

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Keton- és ciano-szelenoészterek mint antibakteriális és rákellenes származékok

PhD tézis



Szemerédi Nikoletta

Témavezető: Dr. Spengler Gabriella

Szeged

2024

BEVEZETÉS

A multidrog rezisztencia (MDR) jelentős kihívást jelent a bakteriális fertőzések és a rák esetében, mivel az MDR a mikroorganizmusok vagy tumorsejtek azon képességére utal, hogy ellenállnak a különböző szerkezeti osztályokba tartozó gyógyszerek hatásainak, ez pedig hatástalanná teszi a hagyományos terápiákat. Az antibiotikumrezisztencia fokozódása a túlzott használat, a nem megfelelő gyógyszerfejlesztéssel és gazdasági tényezőkkel függ össze. Az antibiotikumok helytelen használata, beleértve az állattenyésztést és a nemzetközi forgalmat is, hozzájárul a rezisztencia terjedéséhez. Az antimikrobiális rezisztencia több kategóriába sorolható, ilyen a korlátozott gyógyszerfelvétel, a célmolekula módosítása, a gyógyszerinaktiválás és az efflux mechanizmusok, továbbá az efflux pumpák fokozott expressziója hozzájárulhat a baktériumok megnövekedett virulenciájához, befolyásolhatja a bakteriális kommunikációt (quorum sensing) és a biofilm képződést. A statisztikai adatok azt mutatják, hogy a gyógyszerrezisztencia a tumoros betegek halálzásának egyik fő tényezője, amely az esetek több mint 90%-át teszi ki. A rákos sejtek kemoterápiás rezisztenciája különböző mechanizmusokhoz köthető, mint például a fokozott gyógyszerkiáramlás, a genetikai tényezők, a növekedési faktorok hatása, a fokozott DNS-javító mechanizmusok és a xenobiotikumok fokozott metabolizmusa. Ezen mechanizmusok mindegyike csökkenti a beadott gyógyszerek hatékonyságát, ami egyre nagyobb kihívást jelent a daganatok kezelésében. Az antitumor kemoterápia eredményeként sok betegnél alakul ki MDR a rákellenes gyógyszerekkel szemben, így a kezelés kevésbé hatékony. Az MDR mögött meghúzódó mechanizmusok megértése mind a baktériumok, mind a rák esetében kulcsfontosságú a sikeresebb terápiás stratégiák kidolgozásához. Az utóbbi időben egyre nagyobb érdeklődés mutatkozik a szelén (Se), a szelén-nanorészecskék és a szelénvegyületek iránt. Ez a figyelem különösen a multirezisztens baktériumok elleni küzdelemre és a daganatokkal kapcsolatos kihívások kapcsán vált intenzívebbé. A szelénvegyületek funkcionális jellemzői sajátos természetükből fakadnak, lehetővé téve, hogy antioxidánsként és prooxidánsként kettős szerepet töltsenek be. Antioxidánsként a Se-vegyületek, különösen a szelenocisztein, fontos szerepet játszanak a redox homeosztázis fenntartásában, és megvédik a fagocita sejteket a reaktív oxigénradikálok (ROS) által kiváltott oxidatív stressztől. Ezzel szemben, mint prooxidánsok, a Se-vegyületek jelentős ROS-képződést válthatnak ki a redox folyamatokon keresztül, ami oxidatív stresszhez vezet a sejtekben.

CÉLKITŰZÉSEK

Jelen tanulmányunkban arra törekszünk, hogy foglalkozzunk néhány fontos rezisztencia-mechanizmussal baktériumokban és tumorsejtekben, és új stratégiai megközelítést dolgozzunk ki MDR leküzdésére.

A vizsgálat fő céljai:

1. Tizenöt szelenoészter antibakteriális és MDR visszafordító hatása Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumtörzseken

1.1 A vegyületek MIC-értékeinek meghatározása mikrohígításos módszerrel *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 törzsen, methicillin- és ofloxacin-rezisztens *S. aureus* MRSA 272123 klinikai izolátumon, methicillin- és oxacillin-rezisztens *S. aureus* MRSA ATCC 43300, biofilmet termelő *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955/ATCC 27853, multidrog rezisztens *P. aeruginosa* NEM 986 törzseken, valamint vad típusú, AcrAB-TolC pumparendszert expresszáló *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 (SE01), valamint ennek *acrB* gén inaktivált mutáns *S. Typhimurium* SL1344 (SE02), *acrA* gén inaktivált mutáns *S. Typhimurium* SL1344 (SE03), és *tolC* inaktivált mutáns *S. Typhimurium* SL1344 (SE39) törzsein.

1.2. Efflux pumpa gátlása Se-vegyületekkel valós idejű etidium-bromid akkumulációs vizsgálattal *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MRSA ATCC 43300, *S. Typhimurium* SE01, SE02, SE03 és SE39 törzsekben.

1.3. Quorum sensing gátlásának vizsgálata Se-vegyületekkel *Vibrio campbellii* (ATCC BAA-1118TM és ATCC BAA-1119TM) törzsek alkalmazásával.

1.4. Se-vegyületek biofilm-ellenes aktivitásának meghatározása *S. aureus* ATCC 25923-on és *P. aeruginosa* CCM 3955-ön (ATCC 27853) resazurin vizsgálattal.

2. Tizenöt szelenoészter daganatellenes és MDR visszafordító hatása tumorsejtvonalakban

2.1. A szelenoészterek citotoxikus hatásának meghatározása MTT és resazurin módszerrel különböző rákos sejtvonalakon és normál sejteken.

2.2. A szelenoészterek aktivitásának vizsgálata checkerboard módszerrel doxorubicin jelenlétében a Chou-Talalay módszer alkalmazásával ABCB1-et expresszáló Colo 320 vastagbél adenocarcinoma sejtvonalon.

2.3. Az ABCB1 efflux pumpa gátlásának vizsgálata rhodamin 123 akkumulációs teszttel és áramlási citometriával.

2.4. Pgp ATPáz gátlása szelenoészterek jelenlétében Pgp-Glo™ Assay System kit (Promega) használatával

2.5. Apoptózis indukció szelenoészterek jelenlétében Annexin V-FITC-vel és propidium-jodidos festéssel Colo 320 sejtvonalon áramlási citometriával.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Vegyületek

A dolgozatban vizsgált 15 szelenoésztert előzetesen az EP 17382693 számú szabadalmi bejelentésben leírtak szerint szintetizálták és értékelték. A biológiai vizsgálatok előtt a szelenoészterekből 10 mM-os törzsoldatot készítettünk dimetil-szulfoxidban (DMSO).

2. Baktériumtörzsek

Gram-pozitív törzsek: *Staphylococcus aureus* American Type Culture Collection (ATCC) 25923 törzs (methicillin-érzékeny referencia és biofilm termelő törzs); a *S. aureus* MRSA 272123 klinikai izolátum és a methicillin, oxacillin-rezisztens *S. aureus* MRSA ATCC 43300 törzsek. Gram-negatív törzsek: biofilm termelő *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955/ATCC 27853*, multidrog rezisztens *P. aeruginosa* NEM 986*, vad típusú és AcrAB-TolC pumparendszert expresszáló *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 (SE01), valamint ennek *acrB* gén inaktivált mutáns *S. Typhimurium* SL1344 (SE02), *acrA* gén inaktivált mutáns *S. Typhimurium* SL1344 (SE03), és *tolC* inaktivált mutáns *S. Typhimurium* SL1344 (SE39) törzsei. A quorum sensing vizsgálatok esetében Gram-negatív *Vibrio campbellii* ATCC BAA-1118 és ATCC BAA-1119 törzseket használtuk: (*: a mikroorganizmusokat a Cseh Mikroorganizmusok Gyűjteményétől (CCM, Masaryk Egyetem, Csehország) és az Orvosi Mikrobiológiai Laboratóriumtól (NEM, Cseh Laboratórium, Inc.) szereztük be).

3. Sejtvonalak

A szelenoészterek hatását több sejtvonalon vizsgáltuk. Ezek a sejtvonalak a következők: doxorubicin-érzékeny humán vastagbél adenocarcinoma (Colo 205; ATCC-CCL-222) és a multidrog rezisztens P-gp-t és LRP-t expresszáló (MDR1)-LRP humán vastagbél adenocarcinoma (Colo 320; ATCC-CCL-220.1) (LGC Promochem, Teddington. UK) sejtvonal; humán embrionális tüdő fibroblaszt sejtvonal (MRC-5; ATCC CCL-171; Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Németország); hepatocelluláris carcinoma (HepG2; ATCC®, CCL-23™, Manassas, VA, USA), méhnyak adenocarcinoma (HeLa; ATCC®, CCL-2™), bőr melanoma (B16; ATCC®, CCL-6322™), humán dermális fibroblaszt (HDF) Sigma-Aldrich); humán keratinocita (HaCaT, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Tenyésztési körülményeik a következők: a Colo 205 és Colo 320 humán vastagbél adenocarcinoma sejtvonalat RPMI-ben tenyésztettük. Az MRC-5 humán embrionális tüdőfibroblaszt sejteket Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) tápfolyadékban tenyésztettük. A HepG2, HeLa, B16 és HaCaT sejtvonalatokat 10% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal és 1× antibiotikum antifungális oldattal kiegészített EMEM tápfolyadékban tenyésztettük. Minden sejtvonalat CO₂ termosztátban (5 % CO₂, 37 °C, Thermo Fisher Scientific) inkubáltunk.

4. Minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása mikrohígítási módszerrel

Vizsgálat során meghatároztuk a keton- és ciano-szelenoészterek minimális gátló koncentrációit (MIC), követve a Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) irányelveit.

5. Valós idejű etídiám-bromid akkumulációs vizsgálat

A Se-vegyületek efflux pumpa gátló hatását *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MRSA ATCC 43300, *S. Typhimurium* SE01, SE02, SE03 és SE39 törzseken vizsgáltuk. Valós idejű fluorimetriát alkalmaztunk az etídiám-bromid (EB) efflux pumpa szubsztrát intracelluláris felhalmozódásának meghatározására. Erre a célra a CLARIOstar Plus lemezleolvasót (BMG Labtech, Egyesült Királyság) használtuk. Pozitív kontrollként a rezerpint (RES) 25 µM-ban, a karbonil-cianid-m-klórfenilhidrazont (CCCP) 50 µM-ban használtuk, oldószer kontrollként a DMSO-t 1 v/v%-ban alkalmaztunk. A Se-vegyületeket ½ MIC koncentrációban adtuk a PBS-hez, amely nem toxikus koncentrációjú EB-t (2 µg/ml) tartalmazott. Az oldatokat ezután egy 96 lyukú fekete mikrotiterlemezre (Greiner Bio-One Hungary Kft, Magyarország) pipettáztuk, és mindegyik lyukba 50 µl baktériumszuszpenziót (OD₆₀₀ 0,6) adtunk. A lemezeket a CLARIOstar lemezleolvasóba helyeztük, és a fluoreszcenciát percenként mértük egy órán keresztül 530 nm és 600 nm gerjesztési és emissziós hullámhosszon. Kiszámoltuk az EB akkumulációs vizsgálat utolsó időpontjának (60. perc) relatív fluoreszcencia indexét (RFI).

6. A quorum sensing (QS) gátlásának vizsgálata

A vegyületek anti-quorum sensing (QS) aktivitását a *V. campbellii* két kereskedelmi forgalomban lévő törzsén (ATCC BAA-1118™ és ATCC BAA-1119™) határoztuk meg. Az első törzs az autoinducer-1-re, míg a második törzs az autoinducer-2-re reagál biolumineszcenciával. A törzseket egy éjszakán át tartó tenyésztést követően 5×10⁵ CFU/ml-re hígítottuk Autoinducer Bioassay tápközegben, és 96 lyukú lemezekbe osztottuk, majd hozzáadtuk a vegyületeket. A lumineszcenciát 16 órán keresztül rögzítettük 30 °C-ra beállított mikrolemesz-leolvasóval. A vegyületek effektív koncentráció 50 értékét (EC₅₀) a lumineszcencia alapján határoztuk meg, és a tenyészet életképességét resazurin vizsgálattal

ellenőriztük, hogy kiszámítsuk a vegyületek IC_{50} értékét. A vegyületeket az EC_{50} (az a koncentráció, amely felére csökkenti a sejt-kommunikációt) és az IC_{50} (életképesség; a vegyület azon minimális koncentrációja, amely az 50%-os in vitro gátláshoz szükséges) alapján hasonlítottuk össze.

7. Biofilm ellenes hatás

7.1. A biofilm képződés gátlása

A kísérletben a szelénvegyületek biofilm ellenes hatását vizsgáltuk *S. aureus* ATCC 25923 és *P. aeruginosa* CCM 3955 (ATCC 27853) törzseken 96 lyukú lemezekben. Első lépésként a baktériumokat egy éjszakán át Brain Heart Infusion (BHI) táplevesben hígítottuk, hogy 0,5 McFarland optikai denzitást kapjunk, majd a szuszpenziót 96 lyukú lemezek lyukaiba osztottuk 100 μ l-enként. Ezután Se-vegyületeket adtunk a sejtekhez 100 μ M és 0,19 μ M közötti koncentráció tartományban. A lemezeket ezután 24 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Az inkubálás után a kitapadó sejtek életképességét értékeltük resazurin vizsgálattal. A fluoreszcenciát (560/590 nm, ex./em.) a SpectraMax i3x Multi-Mode Detection Platform (Molecular Devices, Egyesült Államok) segítségével mértük, és a vizsgálatokat négy párhuzamossal végeztük.

7.2. Érett biofilm ellenes hatás

A vizsgálat célja a Se-vegyületek érett biofilmre gyakorolt hatásának vizsgálata volt két baktériumtörzs, a *S. aureus* ATCC 25923 és a *P. aeruginosa* CCM 3955 (ATCC 27853) felhasználásával. Az eredmények meghatározásához resazurin vizsgálatot alkalmaztunk. Először a baktériumok egy éjszakán át tartó tenyészetét hígítottuk BHI táptalajban 0,5 McFarland optikai sűrűségre, majd a baktériumsuszpenziót 100 μ l-enként szétosztottuk a lyukakba. 24 órán át, 37 °C-on végzett inkubálás után a régi táptalajt eltávolítottuk, és új, szelénvegyületekkel kiegészített BHI táptalajt mértünk a lyukakba. A lemezeket ezután további 24 órán át inkubáltuk. 100 μ l resazurint PBS-ben oldva (0,03 mg/l) adtunk minden egyes lyukhoz, és a fluoreszcenciát a SpectraMax i3x Multi-Mode Detection Platform (Molecular Devices, USA) segítségével mértük 560/590 nm gerjesztési és emissziós hullámhosszal, majd kiszámítottuk az IC_{50} értékeket.

8. Citotoxicitási vizsgálat

8.1. MTT vizsgálat

A vegyületekből felező hígítást készítettünk külön lemezen, majd a megfelelő sejt vonalat tartalmazó (Colo 205, Colo 320, MRC-5) lemezekre mértük át. A lemezeket ezután 37 °C-on 24 órán át inkubáltuk, és MTT-vel festettük. Az optikai denzitást (OD) 540 nm-en (ref. 630 nm) mértük ELISA-leolvasóval, hogy meghatározzuk a sejtnövekedés gátlását, IC_{50} értékekben

kifejezve. Az IC₅₀ értékeket és a szórást (SD) a GraphPad Prism szoftver 5.00 for Windows verziójával számítottuk ki, nemlineáris regressziós görbe illesztéssel.

8.2. Resazurin vizsgálat

A HeLa, HepG2, B16, HDF és HaCaT sejtvonal esetében resazurin festést alkalmaztunk. A kísérlethez a sejteket 96 lyukú lemezekre mértük 1 x 10⁵ sejt/ml koncentrációban 100 µl végtérfogatban. 24 óra elteltével a lemezeket PBS-sel háromszor mostuk, és a vegyületeket 0,625-20 µM végső koncentráció tartományban adtuk a sejtekhez. 72 órás inkubálás után resazurinnal festettük a sejteket. Ezután a fluoreszcenciát (pl. 560/590 nm) SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate olvasóval és MiniMax Imaging Cytometer készüléssel (Molecular Devices[®], Egyesült Államok) mértük meg.

9. Checkerboard kombinációs vizsgálat

Az ABCB1 transzportert expresszáló rezisztens Colo 320 vastagbél adenocarcinoma sejteken a szelénvegyületek és a doxorubicin potenciális szinergista hatásának vizsgálatára checkerboard microplate módszert alkalmaztunk, melyet a Chou-Talalay módszer alapján értékeltünk ki. A CalcuSyn szoftverrel 4 vagy 5 adatpontot ábrázoltunk minden arányhoz, és az eredményeket kombinációs index (CI) értéként fejeztük ki 50%-os növekedés gátlásnál (ED₅₀). A medián-hatás egyenletet használtuk a CI értékek kiszámításához, ahol a CI < 1 szinergizmust, a CI = 1 additív hatást vagy kölcsönhatás hiányát, a CI > 1 pedig antagonizmust jelez. A kísérlet elvégzéséhez a doxorubicint vízszintesen 100 µl térfogatban hígítottuk, míg a Se-vegyületet függőlegesen 50 µl térfogatban hígítottuk. A doxorubicin kiindulási koncentrációja 8,62 µM volt, a vegyületek koncentrációját az IC₅₀ alapján számítottuk ki. A lemezeket 37 °C-on CO₂ termosztátban 72 órán át inkubáltuk, és a sejtek életképességét MTT festéssel határoztuk meg. Az optikai denzitást (OD) 540/630 nm-en mértük Multiscan EX ELISA leolvasóval.

10. ABCB1 gátlás szelénészterek jelenlétében

A rhodamin 123 az ABCB1 gátlása révén felhalmozódik a sejten belül, ez a pumpagátlás indikátora. A sejteket Eppendorf centrifugacsövekbe osztottuk, és törzsoldatokból különböző koncentrációkban (0,2 és 2 µM) adtuk a sejtekhez a vizsgált vegyületeket. A sejtpopuláció fluoreszcenciáját CyFlow[®] áramlási citométerrel (Partec, Németország) mértük, és az eredményeket egy reprezentatív áramlási citometriás kísérletből határoztuk meg, amelyben a teljes sejtpopuláció legalább 20 000 egyedi sejtjében mértük a rhodamin 123 retencióját. Meghatároztuk a fluoreszcencia aktivitási hányadost (FAR), pozitív kontrollként tariquidart (0,2 µM végkoncentráció), oldószer kontrollként DMSO-t (2 v/v%) használtunk.

11. P-gp ATPáz aktivitási vizsgálat

A P-glikoprotein ATPáz aktivitását a Promega Pgp-Glo™ Assay System rendszerével értékeltük ki. A vegyületeket 25 µM koncentrációban vizsgáltuk. A kibocsátott luciferáz által generált lumineszcens jelet 580 nm-en mértük a BMG Labtech cég CLARIOstar Plus lemezleolvasójával.

12. Apoptózis indukció

A vizsgálathoz az Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit-et használtuk a Calbiochem-től (EMD Biosciences, Inc. La Jolla, CA). A Colo 320 sejtuszuspenziót körülbelül 1×10^6 sejt/ml-re állítottuk be, és 1 ml-enként szétosztottuk egy 24 lyukú mikrolemezen. A sejteket egy éjszakán át inkubáltuk 37 °C-on 5% CO₂ mellett. Se-vegyületeket adtunk a sejtekhez, és a sejteket 3 órán át 37 °C-on inkubáltuk. A 2 µM koncentrációt a korábbi citotoxicitási eredmények (IC₅₀ értékek) alapján választottuk ki. Pozitív kontrollként 12*H*-benzo(α)-fenotiazint (M627) alkalmaztunk 20 µM végkoncentrációban. Az apoptózis vizsgálatot a kit gyors protokollja szerint hajtottuk végre Annexin V-FITC és propídium-jodid festéssel. A fluoreszcenciát azonnal elemeztük CyFlow® áramlási citométerrel (Partec, Münster, Németország), és az eredményeket egy reprezentatív áramlási citometriás kísérletből kaptuk, amely a mintában lévő teljes populáció legalább 20 000 egyedi sejtjét értékelte. Az adatok elemzéséhez a FlowJo™ szoftvert (BD Biosciences, San Jose, NJ, Egyesült Államok) használtuk.

EREDMÉNYEK

1. Antibakteriális hatás

1.1. Minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása mikrohígítási módszerrel

Az eredmények alapján a keton-szelenoészterek erőteljes antibakteriális hatást fejtenek ki a vizsgált Gram-pozitív baktériumokkal szemben. A K1, K7 és K8 származékok mutatták a legnagyobb hatást, mindhárom vizsgált *S. aureus* törzsön, 0,39 és 1,56 µM közötti MIC-értékekkel.

1.2. A bakteriális efflux pumpák gátlása

A vizsgált Salmonella törzsek közül a K7 keton-szelenoészter mutatta a legerősebb efflux pumpa gátló (EPI) aktivitást, mivel gátolni tudta az AcrAB-TolC rendszert. A Δ *acrB* törzs esetében alacsonyabb EB koncentrációt és alacsonyabb EPI aktivitást figyeeltünk meg, mint a vad típusban. A Δ *acrA* és Δ *tolC* törzsek esetében azonban magasabb EB koncentrációt regisztráltunk, mint a vad típusú törzsnél, a relatív fluoreszcencia intenzitás (RFI) 1,15 és 1,67 volt. A K4 és K5 keton-szelenoészterek gátolták az EB felhalmozódását a *tolC* inaktivált mutáns törzsben. Az N4 és N7 ciano-szelenoészterek mutatták a legfigyelemreméltóbb

aktivitást a *tolC* inaktivált mutáns törzssel szemben. A *S. aureus* ATCC MRSA 43300 esetében csak egy származék, az N4 ciano-szelenoészter mutatott hatásos efflux pumpa gátlást.

1.3. A quorum sensing (QS) gátlásának vizsgálata

A toxikus koncentráció és a sejt-sejt kommunikációt gátló koncentráció közötti különbségtétel érdekében a vizsgálat az IC₅₀-et (az életképességet 50%-kal csökkentő koncentráció) hasonlította össze az EC₅₀-el (azzal a koncentrációval, amely felére csökkenti a sejt-sejt közötti kommunikációt). Ez az összehasonlítás elengedhetetlen volt a vizsgált vegyületek hatékonyságának megállapításához. A szelénvegyületek QS gátló képességét a *V. campbellii* két törzsen vizsgáltuk. Egy vegyület különböző koncentrációinak hatását monitoroztuk a sejt-sejt közötti kommunikációra (EC₅₀) és a sejtek életképességére (IC₅₀) vonatkozóan, és meghatároztuk a vegyületek szelektivitási indexét (SI). Az SI-t az IC₅₀ és az EC₅₀ arányként számítottuk ki, lehetővé téve a toxikus és a QS gátló koncentrációk közötti különbségtételt. Korábbi tanulmányok szerint a gyakorlati alkalmazáshoz 10-nél magasabb szelektivitási index (SI) ajánlott. E kritérium alapján a QS-gátlás szempontjából legígéretesebb keton-szelenoészterek a K1, K2 és K8, míg a leghatékonyabb ciano-szelenoészter az N2.

1.4. Biofilm gátlás

A biofilm gátlás többféle stratégiával valósítható meg: (a) a bakteriális felületi adhézió megakadályozása a kezdeti szakaszokban (adhézió gátlása), (b) az érett biofilmek integritásának megbontása (antibiofilm hatás). Minden vizsgált vegyület hatékonyan bizonyult a biofilm képződés mindkét szakaszában. A Se-vegyületek nagyobb aktivitást mutattak a *P. aeruginosa* törzsen, mint a *S. aureus* törzsen.

2. Tumorelles hatás

2.1. Citotoxicitás

A keton-szelenoészterek erős citotoxikus aktivitást mutattak az érzékeny Colo 205 és a rezisztens Colo 320 rákos sejtvonalakkal szemben, az IC₅₀ értékek mindkét sejtvonal esetében 1-4 µM között voltak. Ugyanakkor hasonló toxicitást mértünk a normál tüdőfibroblaszt sejteken (MRC-5), ami arra utal, hogy a vegyületek nem rendelkeztek szelektivitással a rákos sejtekkel szemben. A ciano-szelenoészterek viszont nem voltak toxikusak az MRC-5 sejtvonalon (IC₅₀ > 100 µM), de erősen toxikusak voltak mindkét vastagbélrák sejtvonalra. A keton-szelenoészterek IC₅₀-értékei 2,2 és 4,3 µM között voltak a HepG2 sejtek esetében, 1,9 és 2,7 µM között HeLa sejtek esetén, és 1,1 és 2,0 µM között B16 sejtek esetében. Ezzel szemben a ciano-szelenoészterek IC₅₀-értékei a következők voltak: 5,2-11,8 µM HepG2 sejtek, 1,3-5,2 µM HeLa sejtek és 1,4-2,6 µM B16 sejtek esetében.

2.2. A szelenoészterek kölcsönhatása doxorubicinnel: a kombinált kemoterápia *in vitro* modellje

Hat keton-szelenoészter (K1, K3, K4, K5, K6, K8) kombinációja doxorubicinnel szinergista kölcsönhatást eredményezett a Colo 320 sejteken, a K5 és K6 minden arányban szinergista hatást mutatott. Hasonló eredményeket figyeltünk meg öt ciano-szelenoészter (N1, N2, N3, N4, N7) esetében, amelyek szinergista hatást mutattak doxorubicinnel kombinálva a Colo 320 sejteken.

2.3. ABCB1 gátlás szelenoészterek jelenlétében

Az áramlási citometriával kapott eredmények alapján a keton-szelenoészterek egy része erősen gátolta az ABCB1 transzportert, közülük a K1, K2, K3, K7 és K8 volt a leghatékonyabb. Ezek a vegyületek a következő FAR értékeket mutatták 2 μM -ban: K1: 45,73; K2: 37,35; K3: 39,17; K7: 40,38 és K8: 36,09. A K3 és K8 mindkét koncentrációban (0,2 μM és 2 μM) hatásos volt, a FAR érték a 0,2 μM -os koncentrációnál a K2-nél 3,99 és a K8-nál pedig 3,38 volt. A ciano-szelenoészterek nem mutattak ABCB1 transzportert moduláló aktivitást.

2.4. Pgp ATPáz aktivitási vizsgálat

Az alacsonyabb relatív ATPáz aktivitás hatékonyabb inhibitorra utal. Ebben a vizsgálatban csak azokat a vegyületeket értékeltük, amelyek ABCB1-gátló aktivitást mutattak. A K1, K4, K7 és K8 gátolta az ABCB1 ATPáz, illetve a fennmaradó vegyületek stimulálták az ATPáz aktivitását.

2.5. Apoptózis indukció

Az eredmények azt mutatták, hogy a K3 volt a leghatékonyabb vegyület, amely a sejtpopuláció 18,6%-ában korai apoptózist indukált. A K3 volt a legaktívabb a késői apoptózis kiváltásában is: 25,6%-os arányt mértünk a sejtpopulációban. Érdekes megjegyezni, hogy az összes származék hozzájárult a késői apoptózishoz a vizsgált sejtpopulációban, aktivitásuk 16,1% és 33,9% között volt.

MEGBESZÉLÉS

1. Antibakteriális hatás

A keton-szelenoészterek igen hatékonyak bizonyultak mind az érzékeny, mind a methicillin rezisztens *S. aureus* törzsekkel szemben. A ciano-szelenoészterek valamivel nagyobb aktivitást mutattak, mint a keton-szelenoészterek a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium törzseken. A vizsgált Se-vegyületek közül a K6 bizonyult a leghatásosabb vegyületnek, *para*-helyzetben *terc*-butil-csoportot tartalmaz, és figyelemre méltó MIC-értékeket mutatott: 1,56 μM az érzékeny törzsekkel szemben és 0,39-3,13 μM a methicillin rezisztens *S. aureus* (MRSA) törzsekkel szemben. Érdekes módon a K6 volt az egyetlen olyan vegyület a vizsgálatunkban,

amely elektrondonor szubsztituenszt tartalmazott. Ez azért érdekes, mert a szelenoészterekkel kapcsolatos korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy az elektronszívó szubsztituensek általában nagyobb biológiai aktivitást mutatnak. A nitrilszármazékok (N1-N7) hasonló hatást mutattak az érzékeny *S. aureus* ATCC 25923 törzsön, 12,5 μM volt a MIC érték. Figyelembe véve az MRSA és *S. Typhimurium* törzseken kapott eredményeket, a leghatékonyabb vegyület az N1 (szubsztituálatlan), N3 (4-Br-szubsztituált), N6 (3-Cl-szubsztituált) és N7 (3,5- bisz(trifluorometil)-szubsztituált) volt. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a monoszubsztituált vegyületek közül a gyűrűhöz kapcsolódó bróm- vagy klóratomot tartalmazó vegyületek aktívabbak, mint a fluor- vagy trifluoro-metil-csoportot tartalmazó vegyületek.

2. Efflux pumpa gátlás

A jelen tanulmányban vizsgált keton- és ciano-szelenoészterek közül csak egy ciano-szelenoészter, az N4 mutatott potens EPI-aktivitást a methicillin rezisztens *S. aureus* ellen, felülmúlva a referencia EPI rezerpin hatását. A K7 keton-szelenoészter hatékony EPI-aktivitást mutatott *S. Typhimurium* törzseken, valószínűleg a bakteriális membránt destabilizáló képessége miatt. Érdekes módon az N5 kivételével minden, legalább egy trifluoro-metil-csoportot tartalmazó vegyület (K4, K5, N4 és N7) mérsékelt efflux pumpa gátló hatást mutatott az *S. Typhimurium* SE39 ΔtolC törzsben. Ezért a $-\text{CF}_3$ és a $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ csoport jelenléte a K7 vegyületben szignifikánsnak tűnt az *S. Typhimurium* SE39 ΔtolC törzsben az efflux pumpa gátlás szempontjából.

3. Quorum sensing (QS) és biofilm gátlás

Eredményeink alapján számos hatékony vegyületet azonosítottunk, amelyek a bakteriális kommunikációt gátló szerként alkalmazhatóak: különösen a K2 vegyület mutatott jelentős aktivitást. Az értékelt vegyületek közül a K1 keton-szelenoészter az AI-1 alapú kommunikáció legígéretesebb gátlószere, ezt követi az N2, az egyetlen ciano-szelenovegyület, amely képes gátolni az ilyen típusú kommunikációt. Mind a K1, mind az N2 gátló hatást mutatott kiemelkedően alacsony, 0,25 μM és 0,34 μM koncentrációban. Érdekes módon mind a K2 vegyületben (keton-szelenoészter), mind az N2 származékban (ciano-szelenoészter) van egy 2-fluor-fenil-csoport, amely a szelenoészterhez kapcsolódik, ami arra utal, hogy fontos az AI-1 kommunikáció gátlásában. A fluoratomok jelenléte más szubsztituensek nélkül előnyös volt az aktivitás szempontjából, amint azt az egyik leghatékonyabb vegyület (K8) bizonyítja, 2,4,5-trifluor szubsztitúcióval. A K1, K2 és K8 vegyületek 10 feletti QS-szelektivitási indexet mutattak, és a *P. aeruginosa* adhéziót szignifikánsan gátolták az antibiofilm vizsgálatban. Ezzel szemben a ciano-szelenvegyületek kiemelkedő hatást mutattak az AI-2 alapú kommunikáció gátlásában. Közülük az N3 és az N7 volt a legaktívabb, ahol az N3 már 60 nM koncentrációban

is jelentős gátlást mutatott. Érdekes módon ezek a vegyületek eltérő szubsztitúciókat mutattak a fenilgyűrűn az AI-1 inhibitorokhoz képest. A QS folyamatát a Gram-pozitív baktériumokban jellemzően peptidmolekulák közvetítik, amelyek eltérnek a *Vibrio* baktériumok által használt kommunikációs jelektől. Számos vizsgált vegyület szignifikánsan gátolta a *S. aureus* adhézióját, ami azt jelzi, hogy a Se-vegyületek képesek módosítani az efflux pumpák aktivitását. Az AI-2-t Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok is használják. Az AI-2 rendszerben ezek a pumpák a kommunikációban résztvevő molekulák transzportjárt felelnek. Érdekes módon a K2, K4, K7, N3, N6 és N7 vegyületek kiemelkedő gátló hatásúak voltak erre az általános kommunikációs rendszerre nézve, amelyet a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok egyaránt használnak. Az antibiofilm vizsgálatban minden vegyület biofilm adhéziót gátló aktivitást mutatott a tesztelt baktériumtörzseken (*S. aureus* ATCC 25923 és *P. aeruginosa* CCM 3955) 4 μM alatti koncentrációkban. Két vegyület (K8 és N3) kimagaslóan gátolta a *P. aeruginosa* biofilm adhézióját (0,86 μM és 0,92 μM).

4. Citotoxikus hatás

Az oxoszelenoészterek néhány kivételtől eltekintve nagyobb citotoxicitást mutattak a ciano-szelenoészterekhez képest a Colo 320, HepG2 és B16 rákos sejtvonalon. A ciano-szelenoészterek nem voltak hatással az MRC-5 sejtekre, azonban mindkét vastagbélrák sejtvonalban jelentős toxicitást mutattak, de rezisztens sejteken kevésbé voltak hatásosak. Az egyes sejtvonalakon a legaktívabb vegyületek, zárójelben a második és harmadik legaktívabb vegyületek a következők voltak: K4 a Colo 205-ben (K1, N4); K1 a Colo 320-ban (K4, K6); K2 a HepG2-ben (K1, K5); N6 a HeLa-ban (K4, K3); és K5 a B16 sejtekben (K2, K6). Érdekes módon a leghatásosabb vegyületek többsége oxoszelenoészter, amelyekben a halogénmentes szubsztituensek csökkentik az aktivitást. A fenilgyűrűhöz kapcsolódóan trifluoro-metil-csoportot vagy egy vagy két halogénatomot tartalmazó származékok jobb aktivitást mutattak. A K1 és K4 gyakran szerepel a legpotensebb vegyületek között, ami arra utal, hogy a tionilgyűrű és a trifluoro-metil-csoport jelenléte a fenilgyűrű *orto* helyzetében fokozza a citotoxicitást. A gyűrűn 3-CF₃ szubsztituenszt tartalmazó K5 szintén jelentős aktivitást mutatott, míg a gyűrűn 2-CF₃ szubsztituenszt tartalmazó N4 ciano-szelenoészter volt a legaktívabb származék a ciano-szelenoészterek közül. Ezek az eredmények alátámasztják azt a megfigyelést, hogy a trifluoro-metil-csoport, az *orto* pozícióban döntő szerepet játszik a citotoxikus aktivitásban, bár a meta-helyzetben ezzel a szubsztituenssel rendelkező vegyület hasonló aktivitást mutatott minden sejtvonalban, kivéve a HepG2-t. A keton-szelenoészterek toxicitást mutattak a normál MRC-5 sejteken, míg a ciano-szelenoészterek egyike sem mutatott

toxicitást. Ez arra utal, hogy az összes ciano-szelenoészter erős szelektivitással rendelkezik rákos sejtekkel szemben.

5. Checkerboard kombinációs vizsgálat

A keton-szelenoészterek, ciano-szelenoészterek és a citotoxikus gyógyszer, a doxorubicin közötti kölcsönhatás vizsgálatakor azt találtuk, hogy a tizenöt szelenoészter közül tizenegy szinergista kölcsönhatást mutatott a doxorubicinnel. A szinergizmust mutató szelenoészterek a következők voltak: K1, K3, K4, K5, K6, K8, N1, N2, N3, N4 és N7. Érdekes módon nem lehetett egyértelmű szerkezet-aktivitás összefüggéseket (SAR) megállapítani, mivel az olyan vegyületek, mint a K5 és K6 különböző mértékű szinergizmust mutattak a doxorubicinnel az összes vizsgált arányban, míg ciano-szelenoészter megfelelőik (N5 és N6) öt esetben antagonistá kölcsönhatással rendelkeztek. Hasonlóképpen, az N1 tiofén-ciano-szelenoészter a hat vizsgált arányból négyben mutatott szinergista kölcsönhatást doxorubicinnel, míg ketonanalógja, a K1, az öt arányból csak egyben mutatott szinergizmust.

6. ABCB1 gátlás rhodamin 123 akkumulációs vizsgálattal

Azt találtuk, hogy a 2-oxopropil-csoport jelenléte a keton-szelenoészterekben döntő jelentőségű volt az ABCB1-t gátló aktivitásban. Az összes keton-szelenoészter, kivéve a K4-et, nagyobb hatékonyságot mutatott ABCB1 gátlóként, míg a ciano-szelenoészterek egyike sem mutatott ABCB1 gátló aktivitást. Az értékelt vegyületek közül a K1 a legaktívabb vegyület, amely fenilgyűrű helyett tioféngyűrűt tartalmaz. Figyelemreméltó, hogy egy nagyobb trifluoro-metil-csoport bevitele a fenilgyűrű (K4) két helyzetébe jelentősen csökkentette annak aktivitását. Érdekes módon ennek a csoportnak a 3-as pozícióba való áthelyezése, ezáltal a sztérikus akadályok kiküszöbölése az aktivitás hatszoros növekedését eredményezte (K5).

7. P-gp ATPáz aktivitási vizsgálat

A P-glikoprotein (P-gp) ATPáz aktivitását kizárólag az oxoszelenoészterek esetén vizsgáltuk, mivel ezek voltak az egyedüli vegyületek, amelyek ABCB1-gátló aktivitást mutattak. Az összes vegyület, kivéve a K4-et, az ATPáz aktivitás modulációját mutatta. Fontos kiemelni, hogy a legerősebb ABCB1 gátlók, vagyis a K1 és a K7 szignifikánsan gátolták az ATPáz aktivitást, a K7 pedig különösen erős gátlást mutatott. Ezen kívül a K8 gyengébb ATPáz gátló hatással rendelkezett. Tekintettel arra, hogy az ABCB1 fokozott aktivitása megvédeheti a sejteket az apoptózistól, a pumpa ATP-ellátásának gátlása elősegítheti az apoptózist. A fent említett származékok (K1, K7 és K8) késői apoptózist indukáltak MDR Colo 320 sejtekben, tovább erősítve az ABCB1 gátlás és az apoptózis indukció közötti kapcsolatot.

8. Apoptózis indukció vizsgálata

Az ABCB1 gátlása és az apoptózis kiváltása közötti összefüggést a keton-szelenoészterek esetében vizsgáltuk. A keton-szelenoészterek, kivéve a K4-et, nagy hatékonysággal indukáltak apoptózist. A K3-as vegyület a pozitív kontroll fenotiazinhoz képest hatékonyabban indukált korai apoptózist, a korai és késői apoptózis indukciót tekintve hasonló aktivitást mutatott, mint a pozitív kontroll. Az eredmények alapján egy bróm atom beépítése a fenilgyűrű (K3) négyes helyzetébe fokozta az apoptózis indukcióját, míg egy nagyobb méretű szubsztituens bevitele a fenilgyűrű 2-es pozíciójába (például a trifluoro-metil-csoport) csökkentette az apoptózis indukciót. Ezenkívül a szelén jelenléte a vegyületekben elősegítheti a szabadgyökök képződését, ami apoptózishoz és sejthalálhoz vezet tumorsejtekben.

TÉZISPONTOK

1. A szelenoészterek mint antibakteriális szerek

- ❖ A keton-szelenoészterek kiemelkedő antibakteriális hatásúak a methicillin érzékeny és methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus* törzseken. A ciano-szelenoészterek szintén erős antibakteriális hatást mutattak ezeken a Gram-pozitív törzseken. A keton- és ciano-szelenoészterek enyhe antibakteriális aktivitással rendelkeztek a Gram-negatív *Salmonella* Typhimurium SE01, SE02, SE03, SE 39, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 és NEM 986 törzseken.

2. A bakteriális virulencia módosítása: az efflux pumpák, a quorum sensing és a biofilm képződés gátlása

- ❖ A K7 keton-szelenoészter képes volt gátolni a vad típusú *Salmonella* Typhimurium AcrAB-TolC rendszerét.
- ❖ Az N4-es ciano-szelenoészter gátolta az AcrAB-TolC rendszer működését *S. Typhimurium* törzsben, a legnagyobb gátlás pedig a *S. Typhimurium tolC*-hiányos SE39 mutáns törzsén volt mérhető. Az N4 ciano-szelenoészter gátolta a *S. aureus* MRSA 43300 törzs efflux pumpa aktivitását.
- ❖ Egyetlen vegyület kivételével minden keton- és ciano-szelenoészter képes volt csökkenteni a *Vibrio campbellii* törzsek bakteriális kommunikációját. A legerősebb quorum sensing gátló keton-szelenoészter a K1, K2, K4, K7 és a K8 származék volt, a ciano-szelenoészterek közül az N2, N3 és N7 vegyület rendelkezett kiemelkedő aktivitással.
- ❖ Valamennyi keton- és ciano-szelenoészter gátolta a biofilm képződését, és képes volt megbontani a *S. aureus* ATCC 25923 és a *P. aeruginosa* CCM 3955 törzsek érett biofilmjét.

3. A szelenoészterek daganatellenes és citotoxikus hatásai

- ❖ Valamennyi keton- és ciano-szelenoészternek volt citotoxikus hatása a vizsgált vastagbél adenocarcinoma (Colo 205 és 320), hepatocelluláris carcinoma (HepG2), cervicalis adenocarcinoma (HeLa) és bőrmelanoma (B16) sejtvonalakon. Fontos kiemelni, hogy a ciano-szelenoészterek tumorsejtekre nézve szelektív hatásúak, azaz nem rendelkeztek toxikus aktivitással a normál MRC-5 tüdőfibroblaszt sejtvonalon.
- ❖ A K1, K3, K4, K5, K6, K8 keton-szelenoészter és az N1, N2, N3, N4, N7 ciano-szelenoészter szinergista kölcsönhatást mutatott a doxorubicin rezisztens Colo 320 vastagbél adenocarcinoma sejteken, mivel csökkenteni tudták a doxorubicin IC₅₀ értékét.

4. Tumor MDR visszafordítása szelenoészterekkel

- ❖ A szelenoészterek közül csak a keton-szelenoészterek gátolták hatékonyan az ABCB1 transzportert, a legaktívabb származékok pedig a K1, K2, K3, K7 és K8 voltak.
- ❖ A K1, K4, K7 és K8 keton-szelenoészterek gátolták az ABCB1 ATPáz-t.
- ❖ A keton-szelenoészterek képesek voltak késői apoptózist indukálni a rezisztens Colo 320 vastagbél adenocarcinoma sejtekben, és csak a K3 vegyület indukált korai apoptózist.

PÉNZÜGYI TÁMOGATÁS

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

- Szegedi Rákkutatásért Alapítvány
- COST Action CA17104 (STRATAGEM) - STSM
- Új Nemzeti Kiválósági Program (ÚNKP) (2021 - UNKP-21-3-SZTE-103; 2022 - ÚNKP-22-3 - SZTE-285; 2023 - ÚNKP-23-4 -SZTE-347)
- GINOP-2.3.2-15-2016-00038
- EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009
- SZTE ÁOK-KKA 2018/270-62-2
- 2018-2.1.15-TÉT-PT-2018-00017 Magyar-portugál bilaterális TÉT együttműködés (FCT/NKFIH, 2019/2020).
- OTKA K132446
- International Visegrad Fund (No. 22010090)

ÉRTEKEZÉSHEZ PAKCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Szemerédi N**, Dobiasová S, Salardón-Jiménez N, Kincses A, Nové M, Habibullah G, Sevilla-Hernández C, Benito-Lama M, Alonso-Martínez FJ, Viktorová J, Spengler G, Domínguez-Álvarez E. Cyano- and Ketone-Containing Selenoesters as Multi-Target Compounds against Resistant Cancers. *Cancers (Basel)*. 2021 Sep 11;13(18):4563. doi: 10.3390/cancers13184563. PMID: 34572790; PMCID: PMC8465942.

IF: 6.575

- II. **Szemerédi N**, Kincses A, Rehorova K, Hoang L, Salardón-Jiménez N, Sevilla-Hernández C, Viktorová J, Domínguez-Álvarez E, Spengler G. Ketone- and Cyano-Selenoesters to Overcome Efflux Pump, Quorum-Sensing, and Biofilm-Mediated Resistance. *Antibiotics (Basel)*. 2020 Dec 11;9(12):896. doi: 10.3390/antibiotics9120896. PMID: 33322639; PMCID: PMC7763688

IF: 4.639