

**NÖVÉNYI EREDETŰ ÉS ÚJONNAN SZINTETIZÁLT VEGYÜLETEK  
REZISZTENCIA VISSZAFORDÍTÓ HATÁSA BAKTÉRIUM  
MODELLEKBEN**

PhD értekezés tézisei

**Kincses Annamária**

Témavezető: Dr. Spengler Gabriella



Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet

Általános Orvostudományi Kar

Szegedi Tudományegyetem

**Szeged**

**2019**

## 1. BEVEZETÉS

Az antimikrobiális rezisztencia (AMR) során az előzetesen alkalmazott antibakteriális szer a baktériumok ellenállóképessége miatt hatástalanná válik. A rezisztens baktériumok ellenállóképessége miatt a szokásos kezelések eredménytelenné válnak, a fertőzés perzisztálhat és továbbterjedhet. Az AMR gyors terjedése évről-évre súlyos problémát okoz a bakteriális fertőzések kezelésében, továbbá a terápia költségeit is jelentősen növeli. Az O'Neill jelentés szerint 2050-re 10 millió ember életét veszélyezteti majd az AMR, és a terápia során felmerülő költségek elérhetik a 100 trillió USD-t.

A baktériumok különböző mechanizmusokon keresztül képesek az antibakteriális gyógyszerek káros hatásait kivédeni. Ezek közül az egyik legfontosabb a multidrog efflux pumpák (EP) megnövekedett expressziója, amelyek az antibakteriális kemoterápiás szerek különböző csoportjait a sejten kívülre juttatják, mielőtt azok elérnék célpontjukat a baktériumsejtben. Az EP-k továbbá szerepet játszanak a biofilm képzésben, illetve a bakteriális kommunikációban (quorum sensing; QS) is. A bakteriális QS egy sejt-sejt kommunikációs és szabályozó mechanizmus, amely a baktériumsejt sűrűségétől függően képes befolyásolni a génexpressziót. A bakteriális biofilm olyan mikrobiális közösség, melyben a szesszilis baktériumok egymáshoz, illetve a felszínhez tapadnak egy önmaguk által termelt extracelluláris polimer mátrix segítségével. A biofilmben a baktériumsejtek alkalmazkodhatnak a környezeti feltételekhez, így a szesszilis sejtek megnövekedett rezisztenciát mutatnak (kb. 10-1000-szeres) a planktonikus sejtekhez képest.

Az irodalomban számos tanulmány bizonyítja a természetes, növényi eredetű és szintetikus vegyületek EP, biofilm képződés és QS gátló aktivitását, valamint az antimikrobiális szerek hatékonyságát is fokozhatják. A jelen kutatásban a *Cleistochlamys kirkii*-ből (Benth) Oliv. (Annonaceae) izolált természetes vegyületeket, fluorozott  $\beta$ -diketo foszfor-ilideket és szelénvegyületeket vizsgáltunk. A *C. kirkii* egy Afrikában őshonos gyógynövény, amelyet Mozambikban sebfertőzések, tuberkulózis és reuma kezelésére alkalmaznak. Előzetes tanulmányok alapján a *C. kirkii* bioaktív vegyületei antimikrobiális hatással is rendelkeznek. A foszfor-ilidek EP-moduláló aktivitását már leírták a multidrog rezisztens (MDR) egér T-limfóma sejtek ATP-kötő kazetta B alcsaládjának (ABCB1) transzporterével kapcsolatban. A harmadik vizsgált vegyületsorozat fő komponense pedig egy olyan fontos nyomelem, mint a szelén, amely jótékony hatással bír a gyulladáshoz kapcsolódó betegségek és a rák megelőzésében, illetve tüneteik enyhítésében. Az elmúlt néhány évben végzett kutatások azt mutatták, hogy a szeléntartalmú vegyületek széles antimikrobiális spektrummal is rendelkeznek.

Az AMR terjedése egy globális kihívás, melynek leküzdése komoly problémát jelent az egészségügy számára. A rezisztens baktériumok által okozott fertőzések hatékonyabb kezelésének megoldása lehet a kombinált terápia alkalmazása (antibiotikum + adjuváns: például EP gátló (EPI) vegyület), mely révén a kezelés költségei is csökkenhetnek. Ehhez azonban új EPI vegyületek felfedezésére van szükség, amely a gyógyszerfejlesztés egyik legnagyobb kihívása.

## 2. CÉLKITŰZÉS

Vizsgálatunk célja a *C. kirkii*-ből izolált vegyületek, fluorozott  $\beta$ -diketo foszfor-ilidek, illetve szelénvegyületek rezisztencia módosító hatásának tanulmányozása volt Gram-pozitív és Gram-negatív modell baktériumtörzseken. A rezisztencia visszafordító vegyületek később önmagukban vagy antibiotikumokkal kombinálva alkalmazhatóvá válhatnak a fertőző betegségek terápiájában.

A kutatás célkitűzései az alábbiak voltak:

1. A vegyületek (öt természetes vegyület, tíz fluorozott  $\beta$ -diketo foszfor-ilid és tizenegy szelénvegyület) antibakteriális hatásának vizsgálata mikrodilúciós módszerrel Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumtörzsek felhasználásával.
2. A vegyületek (öt természetes vegyület, tíz fluorozott  $\beta$ -diketo foszfor-ilid és tizenegy szelénvegyület) EP gátló hatásának monitorozása valós idejű etídiium-bromid (EB) akkumulációs vizsgálattal Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokban.
3. A szelénvegyületek EP moduláló hatásának vizsgálata EB efflux vizsgálattal *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 vad típusú és *acrB* mutáns L644 törzsön.
4. A szelénvegyületek biofilm képzést gátló hatásának vizsgálata kristályibolyás festéssel, a biofilm képző *S. Typhimurium* 14028s törzsön.
5. A *C. kirkii*-ből izolált természetes vegyületek antibiotikummal (tetraciklin (TET) és ciprofloxacín (CIP)) kombinációban történő vizsgálata checkerboard módszerrel *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 és *S. aureus* 27213 törzsön.
6. A szelénvegyületek és antibiotikumok kombinált hatásának vizsgálata mikrodilúciós módszerrel: a TET és CIP antibakteriális hatásának változása szelénvegyületek jelenlétében *Escherichia coli* AG100 törzsön.

7. A *C. kirkii*-ből izolált öt természetes vegyület és a tíz fluorozott  $\beta$ -diketo foszfor-ilid QS gátló hatásának vizsgálata agardiffúziós módszerrel a szenzor *Chromobacterium violaceum* 026 és az N-acil-homoszerin lakton (AHL) termelő *Enterobacter cloacae* 31298 törzs felhasználásával.
8. A legjelentősebb EP moduláló vegyületek EP (*norA*, *mepA*, *acrA*, *acrB*), antibiotikum rezisztencia (*marR*) és QS (*sdiA*) gének expressziójára gyakorolt hatásának monitorozása reverz transzkripció kapcsolt kvantitatív polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) *E. coli* AG100, *S. aureus* ATCC 25923 és *S. aureus* 272123 törzsek felhasználásával.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Vegyületek

Kutatásunk során három vegyületcsoportot vizsgáltunk: a *C. kirkii* (Benth) Oliv. (Annonaceae) gyökérgérből metanolos extrakcióval izolált öt természetes vegyületet (**CK1-5**), melyeket Prof. Dr. Maria-José U. Ferreira (Universidade de Lisboa, Lisszabon, Portugália) bocsátott a rendelkezésünkre. A vegyületek 10 mM-os törzsoldatát dimetil-szulfoxidban (DMSO) készítettük el.

Kísérleteinkben továbbá tíz fluorozott  $\beta$ -diketo foszfor-ilidet (**PY1-10**) vizsgáltunk, melyek szintézisét Prof. Dr. Masami Kawase (Matsuyama University, Matsuyama, Japán) és munkatársai végezték. A vegyületek 10 mg/ml-es törzsoldatát DMSO-ban készítettük el.

A harmadik vizsgált vegyületcsoport tizenegy szelénszármazékot (**EDA1-11**) tartalmazott: egy ciklikus szelenoanhidridet (**EDA1**), kettő heteroaril- (**EDA2-3**), és nyolc aril-szelenoésztert (**EDA4-11**). A vegyületek szintézisét Dr. Enrique Domínguez-Álvarez (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spanyolország) és Prof. Dr. Carmen Sanmartín (University of Navarra, Pamplona, Spanyolország) végezték. A vegyületek 10 mM-os törzsoldatát DMSO-ban készítettük el.

#### 3.2. Baktérium törzsek

Kísérleteink során az alábbi baktérium törzseket használtuk fel: *E. coli* K-12 AG100 vad típusú törzs [argE3 thi-1 rpsL xyl mtl  $\Delta$ (gal-uvrB) supE44], amely expresszálja az AcrAB-TolC efflux pumpát, valamint ennek a törzsnek az AcrAB-TolC efflux pumpa deléciós mutáns *E. coli* AG100 A törzsét. A törzsek Prof. Dr. Hiroshi Nikaido-tól (University of California, Berkeley, CA, Egyesült Államok) származnak. *S. Typhimurium* SL1344 vad típusú törzs, mely expresszálja az AcrAB-TolC efflux pumpát, valamint ennek az AcrB mutáns törzsét (L644),

továbbá a biofilm képző *S. Typhimurium* 14028s. A törzseket Dr. Jessica M. Blair (University of Birmingham, Birmingham, Egyesült Királyság) bocsátotta a rendelkezésünkre.

Methicillin érzékeny referencia törzsként a *S. aureus* ATCC 25923 törzset, míg methicillin és ofloxacin rezisztens törzsként a Prof. Dr. Leonard Amaral-tól (Institute of Hygiene and Tropical Medicine, Lisszabon, Portugália) kapott *S. aureus* 272123 klinikai izolátumot használtuk a vizsgálatok során. Kísérleteink során továbbá az *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 baktérium törzs került felhasználásra.

A QS vizsgálatokban az alábbi törzseket alkalmaztuk: a szenzor törzs *C. violaceum* 026 (CV026), illetve az AHL termelő *E. cloacae* 31298-as törzset (sebből származó klinikai izolátum).

### 3.3. A legkisebb gátló koncentráció meghatározása mikrodilúciós módszerrel

A vegyületek legkisebb gátló koncentrációjának (MIC) meghatározását a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) irányelvei szerint végeztük. Az oldószerként alkalmazott DMSO nem rendelkezett antibakteriális hatással.

### 3.4. Valós idejű etidium bromid akkumulációs vizsgálat

A *C. kirkii*-ből izolált vegyületek (**CK1-5**), a foszfor-ilidek (**PY1-10**) és a szelénvegyületek (**EDA1-11**) EP moduláló aktivitását az EB valós idejű akkumulációjával határoztuk meg, LightCycler valós idejű thermocycler (LightCycler 1.5, Roche, Indianapolis, Egyesült Államok) használatával. A vizsgálat során triptikus szója médiumban (TSB) növesztett overnight *S. aureus* ATCC 25923 és methicillin rezisztens *S. aureus* (MRSA) 272123 baktérium kultúrát friss TSB-be helyeztünk és addig inkubáltunk, amíg az optikai denzitás (OD) 600 nm-en mérve el nem érte a 0,6-ot. Az *E. coli* AG100 és AG100 A esetében a vizsgálathoz Luria-Bertani (LB) médiumot használtunk. A megfelelő OD elérése után a baktérium szuszpenziót foszfát sóoldat pufferben (PBS) mostuk és a vegyületeket különböző koncentrációban az EB oldathoz adtuk ( $\frac{1}{2}$  MIC,  $\frac{1}{3}$  MIC,  $\frac{1}{4}$  MIC vagy  $\frac{1}{5}$  MIC). *E. coli* AG100 törzs esetén 1  $\mu\text{g/ml}$  EB-t, az *E. coli* AG100 A esetén 0,25  $\mu\text{g/ml}$  EB-t, továbbá az *S. aureus* törzsek esetében 0,5  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációjú EB-t alkalmaztunk a vizsgálatban. Ezután az EB és a vegyületek keverékéből 10  $\mu\text{l}$ -t belemértünk a standard kapilláris csövekbe, melyek maximális térfogata 20  $\mu\text{l}$  (Roche, Indianapolis, Egyesült Államok) és további 10  $\mu\text{l}$  baktérium szuszpenziót (OD 0,6 600 nm-en) adtunk a kapillárisokhoz. A fluoreszcenciát FL-2-es csatornán monitoroztuk 30 percen keresztül.

A valós idejű adatokból meghatározható volt a relatív fluoreszcencia index (RFI) az akkumulációs periódus végén (30 perc) az alábbi módon:

$$RFI = \frac{RF_{kezelt} - RF_{kezeletlen}}{RF_{kezeletlen}}$$

$RF_{kezelt}$ = relatív fluoreszcencia (RF) az EB akkumulációs görbe utolsó időpillanatában, az efflux pumpa gátló vegyület jelenlétében;  $RF_{kezeletlen}$ = RF az EB akkumulációs görbe utolsó időpillanatában, az oldószer kontroll jelenlétében (DMSO) A Gram-pozitív törzseknél verapamil, a Gram-negatív baktériumok esetében promethazint (PMZ) alkalmaztunk pozitív kontrollként.

### 3.5. Etidium bromid efflux vizsgálat

A szelénvegyületek (**EDA1-11**) EB effluxra gyakorolt hatását a vad típusú (SL1344) és az AcrB mutáns (L644) *S. Typhimurium* törzsekben vizsgáltuk. A vizsgálat során az LB-ben növesztett overnight *S. Typhimurium* baktérium kultúrát friss LB-be helyeztük és addig inkubáltuk, amíg az OD 600 nm-en mérve el nem érte a 0,4-et. A kultúrát ezután 1 mM  $MgCl_2$ -t tartalmazó 20 mM-os kálium-foszfát oldatban (PPB) mostuk, majd beállítottuk az OD-t 0,2-re. A baktérium kultúrához hozzámértük az EB-t 50  $\mu g/ml$ -es koncentrációban, valamint az efflux pumpa gátló karbonil-cianid-*m*-klorofenil-hidrazont (CCCP) 100  $\mu M$ -os végkoncentrációban. A kultúrát tovább inkubáltuk 23°C-on rázatva (150 rpm), 60 percen keresztül. Az inkubációs idő letelte után a mintákat centrifugáltuk és a pelletet 1 mM-os  $MgCl_2$ -vel, valamint 5%-os glükózzal kiegészített 20 mM-os PPB-ben szuszpendáltuk, majd a kultúrából 200  $\mu l$ -t mértünk fekete, 96-lyukas mikrotitráló lemezbe (Corning, Amszterdam, Hollandia). A lemezbe előzetesen belemértük a tesztelendő anyagok 50  $\mu M$ -os koncentrációját. Az EB effluxot FLUOstar Optima lemez leolvasóval (BMG Labtech, Egyesült Királyság) mértük 530 és 600 nm-en 2 órán keresztül. A mérések során azokat az időpillanatokat határoztuk meg, amikor a fluoreszcencia szintje 25, valamint 50%-kal csökkent a kezdő értékhez képest. Pozitív kontrollként CCCP-t, negatív kontrollként DMSO-t alkalmaztunk.

### 3.6. Biofilm képzés vizsgálata kristályibolyás festéssel

A *S. Typhimurium* 14028s törzs biofilm formáló képességét a szelénvegyületek (**EDA1-11**) jelenlétében 96-lyukas mikrotitráló lemezben vizsgáltuk. Az overnight kultúrát OD 0,1-re (600 nm) hígítottuk ki NaCl-mentes LB-ben, majd a lemez lyukaiba mértük a médium kontroll lyukak kivételével. A vegyületeket ezután 50  $\mu M$ -os koncentrációban hozzáadtuk a baktérium kultúrához és a lemezeket 30°C-on, 48 órán keresztül rázatva (100 rpm) inkubáltuk. Az inkubációs idő végén a tápfolyadékot eltávolítottuk, a lemezeket csapvízzel mostuk, majd 200  $\mu l$  kristályibolyát (0,1% [v/v]) mértünk a lyukakba. A 15 perces, szobahőmérsékleten történő

inkubáció után a lemezeket csapvízzel mostuk, majd 200 µl 70%-os etanolt mértünk a mintákhoz. A *S. Typhimurium* 14028s biofilm képzését kolorimetriásan, 600 nm-on mértük FLUOstar Optima mikrotiter lemez leolvasóval. A szelénvegyületek jelenlétében bekövetkező biofilm tömeg csökkenést %-ban fejeztük ki a kontrollhoz viszonyítva. Az eredményeket t-teszttel hasonlítottuk össze, a statisztikai analízisnél a  $p < 0,05$  értéket vettük szignifikánsnak.

### **3.7. A rezisztencia módosító és az antibiotikumok közötti kapcsolat meghatározása checkerboard technikával**

A kamanetin (CK2) és dikamanetin (CK4) antibiotikumokkal (TET és CIP) kombinációban mutatott hatását a *S. aureus* ATCC 25923 és a rezisztens *S. aureus* 272123 törzseken vizsgáltuk checkerboard módszerrel. Az antibiotikumok kettes léptékű hígítása vízszintes irányban, míg a vegyületek hígítása függőleges irányban történt. Az overnight baktérium kultúrából  $10^{-4}$ -es hígítást készítettünk MH táplevesben, majd 50 µl térfogatban mértük a mikrotitráló lemez lyukaiba. A lemezeket 37°C-on, 18 órán keresztül inkubáltuk; a baktériumsejtek növekedését MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ol)-2,5-difenil tetrazólium-bromid) festékkel tettük láthatóvá. A mérések során az ED<sub>90</sub> értéket határoztuk meg, amely azt a koncentrációt jelenti, ahol a vizsgált baktériumsejtek növekedése 90%-al gátlódik a kontrollhoz képest. A kombinációs index (CI) ennél az értéknél került meghatározásra, CompuSyn szoftverrel (ComboSyn Inc., Paramus, Egyesült Államok). A CI értékek alapján következtethetünk a kölcsönhatás típusára az antibiotikumok és a vizsgált vegyületek között: amennyiben a  $CI < 1$ , akkor szinergizmusról,  $CI = 1$  esetén additív hatás (vagy nincsen kölcsönhatás), illetve ha a  $CI > 1$ , akkor antagonizmusról beszélünk.

### **3.8. A rezisztencia módosító és az antibiotikumok közötti kapcsolat meghatározása MIC redukciós vizsgálattal**

A TET és CIP MIC értékét a szelénvegyületek jelenlétében határoztuk meg MIC redukciós vizsgálattal, 96-lyukas mikrotitráló lemezben *E. coli* AG100 törzsön. Az antibiotikumokból kettes léptékű hígítási sort készítettünk, a szelénvegyületeket állandó koncentrációban ( $\frac{1}{2}$  MIC) adtuk a lyukakhoz. Az overnight baktérium kultúrát MH táplevesben  $10^{-4}$ -re hígítottuk, majd 50 µl-ben a mikrotiter lemez lyukaiba mértük, a médium kontroll sor kivételével. A lemezeket 18 órán keresztül, 37°C-on inkubáltuk termosztátban. A szelénvegyületek kemoszenzitiváló hatását szabad szemmel határoztuk meg, az antibiotikumok MIC értékének a leolvasásával.

### 3.9. Quorum sensing gátlás vizsgálata

Kísérletünk során módosított LB táptalajt használtunk (5 g/l élesztőkivonat, 10 g/l tripton, 10 g/l NaCl, 1 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,3 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 36 mg/l FeNaEDTA, 20 g/l agar). A szenzor törzs *C. violaceum* 026-ot és az AHL termelő *E. cloacae* 31298 törzset egymás mellé párhuzamosan oltottuk le, majd a lemezeket 24-48 órán keresztül szobahőmérsékleten (20°C) inkubáltuk. Az inkubációs idő után a szűrőpapír korongokra a CK vegyületek 10 mM-os, a PY vegyületek 10 mg/ml-es koncentrációjú oldatát vittük fel. A papírkorongokat ezután a táptalajra helyeztük a szenzor és az AHL törzsekből képzett két párhuzamos vonal közé. A mintákat ezt követően újra 24-48 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A vegyületek QS gátló hatását az inkubációt követően a keletkezett gátlási zónák mérésével állapítottuk meg. A keletkezett gátlási zónát milliméterben adtuk meg. Pozitív kontrollként PMZ-t alkalmaztunk.

### 3.10. Génexpresszió vizsgálata RT-qPCR-rel

Az *E. coli* AG100 törzset LB táplevesben, a *S. aureus* ATCC 25923 és *S. aureus* 272123 törzseket TSB-ben növesztettük. Az RNS izolálás napján a vegyületeket 50 µM-os (**EDA1**, **-4**, **-7**), 50 µg/ml-es (**PY2**, **-4**, **-5**), 5 µM-os (**CK2**) és 0,5 µM-os (**CK4**) koncentrációban adtuk a baktérium kultúrához. Ezt követően 4 (**CK2** és **-4**) vagy 4 és 18 órás (**PY2**, **-4**, **-5** és **EDA1**, **-4**, **-7**) időpillanatokban totál RNS-t izoláltunk RNáz mentes környezetben, NucleoSpin RNA kit (Macherey Nagel, Németország) segítségével a gyártó által mellékelt útmutató szerint. A teljes RNS extraktum koncentrációját SmartSpec™ Plus spektrofotométer (Bio-Rad, Egyesült Államok) alkalmazásával 260 nm-en vizsgáltuk.

A *norA* és *mepA* gének expresszióját a kamanetin (**CK2**) és a dikamanetin (**CK4**) jelenlétében vizsgáltuk az össz RNS reverz transzkripciójával az *S. aureus* (ATCC 25923 és MRSA 272123) törzsekben. A célgénekről kapott génexpressziós adatokat a *S. aureus* 16S riboszómális RNS génhez viszonyítottuk.

Az efflux pumpa (*acrA*, *acrB*), az antibiotikum rezisztencia (*marR*) és a QS (*sdiA*) gének expresszióját a **PY2**, **-4**, **-5** és az **EDA1**, **-4**, **-7** jelenlétében *E. coli* AG100 törzsben vizsgáltuk. A célgénekről kapott génexpressziós adatokat az *E. coli* gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*gapdh*) háztartási génhez viszonyítottuk.

A gének expresszióját reverz transzkripció kapcsolt kvantitatív PCR alkalmazásával (RT-qPCR) vizsgáltuk. A tisztított RNS templatok valós idejű kvantifikációját a CFX96 Touch valós idejű PCR detektáló rendszerrel (Bio-Rad, Egyesült Államok) és a SensiFAST™ SYBR No-ROX One-Step Kit (Bioline GmbH, Németország) segítségével végeztük el, a gyártó ajánlása szerint. A RT-qPCR által kapott adatokból számításainkat a  $\Delta\Delta C_t$  módszerrel végeztük el.



## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A vegyületek *in vitro* antibakteriális hatása

#### 4.1.1. *C. kirkii*-ből izolált bioaktív vegyületek

A kamanetin (**CK2**) és a dikamanetin (**CK4**) erős antibakteriális hatással rendelkezett a *S. aureus* ATCC 25923 és a *S. aureus* 272123 törzseken. A **CK2** MIC értéke 12,5  $\mu\text{M}$  volt a referencia *S. aureus* ATCC törzsön, míg ugyanez a vegyület a methicillin és ofloxacin rezisztens *S. aureus* törzs esetében 25  $\mu\text{M}$  volt. A **CK4**-es vegyület volt a leghatásosabb flavanon: a *S. aureus* ATCC 25923 törzsön: a MIC értéke 0,8  $\mu\text{M}$ , a rezisztens *S. aureus* törzsön ugyanez az érték 1,56  $\mu\text{M}$  volt. A vegyületek a Gram-negatív *E. coli* AG100, AG100 A, *C. violaceum* és *E. cloacae* törzseken nem mutattak antibakteriális hatást (MIC: >100  $\mu\text{M}$  vagy 100  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.1.2. Fluorozott $\beta$ -diketo foszfor-ilidek

A **PY1-10**-es vegyületek nem gátolták az AcrAB-TolC-t expresszáló *E. coli* AG100, a pumpa mutáns AG100 A, a *C. violaceum* és az *E. cloacae* törzsek növekedését (MIC: >100  $\mu\text{g/ml}$ ), kivéve az etil-4,4,4-trifluor-3-oxo-2-(trifenilfoszforanilidin)butanoát (**PY6**) foszforilidet, mely enyhe antibakteriális hatással rendelkezett az EP mutáns *E. coli* törzsön (MIC: 50  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### 4.1.3. Szelénvegyületek

A keton tartalmú szelenoészterek (**EDA9-11**) erős antibakteriális hatást mutattak a *S. aureus* ATCC 25923 törzssel szemben. A metil-keton szelenoészter **EDA9** volt a legaktívabb vegyület, melynek a fent említett törzsön a MIC értéke 3,12  $\mu\text{M}$  volt. A szelenoanhidrid **EDA1** és az **EDA2-8** szelenoészterek nem rendelkeztek antibakteriális hatással, a MIC értékük 100  $\mu\text{M}$  vagy >100  $\mu\text{M}$  volt a *S. aureus* ATCC 25923 törzsön. Az **EDA9** továbbá az *E. faecalis* ATCC 29212 növekedését is hatékony gátolta (MIC: 12,5  $\mu\text{M}$ ). A vegyületek nem fejtettek ki gátló hatást a Gram-negatív *E. coli* AG100, AG100 A, *S. Typhimurium* SL1344, az *acrB* inaktivált *S. Typhimurium* L644 és a *S. Typhimurium* 14028s törzseken (MIC: 100  $\mu\text{M}$  vagy >100  $\mu\text{M}$ ).

### 4.2. Efflux pumpa gátló aktivitás (akkumulációs vizsgálat)

#### 4.2.1. *C. kirkii*-ből izolált bioaktív vegyületek

A *S. aureus* ATCC 25923 baktériumtörzs esetén a legjelentősebb efflux pumpa gátlást a **CK2** mutatta, de a **CK4** is EP gátló hatással rendelkezett a pozitív kontrollhoz (verapamil) (RFI: 0,13) képest. A vegyületek (**CK1-5**) az alkalmazott koncentrációban nem mutattak EPI

aktivitást a methicillin és ofloxacin rezisztens *S. aureus* törzsben. A Gram-negatív törzsek esetében a triterpén polikarpol (**CK1**) és az acetilmelodorinol (**CK5**) gátolta az *E. coli* AG100 törzs AcrAB-TolC rendszerét, összehasonlítva a pozitív kontroll PMZ-vel. A vegyületeknek (**CK1-5**) nem volt hatásuk az AcrAB-TolC mutáns *E. coli* AG100 A törzsön.

#### 4.2.2. Fluorozott $\beta$ -diketo foszfor-ilidek

A PY3, -7 és a -8 kivételével a foszfor-ilidek hatékonyan gátolták a *E. coli* AG100 AcrAB-TolC rendszerét. A **PY2**, -4 és -5 gátolta a legerősebben az AcrAB-TolC pumpát, összehasonlítva az EP mutáns *E. coli* törzsszel. A legkiemelkedőbb hatást a **PY4** mutatta a rezisztens *E. coli* AG100 törzs esetében.

#### 4.2.3. Szelénvegyületek

Az **EDA1** és **EDA4** jelenlétében az *E. coli* AG100 AcrAB-TolC pumpa efflux aktivitása a pozitív kontroll PMZ-hez (RFI: 0,15) képest jelentősen csökkent. Az **EDA7** és **EDA9-11** mérsékelt hatást fejtett ki az AG100 törzs intracelluláris EB akkumulációjára. A szelénvegyületeknek (**EDA1-11**) nem volt EP gátló aktivitásuk az *E. coli* AG100 A törzsben.

#### 4.3. Efflux pumpa gátló aktivitás (efflux vizsgálat)

A szelénvegyületek hatására az EB fluoreszcencia szint 25, illetve 50%-os csökkenése korábbi időpillanatban történt, mint a pozitív kontroll CCCP jelenlétében a *S. Typhimurium* SL1344 törzsben. Ezzel szemben az AcrB mutáns *S. Typhimurium* L644 törzsben az **EDA7**-es vegyület hatásosabban gátolta az EB effluxát a CCCP-hez képest.

#### 4.4. A szelénvegyületek biofilm gátló hatása

Az EDA6 és -11 kivételével mindegyik szelénvegyület 50  $\mu$ M-os koncentrációban szignifikánsan gátolta (>45%;  $p < 0,05$ ) a *S. Typhimurium* 14028s biofilm képző képességét. A leghatásosabb biofilm ellenes vegyület az **EDA4** és -5 volt, melyek 50  $\mu$ M-os koncentrációban 75%, valamint 73%-kal csökkentették a kialakuló biofilm mennyiségét.

#### 4.5. *C. kirkii*-ből izolált kamanetin (CK2) és dikamanetin (CK4) antibiotikumokkal kombinációban mutatott kölcsönhatásának típusa

A TET vagy CIP, valamint a **CK2** vagy **CK4** vegyületek együttes hatása a *S. aureus* ATCC 25923 törzsön szinergizmust eredményezett. A methicillin és ofloxacin rezisztens *S. aureus* törzsön a **CK2** és a CIP között enyhe szinergizmust tapasztaltunk. Továbbá a rezisztens *S. aureus* 272123 törzs esetében a **CK4**-es vegyület TET-tel kombinációban szinergista kölcsönhatást mutatott.

#### 4.6. A szelénvegyületek antibiotikumokkal kombinációban mutatott hatása

Az antibiotikumok MIC értékei *E. coli* AG100 törzsben az alábbiak voltak: TET 4,2  $\mu\text{M}$ , CIP 0,02  $\mu\text{M}$ . Az **EDA9**-es vegyület fokozta az antibiotikumok antibakteriális hatását, mivel jelenlétében a TET MIC értéke 2,1  $\mu\text{M}$ , a CIP-é 0,01  $\mu\text{M}$  volt. Hasonló hatást fejtett ki az **EDA10** a CIP-re, melynek MIC értéke a felére csökkent az *E. coli* AG100 törzsön.

#### 4.7. QS gátló aktivitás

##### 4.7.1. *C. kirkii*-ből izolált bioaktív vegyületek

A **CK1** (51 mm), **-2** (50 mm), **-4** (53 mm), és **-5**-ös (52 mm) vegyület hatékonyabban gátolta a QS-t a *C. violaceum* 026 és az *E. cloacae* törzsek között, mint a pozitív kontroll PMZ (46 mm).

##### 4.7.2. Fluorozott $\beta$ -diketo foszfor-ilidek

A pozitív kontroll PMZ-hez képest a foszfor-ilidek nem fejtettek ki hatást (gátlási zóna: 0 mm) a bakteriális QS-re az alkalmazott rendszerben.

#### 4.8. Az antibiotikum rezisztencia, QS és efflux pumpa gének relatív expressziója

##### 4.8.1. *C. kirkii*-ből izolált bioaktív vegyületek

A **CK2** 5  $\mu\text{M}$ -os, a **CK4** 0,5  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban szignifikánsan megemelte a *norA* és *mepA* gének expresszióját 4 óra elteltével a methicillin és ofloxacin rezisztens *S. aureus* törzsben. A vizsgált CK vegyületek 4 óra elteltével nem befolyásolták a *mepA* gén expressziós szintjét, ellenben a *norA* gen kifejeződését a már említett koncentrációban szignifikánsan megemelték a referencia *S. aureus* törzsben.

##### 4.8.2. Fluorozott $\beta$ -diketo foszfor-ilidek

A **PY2** 50  $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációban az összes vizsgált gén kifejeződését emelte 4 óra elteltével, majd a 18. órában a gének expressziója visszatért az alapszintre. A **PY4** szignifikánsan fokozta az RND (resistance-nodulation-division) családba tartozó *acrB* transzporter gén expresszióját 4, illetve 18 óra elteltével is. A **PY5** az *acrA* és az *acrB* gének expressziós szintjét 4 óra elteltével szignifikánsan megemelte.

##### 4.8.3. Szelénvegyületek

Az **EDA1** 50  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban szignifikánsan megemelte az *acrB*, *marR* és *sdiA* gének kifejeződését 4 óra elteltével. Az *acrB* gén expressziója 18 óra elteltével visszatért az alapszintre, és a *marR*, valamint az *sdiA* gének kifejeződése tovább emelkedett. Az **EDA4** az *acrB*, *marR* és *sdiA* gének expresszióját az első 4 óra elteltével megemelte. A 18. órában az *acrB* és a *marR* gének expressziós szintje az első mintavételhez képest lecsökkent, ellenben az

*sdiA* QS génnel, melynek a szintje szignifikánsan megemelkedett. Az **EDA7** szintén szignifikánsan befolyásolta a *marR* expressziós szintjét 4, valamint 18 óra elteltével is. Az *acrA*, *acrB* efflux pumpa és a QS regulator *sdiA* gének expressziója a 18. órára megemelkedett.

#### 4. MEGBESZÉLÉS

Az antibiotikumokkal szemben kialakult multidrog rezisztencia nagy kihívást jelent a fertőző betegségek terápiájában. A multidrog rezisztencia egyik legfontosabb mechanizmusa az EP-k túlzott expressziója, amelyek toxikus anyagokat pumpálnak ki a baktériumsejtből a környezetbe. Továbbá komoly problémát jelent az a tény, hogy az MDR baktériumok által okozott fertőzések növelik a kezelési költségeket, valamint halálos kimenetelhez vezethetnek. A rezisztens kórokozók elleni küzdelem egyik megoldása lehet új EPI-k felfedezése.

A kísérleti munka során vizsgált természetes, növényi eredetű vagy szintetikus vegyületek olyan új antibakteriális vegyületek, melyek a baktérium növekedésének gátlásán túl az efflux pumpák aktivitását is befolyásolhatják, amelyek révén közvetlen módon gátolhatják a biofilm kialakulását, valamint a bakteriális sejt-sejt közötti kommunikációs rendszert, továbbá az említett antibakteriális hatások mellett fokozhatják az antibiotikumok hatékonyságát is.

Vizsgálataink célja a *C. kirkii*-ből izolált bioaktív vegyületek (**CK1-5**), a fluorozott  $\beta$ -diketo foszfor-ilidek (**PY1-10**) és a szelénvegyületek (**EDA1-11**) antibakteriális és multidrog rezisztencia visszafordító hatásának vizsgálata volt különböző baktérium modellek felhasználásával. Kísérleteink során a következő módszereket alkalmaztuk: MIC meghatározás, EB akkumulációs és efflux vizsgálat, checkerboard kombinációs módszer, MIC redukciós vizsgálat, biofilm és QS gátló teszt, valamint RT-qPCR.

##### 5.1. *C. kirkii*-ből izolált bioaktív vegyületek (CK1-5)

Eredményeink alapján elmondható, hogy a kamanetin (**CK2**) és a dikamanetin (**CK4**) antibakteriális hatása volt a legkifejezettebb a methicillin érzékeny és rezisztens *S. aureus* törzsön. A dikamanetin erősebb hatást mutatott, mint a kamanetin, magasabb lipofil jellege miatt, amelyet a hatos szénatomon található extra benzilcsoport eredményezett. A kamanetinnel ellentétben az izokamanetin (**CK3**) –amelyek csak a benzil szubsztituensek helyzetében különböznek egymástól– inaktív volt a vizsgált koncentrációban. Ez alapján megállapítható, hogy a lipofilitás és a benzilcsoport jelenléte a nyolcas szénatomon döntő szerepet játszik az antibakteriális aktivitásában ezen vegyületeknél. A kombinációs vizsgálatban a kamanetin és a dikamanetin szinergizmust mutatott tetraciklinnel és ciprofloxacinnal a *S. aureus* referencia törzsön. Ezenkívül a methicillin rezisztens *S. aureus* törzsön a kamanetin és a dikamanetin, a

tetraciklinnel és a ciprofloxacinnal kombinálva szintén szinergizmust mutatott, ami jelzi, hogy ezek a vegyületek potenciális adjuvánsok lehetnek a bakteriális fertőzések terápiájában. Az antibakteriális hatás mellett a kamanetin gátolta az efflux rendszerek aktivitását a pozitív kontrollhoz képest a *S. aureus* ATCC 25923 törzsben. A kamanetin és a dikamanetin további hatása, hogy gátolták a QS-t a *C. violaceum* 026 és az *E. cloacae* 31298 törzsek között, valamint az EP gének (*norA* és *mepA*) fokozott expresszióját okozták az MRSA törzsben 4 óra elteltével. A génexpresszióban bekövetkezett változásokat a kamanetin és a dikamanetin elleni stressz válasz okozhatta, mivel ezek a növényi származékok potenciálisan károsnak bizonyultak a *S. aureus*-ra nézve, ezért a baktérium a lehető leghamarabb az extracelluláris térbe akarta juttatni a vegyületeket. Ez a stresszválasz magyarázhatja az EP gének 4. órában tapasztalt expressziós szint emelkedését. A kamanetin és a dikamanetin megemelte az MRSA törzs *mepA* gén expresszióját, azonban a referencia *S. aureus* törzsben a vegyületek hatására a *mepA* gén kifejeződése alacsony szinten maradt. Tanulmányok már kimutatták, hogy az EP-k túlzott expressziója „fitnesz költséget” jelent a baktérium számára: például egy EP-t túltermelő rezisztens izolátumban csökken más virulencia faktorok termelése.

Gram-negatív baktériumokban a **CK1–5**-ös vegyületek nem mutattak antibakteriális hatást. Az erősen lipofil polikarpol (**CK1**) gátolta az *E. coli* AG100 RND családjába tartozó AcrAB-TolC rendszert, ami a polikarpol által okozott membrán permeabilitással magyarázható. Ezzel szemben a polikarpolnak nem volt EPI hatása a pumpa mutáns *E. coli* AG100 A törzsben, amely azt bizonyítja, hogy közvetlen EPI hatással lehet az AcrAB-TolC rendszerre. A kamanetin és a dikamanetin mellett a polikarpol és az acetilmelodorinol (**CK5**) is hatékonyan gátolta a baktériumok közötti kommunikációt.

## 5.2. Fluorozott $\beta$ -diketo foszfor-ilidek (PY1-10)

Az előzetes vizsgálatunkban a trifluoro-1-fenil-2-(trifenilfoszforanilidin)bután-1,3-dion (**PY3**), a 4,4,5,5,5-pentafluor-1-fenil-2-(trifenilfoszforanilidin)pentán-1,3-dion (**PY7**) és a 4,4,5,5,6,6,6-heptafluor-1-fenil-2-(trifenilfoszforanilidin)hexán-1,3-dion (**PY8**) hatékonyan gátolta a rákos sejtek transzport rendszereit. A mostani vizsgálatainkban a vegyületek nem mutattak aktivitást az *E. coli* törzsek AcrAB-TolC rendszerével szemben. Az előzetes kísérletek célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a PY vegyületek az elsődleges ABC (ATP-kötő kazetta) transzporter család ABCB1 tagját képesek-e gátolni a rákos sejtekben. Jelen tanulmányban a foszfor-ilideket az *E. coli* RND családba tartozó, másodlagos AcrAB-TolC rendszerén vizsgáltuk. Fontos megjegyezni, hogy az ABC transzporterek az ATP hidrolíziséből nyerik energiájukat, ellenben az AcrAB-TolC rendszerrel, melynél az efflux folyamatokhoz

nélkülözhetetlen energia a protonmotoros erőből származik. *E. coli* AG100-ban a leghatékonyabb vegyületek az 1,1,1-trifluor-3-oxo-1-metoxi-3-(trifenilfoszforanilidin)propán-2-on (**PY2**), a 4,4,4-trifluor-3-oxo-2-(trifenilfoszforanilidin)butanal (**PY4**), és az 1,1,1-trifluor-3-(trifenilfoszforanilidin)pentán-2,4-dion (**PY5**) volt, amelyek gátolták az AcrAB-TolC rendszert, valamint befolyásolták az *acrA* és *acrB* transzporter gének expresszióját. A vegyületek nem bizonyultak QS gátlóknak, azonban a **PY4** fokozta a QS aktivátor *sdiA* expresszióját 18 óra elteltével. Az EPI vegyületek az R<sup>1</sup> láncon trifluor-metil-ketont (COCF<sub>3</sub>), az R<sup>2</sup> láncon metoxi (OMe; **PY2**), formil (CHO; **PY4**) és acetyl (COME; **PY5**) csoportot tartalmaztak. Az előző és a mostani eredmények tükrében elmondható, hogy a fluorozott β-diketo foszfor-ilidek multidrog rezisztencia visszafordító aktivitása különbözött a tumor- és a baktériumsejtekben, rámutatva arra, hogy a vegyületek eltérően hatnak az ABCB1 és az AcrB EP-re, mivel ezek a transzporterek szerkezetüket és energiaforrásukat tekintve is különböznek egymástól.

### 5.3. Szelénvegyületek (EDA1-11)

A disszertációban bemutatott szelénvegyületek daganatellenes és ABCB1 EP gátló aktivitását korábban már vizsgálta kutatócsoportunk különböző rákos sejtekben. A baktériumokkal végzett kísérletek eredményei alapján megállapítható, hogy az **EDA9-11** ketontartalmú szelenoészterek antibakteriális aktivitást mutattak a *S. aureus* referencia törzssel szemben, továbbá a metil-ke-ton szelenoészter (**EDA9**) hatásos volt az *E. faecalis* ATCC 29212 törzsen. Az EB akkumulációs vizsgálatban a ciklikus szelenoanhidrid (**EDA1**) és a meta-szubsztituált benzol szelenodiészter (**EDA4**) hatékonyabban gátolta az *E. coli* AG100 AcrAB-TolC transzport rendszer efflux aktivitását, mint a pozitív kontroll PMZ. A metil-ke-ton szelenoészter szignifikánsan gátolta a vad típusú *S. Typhimurium* SL1344 törzs efflux mechanizmusát. Az AcrB mutáns *S. Typhimurium* törzsben EP gátló aktivitást csak a metoxi-karbonil-metil szelenoészter (**EDA7**) jelenlétében detektáltunk. Az EB efflux vizsgálat során azt az eredményt kaptuk, hogy ugyanazok a vegyületek gátolták a vad típusú és a mutáns *S. Typhimurium* efflux rendszerét is. A megfigyelt hasonlóságok azt jelentik, hogy a szelénvegyületek nem közvetlenül az *S. Typhimurium* AcrAB-TolC rendszerét gátolják. A fenil gyűrűt tartalmazó metil-szubsztituált benzol szelenodiészter és a para-szubsztituált benzol szelenodiészter (**EDA5**) gátolta a leghatékonyabban a *S. Typhimurium* 14028s biofilm képződését. Az **EDA7-10**, valamint a tiofén szelenodiészter (**EDA2**) és a piridin szelenodiészter (**EDA3**) több mint 50%-kal csökkentette a *S. Typhimurium* biofilm képzését. A metil-ke-ton szelenoészter a felére csökkentette a TET MIC értékét, továbbá ez a származék

és a klór-szubsztituált *terc*-butilketon szelenoészter fokozta a TET és a CIP antibakteriális hatását *E. coli* AG100-on. A génexpressziós vizsgálat során megfigyeltük, hogy a ciklikus szelenoanhidrid, a meta-szubsztituált benzol-szelenodiészter és a metoxi-karbonil-metil szelenoészter szignifikánsan megemelte a rezisztencia regulátor *marR* gén expresszióját 4, illetve 18 óra elteltével. A ciklikus szelenoanhidrid jelenlétében a QS regulátor *sdiA* gén expressziós szintje a 4., illetve a 18. órában is szignifikánsan megnövekedett.

A disszertációmban bemutatott eredményeink alapján megállapítható, hogy a természetes és a szintetikus vegyületek önmagukban vagy antibiotikumokkal kombinálva hatékony antibakteriális szerek lehetnek a fertőző betegségek terápiájában. Továbbá azt is fontos megemlíteni, hogy a szubsztituensek típusa és elhelyezkedése is fontos a biológiai hatás szempontjából. A jövőbeni tanulmányok során több vegyületet kellene szisztematikusan megtervezni és elemezni, továbbá meg kell érteni a szerkezet-aktivitás összefüggéseit a hatékony rezisztencia módosítók kifejlesztése érdekében.

## 6. TÉZISPONTOK

### 1. *Cleistochlamys kirkii*-ből izolált bioaktív vegyületek

- A nyolcas szénatomon található benzilcsoporttal rendelkező kamanetin (**CK2**) és dikamanetin (**CK4**) jelentős antibakteriális hatással rendelkezett a referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, valamint a methicillin és ofloxacin rezisztens *S. aureus* 272123 törzsekkel szemben. A két vegyület közül a dikamanetin bizonyult a legaktívabb vegyületnek az említett törzseken, mert ez a vegyület a hatos szénatomon található extra benzilcsoport miatt lipofilebb.
- A dikamanetin szinergista aktivitást mutatott a tetraciklinnel és a ciprofloxacinnal a *S. aureus* referencia törzsön. Továbbá a dikamanetin a tetraciklinnel együtt alkalmazva szinergista kölcsönhatással rendelkezett a methicillin és ofloxacin rezisztens *S. aureus* törzsön.
- A kamanetin és az acetilmelodorinol (**CK5**) erős efflux pumpa moduláló hatást fejtett ki a *S. aureus* referencia törzsben. A polikarpol (**CK1**) gátolta a leghatékonyabban az *Escherichia coli* AG100 AcrAB-TolC transzport rendszerét.
- A *C. kirkii*-ből izolált bioaktív vegyületek, az izokamanetin (**CK3**) kivételével hatékonyan gátolták a baktériumok közötti quorum sensinget.

### 2. Fluorozott $\beta$ -diketo foszfor-ilidek

- Az 1,1,1-trifluor-3-oxo-1-metoxi-3-(trifenilfoszforanilidin)propán-2-on (**PY2**), a 4,4,4-trifluor-3-oxo-2-(trifenilfoszforanilidin)butanal (**PY4**), és az 1,1,1-trifluor-3-(trifenilfoszforanilidin)pentán-2,4-dion (**PY5**) vegyületek közvetlenül az *E. coli* AG100 AcrAB-TolC efflux rendszerét gátolták.

### 3. Szelénvegyületek

- A metil-keon szelenoészternek (**EDA9**) antibakteriális aktivitása volt a referencia *S. aureus* ATCC 25923 és az *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 törzseken.
- A metil-keon szelenoészter fokozta a tetraciklin és a ciprofloxacín hatását az AcrAB-TolC transzportert expresszáló *E. coli* AG100 törzsön.
- Valamennyi szelénvegyület biofilm ellenes hatást mutatott a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s törzsszel szemben.
- A ciklikus szelenoanhidrid (**EDA1**), a meta-szubsztituált benzol szelenodiészter (**EDA4**) és a metoxi-karbonil-metil szelenoészter (**EDA7**) mutatott ígéretes AcrAB-TolC efflux pumpa gátlást az *E. coli* AG100 törzsben.

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszinte hálámat szeretném kifejezni témavezetőmnek, **Dr. Spengler Gabriella** egyetemi adjunktusnak, hogy lehetőséget biztosított, hogy kutatócsoportjában dolgozhassak és amiért „kitárta előttem a világot”. Szeretnék köszönetet mondani, amiért bevezetett a tudományos kutatás világába, továbbá kiváló támogatásáért és bátorításáért.

Szeretném megköszönni **Dr. Burián Katalin** egyetemi docensnek, hogy az általa vezetett Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézetben lehetőséget biztosított kísérleteim elvégzésére.

Nagyon hálás vagyok kollaborációs partnereinknek, **Dr. Enrique Domínguez-Álvareznek**, **Prof. Dr. Carmen Sanmartínnak**, **Prof. Dr. Maria-José U. Ferreiranak** és **Prof. Dr. Masami Kawasenek**, hogy rendelkezésünkre bocsátották a vizsgált vegyületeket, továbbá segítségüket és együttműködésüket projekteken és kutatási ösztöndíjakban.

Külön köszönöm **Vigyikánné Váradi Anikónak** laboratóriumunkban nyújtott technikai segítségét. Hálás vagyok **Müllerné Deák Györgyinek** az RNS koncentrációjának mérésében nyújtott segítségért.

Szeretnék köszönetet mondani a kutatócsoportunkban dolgozó hallgatóknak, akiktől sok segítséget kaptam tanulmányaim során.

Hálás vagyok az Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet minden munkatársának a támogatásukért és a kellemes munkakörnyezet megteremtéséért.



Köszönöm **Dr. Jessica M. A. Blair** és **Dr. Helen McNeil** segítségét a Birminghami Egyetemen végzett biofilm és efflux vizsgálatok elvégzésénél.

Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Gajdács Mária**nak a vegyületek elnevezésében nyújtott segítségéért.

Hálával tartozom a legjobb barátnőmnek **Dr. Mosolygó Tímeának** és barátaimnak **Bozóki-Nové Mártának**, **Kovács Dórának**, **Abonyi Csillának** és **Dr. Varga-Bogdanov Anitának** az önzetlen segítségért, bátorításért és barátságukért.

Végezetül hálával tartozom szüleimnek, húgaimnak és páromnak szeretetükért, türelmükért és bátorításukért.

## 8. PÉNZÜGYI TÁMOGATÁS

A tézisben bemutatott kutatás az alábbi szervezetek és pályázatok támogatásával valósult meg:

- Új Nemzeti Kiválósági Program (ÚNKP-17-3; ÚNKP-18-3)
- Tempus Közalapítvány: Campus mundi hallgatói ösztöndíj, rövid külföldi tanulmányút
- SZTE Talent Ösztöndíj és Kiválósági Lista
- Az Európai Klinikai Mikrobiológiai és Infektológiai Társaság Utazási Pályázata
- SZTE ÁOK Kari Kutatási Alap, 2018/270-62-2: Szelénvegyületek mint új, ígéretes antimikrobiális szerek
- GINOP-2.3.2-15-2016-00012: Új utak a természetes anyag alapú gyógyszerkutatásban: Rendszermetabolomikai megközelítések növényi és mikrobiális eredetű bioaktív terpenoidok felkutatására
- Magyar-Portugál Kormányközi Tudományos és Technológiai Együttműködés 2019-2021: Növényi eredetű vegyületek mint rákellenes szerek: egy ígéretes lehetőség a multidrog rezisztencia leküzdésére

## 9. AZ ÉRTÉKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Kincses A**, Szabó ÁM, Saijo R, Watanabe G, Kawase M, Molnár J, Spengler G. Fluorinated beta-diketo phosphorus ylides are novel efflux pump inhibitors in bacteria. *In Vivo*. **30**: 813-817, 2017.  
**IF: 0.953**
- II. **Kincses A**, Varga B, Csonka A, Sancha S, Mulhovo S, Madureira AM, Ferreira MU, Spengler G: Bioactive compounds from the African medicinal plant *Cleistochlamys kirkii* as resistance modifiers in bacteria. *Phytother Res*. **32**: 1039-46, 2018.

**IF: 3.766**

- III. Mosolygó T, **Kincses A**, Csonka A, Tönki ÁS, Witek K, Sanmartín C, Maré MA, Handzlik J, Kieć-Kononowicz K, Domínguez-Álvarez E, Spengler G. Selenocompounds as novel antibacterial agents and bacterial efflux pump inhibitors. *Molecules*. **24**. pii: E1487, 2019.

**IF: 3.06**

- IV. **Kincses A**, Spengler G: Szelénvegyületek efflux pumpa és biofilm gátló hatásának vizsgálata *Salmonella Typhimurium* törzseken. *Tudományos eredmények a nagyvilágból: Válogatás a Campus mundi ösztöndíjasok tanulmányaiból*. ISBN 978-615-5319-64-8, 2019.

**IF: -****ΣIF: 7.779**