfehérje. A rézre érzékeny törzsek szabad ionos formában halmozzák fel a rezet, amely nagyon káros a sejtekre, viszont a rezisztens törzsek a rezet rézkomplex formájában a citoplazmában tárolják.

A fémionok redukciója

A baktériumok elektrondonorként vagy elektronakceptoraként használhatnak fémeket az energiatermelés folyamata során, az oxidált formában lévő fémek a baktériumok anaerob légzése során az elektronok terminális akceptoraként működhetnek.

A mikroorganizmusok több mechanizmust is használhatnak egyszerre a nehézfémek károsító hatásának kivédése ellen.

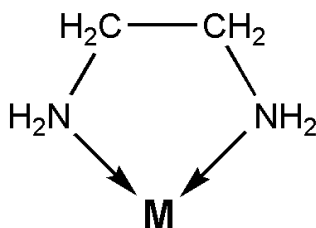
I.2. A fémkomplexek

Általában a fémkomplexeket, toxicitásukból adódóan, nem tartják alkalmasnak a gyógyszerfejlesztésre, azonban kutatók elkészítették a fémkomplexek antimikrobiális tulajdonságainak elemzését és kimutatták, hogy a csaknem 300.000 szerves vegyülethez képest, a fémkomplexek jelentősen magasabb gátlási arányt mutatnak az egyes kórokozókkal szemben (Frei et al. 2020).

I.2.1. A fémkomplexek meghatározása és szerkezete

A koordinációs komplexek olyan vegyületek, amelyekben egy vagy több ligandum kapcsolódik a központi ionhoz. Fémkomplexeknek nevezzük azokat a koordinációs komplexeket, amelyeknek magjában fémion található. Koordinatív kötés alakul ki a fémion szabad d pályája és a ligandum magányos elektronpárja között. Ez a koordinatív kötés abban különbözik a hagyományos kovalens kötéstől, hogy a kötést kialakító mindkét elektron a ligandumtól származik (Lawrance 2009). A kötésben levő ligandum egy Lewis bázis, vagyis elektron leadó (elektrondonor), míg a központi atom egy Lewis sav, vagyis elektron felvevő (elektronakceptor). A fémionokhoz olyan ligandumok kapcsolódhatnak, melyek egy vagy több szabad elektronpárral rendelkeznek, ezáltal egy vagy több kovalens kötés kialakítására képesek (Lawrance 2009). A ligandumok lehetnek magányos elektronpárral rendelkező szerves vagy szervetlen ionok, mint például a Cl^- (klorid-ion) vagy a OH^- (hidroxid-ion), semleges töltésű molekulák, mint a víz vagy az ammónia és ezeknél bonyolultabb molekulaszerkezettel rendelkező vegyületek is (Haas & Franz 2009).

A fogazottság a fémion szerzett elektronpárjainak száma, vagyis a ligandum azon elektronpárjainak számát jelenti, amelyekkel képes koordinációs kötést kialakítani, így léteznek egyfogú (monodentát), kétfogú (didentát) és többfogú (polidentát) ligandumok. Az egyfogú ligandumra klasszikus példa az ammónia (NH_3), amely egy elektronpárral alakít ki koordinációs kötést, a kétfogú ligandumra egyik leggyakoribb példa az etiléndiamin, amely két elektronpárral alakít ki koordinációs kötést (5. ábra). A komplex stabilabb, ha többfogú ligandumok alkotják, mert több kötést hoznak létre, ezért a fémiont és a ligandumot nehezebben, több energiával lehet szétválasztani (Lawrance 2009).

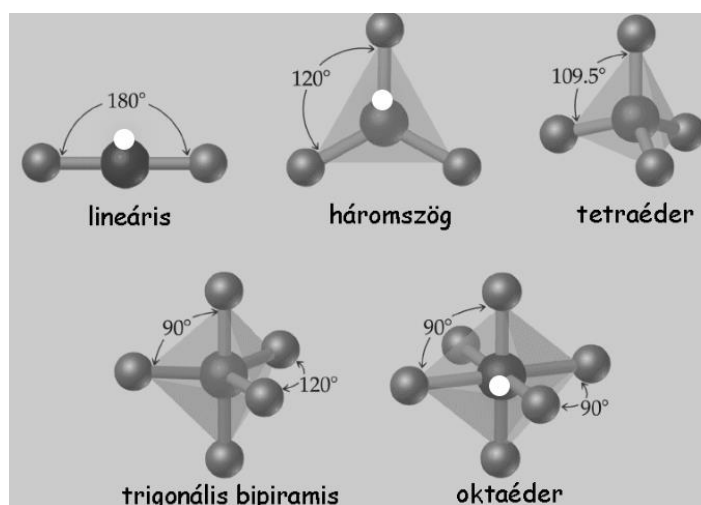


5. ábra: Etiléndiamin által kialakított kétfogú kelátkötés [1]

Annak függvényében, hogy mennyi a komplex koordinációs száma, azaz hány ligandum kapcsolódik a fémionhoz, a komplexek különböző térszerkezeteket alkotnak, így 6 térszerkezet jöhet létre (6. ábra):

- lineáris térszerkezet alakul ki, amikor a ligandumok száma 2;
- háromszög térszerkezet, amikor a ligandumok száma 3;
- tetraéder és síknégyzet térszerkezet, amikor a ligandumok száma 4;
- trigonális bipiramis és négyzet alapú piramis térszerkezet, amikor a ligandumok száma 5;

- oktaéderes és trigonális térszerkezet, amikor a ligandumok száma 6 (Lawrance 2009).



6. ábra: A komplexek térbeli szerkezete [2]

A szerkezetek sokfélesége rávilágít a fémkomplexek gyógyszerkutatásban való alkalmazhatóságának lehetőségére, mert egy molekula alakja az egyik döntő tényező biológiai sorsának és aktivitásának meghatározásában (Frei 2020).

I.2.2. A fémkomplexek biológiai hatása

A fémvegyületek toxicitása az emberi sejtekkel szemben megegyezik a szerves vegyületekével (Frei et al. 2020).

A fémek és komplexeik alkotóanyagként vagy katalizátorként történő alkalmazásukról ismertek és mérgező hatásúak, azonban a fémalapú koordinációs komplexek az orvostudományban mindvégig döntő szerepet játszottak (Frei et al. 2020).

Az arzén-alapú vegyületek alkalmazása hatásos volt a szifilisz kezelésében és a vakcinák tartósításában, a higany-vegyületek fertőtlenítésre, az arany a reumás ízületi gyulladás kezelésére szolgált. A platina-alapú ciszplatín kemoterápiás szer a rákkezelésekben ma is meghatározó szerepet játszik. Az aranytartalmú auranofin egy jóváhagyott gyógyszer a rheumatoid arthritis kezelésére és jelenleg is vizsgálják rákellenes és antimikrobiális hatásait. Az elmúlt két évtizedben további titán-, vas-, ruténium-, gallium-, palládium-, ezüst-, arany-, bizmut- és rézalapú fémkomplexek jutottak el a humán klinikai tesztekig, mint egyes rákbetegségek, illetve a malária kezelésének ígéretes alternatívái. A bizmut- és ezüstalapú antimikrobiális szerek az egyetlen olyan vegyületek, amelyeket egyes klinikai beavatkozások során alkalmaznak. A bizmutot más antibiotikumokkal együttesen használják a *Helicobacter pylori* fertőzések kezelésére. Xeroform néven a 3%-os tribromofenát-bizmut(III)-ot antimikrobiális szerként használják sebek kezelésére kötszerekben. A bizmut-tiol vegyületet (pravibismant) fertőzött diabéteszes lábfekélyek kezelésére használják. Az ezüstöt, fertőtlenítő hatása miatt, különböző formákban használják a sebek kezelésére (Frei et al. 2020).

A fémkomplexek az antibakteriális alkalmazásai rendkívül ritkák és a fémalapú antimikrobiális szerekekkel kapcsolatos publikációk száma eltörpül a fémalapú rákellenes vegyületekről szóló kutatási eredmények mellett, annak ellenére, hogy a háromdimenziós szerkezeti formák óriási változatossága ideális kiindulópont az új antibiotikus vegyületek fejlesztéséhez, mivel a szerves molekulák többsége csak egyszerű egy- vagy kétdimenziós szerkezettel rendelkezik (Frei 2020).

A stabilitási állandó, moláris vezetőképesség, oldhatóság és mágnesesség szintén felelősek a komplexek antimikrobiális aktivitásának növekedéséért (Song et al. 2015).

A fémkomplexek bejutása a sejtekbe

A fémkomplexeknek át kell jutniuk a sejtfaon és a plazmamembránon ahhoz, hogy kifejtthessék antibakteriális hatásukat. Áthaladásukat a membránon és a sejtfaon funkciós csoportjaik szerkezete befolyásolhatja. Vannak olyan fémkomplexek, amelyek nem tudnak behatolni a sejtbe a membránon keresztül, de a sejtfaonra tapadnak és átjárhatatlan bevonatot hoznak létre más anyagok számára, meggátolva a sejt és környezete közötti kapcsolatot. Azok a fémkomplexek, melyek kis molekulasúllyal rendelkeznek be tudnak hatolni a sejtekbe, ahol kapcsolatba lépnek a negatív töltésű molekulákkal, mint például a fehérjékkel, vagy kelátot képeznek a nyomelemekkel és így gátolják a sejtnövekedést (Cermak et al. 2013).

A fémkomplexek nagy reakcióképességgel rendelkeznek a kelátképzés miatt, mert a kelátokban a ligandumok orbitál-átfedései és a fémion pozitív töltésének részleges megoszlása miatt a fémion polaritása csökken. A kelátképzés elősegíti a kettős lipidrétegen való áthaladást, megnövelve a centrális fémion lipofil jellegét, ezáltal a komplexek könnyebben hatolnak be a sejtekbe a lipidmembránokon keresztül és blokkolják a mikroorganizmusok enzimeinek fémkötő helyeit a π elektronok delokalizálódása miatt a kelátgyűrűben (Cermak et al. 2013).

A fémkomplexek megzavarják a légzési folyamatokat és a fehérjeszintézist is, ami miatt a sejt nem képes további növekedésre (Vijayalakshmi 2018).

A fémkomplexek különböző mértékben hatnak a Gram-pozitív és a Gram-negatív baktériumokra, mert ezeknek különböző a sejtfaon szerkezetük. A Gram-negatív baktériumok általában rezisztensebbek az antibakteriális anyagokkal szemben, mert egy aszimmetrikus külső membránjuk van, amelyhez lipopoliszacharidok (LPS) kapcsolódnak és olyan fehérjékből áll, amelyek megakadályozzák a biocidok és az amfipatikus molekulák bejutását. A lipopoliszacharidok összetétele különbözhet az egyes baktériumtörzseknel. Az LPS molekulák amfipatikus polimerek, melynek hidrofób része a külső membránba ágyazódik. Az így képzett barrier megakadályozza a hidrofób biocidok bejutását a sejtekbe, ezért egyes Gram-pozitív baktériumokra ható erős baktericid anyagok a Gram-negatív baktériumokra hatástalanok. Az LPS molekuláknak tehát fontos szerepük van a sejtek antimikrobiális anyagokkal szembeni védelmében, a biofilmképzésben és a megfertőzött szervezetek kolonizálásában (Rosenfeld & Shai 2006).

A Gram-pozitív baktériumok homogén sejtfaonlal rendelkeznek a komplexebb szerkezetű sejtfaonlal rendelkező Gram-negatív baktériumokkal ellentétben. Az egyes anyagok bejutása főként a méretüktől függ, mert a nagyobb méretű molekulák fennakadhatnak a murein rácsszerkezetén (Rosenfeld & Shai 2006; Lemire et al. 2013). A Gram-pozitív baktériumokra a belső koordinációs sférájukban lipofil ligandumokkal rendelkező fémkomplexek mutatnak nagyobb antibakteriális hatást, mert a lipofil jelleg a sejtfaon roncsolásával segíti a transzportfolyamatokat a biomembránokon keresztül, így a komplexek könnyen elérik a sejtben belüli célpontjaikat (Barta Holló et al. 2017).

I.2.3. A fémkomplexek citotoxikus hatásai

Bizonyos Mn-, Co-, Zn-, Ru-, Ag-, Eu-, Ir- és Pt-tartalmú vegyületek Gram-pozitív és/vagy Gram-negatív baktériumok, köztük a methicillin-rezisztens *S. aureus* (MRSA) ellen is hatnak, viszont csak egy teljesen hatékony az ellenállóbb Gram-negatív törzsek ellen. Ezen túlmenően a fémkomplexek egyedülálló hatásmechanizmussal rendelkeznek: ligandumcsere vagy -felszabadítás, ROS-termelés, redox-aktiválás. Ezek az aktivitások kis mértékben vagy egyáltalán nem jellemzőek a tisztán szerves vegyületekre (Frei et al. 2020).

I.2.4. Rézkomplexek

A rézionok nélkülözhetetlenek az élet fennmaradásához, legfőképpen azért, mert számos olyan enzim létezik, amelyek szerkezetében réz található. Az emlősökben a

legfontosabb ilyen enzimek közé tartozik az elektrontranszportlánc terminális oxidáza, a citokróm c oxidáz, amelynek így kulcsfontosságú szerepe van az aerob légzésben vagy a szuperoxid gyökök semlegesítésében szerepet játszó szuperoxid-dizmutáz (SOD) antioxidáns (Calvo et al. 2017).

Annak ellenére, hogy a réz fontos mikroelem, túlzott mennyiségben károsító hatása van. A réz több úton képes a sejteket károsítani. Közvetett károsító hatását a reaktív oxigénformák képezik, de közvetlenül képes más fématommal működő metalloenzimek fémkötő helyére kapcsolódni, esszenciális ionok helyettesítésére, peroxidálni a lipideket és hasítani a DNS és RNS szálakat is (Mekahlia & Bouzid 2009; Ibrahim et al. 2011; Marzano et al. 2012).

A rézionok koncentrációjának változása részt vesz bizonyos neurodegeneratív betegségek kialakulásában. A Parkinson-kórra például jellemző a substantia nigra (feketeállomány) és a nucleus caudatus (fogazott mag) csökkent rézion szintje és megnövekedett vasion koncentrációja (Montes et al. 2014).

A rézkomplexek antibakteriális hatása

Számtalan olyan kutatást végeztek, amelyben ligandumokat kapcsoltak réz(II)-ionokhoz, komplexeket képezve. A tioszemikarbazon származékok például antibakteriális hatással rendelkeznek, ezt réz(II)-ionokhoz kapcsolva, hatékonyabb eredményt értek el. A ligandumok önmagukban mindig kisebb antibakteriális hatással rendelkeztek, mint a komplexek, feltehetően a fémion polaritásának csökkenése, az elektron delokalizáció és a lipid kettősrétegen való áthaladás mértékének növekedése miatt. Az antibakteriális hatást *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* és *Klebsiella pneumoniae* baktériumoknál figyelték meg (Rosu et al. 2010).

Kimutatták, hogy rézionhoz kapcsoltan a ciprofloxacín háromszor hatékonyabb mint szabad vegyületként. A ciprofloxacín önmagában is káros a baktériumsejtekre, ugyanis a replikációban kulcsfontosságú szerepet betöltő topoizomerázt gátolja, megakadályozva ezáltal a sejtosztódást. *Mycobacterium smegmatis* baktériumon vizsgálták a szabad ciprofloxacín, illetve rézzel képzett komplexének antibakteriális hatását, ami hatékonyabbnak bizonyult (Patole et al. 2003).

A réz(II)-ionok benzimidazolokkal képzett komplexeinek antimikrobiális hatását *S. aureus* és *S. epidermidis* baktériumok, valamint *Aspergillus niger* penészgomba esetén mutatták ki (Tabassum et al. 2012; Tavman et al. 2012).

A kitozán egy polikationos biopolimér, melynek önállóan is tulajdonítottak antibakteriális hatást, viszont nem tud átjutni a baktériumok plazmamembránján, mivel a plazmamembrán permeabilitási gátként szolgál a makromolekulák számára. A kitozán vázán található -OH és -NH₂ csoportokat ligandumként rézionokhoz kapcsolva kitozán-réz komplex képződik, ennek hatására a kitozán láncon a koordinációs hely közelében gyenge pontok jönnek létre, ami a kitozán lebomlását okozza. Ez a réz kelátképzésének köszönhető és így hatékony gátlószer a *Salmonella enteritidis* ellen (Mekahlia & Bouzid 2009).

Ugyancsak antibakteriális hatást figyeltek meg *Staphylococcus aureus* és *Escherichia coli* baktériumok ellen, abban az esetben ha szulfonamid és norfloxacín származékokat használtak ligandumként, Cu(II)-ionokhoz kapcsoltan (Kremer et al. 2006; Efthimiadou et al. 2007).

A Föld népességének 40%-a él olyan területeken, ahol gyakoriak a malária fertőzések, a helyzetet súlyosbítja, hogy a *Plasmodium falciparum* élősködő egyre több klinikailag alkalmazott antimaláriás szer ellen válik rezisztenssé (Gokhale et al. 2006). Léteznek olyan réz(II)-komplexek, amelyek malária-ellenes hatással rendelkeznek. A réz(II)-ionok karboxamid-razonokkal és naftokinonokkal képzett komplexeik antimaláriás hatást mutatnak és az élősködők kevésbé válnak rezisztenssé (Gokhale et al. 2003). Az antimaláriás hatás

fokozódása a réz(II)-ionok redukciójakor keletkező reaktív oxigénformák citotoxikus hatásával magyarázható (Gokhale et al. 2006).

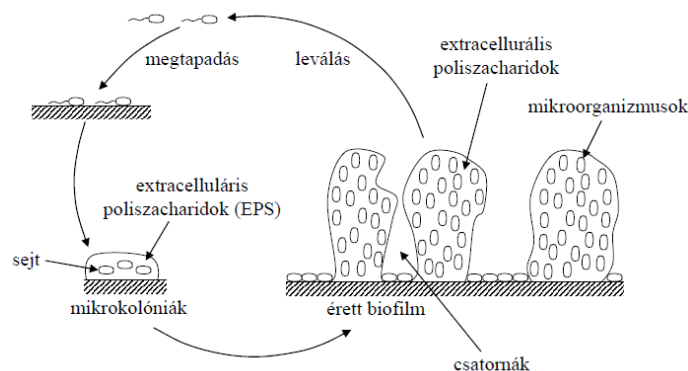
A rézkomplexek még a tuberkulózis (TBC) betegség kezelésében is megoldást jelenthetnek. Az izoniazid a *M. tuberculosis* baktérium ellen gyakran alkalmazott kemoterápiás szer, de léteznek rezisztens törzsek, amelyekre a gyógyszer hatástalan. Az izoniazid rézionhoz kapcsolva lipofillá válik és könnyebben átjut a sejthártyán, így érzékenyebbé téve a rezisztens törzseket (Bottari et al. 2000).

I.3. A biofilmek

A biofilmek a mikroorganizmusok önszerveződő rendszerei, amelyek egybefüggő bevonatot képeznek élő és élettelen felületeken. A biofilmek a mikroorganizmusok vegyes populációiból és az általuk termelt extracelluláris szerves mátrixból állnak, ebben a formában a mikroorganizmusok sokkal ellenállóbbak. A biofilmek nedves felületeken élnek, így megtalálhatóak vízvezetékben, kontaktlencséken, katétereken és emberi szöveteken is, ezért komoly fertőzéseket okozhatnak. A biofilmeknek specifikus tulajdonságaik vannak, például magas UV-sugárzás- és antibiotikum-rezisztencia, genetikai variabilitás és fagocitózissal szembeni ellenállás, ezért a mikroorganizmusok védelmére és túlélésére szolgálnak (Papp 2009).

I.3.1. A biofilmek képződése

A biofilm képződésének négy szakasza különíthető el: letapadás, mikrokolóniák kialakulása, a biofilm érése és a leválás (7. ábra).



7. ábra: A biofilm képződésének folyamata (Papp 2009)

Letapadás

A szabadon úszó mikroorganizmusoknak egy olyan felületet kell találniuk, ahova le tudnak tapadni, ez a folyamat diffúzióval, légáramlással, lamináris áramlással, illetve ülepedéssel mehet végbe. A sejtek letapadását befolyásolhatja a hőmérséklet, a tápanyagok koncentrációja, a felület hidrofób vagy hidrophil jellege és az áramlási sebesség. A sejt felszínén lévő csillók, fimbriák és sejtfalelemek, tokanyagok fontos szerepet játszanak a letapadásban.

A mikrokolóniák kialakulása

A baktériumok szaporodnak és jelmolekulákat bocsájtanak ki, amelyek segítségével kapcsolatba kerülnek a szomszédos sejtekkel. Egy bizonyos küszöbérték felett a jelmolekulák beindítják az extracelluláris poliszacharidok (EPS) képződésért felelős géneket és így a baktériumok egy extracelluláris mátrixban beágyazva fognak szaporodni, mikrokolóniákat alakítva ki.

A biofilm érése

A mikrokolóniák folyamatosan fejlődnek és egy háromdimenziós szerkezetet alakítanak ki, amely sejtcsoportokból, üregekből, pórusokból és poliszacharid természetű extracelluláris

anyagból (EPS) áll. A Gram-negatív baktériumok EPS rétege nagyrészt anionos, ezért a Ca^{2+} és a Mg^{2+} jól tud kötődni a polimér hálózathoz és ettől ellenállóbb lesz. Az EPS-nek fontos védő szerepe van, amely jelentősen hozzájárul a biofilm külső kedvezőtlen tényezőkkel szembeni rezisztenciájához, a baktériumok védelméhez.

Leválás

A sejtek leválása a biofilmről történhet a leánysejtek leválásával az aktívan szaporodó és növekedő sejtek csoportjáról, a tápanyagok koncentrációjának csökkenése miatti vedléssel az EPS molekulák enzimatisz degradálásával vagy akár súrlódás okozta sejtlesodródással is. A levált baktériumok új felületeket kolonizálhatnak.

A biofilm kialakulása jelmolekulák kibocsátásán alapuló sejtsűrűség-függő kommunikációs rendszer, quorum sensing szabályozás alatt áll.

I.4. A kísérletekben használt baktériumok jellemzése

I.4.1. A *Staphylococcus aureus*

I.4.1.1. A *Staphylococcus* génusz

A *Staphylococcus* génuszba tartozó baktériumok Gram-pozitív, gömb alakú, átlagosan 0,5 – 1,5 μm átmérőjű kokkusok, amelyek szőlőfürtszerű csoportosulásokat hoznak létre, mivel osztódásuk több osztódási síkban történik (Harris et al. 2002). A *Staphylococcus* génuszba 42 faj tartozik, amelyek között az emberi szervezetet is kolonizáló fajok is vannak (Ghebremedhin et al. 2008).

A fajok közül a legismertebb a *Staphylococcus aureus* fakultatív patogén és a *Staphylococcus epidermidis*, a bőr normál mikrobiotájának tagja. Nem képesek önálló helyváltoztatásra, mivel gömb alakú felületükön nincsenek csillók, kedvezőtlen környezeti feltételek mellett nem képeznek spórákat, kitartó képleteket, jól tűrik a magas hőmérsékletet és a magas sókoncentrációt. A fakultatív anaerob mikroorganizmusok közé tartoznak, képesek hasznosítani az oxigént, de nem szükséges számukra, valamint kataláz-pozitívak és oxidáz-negatívak. Koaguláz enzim termelésére és a vér megalvasztására képes patogén faj például a *S. aureus* (embert fertőző patogén), a *S. intermedius* és a *S. hyicus* (állatokat fertőző patogének) (Harris et al. 2002).

I.4.1.2. A *Staphylococcus aureus*

A *Staphylococcus aureus* az emberi bakteriális fertőzések döntő hányadának okozója, gyakori patogén mikroorganizmus, amely megtalálható az emberi bőrön, az emésztőrendszerben, élelmiszerekben és a talajban. Képes egészséges embereket is megfertőzni, mert ellenállóbb a többi Gram-pozitív, nem spóráképző baktériumnál. Az emberek 30%-a állandó *S. aureus* fertőzött, leggyakrabban az orrnyálkahártyában fordul elő, a normál mikrobiota részét képezve. A baktérium direkt módon, érintkezéssel terjed, de közvetett módon fertőzött tárgyakkal is (Chambers & DeLeo 2009).

I.4.1.3. A *Staphylococcus aureus* patogenitása

A kórokozás vagy patogenitás a patogén mikroorganizmusoknak az a sajátossága, hogy a fertőzött szervezetben rendellenes folyamatokat váltanak ki, amelyek a gazdaszervezet megbetegedését és egyes esetekben pusztulását idézik elő (Papp 2009).

A baktérium virulenciáját több tényező is befolyásolja, mint például a hidrolitikus enzimek és a toxinok előállításának képessége. A *Staphylococcus aureus* leggyakrabban a sérült bőrön és nyálkahártyákon tud bejutni a szervezetbe. A gazdaszervezet immunrendszerét képes legyőzni, majd elszaporodni a szervezetben a virulencia-faktorai (a fertőzőképességét elősegítő tényezők) révén. A virulencia-faktorai közé tartoznak a specifikus adhezinek (sejtfelszíni fehérjék), a fagocitózist gátló sejtfelszíni fehérjék, a terjedését szolgáló enzimek (invazinok), a toxinok és a reaktív oxigénformákat semlegesítő antioxidánsok.

Az **adhezinek** a baktérium letapadását biztosítják. A baktérium szövetekhez való kapcsolódása úgy történik, hogy az alvadási faktor (clumping faktor), a fibronektinhez kötődő fehérje (fibronectin-binding protein) és a kollagénhoz kötődő fehérje (collagen-binding protein) specifikusan a fibrinogénhez, a fibronektinhez és a kollagénhoz kötődik (Thieme et al. 2005).

A **fagocitózist gátló tényezők** a protein A és a koaguláz enzim. A protein A sejtfelszíni fehérje az immunoglobulinok (IgG) Fc régiójához kapcsolódik és a fagocitózist azáltal gátolja, hogy a kapcsolódási szög nem teszi lehetővé a baktérium bekebelezését. A koaguláz enzimnek a véralvadásban van szerepe, a fibrinogént alakítja át fibrinné (a trombinhoz hasonlóan), a fibrinnel burkolt sejtek ellenállóbbak a fagocitózissal szemben.

Az **invazinok** a kórokozónak a szervezetben való elterjedését elősegítő extracelluláris enzimek. Ilyenek a fibrinolizin (fibrinbontó), a hialuronidáz (hialuronsav bontó) és a lipázok, amelyek feloldják a szöveteket, annak érdekében, hogy a baktériumok elterjedjenek a vérben és a zsírszövetben (Thieme et al. 2005).

A *Staphylococcus aureus* **toxinjai** lehetnek membránkárosító receptormediált vagy receptor-független toxinok, membrán receptorokat gátló toxinok és szekretált enzimek, amelyek bontják a gazdaszervezet makromolekuláit vagy a védekező mechanizmusokat gátolják (Otto 2014).

A membránkárosító toxinok litikus hatásúak, apró lyukakat ejtenek a sejthártyán, amelyeken keresztül a metabolitok kiáramlanak a sejtől. Megkülönböztetünk receptormediált és receptor-független lízist aszerint, hogy a litikus hatás függ-e vagy sem a célsejt membránreceptoraitól. A receptorfüggő toxinok sejtspecifikusabbak, a *Staphylococcus aureus* a vörösvértesteket károsító citolitikus toxinjait hemolizineknek, a fehérvérsejteket károsítókat pedig leukotoxinoknak (leukocidin) nevezik. A receptor-mediált toxinok közül a legismertebb az alfa-toxin, amely a leukocitákat károsítja (kivételt képeznek az eritrociták és a neutrofil granulociták), a sejthártyához érve egy heptamér pórust alkot, ahol kiszállítódnak a monovalens ionok. A delta-toxin (delta-hemolizin) a receptor-független toxinok legismertebb képviselője.

A membránreceptorok működését zavaró toxinok (nem membránkárosító enterotoxinok) hasmenést és hányást okoznak. Ezek a molekulák a T-sejtek proliferációját okozzák, szuperantigének. A SEB (Staphylococcal enterotoxin B) biológiai fegyvernek minősül, míg a SEC (Staphylococcal enterotoxin C) szívbelhártya-gyulladás és veseelégtelenség okozója.

A toxikus sokk szindróma toxin (TSST-1) is egy szuperantigén, amely az IL-1, IL-2, TNF-a és más citokinek termelődését indukálja, amelyek túltermelése halálos lehet.

A szekretált enzimek hámló bőr szindrómát (staphylococcal scalded skin syndrome) okoznak, mivel ide tartoznak különböző proteázok, mint az aureolizin, a glutamil-endopeptidáz, a cisztein-proteáz és az exfoliatív toxin proteázok, amelyek a dezmoszomális kapcsolatokat bontják meg.

I.4.1.4. A *Staphylococcus aureus* Gram-pozitív sejtfalának szerkezete

A Gram-pozitív baktériumok sejtfala homogén, vastagsága 20-80 nm közötti. Fő alkotóeleme a peptidoglikán (murein), amely a sejtfal össztömegének 20-80%-át képezi. A sejtfal másik fő alkotóeleme a teichosav, amelyeknek két típusa van: plazmamembránhoz kapcsolódó lipoteichosavak és sejtfalhoz kapcsolódó teichosavak, ezek elindíthatják a makrofágok citokin szekrécióját. A peptidoglikán és a teichosavak a sejtfal 90%-át teszik ki, a maradék 10% peptidoglikán hidrolázokból, exoproteinekből és felületi fehérjékből áll, utóbbiak a murein sejtfal peptidjeihez kapcsolódnak (Thieme et al. 2005).

A *Staphylococcus aureus* bakteriális sejtfalának szerepe a sejt védelme és a sejt alakjának megőrzése, ellenálló a belülről kifelé ható ozmotikus nyomással szemben is (Thieme et al. 2005).

I.4.1.5. A *Staphylococcus aureus* antibiotikum-rezisztenciája

A *S. aureus* az egyik vezető kórokozó az antimikrobiális rezisztenciával összefüggő halálozások esetében. A *Staphylococcus*ok penicillinnel szembeni rezisztenciáját a penicillináz enzim termelése biztosítja, amely hasítja a penicillin molekula β -laktám gyűrűjét, ami hatástalanná teszi az antibiotikumot (Deurenberg & Stobberingh 2008). A methicillinnel szembeni rezisztenciáért a *mecA* gén felelős, amely egy megváltozott penicillin-kötő fehérjét kódol, ami kisebb affinitással rendelkezik a β -laktámok (penicillinek, cefalosporinok és karbapenemek) megkötésére. Csupán két évvel a methicillin antibiotikum alkalmazását követően már megjelent a methicillin-rezisztencia a *S. aureus* törzsek körében (Jamrozy et al. 2017). Az aminoglikozid antibiotikumok, mint például a kanamicin, gentamicin, sztreptomycin, egykor hatékonyak voltak a *Staphylococcus* fertőzésekkel szemben, viszont a törzsek kifejllesztették az aminoglikozidok hatását gátló mechanizmusokat (Carter et al. 2000).

1.4.1.6 A *Staphylococcus aureus* fertőzések kezelése

Az MRSA fertőzéseket mind a kórházi, mind a közösségi környezetben általában nem β -laktám antibiotikumokkal kezelik (Stijn et al. 2002). A klindamicin-alapú terápia és a glikopeptid antibiotikumok például a vankomicin) egyaránt alkalmazhatók, viszont már léteznek vankomicin-rezisztens *S. aureus* (VRSA) törzsek, amelyek rezisztenssé váltak a glikopeptidekkel szemben (Gomez-Lus et al. 1997).

1.4.2. A *Serratia marcescens*

1.4.2.1. A *Serratia* génusz

A *Serratia* a *Yersiniaceae* családba tartozó Gram-negatív, jellemzően 1-5 mikrométer hosszú, spórákat nem termelő, fakultatív anaerob, pálcika alakú baktériumok nemzetsége, jelenleg 19 faja ismert. A többi Gram-negatív baktériumtól az különbözteti meg, hogy képes a kazein hidrolízisére, ami lehetővé teszi számára extracelluláris metalloproteinázok termelését, amelyekről úgy gondolják, hogy a sejt-extracelluláris mátrix kölcsönhatásokban jelentősek (Khanna et al. 2013).

A *Serratia* enterobaktérium nemzetség számos fajból áll, amelyek közül néhányan egy nem diffúz, vízben nem oldódó vörös pigmentet, prodigiosint termelnek. Az ókorban a vörös foltok megjelenését az élelmiszereken a baktériumok felfedezése után a *Serratia marcescens*-nek tulajdonították. A történelem során sokszor előfordult, hogy vérszerű foltokról számoltak be a kenyéren és a megszentelt ostyákon, ami rémületbe ejtette a babonás embereket. Egyetlen orvos sem merné azt állítani, hogy a *S. marcescens* szaprofita, valószínű, hogy a szaprofita vörös-pigmentált törzsekből alakultak ki a nem pigmentált nozokomiális kórokozó törzsek (Zizka et al. 1999).

A *S. marcescens* gyakran megtalálható zuhanyzóknak, WC-csészékben és a nedves csempék környékén, rózsaszínes-piros biofilm formájában. A *S. marcescens*en kívül a *S. plymuthica*, *S. liquefaciens*, *S. rubidaea* és *S. odoriferae* fajok néhány ritka törzséről kimutatták, hogy fertőzést, például oszteomielitist és endokarditist okoz (Greenberg 1978).

A *Serratia* fajok az Enterobacterales rend többi tagjától három enzim egyedi termelése alapján különböztethetők meg: DNáz (*nucA*), lipáz és zselatináz (*serralysin*) (Khanna et al. 2013).

1.4.2.2. A *Serratia marcescens*

A *Serratia marcescens* megtalálható az állati vagy emberi szervezetekben, a talajokban, a vizekben és a növényekben (Carbonell et al. 2000).

A *Serratia marcescens* opportunista fakultatív kórokozó, amely azt jelenti, hogy egészséges egyénben nem okoz fertőzést, habár megtalálható az emberi szervezetben, viszont a nozokomiális fertőzések (kórházban szerzett fertőzések) körülbelül 2%-áért felelős. A baktérium legyengült immunrendszerű embereket fertőz és olyan betegeknél található meg,

akiknél nem steril invazív eszközöket használnak (például laringoszkópot). A *Serratia marcescens* gyakran okoz húgyúti-, légzőszervi-, izomszöveti-, bőr- és lágszöveti fertőzéseket, de megtámadja a szív perikardiumát, a műtéti sebeket, ugyanakkor szemfertőzéseket, szaruhártyagyulladást is okoz (Marty et al. 2002; Verma et al. 2011). A *S. marcescens* által okozott meningitisz, sebfertőzések és ízületi gyulladások nagy esetszámai fordultak elő gyermekosztályokon. Beszámoltak fertőző endokarditisz esetszám-növekedéséről intravénás kábítószer-használók körében, valamint *Serratia* arthritisz eseteit jelentették intraartikuláris injekciót kapó betegeknél. A *S. marcescens* a fogak szubgingivális biofilmjét képezheti és emiatt, a *S. marcescens* vöröses-narancssárga tripirrol szerkezetű pigmentjének, az úgynevezett prodigiozinnak tulajdoníthatóan, a fogak elszíneződését okozhatja (Voelz et al. 2010; Martins et al. 2015).

I.4.2.3. A *Serratia marcescens* patogenitása

A *Serratia marcescens* virulencia-faktorai közé számos extracelluláris fehérje tartozik, ilyen a kitináz, lecitináz, hemolizin, sziderofórok, lipázok, proteázok és nukleázok. Számos toxint és egyéb virulencia-faktort is termel, melyeknek hemolitikus és citotoxikus hatásuk van, ilyen például a Sh1A, a Ph1A és a szerrawittin (Marty et al. 2002; Aggarwal et al. 2017).

A *Serratia marcescens* által termelt jelentősebb extracelluláris fehérjék közé tartozik a szerin-proteáz, amely egy 56kDa nagyságú fehérje és az IgG és az IgA, valamint a lizozim hasításával elősegíti a szaruhártya gyulladását. Egy másik extracelluláris fehérje az Sh1A hemolizin, amely a vörösvérsejtek hemolízisét és a fehérvérsejtekben lévő gyulladásos mediátorok, például hisztamin és leukotriének, felszabadulását okozza. A hemolizin működéséhez az Sh1B gén aktiválódása szükséges és az expresszióját hiszton-szerű H1 fehérje szabályozza. Egy harmadik extracelluláris fehérje az 1 típusú fimbria fehérje, amely a célsejthez való szoros kapcsolódást teszi lehetővé (Rodrigues et al. 2006; Verma et al. 2011).

A *Serratia marcescens* egyéb virulencia-faktorai a prodigiozin, bioszurfaktánsok, zselatináz, klórperoxidáz és alkalikus foszfatáz. A prodigiozint, a növekedési pigmentet gyakran használják a *Serratia* fajok fenotípusos azonosító markereként vörös színezete miatt (Clements et al. 2019). Bioszurfaktánsokat izoláltak a *Serratia marcescens*, *Serratia rubidaea* és *Serratia surfactantfaciens* fajokból, ezek a vegyületek emulgeáló, lerakódásgátló, daganatellenes és mikrobellenes hatásuk miatt jelentősek (Haddix & Shanks 2018; Araújo et al. 2019). Az endonukleázok, mint például a DNS-áz, segíthetik az inváziós és terjedési tevékenységet, lehetővé téve a környezet kiaknázását és a tápanyagok elérhetőségének maximalizálását (Benedik & Strych 1998). Hőstabil lipázt, lúgos proteázt és zselatinázt termelő törzseket izoláltak kontaktlencsével kapcsolatos szaruhártyafekélyekből (Pinna et al. 2011; García-Silvera et al. 2018). A klórperoxidáz lehetővé teszi a foszfodiészter kötések hidrolízisét, míg az alkalikus foszfatázok részt vesznek a sejtjelátviteli folyamatokban (Preobrazhenskaya et al. 2003).

I.4.2.4. A *Serratia marcescens* Gram-negatív sejtfalának szerkezete

A Gram-negatív baktériumoknak vékony sejtfaluk van, amely egyetlen peptidoglikán rétegből áll, amelyet külső membrán vesz körül. A külső membrán lipopoliszacharidokat (LPS) tartalmaz, amelyek egy glükózamin-foszfát dimérhez kötött zsírsavakból állnak. Az egyik glükózamin egy magpoliszacharidhoz kapcsolódik, amely az O poliszacharidokig terjed. A külső membrán a tápanyagok felvételének és a toxinok kizárásának szabályozására is szolgál. A felületi rétegekben található fehérjepórusok és transzporterek szelektivitása változó (Chemaly et al. 2011).

I.4.2.5 A *Serratia marcescens* antibiotikum-rezisztenciája

A *Serratia marcescens* elsősorban nozokómiális kórházi fertőzéseket okoz. A baktérium több antibiotikummal szemben rezisztens az R-faktorok jelenléte miatt, amelyek egy vagy több rezisztenciát kódoló gént hordozó plazmidok. Ilyen az ampicillin, a második generációs cefalosporinok, aztreonám, makrolidok és imipeném szembeni rezisztencia, ezért rezisztens

törzsek által okozott fertőzéseket nehéz kezelni. A *Serratia marcescens* β -laktám antibiotikumokkal szemben rezisztensek, mivel egy indukálható, széles spektrumú β -laktamázt termelnek, amely hidrolizálja a β -laktám antibiotikumokat. A β -laktám egy másik típusát, metalo- β -laktámot is termelnek a baktérium egyes törzsei, ennek a típusú enzimnek a termeléséhez a baktériumoknak Zn-ionra van szükségük. A baktérium az aminoglikozidok ellen is termel enzimeket, ilyenek az aminoglikozid-acetil-transzferázok, az aminoglikozid-nukleotidil-transzferázok és az aminoglikozid-foszfotranszferázok, amelyek szerkezeti változást okoznak az antibiotikumokban, így hatástalanítják azokat (Rodrigues et al. 2006; Chemaly et al. 2011).

I.4.2.6 A *Serratia marcescens* által okozott fertőzések kezelése

A *Serratia* által okozott fertőzések kezelésére egy *Pseudomonas* törzsek ellen alkalmazott β -laktám antibiotikum és egy aminoglikozid antibiotikum kombinációja a leghatékonyabb, ezekre az antibiotikumokra még nem alakítottak ki rezisztenciát a nozokomiális fertőzéseket okozó baktériumtörzsek (Verma et al. 2011).

II. Célkitűzések és hipotézisek

Jelen dolgozat célja különböző réztartalmú fémkomplexek hatásának vizsgálata a Gram-negatív *Serratia marcescens*, illetve a Gram-pozitív *Staphylococcus aureus* baktériumtörzsek fejlődésére és egyes jellegzetes mikrobiális folyamatokat szabályozó kommunikációs rendszerek működésére.

Tudva azt, hogy a komplexek antibakteriális hatása függ a centrális fémiontól és a ligandumoktól, vizsgálatunk célja az volt, hogy megnézzük mekkora a különböző ligandumokat tartalmazó rézkomplexek toxicitása közötti különbség, melyek rendelkeznek nagyobb antibakteriális hatással.

Felállított hipotéziseink a következők:

1. Mindkét vizsgált baktériumtörzs fejlődését és aktivitását egyes rézkomplexek negatívan befolyásolják.
2. Feltételezéseink szerint a két baktérium eltérő érzékenységet mutat különböző sejtfalszerkezetének köszönhetően.
3. Várhatóan a diffúziós korongokra pipettázott komplexek mennyiségének növelésével (5, 10, 20 és 30 μ l) a gátlási zónák is növekszenek.
4. A nagyobb mennyiségben alkalmazott rézkomplex oldatok nagyobb hatással lesznek a baktériumok fejlődésére, pigmenttermelésére és biofilmképzésére.
5. Azt is feltételeztük, hogy a rézkomplexek negatív hatással lesznek a quorum sensing kommunikációs rendszerek működésére, amelyre a baktériumsejtek biofilmképző képességének, illetve pigmentképzésének mértéke alapján következtetünk.

III. Anyagok és módszerek

III.1. A vizsgálatokban használt fémkomplexek

A minták eredete

Kísérleteink során a kolozsvári Babeş-Bolyai Tudományegyetem Kémia és Vegyészmérnöki Karán szintetizált rézkomplexek antimikrobiális hatását vizsgáltuk *Staphylococcus aureus* és *Serratia marcescens* baktériumtörzseken. Azért esett erre a két baktériumra a választásunk, mert eltérő sejtfalszerkezetük révén feltételezhető, hogy a rézkomplexek különböző úton hatolnak be és károsítják a sejteket, így a gátlás is eltérő mértékű lesz, valamint a tenyésztésük nem igényel speciális tápközeget, könnyen átolthatók

és fenntarthatók alaptáptalajokon. Mindkét mikroorganizmus megtalálható a természetben, ugyanakkor a humán mikrobiota tagja.

Mind a 7 vizsgált fémkomplexnek a centrális fématomja réz (1. táblázat, Függelék, 1-7. ábra).

1. táblázat: A rézkomplexek elnevezése és szerkezete

Azonosító szám	Elnevezés és szerkezet
1956	[Cu(metil-i-butyl-dioxim) ₂ (3-HO-anilin) ₂]
1958	[Cu(metil-pentil-dioxim) ₂ (3-amino-1-propanol) ₂]
1959	[Cu(metil-pentil-dioxim) ₂ (n-pentil-amin) ₂]
1960	[Cu(metil-pentil-dioxim) ₂ ((n-butyl) ₂ NH) ₂]
2219	[Cu(butirofenon-szemikarbazon) ₂]
2225	[Cu(butirofenon-tioszemikarbazon) ₂]
2285	[Cu(metil-butyl-dioxim) ₂ (1-naftilamin) ₂]

A réztartalmú butirofenonok (2225, 2229) kivételével, amelyeket 2 mM-os koncentrációban alkalmaztunk, az összes többi DMSO-ban többszörös vortexeléssel feloldott rézkomplext 10 mM-os koncentrációban használtunk.

III.2. Az antibakteriális hatás vizsgálata

A vizsgálatban használt törzsek a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) és a *Serratia marcescens* (SZMC 0567).

III.2.1. A vizsgálathoz használt táptalajok

A táptalajoknak tartalmazniuk kell mindazokat az anyagokat, amelyek esszenciálisak a mikroorganizmusok fejlődéséhez és szaporodásához. Vizsgálataink során folyékony vagy szilárd glicerines táptalajt használtunk a *Serratia marcescens* fejlődésének, pigmenttermelésének és biofilmképzésének vizsgálatára, míg a *Staphylococcus aureus* esetében Nutrient hústáplevest vagy Nutrient agar táptalajt alkalmaztunk.

A glicerines táptalaj összetétele:

- 10 g húskivonat
- 10 ml glicerín
- 25 g agar (szilárd táptalaj esetén)
- 1000 ml desztillált víz.

A Nutrient hústáptalaj összetétele:

- 5 g pepton
- 3 g húskivonat
- 20 g agar (szilárd táptalaj esetén)
- 1000 ml desztillált víz.

A táptalajok pH-ját 10%-os NaOH-oldattal semlegesre (pH=7) állítottuk be. A táptalajokat autoklávban sterilizáltuk 121 °C-on, 30 percen keresztül.

III.2.2. A fejlődés gátlásának vizsgálata Kirby-Bauer korongdiffúziós módszerrel

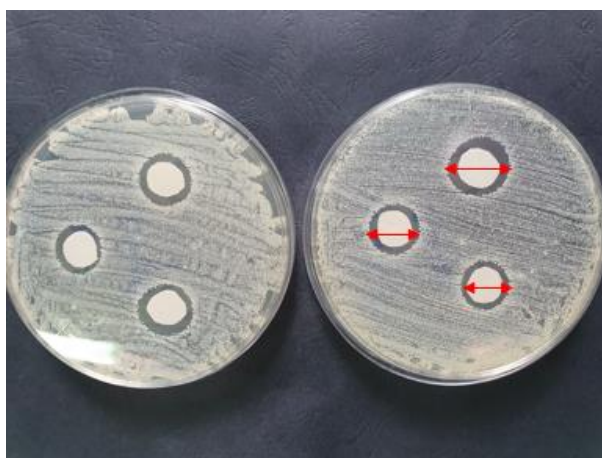
A kísérlet elvégzése napján a szilárd táptalajon lévő baktériumtenyészetből 1-2 kacsnyi mennyiségű inokulumot, hő által sterilizált oltókaccsal fiziológiás sóoldatba (0,9 %-os NaCl-oldat) szuszpendáltunk, úgy, hogy a 0,5-ös turbiditású McFarland etalon oldatnak megfelelő sűrűségű oldatot kapjunk (OD~0,2, ami megközelítőleg $1,5 \times 10^8$ baktériumsejtnek felel meg ml-ként). A folyékony szuszpenzióból 100 µl-t a steril Petri-csészékbe előkészített szilárd táptalajokra pipettáztunk mikropipetta segítségével, majd ezt egyenletesen szélesztettük az egész táptalaj felszínén.

A Petri-csészékre fémcsipesz segítségével előzőleg 170 °C-on 90 percig sterilizált, 8-10 mm-es átmérőjű szűrőpapírkorongokat helyeztünk.

A korongokra a 2 mM-os oldatokból (2225, 2229) 5, 10, 20-és 30 µl, előzőleg 1000 µl DMSO-ban feloldott rézkomplexekeket pipettáztunk, míg a többi komplex 10 mM-os törzsoldatából 30 µl-t vittünk fel.

A Petri-csészéket 24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk a *Staphylococcus aureus* Gram-pozitív baktérium esetében, míg a *Serratia marcescens* Gram-negatív baktérium esetében 24 óráig 25 °C fokon hagytuk a beoltott Petri-csészéket.

A papírkorongból a táptalajba diffundáló rézkomplexekek hatására, az érzékeny mikroorganizmusok esetében, a korong körül gátlási zóna jött létre, míg a rezisztens baktériumok esetében nem. Az inkubációs idő letelte után vonalzó segítségével lemértük mm-ben a gátlási zónák átmérőjét, ezeknek méretéből következtetni lehet az érzékenységre (8. ábra). Mindegyik fémkomplex és mindegyik mennyiség esetén hatszoros ismétléssel (6 papírkorong) dolgoztunk és az így kapott gátlási zónák átmérőjét átlagoltuk.



8. ábra: Gátlási zónák kialakulása a korongdiffúziós módszer során

III.2.3. A fejlődésgátlás és a pigmenttermelés gátlásának vizsgálata mikrodilúciós módszerrel

Mikrodilúciós módszerrel megnéztük azoknak a vegyületeknek a hatását különböző mennyiségekben, amelyek gátló hatást fejtettek ki a korongdiffúziós módszer során. Hígítási sorokat végeztünk mikrolemezeken, 1 lemezen 2 anyagot vizsgáltunk.

Ehhez a kísérlethez 12*8 üregű mikrolemezeket használtunk, amelyekbe előbb 200 µl tápoldatot tettünk, majd az első oszlopba a rézkomplexekek 2 vagy 10 mM-os törzsoldatait pipettáztuk, oly módon, hogy az üregben levő tápoldat a vegyületet 100 µg/ml-nyi mennyiségben tartalmazza.

A kezdeti oldatból kiindulva felező hígítási sort végeztünk, ennek megfelelően az üregekben levő oldatok hatóanyag-mennyisége 0-100 µg/ml között változott. Minden változatot háromszoros ismétlésben készítettünk el. Ezután az üregeket beoltottuk 10 µl 0,5-ös McFarland oldatnak megfelelő turbiditású baktériumsuszpenzióval. A mikrolemez utolsó oszlopa nem tartalmazza a hígított vegyületet, ezért ez lesz a kontroll, amelyben a baktériumok növekedése maximális. Negatív kontrollokat is készítettünk, amelyek tartalmazták a hatóanyagok megfelelő hígításait, de beoltatlanok maradtak.

Apollo mikrolemez leolvasó spektrofotométerrel lemértük a mikrolemezek üregeiben található oldatok abszorbanciáját 595 nm-es hullámhosszon. A zavarosság fordítottan arányos a fejlődésgátlással. A mikrodilúciós vizsgálatokat a *Staphylococcus aureus* fejlődésének felmérésére, valamint a *Serratia marcescens* fejlődésének és pigmenttermelésének becslésére alkalmaztuk, utóbbi esetben a szpektrofotometriás méréseket 492 nm-es hullámhosszon végeztük el.

A *Serratia marcescens*t tartalmazó mikrolemezeket 24 órán keresztül 25 °C fokon hagytuk, míg a *Staphylococcus aureus*szal beoltott mikrolemezeket 24 órán át 37 °C fokon inkubáltuk.

III.2.4. A biofilmképzés mértékének vizsgálata a fluoreszcein-diacetátot hidrolizáló aktivitás alapján

A biofilmképzés mértékét a biofilmet alkotó sejtek fluoreszcein-diacetátot (FDA) hidrolizáló aktivitásának felmérésével határoztuk meg.

A fluoreszcein-diacetátot (3',6'-diacetil-fluoreszcein), röviden FDA-t számos bakteriális enzim (lipázok, proteázok, észterázok stb.) képes hidrolizálni. A hidrolízis eredményeként fluoreszcein keletkezik, ami spektrofotometriásan mérhető és mennyisége egyenesen arányos a biofilmet alkotó mikroorganizmusok számával és aktivitásával. Gyors, egyszerű és érzékeny módszer, mely a mikrobiális közösségek össz-aktivitásának meghatározására alkalmas.

Az eljárás megegyezik a mikrodilúciós módszernél leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy 48-72 órás inkubálási időt alkalmaztunk, amíg kialakulhattak a biofilmek az üregek falán. Az inkubációs idő leteltével az üregek tartalmát kiöntöttük, majd a le nem tapadt sejtek eltávolítása érdekében az üregeket fiziológias sóoldattal (0,9%-os NaCl-oldat) mostuk át. Ezután az üregekbe 200 µl PBS-oldatot (foszfátpuffer, melynek pH-ja 7,4 és összetétele: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄; 1000 ml H₂O) és 1 µl FDA-oldatot (2 mg FDA/ml acetone) adagoltunk és a mikrolemezeket rázógépen 3 órán keresztül ráztuk (9. ábra).

A szintelen FDA hidrolíziséből keletkezett zölden fluoreszkáló fluoreszcein mennyiségét 490 nm-es hullámhosszon mért abszorbancia-értékekből kalibrációs görbe (0-20 µg fluoreszcein/ml) segítségével határoztuk meg. Az FDA-hidrolízis mértékéből következtettünk a biofilm állapotára.



9. ábra: Az FDA módszer kivitelezése mikrolemezen

III.3. Az adatok statisztikai feldolgozása

A statisztikai összehasonlítás során mindegyik fémkomplex esetében vizsgáltuk az alkalmazott mennyiségek hatását a fejlődés vagy mikrobiális folyamatok (pigmenttermelés, biofilmképzés) mértékére. Az összehasonlítások során azt vizsgáltuk, hogy az alkalmazott mennyiségek esetén mért abszorbancia-értékek eltér-e a kontrolltól, azaz a 0 µg/ml-től. A változatok összehasonlítására lineáris modelleket használtunk, ahol a függő változó az abszorbancia volt, míg a magyarázó változó a mennyiség. Ennek a megközelítésnek a

használata azért volt indokolt, mert a kontrollal együtt 12 különböző mennyiséggel dolgoztunk, ami megfelelő erősségű módszert igényelt. A lineáris modell nem feltételezi a varianciák homogenitását, ezért, ha a kiugró értékek, valamint a maradékok eloszlásának vizsgálata megfelelő illeszkedést mutat, a modell eredményei megbízhatónak mondhatók. A főhatást (mennyiség) a modell ANOVA táblázata segítségével vizsgáltuk. Amennyiben volt szignifikáns főhatás, lineáris hipotézistesztet végeztünk, hogy megnézzük a kontrolltól (0 µg/ml) való eltérést.

A fémkomplexek egymáshoz viszonyított hatását 50 µg/ml koncentrációk esetében vizsgáltuk, szintén a fent bemutatott módszer segítségével.

A gátlások vizsgálata során, mivel mindegyik esetben az összehasonlított csoportok száma kisebb volt mint 5, az adatok normalitását és variancia-homogenitását ellenőriztük, majd a csoportok közötti összehasonlítást egyutas-ANOVA-val és Tukey post-hoc teszttel végeztük.

A statisztikai elemzésekhez az R környezetet (verz. 4.2.2) alkalmaztuk (R Core Team, 2022). Az adatrendezéshez a *dplyr* csomagot (Wickham et al. 2022), a vizualizációhoz a *ggplot2* csomagot használtuk (Wickham 2016). A lineáris modellek illeszkedésének vizsgálatát a *DHARMA* csomag (Hartig, 2022) segítségével, míg a lineáris hipotézisteszteket az *emmeans* csomag segítségével végeztük (Lenth 2023).

IV. Eredmények és kiértékelésük

A 7 rézkomplex hatását a *Staphylococcus aureus* és a *Serratia marcescens* baktériumtörzsek fejlődésére és aktivitására háromféle módszerrel vizsgáltuk meg.

IV.I. A korongdiffúziós módszer által kapott gátlási zónák átmérőinek összehasonlítása

A *Staphylococcus aureus* és az *Serratia marcescens* eltérő érzékenységet mutatott a vizsgált komplexek iránt.

IV.I.I. A *Staphylococcus aureus* fejlődésére vonatkozó eredmények

A fémkomplexek okozta gátlás vizsgálata során azt találtuk, hogy a *Staphylococcus aureus* esetén 5 rézkomplex bizonyult hatékonyak: az 1956, 1958, 1959, 2225 és 2285 jelölésű komplexek (2. táblázat). A 2285-ös fémkomplex okozta a legnagyobb gátlást (10. ábra; $Df_{\text{komplex}} = 3$, $Df_{\text{maradék}} = 20$, $F = 45.1$, $P < 0.001$), amely szignifikánsan nagyobb volt az összes fémkomplex okozta gátlásnál, míg a többi fémkomplex fejlődésgátló hatása között nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést (10. ábra). A 0 érték a 2. táblázatban azt jelenti, hogy nem volt megfigyelhető gátlás, tehát a baktérium rezisztens a hatóanyag általunk alkalmazott mennyiségére.

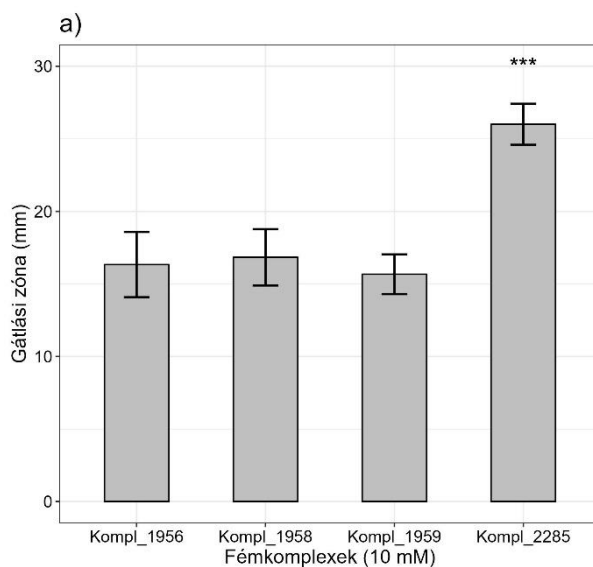
2. táblázat: A kísérletben használt rézkomplexek által okozott gátlási zónák mérete a *Staphylococcus aureus* esetén

Anyag	Gátlási zóna átmérőjének átlaga (mm)	Koncentráció	Mennyiség
1956	16,33	10 mM	30 µl
1958	16,83		
1959	15,66		
1960	0		
2285	26		
2225	12,66	2 mM	5 µl
	14,33		10 µl
	15,41		20 µl
2219	0		5, 10, 20 µl

A 1960-as, (metil-pentil-dioxim)(butil-NH) ligandumot tartalmazó vegyület és az 2219-as, butirofenon-szemikarbazon-tartalmú rézkomplexek nem voltak hatékonyak a baktérium fejlődésének gátlásában.

A vizsgált rézkomplexek közül a ligandumként naftilamint tartalmazó 2285-ös rézkomplex bizonyult a leghatékonyabbnak a *Staphylococcus aureus* törzzsel szemben, 26 mm-es gátlási zónát eredményezve (2. táblázat, 11. ábra), amely szignifikánsan nagyobb volt az összes 10 mM-os törzsoldat formájában használt fémkomplex okozta gátlásnál. amelyek megközelítőleg 15-17 mm-es gátlási zónákat alakítottak ki.

A 2 mM-os oldat formájában tesztelt butirofenon-szemikarbazont tartalmazó 2225-ös rézkomplex esetén megfigyelhető, hogy a mennyiségek növelésével az antibakteriális hatás fokozódik. Tekintettel arra, hogy ez a hatóanyag kisebb moláris koncentrációban volt alkalmazva, megállapítható, hogy szintén erőteljes gátlást váltott ki.



10. ábra: A fémkomplexek okozta gátlási zónák összehasonlítása

Az oszlopok magassága az átlagot, míg a hibamutatók a szórást jelölik. Szignifikancia szintek: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$



11. ábra: Gátlási zónák kialakulása a 2285-ös rézkomplex esetén

IV.I.II. A *Serratia marcescens* fejlődésére vonatkozó eredmények

A *Serratia marcescens* esetén a fejlődésen kívül, vizsgáltuk az egyes fémkomplexek hatását a quorum sensing szabályozó rendszerekre is, viszont a QS-rendszerek megzavarására utaló fehér telepeket mutató zónák átmérőit között nem találtunk szignifikáns eltérést (12.

ábra; $Df_{\text{komplex}} = 4$, $Df_{\text{maradék}} = 5$, $F = 2.17$, $P = 0.1$). Ebben az esetben is 5 rézkomplex bizonyult hatékonynak a QS-rendszerek megzavarásában: az 1956, 1958, 1959, 1960, 2285 (3. táblázat). Az 1960 rézkomplex a *S.aureus* és a *S. marcescens* fejlődésének gátlásában nem volt hatásos, viszont negatív hatást fejtett ki a *S. marcescens* QS-rendszereire.

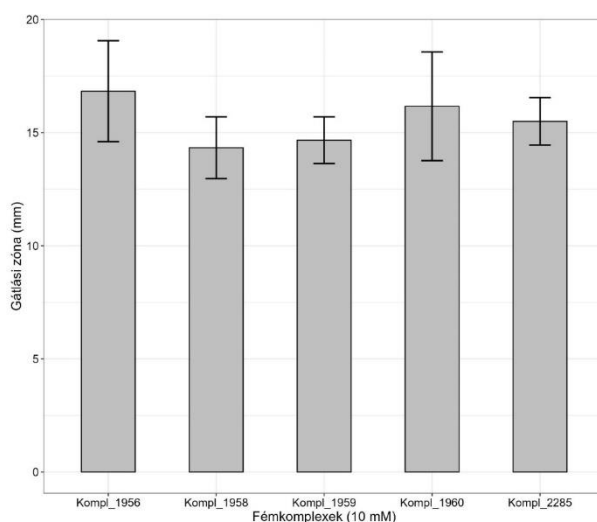
3. táblázat: A kísérletben használt rézkomplexek által okozott QS-gátlási zónák mérete a *Serratia marcescens* esetén

Anyag	Gátlási zónák átmérőinek átlaga (mm)	Koncentráció	Mennyiség
1956	16,83	10 mM	30 μ l
1958	14,33		
1959	14,66		
1960	16,16		
2285	15,5		
2219	0	2 mM	5, 10, 20 μ l
2225			

A 2225 és 2219 rézkomplexek nem voltak hatékonyak az általunk alkalmazott mennyiségekben, nem kaptunk gátlást, tehát a baktérium rezisztens, habár a 2225-ös butirofenon-tioszemikarbazon tartalmú rézkomplex a *S.aureus*-nál hatásosnak bizonyult. A baktériumellenes hatás elmaradása, annak is betudható, hogy ezek kisebb moláros koncentrációban voltak alkalmazva.

Figyelembe véve, hogy a tesztelt rézkomplexek közül egyesek negatív hatást fejtettek ki a *S. aureus* szaporodására, míg a *S. marcescens* növekedésére nem voltak hatással, megállapítható, hogy hipotéziseinknek megfelelően a *S. aureus* érzékenyebbnek bizonyult mint a *S. marcescens* a korongdiffúziós módszer eredményei alapján.

A *Serratia marcescens* esetében a réztartalmú anilinszármazék (1956-os komplex) fejtette ki a legerőteljesebb gátló hatást, 16,83 mm-es QS-gátlási zónát eredményezve (3. táblázat, 13. ábra).



12. ábra: Fémkomplexek hatása a *S. marcescens* quorum sensing rendszereire
Az oszlopok magassága az átlagokat, a hibamutatók a szórást jelölik



13. ábra: Gátlási zónák kialakulása az 1956-os rézkomplex esetén

IV.II. A mikrodilúciós módszerrel kapott fejlődésgátlás mértékének összehasonlítása

Kísérleteink során a két baktérium érzékenységét a korongdiffúziós módszer során pozitív eredményt mutató hatóanyagok 12 különböző mennyisége (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 és 100 µg/ml) esetén is vizsgáltuk. A mennyiségek növelésével azt várnánk, hogy a gátlás mértéke növekedjen és a zavarosság, vagyis a baktériumok fejlődésének mértéke csökkenjen.

IV.II.I. A *Staphylococcus aureus* fejlődése a hatóanyagok jelenlétében

A *S. aureus* esetén kapott eredményeink alapján a különböző fémkomplexek egy bizonyos mennyiségénél a gátlás mértéke szignifikáns volt és ahogy növeltük a mennyiséget a gátlás mértéke is növekedett.

Adataink alapján azt találtuk, hogy a 2285-ös fémkomplex kivételével mindegyik fémkomplexnek volt hatása a baktériumok szaporodására (4. táblázat).

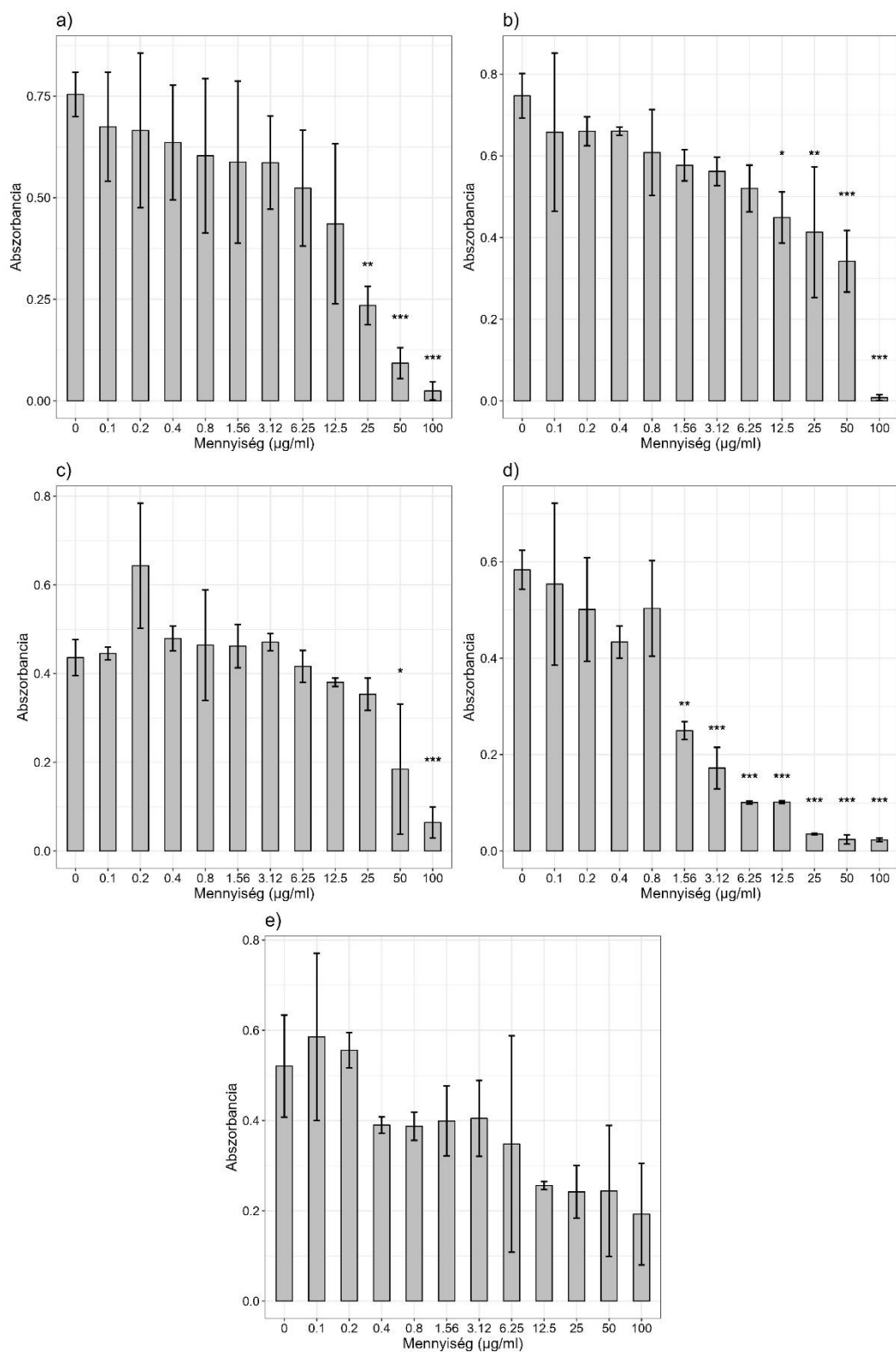
4. táblázat: Az egyes fémkomplexek főhatásai az abszorbania értékekre (*abszorbancia* ~ *mennyiség* lineáris modellek ANOVA táblázata)

	Szabadsági fok	F-érték	P-érték
Fémkomplex 1956			
Mennyiség	11	8.99	<0,001
Maradék	24		
Fémkomplex 1958			
Mennyiség	11	15.07	<0,001
Maradék	24		
Fémkomplex 1959			
Mennyiség	11	12.04	<0,001
Maradék	24		
Fémkomplex 2225			
Mennyiség	11	33.32	<0,001
Maradék	24		
Fémkomplex 2285			
Mennyiség	11	3.79	0.003
Maradék	24		

Az 1956-os fémkomplex esetében azt találtuk, hogy a kontrolltól (0 $\mu\text{g/ml}$) a 25, 50 és 100 $\mu\text{g/ml}$ tért el szignifikánsan (14. ábra). Az 1958-as fémkomplex esetében azt tapasztaltuk, hogy a kontrolltól való szignifikáns eltérés a 12,5, 25, 50 és 100 $\mu\text{g/ml}$ mennyiségek esetén figyelhető (14. ábra). Az 1959-es fémkomplex vizsgálatánál azt találtuk, hogy csak a nagyobb mennyiségek (50 és 100 $\mu\text{g/ml}$) esetén figyelhető meg szignifikáns fejlődés-csökkenés a kontrollhoz viszonyítva (14. ábra). A 2225-ös fémkomplex esetében a szignifikáns eltérések már az 1,56-os mennyiségnél jelentkeztek, tehát ez a rézkomplex volt a leghatékonyabb (14. ábra), azonban a 2285-ös fémkomplex esetében, annak ellenére, hogy a korongdiffúziós módszernél alkalmazott mennyiségben hatásosnak bizonyult, nem találtunk eltérést a kontrollhoz viszonyítva, ez volt a legkevesbé hatékony, sőt kis mennyiségeknél enyhén serkentette a baktériumok szaporodását (14. ábra). Ennek az lehet a magyarázata, hogy a korongdiffúzió során megközelítőleg 150 μg -os mennyiségben alkalmaztuk, a mikrodilúciós módszer során pedig maximálisan 100 $\mu\text{g/ml}$ -es mennyiséget használtunk.

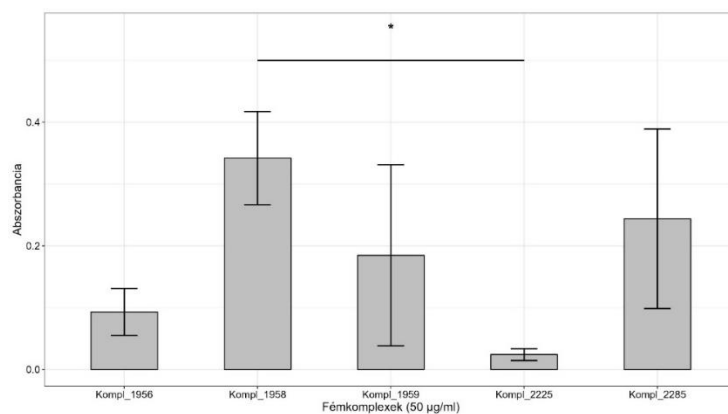
A fémkomplexek 50 $\mu\text{g/ml}$ -en való összehasonlítása során azt találtuk, hogy az 1958-as mennyiség eltért a 2225-östől, más eltérést nem tapasztaltunk (15. ábra; $Df_{\text{komplex}} = 4$, $Df_{\text{maradék}} = 10$, $F = 4,68$, $P = 0.02$).

A hatóanyagok jelenlétében megvalósuló fejlődés esetén megfigyelhető, hogy az 1958, 1959 és 2285 jelölésű rézkomplexek a mennyiségek növelésével fokozatosan gátolják a *S. aureus* fejlődését, míg az 1956-os, illetve a 2225-ös már a kisebb mennyiségeknél is egy erőteljesebb gátlást idéznek elő. Mindegyik hatóanyag esetén a nagyobb mennyiségek már legalább 50%-os gátlást fejtenek ki (16. ábra).

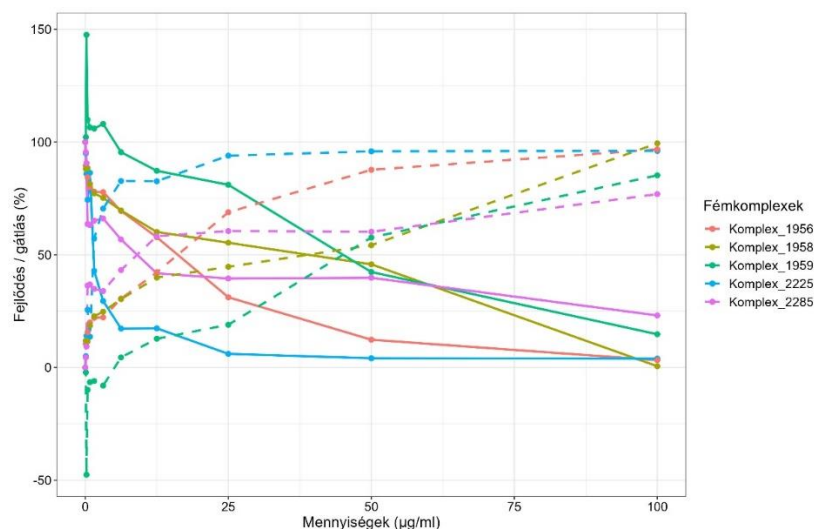


14. ábra: Az abszorbancia-értékek összehasonlítása a kontrollal (0 µg/ml) lineáris hipotézistesztet használva a *S. aureus* fejlődése esetén

a) Fémkomplex 1956, b) Fémkomplex 1958, c) Fémkomplex 1959, d) Fémkomplex 2225, e) Fémkomplex 2285. Szignifikancia szintek: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Az oszlopok magassága az átlagot, a hibamutatók a szórást jelölik



15. ábra: Az egyes fémkomplexek 50 µg/ml-es mennyisége által kiváltott hatásának összehasonlítása



16. ábra: Az egyes fémkomplexek hatása a fejlődésre (folytonos vonal) és a gátlás mértéke (szaggatott vonal) a *S. aureus* esetén

IV.II.II. *Serratia marcescens* fejlődése és pigmenttermelése a hatóanyagok jelenlétében

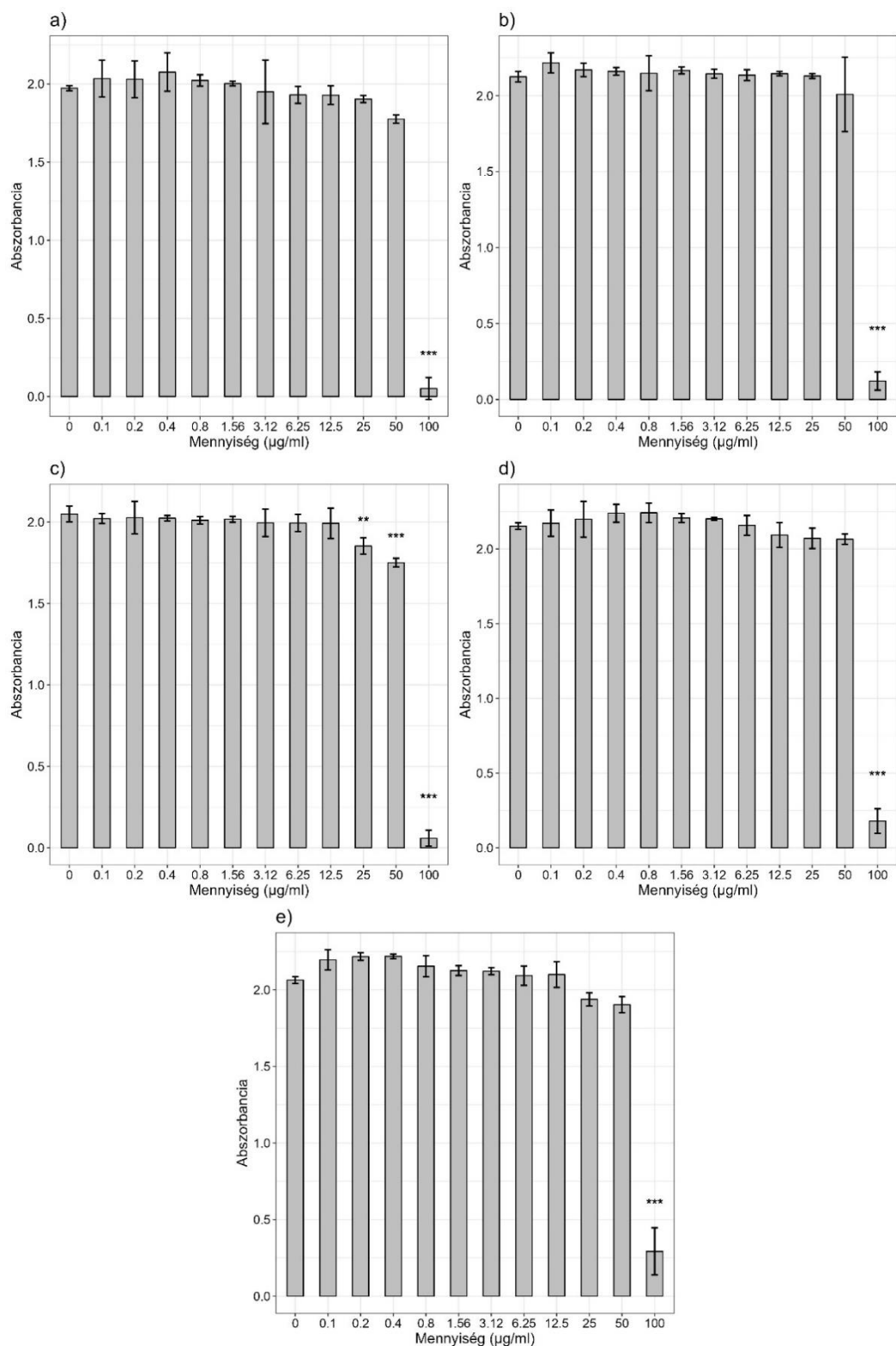
A *Serratia* fejlődésének vizsgálata során azt találtuk, hogy mindegyik vizsgált fémkomplex esetén csak a 100 µg/ml-ben alkalmazott mennyiség váltott ki erőteljes gátlást a baktériumok szaporodására, szignifikánsan eltérve a kontrolltól, tehát ezek az adatok is alátámasztják azt a megfigyelést, hogy a *Serratia* kevésbé volt érzékeny a *S. aureus*hoz viszonyítva (5. táblázat, 17. ábra).

5. táblázat: Az egyes fémkomplexek főhatásai a mért abszorbanciára
(*abszorbancia ~ mennyiség* lineáris modellek ANOVA táblázata)

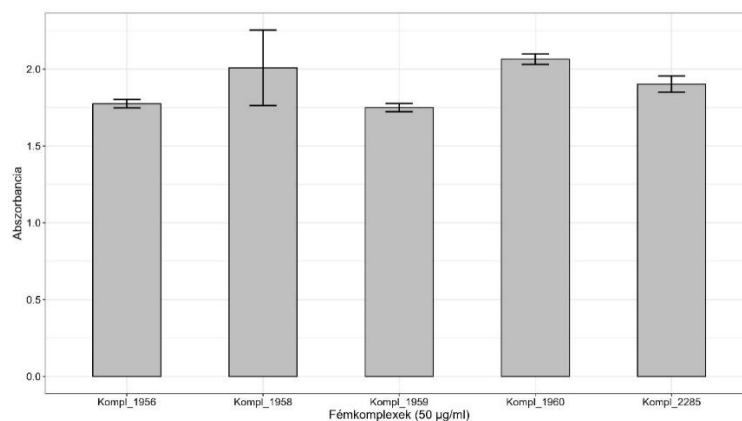
	Szabadsági fok	F-érték	P-érték
Fémkomplex 1956			
Mennyiség	11	113.77	<0,001
Maradék	24		
Fémkomplex 1958			
Mennyiség	11	139.32	<0,001
Maradék	24		
Fémkomplex 1959			
Mennyiség	11	291.46	<0,001
Maradék	24		
Fémkomplex 1960			
Mennyiség	11	216.69	<0,001
Maradék	24		
Fémkomplex 2285			
Mennyiség	11	197.19	<0,001
Maradék	24		

A fémkomplexek 50 µg/ml-en való összehasonlításánál nem találtunk szignifikáns különbséget a fémkomplexek fejlődésre gyakorolt hatása között (18. ábra; $Df_{\text{komplex}} = 4$, $Df_{\text{maradék}} = 10$, $F = 7.86$, $P < 0.004$).

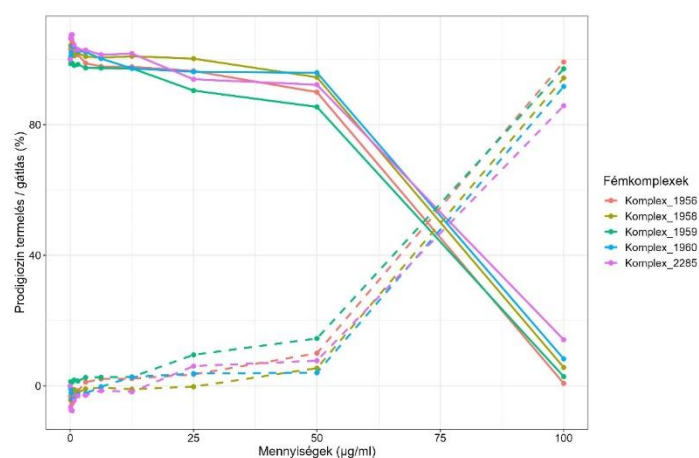
Általánosan elmondható, hogy a hatóanyagok mennyiségének növelésével egy fokozatos csökkenő tendencia figyelhető meg a *S. marcescens* prodigiozintermelő képességében, az 50 µg/ml mennyiségtől kezdődően egy erőteljesebb gátlás figyelhető meg (19. ábra).



17. ábra: Az abszorbancia-értékek összehasonlítása a kontrollal (0 µg/ml) lineáris hipotézistesztet használva a *S. marcescens* fejlődése esetén
a) Fémkomplex 1956, b) Fémkomplex 1958, c) Fémkomplex 1959, d) Fémkomplex 1960,
e) Fémkomplex 2285. Szignifikancia szintek: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Az oszlopok magassága az átlagot, a hibamutatók a szórást jelölik



18. ábra: Az egyes fémkomplexek 50 µg/ml-es mennyiségei által fejlődésre gyakorolt hatásának összehasonlítása a *S. marcescens* esetén



19. ábra: Az egyes fémkomplexek okozta hatás a prodigiozintermelésre a *S. marcescens* esetén
pigmenttermelés - folytonos vonal, gátlás - szaggatott vonal

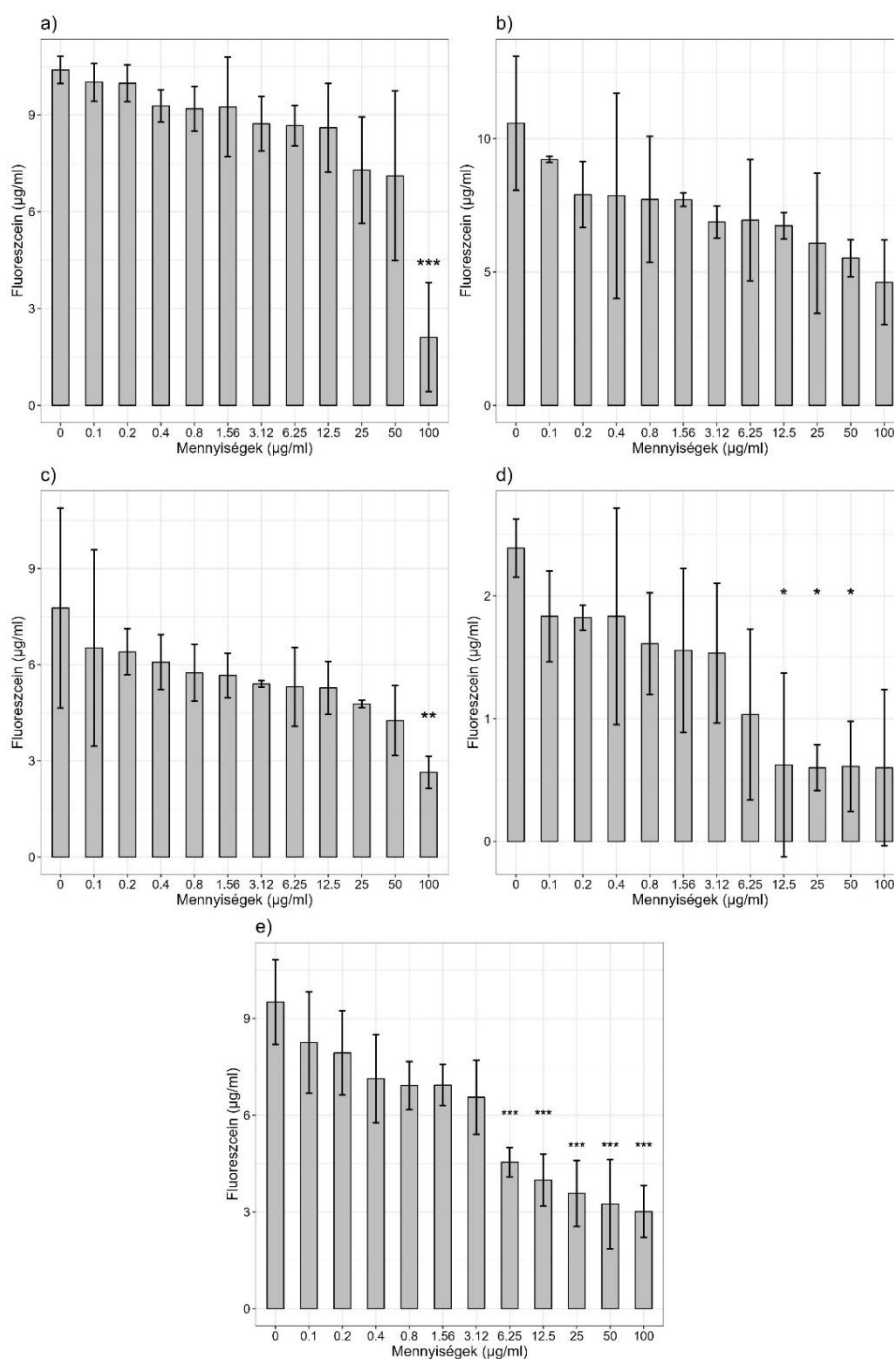
IV.III. A rézkomplexek hatása a bakteriális biofilmképzésre

IV.III.I. A *Staphylococcus aureus* biofilmképzése a hatóanyagok jelenlétében

Az 1956-os fémkomplex esetében egy szignifikáns eltérést találtunk, amely a 100 µg/ml mennyiségnél jelentkezett, tehát a maximális mennyiség szignifikánsan csökkentette a *S. aureus* baktérium biofilmképzését, erre utalnak a kisebb fluorezcsein mennyiségek is (20. ábra; $Df_{\text{koncentráció}} = 11$, $Df_{\text{maradék}} = 24$, $F = 9.06$, $P < 0.001$). Az 1958-as fémkomplex esetében nem találtunk szignifikáns eltéréseket a kontrollhoz viszonyítva (20. ábra; $Df_{\text{koncentráció}} = 11$, $Df_{\text{maradék}} = 24$, $F = 2.58$, $P = 0.17$). Az 1959-es fémkomplex esetében, a a 100 µg/ml esetén volt szignifikáns eltérés a kontrolltól (20. ábra; $Df_{\text{koncentráció}} = 11$, $Df_{\text{maradék}} = 24$, $F = 2.29$, $P = 0.04$). A 2225-ös fémkomplex esetében három szignifikáns eltérést találtunk a kontrollhoz képest, amely szerint már a 12,5 µg/ml mennyiségtől kezdődően jelentősen gátolta a baktériumok biofilmképzését (20. ábra; $Df_{\text{koncentráció}} = 11$, $Df_{\text{maradék}} = 24$, $F = 3.89$, $P = 0.002$). A legerőteljesebb gátlás a *S. aureus* biofilmképzésére a 2285-ös fémkomplex esetében észlelhető, a szignifikáns eltérések már a 6,25 µg/ml-es mennyiségtől kezdődően figyelhetők meg (20. ábra; $Df_{\text{koncentráció}} = 11$, $Df_{\text{maradék}} = 24$, $F = 11.97$, $P < 0.001$).

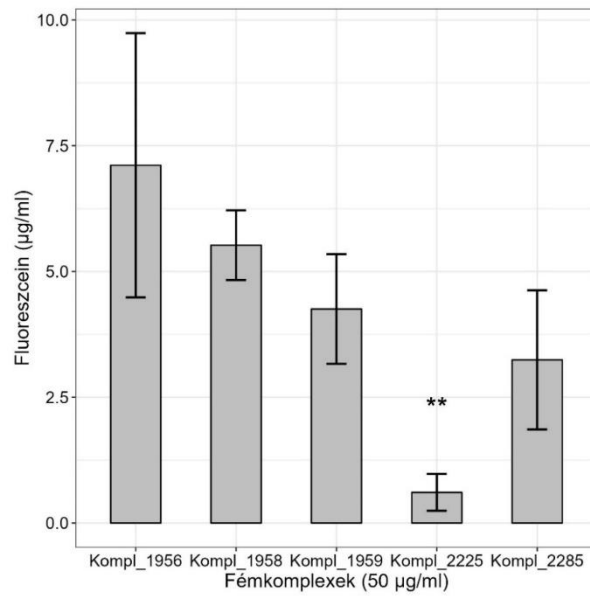
Az egyes fémkomplexek 50 µg/ml koncentráción való összehasonlítása során a 2225-ös komplex értékei szignifikánsan kisebbek voltak a többi fémkomplex értékeinél, ami szintén arra utal, hogy ez a vegyület jó QS rendszer által szabályozott biofilm-gátlónak bizonyul (21. ábra; $Df_{\text{fémkomplex}} = 4$, $Df_{\text{maradék}} = 10$, $F = 8.47$, $P = 0.002$).

A hatóanyagok jelenlétében megvalósuló biofilmképzés esetén megfigyelhető, hogy az 1956, 1958 és 1959 jelölésű rézkomplexek, amelyek mindegyikének ligandumában metil-pentil-dioxim található, a mennyiségek növelésével fokozatosan gátolják a *S. aureus* biofilmképzését, míg a tioszemikarbazont tartalmazó 2225-ös, illetve a 2285-ös naftilamin-származékok már a kisebb mennyiségeknél is egy erőteljesebb gátlást idéznek elő (22. ábra).

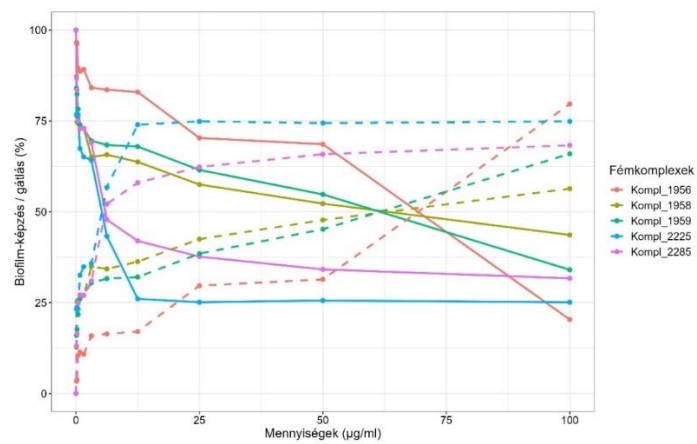


20. ábra: A *S. aureus* biofilmképzésének mértéke a hatóanyagok jelenlétében lineáris hipotézist használva

a) Fémkomplex 1956, b) Fémkomplex 1958, c) Fémkomplex 1959, d) Fémkomplex 2225, e) Fémkomplex 2285. Szignifikancia szintek: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Az oszlopok magassága az átlagot, a hibamutatók a szórást jelölik



21. ábra: Az egyes fémkomplexek 50 µg/ml mennyiségei által a biofilmképzésre gyakorolt hatásának összehasonlítása a *S. aureus* esetén

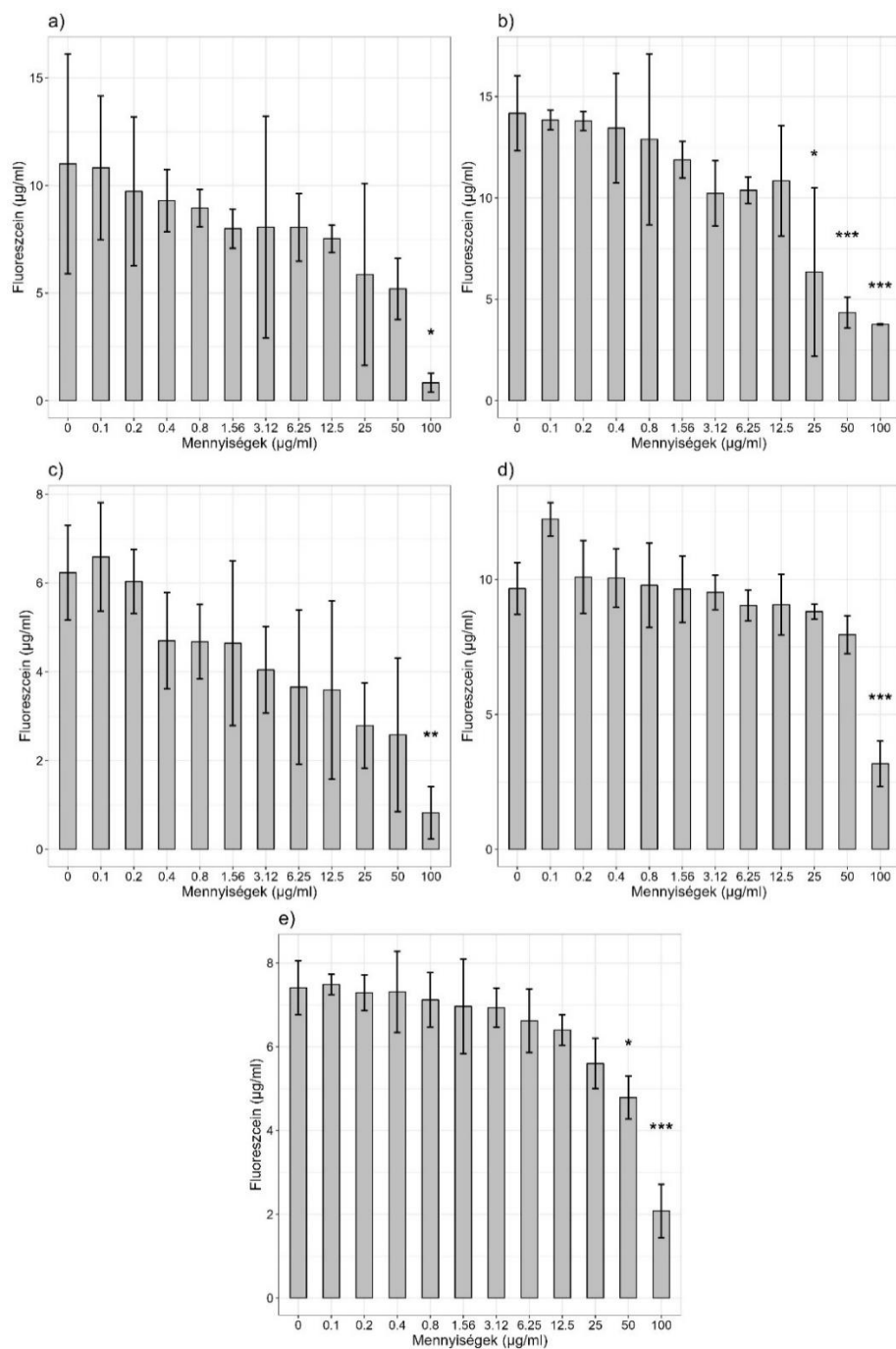


22. ábra: Az egyes fémkomplexek hatása a *S. aureus* biofilmképzésére biofilmképzés - folytonos vonal, gátlás - szaggatott vonal

IV.III.II. A *Serratia marcescens* biofilmképzése a hatóanyagok jelenlétében

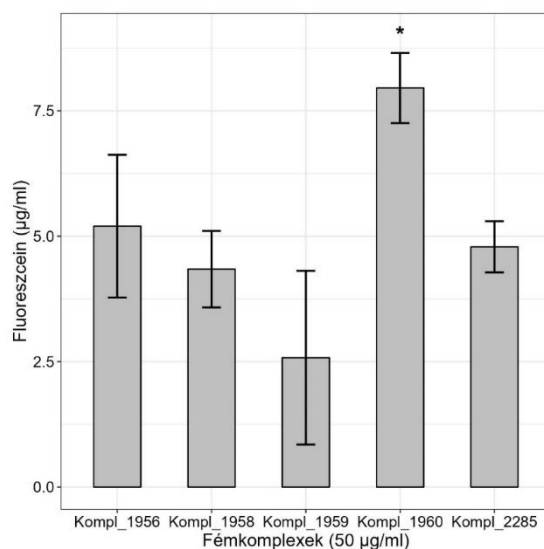
Az 1956-os fémkomplex esetében egy szignifikáns eltérést találtunk, amely a 100 µg/ml mennyiségnél jelentkezett (23. ábra; $Df_{\text{koncentráció}} = 11$, $Df_{\text{maradék}} = 24$, $F = 2.74$, $P = 0.01$). Az 1958-as fémkomplex esetében a kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltérés a 25, 50 és 100 µg/ml koncentrációk esetében jelentkezett, ami arra utal, hogy itt erőteljesebb gátlás figyelhető meg a baktérium biofilmképzésére (23. ábra; $Df_{\text{koncentráció}} = 11$, $Df_{\text{maradék}} = 24$, $F = 8.6$, $P < 0.001$). Az 1959-es fémkomplex és 1960-as fémkomplex esetében csak a legnagyobb, 100 µg/ml mennyiség esetén találtunk szignifikáns eltérést a kontrollhoz viszonyítva (23. ábra; $Df_{\text{koncentráció}} = 11$, $Df_{\text{maradék}} = 24$, $F = 4.8$, $P < 0.001$, illetve $Df_{\text{koncentráció}} = 11$, $Df_{\text{maradék}} = 24$, $F = 14.04$, $P < 0.001$). A 2285-ös fémkomplex esetében a szignifikáns eltérések az 50 és 100 µg/ml mennyiség esetében jelentkeztek (23. ábra; $Df_{\text{koncentráció}} = 11$, $Df_{\text{maradék}} = 24$, $F = 16.8$, $P < 0.001$). Általánosan elmondható, hogy a hatóanyagok mennyiségének növelésével egy fokozatos csökkenő tendencia figyelhető meg a *S. marcescens* biofilmképző képességében, de csak a nagyobb mennyiségek váltanak ki szignifikáns gátlást a kontrollhoz viszonyítva (25. ábra).

Az egyes fémkomplexek 50 µg/ml mennyisége által kiváltott hatás összehasonlítása során az 1960-as fémkomplex esetében magasabb értékeket mértünk (24. ábra; $Df_{\text{fémkomplex}} = 4$, $Df_{\text{maradék}} = 10$, $F = 8.91$, $P = 0.002$), ami megerősíti azt, hogy ennek a hatóanyagnak nincs jelentős gátló hatása a *S. marcescens* biofilmképzésére és ennél a mennyiségnél a gátlás nem éri el az 50%-ot sem.

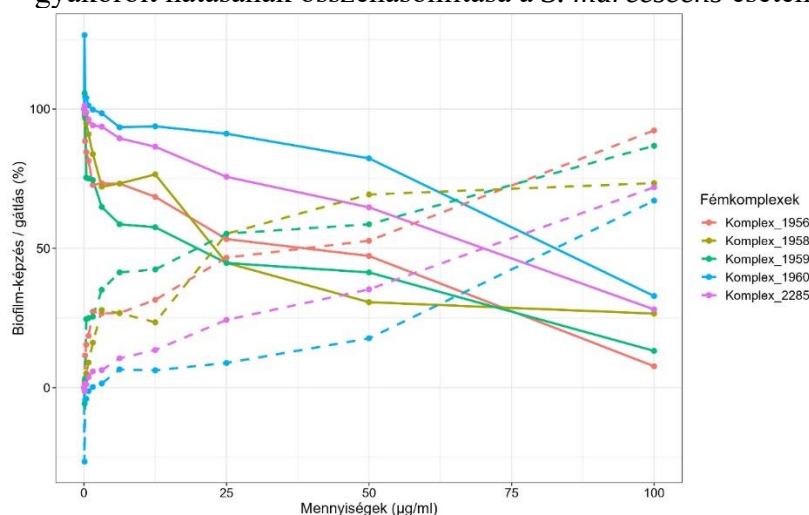


23. ábra: A *S. marcescens* biofilmképzésének mértéke a hatóanyagok jelenlétében lineáris hipotézistestet használva

a) Fémkomplex 1956, b) Fémkomplex 1958, c) Fémkomplex 1959, d) Fémkomplex 1960, e) Fémkomplex 2285. Szignifikancia szintek: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Az oszlopok magassága az átlagot, a hibamutatók a szórást jelölik



24. ábra: Az egyes fémkomplexek 50 µg/ml mennyiségei által a biofilmképzésre gyakorolt hatásának összehasonlítása a *S. marcescens* esetén



25. ábra: Az egyes fémkomplexek hatása a *S. marcescens* biofilmképzésére
biofilmképzés - folytonos vona, gátolás - szaggatott vonal

Következtetések

1. Mindkét vizsgált baktériumtörzs fejlődését és aktivitását egyes rézkomplexek negatívan befolyásolták. A mennyiségek növelésével bizonyos anyagoknál az antibakteriális hatás fokozódása figyelhető meg.
2. A Gram-pozitív *Staphylococcus aureus* érzékenyebbnek bizonyult mint a Gram-negatív *Serratia marcescens*.
3. A vizsgált rézkomplexek közül a ligandumként butirofenon-tioszemikarbazont tartalmazó 2225-ös, illetve a naftilamint tartalmazó 2285-ös bizonyult a leghatékonyabbnak a *Staphylococcus aureus* törzs fejlődésének és biofilmképzésének gátlásában.
4. A *Serratia marcescens* esetében az 1956-os anilinszármazék, az 1958-as amino-propanol tartalmú, illetve a pentil-amint tartalmazó 1959-es rézkomplex nagyobb mennyiségei fejtettek ki erőteljesebb gátló hatást a baktérium aktivitására és biofilmképzésére, megzavarva a QS rendszerek működését.

Kitekintések

A komplexek további vizsgálatokra szorulnak, ugyanis alkalmazásuk az emberi szervezetre is káros hatással lehet. Jelen komplexek esetében is szükséges a sejtenyészetekre kifejtett hatás vizsgálata, ugyanis a nem megfelelő használatuk különböző sejtkárosodásokhoz vezethet.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Papp Juditnak a szakdolgozatom megírásához nyújtott segítségéért, türelméért és útbaigazításaiért.

Irodalomjegyzék

- Aggarwal, C., Paul, S., Tripathi, V., Paul, B., & Khan, M. A. (2017). Characterization of putative virulence factors of *Serratia marcescens* strain SEN for pathogenesis in *Spodoptera litura*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 143, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.12.004>
- Araújo, H. W. C., Andrade, R. F. S., Montero-Rodríguez, D., Rubio-Ribeaux, D., Alves Da Silva, C. A., & Campos-Takaki, G. M. (2019). Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1046-0>
- Argüello, J. M., Raimunda, D., & Padilla-Benavides, T. (2013). Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(11), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00073>
- Barta Holló, B., Szilágyi, I. M., Várhelyi, C., Hunyadi, D., Nagy, R. I., Tihi, N. G., Goga, F., Papp, J., Szalay, R., & Pokol, G. (2017). Synthesis, physico-chemical characterization and bacteriostatic study of Pt complexes with substituted amine ligands. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 127(2), 1733–1741. <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5591-7>
- Benedik, M. J., & Strych, U. (1998). *Serratia marcescens* and its extracellular nuclease. *FEMS Microbiology Letters*, 165(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00234-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00234-1)
- Bottari, B., Maccari, R., Monforte, F., Ottanà, R., Rotondo, E., & Vigorita, M. G. (2000). Isoniazid-related copper(II) and nickel(II) complexes with antimycobacterial *in vitro* activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 10(7), 657–660. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00058-5](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00058-5)
- Calvo, J., Jung, H., & Meloni, G. (2017). Copper metallothioneins. *IUBMB Life*, 69(4), 236–245. <https://doi.org/10.1002/iub.1618>
- Carbonell, G. V., Della Colleta, H. H. M., Yano, T., Darini, A. L. C., Levy, C. E., & Fonseca, B. A. L. (2000). Clinical relevance and virulence factors of pigmented *Serratia marcescens*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 28(2), 143–149. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(00\)00146-2](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(00)00146-2)
- Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., & Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, 407(6802), 340–348. <https://doi.org/10.1038/35030019>
- Cermak, S. C., Biresaw, G., Isbell, T. A., Evangelista, R. L., Vaughn, S. F., & Murray, R. (2013). New crop oils-properties as potential lubricants. *Industrial Crops and Products*, 44, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.035>
- Chambers, H. F., & DeLeo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 629–641. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>
- Chemaly, R. F., Rathod, D. B., Sikka, M. K., Hayden, M. K., Hutchins, M., Horn, T., Tarrand, J., Adachi, J., Nguyen, K., Trenholme, G., & Raad, I. (2011). *Serratia marcescens* bacteremia because of contaminated prefilled heparin and saline syringes: A multi-state report. *American Journal of Infection Control*, 39(6), 521–524. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2010.08.020>
- Chen, B. L., Mok, K. F., Ng, S. C., & Drew, M. G. B. (1999). Syntheses, structures and properties of copper(II) complexes with thiophene-2,5-dicarboxylic acid (H₂Tda) and nitrogen-containing ligands. *Polyhedron*, 18(8–9), 1211–1220. [https://doi.org/10.1016/S0277-5387\(98\)00418-5](https://doi.org/10.1016/S0277-5387(98)00418-5)
- Cherdtrakulkiat, R., Boonpangrak, S., Sinthupoom, N., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., & Prachayasittikul, V. (2016). Derivatives (halogen, nitro and amino) of 8-hydroxyquinoline with highly potent antimicrobial and antioxidant activities. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 6, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.03.014>
- Chohan, Z. H., Praveen, M., & Ghaffar, A. (1998). Synthesis, characterisation and biological role of anions (nitrate, sulphate, oxalate and acetate) in Co(II), Cu(II) and Ni(II) metal chelates of some Schiff base derived amino acids. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry*, 28(10), 1673–1687. <https://doi.org/10.1080/00945719809349422>
- Clements, T., Ndlovu, T., Khan, S., & Khan, W. (2019). Biosurfactants produced by *Serratia* species: Classification, biosynthesis, production and application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(2), 589–602. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9520-5>

- Desoize, B. (2004). Metals and metal compounds in cancer treatment. *Anticancer Research*, 24(3 A), 1529–1544.
- Deurenberg, R. H., & Stobberingh, E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(6), 747–763. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.007>
- Dixit, R. B., Vanparia, S. F., Patel, T. S., Jaganib, C. L., Doshi, H. V., & Dixit, B. C. (2010). Synthesis and antimicrobial activities of sulfonohydrazide-substituted 8-hydroxyquinoline derivative and its oxinates. *Applied Organometallic Chemistry*, 24(5), 408–413. <https://doi.org/10.1002/aoc.1631>
- Efthimiadou, E. K., Thomadaki, H., Sanakis, Y., Raptopoulou, C. P., Katsaros, N., Scorilas, A., Karaliota, A., & Psomas, G. (2007). Structure and biological properties of the copper(II) complex with the quinolone antibacterial drug N-propyl-norfloxacin and 2,2'-bipyridine. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101(1), 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.07.019>
- Frei, A. (2020). Metal complexes, an untapped source of antibiotic potential? *Antibiotics*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020090>
- Frei, A., Zuegg, J., Elliott, A. G., Baker, M., Braese, S., Brown, C., Chen, F., G. Dowson, C., Dujardin, G., Jung, N., King, A. P., Mansour, A. M., Massi, M., Moat, J., Mohamed, H. A., Renfrew, A. K., Rutledge, P. J., Sadler, P. J., Todd, M. H., ... Blaskovich, M. A. T. (2020). Metal complexes as a promising source for new antibiotics. *Chemical Science*, 11(10), 2627–2639. <https://doi.org/10.1039/c9sc06460e>
- García-Silvera, E. E., Martínez-Morales, F., Bertrand, B., Morales-Guzmán, D., Rosas-Galván, N. S., León-Rodríguez, R., & Trejo-Hernández, M. R. (2018). Production and application of a thermostable lipase from *Serratia marcescens* in detergent formulation and biodiesel production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(2), 156–172. <https://doi.org/10.1002/bab.1565>
- Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., & König, B. (2008). Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus species* based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), 1019–1025. <https://doi.org/10.1128/JCM.02058-07>
- Gokhale, N. H., Padhye, S. B., Billington, D. C., Rathbone, D. L., Croft, S. L., Kendrick, H. D., Anson, C. E., & Powell, A. K. (2003). Synthesis and characterization of copper(II) complexes of pyridine-2-carboxamidrazones as potent antimalarial agents. *Inorganica Chimica Acta*, 349, 23–29. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(03\)00047-1](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(03)00047-1)
- Gokhale, N. H., Shirisha, K., Padhye, S. B., Croft, S. L., Kendrick, H. D., & McKee, V. (2006). Metalloantimalarials: Synthesis, X-ray crystal structure of potent antimalarial copper (II) complex of arylazo-4-hydroxy-1,2-naphthoquinone. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16(2), 430–432. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.09.061>
- Gomathy, M., & Sabarinathan, K. G. (2010). Microbial mechanisms of heavy metal tolerance- a review. *Agricultural Reviews*, 31(2), 133–138.
- Gomez-Lus, M. L., Aguilar, L., Martin, M., Gimenez, M. J., Martinez, P., & Prieto, J. (1997). Intracellular and extracellular killing of a penicillin-resistant, serotype-9 strain of *Streptococcus pneumoniae* by polymorphonuclear leucocytes in the presence of subinhibitory concentrations of clavulanic acid [6]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40(1), 142–144. <https://doi.org/10.1093/jac/40.1.142>
- Greenberg, L. (1978). *Serratia marcescens* in human affairs. *Drug Intelligence & Clinical Pharmacy*, 12(11), 674–679. <https://doi.org/10.1177/106002807801201106>
- Haas, K. L., & Franz, K. J. (2009). Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. *Chemical Reviews*, 109(10), 4921–4960. <https://doi.org/10.1021/cr900134a>
- Haddix, P. L., & Shanks, R. M. Q. (2018). Prodigiosin pigment of *Serratia marcescens* is associated with increased biomass production. *Archives of Microbiology*, 200(7), 989–999. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1508-0>
- Harris, L. G., Foster, S. J., Richards, R. G., Lambert, P., Stickler, D., & Eley, A. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review. *European Cells and Materials*, 4, 39–60. <https://doi.org/10.22203/ecm.v004a04>
- Hartig, F. (2022). *DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models*.
- Hernández-Montes, G., Argüello, J. M., & Valderrama, B. (2012). Evolution and diversity of periplasmic proteins involved in copper homeostasis in gamma proteobacteria. *BMC Microbiology*, 12, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-249>
- Ibrahim, M., Wang, F., Lou, M. miao, Xie, G. lin, Li, B., Bo, Z., Zhang, G. qing, Liu, H., & Wareth, A. (2011). Copper as an antibacterial agent for human pathogenic multidrug resistant *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(6), 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.08.017>
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(2), 60–72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>
- Jamroz, D., Coll, F., Mather, A. E., Harris, S. R., Harrison, E. M., MacGowan, A., Karas, A., Elston, T., Török, M. E., Parkhill, J., & Peacock, S. J. (2017). Evolution of mobile genetic element composition in an epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Temporal changes correlated with frequent loss and gain events. *BMC Genomics*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4065-z>
- Kanchana, S., Jeyanthi, J., Kathiravan, R., Suganya, K. (2014). Biosorption of heavy metals using algae : a review. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, 3(2), 1–6.
- Khanna, A., Khanna, M., & Aggarwal, A. (2013). *Serratia marcescens*- a rare opportunistic nosocomial pathogen and measures to limit its spread in hospitalized patients. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(2), 243–246.

<https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5010.2737>

- Kremer, E., Facchin, G., Estévez, E., Alborés, P., Baran, E. J., Ellena, J., & Torre, M. H. (2006). Copper complexes with heterocyclic sulfonamides: Synthesis, spectroscopic characterization, microbiological and SOD-like activities: Crystal structure of $[\text{Cu}(\text{sulfisoxazole})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(7), 1167–1175. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.01.042>
- Lawrance, G. A. (2009). Introduction to Coordination Chemistry. In *Introduction to Coordination Chemistry*. Wiley, Callaghan. <https://doi.org/10.1002/9780470687123>
- Lemire, J. A., Harrison, J. J., & Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 11(6), 371–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>
- Lemly, A. D. (1997). A teratogenic deformity index for evaluating impacts of selenium on fish populations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37(3), 259–266. <https://doi.org/10.1006/eesa.1997.1554>
- Lenth, R. V. (2023). *emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means*.
- Lima, E., Guerra, R., Lara, V., & Guzmán, A. (2013). Gold nanoparticles as efficient antimicrobial agents for *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-11>
- Liu, Y. Q., Yin, X. D., Ma, K. Y., Wang, Y. L., Sun, Y., Shang, X. F., Zhao, Z. M., Wang, R. X., Chen, Y. J., & Zhu, J. K. (2020). Design, synthesis, and antifungal evaluation of 8-hydroxyquinoline metal complexes against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(40), 11096–11104. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01322>
- Martins, H. F. G., Raposo, A., Baptista, I., & Almeida, J. (2015). *Serratia marcescens* osteomyelitis in Cushing's disease. *BMJ Case Reports*, 2015, 1–5. <https://doi.org/10.1136/bcr-2015-212872>
- Marty, K. B., Williams, C. L., Guynn, L. J., Benedik, M. J., & Blanke, S. R. (2002). Characterization of a cytotoxic factor in culture filtrates of *Serratia marcescens*. *Infection and Immunity*, 70(3), 1121–1128. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1121-1128.2002>
- Marzano, C., Pellei, M., Tisato, F., & Santini, C. (2012). Copper complexes as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 9(2), 185–211. <https://doi.org/10.2174/187152009787313837>
- Mekahlia, S., & Bouzid, B. (2009). Chitosan-Copper (II) complex as antibacterial agent: synthesis, characterization and coordinating bond-activity correlation study. *Physics Procedia*, 2(3), 1045–1053. <https://doi.org/10.1016/j.phpro.2009.11.061>
- Montes, S., Rivera-Mancia, S., Diaz-Ruiz, A., Tristan-Lopez, L., & Rios, C. (2014). Copper and copper proteins in Parkinson's disease. In Yang, Y. (Ed.) *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Hindawi Publishing Corporation, London. <https://doi.org/10.1155/2014/147251>
- Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology*, 17(1), 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.004>
- Papp, J. (2009) *Általános Mikrobiológia I.* Kriterion, Kolozsvár.
- Patole, J., Sandbhor, U., Padhye, S., Deobagkar, D. N., Anson, C. E., & Powell, A. (2003). Structural chemistry and *in vitro* antitubercular activity of acetylpyridine benzoyl hydrazone and its copper complex against *Mycobacterium smegmatis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13(1), 51–55. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00855-7](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00855-7)
- Pinna, A., Usai, D., Sechi, L. A., Carta, A., & Zanetti, S. (2011). Detection of virulence factors in *Serratia* strains isolated from contact lens-associated corneal ulcers. *Acta Ophthalmologica*, 89(4), 382–387. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2009.01689.x>
- Porcheron, G., Garénaux, A., Proulx, J., Sabri, M., & Dozois, C. M. (2013). Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: Correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3(DEC), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00090>
- Preobrazhenskaya, Y. V., Voskoboev, A. I., & Burd, V. N. (2003). Hydrolysis of phosphoester bond by the heme-independent chloroperoxidase from *Serratia marcescens*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 29(6), 556–559. <https://doi.org/10.1023/B:RUBI.0000008896.40862.d6>
- Qin, Q. P., Chen, Z. F., Qin, J. L., He, X. J., Li, Y. L., Liu, Y. C., Huang, K. Bin, & Liang, H. (2015). Studies on antitumor mechanism of two planar platinum(II) complexes with 8-hydroxyquinoline: Synthesis, characterization, cytotoxicity, cell cycle and apoptosis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 92(2), 5–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.12.052>
- R Core Team. (2022). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.
- Rodrigues, A. P., Holanda, A. R. M., Lustosa, G. P., Nóbrega, S. M. B., Santana, W. J., Souza, L. B. S., & Coutinho, H. D. M. (2006). Virulence factors and resistance mechanisms of *Serratia marcescens*: A short review. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 53(1), 89–93. <https://doi.org/10.1556/AMicr.53.2006.1.6>
- Rosenfeld, Y., & Shai, Y. (2006). Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: Role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(9), 1513–1522. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.017>
- Rosut, T., Pahontu, E., Pasculescu, S., Georgescu, R., Stanica, N., Curaj, A., Popescu, A., & Leabu, M. (2010). Synthesis, characterization antibacterial and antiproliferative activity of novel Cu(II) and Pd(II) complexes with 2-hydroxy-8-R-tricyclo[7.3.1.0.2,7]tridecane-13-one thiosemicarbazone. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(4), 1627–1634. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.015>
- Rusyniak, D. E., Arroyo, A., Acciani, J., Froberg, B., Kao, L., & Furbee, B. (2010). Heavy metal poisoning: management of intoxication and

- antidotes. *Exs*, 100, 365–396. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8338-1_11
- Stijn, I. B., Koenraad H., V., Erik, A. H. & Francis, A., C. (2002). Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Archives of Internal Medicine*, 162(19), 2229–2235. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=2002383391>
- Song, Y., Xu, H., Chen, W., Zhan, P., & Liu, X. (2015). 8-Hydroxyquinoline: A privileged structure with a broad-ranging pharmacological potential. *Royal Society of Chemistry*. 6(1), 61–74. <https://doi.org/10.1039/c4md00284a>
- Tabassum, S., Parveen, M., Ali, A., Alam, M., Ahmad, A., Khan, A. U., & Khan, R. A. (2012). Synthesis of Aryl-1,2,4,5-tetrazinane-3-thiones, *in vitro* DNA binding studies, nuclease activity and its antimicrobial activity. *Journal of Molecular Structure*, 1020, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.03.049>
- Tavman, A., Boz, I., & Cinarli, A. (2012). Spectral characterization and antimicrobial activity of Cu (II) and Fe (III) complexes of 2- (5-Cl / NO₂ -1H- benzimidazol-2-yl)-4-Br/NO₂-phenols, *Journal of Coordination Chemistry*, 63(8), 1398–1410. <https://dx.doi.org/10.1080/00958971003789835>
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Büttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D. H., Niesbach-Klößgen, U., Patschkowski, T., Rühert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S. C., Vorhölder, F., Weber, E., Pühler, A., Bonas, U., Bartels, D., Kaiser, O. (2005). Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *Journal of Bacteriology*, 187(21), 7254–7266. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7254-7266.2005>
- Torayama, H., Nishide, T., Asada, H., & Fujiwara, M. (1997). Preparation and characterization of novel cyclic tetranuclear manganese (III) complexes . *Science*, 4(3) 3787–3789.
- Verma, V., Testero, S. A., Amini, K., Wei, W., Liu, J., Balachandran, N., Monoharan, T., Stynes, S., Kotra, L. P., & Golemi-Kotra, D. (2011). Hydrolytic mechanism of OXA-58 enzyme, a carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamase from *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(43), 37292–37303. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.280115>
- Vijayalakshmi, M. (2018). Synthesis and spectral characterization of schiff base transition metal complexes, DNA cleavage and antibacterial activity studies. *Rasayan Journal of Chemistry*, 11(2), 857–864. <https://doi.org/10.7324/RJC.2018.1123033>
- Voelz, A., Müller, A., Gillen, J., Le, C., Dresbach, T., Engelhart, S., Exner, M., Bates, C. J., & Simon, A. (2010). Outbreaks of *Serratia marcescens* in neonatal and pediatric intensive care units: Clinical aspects, risk factors and management. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213(2), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2009.09.003>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Wickham, H., François, R., Henry, L., & Müller, K. (2022). *dplyr: A grammar of data manipulation*.
- Zizka, G., Horres, R., Nelson, E. C., & Weising, K. (1999). Revision of the genus *Fascicularia* Mez (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 129(4), 315–332. <https://doi.org/10.1006/bojl.1998.0223>
- Internetes oldalak:
1. <https://en.wikipedia.org/wiki/Chelation>
 2. <https://docplayer.hu/39817951-A-kovalens-kotes-polaritasa.html>