MULTIDROG REZISZTENCIA VISSZAFORDÍTÁSA EFFLUX PUMPA GÁTLÓ VEGYÜLETEKKEL ÉS LEHETSÉGES ADJUVÁNSOKKAL BAKTÉRIUMOKBAN ÉS TUMORSEJTEKBEN

PhD tézis

Bozóki-Nové Márta

Témavezető: Dr. Spengler Gabriella

Orvosi Mikrobiológiai Intézet

Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ és Általános Orvostudományi Kar

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2021

BEVEZETÉS

A gyógyszer-rezisztencia egy természetes folyamat, amely az élőlények és a környezetük kölcsönhatásán alapul. Az elmúlt évtizedekben viszont drámaian megnövekedett a rezisztens mikrobiális fertőzések száma, mely a gyógyszer-rezisztens mikróbák globális terjedésével magyarázható. Ezenfelül a multidrug rezisztencia (MDR) a rákos sejtekben is előfordul, megnehezítve a klinikai kezeléseket. A tumorterápiában elért sikerek és erőfeszítések ellenére a rákellenes gyógyszerekkel szembeni rezisztencia leküzdése a daganatterápia egyik legfontosabb kihívása. A gyógyszer-rezisztenciának számos mechanizmusa létezik baktériumokban és tumorsejtekben. Néhány mechanizmus specifikus, viszont a megnövekedett drog efflux jelensége a baktériumoknál és a tumorsejteknél is megfigyelhető. Ez a mechanizmus a gyógyszer-felhalmozódás csökkenéséhez vezet, amely a túltermelt efflux pumpák (EP-k) működésének következménye, így ezek gátlása egy ígéretes megközelítése az MDR leküzdésének. Az MDR visszafordítása céljából új szintetikus efflux pumpa gátló szereket (EPI-ket) lehet tervezni (pl. szeléntartalmú vegyületeket) vagy „régi” gyógyszereket (pl. fenotiazinokat) lehet újra felhasználni és új indikációkkal alkalmazni.

A szelén (Se) az élőlények számára elengedhetetlen nyomelem, továbbá a szelénvegyületek hatékonyak a rákos sejtvonalak ellen is, hiszen képesek befolyásolni a tumor növekedését, az áttéteket, az angiogenezist és a gyógyszer-rezisztenciát. Ezenkívül ezek a szerek antibakteriális aktivitással is rendelkeznek. A Se-t tartalmazó szerek alternatív és hatékony vegyületek az MDR leküzdésére mind a rákellenes, mind az antibakteriális terápiában. A fenotiazinokat az évek során mint antiemetikus, antipszichotikus, antihisztamin és antikolinerg hatású vegyületeket alkalmazták. Számos tanulmány kimutatta, hogy a fenotiazinok EPI-ként képesek visszafordítani az MDR-t baktériumokban, valamint erős rákellenes hatással rendelkező vegyületek. A fenotiazinokat széles körben ismerik és használják a klinikai gyakorlatban, továbbá ezen vegyületek adjuvánsként történő alkalmazása lehetséges alternatívát jelenthet az MDR fenotípus leküzdésére rákos megbetegedésekben, mert a gyógyszer újrapozícionálás célja a meglévő gyógyszerek új felhasználási javallatainak megtalálása.

Az évek során számos EPI hatású vegyületet fedeztek fel, de ezek jelenlegi formájukban klinikai felhasználásra nem alkalmasak. Ennek ellenére a specifikus EPI-k képesek helyreállítani az ismert gyógyszerek hatékonyságát, valamint hasznosak lehetnek takarmány-adalékanyagokként is, amelyek célja az állati gyomor-bél traktus kolonizációjának csökkentése, ezáltal csökkentve a fertőzések emberekbe történő átvitelét.

CÉLKITŰZÉSEK

A kutatás célja új szelénvegyületek vizsgálata Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokon. A multidrug rezisztens tumorsejtek tekintetében különféle megközelítések segíthetnek az MDR fenotípus leküzdésében. Jelen munkában szelénvegyületeket alkalmaztunk a daganatellenes fenotiazinokkal kombinálva *in vitro* tumorsejt modellrendszerben.

A kutatás fő céljai:

1. **A környezeti pH (pH 5 és pH 7) hatása a Gram-negatív *Escherichia coli* K-12 AG100 AcrAB-TolC efflux pumpa (EP) rendszerére az efflux pumpa gátló (EPI) prometazin (PMZ) jelenlétében**

   1.1. A PMZ legkisebb gátló koncentrációjának (MIC) meghatározása mikrodilúciós módszerrel

   1.2. A PMZ pumpa gátló hatásának vizsgálata etídium-bromid (EB) valós idejű akkumulációjával.

   1.3. Az *acrA*, *acrB* EP gének és szabályozóik (*marA*, *marB*, *marR* és *rob*), valamint a stressz gén *soxS* génexpressziós változásainak vizsgálata PMZ hatására RT-qPCR módszerrel.

2. **Kilenc szimmetrikus szelenoészter antibakteriális hatásának vizsgálata Gram-negatív és Gram-pozitív törzseken**

   2.1. A vegyületek MIC értékének meghatározása mikrodilúciós módszerrel AcrAB-TolC pumparendszert expresszáló vad típusú *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 (SE01) törzsön, valamint Δ*acrB* mutáns *S.* Typhimurium SL1344 (SE02), Δ*acrA* mutáns *S.* Typhimurium SL1344 (SE03) és Δ*tolC* mutáns *S.* Typhimurium SL1344 (SE39) törzsön, valamint meticillinre érzékeny *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 referencia törzsön, illetve meticillin és ofloxacin rezisztens *S. aureus* 272123 (MRSA) klinikai izolátumon.

   2.2. A szelénvegyületek rezisztencia módosító hatásának értékelése ciprofloxacinnal (CIP) és tetraciklinnel (TET) kombinálva *S. aureus* törzseken.

   2.3. A szelénvegyületek anti-biofilm hatásának vizsgálata *S. aureus* törzseken kristályibolya festéssel.

   2.4. A szelénvegyületek EP gátló hatásának vizsgálata valós idejű EB akkumulációval.

2.5. A szelénvegyületek QS gátló hatásának monitorozása agardiffúziós módszerrel a szenzor *Chromobacterium violaceum* 026 és az *N*-acil-homoszerin lakton (AHL) termelő *Enterobacter cloacae* 31298 törzs felhasználásával.

3. A szelénvegyületek és a fenotiazinok mint tumorellenes adjuvánsok kölcsönhatásának *in vitro* vizsgálata egér T-limfóma sejteken

3.1. A vegyületek citotoxicitásának és szelektivitásának meghatározása NIH/3T3 egér embrionális fibroblaszt, valamint egér T-limfóma sejteken.

3.2. A szelénvegyületek és a fenotiazinok kölcsönhatásának vizsgálata MDR egér T-limfóma sejteken checkerboard kombinációs módszerrel.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Vegyületek

A szelénvegyületeket Dr. E. Domínguez-Álvarez és munkatársai (CSIC, Madrid, Spanyolország) NMR, MS és IR technikák alkalmazásával jellemezték, valamint tisztaságukat elemanalízissel értékelték. A vegyületek tiszták és kémiailag stabilak voltak levegőn. A biológiai vizsgálatokban történő felhasználásuk előtt az anyagokat dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk és 10 mM koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk.

További vegyületeink a prometazin (PMZ), a klórpromazin (CPZ) és a tioridazin (TZ) voltak, amelyeket DMSO-ban oldottunk fel, kivéve a PMZ-t, amelyet desztillált vízben. A DMSO koncentrációját minden kísérletben 1% alatt tartottuk.

1.1. Szimmetrikus szelenoészterek

Kutatásunk során kilenc szimmetrikus szelenodiésztert vagy szelenotriésztert értékeltünk: három 2-oxopropil-szelenoészter (röviden: keton-szelenoészter vagy metil-keton-szelenoészter; **Se-K1**, **Se-K2** és **Se-K3** vegyület), három metil-oxi-karbonil-metil-szelenoészter (metil-karbonil-szelenoészter vagy metil-oxi-karbonil-szelenoészter; **Se-E1**, **Se-E2** és **Se-E3**) és három metil-ciano-szelenoészter (ciano-szelenoészter; **Se-C1**, **Se-C2** és **Se-C3** vegyületek). Szintézisük leírása megtalálható az EP17382693 számú szabadalomban.

1.2. Korábban már leírt rákellenes aktivitással rendelkező szelenoanhidrid és szelenoészterek

Az **EDA1** ciklikus szelenoanhidrid, az **EDA2-EDA5** szimmetrikus szelenoészterek, valamint az **EDA6-EDA11** aszimmetrikus szelenoészterek újbóli szintézisét, tisztítását és

jellemzését Dr. E. Domínguez-Álvarez végezte (CSIC, Madrid), a vegyületek tisztaságát elemanalízissel értékelte.

2. Sejtvonalak

L5178 egér T-sejtes limfóma sejtvonal (érzékeny szülői PAR, illetve ennek pHa MDR1/A retrovírussal transzfektált multidrog rezisztens MDR sejtvonala, amely túltermeli a humán ABCB1 fehérjét), ECACC 87111908 katalógus számmal az amerikai Gyógyszer- és Élelmiszerellenőrző Hatóságtól (FDA; Egyesült Államok) kerültek kutatócsoportunkhoz. Az ABCB1-expresszáló L5178Y (MDR) sejtvonalat a transzfektált sejtek kolhicinnel történő tenyésztésével szelektálták ki. A sejteket McCoy 5A tápfolyadékban tenyésztettük 10% hő-inaktivált lószérummal, 200 mM L-glutamin és egy penicillin-sztreptomicin keverékkel kiegészítve 100 U/L, illetve 10 mg/L koncentrációban. A sejtvonalakat 37°C-on, 5% CO_2 atmoszférában inkubáltuk.

A NIH/3T3 egér embrionális fibroblaszt sejtvonalat (ATCC CRL-1658) az LGC Promochem-től (Teddington, Egyesült Királyság) vásároltuk. A sejtvonalat Dulbecco's Modified Eagle's tápfolyadékban tenyésztettük, 10% hőinaktivált borjúszérummal és penicillin-sztreptomicin keverékkel kiegészítve, 100 U/L, illetve 10 mg/L koncentrációban. A sejtvonalat 37°C-on, 5% CO_2 atmoszférában inkubáltuk.

3. Baktériumtörzsek

A vegyületeket a következő baktériumtörzseken vizsgáltuk:

Gram-negatív *Escherichia coli* K-12 AG100 vad típusú törzs [argE3 thi-1 rpsL xyl mtl Δ(gal-uvrB) supE44], amely expresszálja az AcrAB-TolC efflux pumpát. A törzs Prof. Dr. Hiroshi Nikaido-tól (University of California, Berkeley, CA, Egyesült Államok) származik.

Gram-negatív *Salmonella enterica* Typhimurium SL1344 (SE01) vad típusú törzs, mely expresszálja az AcrAB-TolC pumpát, valamint ennek az *acrB* mutáns *S.* Typhimurium SL1344 törzsét (SE02), *acrA* mutáns *S.* Typhimurium SL1344 (SE03) törzsét, továbbá a *tolC* mutáns *S.* Typhimurium SL1344 (SE39) törzsét. A *Salmonella* törzseket Dr. Jessica M. Blair (University of Birmingham, Birmingham, Egyesült Királyság) bocsátotta a rendelkezésünkre.
Meticillin érzékeny referencia törzsként a Gram-pozitív *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 törzset, míg meticillin 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 kísérletek során.

A QS vizsgálatokban szenzor törzsként a *Chromobacterium violaceum* 026 (CV026)-ot, illetve az *N*-acil- homoszerin lakton (AHL) termelő *Enterobacter cloacae* 31298-as törzset (sebből származó klinikai izolátum) alkalmaztuk. Ha a CV026 magas sejtsűrűséget ér el, lila színű pigmentet, violaceint termel.

4. Legkisebb gátló koncentráció meghatározása mikrodilúciós módszerrel

A PMZ és a szelénvegyületek (**Se-K1, -K2, -K3**; **Se-E1, -E2, -E3**; **Se-C1, -C2, -C3**) legkisebb gátló koncentrációjának (MIC) meghatározását a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) irányelvei szerint végeztük. A PMZ esetében desztillált vizet, a szelénvegyületek esetében DMSO-t alkalmaztunk oldószerként. A kísérletekben alkalmazott DMSO koncentrációja (1 v/v%) nem rendelkezett antibakteriális hatással.

5. Valós idejű etídium-bromid akkumulációs vizsgálat LightCycler valós idejű thermocycler alkalmazásával savas (pH 5) és semleges (pH 7) kémhatáson

A PMZ hatását EB valós idejű akkumulációjával 0.4% glükóz jelenlétében és hiányában *E. coli* AG100 K-12 törzsön vizsgáltuk LightCycler valós idejű thermocycler (LightCycler 1.5, Roche, Indianapolis, Egyesült Államok) használatával. A vizsgálat során LB-ben növesztett overnight baktérium kultúrát használtunk, melyet friss pH 5-ös és pH 7-es LB táplevesben növesztettünk addig, amíg az optikai denzitása 600 nm-en mérve el nem érte a 0,6-os értéket (10^7 CFU/ml). A megfelelő OD elérése után a baktérium szuszpenziót PBS-ben mostuk, majd lecentrifugáltuk 13000 × g-n, 3 percig. Ezt követően a baktérium pelletet újra felszuszpendáltuk a táplevesnek megfelelő PBS-ben (pH 5 és pH 7). A további lépésekhez a vizsgálandó vegyületet, a PMZ-t 25 µg/ml, illetve az EB-t 1 µg/ml végkoncentrációban használtunk. Az oldatokat standard kapilláris csövekbe mértük össze, melyek maximális térfogata 20 µl (Roche, Indianapolis, IN, USA). A fluoreszcenciát az FL-2-es csatornán monitoroztuk, 30 percen keresztül. A valós idejű adatokból meghatározható volt a relatív fluoreszcencia index (RFI) az akkumulációs periódus végén.

6. Teljes RNS preparálás baktériumból

E. coli AG100 K-12 törzset pH 5-ös és pH 7-es LB táplevesben 37°C-on overnight tenyésztettük rázatva (OD_{600}: 0,6). Ebből készítettünk 25 µg/ml PMZ-vel kezelt, illetve kezeletlen baktérium szuszpenziókat 3,5 ml-ben. Ezt követően 0, 1, 2, 4, 8 és 18 órás időpillanatokban totál RNS-t izoláltunk. A preparálást RNáz mentes környezetben, a NucleoSpin RNS izoláló Kit

(Macherey Nagel) segítségével végeztük, a gyártó által mellékelt útmutató szerint. A teljes RNS extraktum tisztaságát és koncentrációját spektrofotométer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, SmartSpec™ Plus) alkalmazásával 260 nm-en vizsgáltuk. A tisztított RNS preparátumot felhasználásig RNáz mentes vízben és nukleáz mentes gyűjtő csövekben -20°C-on tároltuk.

7. Relatív génexpresszió vizsgálata reverz transzkriptáz valósidejű kvantitatív polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR)

A különböző időpillanatokban történő teljes RNS preparálást követően az EP gének, valamint szabályozóik relatív expresszióját vizsgáltuk PMZ jelenlétében és hiányában *E. coli* AG100 K-12 törzsön RT-qPCR alkalmazásával. A tisztított RNS templátok valósidejű kvantifikációját a CFX96 Touch valósidejű PCR detektáló rendszerrel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) és a SensiFAST SYBR No-ROX One-Step Kit segítségével végeztük el, a gyártó ajánlása szerint. A vizsgálatot 96-lyukú lemezben végeztük, amely minden lyukának végtérfogata 20 µl volt. Ez tartalmazott 10 µl SensiFAST SYBR No-ROX One-Step Mix-et, 0,2 µl reverz transzkriptáz enzimet, 0,4 µl RiboSafe RNáz inhibítort, 5,4 µl dietil-pirokarbonát (DEPC)-kezelt vizet, 500 nM primert és megközelítőleg 20 ng totál RNS-t RNáz mentes vízben. A célgénekről kapott génexpressziós adatokat a *GAPDH* háztartási génhez viszonyítottuk. Az RT-qPCR során kapott adatokból számításainkat a ΔΔCt módszerrel végeztük.

8. Rezisztencia módosító hatás vizsgálata

A szelénvegyületek (**Se-K1, -K2, -K3**; **Se-E1, -E2, -E3**; **Se-C1, -C2, -C3**) rezisztencia módosító hatását ciprofloxacin (CIP) és tetraciklin (TET) antibiotikumokkal vizsgáltuk MIC redukcióval *S. aureus* törzseken 96-lyukas mikrotitráló lemezben. Az antibiotikumokból kettes léptékű hígítási sort készítettünk, a szelénvegyületeket azonos koncentrációban (½ 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 végtérfogat 200 µL volt minden lyukban. A lemezeket 18 órán keresztül, 37°C-on inkubáltuk. Az inkubációt követően a szelénvegyületek kemoszenzitizáló hatását önmagukban és kombinációban 20 µL MTT festék hozzáadásával, a MIC értékek szabad szemmel történő leolvasásával határoztuk meg.

9. Valós idejű etídium-bromid akkumulációs vizsgálat CLARIOstar Plus lemezleolvasó alkalmazásával

A szelénvegyületek (**Se-K1, -K2, -K3**; **Se-E1, -E2, -E3**; **Se-C1, -C2, -C3**) EB akkumulációra gyakorolt hatását automatizált EB módszerrel határoztuk meg CLARIOstar Plus lemezleolvasó (BMG Labtech, UK) alkalmazásával. A vizsgálat során LB-ben növesztett overnight baktérium kultúrát használtunk, melyet friss LB táplevesben növesztettünk addig, amíg az optikai denzitása 600 nm-en mérve el nem érte a 0,6-os értéket. A megfelelő OD elérése után a baktérium szuszpenziót PBS-ben mostuk, majd lecentrifugáltuk 13000 × g-n, 3 percig. Ezt követően a baktérium pelletet újra felszuszpendáltuk PBS-ben. A vegyületeket ½ MIC koncentrációban adtuk az EB oldathoz (1 µg/mL). Ezután a vegyületet tartalmazó EB-oldat 50 µl-ét 96 lyukú fekete mikrotiter lemezbe (Greiner Bio-One Hungary Kft, Magyarország) pipettáztuk, végül mindegyik lyukba 50 µl baktérium szuszpenziót (OD_{600}: 0,6) mértünk. A lemezeket a CLARIOstar lemezleolvasóba helyeztük, és a fluoreszcenciát 530 nm-es és 600 nm-es gerjesztési és emissziós hullámhosszon mértük percenként 1 órán át, valós időben. A valós idejű adatokból meghatározható volt a relatív fluoreszcencia index (RFI) az akkumulációs periódus végén.

10. Biofilmképzés vizsgálata kristályibolyás festéssel

A tesztelt vegyületek biofilm képzést gátló hatását *S. aureus* törzseken vizsgáltuk kristályibolyás (CV; 0,1% (v/v)) festéssel. Az overnight baktérium kultúrát OD 0,1-re (600 nm) hígítottuk ki TSB táplevesben, majd 96-lyukú mikrotiter lemez lyukaiba mértük a médium kontroll lyukak kivételével. A vegyületeket ezután 50 µM-os koncentrációban adtuk a baktérium kultúrához és a lemezeket 30°C-on, 48 órán keresztül rázatva (100 rpm) inkubáltuk. Ezután a tápfolyadékot eltávolítottuk, a lemezeket csapvízzel mostuk, majd 200 µl CV-t mértünk a lyukakba. A 15 perces, szobahőmérsékleten történő inkubáció után a lemezeket csapvízzel mostuk, majd 200 µl 70%-os etanolt mértünk a mintákhoz. A törzsek biofilm képzését kolorimetriásan, 600 nm-en mértük Multiscan EX ELISA lemez leolvasóval (Thermo Labsystems, Cheshire, WA, USA). A szelénvegyületek jelenlétében bekövetkező biofilm tömeg csökkenését %-ban fejeztük ki a kontrollhoz viszonyítva.

11. Quorum sensing (QS) vizsgálat

A szelénvegyületek (**Se-K1, -K2, -K3**; **Se-E1, -E2, -E3**; **Se-C1, -C2, -C3**) QS gátló hatását *C. violaceum* 026 szenzor törzs és *E. cloacae* 31298 AHL termelő törzs segítségével

végeztük. Kísérletünk során módosított LB táptalajt használtunk (5 g/l élesztőkivonat, 10 g/l tripton, 10 g/l NaCl, 1 g/l K_2HPO_4, 0,3 g/l $MgSO_4$ x $7H_2O$, 36 mg/l FeNaEDTA, 20 g/l agar). Az alkalmazott törzseket egymás mellé párhuzamosan oltottuk le, majd a lemezeket 24-48 órán keresztül szobahőmérsékleten (20°C) inkubáltuk. Ezután 7 mm átmérőjű papírkorongokat helyeztünk a táptalajra a szenzor és az AHL termelő törzsek közé, majd felvittük a szűrőpapír korongokra a szelénvegyületek nem toxikus koncentrációjú oldatát 10 µL térfogatban. 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, melyet milliméterben adtunk meg. Pozitív kontrollként a PMZ-t alkalmaztuk.

12. Citotoxicitás vizsgálat

A fenotiazinok növekvő koncentrációinak sejtnövekedésre gyakorolt hatását 96-lyukú mikrotiter lemezeken teszteltük. A Se-vegyületek citotoxikus aktivitását PAR és MDR egér T-limfóma sejteken korábban már meghatározták (Domínguez-Álvarez, E. és munkatársai, *Bioorg Med Chem Lett* 2016).

A PAR és MDR egér T-limfóma sejteket McCoy's 5A tápfolyadékban tenyésztettük, kiegészítve 10% hőinaktivált lószérummal.

A NIH/3T3 egér embrionális fibroblaszt sejteket DMEM tápfolyadékban tenyésztettük, kiegészítve 10% hőinaktivált borjúszérummal.

A sejtszámot $1x10^4$/lyuk (100 µl táptalajban) koncentrációra állítottuk be, majd hozzáadtuk a 96 lyukú, lapos aljú mikrotiter lemezekhez, amelyek már tartalmazták a tesztelt vegyületek hígításait. A lemezeken a kezdő koncentrációt (100 µM) hígítottuk tovább felező hígításos módszerrel. Végül a lemezeket 37°C-on inkubáltuk 24 órán át, CO_2 termosztátban. Az inkubációt követően 20 µl MTT festéket mértünk a lemezekre, majd további 4 óra múlva 100 µl 10% SDS (nátriumdodecil-szulfát)-HCl elegyet mértük a mintákhoz, a formazán kristályok szolubilizálása érdekében, majd 37°C-on, CO_2 termosztátban inkubáltuk egy éjszakán át. Ezt követően meghatároztuk a sejtek növekedését Multiscan EX ELISA olvasó (Thermo Labsystems, Cheshire, WA, USA) segítségével OD_{540} nm (ref. 630 nm) hullámhosszon. A kapott adatok alapján IC_{50} értéket számoltunk GraphPad Prism5 szoftver segítségével.

13. Checkerboard kombinációs vizsgálat

A szelénvegyületek (**EDA1-11**), illetve a széléntartalmú referencia vegyületek és a fenotiazinok közötti kölcsönhatást checkerboard kombinációs módszerrel végeztük el.

A PMZ-t desztillált vízben, a TZ-t és a CPZ-t DMSO-ban frissen oldottuk be a vizsgálatok napján. A kísérletet 96-lyukú mikrotiter lemezben végeztük MDR egér T-limfóma sejtekkel, ahol a sejtszám 6000 sejt/lyuk volt. A fenotiazinok hígítását vízszintes irányban 100 µl-ben, a szelénvegyületek hígítását függőlegesen 50 µl térfogatban végeztük. A sejteket McCoy's 5A tápfolyadékban reszuszpendáltuk, és mindegyik lyukhoz 50 µl sejtszuszpenziót mértünk. A lemezeket 72 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on 5%-os CO_2 termosztátban. A vegyületek sejtosztódásra gyakorolt hatását MTT módszerrel határoztuk meg. Az inkubáció után 20 µl MTT-t 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. A lemezek optikai denzitását Multiscan EX ELISA mikrotiter lemez leolvasóval (Thermo Labsystem, Cheshire, Egyesült Államok) mértük 540 és 630 nm-en, mely segítségével meghatározható volt a sejtpusztulás mértéke. A kapott adatokból ED_{50} értéket határoztunk meg, amely azt a koncentrációt jelenti, ahol a vizsgált sejtek növekedése 50%-kal gátlódik a kontrollhoz képest. A kombinációs index (CI) ennél az értéknél került meghatározásra CompuSyn szoftver alkalmazásával (ComboSyn Inc., Paramus, New Jersea, Egyesült Államok), legalább 4-5 adatpont felhasználásával. A CI értékeket a Chou-Talalay-módszer szerint számítottuk ki, ahol CI <1 szinergizmust, CI = 1 additív hatást (vagy nincs interakció) és CI >1 antagonizmust jelent.

14. Statisztikai analízis

Három egymástól független kísérletből származó adatokból (átlag ± szórás) végeztük számításainkat. Az adatok elemzését a SigmaPlot Windows Verzió 12.0 szoftver (Systat Software Inc., San Jose, Kalifornia, USA) segítségével végeztük el páros t-teszt alkalmazásával.

EREDMÉNYEK

1. Az AcrAB-TolC efflux pumpa rendszer aktivitásának vizsgálata prometazin (PMZ) jelenlétében és hiányában 7-es és 5-ös pH értéken

1.1. PMZ efflux pumpa gátló hatása

A valós idejű akkumulációs görbék magasabb intracelluláris EB koncentrációt mutattak glükóz hiányában 7-es pH-n, mint 5-ös pH-n. Az EB sejten belüli koncentrációja PMZ jelenlétében megnövekedett semleges kémhatású közegben, ezzel szemben savas pH-n az intracelluláris EB koncentráció alacsonyabb volt. A PMZ-vel kezelt minta esetében az intracelluláris EB felhalmozódás szignifikánsan nagyobb volt pH 7-nél, mint pH 5-nél. Az EP gátló PMZ hatékonyabb EPI hatást tudott kifejteni semleges kémhatáson.

1.2. A pumpa gének és szabályozóik relatív génexpressziós változásai

Savas pH esetén a *soxS* kivételével minden gén csökkent expressziós mintázatot mutatott az első 1-2 órában, majd ezt követően kifejeződésük növekedni kezdett. Génexpressziós növekedést a 18. óra elteltével az *acrA* és *acrB* EP gének, valamint a *marR* regulátor és a *soxS* stressz gén esetén mutattunk ki. Semleges kémhatáson a *marB* és *marR* kivételével szinte minden gén csökkent expressziós mintázatot mutatott az első 1-2 órában. Jelentős génkifejeződést figyelhettünk meg az *acrA*, *acrB* és a *marA* esetén a 18., illetve *marB* esetén az 1. órában. A tenyésztési periódus elején az *acrA* és *acrB* EP gének kifejeződése csökkent mintázatot mutatott, ezzel szemben a tenyésztési periódus végén (18. óra) expressziójuk megnövekedett.

2. Új szimmetrikus szelenoészterek antimikrobiális hatása

2.1. Szelénvegyületek minimális gátló koncentrációjának (MIC) meghatározása

A MIC értékek alapján a szelénvegyületek hatékonyabbak voltak *S. aureus* törzseken. A leghatékonyabb vegyületek az **Se-K1**, **Se-K2** és **Se-K3** keton-szelenoészterek voltak (MIC: 0,39 μM) *S. aureus* ATCC 25923 referencia törzsön. A három származék közös tulajdonsága egy metil-keton csoport a szelénatomhoz kötődő alkilcsoportban. Ennek a metil-ketonnak a helyettesítése ciano- vagy metil-oxi-karbonil csoporttal drámai módon csökkentette az aktivitást, mivel a ciano- és metil-oxi-karbonil származékok MIC értékei jelentősen magasabbak voltak *S. aureus* ATCC 25923 törzsön, kivéve a triszubsztituált **Se-C3** származék esetén. Ugyanez a tendencia figyelhető meg a *S. aureus* MRSA 272123 esetében is. A

vegyületek enyhe antibakteriális hatást mutattak *Salmonella* törzseken, ahol a leghatékonyabb vegyület az **Se-C3** (MIC: 12,5 µM) volt SE01, SE02 és SE03 törzseken.

2.2. *Szelénvegyületek rezisztencia módosító hatása*

Az **Se-E3** szelénvegyület szinergizmust mutatott tetraciklin (TET) antibiotikummal a meticillinre érzékeny *S. aureus* ATCC 25923 törzsön. Ugyanakkor minden Se-vegyület szinergizmust mutatott TET-el a meticillin rezisztens *S. aureus* törzsön. A vegyületek közül az **Se-E3** és **Se-C2** voltak a leghatékonyabbak TET-el kombinációban. Továbbá az **Se-E1** és **Se-C1** vegyületek is hatékonyan csökkentették a MIC értéket. Ezenkívül az **Se-K1** és **Se-E3** szinergizmust mutatott ciprofloxacin (CIP) antibiotikummal MRSA törzsön.

2.3. *Szelénvegyületek anti-biofilm hatása*

A biofilm képzés gátlását (%) a kapott abszorbancia egységek (AU) átlaga alapján számoltuk. Az abszorbancia a kezeletlen minták esetén a következő volt: *S. aureus* ATCC 25923 referencia törzs esetén AU 2.4 ± 0.1, rezisztens *S. aureus* MRSA 272123 törzsnél AU 1.3 ± 0.1 és a vad típusú *S.* Typhimurium esetén AU 2.2 ± 0.3 volt. **Se-K1** (AU: 0.45 ± 0.17; gátlás: 64.5%), **Se-K3** (AU: 0.16 ± 0.06; gátlás: 84.7%), **Se-E3** (AU: 0.32 ± 0.07; gátlás: 74.6%), és **Se-C1** (AU: 0.72 ±- 0.15; gátlás: 43.7%) hatékonyan gátolta *S. aureus* MRSA törzs biofilm képzését. A *S. aureus* referencia törzs esetében anti-biofilm hatást figyeltük meg az **Se-K2** (AU: 1,67 ± 0,10; gátlás: 30,3%) és az **Se-E3** (AU: 1,22 ± 0,17; gátlás: 74,6%) vegyületnél. A vegyületek nem mutattak szignifikáns anti-biofilm hatást *S.* Typhimurium SE01 törzsön.

2.4. *Szelénvegyületek efflux pumpa gátló hatása*

A *Salmonella* törzsek közül a *tolC* gén inaktivált mutáns *S.* Typhimurium SE39 törzsnél növelték a Se-vegyületek a leghatékonyabban az EB sejten belüli akkumulációját 60 perc elteltével. A Se-vegyületek jelenlétében kapott RFU-k (relatív fluoreszcencia egységek) a vad típusú *S.* Typhimurium SE01 törzsön voltak a legalacsonyabbak. A CCCP mint referencia EPI volt a pozitív kontroll *Salmonella* és *S. aureus* referencia törzs esetében. Továbbá *S. aureus* MRSA törzsnél a referencia EPI verapamil volt. Az oldószer DMSO negatív kontrollként szerepelt a kísérletekben. Az **Se-E2** szignifikánsan növelte az intracelluláris EB felhalmozódását *S.* Typhimurium SE02, SE03 és SE39 törzseken. Ezenkívül szignifikáns EB felhalmozódás volt megfigyelhető **Se-K3** esetében a *S.* Typhimurium SE39-en. A referencia és a rezisztens *S. aureus* törzseknél az **Se-E3** vegyület fejtette ki a legkiemelkedőbb EPI aktivitást.

2.5. *Szelénvegyületek QS gátló hatása*

Az **Se-K1**, **Se-K2** és **Se-E1** szelénvegyületek mutattak QS gátló hatást. Az **Se-K1** és **Se-K2** gátlási zónája 37 és 40 mm volt, valamint a metil-oxi-karbonil szelenoészter **Se-E1** volt a leghatékonyabb QS gátlószer, amely 41 mm-es gátlási zónát mutatott.

3. Szelénvegyületek kölcsönhatása fenotiazinokkal egér T-limfóma sejteken

3.1. *A vegyületek citotoxicitásának és szelektivitásának meghatározása NIH/3T3 egér embrionális fibroblaszt sejteken és egér T-limfóma sejteken*

A tizenöt vizsgált vegyület közül hét mutatott toxicitást NIH/3T3 sejteken (**EDA2**, **EDA6-EDA11** vegyületek), de csak három mutatott szelektivitást (**EDA1**: erősen szelektív, **EDA3** és **EDA10**: közepesen szelektív) tumorsejteken az egér T-limfóma sejtvonalakra vonatkozó korábbi eredmények alapján.

3.2. *A vegyületek kölcsönhatása fenotiazinokkal checkerboard módszer alkalmazásával*

A legelőnyösebb kölcsönhatásokat alacsony koncentrációban (1,46-11,25 μM) az **EDA2-5** vegyület esetében tapasztaltuk, melyek közül az **EDA2** és **EDA5** mindegyik fenotiazinnal szinergizmust mutatott. Ezzel szemben az **EDA6-EDA8** és a referencia vegyületek antagonizmust mutattak a fenotiazinokkal. Az **EDA1** O-izoszter szinergizmust mutatott PMZ-vel és CPZ-vel, továbbá a KOCN referencia vegyület és a TZ között is szinergizmus volt megfigyelhető. Az alacsony IC_{50} értékű vegyületek (**EDA1**, **EDA10** és **EDA11**) szintén additív (CI = 1) vagy antagonista (CI >1) kölcsönhatásokat mutattak a fenotiazinokkal, kivéve az **EDA9**, amely szinergizmust mutatott CPZ-vel és TZ-vel.

MEGBESZÉLÉS

A mikróbák antimikrobiális szerekkel szembeni rezisztenciája, valamit a rákos sejtek kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztenciája világszerte növekszik, amely jelentős közegészségügyi problémát jelent. Az EP túlzott expressziója, mint fontos rezisztencia mechanizmus, lehetővé teszi a sejtek számára, hogy több toxikus anyagot is eltávolítsanak. Az EPI vegyületek alkalmazása olyan terápiás lehetőség, amely segíthet az MDR leküzdésében. Ezek a gátlószerek lehetnek természetben előforduló bioaktív vagy szintetikus vegyületek, valamint szinergista módon fokozhatják más gyógyszerek hatását is. Az új vegyületek, valamint a „régi” gyógyszerek alkalmazhatóak lehetnek antibakteriális/daganatellenes adjuvánsként a kombinációs kemoterápiában, illetve a jól ismert farmakológiai profillal rendelkező, klinikailag jóváhagyott gyógyszerek a gyógyszer

újrapozícionálás stratégiája szerint potenciális szereknek tekinthetők új indikációkkal, amelyek eltérnek az eredeti orvosi alkalmazástól.

Vizsgálatunk fő célja a klinikailag alkalmazott fenotiazinok és az új szintetikus szelénvegyületek MDR visszafordító hatásainak értékelése volt különböző bakteriális és tumoros modellekben.

1. Stresszválasz a bakteriális EPI-k alkalmazása során

A baktériumok virulenciája és adaptációja a környezeti feltételekhez függ a különböző tényezők (pl. csökkent tápanyagforrás és az éhezés, a pH, valamint az alacsony és a magas ozmolaritás) által kiváltott stresszválasztól. Az enterális baktériumok túlélése és kolonizációja a szélsőséges pH-toleranciától függ. Ezenkívül korábban leírták, hogy számos szer, például az antibiotikumok pH-függő antibakteriális hatást mutattak. A fenotiazinok biológiai aktivitásának sokféleségét számos tanulmány kiemelte a pszichofarmakológiában és az új terápiás javallatokban. A fenotiazinok szerepét az AcrAB-TolC pumparendszer inhibitoraként semleges pH-n már tanulmányozták, és igazolták, hogy a fenotiazinok befolyásolják a pumpa aktivitását, viszont ezeket a vegyületeket savas pH-n nem vizsgálták.

Kutatásunkban az *E. coli* K-12 AG100 törzs AcrAB-TolC rendszerének gátlását vizsgáltuk az EPI PMZ jelenlétében 7-es és 5-ös pH-n.

Az EB akkumulációs vizsgálatban a PMZ EPI aktivitása pH 5-nél kevésbé volt hatékony, mint pH 7-nél. Következésképpen a PMZ EPI aktivitása pH függő, mert savas kémhatáson a protonmotoros erő (PMF) magasabb, így az AcrB pumpa energiaellátása biztosított, amely alacsonyabb EB felhalmozódást eredményezett a semleges kémhatással szemben. Ezenkívül a *marB, marR, acrA, acrB,* és *soxS* gének expressziója szintén megemelkedett 5-ös pH-n. Továbbá a *soxS* expressziós mintázata folyamatos növekedést mutatott savas kémhatáson, ezzel szemben semleges kémhatáson ennek a génnek a kifejeződése csökkent, egészen a tenyésztési periódus végéig. A replikáció megindításához szükséges *rob* gén expressziója a tenyésztés 4. órájában volt a legmagasabb. Az *acrA* és *acrB* EP gének 5-ös és 7-es pH-n történő túlzott expressziója a toxikus anyagok folyamatos eltávolítását jelzik a pumpák működésével. Az eredmények alapján elmondható, hogy a savas pH és a PMZ kezelés stresszválaszt indukált *E. coli*-ban.

2. Szimmetrikus szelenoészterek antibakteriális aktivitása

Korábbi kutatásokban csoportunk már vizsgálta az újonnan szintetizált szelénvegyületek antibakteriális aktivitását különböző baktériumtörzseken. Ezekben a tanulmányokban ciklikus szelenoanhidrideket, valamint szimmetrikus és nem szimmetrikus szelenoészteret

vizsgáltunk. A szimmetrikus vegyületek ígéretes antibakteriális hatást mutattak, ezért a további kutatásainkban újabb, második generációs szimmetrikus szelenoészterek antibakteriális hatását vizsgáltuk. A szimmetrikus szelénvegyületek három csoportjának, a metil-keton-szelenoészterek (**Se-K1**, **-K2**, **-K3**), metil-oxi-karbonil-metil-szelenoészterek (**Se-E1**, **-E2**, **-E3**) és metil-ciano-szelenoészterek (**Se-C1**, **-C2**, **-C3**) antibakteriális hatását érzékeny és rezisztens *S. aureus* törzseken, valamint *S.* Typhimurium törzseken határoztuk meg.

A MIC meghatározás során a szimmetrikus szelenoészterek hatékonyabbak voltak Gram-pozitív *S. aureus* törzseken, mint a Gram-negatív *S.* Typhimurium baktériumtörzseken. Ez arra utalhat, hogy ezek a Se-vegyületek a Gram-pozitívokkal szemben erősebb antibakteriális hatással rendelkeztek. A vegyületek rezisztencia módosító hatásának vizsgálata esetén az összes vegyület képes volt fokozni a tetraciklin *S. aureus* MRSA elleni aktivitását. A vegyületek közül az **Se-K1**, **Se-K2** és **Se-K3** metil-keton-szelenoészter volt a legerősebb antibakteriális hatású *S. aureus* referencia törzsön. Ezzel szemben a metil-oxi-karbonil-szelenoészterek, mint az **Se-E1**, **Se-E2** és **Se-E3**, valamint az **Se-C1** és **Se-C2** ciano-szelenoészterek MRSA törzsön mutattak erős rezisztencia módosító aktivitást tetraciklin jelenlétében. A valós idejű EB akkumulációs vizsgálat során az intracelluláris EB koncentráció a Δ*tolC* mutáns *S.* Typhimurium SE39 esetén volt a legmagasabb, a legkisebb pedig a vad típusú *S.* Typhimurium SE01 törzsnél a metil-oxi-karbonil-szelenoészter **Se-E2** jelenlétében. Ez a vegyület jelentősen megnövelte az EB akkumulációt a Δ*acrA*, Δ*acrB* és Δ*tolC* mutáns *S.* Typhimurium törzsekben, valószínűleg az effluxtól független mechanizmusok miatt (pl. membrán destabilizáló hatás). Ezenkívül a metil-oxi-karbonil-szelenoészter **Se-E3** szignifikánsan hatékony EP gátlást mutatott érzékeny (p <0,001) és rezisztens (p = 0,001) *S. aureus* törzseken. Az anti-biofilm hatást tekintve a metil-oxi-karbonil-szelenoészter **Se-E3** szignifikáns biofilm gátlást mutatott mind az érzékeny, mind a rezisztens *S. aureus* törzsekben. Továbbá a metil-keton-szelenoészter **Se-K3** volt a leghatékonyabb biofilm gátló az MRSA törzsön. Emellett az **Se-K1** is figyelemre méltó szelénvegyület, mivel 50%-nál magasabb biofilm gátló hatást mutatott MRSA-val szemben. Meglepő, hogy az **Se-K2** elősegítette az *S. aureus* MRSA biofilm képződését, ugyanis kémiai képlete megegyezik **Se-K1** képletével, csupán a fenilgyűrű szubsztitúciós mintázatában különböznek egymástól. A metil-oxi-karbonil-szelenoészterek esetén csak a triszubsztituált **Se-E3** származék volt képes jelentősen gátolni a biofilm képződést az *S. aureus* törzsekben. A QS vizsgálat során a metil-keton-szelenoészter **Se-K1** és **Se-K2**, valamint a metil-oxi-karbonil-szelenoészter **Se-E1** bizonyultak hatásos QS inhibitornak, melyek közül **Se-E1** volt a leghatékonyabb gátlószer. Eredményeink alapján elmondható, hogy a szimmetrikus szelenoészterek erős antibakteriális aktivitással

rendelkeznek, főként *S. aureus* törzseken. A leghatékonyabb származékok a metil-keton-szelenoészterek voltak, ezt követték a ciano-szelenoészterek, végül a metil-oxi-karbonil-szelenoészterek.

3. Szelénvegyületek kölcsönhatása fenotiazinokkal

A szelénvegyületeknek nem csupán az antibakteriális hatásait, de rákellenes és EP gátló aktivitását is tanulmányozták különböző tumorsejtekben. Korábban csoportunk már vizsgálta a Se-vegyületek aktivitását különféle rákellenes gyógyszerekkel (vinkrisztin, doxorubicin, ciklofoszfamid és metotrexát), valamint az EP gátló verapamillal kombinálva MDR egér T-limfóma sejtvonalon. Az eredmények alapján néhány Se-vegyület nagyon hatékony adjuváns volt referencia kemoterápiás szerekkel kombinálva. Az előzmények folytatásaként egy ciklikus szelenoanhidridet (**EDA1**), négy szimmetrikus szelenoésztert (**EDA2-EDA5**), hat nem szimmetrikus szelenoésztert (**EDA6-EDA11**), valamint négy referencia vegyületet (**EDA12-EDA15**) vizsgáltunk három fenotiazin (PMZ, TZ és CPZ) jelenlétében. A szelektivitási index (SI) tekintetében az **EDA1** ciklikus szelenoanhidrid mutatta a legerősebb szelektivitást, bár a kombinációs vizsgálatban nem mutatott szignifikáns hatást. Ezzel szemben a ftálsavanhidrid, amely az **EDA1** vegyület oxigén izosztere mérsékelt szinergizmust mutatott PMZ és CPZ jelenlétében. Ezenkívül az **EDA2** és **EDA5** szimmetrikus szelenoészterek, amelyek két szelénatomot tartalmaznak, szinergista hatást mutattak mindhárom fenotiazinnal, azonban csak az **EDA2** tiofénszármazék mutatott szinergizmust TZ-vel. Eredményeinket tekintve a fenotiazinok közül a TZ kis koncentrációban alacsonyabb CI-értékeket mutatott, mint a PMZ és a CPZ. Korábban már leírták, hogy a klóratom jelenléte a molekulában fokozhatja a biológiai aktivitást, ezért nem meglepő, hogy a TZ mellett a klóratomot tartalmazó CPZ is erősebb aktivitást mutatott vizsgálatainkban, mint a fenotiazin szülői vegyület, a PMZ.

A jelen munkában elért eredmények alapján a Se-vegyületek képesek visszafordítani a multidrog rezisztenciát mind tumorsejtekben, mind baktériumtörzsekben. A szelénvegyületek a potenciális adjuvánsok figyelemre méltó új osztályát jelenthetik a bakteriális fertőzések és a rákterápia területén. Ezen túlmenően a fenotiazinok mind már ismert gyógyszerek, amelyek ismert farmakológiai és toxicitási profilokkal rendelkeznek, ezért adjuvánsként történő alkalmazásuk potenciális megközelítésnek tekinthető a rákterápiában, amint azt a gyógyszer újrapozícionálás stratégiája is javasolja. A baktériumok válaszreakciójának eredményei alapján a hatékonyabb terápia érdekében érdemes figyelembe venni a környezeti feltételeket. Hangsúlyozni kell, hogy ezek a tanulmányok előzetesek, és további kutatásokat kell végezni a szelénvegyületek és származékaik lehetséges alkalmazásainak mélyebb feltárása érdekében.

Mindazonáltal az EPI vegyületek más, virulenciához kapcsolódó biológiai funkciókat is befolyásolhatnak, ezért a hatásos vegyületeket különféle bakteriális modell rendszerekben, a gazdaszervezethez hasonló környezeti feltételek mellett kell vizsgálni és jellemezni.

TÉZISPONTOK

1. Stresszválasz a bakteriális EPI-k alkalmazása során

- A PMZ pumpa gátló aktivitása pH 5-nél kevésbé volt hatékony, mint 7-es pH-n *E. coli* K-12 AG100 baktériumtörzsben. Megállapítható, hogy a PMZ pumpa gátló aktivitása pH-függő.
- A savas pH és a PMZ kezelés szignifikáns stresszreakciót váltott ki *E. coli*-ban. Ennek eredményeként az EP gének (*acrA*, *acrB*) és szabályozóik (*marB*, *marR*), valamint a stressz gén (*soxS*) expressziója növekedett 5-ös pH-n a 7-es pH-hoz képest.

2. A szimmetrikus szelénvegyületek antibakteriális aktivitása

- A szimmetrikus keton-szelenoészterek (**Se-K1**, **-K2**, **-K3**), a metil-karbonil-szelenoészterek (**Se-E1**, **-E2**, **-E3**) és a ciano-szelenoészterek (**Se-C1**, **-C2**, **-C3**) hatékony antibakteriális aktivitással rendelkeztek a vizsgált Gram-pozitív baktériumok esetén, vagyis az érzékeny és a rezisztens *S. aureus* törzsek.
- A metil-karbonil-szelenoészterek (**Se-E1**, **Se-E2**, és **Se-E3)**, valamint a ciano-szelenoészterek (**Se-C1** és **Se-C2)** erős rezisztencia módosító hatást mutattak tetraciklinnel kombinációban a rezisztens *S. aureus* törzsön.
- A szelenoészterek hatékonyabb pumpa gátló hatást mutattak a Δ*tolC* mutáns *S.* Typhimurium SE39 törzsön a vad típushoz képest. Figyelemre méltó EP gátlást mutatott a metil-karbonil-szelenoészter **Se-E2** Δ*acrA*, Δ*acrB*, Δ*tolC* mutáns *S.* Typhimurium törzseken. Ezenkívül a metil-karbonil-szelenoészter **Se-E3** hatékony EP gátlást mutatott az érzékeny és rezisztens *S. aureus* törzseken.
- A metil-karbonil-szelenoészter **Se-E3** szignifikáns anti-biofilm hatást mutatott érzékeny és rezisztens *S. aureus* törzseken. Továbbá a keton-szelenoészter **Se-K3** volt a legerősebb biofilm gátlószer rezisztens *S. aureus* törzsön.
- A keton-szelenoészter **Se-K1** és **Se-K2**, valamint metil-karbonil-szelenoészter **Se-E1** képes volt gátolni a bakteriális quorum sensing rendszert, melyek közül a leghatékonyabb az **Se-E1** vegyület volt.

3. Szelénvegyületek kölcsönhatása fenotiazinokkal

- A szimmetrikus szelenoészterek, a tiofén-származék **EDA2** és a benzol-származék **EDA5** szinergizmust mutattak mindhárom fenotiazinnal (prometazin, klórpromazin,

tioridazin) MDR (ABCB1 pumpát túltermelő) egér T-limfóma sejteken. A legerősebb szinergizmust az **EDA2** tiofén-származék esetében tapasztaltuk.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mély hálámat szeretném kifejezni témavezetőmnek, **Dr. Spengler Gabriellának** a lehetőségért, hogy a kutatócsoportjában dolgozhattam, valamint átfogó útmutatásáért a kutatás során. Tézisem sosem készülhetett volna el építő tanácsai, folyamatos támogatása és mérhetetlen türelme nélkül.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Burián Katalin** egyetemi docensnek, hogy az általa vezetett Orvosi Mikrobiológiai Intézetben lehetőséget biztosított kísérleteim elvégzésére.

Rendkívül hálás vagyok kollaborációs partnereinknek, **Dr. Enrique Domínguez-Álvareznek**, **†Prof. Dr. Leonard Amaralnak**, **Prof. Dr. Molnár Józsefnek, Prof. Dr. Carmen Sanmartínnak** és **Dr. Jessica M. A. Blairnek,** akik segítségével és támogatásával gyümölcsöző tudományos együttműködésekre, projektekre és kutatási támogatásokra tehettünk szert.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani **Dr. Kincses Annamáriának**, **Dr. Gajdács Máriónak** és minden, kutatócsoportunkban dolgozó egyetemi hallgatónak, akik segítettek tanulmányaim során. Szeretném megköszönni **Annamáriának** a barátságát és támogatását, valamint a laboratóriumi munkában nyújtott segítségét és útmutatását.

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

Hálás vagyok az Intézet minden tagjának a támogatásukért és a barátságos munkakörnyezet megteremtéséért Ph.D. tanulmányaim során.

Mélységesen hálás vagyok kollégáimnak és barátaimnak, **Dr. Mosolygó Tímeának**, **Dr. Varga-Bogdanov Anitának** és **Somlyai-Popovics Nikolettának** önzetlen segítségükért és bátorításukért.

Végül hálás vagyok a családomnak szeretetükért, sok türelmükért és támogatásukért.

PÉNZÜGYI TÁMOGATÁS

A tézisben bemutatott kutatás az alábbi szervezetek és pályázatok támogatásával készülhetett el:

- Szegedi Rákkutatásért Alapítvány
- SZTE ÁOK-KKA 2018/270-62-2: Szelénszármazékok mint új, ígéretes antimikrobiális szerek
- EFOP 3.6.3-VEKOP-16-2017-00009
- GINOP-2.3.2-15-2016-00038
- COST Action CA17104 (STRATAGEM)

ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

I. **Nové M**, Kincses A, Molnár J, Amaral L, Spengler G: The Role of Efflux Pumps and Environmental pH in Bacterial Multidrug Resistance. *In Vivo.* **34**:65-71, 2020.
IF: 1,541

II. **Márta Nové,** Annamária Kincses, Beatrix Szalontai, Bálint Rácz, Jessica MA Blair, Ana González-Prádena, Miguel Benito-Lama, Enrique Domínguez-Álvarez, Gabriella Spengler: Biofilm Eradication by Symmetrical Selenoesters for Food-Borne Pathogens. *Microorganisms* **8** (4) 566, 2020.
IF: 4,152

III. Mário Gajdács, **Márta Nové**, Ákos Csonka, Borisz Varga, Carmen Sanmartin, Enrique Dominguez-Álvarez, Gabriella Spengler: Phenothiazines and Selenocompounds: A Potential Novel Combination Therapy of Multidrug Resistant Cancer. *Anticancer Res.* **40**(9):4921-4928, 2020.

IF: 1,994

ΣIF: 7,687