

# **REZISZTENCIA MÓDOSÍTÁSA PROKARIÓTA ÉS EUKARIÓTA SEJTEKEN**

PhD tézis összefoglaló

Schelz Zsuzsanna

Témavezető: Prof. Dr. Molnár József

Szegedi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Orvosi Mikrobiológiai és Immunológiai Intézet

Szeged

2009

## BEVEZETÉS

A baktériumok antibiotikumokkal szemben mutatott rezisztenciája nagymértékben megnehezíti a fertőzések megbetegedések terápiáját. Különösen a több antibiotikummal szemben rezisztens, ún. multidrog rezisztenciát (MDR) hordozó kórokozók növelhetik meg egy fertőzés morbiditási és mortalitási rátáját. A rezisztens törzsek szinte közvetlenül az antibiotikumok bevezetése után jelentek meg hospitalizált betegekben. Elsőként az enterális kórokozók körében írtak le antibiotikum rezisztenciát, majd később az olyan bakteriális kórokozók között is megjelentek rezisztens törzsek, mint a *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* és a *Pseudomonas aeruginosa*.

Az antibiotikum rezisztencia kialakulása elkerülhetetlen volt, ha az evolúciós hátterét vesszük figyelembe, hiszen a rezisztens törzsek előnyre tesznek szert az érzékeny baktériumokkal szemben. A rezisztencia kialakulásában óriási szerepe van az antibiotikumok kritikátlan használatának és a nem megfelelő higiéniének. Mindehhez hozzájárul az, hogy a mezőgazdaságban az antibiotikumokat hozamfokozóként alkalmazzák a klinikumban használatos dózisonál kisebb mennyiségben, ami kedvez a rezisztens törzsek szelekciójának. Mivel az antibiotikum rezisztencia egyre nagyobb méreteket ölt, szükség volna megfelelő módszerek és protokollok kidolgozására, hogy a rezisztencia terjedését megfékezzük.

### Antibiotikum rezisztencia mechanizmusai baktériumokban

Bizonyos baktériumtörzsek intrinsic rezisztenciával rendelkeznek (pl. *Enterococcus* szulfonamidokkal szembeni rezisztenciája), de a szerzett rezisztencia a terápia szempontjából jóval nagyobb problémát jelent. A rezisztenciát hordozó gén jelen lehet a kromozómán vagy az attól függetlenül replikációra képes plazmidokon. Létrejöhethet mutációval, vagy horizontális géntranszferrel (konjugáció), transzdukciónal vagy transzformációnal.

Az antibiotikum rezisztencia mechanizmusai a következők lehetnek:

- enzimikus lebontás vagy módosítás (pl.  $\beta$ -laktamáz, transzferáz enzimek)
- aktív efflux és csökkent felvétel (efflux transzporterek)
- célstruktúra módosítása (pl. streptomycin rezisztencia *M. tuberculosis*-ban)

### Rezisztencia elleni küzdelem lehetőségei

Az elmúlt évtizedekben tanúi lehettünk annak, hogy az antibiotikum rezisztencia egyre nagyobb méreteket ölt. Erre egyfajta megoldást jelent, olyan antibiotikumok fejlesztése, amelyek új szerkezettel, vagy új hatásmechanizmussal rendelkeznek. Míg korábban az antibiotikum hatásmechanizmusát utólag tisztázták, ma már a genomika lehetővé teszi, hogy az új antimikrobás szerek kiválasztása ún. „target-based screening” alapján történjen. Az utóbbi évtizedben néhány új antibiotikum került bevezetésre. A linezolid, az első oxazolidinon antibiotikum, amelyet a vankomicin rezisztens *Enterococcusok* terápiájában, nozokómiális pneumonia és a bőr fertőzések megbetegedéseiben alkalmazzák. De a közelmúltban történt bevezetésre a streptograminok közül a quinupristin/dalfopristin, az új generációs tetraciklinek közül a tigecyclin, lipopeptidek közül a daptomicin, a glikopeptidek közül a dalbavancin, oritavancin és a telavancin. A makrolidok szerkezetével rokon ketolidok is az újonnan bevezetett antibiotikumok közé tartoznak.

Segítheti az antimikrobás terápiát olyan vegyületek alkalmazása, amelyek korábban nem ismert baktérium-specifikus mechanizmusokra hatnak. A szortáz enzimek a bakteriális sejtfalban segítik a felszíni fehérjék kötődését transzpeptidáció katalízisével. A folyamat molekulárisan specifikus az egyes baktériumtörzsekre, így Gram-pozitív baktériumok okozta fertőzések kezelésében használandó antibiotikumok célozhatják a folyamat gátlását. A sejtfal bioszintézisében az izoprenoid prekursorok jelenléte elengedhetetlen. Az ún. nem-mevalonát

úton történő szintézis is specifikus a prokaryotákra, így ennek gátlása is egy lehetséges antibiotikum hatásmechanizmus.

Rezisztenciamódosítók:

Azok a farmakonok, amelyek képesek egy antibiotikum hatékonyságát növelni azáltal, hogy a rezisztenciát csökkentik, rezisztencia módosítóknak tekintendők. Ezek az anyagok önmagukban nem feltétlenül szükséges, hogy rendelkezzenek antibakteriális hatással, de egy adott antibiotikummal kombinációban, a rezisztencia ellen hatnak. A rezisztenciamódosítás többféle úton valósulhat meg. Célozhatja a bakteriális efflux mechanizmusokat, a quorum sensinget, a sejtmembrán permeabilitást, az antibiotikum-bontó enzimeket, de genom szinten is kifejthetik hatásukat.

- Efflux pumpa gátlók: Az aktív efflux mechanizmusok minden sejtre jellemzőek. Részt vesznek a sejt számára toxikus molekulák eltávolításában, így az antibiotikum rezisztencia egyik fő közvetítői, sok esetben a multidrog rezisztencia kialakulásáért felelnek. Az efflux mechanizmusok szelektív gátlására tetraciklin analógokat vizsgáltak.
- Plazmid elimináció: A rezisztencia sok esetben nem a bakteriális kromozómán, hanem R-plazmidon kódolt, amely mobilis genetikai elem felelős a rezisztencia terjedésében is. A plazmidokra kis valószínűséggel jellemző a spontán veszteség, de a plazmid eliminációt bizonyos hatások és anyagok elősegíthetik. Korai tanulmányokban az akridin narancsról, az etidium bromidról és a nátrium-dodecilszulfátról írtak le antiplazmid hatást, de toxicitásuk *in vivo* alkalmazásukat akadályozta. Molnár és mtsai triciklusos vegyületeket vizsgáltak, és a klórpromazinról, valamint a prometazinról derült ki, hogy *in vitro* képesek *E. coli*-ban eliminálni a tetraciklin, kloramfenikol, streptomycin és szulfonamid rezisztenciát. Ezt hasonló szerkezetű vegyületek szisztematikus vizsgálata követte, és számos hatásos vegyületre került fény. Kevés *in vivo* adat áll rendelkezésre, de a prometazinról bebizonyosodott, hogy gentamicinnel kombinálva csökkente a visszatérő pyelonephritis recidívát gyermekekben.
- Quorum sensing gátlása: A quorum sensing olyan regulátor folyamatok összessége, amely a bakteriális populáció szintjén szabályoz. Quorum sensing fontos szerepet tölt be a virulencia faktorok szintézisében, biofilm létrehozásában, konjugációban, a spóráképzésben, kompetens állapot létrehozásában. A szignálmolekulák szintézisnek, eloszlásának, valamint receptoron való kötődésének gátlása lehet alternatíva új antibiotikum hatásmechanizmusaként.

### **Daganatos sejtek rezisztenciája**

A daganatos megbetegedések terápiáját megnehezíti a malignus sejtek citosztatikumokkal szembeni rezisztenciája. Számos mechanizmus közül a leggyakoribb az energia-dependens transzporterek közvetítette rezisztencia. Az ABC transporterek (ATP-binding cassette) a humán genomban 49 génen kódoltak, és hét alcsaládba sorolhatók. A multidrog rezisztenciáért felelős egyik leggyakoribb fehérje a P-glikoprotein, amely fiziológiás funkciói mellett a tumorsejtekből a szerkezetileg különböző citosztatikumokat képes kipumpálni. A P-glikoprotein működését gátló vegyületek segíthetik a konvencionális kemoterápia sikerességét, ezért tumor specifikus formulálást követően ígéretesnek látszanak a kemoterápiás kezelés kiegészítéseként.

## CÉLKITŰZÉSEK

A természetben előforduló és kémiai szintetizált vegyületek között kerestünk potenciális rezisztenciamódosítókat ill. antimikrobás hatású vegyületeket a későbbiekben felsorolt módszerekkel az alábbi vizsgálatokban:

- Organikus szilícium vegyületek vizsgálata különböző bakteriális plazmidokon
- Illóolajok antimikrobás és antiplazmid hatásainak vizsgálata
- Thioridazin származékok antibakteriális hatásának meghatározása *M. tuberculosis* H37Rv törzsön BACTEC 450 respirometriás módszerrel
- Illóolajok Quorum sensingre gyakorolt hatása
- Illóolajok és komponenseik antiproliferatív hatásának tanulmányozása humán MDR1 génnel transzfektált egér limfóma sejtvonalon
- Illóolajok és komponenseinek hatása P-gp működésére; flowcytometriás vizsgálat rodamin 123-mal
- Illóolajkomponensek és citosztatikumok kölcsönhatása tumorsejteken *in vitro*; checkerboard módszer mikrotiter lemezben
- Négy kiválasztott illóolaj komponens apoptózisra gyakorolt hatásának tanulmányozása kettős fluoreszcens festéssel és annexin V-FITC módszerrel
- Anastasia Black (Orosz fekete paprika) kivonatainak rezisztenciamódosító hatásának vizsgálata egér limfóma sejteken, valamint a határos frakciók tartalmi meghatározása HPLC és LC-MS-MS módszerekkel

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### ANYAGOK

#### Növényi eredetű anyagok

- **Illóolajok:** narancs olaj (*Citrus sinensis* L., Myrtaceae), eukajiptusz olaj (*Eucalyptus globulus* L., Myrtaceae), édeskömény olaj (*Foeniculum vulgare* Mill., Lamiaceae) geranium olaj (*Geranium robertianum* L., Geraniaceae), boróka olaj (*Juniperus communis* L., Cupressaceae), borsosmenta olaj (*Mentha piperita* L., Lamiaceae), rozmaring olaj (*Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae), tisztított terpentín olaj (fenyő fajokból desztillált), kakukkfű olaj (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae), rózsa olaj (*Rosa damascena* L., Rosaceae), levendula olaj (*Lavandula angustifolia* L., Labiatae), kamilla olaj (*Matricaria recutita* L., Asteraceae). Ezek az illóolajok megfelelnek a hatályos Magyar Gyógyszerkönyv (Ph.Hg. VIII.) előírásainak, beszerzése a Phoenix Pharma Gyógyszerkereskedelmi Rt-től történt. Ausztrál teafa olaj (*Melaleuca alternifolia* Cheel, Myrtaceae). Előállítója a Main Camp Marketing Pty Ltd, Ballina, NSW, Ausztrália. Az illóolajok oldószere dimetil-szulfoxid.
- **Oregánó illóolajok:** *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart, termesztése a Budapesti Corvinus Egyetem Kísérleti Tangazdaságában történt, valamint a MTA vácrátóti Ökológiai és Botanikai Kutatóintézetében. Az illóolajok kivonása a SZTE Gyógyszerésztudományi Karának Farmakognóziái Intézetében történt.
- **Illóolaj komponensek:** A következő gázkromatográfiás standard komponensek kerültek vizsgálatra: *p*-cimén, eukajiptol, béta-kariofillén, karvakrol, limonén, linalool, alfa-pinén, béta-pinén, szabinén, alfa-terpinén, gamma-terpinén, borneol, kariofillén-oxid, timol, mentol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- **Orosz fekete paprika:** Szárított Anastasia Black (*Capsicum annuum* L. var. *angulosum* Mill., Solanaceae) paprikából kivonatok készültek hexánnal, acetonnal, metanollal és 70%-os metanollal. A kivonatok további frakcionálásra kerültek.

### Szintetikus vegyületek

- **Szerves szilícium vegyületek:** 1,3-Dimetil-1,3-bis(4-fluorofenil)-1,3-bis(3-morfolinopropil)-disiloxan-dihidroklorid (**Sila 409**) és, 1,3-Dimetil-1,3-bis(4-fluorofenil)-1,3-bis{3-[1(4-butil-piperazinil)]-propil}-disiloxan-tetrahidroklorid (**Sila 421**). A vegyületeket Hegyes Péter és munkatársai szintetizálták. A két vegyület szabadalma a következő számon került bejegyzésre: n<sup>o</sup> 0099150.6, PCT/DE00/04110
- **Tioridazin származékok:** a 14 különböző tioridazin vegyületet Hajós György és munkatársai állították elő (MTA Kémiai Kutatóközpont).
- **További vegyületek:** prometazin (Pipolphen, EGIS Nyrt., Budapest), penicillin (Biogal-Teva Pharma Rt., Budapest, Hungary), ampicillin (AMP), tetraciklin-hidroklorid (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), oxytetraciklin (OXY), gentamycin (GENT) (Chinoin/Sanofi-Synthelabo, Budapest), erythromycin (ERY) (Richter Gedeon Nyrt., Budapest), flukonazol (Diflucan, Pfizer, Amboise, Franciaország), dimetilszulfoxid (DMSO) (SERVA, Feinbiochemica, Heidelberg, Németország), és 3-(4,5-dimetilthiazil)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

### Baktériumkultúrák és sejtvonalak

- **Baktériumok:** *Escherichia coli* F'lac K12 LE140 (tsx, str, Δlac, su<sup>-</sup>, λ<sup>r</sup>, mal<sup>+</sup>), *E. coli* AG100 (proton pumpa hordozó) és *E. coli* AG 100<sub>A</sub> (acrAB deletált mutáns, Dr. H. Nikaido), *E. coli* AG100<sub>TET</sub> és *E. coli* AG 100<sub>A</sub><sub>TET</sub> tetraciklin rezisztencia indukált törzsek (8 μg/mL) (Amaral L.), *E. coli* AG100<sub>TET</sub> pBR322 és *E. coli* AG 100<sub>A</sub><sub>TET</sub> pBR322 (a tetraciklin rezisztens törzsek pBR322 plazmiddal transzformált izolátumai), *E. coli* P673 sertésből izolált nefropatogén törzs, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* (klinikai izolátum), *Chromobacterium violaceum* CV026 (Prof. Thomas J. Burr, Cornell University, Geneva, NY), *E. coli* ATCC 31298 és részben karakterizált Ezf 10/17, amelyet szőlő gyökérgolyvájából izoláltak
- **Gombák:** *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 14053, *Saccharomyces cerevisiae* 0425 52C (Grand, mitokondriummal rendelkező) és *S. cerevisiae* 0425 δ/1 (Petit, mitokondrium hiányos).
- **Daganatos sejtvonalak:** human MDR1 génnel transzfektált egér limfóma sejtek (MDR, L5178) és ennek szülői sejtvonala (PAR, L5178Y). Humán méhnyak adenokarcinóma sejtvonala (HeLa).

### Táptalajok, tápfolyadékok

- **Baktérium- és gomba tenyészetekhez**  
**LB (Luria-Bertani):** 0.5% élesztő kivonat, 1.0 % tripton, 1.0 % NaCl, 2.0 % agar;  
**MTE (Minimál Tripton-Élesztő):** 0.1 % NH<sub>4</sub>Cl, 0.7 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3 % NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0.2 % NaCl, 1.0 % tripton, 0.1 % élesztő kivonat, 1.5 % agar; **ezoin--metilénkék (EMB)** (BioMérieux): 3.6 % EMB; **TSB and TSA (Tryptic Soy Broth és Agar):** 3.0 % TSB, 2 % agar (Scharlau Chemie S.A. Barcelona, Spain); **ETB (Élesztő kivonat-Tryptone Broth):** 0.5 % élesztő kivonat, 1.0 % tripton, 0.5 % NaCl; **véres agar:** 4.42 % Columbia táptalaj (Biolab Rt., Hungary), 5.0 % steril defibrinált birkavér (Phylmaster Nyrt.); **2xETB (Élesztő Pepton, Dextróz):** 1.0 % élesztő kivonat, 2.0 % pepton, 2.0 % glükóz, 1.3 % citromsav, 1.4 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- **Tumorsejtekhez**

Tápfolyadék L5178 and L5178Y egér limfóma sejtekhez: módosított McCoy's 5A tápfolyadék (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)

A HeLa sejteket Eagle's MEM (Gibco BRL, Paisley, UK) tápfolyadékban tenyésztettük. A sejteket telített páratartalmú, 37°C-os 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó termosztátban tartottuk.

### **Antimikróbás hatás meghatározása**

Agar diffúzió: A baktérium és gomba előtenyészeteket fiziológias sóban hígítottuk, majd agar lemezekre szélesztettük. A lemezekbe 5 mm átmérőjű mélyedéseket készítettünk, és a vizsgálandó anyagokat ebbe mértük. Az antimikróbás hatást az inkubációt követően a keletkezett gátlási zónák alapján állapítottuk meg.

Minimális gátló koncentrációk meghatározása (MIC érték): A MIC értékeket 96 lyukú mikrotiter lemezen határoztuk meg. A vizsgálandó anyagokból felező hígításokat készítettünk, majd hozzáadtuk a baktérium- vagy gomba tenyészetek hígított szuszpenzióit. Inkubációt követően leolvastuk azt a legkisebb koncentráció értéket, ahol a növekedés teljes mértékben gátolt volt.

### **Plazmid elimináció vizsgálata**

Az *E. coli* F<sup>'</sup>lac K12 LE140 törzs éjszakai előtenyészetével MTE táplevest inokuláltunk, majd a vizsgált anyagok megfelelő hígításait a tenyészetekhez adtuk. Inkubációt követően a tenyészetek megfelelő hígításait eozin-metilénkék táptalajra szélesztettük, és 24 órán át inkubáltuk 37 °C-on. Ezt követően megszámloltuk a lac<sup>-</sup> és lac<sup>+</sup> telepeket, és meghatároztuk a plazmidelimináció százalékos arányát. Kísérleteinkben pozitív kontrollként prometazint használtunk. Az *E. coli* P673 törzs esetében a különbséget az előzőekhez képest az jelentette, hogy a kezelt kultúrát véres agarra szélesztettük, majd inkubációt követően a hemolitikus udvar alapján értékeltük a plazmid törölő hatást.

*E. coli* AG100<sub>TET</sub> pBR322 és *E. coli* AG 100A<sub>TET</sub> pBR322 törzsek antiplazmid hatását replica- plating módszerrel vizsgáltuk. A SILA 409 és SILA 421 anyagokkal kezelt baktérium tenyészeteket először antibiotikum mentes lemezre szélesztettük, majd a Lederberg-féle replica-plating módszerével antibiotikumot tartalmazó lemezekre vittük át a telepeket. Inkubációt követően a mesterlemezt és a „replica” lemezt összehasonlítva állapítottuk meg a plazmid eliminációt.

### ***E. coli* AG 100<sub>TET</sub> és AG 100A<sub>TET</sub> transzformációja pBR 322 plazmiddal**

*E. coli* AG 100<sub>TET</sub> és AG 100A<sub>TET</sub> baktériumokból éjszakai előtenyészetet készítettünk ETB táplevesben úgy, hogy a táptalaj mindkét baktériumtörzs esetében tartalmazott 8 µg/mL tetraciklint, *E. coli* AG 100A<sub>TET</sub> esetében a tetraciklin mellett 100 µg/mL kanamicint. Az előtenyészet 1 mL-ét 50 mL ETB tápleveshez adtuk, és további 4 órán át 37 °C-on inkubáltuk addig, hogy a kultúra optikai denzitása 0.25-0.30 közé essen 540 nm-es tartományban. A mintát jégen tartottuk 10 percig, majd centrifugáltuk 3500 rpm-en. A felülúszót eltávolítottuk, és a baktériumokat 0.1 M-os hideg MgCl<sub>2</sub> oldatban szuszpendáltuk fel. Újabb centrifugálást követően a sejtekhez hideg CaCl<sub>2</sub> oldatot adtunk, és a sejteket 0 °C-on tartottuk 1 órán át. 200 µL kompetens baktériumsejthez 5 µL tisztított pBR322 plazmidot adtunk, és 45 percig jégen tartottuk, amit 42 °C-os hősokk követett. A transzformált baktériumokat 37 °C -on tartottuk 1 órán át, centrifugáltuk, és antibiotikumot tartalmazó tápelemezre szélesztettük.

## **Checkerboard-módszer antibiotikumok/citosztatikumok és rezisztenciamódosítók kölcsönhatásának vizsgálatához**

A mikrodilúciós checkerboard-módszer alkalmas baktériumokon és tumorsejteken is különböző anyagok kölcsönhatásának kimutatására. Mikrotiter lemezben elkészítettük a vizsgálandó anyagok különböző hígításait úgy, hogy az anyagok egymásra merőleges oszlopok és sorok találkozásánál különböző koncentrációban legyenek jelen, tehát minden mélyedésben más módon legyenek jelen a koncentrációk kombinációi. A lemezeket baktériumokkal/tumorsejtekkel inokuláltuk, és inkubáltuk 37°C-on 24 óráig a baktériumok esetében, és 37 °C-on 5.0 %-os CO<sub>2</sub> atmoszférában 72 órán keresztül a tumorsejtek esetében. Ezt követően a mintákhoz 20 µL MTT oldatot (5 mg/mL) adtunk, és újabb inkubációt követően nátrium-dodecil szulfát oldattal oldottuk fel a keletkezett kristályokat. Az anyagok baktériumokra és tumorsejtekre gyakorolt hatását az optikai denzitások mérése (Dynatech MRX ELISA reader) után határoztuk meg. Meghatároztuk az egyes anyagok frakcionális gátló koncentrációját (FIC érték), és kiszámoltuk a FIC indexet a következő képlet alapján: FIC<sub>A</sub> + FIC<sub>B</sub>, ahol A az antibiotikum/citosztatikum, B a vizsgált anyag.

$$FIC_A = \frac{\text{MIC}_A \text{ kombinációban}}{\text{MIC}_A \text{ egyedül}} \quad FIC_B = \frac{\text{MIC}_B \text{ kombinációban}}{\text{MIC}_B \text{ egyedül}}$$

A tumorsejtek esetében a MIC értékek helyére az ID<sub>50</sub> értékek helyettesítendőek be.

A FIC értékek alapján az anyagok kölcsönhatását a következőképpen kategorizáltuk: szinergizmus (<0.5), additív kölcsönhatás (0.5-1.0), indifferens (>1), antagonizmus (>4.0).

## **Quorum sensing (QS) mechanizmusok gátlása**

A vizsgált baktériumok autoinducer-képzését a *Chromobacterium violaceum* CV026 bioszenzor törzs segítségével vizsgáltuk. Ez a törzs lila színű pigmentet termel rövid szénláncú autoinducerek (N-acil-homoszerin laktonok, AHL) jelenlétében. *E. coli* ATCC 31298 és az ezerfürtű szőlő gyökérgolyvájából izolált Ezf 10/17-es AHL termelő törzseken végeztük a vizsgálatokat. A QS gátló vegyületeket agardiffúziós módszerrel tanulmányoztuk oly módon, hogy LB agarlemez felszínére az AHL termelő törzsből és a szenzor törzs előtenyészetéből párhuzamos csíkokat szélesztettünk egymástól 5mm-es távolságra, és a vizsgált anyagok oldataival átitatott papírkorongot a kiszélesztett baktériumokra helyeztük. Pozitív kontrollként akridin narancsot és 5-fluorouracilt használtunk. A QS-gátló hatást a lila pigment jelenléte vagy hiánya alapján állapítottuk meg.

## **Thioridazin és származékainak antibakteriális vizsgálata *M. tuberculosis* H37Rv törzsön BACTEC 460 radiometriás módszerrel**

A vizsgálandó anyagokat tartalmazó mintákat a baktérium (*M. tuberculosis* H37Rv) 10<sup>5</sup> és 10<sup>6</sup> telepformáló egységével inokuláltuk. A baktériumtenyészeteket Middlebrook 7H9 táplevesben növesztettük. Az előtenyészetből a McFarland szerinti 0.5-ös denzitású hígítást alkalmaztuk. Az inokulált minták a thioridazin származékok 0.0-20.0 mg/mL koncentrációját tartalmazták. A mintákat 37 °C-on inkubáltuk, és baktériumok anyagcsere folyamatai során <sup>14</sup>C palmitinsavból keletkezett <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> mennyiségét Bactec 460 készülékkel mértük. Ennek mennyisége alapján számoltuk a MIC értékeket.

## **Multidrog rezisztencia visszafordítása daganatsejteken**

A kísérletekhez humán MDR1 génnel transzfektált egér limfóma sejteket és a szülői sejt vonalat használtuk. Az MDR sejt vonalat 60 ng/mL kolhicin jelenlétében tenyésztettük a rezisztens fenotípus megőrzése érdekében. Az L5178 MDR sejt vonalat és a szülői sejt vonalat McCoy's 5A tápfolyadékban tenyésztettük 10 % inaktivált lószérum jelenlétében. A sejtek denzitását 2x10<sup>6</sup>/mL-re állítottuk be, és 0.5 mL-ként Eppendorf csövekbe mértük. A sejteket a vizsgálandó anyagokkal 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Rodamin 123 hozzáadása

után 20 perces inkubáció következett 37 °C-on. A sejtek mosását követően, azok fluoreszcenciáját áramlási citométerrel mértük meg, kísérleteinkben pozitív kontrollként a verapamil szerepelt. A fluoreszcencia értékekből fluoreszcens aktivitási hányadost számoltunk a következő képlet szerint, amelyben az egyes kontroll és kezelt minták fluoreszcencia értéke szerepel:

$$\text{Fluoreszcens aktivitási hányados} = \frac{\text{MDR kezelt} / \text{MDR kontroll}}{\text{Szülői kezelt} / \text{szülői kontroll}}$$

### **LC-MS-MS módszer fenolos vegyületek meghatározásához**

Anasztasia Black paprika kivonataiban lévő fenolos vegyületeket határoztunk meg folyadékkromatográfiával kombinált tömegspektrométerrel. A méréseket API 3000 háromszoros quadrupol tömegspektrométerrel végeztük (TurboIonspray forrás mellett) A kromatográfiás elválasztás Prodigy ODS3 100 Å oszlopon történt. A következő komponenseket vizsgáltuk: feruloil-glükopiranozid, szinapoil-glükopiranozid, quercetin-rhamnopiranozid-glükopiranozid, luteolin-glükopiranozid-arabinopiranozid, apigenin-glükopiranozid-arabinopiranozid, quercetin-rhamnopiranozid, luteolin-(furanozil-glükopiranozil-malonil)-glükopiranozid, heszperidin, feruyl alcohol-(methylhydroxypropionyl)-glükopiranozid, luteolin-arabinopiranozid-diglükopiranozid, luteolin-glükuronid, ferulasav, szinapinsav, quercetin, luteolin és apigenin.

### **Anasztasia Black kivonatainak vizsgálata HPLC módszerrel**

A fekete paprika kivonatainak karotenoid tartalmát vizsgáltuk HPLC módszerrel. Az elválasztás Devosil RP Aqueous C30 kolonnán történt. Az eluensek a következők voltak: (A) 0.004 % ammónium-acetát (oldószer: MeOH) és (B) *terc*-butil-metil éter. A gradiens program az alábbiak szerint futott: 85-70 % B (5 perc), 70-60 % B (5 perc), 60-45 % B (5 perc), 45 % B isocratic (20 perc), 45-20 % B (5 perc), and 20-85 % B (5 perc), konstans, 1 mL/perces áramlás mellett. A dektektálás hullámhossza 453 nm, az injektált térfogat 20 µL volt. Pozitív kontrollként béta-karotint és luteint használtunk.

### **Illóolajok apoptózisra gyakorolt hatása**

#### Apoptózis vizsgálata áramlásos citométerrel

Kísérleteinkhez pozitív kontrollként az apoptózist indukálni képes 12*H*-benzo[ $\alpha$ ]phenotiazint (M627) használtuk. Az L5178 egér limfóma sejteket a vizsgálandó anyagokkal kezeltük, 24 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a sejteket mostuk, és kötőpufferben reszuszpendáltuk. Újabb mosást követően adtuk a mintákhoz az Anexin-V oldatát. 10 percig szobahőmérsékleten sötétben inkubáltuk a mintákat, majd mosást követően kötőpuffert adtunk a sejtekhez. A fluoreszcencia mérése előtt probidium-jodidot adtunk a mintákhoz. A sejtek fluoreszcens aktivitását áramlási citométerrel határoztuk meg, és a különböző sejtciklushoz tartozó populációkat winMDI2.8 szoftverrel értékeltük ki.

#### Apoptózis vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával HeLa sejteken

Az akridin-narancs/etidium-bromid kettős festéssel az élő, korai valamint késői apoptotikus és nekrotikus sejteket lehet elkülöníteni. A festés során az akridin-narancs áthatol az intakt membránon, és a sejtmagot homogén zöldre festi élő sejtekben, míg korai apoptózis esetén a sejtmag granulált zöldre festődik. Az etidium-bromid csak a fokozott permeabilitású sejtmembránon halad át, és a sejtmagot pirosra festi. A morfológiai paramétereket 24 óras kezelés után HeLa sejteken vizsgáltuk.



## EREDMÉNYEK

### **Szerves szilíciumvegyületek antibakteriális és antiplazmid hatásai**

Két szerves szilícium vegyületet (Sila 409 és 421) vizsgáltunk *E. coli* törzsek különböző plazmidjain. *E. coli* K12 LE 140 F'lac plazmidján, *E. coli* P673 hemolizin-plazmidján, és tetraciklin rezisztencia-indukált *E. coli* AG100 és AG100A pBR322 plazmiddal transzformált törzsein történtek a plazmidtörlést célzó vizsgálatok. A legkifejezettebb antiplazmid hatás a K12 LE 140 törzs F'lac plazmidján mutatkozott, mert a Sila 409 87,85 %-ban, míg a Sila 421 83,75 %-ban okozott plazmideliminációt. A nefropatogén *E. coli* P673 törzsen a Sila 421 9,72 %-ban eredményezett nem hemolizáló telepeket, ami a pCW2 eliminációjával magyarázható. A pBR322 plazmid eliminációját „replica palting” módszerrel vizsgáltuk a fenti törzseken. Alacsony előfordulási gyakorisággal volt kimutatható a plazmidelimináció (28,9-6,7 %).

### **Illóolajok antimikrobás és antiplazmid hatásai**

A gyógyászatban alkalmazott tíz illóolaj hatásait vizsgáltuk baktériumokon és sarjadzó gombákon. Az antimikrobás hatás tekintetében a kakukkfű olaj emelkedett ki, és ez a hatás a timol összetevőjének tulajdonítható. A továbbiakban az antibakteriális hatással rendelkező illóolajokat tanulmányoztuk *E. coli* K12 LE140 törzsen plazmid eliminációra. Ez a kísérlet a rezisztencia plazmid törlését hivatott modellezni. Pozitív kontrollként prometazint alkalmaztunk. Eredményeink azt mutatták, hogy a borsosmenta olajjal történő kezelés jelentős arányban eredményez *lac*<sup>-</sup> telepeket. A borsosmenta illóolajának legfőbb komponense a mentol, amely 325 µg/mL koncentrációnál 96 %-os eliminációt hozott létre. Prometazinnal kombinálva a mentol antiplazmid hatása még kifejezettebb volt. Az említett baktériumtörzsen a borsosmenta olaj és a mentol antibakteriális hatását is vizsgáltuk antibiotikumokkal kombinálva. Additív hatás volt kimutatható a menta olaj és oxytetraciklin, valamint a mentol és oxytetraciklin között.

### ***Origanum vulgare* ssp. *hirtum* illóolajának antimikrobás hatása**

Magyarországon termesztett szurokfű (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*, Link, Ietswaart) négy vonalának illóolaj összetételét vizsgáltuk, és antimikrobás hatását ennek függvényében. Az összetétel meghatározása gázkromatográfiás és tömegspektroszkópiás módszerrel a SZTE Gyógyszerésztudományi Karának Farmakognóziái Intézetében történt. Megállapítható volt, hogy mindegyik vonal illóolaja a Pasquier-féle karvakrol csoportba sorolható, hiszen ez a komponens volt mindegyik estben a meghatározó. Az antibakteriális és gombaellenes hatásokban nem mutatkozott jelentős különbség, az *E. coli* AG100 és AG100A törzsek érzékenységében tapasztaltunk különbséget. A protonpumpával nem rendelkező AG100A törzs esetében a MIC értékek jelentősen alacsonyabbak voltak a vad törzshöz képest. Ennek magyarázata az lehet, hogy az antibakteriális hatásban protonpumpa működéssel összefüggő mechanizmusok játszanak szerepet.

### **Illóolaj komponensek antimikrobás és antiplazmid hatásai**

A komplex illóolajok hatásának feltérképezése érdekében a bennük leggyakrabban előforduló illóolaj komponenseket vizsgáltuk. 14 illóolaj komponens MIC értékeit határoztuk meg baktériumokon és sarjadzó gombákon, majd *E. coli* K12 LE140 törzsen F'lac plazmid eliminációs hatásukat tanulmányoztuk. Az antimikrobás hatások mellett a karvakrol (45,5%) és a linalool (61,2%) rendelkezett antiplazmid hatással.

### **Illóolajok quorum sensing-re (QS) gyakorolt hatása**

Agardiffúziós módszerrel vizsgáltuk különböző illóolajok QS-re gyakorolt hatását oly módon, hogy a *C. violaceum* szenzor törzs pigment termelését figyeltük az illóolajok jelenlétében a QS szignált termelő törzs mellett (*E. coli* ATCC 1298 és Ezf 10/17). Pozitív kontrollként akridin-narancsot és 5-fluorouracilt használtunk. A geránium olaj és a rózsaolaj gátolta a legnagyobb mértékben a QS választ, de a rozmaryng- és levendulaolaj is mutatott gátló hatást. Ezen hatások jelentősége abban állhat, hogy modellezi új lehetséges antibiotikumok hatásmechanizmusát, amelyek rezisztens bakteriális fertőzésben nyerhetnek alkalmazást. A QS mechanizmusok gátlása ugyanis szelektív támadáspontot jelenthetnek új antibakteriális szerek fejlesztésénél.

### **Tioridazin-származékok vizsgálata *M. tuberculosis* H37Rv törzsön BACTEC 460 radiometriás módszerrel**

A fenotiazin vázas vegyületek *in vitro* antibakteriális hatással rendelkeznek *M. tuberculosis* antibiotikum érzékeny- és rezisztens törzsein. A korábbi kísérletekben a klórpromazin kapta a legnagyobb figyelmet, de mellékhatásai nagymértékben korlátozzák *in vivo* felhasználását a fertőzőes megbetegedések kiegészítő terápiájában. A tioridazin kedvezőbb mellékhatás profilja miatt alkalmasabb lehet erre a célra, bár az antibakteriális kemoterápiában alkalmazandó dózis jóval a klinikailag megfelelő tartomány felett lenne. A tioridazin képes felhalmozódni az alveoláris makrofágokban, ami szintén előnyös az antituberkulotikus terápiában. Munkánk során 14 különböző módon szubsztituált tioridazin származékot vizsgáltunk *M. tuberculosis* H37Rv törzsön BACTEC 460 respirometriás módszerrel. Célunk a vegyületek MIC értékeinek meghatározása volt. Eredményeink azt mutatták, hogy az alkalmazott koncentráció tartományban az anyagok csekély antibakteriális hatással rendelkeznek, vizsgált vegyületek közül három közelítette meg az alapvegyület antibakteriális hatását.

### **Illóolaj komponensek antiproliferatív és multidrog rezisztenciamódosító hatásai egér limfóma sejteken**

A korábban baktériumokon és gombákon tesztelt illóolaj komponenseket tumor sejteken vizsgáltuk. Antiproliferatív hatásukat határoztuk meg elsőként egyedül, majd citosztatikummal (doxorubicin) kombinációban humán MDR1 génnel transzfektált sejtvonalon. Szinergizmus volt megfigyelhető az  $\alpha$ -terpinén és a doxorubicin között, a többi komponens esetében a kölcsönhatás additív vagy semleges volt.

Az anyagokat rodamin akkumulációs teszttel vizsgáltuk a Pgp okozta efflux gátlásának meghatározására. A rodamin akkumulációját emelte az eukaliptol,  $\alpha$ -terpinén, borneol és timol, de a sejten bekövetkező strukturális változások, amelyekről az FSC és SSC értékek alapján tudtunk következtetni, arra utalnak, hogy a komponensek az adott koncentrációban toxikusak lehetnek.

### **Anasztasia Black kivonatok biológiai hatásai és kémiai analízise**

Orosz fekete paprika (*Capsicum annuum* L. var. *angulosum*, Mill., Solanaceae) hexánnal, acetonnal, metanollal és 70%-os metanollal készült kivonatai további elválasztásra kerültek oszlopkromatográfiás eljárással, majd a kivonatok és frakciókat humán MDR1 génnel transzfektált egér limfóma sejteken vizsgáltuk rodamin akkumulációs teszttel. A hexánnal és acetonnal készült kivonatokból előállított további frakciók okoztak fokozott rodamin akkumulációt a verapamil kontrollal összehasonlítva.

Acetonnal, metanollal és 70%-os metanollal készült kivonatok és azok frakciói további analízisre kerültek, fenolos összetevőiket határoztuk meg LC-MS-MS és HPLC módszerekkel. LC-MS-MS módszerrel 16 különböző vegyületet mutattunk ki, a luteolin-

glükuronid és luteolin-arabinopiranozid-diglükopiranozid elsőként került kimutatásra IDA (information dependent acquisition) és MRM (multiple reaction monitoring) analízissel. A legkarakterisztikusabb összetevő a kivonatokban a kvercetin-ramnopiranozid volt. HPLC módszerrel a kivonatok karotenoid összetevőit vizsgáltuk. Standard-ként luteint és  $\beta$ -karotént alkalmaztunk. Az acetonos kivonatban kimutatható volt a lutein, de a frakciókban már nem jelentkezett. Az alacsony karotenoid kimutathatóság annak tulajdonítható, hogy a kivonási eljárás nem kedvezett a karotenoid összetevők stabilitásának.

### **Illóolaj komponensek apoptózist indukáló hatása**

Áromlások citometriával Annexin V-probidium-jodid jelenlétében vizsgáltuk a humán MDR1 génnel transzfektált egér limfóma sejtkeben a DNS fragmentációt az illóolaj komponensekkel történő előkezelést követően. A sejtciklus G1 fázisa előtt felszaporodó szubG1 populációt, mint apoptotikus populációt, és a korai apoptotikus, késői apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát határoztuk meg. Eukaliptol,  $\beta$ -pinén,  $\alpha$ -terpinén és borneol esetében az apoptotikus sejtek aránya 5,32-8,93 % között változott.

A négy illóolaj komponenssel előkezelt humán méhnyak karcinóma (HeLa) sejteket akridin-narancs és etidium-bromid fluoreszcens festékekkel jelöltük, és az apoptózisra jellemző morfológiai jellemzőket figyeltük. Sejtsugorodás, a sejtmembrán permeabilitásának növekedése, sejtmag granuláció volt megfigyelhető a borneollal előkezelt sejteken.

## **DISZKUSSZIÓ**

A disszertáció fő célja a rezisztencia visszafordításának tanulmányozása prokarióta és eukarióta modelleken természetes eredetű anyagokkal és kémiai szintetizált vegyületekkel. Potenciális rezisztenciamódosító vegyületeket vizsgáltunk baktériumokon és sarjadzó gombákon, hogy meghatározzuk az anyagok antimikrobás és antiplazmid hatásait. Továbbá tumorsejteken tanulmányoztuk multidrog rezisztenciára gyakorolt hatásukat.

SILA 409 és SILA 421-es szerves szilícium vegyületekről korábbi kísérletek bebizonyították, hogy tumorsejteken képesek a rezisztencia visszafordítására. Vizsgálatainkban a baktériumok növekedésére és különböző plazmidokra kifejtett hatásukat tanulmányoztuk. Mindkét vegyület kifejezett antibakteriális és antiplazmid hatást mutatott.

Számos illóolajról és komponenseiről bizonyították, hogy antimikrobás hatással rendelkeznek. Az antimikrobás hatás mellett célunk volt tanulmányozni különböző illóolajok antiplazmid hatását is. A borsmenta olaj és legfontosabb összetevője, a mentol mutatta a legkifejezettebb antiplazmid hatást. A plazmidokra gyakorolt hatás alapján arra következtethetünk, hogy az illóolajok prokaryota sejtekre gyakorolt hatása komplexebb annál, hogy csak a sejtmembránnal való kölcsönhatásukkal magyarázzuk antibakteriális hatásukat. Az *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* illóolajainak antimikrobás hatása is kifejezett volt. A négy típus hatásában megfigyelhető hasonlóság valószínűleg az összetételbeli hasonlóságban rejlik, amelyet a gázkromatográfiás vizsgálatok támasztanak alá. A négy vonal illóolajainak legfőbb komponense a karvakrol, amely szintén rendelkezik antiplazmid hatással.

A sejtek közötti kommunikációnak óriási jelentősége van mind a prokarióta mind az eukarióta világban. A baktériumok közötti kommunikáció egyik legfőbb eszköze az ún. quorum sensing. Ezen mechanizmusokat támadva specifikus célmechanizmusokat találhatunk, amelyek elősegíthetik új antibiotikumok fejlesztését. Kísérleteinkben illóolajok hatását vizsgáltuk a QS szignálmolekulák szintézisére, és azt tapasztaltuk, hogy a rózsa és geránium olajok *in vitro* képesek voltak gátolni a szignálmechanizmusokat.

Anastasia Black (Orosz fekete paprika) kivonatainak rezisztenciára gyakorolt hatását vizsgáltuk Pgp-t expresszáló egér limfóma sejteken rodamin exklúziós teszttel, majd a hatások frakciókat analizáltuk LC-MS-MS és HPLC módszerekkel. Megfigyeléseink szerint az aktív hatóanyagok valószínűleg fenolos vegyületek lehetnek.

Az apoptózist indukáló és MDR gátló hatás a gyógyszerkutatás szempontjából két értékes tulajdonság. Az illóolajok komponensei közül kiválasztott anyagok kis mértékben indukáltak apoptózist, amely a borneol esetében 24 órás inkubációt követően volt a legmarkánsabban megfigyelhető.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Prof. Dr. Molnár Józsefnek** Ph.D. tanulmányaim során nyújtott iránymutatásáért és támogatásáért.

Köszönöm **Prof. Dr. Mándi Yvettenek**, hogy a SZTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunológiai Intézetében végezhettem kutatómunkámat a doktori képzés keretein belül.

Hálával tartozom **Prof. Dr. Hohmann Juditnak**, **Varga Erzsébetnek** és **Veres Katalinnak** a gyógynövényekkel kapcsolatos munkák során nyújtott segítségükért, a közös munkákért, **Prof. Leonard Amaralnak** és **Marta Martinsnak**, **Prof. Vincenzo Foglianonak** a külföldi tanulmányutak során szerzett szakmai tapasztalatokért. Köszönöm **Prof. Szegedi Ernőnek** a quorum sensing vizsgálata során nyújtott segítségét, irányítását.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani közvetlen munkatársaimnak: **Dr. Molnár Annamáriának**, **Dr. Spengler Gabriellának**, **Vigyikánné Váradi Anikónak**, **Dr. Engi Helgának**, **Dr. Gyémánt Nórának**, **Szabó Ágnes Mírának**, **Varga Zoltán Gábornak** és az Orvosi Mikrobiológiai és Immunológiai Intézet dolgozóinak.

Köszönöm Dr. Ocsovszy Imrének az áramlási citometriás méréseket.

Köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, hogy bátorítottak, és mindig mellettem álltak.

Munkámat a következő szervezetek támogatásával végeztem: **Szegedi Rákkutatásért Alapítvány**, Richter Gedeon Centenárium Alapítvány, COST B16, FEMS (Federation of European Microbiological Societies).

## FÜGGELÉK

### Értekezés alapját képező közlemények

I **Schelz Z**, Molnar J, Hohmann J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 2006, 77: 279-285. IF: 0.908

II **Schelz Z**, Molnar J, Hohmann J. Növényi illóolajok antimikróbás és antiplazmid hatása. *Orvostudományi Értesítő*, 337, 2005, 78: 579-583.

III Veres K, Varga E, **Schelz Z**, Molnar J, Bermáth J, Máthé I. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of four lines of *Origanum vulgare* subs. *hirtum* (Link) Ietswaart grown in Hungary. *Natural Product Communications*, 2007, 2:1-4.

IV **Schelz Z**, Molnar J, Fogliano V, Ferracane R, Pernice R, Shirataki Y, Motohashi N. Qualitative analysis of MDR-reversing Anastasia Black (Russian Black Sweet Pepper, *Capsicum annuum*, Solanaceae) extracts and fractions by HPLC and LC-MS-MS methods. *In vivo*, 2006, 20:651-656. IF: 1.273

V Shirataki Y, Kawase M, Sakagani H, Nakashima H, Tani S, Tanaka T, Sohara Y, **Schelz Z**, Molnar J, Motohashi N. Bioactivities of Anastasia Black (Russian Black Sweet Pepper). *Anticancer Research*, 2005, 25:1991-2000. IF: 1.479

VI **Schelz Z**, Molnar J, Motohashi N, Shirataki Y. Anastasia Black kivonatok multidrog rezisztencia módosító hatásai. *Orvostudományi Értesítő*, 337, 2004, 77: 256-261.

VII Martins M, **Schelz Z**, Martins A, Molnar J, Hajos G, Riedl Z, Viveiros M, Yalcin I, Aki-Sener E, Amaral L. In vitro and ex vivo activity of thioridazine derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents*, 2007, 29: 338-340. IF: 2.221

VIII **Schelz Z**, Martins M, Amaral L, Hajós G, Molnar J. Thioridazine-származékok antibakteriális hatása *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv törzsön. *Orvostudományi Értesítő* 337, 2006, 79: 558-560.

IX Spengler G, Molnar A, **Schelz Z**, Amaral L, Sharples D, Molnar J. Mechanism of plasmid curing in bacteria. *Current Drug Targets*, 2006, 7:823-841. IF: 4.274

X. **Schelz Z**, Martins M, Martins A, Viveiros M, Amaral L. Elimination of plasmids by SILA compounds that inhibit efflux pumps of bacteria and cancer cells. *In vivo*, 2007, 21: 635-640. IF: 1.273

### Egyéb kivonatok

**Schelz Z**, Molnar J, Hohmann J. Illóolajok antimikróbás és antiplazmid hatásai, Magyar Kemoterápiás Társaság XVI. Nagygyűlése, 2002. június 7-8., Szeged

**Schelz Z**, Molnar J, Hohmann J. Antimikrobiális hatások vizsgálata növényi olajokkal, Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2002. október 8-10., Balatonfüred

**Schelz Z**, Molnár J, Motohashi N, Shirataki Y. Anastasia black kivonatok multidrog rezisztencia módosító hatásai. A Magyar Kemoterápiás Társaság XVIII. Kongresszusa, 2004. január 22-24., Budapest

**Schelz Z**, Molnár J, Motohashi N, Shirataki Y. Multidrug Resistance Reversal Activity of a Fruit vegetable, Anastasia Black Extracts, 15<sup>th</sup> International Congress on Anti-Cancer Treatment, 9-12 February, 2004. Paris, France

**Schelz Z**, Molnár J, Veres K, Varga E, Máthé I. A szurokfű (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) illóolajának kémiai és mikrobiológiai vizsgálata. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2004. október 7-9. Keszthely

**Schelz Z**, Molnár J, Hohmann J. Antimicrobial Activity of Volatile Oils, ECC & RICAI 2004., 1-3rd December, 2004. Paris, France

**Schelz Z**, Molnár J, Hohmann J. Növényi illóolajok antimikrobás és antiplazmid hatása, Erdélyi Múzeum Egyesület Orvos- és Gyógyszerésztudományi Szakosztály, XV. Ülésszak, 2005. április 13-17. Marosvásárhely, Románia

Veres K, **Schelz Z**, Varga E, Máthé I. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Origanum vulgare* subs. *Hirtum* (Link) Ietswaart, 53rd Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, 21-25th August, 2005. Florence, Italy

Veres K, **Schelz Z**, Varga E, Bernáth J, Máthé I. The evaluation of the essential oil content in *Origanum* species (*Origanum vulgare* L. and *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum* Ietswaart), János Lippay-Imre Ormos-Károly Vas Scientific Session, 19-21st October, 2005. Budapest

**Schelz Z**, Molnar J, Ferracane R, Fogliano V. Biological activities of Coneflower (*Echinacea purpurea* L. Mönch) CO<sub>2</sub> supercritical extracts on human MDR1 gene-transfected mouse lymphoma cells. 17th International Congress on Anti-Cancer Treatment. 30th January-2nd February, 2006, Paris, France.

**Schelz Z**, Hohmann J, Veres K, Varga E, Molnar J. Biological activities of essential oils. European Conference on the Reversal of Multidrug Resistance from Bacteria to Cancer cells and Parasites, Closing Conference of the COST Action B16, 22-25th April, 2006. Budapest

**Schelz Z**, Martins M, Amaral L, Hajós Gy, Molnár J. Tioridazin-származékok antibakteriális hatása *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv törzsön. Erdélyi Múzeum Egyesület Orvos- és Gyógyszerésztudományi Szakosztály, XVI. Ülésszak, 2006. április 27-29. Csíkszereda, Románia

**Schelz Z**, Molnar J, Fogliano V, Ferracane R, Pernice R, Shirataki Y, Motohashi N. Qualitative analysis of MDR-reversing Anastasia Black (Russian black sweet pepper, *Capsicum annuum*, Solanaceae) extracts and fractions by HPLC and LC-MS-MS methods. Mediterranean Congress of Chemotherapy, 25-27th June, 2006. Catania, Italy

**Schelz Z**, Veres K, Varga E, Molnar J. Biological activities of essential oil components. 8<sup>th</sup> European Congress of Chemotherapy and Infection, 26-28th October, 2006. Budapest

**Schelz Z**, Veres K, Varga E, Molnar J. Reversal of multidrug resistance by essential oil components on human MDR1 gene-transfected mouse lymphoma cells. 19th International Congress on Anti Cancer Treatment. 5-8 February, 2008, Paris, France.