

**SZELÉNVEGYÜLTEK MINT ÚJ RÁKELLENES SZEREK
REZISZTENS EMLŐRÁK ELLEN ÉS ANTIBAKTERIÁLIS
SZEREK CHLAMYDIA TRACHOMATIS D ELLEN**

Ph.D. Tézis

Dr. Csonka Andrea

Témavezető: Dr. Spengler Gabriella

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Orvosi Mikrobiológiai Intézet



Szeged

2022

1. BEVEZETÉS

Az EU-tagállamok közül Magyarországon a legmagasabb a tüdő- és vastagbélrák előfordulása és mortalitási aránya. Az emlődaganat jelentős egészségügyi probléma, amelynek prevalenciája és halálozási aránya világszerte növekvő tendenciát mutat. Az emlődaganat az egyik leggyakrabban diagnosztizált daganatos megbetegedés és vezető halálok a női populációban. A kezelés során kemoterápiát alkalmaznak, amelynek célja a rosszindulatú sejtömeg megszüntetése vagy csökkentése, valamint a beteg életminőségének javítása. A kemoterápia alkalmazását jelentősen befolyásolja alacsony biohasznosulása, a nem szelektív citotoxikus aktivitásból adódó hátrányos mellékhatások, valamint a multidrog-rezisztencia (MDR) kialakulása, amelynek során a daganatok eltérő szerkezetű és hatásmechanizmusú kemoterápiás szerekkel szemben mutatnak rezisztenciát.

A *Chlamydia trachomatis* szexuális úton terjedő Gram-negatív, obligát, intracelluláris parazita. Az emberi szervezetben urogenitális megbetegedést, szemfertőzést (pl. újszülöttkori kötőhártyagyulladás) képes okozni. A WHO becslése szerint 2020-ban 129 millió új chlamydia fertőzés fordult elő világszerte. A *C. trachomatis* fertőzés miatt kezelt nők 10–15%-nál fordul elő visszatérő vagy tartós fertőzés.

A gyógyszer-rezisztencia általánosan ismert és széles körben elterjedt folyamat, amely során a kórokozók vagy tumorsejtek ellenállóvá válnak az alkalmazott kezeléssel szemben. A bakteriális és tumor MDR kialakulása jellemzően az efflux transzporter fehérjék túlzott expressziójának tulajdonítható. Ezek a transzporterek többféle, egymásól eltérő szerkezetű kemoterápiás szer, illetve antibiotikum kipumpálására képesek. A szakirodalomban számos olyan vegyületet írtak le, amelyek képesek gátolni a pumpák működését. Az MDR fenotípus visszafordítására lehetséges megoldás az efflux pumpa gátló (EPI) vegyületek adjuvánsként történő alkalmazása a terápia során.

A szelén (Se) az emberi szervezetben csak kis mennyiségben előforduló, de alapvető fontosságú nyomelem. Az Se-vegyületek az emberi szervezetben lehetnek antioxidáns vagy prooxidáns hatásúak. Emellett képesek modulálni a gyulladásos folyamatokat, apoptózist indukálni, gátolják az MDR efflux pumpákat, kemopreventív hatásúak, valamint antiproliferatív és citotoxikus aktivitásuk révén a daganatok áttétképződését is gátolhatják. Szakirodalmi adatok alapján az Se tartalmú vegyületek antivirális, antimikrobiális, biofilm-ellenes és antifungális tulajdonságokkal is rendelkeznek. Számos jótékony hatásuk révén az Se-vegyületek új alternatívát jelenthetnek a kísérleti kemoterápiában és a baktériumok multidrog rezisztenciájának leküzdésében.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A kutatás célja tizenegy (1–11) szelénvegyület aktivitásának vizsgálata volt az MCF-7 emlődaganat sejtvonalon és annak doxorubicin-rezisztens alvonalán, a KCR-en, mint *in vitro* modellrendszeren. A kutatás során az Se-vegyületek doxorubicinnel való kölcsönhatását, valamint a vegyületek apoptózist indukáló aktivitását a már említett MCF-7 és KCR sejtvonalakon vizsgáltuk. Az Se-vegyületek antibakteriális hatását a *C. trachomatis* D baktériumtörzsön tanulmányoztuk.

A kutatás fő céljai:

- 1) A szelénvegyületek citotoxicitásának és szelektivitásának meghatározása a doxorubicin-érzékeny MCF-7 és a rezisztens KCR emlődaganat sejtvonal felhasználásával MTT módszerrel.
- 2) A szelénvegyületek és a doxorubicin kölcsönhatásának vizsgálata MCF-7 és KCR emlődaganat sejtvonalon checkerboard kombinációs módszerrel.
- 3) A szelénvegyületek apoptózist indukáló hatásának vizsgálata áramlási citometriával Annexin V-FITC és propídium-jodid kettős festéssel MCF-7 és KCR emlődaganat sejtvonalon.
- 4) A szelénvegyületek antibakteriális aktivitásának meghatározása a *C. trachomatis* D baktériumon indirekt immunfluoreszcens festéssel.

3. ANYAG ÉS MÓDSZEREK

3.1. Vegyületek

A vizsgált vegyületcsoport tizenegy szelénszármazékot tartalmazott: egy ciklikus szelenoanhidridet (1) és tíz szelenoésztert (2–11). A vegyületek szintézisét Dr. Enrique Domínguez-Álvarez (CSIC, Madrid, Spanyolország) és Prof. Dr. Carmen Sanmartín (University of Navarra, Pamplona, Spanyolország) végezték. A vegyületek a spektroszkópos vizsgálatok alapján tiszták és kémiaiilag stabilak voltak levegőn.

A ftálsav-anhidrid (**12**; az **1**-es vegyület oxigén izosztere) és három szervesetlen kalkogén-cianát (**13–15**) referenciaként szerepelt kísérleteinkben. A **12–15** vegyületeket a Sigma-Aldrich Chemie GmbH-től (Steinheim, Németország) vásároltuk meg.

A vegyületeket dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk és a kísérletekhez 10 mM koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk.

3.2. Sejtvonalak

Az MCF-7 emlődaganat sejtvonalat (ATCC® HTB-22) az LGC Promochem-től (Teddington, Egyesült Királyság) vásároltuk. Az MCF-7 sejtvonalat és annak doxorubicin-rezisztens KCR sejtvonalát 4,5 g/l glükózt tartalmazó Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) tápfolyadékban tenyésztettük, kiegészítve az alábbiakkal: nem-esszenciális aminosav keverék, vitamínkeverék és 10% hőinaktivált főtális borjúsérum (FBS). A sejtvonalakat 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában inkubáltuk. Minden harmadik passzálás alkalmával 0,56 µg/ml doxorubicint adtunk az EMEM tápfolyadékhoz, hogy az ABCB1 efflux pumpa expresszióját fenntartsuk a rezisztens KCR sejtvonalban.

3.3. Baktériumtörzs

A vegyületek Chlamydia ellenes hatását a *C. trachomatis* referencia törzs (szerovariáns D, UW-3/Cx, ATCC, VR-885D) felhasználásával határoztuk meg.

3.4. Citotoxicitás vizsgálata

Az Se-vegyületek növekvő koncentrációinak sejtosztódásra gyakorolt hatását 96-lyukú mikrotiter lemezekben vizsgáltuk az MCF-7 és KCR sejtvonalakon. A vegyületek törzsoldatait (10 mM) 100 µl EMEM tápfolyadékban hígítottuk.

Az adherens MCF-7 és KCR sejteket 96-lyukú mikrotiter lemezekben tenyésztettük EMEM tápfolyadékban. A sejtszámot 1×10^4 /lyuk (100 µl médiumban) koncentrációra állítottuk be. A sejteket a vizsgálat előtt 37°C-on, 24 órán át, CO₂ termosztátban tenyésztettük. Az inkubációs idő letelte után a sejteket tartalmazó lemezekről eltávolítottuk a tápfolyadékot, és a sejtekhez hozzámértük a vegyületek felező hígításait. A lemezeket 37°C-on inkubáltuk 24 órán keresztül; az inkubációs idő végén 20 µl MTT festéket mértünk a lemezekre, majd további 4 óra múlva 100 µl 10%-os SDS (nátrium-dodecil-szulfát)-HCl elegyet mértünk a mintákhoz a formazán kristályok szolubilizálása érdekében.

A lemezeket 37°C-on, CO₂ termosztátban inkubáltuk egy éjszakán át. Ezt követően Multiscan EX ELISA (Thermo Labsystems, Cheshire, WA, USA) lemezolvasó segítségével OD₅₄₀ nm (ref. 630 nm) hullámhosszon meghatároztuk a sejtek növekedését. A mérések adataiból IC₅₀ értéket számoltunk, amely azt a koncentrációt jelenti, ahol a vizsgált sejtek 50%-a elpusztul a kontrollhoz képest.

A szelektivitást a szelektivitási index (SI) segítségével definiáltuk, amelyet a korábban leírt, nem daganatos MRC-5 (humán embrionális tüdő fibroblaszt) sejtvonalon kapott IC₅₀ érték és az adott daganatos sejtvonalra (MCF-7 vagy KCR) vonatkozó IC₅₀ érték hányadosaként definiáltunk (Domínguez-Álvarez *et al. Bioorg Med Chem Lett.* **26**:2821-24, 2016). Egy vegyület akkor tekinthető erősen szelektívnek, ha az SI értéke 6-nál nagyobb, mérsékelten szelektívnek, ha 3<SI<6, enyhén szelektívnek, ha 1<SI<3, és nem szelektívnek, ha SI kisebb, mint 1.

Az anti-chlamydiás hatás vizsgálatához a vegyületek citotoxikus hatását HeLa sejtvonalon is megvizsgáltuk a fent leírt módszerrel.

3.5. Checkerboard kombinációs vizsgálat

A szelénvegyületek és a doxorubicin közötti kölcsönhatását checkerboard kombinációs módszerrel vizsgáltuk. A kísérletet 96-lyukú mikrotiter lemezen végeztük el MCF-7 és KCR sejteken, ahol a sejtszám 6000 sejt/lyuk volt. A sejteket a vizsgálat előtt 37°C-on, 24 órán át, CO₂ termosztátban tenyésztettük. Az inkubációs idő letelte után a sejteket tartalmazó lemezekről eltávolítottuk a tápfolyadékot.

A kombinációs kísérletben használt Se-vegyületek és a doxorubicin koncentrációját az adott sejtvonalakon kapott IC₅₀ értékek alapján választottuk ki. A doxorubicin hígításait vízszintes irányban 100 µl-ben, az Se-vegyületek hígítását függőlegesen 50 µl térfogatban végeztük a mikrotiter lemezben, majd ráértük a sejtekre. A lemezeket 72 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on, 5%-os CO₂ termosztátban. A vegyületek sejtosztódásra gyakorolt hatását MTT módszerrel határoztuk meg. Az inkubáció után 20 µl MTT-t mértünk a lemezekre, majd 4 óra elteltével 100 µl 10%-os SDS-HCl elegyet mértünk a mintákhoz, majd a lemezeket további 37°C-on, CO₂ termosztátban inkubáltuk egy éjszakán át. Ezt követően a lemezek optikai denzitását Multiscan EX ELISA mikrotiter leolvasóval mértük 540 és 630 nm-en, amelynek segítségével meghatározható volt a sejtpusztulás mértéke.

A kapott adatokból ED_{50} értéket számoltunk, ez az érték 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, NJ, USA), legalább 4–5 adatpont felhasználásával. A CI értékeket a Chou-Talalay-módszer szerint számítottuk ki, ahol a $CI < 1$ szinergizmust, a $CI = 1$ additív hatást (vagy a kölcsönhatás hiányát), és a $CI > 1$ antagonizmust jelent.

3.6. Apoptózis indukció vizsgálata

Az Se-vegyületek apoptózist indukáló hatását *in vitro* vizsgáltuk MCF-7 és KCR sejtvonalon. Az apoptózist a Calbiochem (EMD Biosciences, Inc. La Jolla, CA, USA) Annexin V-FITC apoptózis detektáló kittel vizsgáltuk a gyártó utasításai alapján. Ez a módszer lehetővé teszi a korai és késői apoptotikus események, valamint a nekrozis meghatározását az Se-vegyületekkel kezelt sejtpopulációban.

A sejtszuspenzió sűrűségét 1×10^6 sejt/ml-re állítottuk be. A sejtszuspenziót 0,5 ml-ként (5×10^5 sejt) 24-lyukú lemezbe osztottuk szét, és egy éjszakán át 37°C -on, 5% CO_2 mellett inkubáltuk. A következő napon eltávolítottuk a tápfolyadékot, és friss médiumot mértünk a sejtekre. Ezután a sejteket 3 órán keresztül, 37°C -on kezeltük a vegyületek 1 vagy 2 μM -os koncentrációjával. Pozitív kontrollként M627-et (12*H*-benzo[α]fenotiazin; 20 μM) használtunk, amely ismert, korai apoptózist indukáló vegyület. A mintákat PBS-ben mostuk, majd friss EMEM tápfolyadékot adtunk a sejtekhez, és a lemezeket további 24 órán keresztül 37°C -on, 5% CO_2 mellett inkubáltuk. Az inkubációs idő lejártá után a sejteket tripszinezéssel, óvatosan eltávolítottuk a lyukakból, majd a mintákat $2000 \times g$ -n 2 percig centrifugáltuk. A sejteket reszuspendáltuk friss, szérummentes médiumban. Ezt követően az apoptózis vizsgálatot a kit "gyors" protokollja szerint végeztük el, és a sejtpopulációk fluoreszcenciáját Partec CyFlow® áramlási citométerrel (Partec, Münster, Németország) detektáltuk.

3.7. Chlamydia trachomatis D szaporítás

A *C. trachomatis* D-t HeLa 229 sejteken (ATCC, CCL-2.1) szaporítottuk. A fertőző elemi testek mennyiségét indirekt immunfluoreszcens festéssel határoztuk meg. Az elemi testek különböző hígításaival HeLa sejteket fertőztünk, majd 48 órás inkubáció után a sejteket acetonnal fixáltuk és monoklonális anti-Chlamydia LPS antitesttel (AbD Serotec, Oxford,

Egyesült Királyság) és FITC-jelölt IgG-vel (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) festettük. A *C. trachomatis* D inklúziókat UV-mikroszkóp alatt számoltuk meg.

3.8. Anti-chlamydiás hatás vizsgálata

A *C. trachomatis* D elemi testeket (4×10^3 IFU/ml) szacharóz-foszfát-glutaminsav pufferben (SPG) a vizsgált vegyületek különböző koncentrációival (0,25 μ M, 0,5 μ M, 1,25 μ M és 2,5 μ M) inkubáltuk 2 órán keresztül 37°C-on. Kontrollként a *C. trachomatis* D elemi testeket SPG-ben inkubáltuk. A vegyületek Chlamydia ellenes hatásának vizsgálatához HeLa sejteket tenyésztettünk 13 mm-es fedőlemezek 24-lyukú tenyésztőedényben. 24 órát követően a konfluens sejteket az Se-vegyületekkel kezelt *C. trachomatis* D-vel vagy a kezeletlen kontrollokkal fertőztük. 48 óra elteltével a sejteket 10 percig -20°C-on acetonnal fixáltuk. A fertőző elemi testek titerét indirekt immunfluoreszcens festéssel határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Szelénvegyületek citotoxikus aktivitása

A tizenegy Se-vegyület (1–11) és négy referencia vegyület (12–15) rákellenes hatását az MCF-7 és a KCR emlődaganat sejtvonalon vizsgáltuk. A szelenoanhidrid (1) és a 2–7-es szelenoészterek az MCF-7 sejtvonalon nem mutattak citotoxikus aktivitást, a vegyületek IC_{50} értéke 100 μ M felett volt. Ezzel szemben a ketontartalmú szelenoészterek (9–11) erős citotoxikus aktivitást mutattak, mivel IC_{50} értékeik 1,04 és 1,70 μ M között mozogtak. Az eredmények hasonlóan bizonyultak a rezisztens KCR sejtek esetében is, két származék kivételével. A szelenoanhidrid (1) IC_{50} értéke 2,35 μ M volt, amely több mint 40-szer alacsonyabb, mint az MCF-7 esetében. Ez az eredmény arra utalhat, hogy ez a vegyület közvetlenül a KCR sejtek által túltermelt ABCB1 efflux pumpára hat. Továbbá a 11-es vegyület fele olyan mértékben volt aktív a KCR sejteken, mint az MCF-7-en. A referencia vegyületek (12–15) nem gátolták az MCF-7, a KCR, valamint az MRC-5 sejtek szaporodását, IC_{50} értékük 100 μ M felett volt. Kutatócsoportunk a Se-vegyületek rákellenes hatását az MRC-5 humán embrionális tüdő fibroblaszt sejtvonalon korábban már megvizsgálta (Domínguez-Álvarez *et al. Bioorg Med Chem Lett.* **26**:2821-24, 2016).

A szelenoészterek daganatos sejtekkel szembeni szelektivitását tekintve egyértelműen megfigyelhető volt, hogy a ketontartalmú szelenoészterek mérsékelten voltak szelektívek az MCF-7 és KCR daganatos sejtekre, kivéve a **11-es** vegyületet, amely a KCR irányába enyhén szelektív volt (SI=2,2). A **9-es** vegyület SI értéke a KCR sejtek esetében közel 6 volt (SI=5,6), ami a küszöbértéke annak, hogy egy vegyületet erősen szelektívnek tekintsünk. A többi szelenoészter nem mutatott szelektivitást az MCF-7 és KCR sejtvonalakon. Ezzel szemben a szelenoanhidrid (**1**) erős szelektivitást mutatott a KCR sejtvonal irányába, az SI értéke 42 volt.

4.2. Szelénvegyületek kölcsönhatása doxorubicinnal

A citotoxicitási vizsgálatban az öt aktív vegyületet (**1; 8–11**) doxorubicinnal kombinálva is megvizsgáltuk a két emlődaganat sejtvonalon. A vegyületek és a doxorubicin kölcsönhatásának eredményei jelentős különbséget mutattak a két vizsgált sejtvonalon. A vizsgált Se-vegyületek szinergista kölcsönhatást mutattak a doxorubicinnal a KCR sejtvonalon, míg az MCF-7 sejtvonal esetén a szelenoészterek és a doxorubicin között antagonista kölcsönhatás volt megfigyelhető. A legelőnyösebb kölcsönhatást alacsony koncentrációban (2,5 μM) a **9-es** vegyület esetében tapasztaltuk a KCR sejtvonalon. Ez a vegyület a doxorubicin legalacsonyabb koncentrációja (42,5 μM) mellett a legerősebb szinergizmust mutatta. A többi Se-vegyület szinergista módon lépett kölcsönhatásba a doxorubicinnal, a vegyület 4-szeres, illetve a kemoterápiás szer 2-szeres koncentrációjánál. Az MCF-7 sejteken a **9-es** vegyület magasabb koncentrációban (5 μM) mérsékelten antagonista kölcsönhatást mutatott a doxorubicinnal (1 μM). A **8-as** vegyület esetében ugyanilyen koncentrációban enyhe antagonizmus volt megfigyelhető, de a doxorubicin koncentrációja ebben az esetben 4-szer magasabb volt.

4.3. Apoptózis vizsgálat

A Se-vegyületek a 7-es szelenoészter kivételével nem befolyásolták az MCF-7 és KCR sejtek apoptózist. A 7-es származék alacsony, 2 μM -os koncentrációban korai apoptotikus és késői apoptotikus/nekrotikus folyamatokat indított el a sejtek 16,9%, illetve 7,85%-ában MCF-7 sejteken. A pozitív kontrollként alkalmazott M627 a sejtpopuláció 20,8%-ában korai apoptózist, 67,1%-ában pedig késői apoptózist váltott ki, így a 7-es vegyület által előidézett apoptotikus események mérsékeltnek mondhatóak.

4.4. Szelénvegyületek Chlamydia ellenes vizsgálata

A Se-vegyületek Chlamydia ellenes hatásának vizsgálata előtt a HeLa sejteken is meghatároztuk a vegyületek IC_{50} értékeit azért, hogy a vegyületek olyan koncentrációit alkalmazzuk a későbbiekben, amelyek nem toxikusak a HeLa sejtvonalra.

A 2-es, 3-as, 5-ös, 7-es és a 9–11-es Se-vegyületek szignifikánsan gátolták a Chlamydia inklúziók képződését az alkalmazott koncentrációkban. A 2-es és a 7-es vegyület 2,5 μ M-os koncentrációban 82%, illetve 71%-os gátlást mutatott a kontrollhoz képest. Ezenkívül ugyanezen vegyületek 1,25 μ M-os koncentrációban is hatékonyak voltak, míg a 9-es és a 10-es Se-vegyület nagyon alacsony, 0,5 μ M-os szubmikromoláris koncentrációban szignifikánsan gátolta az inklúziók képződését. A leghatásosabb Chlamydia-ellenes Se-vegyület a 9-es és a 11-es volt, mivel 0,25 μ M-os koncentrációban több mint 50%-kal gátolta a *C. trachomatis* D szaporodását (0,0689 μ g/ml, illetve 0,0858).

5. MEGBESZÉLÉS

A korai és áttétes emlődaganat kezelésében a hagyományos kemoterápia részben antraciklin gyógyszerek, pl. doxorubicin adásán alapul. A kezelés során alkalmazott gyógyszerek olyan súlyos mellékhatásokat okozhatnak, mint a kardiotoxicitás és a myeloszuppresszió. Az antraciklinek mellékhatásainak minimalizálása érdekében ajánlott a liposzómás doxorubicin használata vagy megfontolandó a nanotechnológia alkalmazása kevésbé toxikus származékok előállítása céljából.

Kutatásunk során tizenegy (1–11) Se-vegyület tumorelles tulajdonságait és doxorubicinnel való kölcsönhatását vizsgáltuk meg annak érdekében, hogy hatékony adjuvánsokat találjunk, amelyek a későbbiekben alkalmazhatóvá válhatnak a kombinált kemoterápiában.

A Chlamydia fajok rezisztencia mechanizmusaik révén többféle antibiotikummal szemben is rezisztenciát mutathatnak. A Chlamydia a DNS, RNS vagy a fehérjeszintézist gátló antibiotikumokra érzékeny, ezért a klinikai gyakorlatban a tetraciklineket, makrolidokat és kinolonokat alkalmaznak a gyógyítás során. Az MDR fenotípus leküzdésére megoldást nyújthat új antibakteriális és MDR visszafordító vegyületek kifejlesztése, amelyek révén a terápia hatékonysága fokozódik, a kezelés időtartama rövidül.

A kutatásunk részeként ezért az Se-vegyületek Chlamydia-ellenes hatását is megvizsgáltuk annak érdekében, hogy hatékony vegyületeket találjunk, amelyek gátolják a baktérium szaporodását.

5.1. Szelénvegyületek rákellenes hatása

A szelenoanhidrid **1** szelektív aktivitást fejtett ki az ABCB1-et overexpresszáló KCR-sejtvonalon ($IC_{50}=2,35\ \mu M$), azonban hatástalan volt az MCF-7 sejtvonallal szemben. Ezek az eredmények összhangban vannak korábbi kutatási eredményeinkkel, amelyek megerősítik, hogy a szelenoanhidrid **1** közvetlenül az ABCB1 efflux pumpára hat. Meglepő módon ez a származék nem váltott ki apoptotikus folyamatokat a vizsgált emlődaganat sejtvonalakban, ennek oka az ABCB1 és a multidrog-rezisztencia protein 1 efflux pumpák kettős gátlása, valamint más rezisztencia mechanizmusok megléte.

A szelenoészterek közül csak a **9–11**-es ketontartalmú vegyületek fejtettek ki jelentős citotoxikus hatást az emlődaganat (KCR és MCF-7) sejtvonalakkal szemben. A **2–5**-ös szimmetrikus dimetil-szelenoészter, az amid-tartalmú **6**-os és a **7**-es metoxi-karbonil-metil-szelenoészter inaktív volt a vizsgált sejtvonalakon. Az utóbbi vegyületnél mért értékek alapján elmondható, hogy az *O*-észter oxigénjéhez kötött metil-rész fenilgyűrűvel való helyettesítése csökkent, 60 és 100 μM közötti IC_{50} értékeket eredményezett. Ha ezt a fenil-észtert metil-ketonnal (**9**) vagy *terc*-butil-ketonnal (**11**) helyettesítjük, akkor az aktivitás megnő, az IC_{50} érték alacsony mikromoláris koncentrációra csökken, ami rámutat ennek az alkil-keton résznek a ketontartalmú szelenoészterek biológiai aktivitásában játszott szerepére. Továbbá ezek a szelénszármazékok figyelemre méltó szelektivitást mutattak a vizsgált rákos sejtvonalakkal (MCF-7, KCR), szemben a nem tumoros MRC-5 sejtvonallal.

A kombinációs vizsgálatokban megfigyelt eredmények különböznek a két sejtvonalon. Ez az eredmény a vegyületek eltérő aktivitására utal; a rezisztens (KCR) sejtvonal érzékenyebb a vegyületek hatására. Szakirodalmi adatok alapján a doxorubicin és a metil-szelénsav apoptózist indukálva, szinergista módon hat az MCF-7 sejtekre, mivel kooperatív módon aktiválja az első apoptotikus (FAS) útvonalat. A doxorubicin FasL-független módon Fas oligomerizációt okoz, a metil-szeleninsav pedig növeli a FAS-hoz kapcsolódó halál-domén fehérje expresszióját, ami apoptózist vált ki. A 11 Se-vegyületünk közül csak a metoxi-karbonil-metil-*p*-klórbenzoszelenoát (**7**) indukált apoptózist az MCF-7 sejtekben, a többi származék nem váltott ki apoptózist MCF-7 és KCR sejtekben.

Eredményeink arra utalnak, hogy a vizsgált szelénszármazékok visszafordíthatják a KCR sejtek rezisztenciáját. A vegyületek bizonyítottan ABCB1 modulátorok, így a doxorubicinnal való szinergizmusuk a KCR sejtek által expresszált efflux pumpával való kölcsönhatásának tekinthető. Ezzel szemben az MCF-7 sejtekben a vegyületek a doxorubicinnal antagonizmust mutattak, amiből arra következtethetünk, hogy a sejtben eltérő rezisztencia mechanizmusok vannak jelen. Eredményeink új megközelítésként szolgálhatnak az ABCB1-et expresszáló rezisztens emlődaganat kezelésében, amely ellenáll a jelenlegi klinikai használatban lévő kezeléseknek. A legígéretesebb vegyület a **9**-es metil-keon szelenoészter volt, amellyel aktivitása miatt érdemes lenne további vizsgálatokat is elvégezni a lehetséges alkalmazások szempontjából.

A kutatómunka során kapott eredmények rávilágítanak a $-\text{COSeCH}_2\text{COCH}_3$ és a $-\text{COSeCH}_2\text{CO}(\text{CH}_3)_3$ csoportok biológiai aktivitásban betöltött jelentőségére a többi vizsgált szubsztituenssel ($-\text{COSeCH}_3$, $-\text{COSeCH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{COSeCH}_2\text{COOCH}_3$ és $-\text{COSeCH}_2\text{COPh}$) összehasonlítva. A ketontartalmú **9–11**-es szelenoészterek citotoxikus aktivitása, szelektivitása és a doxorubicinnal való kölcsönhatása összhangban van csoportunk korábbi, egér T-limfóma (L5178Y) és vastagbél adenokarcinóma sejteken (Colo 205 és Colo 320) végzett munkájával. A jövőbeni vizsgálatok során a mostani vegyületek továbbfejlesztett származékait szeretnénk a kutatásainkba bevonni azért, hogy még hatékonyabb és szelektívebb rákellenes szereket tervezhessünk.

5.2. Szelénvegyületek Chlamydia ellenes hatása

Korábbi tanulmányok arról számoltak be, hogy az olyan Se-tartalmú vegyületek, mint a szelenocianát, a szelenokarbamid és a diszelenid antiproliferatív hatást mutattak a *Leishmania* spp. intracelluláris alakjaival szemben. Kutatásunkban a szelenoészterek gátolták az intracelluláris Chlamydia szaporodását. A **2**-es, **3**-as, **5**-ös, **7**-es és **9–11**-es szelenoészterek mutattak figyelemre méltó aktivitást a *C. trachomatis* D-vel szemben. Továbbá a metil (**9**) és a *terc*-butil (**11**) származékok hatása is ígéretes volt, mivel már nagyon alacsony, 0,25 μM -os koncentrációban is gátolták a Chlamydia inklúziók több mint 50%-ának a képződését. Hatásmódjukat azonban ebben a vizsgálatban nem sikerült megállapítani.

Ami a Chlamydia-ellenes vizsgálatok során megfigyelt szerkezet-aktivitás összefüggéseket illeti, a **9–11**-es keon-szelenoészterek a már említett alacsony koncentrációban (0,25 μM , 0,5 μM) is aktívak voltak a vegyületcsoport többi tagjához képest (1,25 μM , 2,5 μM).

A további szelenoészterek közül a tiofén gyűrűt tartalmazó szimmetrikus dimetil-szelenodiészter (2) és a 7-es metil-oxoészter származék mutatott nagyobb hatékonyságot, de a 3-as és 5-ös szimmetrikus dimetil-szelenodiészterek aktivitása is figyelemre méltó volt. Ezen eredmények tükrében elmondható, hogy a szimmetria az intracelluláris kórokozókkal szembeni aktivitást jelentősen befolyásolta.

A tézisben 11 új Se-vegyület daganatellenes, MDR visszafordító és antibakteriális hatását vizsgáltuk meg *in vitro* modellrendszereken. A szelenoanhidrid (1) szelektíven gátolta a doxorubicin-rezisztens, ABCB1-et expresszáló KCR-sejtvonalat. A szelenoészterek közül csak a ketontartalmú vegyületek (9–11) mutattak citotoxikus aktivitást az MCF-7 és KCR sejtvonalakon, továbbá az Se-vegyületek szinergisztikusan hatottak a doxorubicinnel a KCR sejtvonalon. A 9-es metilketon-szelenoészter nagyon alacsony koncentrációban (0,25 μ M) antibakteriális hatást mutatott a *C. trachomatis* D törzsön. Az eredmények alapján elmondható, hogy a citotoxikus, a szinergista és a Chlamydia-ellenes hatás a COSeCH₂COCH₃ és COSeCH₂CO(CH₃)₃ csoportoknak tulajdonítható. A vegyületek e csoportja potenciális tumorelles, Chlamydia-ellenes és MDR visszafordító alapváz lehet új kémiai vegyületek szintetizálásához.

6. TÉZISPONTOK

- 1) A ketontartalmú szelenoészterek (9–11) ígéretes citotoxikus hatást mutattak a doxorubicin-érzékeny MCF-7 és a doxorubicin-rezisztens KCR emlődaganat sejtvonalakon.
- 2) A keton-szelenoészterek (9–11) erős vagy mérsékelt szelektivitást mutattak a vizsgált emlődaganat sejtvonalakkal (MCF-7, KCR), szemben a nem tumoros MRC-5 sejtvonallal.
- 3) A metoxi-karbonil-metil szelenoészter (7) korai és késői apoptózist indukált az MCF-7 sejtekben.
- 4) A ketontartalmú szelenoészterek (9–11) doxorubicinnel szinergista aktivitást mutattak a doxorubicin-rezisztens KCR emlődaganat sejtvonalon.
- 5) A metilcsoportot tartalmazó 2-es, 3-as és 5-ös, a metoxi-karbonil-metil (7) és a ketontartalmú szelenoészterek (9–11) figyelemre méltó antibakteriális aktivitással rendelkeztek a vizsgált *C. trachomatis* D törzsön.
- 6) A leghatékonyabb anti-chlamydiás aktivitást a 9-es metil-keton szelenoészter mutatta: 0,25 μ M-os koncentrációban gátolta a *C. trachomatis* D szaporodását.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszinte hálámat szeretném kifejezni témavezetőmnek, **Dr. habil. Spengler Gabriella** egyetemi adjunktusnak, amiért lehetőséget biztosított, hogy az Orvosi Mikrobiológiai Intézet *Kísérletes kemoterápia és profilaxis* kutatócsoportjában dolgozhassak, és amiért felkeltette érdeklődésemet a kísérleti munka iránt. Továbbá szeretnék köszönetet mondani az értékes tanácsokért és a tudományos inspirációért.

Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Burián Katalin** tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy az általa vezetett Orvosi Mikrobiológiai Intézetben végezhettem PhD tanulmányaimat.

Hálával tartozom kollaborációs partnerünknek, **Dr. Enrique Domínguez-Álvareznek**, hogy rendelkezésünkre bocsátotta a szelénvegyületeket, valamint szakmai segítségével és együttműködésével segítette a közös munkát.

Köszönöm **Dr. Ocsovszki Imre** segítségét az áramlási citometriás vizsgálatok elvégzésénél.

Köszönettel tartozom **Dr. Mosolygó Tímeának** és **Dr. Kincses Annamáriának** barátságukért, a sok jó tanácsért és támogatásukért a munkám során.

Köszönöm **Vigyikánné Váradi Anikónak** a kiváló technikai segítségét.

Szeretnék köszönetet mondani az Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden tagjának a támogatásukért és a barátságos munkakörnyezet megteremtéséért.

Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Molnár Józsefnek** a bakteriális és daganatos multidrog rezisztencia kutatásával kapcsolatos támogatását és segítségét.

Végezetül, hálával tartozom férjemnek, **Ákosnak** és a családomnak szeretetükért és támogatásukért.

8. PÉNZÜGYI TÁMOGATÁS

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

- Szegedi Rákkutatásért Alapítvány
- GINOP-2-3-2-15-2016-00038
- SZTE ÁOK-KKA 2018/270-62-2: Szelénszármazékok mint új, ígéretes antimikrobiális szerek

9. ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Csonka A**, Kincses A, Nové M, Vadas Z, Sanmartín C, Domínguez-Álvarez E, Spengler G. Selenoesters and Selenoanhydrides as Novel Agents Against Resistant Breast Cancer. *Anticancer Res.* 2019 Jul;39(7):3777-3783. doi: 10.21873/anticancer.13526. PMID: 31262904.

IF: 1.994

- II. 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.* 2019 Apr 16;24(8):1487. doi: 10.3390/molecules24081487. PMID: 31014009; PMCID: PMC6514980.

IF: 3.267

ΣIF: 5.261