

**SZERVES SZELÉNVEGYÜLETEK MULTIDROG
REZISZTENCIA VISSZAFORDÍTÓ HATÁSÁNAK
VIZSGÁLATA**

PhD disszertáció

dr. Gajdács Mórió

Témavezető: Dr. Spengler Gabriella



Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet

Szeged

2018

I. BEVEZETÉS

A daganatos megbetegedések a második vezető haláloknak számítanak, nemzetközi viszonylatban súlyos népegészségügyi problémát jelentenek. 2012-ben világszerte 8,2 millió daganatokhoz köthető halálesetet és 14,1 millió új rákos beteget regisztráltak, míg 32,6 millió ember lépett be az ötéves túlélés szakaszába. Az Európai Unió tagállamai közül Magyarország számolt be a legtöbb új esetről és a legmagasabb halálozási arányról a tüdőrák és a vastagbélrák tekintetében. A daganatos kórképek alatt számtalan, egymástól gyakran sok szempontból eltérő betegséget értünk, melyet az egészséges sejtek átalakulása jellemez szabályozatlanul osztódó és növekedő sejtekké, melyek veszélyeztetik az egészséges szövet és a szervezet valamennyi részének normális működését. A daganatos megbetegedések számos etiológiai tényezőjét leírták: az egyén öröklött hajlama a betegségre, különböző életmódbeli szokások, környezeti faktorok és egyéb befolyásoló tényezők, mint az immunszuppresszió és különböző gyógyszerek egyaránt daganatok kialakulásához vezethetnek.

A daganatterápia célja a rosszindulatú sejtömeg elpusztítása vagy méretének csökkentése, ezzel egyidőben a beteg életminőségének javítása. A rákos betegek terápiáját tekintve a sebészeti beavatkozások, a radioterápia és a kemoterápia (vagy magában vagy akár kombinálva az előző kettővel) áll rendelkezésünkre. A kemoterápia a leggyakrabban használt kezelési mód a malignus hematológiai kórképek és a szolid tumorok tekintetében is. Azt a jelenséget, amikor a daganatsejtek több, egymástól kémiai szerkezetben és hatásmechanizmusban különböző kemoterápiás szerrel szemben mutatnak rezisztenciát, multidrog rezisztenciának (MDR) nevezzük, melyet a tumorsejtek számos mechanizmuson keresztül képesek kialakítani. Jelen kutatásunk során az energiafüggő efflux pumpák és az apoptózis gátlása által kialakult MDR kapott kitüntetett figyelmet. Az ATP-kötő kazetta (ABC; ATP-binding cassette) transzportercsalád rendkívül jelentős és elterjedt csoportja a transzport funkciót ellátó fehérjéknek az emberi szervezetben, melyek működésük során az ATP hidrolíziséből felszabaduló energiát használják fel arra, hogy a fehérjét expresszáló sejtől eltávolítsanak különböző szubsztrátokat. Az ABC transzporterek közül először az ABCB1 fehérjét írták le: a fehérje túltermelését gyakran hozták kapcsolatba hátrányos klinikai kimenetellel a daganatos betegség során. Ez a transzporter flexibilis szubsztrátkötő helyének köszönhetően többféle, egymással nem rokon szerkezetű kemoterápiás szer kipumpálására képes. Feltörekvő kutatási irányvonalnak és terápiás stratégiának mutatkozik az efflux pumpa gátlók alkalmazása, így javítani lehet a daganatellenes terápia hatékonyságát. A kemoterápiás szerek által kiváltott sejthalál egyik legjelentősebb formájának az apoptózist tekintik, az apoptotikus folyamatok károsodása vezethet MDR (terápia-refrakter) daganatokhoz.

Számos szervetlen és szerves szelénvegyületet vizsgáltak mint kemopreventív és/vagy citotoxikus szert a daganatterápiában: ezeket az eredményeket nagy elemszámú epidemiológiai vizsgálat is alátámasztja. A szelénvegyületek daganatellenes szerként való alkalmazásához fűzött elképzelések azok redox-moduláló hatásával függnek össze. A szakirodalomban leírták, hogy a rákos sejtek sokkal érzékenyebbek az exogén oxidatív stresszre, mint az egészséges, nem tumoros sejtek. Ennek oka a reaktív oxigén intermedierek (ROS) fokozott szintje és az antioxidáns kapacitásuk maximális küszöbértéke, mivel a daganatsejtek csak intenzívebb metabolizmusukkal képesek fenntartani folyamatos sejtproliferációjukat. A kísérletes vizsgálatok kezdetben a szervetlen szelénvegyületeket tanulmányozták citotoxikus hatásukra és kombinációs kemoterápiában való hatékonyságukra vonatkozóan, azonban későbbi

eredmények rávilágítottak arra, hogy a szerves szelénvegyületek előnyösebb biológiai hatással rendelkeznek és kevésbé toxikusak. Ezen vegyületeket számos *in vitro* daganatsejtes és állatkísérletes modellrendszerben vizsgálták, ahol ígéretes rákellenes és ROS-moduláló hatást mutattak önmagukban vagy klinikailag releváns kemoterápiás szerekkel kombinációban.

II. CÉLKITÚZÉS

Vizsgálatunk célja Domínguez-Álvarez és *mtsai.* által szintetizált, újszerű szerkezettel rendelkező szerves szelénvegyületek antitumor hatásának tanulmányozása különböző *in vitro* sejtvonalas modellrendszerek (egér és humán, tumoros és nem daganatos) felhasználásával. Citotoxikus hatásuk mellett a vegyületek multidrog rezisztencia visszafordító hatását is vizsgáltuk két rezisztencia mechanizmusra (ABCB1-által mediált drog efflux gátlása és apoptózis indukció) vonatkozóan. Ezen felül feltérképeztük fizikai-kémiai tulajdonságaikat, hogy további származékokat lehessen előállítani és *in vivo* is fel lehessen őket használni.

A kutatás célkitűzései az alábbiak:

1. A vegyületek (ciklikus szelenoanhidrid, tíz szelenoészter és négy szerves kalcogénvegyület) **citotoxikus hatásának és szelektivitásának meghatározása** L5178Y szülői (PAR) és *ABCB1*-génnel transzfektált multidrog rezisztens (MDR) egér T-sejtes limfóma sejtvonal, Colo 205 (doxorubicin-érzékeny) és rezisztens Colo 320 (*ABCB1*-túltermelő) humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonal, A549 humán tüdő adenokarcinóma, NIH/3T3 egér embrionális fibroblaszt és MRC-5 humán tüdő fibroblaszt sejtvonal felhasználásával, MTT módszerrel.
2. A vegyületek (ciklikus szelenoanhidrid, tíz szelenoészter és négy szerves kalcogénvegyület) **efflux pumpa moduláló hatásának vizsgálata** L5178Y szülői (PAR) és *ABCB1*-génnel transzfektált multidrog rezisztens (MDR) egér T-sejtes limfóma, Colo 205 (doxorubicin-érzékeny) és rezisztens Colo 320 (*ABCB1*-túltermelő) humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonalon, rhodamin 123 akkumuláción alapuló áramlási citometriás módszerrel.
3. A vegyületek (ciklikus szelenoanhidrid, tíz szelenoészter és négy szerves kalcogénvegyület) **apoptózist indukáló hatásának vizsgálata** Annexin V-FITC módszerrel L5178Y szülői (PAR) és *ABCB1*-génnel transzfektált multidrog rezisztens (MDR) egér T-sejtes limfóma és rezisztens Colo 320 (*ABCB1*-túltermelő) humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonalon.
4. A vegyületek **fizikai-kémiai és *in vivo* abszorpciós paramétereinek *in silico* elemzése** OSIRIS Molecular Property Explorer és PreADMET 2.0 szoftverek felhasználásával. Korreláció-regresszió analízis felhasználása a becsült fizikai-kémiai paraméterek és az efflux pumpa gátló hatás közötti összefüggések meghatározására.
5. **Szerkezet-hatás összefüggések (SAR) meghatározása** a kísérleti eredmények fényében.

III. ANYAG ÉS MÓDSZER

Vegyületek

Kutatásunk során az alábbi vegyületeket vizsgáltuk: egy ciklikus szelenoanhidrid (**1**) és különböző funkciós csoportokkal rendelkező szelenoészterek (**2-11**; **2-5**: metil-csoport; **6**: amid; **7-8**: karboxil-észter; **9-11**: keton). A vegyületek szintézisét Domínguez-Álvarez és *mtsai*. írták le. A vegyületeket DMSO-ban oldottuk fel a törzsoldatok (10 mM koncentrációban) elkészítéséhez. Ftálsav-anhidrid (**12**; az **1**-es vegyület oxigén izosztere) és három szervetlen kalkogén-cianát (**13-15**; **13**-KOCN, **14**-NH₄SCN, **15**-KSeCN) referenciaként szerepelt kísérleteinkben. Továbbá az alábbi vegyületek kerültek felhasználásra kísérleteink során: rhodamin 123 (R123; Sigma, St. Louis, MO, USA), 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid (MTT; Sigma, St Louis, MO, USA), nátrium-dodecil-szulfát (SDS; Sigma), verapamil (EGIS, Budapest, Magyarország), cisplatin (TEVA, Petah Tikva, Izrael) és dimetil-szulfoxid (DMSO; Sigma). Az apoptózis vizsgálatához a pozitív kontroll M627 (12H-benzo[*a*]fenotiazin) kivételével minden reagenst az Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (katalógusszám: PF 032, EMD Biosciences, Inc. La Jolla, CA) tartalmazott. A pozitív kontroll M627-et Prof. Dr. Noboru Motohashi bocsátotta rendelkezésünkre (Meiji Gyógyszerészeti Egyetem, Kiyose, Tokió, Japán), melyet DMSO-ban oldottunk fel. A rhodamin 123 törzsoldatát PBS-ben, a verapamil törzsoldatát vízben készítettük el. Minden oldatot a vizsgálat napján, frissen készítettünk el.

Sejtvonalak

Az **L5178Y** egér **T-sejtes limfóma sejtvonalat (PAR)** (ECACC 87111908 katalógus számmal az amerikai Gyógyszer- és Élelmiszerellenőrző Hatóságtól került megvásárlásra) transzfektálták pHa MDR1/A retrovírussal, a Cornwell és *mtsai*. által leírt módszer alapján. Az **ABCB1-túltermelő sejtvonal (MDR)** a transzfektált sejtek kolhicinnel való tenyésztésével került kiszelektálásra. A **humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonal (Colo 205)** doxorubicin-érzékeny és **Colo 320/MDR-LRP** multidrog rezisztens, ABCB1-túltermelő (MDR1)-LRP), ATCC-CCL-220.1 (Colo 320) és CCL-222 (Colo 205), az **A549 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonal** (ATCC CCL-185), a **NIH/3T3 egér embrionális fibroblaszt sejtvonal** (ATCC CRL-1658) és az **MRC-5 humán embrionális tüdő fibroblaszt** (ATCC CCL-171) az LGC Promochem-től (Teddington, Egyesült Királyság) került megvásárlásra.

Az **L5178Y** egér **T-sejtes limfóma sejtvonalakat (PAR és MDR)** McCoy's 5A tápfolyadékban tenyésztettük (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), kiegészítve az alábbiakkal: 10% hőinaktivált lószérum (Sigma, USA), nystatin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) és penicillin-streptomycin keverék (100 U/l és 10 mg/l) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). A **humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonalakat (Colo 205 és Colo 320)** RPMI-1640 tápfolyadékban tenyésztettük (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), kiegészítve az alábbiakkal: 10% hőinaktivált főtális borjúsérum (FBS; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 1 mM nátrium-piruvát, 100 mM HEPES (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), nystatin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) és penicillin-streptomycin keverék (100 U/l és 10 mg/l) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). A **NIH/3T3 egér embrionális fibroblaszt sejtvonalat** Dulbecco's Modified Eagle's Medium tápfolyadékban (DMEM; Gibco Life Technologies Co., UK) tenyésztettük, kiegészítve az alábbiakkal: 4,5 g/l D-glükóz, 10% hőinaktivált főtális borjúsérum, 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 1 mM nátrium-piruvát (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), nystatin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) és penicillin-streptomycin keverék (100 U/l és

10 mg/l). Az **MRC-5 humán embrionális tüdő fibroblaszt sejtvonalat** és az **A549 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalat** Eagle's Minimal Essential Medium tápfolyadékban (EMEM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) tenyésztetük, kiegészítve az alábbiakkal: nem-esszenciális aminosav keverék (NEAA; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), vitaminelegy (az MRC-5 sejtvonaltól), 10% hőinaktivált főtális borjúsérum (FBS) 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 1 mM nátrium-piruvát (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), nystatin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) és penicillin-streptomycin keverék (100 U/l és 10 mg/l).

Citotoxicitás vizsgálata

A különböző szerkezetű szelénvegyületek sejtosztódásra gyakorolt hatását 96 lyukú mikrotiter lemezekben határoztuk meg. A harmadik oszlopba 196 µl tápfolyadékhoz 4 µl-t adtunk a szelénészter származékok 10 mM-os koncentrációjú törzsoldataiból, innen hígítottuk tovább az anyagokat felező hígításos módszerrel. Ezt követően az egér T-sejtes limfóma sejtekből és a humán vastagbél adenokarcinóma sejtekből 10^4 sejtet mértünk a második oszlopba a 100 µl a megfelelő tápfolyadék mellé 100 µl térfogatban, kivéve a médium kontroll sorokat, így a vegyületek kezdeti koncentrációja 100 µM lett. A kitapadó egér embrionális fibroblaszt (10^4 /lyuk), humán embrionális tüdő fibroblaszt ($1,5 \times 10^4$ /lyuk) és humán tüdő adenokarcinóma (10^4 /lyuk) sejteket a megfelelő médiumban felvéve kitapasztottuk 96 lyukú mikrotiter lemezekben 4 órán át. Ebben az esetben a felező hígításokat külön mikrotiter lemezekben készítettük el, melyeket később mértünk rá a sejtekre. A lemezeket 37°C hőmérsékleten inkubáltuk 24 órán át, CO₂ termosztátban, az inkubáció után 20 µl MTT-t (5 mg/ml-es törzsoldatból, Sigma) mértünk a lemezekre, majd további 4 óra múlva 100 µl 10% SDS (nátrium-dodecil-szulfát)-HCl elegyet mértük a mintákhoz, a formazán kristályok szolubilizálása végett, majd a lemezeket további 24 órán át inkubáltuk CO₂ termosztátban. A lemezek optikai denzitását (OD) Multiscan EX ELISA mikrotiter lemez leolvasóval (Thermo Labsystem, Cheshire, Egyesült Államok) mértük 540 és 630 nm-en, hogy számszerű adatot kapjunk a sejtpusztulás mértékéről. A mérések során az IC₅₀ értéket határoztuk meg, amely azt a koncentrációt jelenti, ahol a vizsgált sejtek 50%-a elpusztul a kontrollhoz képest, az alábbi képlet alapján:

$$IC_{50} = 100 - \left[\frac{OD_{kezelt} - OD_{médiumkontroll}}{OD_{kezeletlen} - OD_{médiumkontroll}} \right] \times 100$$

Szelektivitási indexeket (SI) számoltunk azért, hogy összehasonlítsuk a vizsgált vegyületek hatékonyságát a tumoros és nem daganatos sejtvonalon. A szelektivitási indexeket egy kvóciens formájában fejeztük ki, melyet úgy kaptunk, hogy a nem tumoros sejteken mért IC₅₀ értékeket elosztottuk a daganatos sejtvonalon (érzékeny, illetve MDR) kapott IC₅₀ értékekkel. A vegyület erősen szelektívnek tekinthető, ha az SI értéke 6-nál nagyobb, mérsékeltén szelektívnek, ha 3 < SI < 6, enyhén szelektívnek, ha 1 < SI < 3 és nem szelektívnek, ha SI kisebb, mint 1.

ABCB1 efflux pumpa gátlás vizsgálata

A vizsgált vegyületek ABCB1 (P-glikoprotein) multidrog efflux pumpára gyakorolt gátló hatását rhodamin 123 (R123) akkumuláción alapuló, áramlási citometriás módszerrel vizsgáltunk az MDR egér T-sejtes limfóma és a rezisztens Colo320 humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonalon. A módszer egy fluoreszcencián alapuló mérési technika, amely verapamil (egy első generációs, kompetitív efflux pumpa gátló) használ referenciacitometriként. Az egér T-limfóma és a vastagbél adenokarcinóma sejtek számát 2×10^6 sejt/ml-re állítottuk be, az egér T-limfóma sejteket sérumentes McCoy's 5A médiumban, a

vastagbél adenokarcinóma sejteket szérumentes RPMI-1640 médiumban reszuszpendáltuk, majd 0,5 ml térfogatonként Eppendorf-csővekbe osztottuk szét őket. A vizsgált vegyületeket 2 és 20 μM -os végkoncentrációkban adtuk a mintákhoz, 1 és 10 mM-os koncentrációjú törzsoldatokból, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat. Verapamil (EGIS, Budapest, Magyarország) használtunk pozitív kontrollként (20 μM koncentrációban), míg a DMSO oldószer kontrollként szerepelt (2 V/V%). Ezután valamennyi mintához 10-10 μl rhodamin 123 (R123, Sigma, St. Louis, MO, USA) festéket mérünk. A R123 egy nem toxikus, lipofil, kationos fluoreszcens festék ($\lambda_{\text{ex/em}} = 505/534 \text{ nm}$), amely az ABCB1 pumpa szubsztrátja. Mivel membránpermeabilis, az élő sejtek gyorsan felveszik, így MDR gátlószerekkel együtt az ABCB1 pumpa funkciójának mérésére használható. A kezelt mintákat 20 percig 37°C-os vízfürdőben tartottuk, és miután kétszer mostuk őket foszfát sóoldat pufferrel (PBS), 0,5-0,5 ml PBS-ben vettük fel a mintákat. A vizsgált sejtpopulációk fluoreszcenciáját Partec CyFlow[®] áramlási citométer (Partec, Münster, Germany) segítségével detektáltuk. Az eredményeink egy reprezentatív áramlási citometriás kísérletből származnak, amelyben az össz sejtpopulációban legalább 20,000 egyedi sejt kiértékelése történt meg. Vizsgálatunk eredményeképpen fluoreszcencia aktivitási hányados (FAR) értékeket kaptunk, amelyek az alábbi összefüggés alapján határozhatóak meg, a kezelt és kezeletlen, érzékeny PAR és MDR sejtvonalak fluoreszcenciájának függvényében:

$$FAR = \frac{MDR_{\text{kezelt}} / MDR_{\text{kontroll}}}{\acute{E}rz\acute{e}keny_{\text{kezelt}} / \acute{E}rz\acute{e}keny_{\text{kontroll}}}$$

Az áramlási citometriás mérések során az alábbi paramétereket értékeltük ki: előre mutató fényszórás (FSC, a sejtek nagyságáról ad információt); oldalirányú fényszórás (SSC, a sejtek granuláltságáról ad információt); FL-1 (a mért fluoreszcencia értéke a sejtekben) és a fluoreszcencia aktivitási hányados (FAR), melyet a fent látható képlet alapján számoltunk. A vegyületek efflux pumpa gátló hatását a verapamilével hasonlítottuk össze, emellett egy FAR-kvóciens is kiszámításra került, az alábbi képlet alapján:

$$\text{Kvóciens} = 100 \times (\text{FAR}_{\text{vegyület}} / \text{FAR}_{\text{verapamil}})$$

Apoptózis indukció vizsgálata

A szelénvegyületek apoptózist indukáló hatását az L5178Y egér T-sejtes limfóma (szülői és *ABCBI*-transzfektált) és a rezisztens Colo 320 humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonalon vizsgáltuk *in vitro*. Az apoptózist az Annexin V-FITC Apoptózis detektáló kittel vizsgáltuk, a gyártó utasításai alapján. Ez a módszer lehetővé teszi a korai és késői apoptotikus folyamatok és a sejthalál differenciálását és kvantitatív eredményt ad a kezelt sejtpopulációról. Az apoptózis indukció vizsgálatánál annexin V foszfolipidkötő fehérjét használtunk a PS megkötésére, amelyhez fluoreszcein-izotiocianát (FITC) volt konjugálva mint fluoreszcens szubsztrát ($\lambda_{\text{ex/em}} = 495/519 \text{ nm}$), a fluoreszcens jelet áramlási citometriával detektáltuk. Mivel azoknál a sejteknél is megfigyelhető a PS áthelyeződés, amelyek már nekrotikusak vagy elpusztultak, propídium-jodidos (PI) festést is ($\lambda_{\text{ex/em}} = 535/617 \text{ nm}$) alkalmazunk. A két festés azért használható párhuzamosan, mert hullámhossz tartományaikban nincsen átfedés. A mintákban a sejtszám 1×10^6 sejt/ml-re volt beállítva. Az L5178Y egér T-sejtes limfóma sejtek esetén a sejtszuszpenziót Eppendorf-csővekbe osztottuk szét 0,5 ml-ként (5×10^5 sejt). Az egér T-sejtes limfóma sejteket 1 órán át kezeltük a vizsgált vegyületekkel, 37°C-on. A Colo 320 humán vastagbél adenokarcinóma sejtek esetén a sejtszuszpenziót 24-lyukú lemezekbe osztottuk szét és 24 órán át inkubáltuk 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában. A következő napon a

médiomot eltávolítottuk és friss tápfolyadékot mértünk a sejtekre. A Colo 320 humán vastagbél adenokarcinóma sejteket 3 órán át kezeltük a vizsgált vegyületekkel.

Pozitív kontrollként M627-et használtunk (12*H*-benzo[*a*]fenotiazin; 20 μ M), amely egy benzotiazin származék és ismert korai apoptózist indukáló vegyület. A DMSO oldószer kontrollként szerepelt (2 V/V%). A mintákat PBS-ben mostuk, majd a sejteket 2000 x g-n centrifugáltuk 2 percig. A sejtekhez friss médiomot adtunk, majd a lemezeket 24 órán át inkubáltuk 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában. Az inkubációs idő lejárta után a Colo 320 sejteket óvatosan eltávolítottuk a lyukakból sejtkaparó segítségével. A mérés előtt a sejteket reszuszpendáltuk friss, sérülésmentes médiumban. Ezután elvégeztük az apoptózis vizsgálatot a kit „gyors” protokollja alapján, a vizsgált sejtpopulációk fluoreszcenciáját Partec CyFlow® áramlási citométer (Partec, Münster, Németország) segítségével detektáltunk.

Prediktív *in silico* vizsgálat

A vizsgált szelénvegyületek fizikai-kémiai és *in vivo* abszorpciós tulajdonságainak becslésére prediktív *in silico* vizsgálatot végeztünk OSIRIS Molecular Property Explorer (Actelion Pharmaceuticals, Allschwil, Svájc) és PreADMET 2.0 (Yonsei Egyetem, Seoul, Koreai Köztársaság), interneten ingyenesen elérhető szoftverek felhasználásával, hogy közelítő képet kaphassunk a szelénvegyületek, mint potenciális farmakon-jelöltek várható tulajdonságairól. Az OSIRIS (a szóban forgó modelltől függően) 2000–5000 gyógyszermolekulát tartalmazó adatbázissal dolgozik, míg a PreADMET több mint 1 millió molekula kísérletesen mért tulajdonságait tartalmazza. A vizsgálat során a vegyületek alábbi tulajdonságait vizsgáltuk és értékeltük, hogy meghatározzuk a vegyületek illeszkedését a Lipinsky-féle ötös szabályhoz (RO5): molekulatömeg (*M*), hidrogénkötés-donorok száma (n-OH/NH), hidrogénkötés-akceptorok száma (n-ON), oktanol/víz partíciós koefficiens tízes alapú logaritmus (cLog*P*), vízdékonyság tízes alapú logaritmus (log*S*; mol/l-ben kifejezve) és a molekulák topológiai poláris felülete (TPSA). Ezen felül, a szoftverek segítségével megbecsültük a vegyületek farmakokinetikai tulajdonságait, így a plazmafehérjekötődést (PPB%), különböző monolayer modellrendszereken történő penetráció mértékét (Caco-2, MDCK), humán intesztinális abszorpció mértékét (HIA%) és a különféle citokróm P450 enzimekkel való kölcsönhatást. Az adatok összehasonlítása céljából különböző szerkezetű és hatásmechanizmusú, klinikailag releváns daganatellenes szereket (doxorubicin, gemcitabin, irinotekán, methotrexát, 5-fluorouracil) választottunk referenciaként. Meghatároztuk a vegyületek efflux pumpa gátló hatásának (logFAR értékben kifejezve) függését a becsült fizikai-kémiai paraméterektől (cLog*P*, log*S*, logTPSA, *M*), korreláció-regresszió analízist végeztük Past 3.16 statisztikai program felhasználásával. Szignifikánsnak $p < 0,05$ alatt tekintettük, emellett a determinációs együtthatót (R^2) is számoltunk, amely a kölcsönhatás százalékos függését fejezi ki a változók között.

IV. EREDMÉNYEK

Citotoxicitás vizsgálata

A ciklikus szelenoanhidrid (**1**) és a **9-11**-es számú szelenoészter erős citotoxikus hatással rendelkezett mind a szülői, mind az MDR egér T-limfóma sejteken (az IC₅₀ érték az előbbire vonatkozóan 0,94-3,97 μ M, az utóbbira vonatkozóan 0,43-4,65 μ M), az utóbbi három vegyület daganatellenes hatását nanomólos tartományban is képes volt kifejteni, a legaktívabbnak bizonyuló szelenoészter (**10**) IC₅₀ értéke 430 nM volt MDR egér T-limfóma

sejteken. A **3**-as és **6**-os szelenoészterek szintén erős citotoxikus hatással rendelkeztek, azonban ezen aktivitásukat csak 5-40-szer magasabb koncentrációban voltak képesek kifejteni, mint az előző négy vegyület. A **9-11**-es számú szelenoészter a nem daganatos egér embrionális fibroblaszt sejteken is erősen toxikusnak bizonyult (0,62-1,35 μM), míg a **2**-es és **7**-es (23,72 μM), illetve a **6**-os és **8**-os (69,69-74,47 μM) hasonló koncentrációkban volt toxikus. A **10**-es vegyület mérsékelten volt szelektív (SI=3,14), míg a szelenoanhidrid (**1**) kiváló szelektivitást mutatott (SI \geq 25,19) a daganatos sejtvonalak irányába. A humán vastagbél adenokarcinóma sejteken végzett kísérletek alapján a **9-11**-es számú szelenoészter erős citotoxikus hatással rendelkezett mind az érzékeny (Colo 205), mind a rezisztens (Colo 320) sejtvonalakon (az IC₅₀ értékek 1,19-5,48 μM és 0,35-0,96 μM), a legaktívabb vegyület (**9**) IC₅₀ értéke a Colo 320 sejteken 350 nM. Érdemes kiemelni, hogy a **9**-es és **11**-es szelenoészter mérsékelt-erős szelektivitást mutatott a Colo 320 (SI: 3,40-10,0) és a Colo 205 (SI: 4,2-14,40) sejtvonala irányába.

A ciklikus szelenoanhidrid (**1**) és két másik szelenoészter (**4** és **8**) hasonlóan ígéretesnek tekinthető, hisz nem voltak toxikusak a Colo 205 sejtvonalon, de aktívak voltak a rezisztens sejteken. A ciszplatin IC₅₀ értékei 11,36-108,29-szor magasabbak voltak, mint a **9-11**-es szelenoésztereké, emellett a szelénvegyületek 2,07-6,09-szer szelektívebbek voltak a vastagbél adenokarcinóma sejteken. Ehhez hasonlóan, a **9-11**-es szelenoészterek hatékony citotoxikus szerekeknek bizonyultak az A549 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalon (IC₅₀: 5,91-15,22 μM), két másik vegyülettel együtt (**2** és **8**), melyek 50 μM körül bizonyultak hatásosnak. Azonban ezek a vegyületek csekély szelektivitást vagy annak teljes hiányát (0,09-1,95) mutatták a tüdő adenokarcinóma/tüdő fibroblaszt sejtvonalak vonatkozásában. A referencia vegyületek (**12-15**) nem rendelkeztek citotoxikus hatással egyik vizsgált sejtvonalon sem.

ABCB1 efflux pumpa gátlás vizsgálata

A tizenegy vegyület közül négy (**1**, **9-11**) rendelkezett jelentős ABCB1 gátló hatással (az R123 intracelluláris koncentrációja ezekben az esetekben volt a legnagyobb) MDR egér T-limfóma és Colo 320 humán vastagbél adenokarcinóma sejteken, 20 μM -os koncentrációban. Az aktív vegyületek FAR kvóciensei a pozitív kontrollhoz (verapamil, 20 μM) képest 228,62-458,48% között mozogtak. A két legaktívabb vegyület (a ciklikus szelenoanhidrid **1** és a **9**-es szelenoészter) hatékonyabb ABCB1 gátló hatással rendelkezett a verapamilnál, még tízszer kisebb koncentrációban (20 vs. 2 μM) is, 202,58%-os és 442,41%-os FAR kvóciens értékekkel. Hasonló eredményeket kaptunk az ABCB1-et túlermelő Colo 320 sejtvonalon: a ciklikus szelenoanhidrid **1** és a **9-11**-es szelenoészter hatékony gátlószerei voltak az efflux protein működésének, túlszárnyalva a verapamil aktivitását (FAR=2,85) 2 μM -os koncentrációban (135,44-401,05% közötti kvóciens értékekkel). A kutatás során vizsgált többi vegyület (**2-8**-as szelenoészterek és a **12-15**-es referencia vegyületek) nem rendelkeztek a verapamilhoz mérhető efflux pumpa gátló hatással egyik sejtvonalon sem.

Apoptózis indukció vizsgálata

A szelénvegyületek apoptózist indukáló hatását a 12*H*-benzo[α]fenotiazinéhoz hasonlítottuk. A vizsgált szelenoészterek hatásos apoptózist indukáló vegyületeknek bizonyultak az egér T-sejtes limfóma sejtvonalakon. A ciklikus szelenoanhidrid (**1**) és a **9-11** szelenoészter hatékonysága volt a legfigyelemreméltóbb a pozitív kontrollal összehasonlítva, ha az összes apoptotikus esemény számát vesszük alapul. A pozitív kontroll csak tízszer

magasabb koncentrációban (2 vs. 20 μM) tudott az előbb említett vegyületekhez hasonló apoptózist indukáló hatást mutatni. Az MDR egér T-sejtes limfóma sejtvonalon elvégzett kísérletekben az **1**-es vegyület kiemelkedő hatású volt, mert korai apoptózist indukált a vizsgált sejtpopuláció 32,2%-ban (összesen 77,67%-ban). Ezen felül, a **9-11**-es szelenoészterek is aktívnak bizonyultak, azonban ezek biológiai hatását döntően késői apoptotikus/nekrotikus vagy nekrotikusként detektáltuk. A vizsgált vegyületek hasonló mértékben indukáltak apoptózist a szülői egér T-sejtes limfóma sejtvonalon, azonban érdemes megjegyezni, hogy a **10-11**-es szelenoészterek számottevően hatékonyabbak voltak az érzékeny sejtvonalon (apoptotikus események a vizsgált sejtpopuláció 39,01% vs. 84,37%-ban, illetve 47,16% vs. 92,46%-ban). Az efflux pumpák szerepét az apoptózis indukció elkerülésében és a sejtmembrán stabilizálásában már leírták. Az efflux pumpák működésének és a programozott sejthalál folyamatainak összefonódása lehetséges magyarázata a megfigyeléseinknek. Egy másik lehetséges magyarázat lehet az, hogy a vegyületek intracelluláris koncentrációja valószínűleg alacsonyabb az ABCB1 efflux pumpa működésének következtében: míg mind a **9-11**-es vegyület citotoxikus hatással rendelkezett $\text{IC}_{50} < 2 \mu\text{M}$ -s koncentrációban (a késői apoptózist/nekrotizist okozó hatásukhoz az egér sejtekben), a **9**-es szelenoészter hatékony efflux pumpa gátló hatással rendelkezett 2 μM -os koncentrációban is, míg a **10-11**-es vegyületek csak 20 μM -os koncentrációban mutatott hasonló aktivitást. Az eredményeink alapján a vegyületek hasonló mértékben okoztak késői apoptózist/nekrotizist PAR sejteken, míg a **9**-es vegyület kiugróan magas (2,8-3,9-szer magasabb) aktivitással bírt az MDR sejteken.

A vegyületek (**1**, **9-11**) hasonló hatást mutattak a rezisztens humán vastagbél adenokarcinóma (Colo 320) sejtvonalon (apoptózist indukáltak a vizsgált sejtpopuláció 64,6-80,5%-ban). Összehasonlítva az eredményeket mind a három sejtvonalra vonatkozóan, megfigyelhető, hogy a ciklikus szelenoanhidrid (**1**) hatékony korai apoptózist indukálónak bizonyult (32,2-66,1%), míg a **9-11**-es szelenoészter döntően késői apoptotikus/nekrotikus folyamatokat indított el, mely valószínűleg erős citotoxikus tulajdonságuknak köszönhető. Más szelénvegyületek (**2-8**) vagy a referencia vegyületek (**12-15**) nem rendelkeztek hasonló apoptózis indukáló hatással.

Prediktív *in silico* elemzés

A szelénvegyületek fizikai-kémiai tulajdonságaikat tekintve összhangban vannak a disszertációban részletezett értékelési kritériumokkal és kivétel nélkül mindegyik megfelelt a Lipinsky-féle ötös szabálynak, szemben bizonyos referenciavegyületekkel (doxorubicin, methotrexát, irinotekán). A szerves szelénvegyületek várható kiváló orális biohasznosíthatósággal (96.74-99.10%) rendelkeznek, és a Caco-2 egysejtrétegen becsült értékeik alapján mérsékelt permeabilitási tulajdonságokkal rendelkeznek. A prediktált plazmafehérje kötődés (PPB%) közel 100%-os az összes vizsgált szelénvegyület esetében, amely a szelénatom jelenlétének köszönhető a biológiailag aktív molekulákban. A vizsgált vegyületek előreláthatólag a CYP2C9 enzim inhibitorai és a **6**-os vegyületet leszámítva a CYP3A4 enzim szubsztrátjai és inhibitorai, amely problémát jelenthet, ha ezeket a vegyületeket együtt adagolnák olyan daganatellenes szerekkel, amelyek ezeken az enzimeken metabolizálódnak. A vizsgált vegyületek efflux pumpa gátló hatása ($\log\text{FAR}$) és az oktanol/víz koefficiensük tízes alapú logaritmus ($c\text{Log}P$) között szignifikáns összefüggést találtunk mind az MDR egér T-sejtes limfóma sejteken ($p=0,0034$; $R^2=0,6934$), mind a Colo 320 humán vastagbél adenokarcinóma sejteken ($p=0,0198$; $R^2=0,5117$). A vegyületek molekulatömege, a topológiai poláris felülete, illetve a vízoldhatóságuk tízes alapú logaritmus és a fluoreszcencia adatok ($\log\text{FAR}$) között nem találtunk jelentős összefüggést.

V. MEGBESZÉLÉS

A daganatos megbetegedések súlyos népegészségügyi problémát jelentenek. 8,2 millió daganatokhoz köthető halálesetet és 14,1 millió új rákos beteget regisztráltak. A fejlett országokban az öregedő népesség miatt a daganatos megbetegedések előfordulása előreláthatólag tovább fog növekedni. Az Európai Unió tagállamai közül Magyarország számolt be a legtöbb új esetről és a legmagasabb halálozási arányról a tüdőrák és a vastagbélrák tekintetében. A daganatterápia célja a rosszindulatú sejttömeg elpusztítása vagy méretének csökkentése, ezzel egyidőben a beteg életminőségének javítása. A kemoterápia hatékony alkalmazását megnehezíti a szerek alacsony biohasznosíthatósága, alacsony szelektivitásukból adódó előnytelen mellékhatás profilja és a multidrog rezisztencia kialakulása. A multidrog rezisztencia során a daganatsejtek több, különböző kémiai szerkezetű vagy hatásmechanizmusú szerrel szemben mutatnak rezisztenciát. A jelen disszertációban az energiafüggő efflux pumpák által okozott rezisztencia és az apoptózis indukció gátlását vizsgáltuk. Számos olyan vegyületet írtak le, amely képes az ABCB1 transzporter funkcióját gátolni. Egy ígéretes terápiás stratégiának tartják különböző rezisztencia módosító vegyületek alkalmazását adjuvánsként, hogy visszafordítsák a daganatos sejtek MDR fenotípusát. Rengeteg szervetlen és szerves szelénvegyületet vizsgáltak daganatellenes hatásukra vonatkozóan. A szerves szelénvegyületek ismert modulátorai az emlősejtek intracelluláris redox státuszának, ennél fogva hatékony és szelektív daganatellenes hatásúak lehetnek, mivel a daganatsejtek érzékenyebbek az exogén ROS-ra. A kutatás célja újszerű szerkezettel rendelkező szerves szelénvegyületek daganatellenes és MDR visszafordító hatásának vizsgálata, a hazai daganatos betegségek epidemiológiai viszonyait figyelembe véve. Ezen felül célkitűzéseink között szerepelt a szerkezet-hatás összefüggések meghatározása.

Eredményeink tükrében elmondható, hogy adott szerkezettel rendelkező vegyületek minden vizsgálat során figyelemre méltó aktivitással rendelkeztek, míg mások nem voltak hatékonyak egyik kísérletben sem. A referenciaként választott vegyületeknek (**12-15**) nem volt hatása egyik kísérletben sem. A **citotoxicitási vizsgálatokban** a szelénatom közvetlen közelében levő alkilánc természete meghatározó volt a daganatellenes hatás szempontjából. A ciklikus szelénanhidriden (**1**) kívül a metil- (**9**) vagy *terc*-butilketon-szubsztitúció (**10,11**) volt a legelőnyösebb a citotoxikus hatás kifejeződéséhez. Az aromás gyűrűn található szubsztituensek hatása kevésbé volt jelentős a vegyületek daganatellenes hatása szempontjából. Általánosságban elmondható, hogy a szelénvegyületek az A549 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalon voltak a legkevésbé aktívak és szelektívek. A **9-11-es** szelénészter kiemelkedő hatását az is igazolja, hogy IC_{50} értékeik több esetben is a nanomólos tartományban voltak és szelektivitási indexük is 6 felettinek bizonyult a humán vastagbél adenokarcinóma sejteken. A ciklikus szelénanhidrid (**1**) kiemelkedő szelektivitással rendelkezett egér sejtvonalakon ($SI > 20$) és nem mutatott toxicitást egyik nem tumoros sejtvonal iránt sem. A **rhodamin 123 akkumulációs vizsgálatok** eredményei összhangban vannak a citotoxicitási vizsgálatban megfigyelttel. A 4-klór-fenil-szubsztituált metil-keton-szelénészter (**9**) volt a legaktívabb vegyület (2 μ M-os koncentrációban hatékonyabbnak bizonyult bármely más vegyületnél), melyet a ciklikus szelénanhidrid (**1**) és a másik két metil-keton-szelénészter (**10,11**) követ, melyek szintén hatékony ABCB1 gátlók voltak bírtak 20 μ M-os koncentrációban.

A **2-8**-as szelenoészter efflux pumpa moduláló hatása nem volt összehasonlítható a verapamillal. Fontos kiemelni, hogy a vegyületek lipofilicitása befolyásolta azok ABCB1 moduláló hatását, mivel a cLogP értékük szignifikáns összefüggést mutatott ($p < 0,05$) a számolt FAR értékekkel. **Az apoptózis vizsgálatban** az előbb említett négy vegyület (**1**, **9-11**) az egér sejtvonalak esetén a sejtpopuláció 39,01-97,32%-ban, a humán sejtvonalak esetén 64,60-71,40%-ban volt képes kiváltani apoptózist. A ciklikus szelenoanhidrid (**1**) volt a leghatékonyabb korai apoptózist indukáló vegyület (az egér sejtvonal esetén a vizsgált sejtpopuláció egyharmadában, a vastagbél adenokarcinóma sejtvonalak esetén a vizsgált sejtpopuláció kétharmadában), ezzel aktívabbnak bizonyult, mint a pozitív kontroll (M627). A metil-ke-ton-szelenoészterek ezzel szemben döntően nekrozist (az egér sejtvonalak esetén egészen 85,8%-ig) okoztak. A két különböző típusú sejthalál megkülönböztetése fontos, hiszen a kemoterápia-indukált sejthalál szempontjából a korai apoptotikus folyamatok az előnyösek, hiszen nem szabadulnak fel gyulladáshoz vezető mediátorok, amelyek károsítják a környező sejteket, szemben a nekrotikus folyamatokkal. A **2-8**-as számú szelenoészter esetén az apoptózist indukáló hatás csekély volt vagy teljesen hiányzott. A humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonal érzékenyebbnek bizonyult a szelenoészterekkel történő kezelésre.

A kalkogén elemeket (S, Se, Te) tartalmazó szerves vegyületek iránt egyre nagyobb az érdeklődés a kísérletes kemoterápiás kutatásokban. A szakirodalom arra enged következtetni, hogy a csoport legaktívabb eleme a tellúr (Te), azonban ezek a vegyületek általában erős toxikus hatással és csekély szelektivitással rendelkeznek. A szelénvegyületek előnye, hogy befolyásolják a különböző celluláris redox mechanizmusokat és szignál transzdukciós útvonalakat, ezért kifejezetten vonzóak a kutatók számára. A **12**-es számú referencia vegyület, amely a ciklikus szelenoanhidrid oxigén-izosztere, nem mutatott értékelhető aktivitást egyik vizsgálat során sem, ami arra enged következtetni, hogy a Se-atom központi jelentőségű a vegyületek hatékonysága tekintetében. A vegyületek pontos molekuláris hatásmechanizmusát még nem írták le. Előző vizsgálatok és Domínguez-Álvarez és *mtsai*. hipotézise alapján a vegyületek biológiai hatása a szelenoészter csoport hidrolízisében keresendő. Ez a bomlás lehetővé teszi a szelén-anionok felszabadulását a biológiai közegbe, így a töltéssel rendelkező szelén-részecskék bekapcsolódhatnak a legkülönbözőbb oxido-redukciós folyamatokba. Azt feltételezzük, hogy az új szelenoészterek „prodrug” formájában fejtik ki a hatásukat, így a molekulák képesek átjutni a sejtek citoplazmájába. A sejten belül a hordozómolekula bomlik és felszabadítja az anionos karakterű részecskéket, amelyek citotoxikus hatással rendelkeznek. Az elektronszívó csoportok a molekulán belül (pl. ke-ton, karboxilcsoport) elősegítik a lebomlás folyamatát és stabilizálhatják a keletkező részecskéket. Azonban nem érdemes olyan származékokat tervezni, amelyeknek bomlása még a citoplazmán való átjutás előtt bekövetkezik, hisz ebben az esetben az ionos karakterű részecskék már nem lesznek képesek átjutni a citoplazmán hidrofíl karakterük miatt. A ciklikus szelenoanhidrid (**1**) hatékonysága valószínűleg hasonlóan magyarázható, mint a **9-11**-es vegyületek hatásmechanizmusa, bár a bomlás folyamatának és kinetikájának különbözőnek kell lennie, hisz ebben az esetben a Se-atom egy öttagú gyűrűrendszerben található. Ezen felül nem világos még az sem, hogy a vizsgált vegyületek az ABCB1 kompetitív gátlószerei vagy a fehérje egy specifikus doménjéhez kötődnek.

Összegezve, négy vegyület került azonosításra, mint kiváló vezérmolekula további kísérletek tervezésére: a ciklikus szelenoanhidrid (**1**) és a **9-11**-es számú szelenoészterek. Ezek a vegyületek kiváló daganatellenes és MDR-visszafordító (ABCB1-pumpa moduláló és apoptózis indukáló) hatással rendelkeztek. Figyelembe véve az *in silico* elemzés során kapott becsült eredményeket, a vegyületek előreláthatólag megfelelő *in vivo* biohasznosíthatósággal rendelkeznek és ígéretesek lehetnek a pre-klinikai és klinikai kutatási fázisba való átmenetben (lásd megfelelőségüket a RO5 szabálynak és a HIA% értékeiket). A jövőbeli kutatásokat tekintve további szerkezeti variáns származékok tervezésére, szintézisére mindenképpen javasolt. Ezen felül érdekes lehet a különböző szelénvegyületek vizsgálata kombinációs kemoterápiában különböző daganatellenes szerekekkel *in vitro*, mert ez a kutatási terület is gazdag szakirodalommal rendelkezik

VI. TÉZISPONTOK

a. Szelénvegyületek mint citotoxikus szerek: Három alkil-ke-toncsoportot tartalmazó szelenoészter mutatott ígéretes (IC₅₀ értékek a nanomólos tartományban) citotoxikus hatást egér T-sejtes limfóma, humán vastagbél adenokarcinóma és humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalakon. A ciklikus szelenoanhidrid kiváló aktivitást és szelektivitást mutatott a daganatos egér sejtvonalak irányába.

b. Szelénvegyületek mint efflux pumpa gátló szerek: A ciklikus szelenoanhidrid és három alkil-ke-toncsoportot tartalmazó szelenoészter rendelkezett figyelemre méltó efflux pumpa gátló hatással az ABCB1-túltermelő egér T-sejtes limfóma és humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonalon. A 4-klór-fenil szubsztituens megléte bizonyult a legelőnyösebbnek az efflux pumpa gátló hatás szempontjából mind az egér, mind a humán sejtvonalon.

c. Szelénvegyületek mint apoptózis indukáló szerek: A ciklikus szelenoanhidrid hatékony korai apoptózist indukáló vegyület volt, míg az alkil-ke-toncsoportot tartalmazó szelenoészterek döntően késői apoptózist/nekrózist indukáltak az érzékeny és az ABCB1-túltermelő egér T-sejtes limfóma és vastagbél adenokarcinóma sejtvonalon.

d. A szelénvegyületek ADME tulajdonságainak becslése *in silico* módszerrel: Valamennyi szerves szelénvegyület megfelel a Lipinsky-féle ötös szabálynak, továbbá várhatóan mérsékelt intesztinális penetrációs tulajdonságokkal, nagyon erős plazmafehérje kötődéssel és kiváló orális biohasznosíthatósággal rendelkeznek. Az eredmények alapján összefüggés feltételezhető az efflux pumpa gátló hatás és a vegyületek lipofil karaktere között.

VII. PÉNZÜGYI TÁMOGATÁS

A disszertációban bemutatott kutatást az alábbi szervezetek és pályázatok támogatták:

1. **Szegedi Rákkutatásért Alapítvány,**
2. **TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001,**
3. **Márton Áron Tehetséggondozó Szakkollégiumi Program 2015/16** (Külgazdasági és Külügyminisztérium),
4. **Márton Áron Kutatói Program 2016/17 és 2017/18** (Külgazdasági és Külügyminisztérium),
5. **SZTE Talent Ösztöndíj és Kiválósági Lista,**
6. **Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP-17-3),**
7. **A Magyar Mikrobiológiai Társaság Utazási Pályázata,**
8. **ESCMID Mentorprogram és Nyári Egyetem Utazási Pályázat (2017/18).**

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Spengler Gabriella egyetemi adjunktusnak**, hogy lehetőséget biztosított, hogy a *Kísérletes kemoterápia és profilaxis* kutatási területen tevékenykedhessek az SZTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézetben. Továbbá szeretnék köszönetet mondani az értékes tanácsokért és tudományos iránymutatásáért. Az általa létrehozott támogató légkör jelentősen hozzájárult a kutatásaim sikeréhez.

Szeretném megköszönni **Dr. Burián Katalin** egyetemi docensnek, hogy az általa vezetett Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézetben végezhettem doktori (PhD) tanulmányaimat és lehetővé tette kísérleteim elvégzését.

Hálával tartozom kollaborációs partnereinknek, **Dr. Enrique Domínguez-Álvareznek**, **Prof. Dr. Carmen Sanmartínnak** és **Dr. Jadwiga Handzliknak**, hogy rendelkezésünkre bocsátották a vizsgált vegyületeket, valamint szakmai segítségükkel és együttműködésükkel segítették a közös munkánkat.

Köszönöm **Dr. Ocsovszki Imre** segítségét az áramlási citometriás vizsgálatok elvégzésénél és az eredmények kiértékelésénél. Az apoptózis vizsgálatok elvégzésél sok segítséget kaptam **Dr. Szabó Tönki Ádámtól**.

Nagyon köszönöm **Vigyikánné Váradiné Anikó** kiváló technikai segítségét, ezen kívül barátságát, támogatását és kedvességét a laboratóriumban eltöltött időmben. Köszönettel tartozom **Kincses Annamária** és **Nové Márta** volt munkatársaimnak barátságukért és támogatásukért is. Szeretnék köszönetet mondani minden kollégámnak az Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézetben.

Szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Molnár Józsefnek** és **Prof. Dr. Leonard Amaralnak**, akik a baktériumok és a daganatsejtek multidrog rezisztenciájának visszafordításával kapcsolatban értek el fontos eredményeket.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Urbán Editnek**, aki lehetővé tette az SZTE ÁOK Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet erőforrásainak felhasználását a kutatásaim során, illetve vállalta mentorálásomat az ESCMID Mentorprogramján belül.

Hálás vagyok **Dr. Paulik Editnek** és **Dr. Szabó Andreának**, hogy a jelen disszertációhoz nem kapcsolódó kutatási törekvéseimben támogattak.

Különösen hálás vagyok **Dr. Bátori Zoltánnak** és családjának az önzetlen segítségért és támogatásért.

Végezetül, hálával tartozom a családomnak és barátaimnak szeretetükért és támogatásukért, különösen édesanyámnak, **Szilviának**, aki nélkül nem érhettem volna el ezeket a sikereket. A jelen disszertációt neki ajánlom.

IX. KÖZLEMÉNYEK

I. Domínguez-Álvarez E, **Gajdács M**, Spengler G, Palop JA, Maré MA, Kieć-Kononowicz K, Amaral L, Molnár J, Jacob C, Handzlik J, Sanmartín C: Identification of selenocompounds with promising properties to reverse cancer multidrug resistance. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 26(12): 2821-2824, 2016.

IF₂₀₁₆: 2.454, Idézők: 12 (Független idézők: 5)

II. **Gajdács M**, Spengler G, Sanmartín C, Maré MA, Handzlik J, Domínguez-Álvarez E: Selenoesters and selenoanhydrides as novel multidrug resistance reversing agents: A confirmation study in a colon cancer MDR cell line. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 27(4): 797-802, 2017.

IF₂₀₁₇: 2.442, Idézők: 10 (Független idézők: 4)

III. **Gajdács M**, Handzlik J, Sanmartín C, Domínguez-Álvarez E, Spengler G: [Organoselenium compounds as antitumor agents: *in vitro* evaluation on a colon cancer model system] (*article in Hungarian*). *Acta Pharmaceutica Hungarica* 88(2): 59-66, 2018.

IF₂₀₁₇: -, Idézők: -

IV. **Gajdács M**, Handzlik J, Sanmartín C, Domínguez-Álvarez E, Spengler G: [Prediction of ADME properties for selenocompounds with anticancer and efflux pump inhibitory activity using preliminary computational methods] (*article in Hungarian*). *Acta Pharmaceutica Hungarica* 88(2): 67-74, 2018.

IF₂₀₁₇: -, Idézők: -

ΣIF: 4.896

A disszertációhoz kapcsolódó tudományos előadások: 17

X. TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Hozzájárulok ahhoz, hogy a doktorjelölt a disszertációban felsorolt közös publikációt és a benne foglalt eredményeket a védési eljárásban felhasználja.

Kijelentem, hogy a felsorolt közleményből felhasznált eredményeket más PhD eljárásban nem használtuk és a jövőben sem használjuk fel:

- Egy ciklikus szelenoanhidrid, tíz szelenoészter és négy szerves kalcogénvegyület citotoxikus hatásának és szelektivitásának meghatározása egér limfóma sejteken.
- Egy ciklikus szelenoanhidrid, tíz szelenoészter és négy szerves kalcogénvegyület efflux pumpa moduláló hatásának vizsgálata egér limfóma sejteken.
- A vegyületek (ciklikus szelenoanhidrid, tíz szelenoészter és négy szerves kalcogénvegyület) apoptózist indukáló hatásának vizsgálata egér limfóma sejteken.

Szeged, 2018. november 29.

.....

Dr. Spengler Gabriella

SZTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet