

37. Országos Tudományos Diákköri Konferencia

Biológia szekció

A kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumok hatékonyak a polimixin B rezisztens baktériumtörzsekkel szemben

Szerző neve: Kurkó Eszter

Biológia szak MSc II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Témavezetők neve: Prof. Dr. Pál Csaba

Dr. Czikkely Márton Simon

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Szeged

2025

Tartalomjegyzék

I.Bevezetés.....	3
1. Az antibiotikum rezisztencia molekuláris mechanizmusai	4
1.1 Az antibiotikumok inaktiválása	4
1.2 Membrán permeabilitás csökkentése.....	5
1.3 Antibiotikumok aktív transzportja efflux pumpák által	6
1.4 A célmolekula megváltoztatása	6
1.4 A célmolekula túltermelése	7
1.5 A célreakció megkerülése.....	7
2. Az antibiotikum rezisztencia evolúciója	7
3. Jelenlegi klinikai fejlesztés alatt álló antibiotikumok	8
4. A jövő antibiotikumai hajlamosak a rezisztenciára Gram-negatív kórokozók esetében .	10
II. Célkitűzések	13
III. Anyagok és módszerek.....	13
1. Az alkalmazott baktérium törzsek, antibiotikumok és tápoldatok.....	13
2. Minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása.....	15
3. A baktériumok túlélésének mérése antibiotikum kezelést követően	15
IV. Eredmények	16
1. A polimixin B rezisztens baktériumtörzsek nem mutatnak keresztrezisztenciát kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumokkal szemben	16
2. A kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumok csoportján belül nem jellemző a keresztrezisztencia	18
3. A legjobb ölési kinetikát az SCH79797 kettős célpontú permeabilizáló antibiotikum mutatta mindhárom vizsgált baktériumfaj esetében.....	20
V. Diskusszió	21
VI. Köszönetnyilvánítás	23
VII. Irodalomjegyzék	24

I.Bevezetés

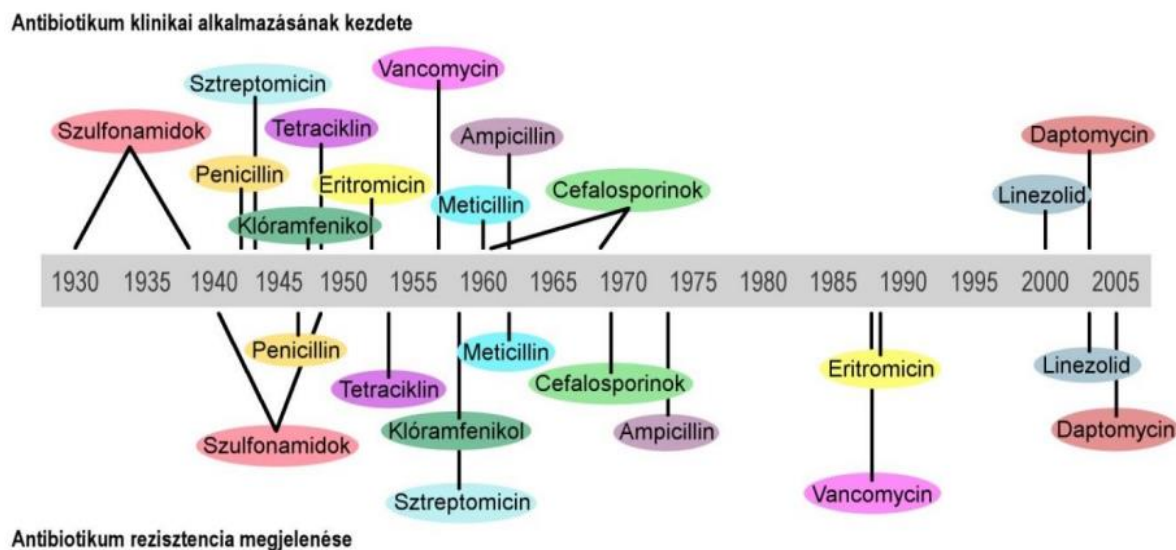
Az antibiotikumok a modern orvostudomány egyik legjelentősebb eredményei, és az elmúlt több mint 60 évben számtalan életet mentettek meg.¹ Manapság a fejlett országokban magától értetődőnek tartjuk az antibiotikumok létezését, de a Thomas Mann regényeiben megjelenő bakteriális fertőzések jól példázzák, milyen súlyos és kezelhetetlenek voltak ezek a betegségek az antibiotikumok felfedezése előtt. A *Halál Velencében* című műben kolerával, a *Varázshegy*-ben tuberkulózissal, míg a *Doktor Faustus*-ban szifilisszel és akut bakteriális agyhártyagyulladással találkozunk. A fertőzött betegek meghaltak, és az orvosok tehetetlenek voltak a beavatkozásban.²

A huszadik század elején történt felfedezésük óta, az antibiotikumok forradalmasították a fertőző betegségek kezelését globális szinten.³ Az első antibiotikum, a penicillin, mérföldkőnek számított, amely lehetővé tette a korábban halálosnak ítélt betegségek kezelését.⁴

Az antibiotikumok aranykorának nevezett időszakban számos új antibiotikumot fejlesztettek ki, a legtöbbjük napjainkban is használatban van.⁵ Bakteriális fertőzések kezelésén túl, az antibiotikumok lehetővé tették számos orvosi beavatkozás végrehajtását, beleértve a rákterápiás kezeléseket, invazív sebészeti beavatkozásokat, mint a szívműtétek, szervátültetések, így jelentősen hozzájárultak a fertőzések miatti halálozási arány csökkenéséhez.⁶

Azonban az aranykor nem tartott sokáig, a baktériumok és az antibiotikumok közötti evolúciós fegyverkezési verseny elkezdődött: minél gyakrabban használták az antibiotikumokat, annál kevésbé voltak hatékonyak. Az antibiotikumok támadására válaszul a baktériumok védekező mechanizmusokat fejlesztettek, túléltek, így váltak napjaink mikrobiológiájának meghatározó problémájává, antibiotikum rezisztenssé.⁷ A szulfonamidok és penicillin bevezetése óta minden új antibiotikum használatát követően klinikailag jelentős rezisztencia alakult ki, gyakran már néhány év elteltével (1. ábra).⁸ Mindez ahhoz vezetett, hogy az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2001-ben globális problémaként nevezte meg az antibiotikum rezisztenciát, amely sürgős beavatkozást igényel. Azóta csak tovább romlott a helyzet, a WHO adatai alapján 2019-ben az antibiotikum rezisztencia 4,95 millió ember halálát okozta.⁹

Számos tanulmány hívja fel a figyelmet arra a veszélyre, hogy egy poszt-antibiotikum korszak fele tartunk, ahol a 20. században felfedezett gyógyszerekkel korábban könnyen kezelhető fertőzések a 21. században már nem lesznek hatékonyan gyógyíthatók.¹⁰



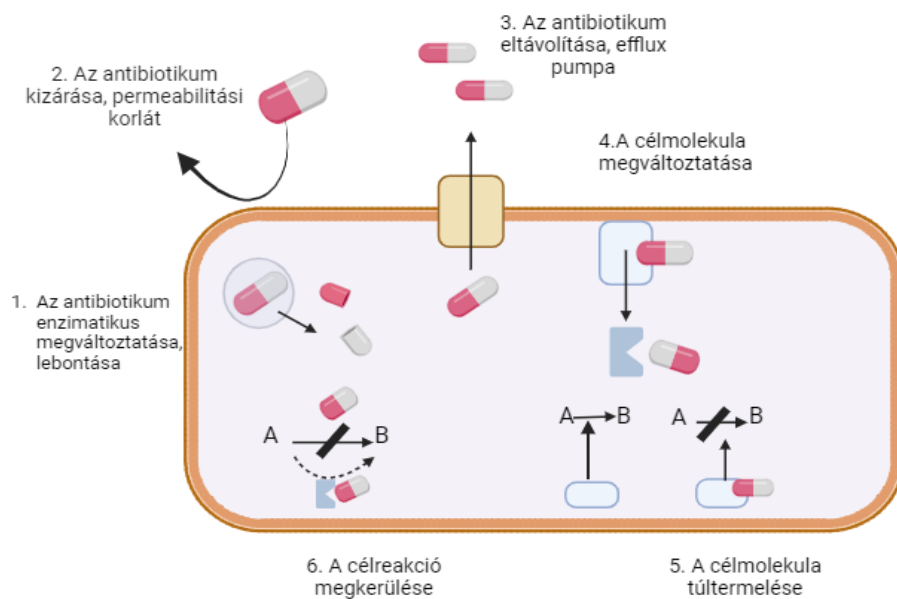
1.ábra. Az antibiotikumok megjelenésének és a rezisztencia kialakulásának idővonala. Az idővonal fölött az egyes antibiotikumok bevezetésének éve, míg az idővonal alatt a rezisztencia megjelenése van feltüntetve⁸

1. Az antibiotikum rezisztencia molekuláris mechanizmusai

Az antibiotikumok olyan kis molekulású (<1000 dalton) szerves kémiai anyagok, amelyek lehetnek természetes vagy szintetikus eredetűek, és gátolják (bakteriosztatikus), vagy elpusztítják (baktericid) a kórokozó baktériumokat különböző mechanizmusokon keresztül.¹¹ Ezért nem meglepő, hogy ezen erős szelekciós nyomásra adott válaszként a baktériumok is számos antibiotikum rezisztencia mechanizmust alakítottak ki (2. ábra).¹²

1.1 Az antibiotikumok inaktíválása

Számos patogén baktériumban elterjedt rezisztenciamechanizmus az antimikrobiális szer inaktíválása, amelynek során a gyógyszer szerkezete sérül vagy lebomlik, csökkentve annak hatékonyságát. Ez általában a baktériumok által termelt lebontó enzimek segítségével valósul meg, így nem szükséges a bakteriális sejt esszenciális alkotóelemeinek megváltoztatása, ami jelentős fitness költséggel járhat.¹³ Az enzimatis inaktiváció megvalósulhat hidrolízissel, vagy egy újabb kémiai csoport hozzáadásával. Mindkét mechanizmus elterjedt, mivel a legtöbb lebontó enzim a környezetben élő mikrobákból származik és mobilis elemeken terjed.^{13,14}



2. ábra. A legfontosabb antibiotikum rezisztencia mechanizmusok. (Spohn, 2018 nyomán)¹²

Az antibiotikumok inaktiválásának egyik példája, amikor a béta-laktám antibiotikumokat, (pencillinek, cefalosporinok, carbapenemek, monobactamok) a béta-laktamáz enzimek bontják le az amidkötés hidrolízisével, ezzel hatástalanná téve a gyógyszert.^{13,15}

Az antibiotikumok inaktiválásának másik példája, amely kémiai csoportok átvitelén alapszik, aminoglikozidok esetében gyakori, acetiltranszferázok, foszfortranszferázok végzik, amelyek a gyógyszer hidroxil- vagy aminocsoportjait változtatják meg, csökkentve az antibiotikum célponthoz való kötődését.¹³

1.2 Membrán permeabilitás csökkentése

Ahhoz, hogy egy antibiotikum kitudja fejteni hatását elsősorban át kell jutnia a baktérium sejtfalán, ami főként a Gram-negatív baktériumok esetén kettős akadályt jelent a sejtfal külső membránja és a sejtmembrán jelenléte miatt. A külső membrán egy foszfolipidekből álló kettős réteg, amely külső rétegében a szokásos membránlipidek helyett lipopoliszacharidokat (LPS) tartalmaz.

Az LPS réteg minden szerves molekula sejtbe történő bejutását képes megnehezíteni, emiatt permeabilitási gátat képez a baktériumsejt körül. Az LPS-en kívül a külső membrán számos fehérjét tartalmaz, például porin fehérjét, amelyek lehetővé teszik a kis molekulatömegű anyagok, valamint sejt fennmaradásához szükséges molekulák sejtbe jutását.¹⁴⁻¹⁶

Az antibiotikum rezisztens baktériumok képesek megváltoztatni a külső membránfehérjék expresszióját, így azok nem tudnak beépülni a membránba, vagy a porin csatornák funkcióját rontják el permeabilitást csökkentő mutációk által.¹⁴

Azonban a külső membrán permeabilitása nagymértékben változik baktériumfaj függő módon. Például olyan kritikus prioritású kórokozók, mint a *Pseudomonas aeruginosa*, és *Acinetobacter baumannii*, több specifikus porin csatornával rendelkezik, amelyek csak kis molekulák bejutását engedik, emiatt membránjuk átjárhatósága rendkívül alacsony, ellehetetlenítve a hidrofил antibiotikumok átjutását.¹³ Az *Escherichia coli* esetében a porinok szerkezeti változása, például a pórus töltésének módosítása, vagy szűkítése gátolja az antibiotikumok bejutását.¹³

1.3 Antibiotikumok aktív transzportja efflux pumpák által

A baktériumok nemcsak azt akadályozzák meg, hogy az antibiotikumok bejussanak a sejtbe, hanem képesek aktívan kijuttatni őket efflux pumpák által. Az efflux pumpák transzmembrán fehérjék, amelyek a protonomotoros erőt felhasználva, különböző antibiotikumokat szállítanak a sejtből a környezetbe.¹⁷ Az antibiotikumok eltávolítása a bakteriális sejtől csökkenti a gyógyszer koncentrációját, ami ezáltal hatástalanná válik és nem avatkozik be a bakteriális sejtfunkciók működésébe.¹² Egyes efflux pumpák többféle struktúrájú antibiotikumot is képesek kipumpálni, ezáltal multidrog rezisztenciát (MDR) okozva.¹⁸ Sok efflux pumpa klinikai szempontból releváns, mivel túltermelődésük képes olyan szintű rezisztencia kialakítására, hogy az addig hatékonyan alkalmazott antibiotikum teljesen hatástalanná válik a fertőzésekkel szemben.¹⁹ Az is előfordul, hogy egy-egy efflux pumpa önmagában nem okoz rezisztenciát, csak más rezisztencia mechanizmusokkal együtt, mint például a fluorokinolon rezisztencia esetén.²⁰ A tetraciklin rezisztencia legelterjedtebb mechanizmusa az efflux pumpák által valósul meg.²¹

1.4 A célmolekula megváltoztatása

Az antibiotikumok általában erősen kötődnek célmolekuláikhoz megakadályozva azok normál működését. Ha azonban a célmolekula szerkezete megváltozik olyan módon, hogy az antibiotikum kötődése kevésbé legyen hatékony, de a célmolekula továbbra is képes legyen ellátni feladatát, a baktérium rezisztenssé válhat az adott szerrel szemben.²² Ez a mechanizmus különösen problémás lehet, mert a baktérium így képes tovább működni, míg a kezelés hatástalan lesz. Ezen szerkezeti módosulások gyakran pontmutációk révén jönnek létre, amelyek megváltoztatják a célmolekula azon részeinek aminosav sorrendjét, amelyekhez az

antibiotikum kötődne. Az ilyen változások egyik példája a béta-laktámokkal szembeni rezisztencia, ahol a baktériumok penicillin-kötő fehérjeinek módosulásai csökkentik az antibiotikum hatékonyságát.²²

1.4 A célmolekula túltermelése

Az antibiotikum dózisa, amelyet a szervezetbe juttatnak, csak egy korlátozott mennyiségű célmolekulával képes kölcsönhatásba lépni. Ezért a célmolekula túltermelése egy hatékony rezisztencia mechanizmus, mivel az antibiotikumok mennyisége nem elegendő a megnövekedett számú célmolekula gátlásához.¹³ Ezt a mechanizmust jól példázza a szulfonamid és trimetoprim rezisztencia, ahol a baktériumok túltermelik azokat az enzimeket, amelyeket ezek az antibiotikumok céloznak meg, így a gyógyszerek nem tudják hatékonyan gátolni a bakteriális anyagcsere folyamatokat.²³

1.5 A célreakció megkerülése

A célreakció megkerülése egy olyan stratégia, amelynek során a baktérium egy alternatív utat alakít ki, amely lehetővé teszi, hogy az eredeti célmolekula feleslegessé váljon az antibiotikum számára.¹³ Ezt az alternatív utat általában egy új gén révén hozza létre, amely biztosítja a szükséges biokémiai funkciókat, de nem érintett az antibiotikum hatásmechanizmusában. Például olyan antibiotikumok esetében, mint a trimetoprim és a szulfonamid, a baktériumok alternatív folsavszintézist érintő enzimeket termelhetnek, amelyek nem érzékenyek az antibiotikumra, így megkerülik az antibiotikum által célzott enzim blokkolását és fenntartják a sejt életképességét.²⁴

2. Az antibiotikum rezisztencia evolúciója

A rezisztencia mechanizmusainak sejt szintű tárgyalása után szükséges megértenünk miként fejlődhetnek és terjedhetnek ezek a mechanizmusok a bakteriális populációk szintjén.

A baktériumok rendelkeznek természetes, intrinszik rezisztenciával számos antibiotikummal szemben, ennek alapja lehet egy strukturális tulajdonság, mint például az előbbieken tárgyalt Gram-negatív baktériumok külső membránja.¹⁸ A természetes rezisztencia jelenléte is aggodalomra ad okot, viszont a baktériumok mutációk és a rezisztencia gének horizontális géntranszfere révén, szerzett rezisztenciára is szert tudnak tenni.¹⁸ A rezisztencia gének átvitelének két mechanizmusa lehetséges: vertikális-, valamint az imént említett horizontális

géntranszfer.²⁵ A vertikális géntranszfer egy hagyományos sejtosztódás révén történő génröklődés, amelynek során az utódsejtek megkapják a szülősejt DNS-ét, benne bármilyen antibiotikum rezisztenciát kódoló mutációval. Horizontális géntranszfer során a gének nem generációkon keresztül adódnak át, hanem különböző baktériumok között közvetlenül cserélődnek, lehetővé téve a gyors genetikai változást, valamint az antibiotikum rezisztencia gyors terjedését.²⁵

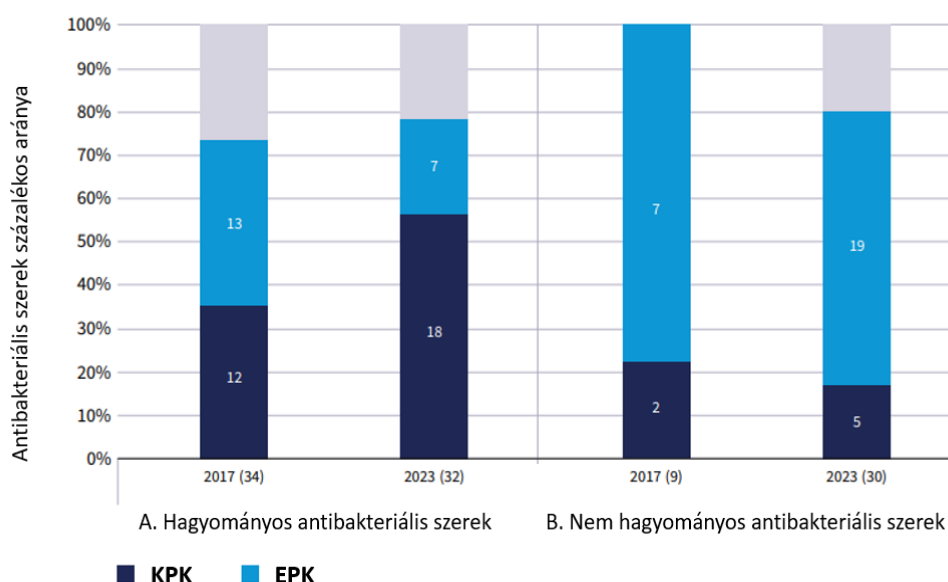
Az antibiotikumok használata óta kialakult rezisztenciaproblémákat az okozza, hogy a patogének horizontális géntranszfer révén megszerezték a meglévő rezisztenciagéneket. Mind vertikális, mind horizontális evolúció során az antibiotikumok jelenléte szelekciós nyomást jelent, amely előnyhöz juttatja a rezisztens baktériumokat, kiszorítván az érzékeny törzseket, így gyorsítva a rezisztencia terjedését a baktériumpopulációkban.²⁶

3. Jelenlegi klinikai fejlesztés alatt álló antibiotikumok

Sajnos egyre több baktérium válik rezisztenssé, és egyre több antibiotikummal szemben mutatnak csökkent érzékenységet, miközben az új hatásmechanizmusú antibiotikumok fejlesztése egyre lassabb ütemben halad.²⁷ A WHO 2023-as jelentése szerint 97 antibiotikum van klinikai I-III fázisú vizsgálat alatt, amelyekből 32 antibiotikum célozza a WHO prioritási listáján szereplő kritikus kórokozókat (*A. baumannii*, *P. aeruginosa* és az *Enterobacteriaceae* család tagjai: *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*)⁹. Ebben a tanulmányban kizárólag ezeknek a kórokozóknak a rezisztencia profiljaira fogok összpontosítani a fejlesztés alatt álló antibiotikumokkal szemben. Ezen antibiotikumok közül mindössze 18 antibiotikumról van egyértelmű bizonyíték, hogy korábban hatékonynak bizonyult legalább egy kritikus prioritású kórokozóval szemben.⁹ Ezek többsége béta-laktám vagy béta-laktám/béta-laktamáz inhibitor (BLI) kombináció. Mivel ezek kombinációs szerek, a velük szembeni rezisztencia kialakulása sajátos mechanizmusokon alapul, emiatt ennek vizsgálata nem része a jelenlegi tanulmánynak, de a jövőbeni kutatásaink célja lesz. Fejlesztésük viszont azért kapott kiemelt figyelmet, mert számos Gram-negatív baktérium béta-laktamáz enzimet termel, amelyek hatástalanítják a béta-laktám antibiotikumokat. Mivel a Gram-negatív baktériumok különösen súlyos fertőzéseket okoznak, és gyakran multidrog-rezisztens törzseik nehezen kezelhetők, jogos és szükséges, hogy a fejlesztési erőfeszítések jelentős része ellenük irányul. Ezt követik a polimixinek (SPR-206, MRX-8, QPX9003), majd a klasszikus antibiotikum osztályok származékai, mint például az apramicin-szulfát (aminoglikozid származék), zifanociklin (tetraciklin származék).

Érdemes megemlíteni a gepotidacin (GEP) és zoliflodacin (ZOL) antibiotikumokat, mindkettő 3. fázisban lévő topoizomeráz gátló, viszont új kémiai struktúrával rendelkeznek, új hatásmechanizmust alkalmaznak az eddigi fluorokinolonokhoz képest (ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, delafloxacin),^{9,28} valamint nem mutattak keresztrezisztenciát a fluorokinolon rezisztens klinikai izolátumokkal.²⁹ Ez a példa szemlélteti, hogy nem a *de novo* rezisztencia kialakulásának elkerülése orientálja az antibiotikumok fejlesztését, hanem a keresztrezisztencia tulajdonságok, alacsonyabb toxicitású készítmények bevezetése.

Annak ellenére, hogy a legnagyobb innovációs lehetőségek a nem hagyományos antibakteriális szerekben, például a bakteriofágokban, enzimekben, antitestekben és immunmodulátorokban rejlenek, aggasztó tény, hogy ezekre a megoldásokra kevesebb fejlesztés irányul, mint a hagyományos antibakteriális szerekre, ami komoly bizonytalanságot vetít előre a jövő fertőzéseinek kezelésében (3. ábra).



3.ábra. A hagyományos (A) és a nem hagyományos (B) antibakteriális szerek aránya a kritikus (KPK) és egyéb (EPK) prioritású kórokozók ellen a klinikai fejlesztésekben.⁹

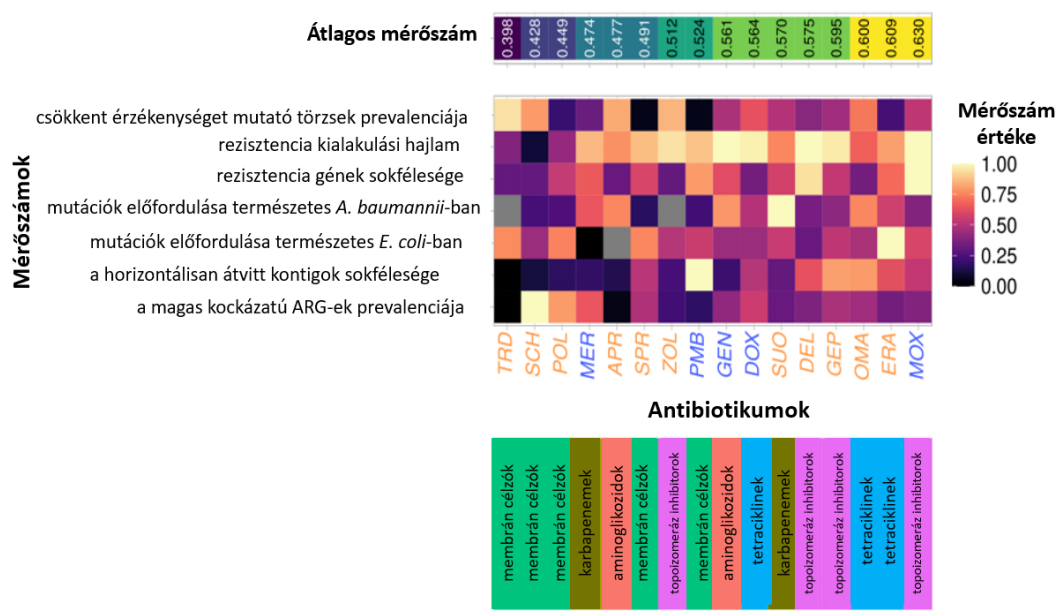
Kim Lewis (2020) egy jelentős tanulmányában az antibiotikumok fejlesztésének nehézségeit vizsgálta, különös figyelmet fordítva a Gram-negatív baktériumokkal szembeni kihívásokra. Ezeknek a baktériumoknak a sejtfelszínét egy negatív töltésű LPS réteg borítja, amely hatékonyan akadályozza meg a nagy, hidrofób molekulák bejutását. Emellett a belső, pozitív töltésű foszfolipid kettős réteg és a membránfehérjék védelme gátolja a hidrofil molekulák áthatolását, létrehozva egy szinte áthatolhatatlan védőgátat.³⁰ A kutatás arra a következtetésre

jutott, hogy a baktériumok külső membránja kulcsfontosságú célpontként szolgálhat az új antibiotikumok számára, mivel a hatékony kezelés alapja az, hogy a molekulák képesek legyenek áthatolni ezen a védelmi rendszeren.³⁰

4. A jövő antibiotikumai hajlamosak a rezisztenciára Gram-negatív kórokozók esetében

Egy korábbi kutatásban laboratóriumi evolúciós kísérletek (ALE), a rezisztencia gyakoriságának elemzése (FoR) és metagenomikai vizsgálatok segítségével tanulmányoztuk a jelenleg fejlesztés alatt álló antibiotikumok rezisztencia profilját.

Az eredmények azt mutatták, hogy a rezisztencia a kritikus prioritású Gram-negatív kórokozók esetében általában gyorsan, néhány nap alatt kifejlődik az új antibakteriális vegyületekkel szemben.²⁹ Az ilyen laboratóriumi környezetben keletkezett, rezisztenciát biztosító nem-szinonim mutációk, klinikai szempontból is jelentősnek bizonyultak, mivel gyakran előfordulnak klinikai izolátumok genomjában. A probléma feltárása érdekében a fejlesztés alatt álló antibiotikumokkal kapcsolatban egy rezisztenciaterképet készítettünk, amely rangsorolja az antibiotikumokat különböző rezisztencia indikátorok figyelembe vételével (4. ábra).²⁹



4.ábra. Rezisztencia térkép a munka során használt fejlesztés alatt álló antibiotikumokra.²⁹ A hőterkép különböző mutatókat jelenít meg: 1) csökkent érzékenységet mutató törzsek prevalenciája – a kiválasztott kórokozó csoportban szereplő baktérium törzsek

aránya, amelyek magas kezdeti minimális gátló koncentrációval (MIC) rendelkeznek 2) rezisztencia kialakulási hajlam – az adaptív laboratóriumi evolúció (ALE) és a spontán kialakuló rezisztencia gyakoriságának (FoR) elemzése alapján 3) a mutációkat hordozó gének sokfélesége 4-5) a természetes *A.baumannii* vagy *E.coli* törzsekben előforduló mutációk prevalenciája – a laboratóriumban megfigyelt adaptív mutációk azon aránya, amelyek már jelen vannak a természetes *A. baumannii* és *E. coli* törzsekben; 6) a horizontálisan átvitt kontigok¹ sokfélesége – az egyedi DNS-fragmentumok száma antibiotikumonként, három metagenomikai könyvtárban szereplő összes kontig számmal normalizálva 7) a magas kockázatú antibiotikum-rezisztencia gének (ARG) prevalenciája – az ARG-k azon hányada, amelyeket magas kockázatúnak minősítettek, ha teljesítették a három egészségügyi kockázati kritérium közül legalább kettőt (génmobilitás, az emberi mikrobiomokban való jelenlét, és a bakteriális gazdaszervezet patogenitása), az egyes antibiotikumoknál észlelt összes ARG között. A szürke szín hiányzó értéket jelöl, mivel a vizsgált fajok már kezdeti rezisztenciával rendelkeznek. Az antibiotikumok az átlagos mérőszám értékek alapján vannak rendezve, a kék és narancssárga színek a kontroll és az újabb antibiotikumokat jelölik, valamint a hőtésképp alatti panel az elemzett antibiotikumok osztályát jelzi.²⁹

Ahogy az elemzésből is látszik, a membrán célzó antibiotikumok, közülük is a Tridecaptin M152-P3 (TRD), SCH79797, és POL7306 a legkevésbé hajlamosak a rezisztencia kialakulására, valamint Kim Lewis munkája is azt mutatja, hogy ezek az antibiotikumok hatékonyak voltak egérfertőzős kísérletekben.³⁰

A TRD tud kötődni az LPS-hez, permeabilizálva a külső membránt, valamint a lipid II-höz, amely létfontosságú a bakteriális sejtmembrán bioszintéziséhez. Lipid II kötésén keresztül apró pórusokat hoz létre a belső membránon, emiatt befolyásolja a protongrádiens.³² Az SCH79797 közvetlenül aktiválja a baktériumok nagy vezetőképességű mechanoszenzitív csatornáját, az MscL-t, ezáltal membránkárosodást és permeabilizációt eredményez, és emellett gátolja a folát bioszintézisét.³³

A POL7306 peptid alapú antibiotikum, amely szerkezeti és funkcionális hasonlóságot mutat a polimixin B-vel (PMB), hatásmechanizmusa abban rejlik, hogy ki tud kötődni az LPS-hez, és

¹ kontig: egy DNS szekvencia, amelyet több átfedő DNS-fragmentum összekapcsolásával állítanak össze a genom szekvenálása során.

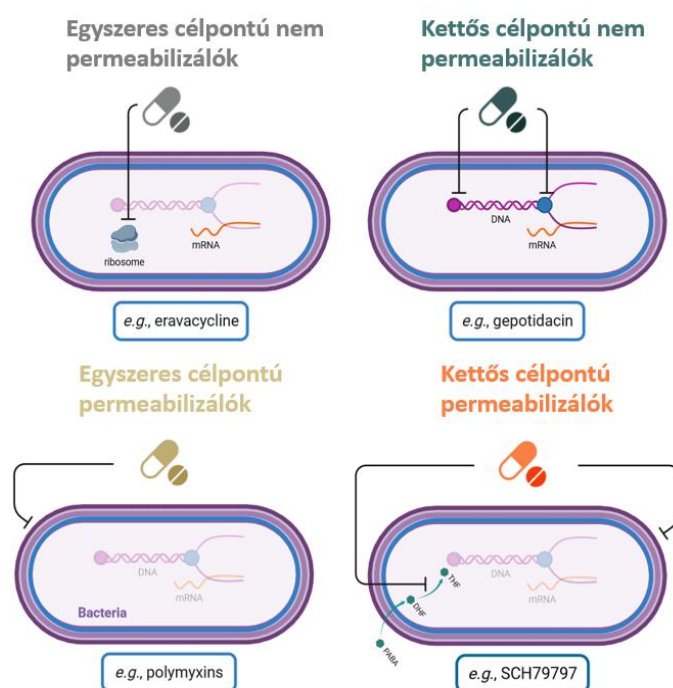
egy külső membránfehérjéhez, BamA-hoz, amelynek szerepe van béta-hordó fehérjék hajtogatásában és beillesztésében a Gram-negatív baktériumok külső membránjába.³¹

Antibiotikumok csoportosítása hatásmechanizmusaik alapján

Ezek alapján, jelen munkában két szempont szerint osztályoztuk az antibiotikumokat, melyeket az előző munka során is használtunk: egyrészt a sejten belüli célpontjuk, másrészt a sejtmembránnal való kölcsönhatásuk alapján (5. ábra).

Az első csoportba, olyan egyszeres célpontú antibiotikumok tartoznak, amelyek nem képesek károsítani a bakteriális membránt (egyszeres célpontú nem permeabilizálók), ide tartoznak a tetraciklinek, aminoglikozidok, karbapenemek klasszikus csoportjaiban lévő antibiotikumok. A második csoportba tartoznak a topoizomeráz inhibitorok, amelyek két homológ intracelluláris helyet céloznak meg a bakteriális sejten belül, viszont nem permeabilizálják a membránt (kettős célpontú nem permeabilizálók).

A harmadik csoportot a peptid alapú antibiotikumok képviselik, melyek egy általános membrán-lízis mechanizmuson keresztül hatnak (egyszeres célpontú permeabilizálók). Végül az utolsó csoportba tartoznak azok az unikális mechanizmusú antibiotikumok, amelyeknek két célpontjuk is van és ebből legalább egy a bakteriális membrán (kettős célpontú permeabilizálók): célozzák a membránt és valamilyen sejtes folyamatot gátolnak, ilyen például az imént említett TRD, SCH79797, POL7306,.



5.ábra. Antibiotikum osztályok csoportosítása sejten belüli hatásuk és membránnal való interakciójuk alapján. (forrás: saját ábra biorender)

II. Célkitűzések

Ismerve, hogy a Gram-negatív kórokozók esetében az új fejlesztés alatt álló antibiotikumokra rövid időn belül rezisztencia alakul ki, de a kettős hatásmechanizmusú, permeabilizáló antibiotikumok ígéretesek a rezisztenciával szembeni ellenálló képesség szempontjából, célul tűztem ki ezen szerek (TRD, SCH79797, POL7306) vizsgálatát. Ezzel részletesebb képet szerettem volna kapni hatékonyságukról és potenciális rezisztenciával szembeni ellenálló képességükről.

Továbbá jelen munkám célja, hogy feltárjam az egyszeres (SPR-206, PMB, kolisztin) és kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumok közötti keresztrezisztencia kialakulásának lehetőségét. Ezen antibiotikumok hasonló hatásmechanizmusa miatt, valamint a polimixin antibiotikumok (egyszeres célpontú permeabilizálók) széleskörű alkalmazása következtében kialakult polimixin rezisztens baktériumtörzsek jelenléte miatt különösen fontos megérteni, hogy van-e keresztrezisztencia közöttük. Emellett a baktériumokra gyakorolt ölési kinetikájukat is szerettem volna összehasonlítani ezen antibiotikumoknak, mivel feltételezhető, hogy az ölésben lévő különbségekben lehet a rezisztencia hiányának forrása.

III. Anyagok és módszerek

1. Az alkalmazott baktérium törzsek, antibiotikumok és tápoldatok

Baktérium törzsek. A kísérletek során négy klinikai szempontból releváns, patogén baktériumtörzset vizsgáltunk, amelyek mindegyike az American Type Culture Collection (ATCC) törzsgyűjteményéből származik: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 10031, *A. baumannii* ATCC 17978 és *P. aeruginosa* ATCC BAA-3107. Ezek a törzsek antimikrobiális szerekkel szemben érzékeny vonalak, amelyeket széles körben alkalmaznak az antimikrobiális aktivitás vizsgálatokban.

Annak érdekében, hogy meghatározzuk, hogy az egyszeres célpontú permeabilizáló antibiotikumhoz korábbi munka során²⁹ adaptált vonalak milyen mértékben mutatnak keresztrezisztenciát a kettős célpontú, permeabilizáló hatású antibiotikumokkal szemben, 12 polimixin B rezisztens vonalat használtunk, amelyek ALE módszerrel lettek előállítva. Az ALE

során a baktériumokat hosszú távon polimixin B jelenlétében növesztették, amely lehetővé tette a rezisztens vonalak kialakulását. Ezek a vonalak különböző mértékű rezisztenciát mutattak a polimixinekkel és más antibiotikumokkal szemben, amely lehetőséget adott a keresztrezisztencia mechanizmusainak vizsgálatára. Minden vizsgált fajból három függetlenül evolválódott vonalat vizsgáltunk, beleértve az *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* és *P. aeruginosa* fajokat.

A következő keresztrezisztenciát vizsgáló kísérlet során fordított megközelítést alkalmaztunk: arra voltunk kíváncsiak, hogy a kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumokhoz adaptált baktériumvonalak milyen mértékben mutatnak keresztrezisztenciát az egyszeres célpontú permeabilizáló és a kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumokkal szemben. Ehhez a kísérlethez összesen 15, különböző kettős célpontú antibiotikumokhoz adaptált vonalat használtunk, ezek közül hat Tridecaptin M152-P3-hoz, három SCH79797-hoz és hat POL7306-hoz adaptált vonal, amelyek szintén az ALE kísérletből származnak. A *K. pneumoniae*, *E. coli*, *A. baumannii* fajokból kettő vagy három függetlenül evolválódott vonalat vizsgáltunk.

Antibiotikumok. A kísérletek során hat antibiotikumot alkalmaztunk, amelyek különböző antibiotikumosztályokból származnak, azonban közös jellemzőjük, hogy mindegyik képes permeabilizálni a bakteriális sejtmembránt. Négy közülük újonnan fejlesztett antibiotikum (POL7306, SCH79797, TRD, SPR-206), amelyek jelenleg különböző klinikai vizsgálati fázisokban vannak. A másik két antibiotikum, a polimixin B és a kolisztin (COL), hagyományos antibiotikumok, amelyek évtizedek óta használatosak a klinikai gyakorlatban, különösen a multidrog-rezisztens Gram-negatív baktériumok elleni küzdelemben.

Az antibiotikumkészletek előállítását követően minden oldatot szűrővel sterilizáltunk a kontamináció elkerülése érdekében, majd -20°C -on tároltuk a felhasználásig. Az antibiotikumok stabilitásának fenntartása érdekében ezen tárolási hőmérséklet kulcsfontosságú volt, mivel biztosította a molekulák aktivitásának és szerkezetének megőrzését a kísérletek megkezdéséig.

Táptalaj. A munkánk során minden kísérletben kationnal módosított Mueller-Hinton Broth 2 (MHB, Millipore) táptalajt használtunk, amelyet az EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) és CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) irányelvek alapján a minimális gátló koncentráció (MIC) mérésére ajánlanak. Ez a táptalaj

általánosan alkalmazott a mikrobiológiai tesztek során, mivel optimális körülményeket biztosít a legtöbb baktérium növekedéséhez és különböző antibiotikumok hatásának vizsgálatához.

2. Minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása

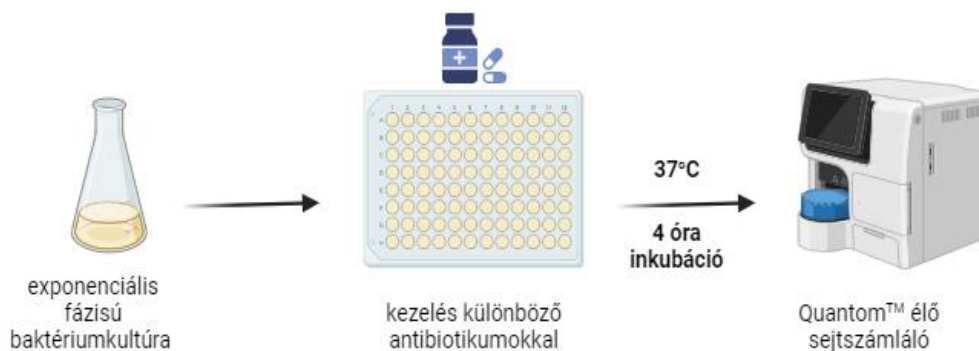
Az MIC az a legkisebb antibiotikum-koncentráció, amely egy adott izolátum esetében még képes megakadályozni a baktérium növekedését szigorúan szabványosított körülmények között. Az MIC-értékek meghatározásához standard folyadékhígítási módszert alkalmaztunk: a megadott antibiotikumokkal kétszeres hígítási sorozatot végeztünk 96 lyukú mikrotiter lemezekben. Minden lyukba 5×10^5 sejt/mL koncentrációban oltottunk be baktériumokat 100 μ L táptalajjal. A lemezeket 37°C-on, folyamatos rázással (300 RPM) inkubáltuk 18 órán keresztül. A sejtnövekedést optikai denzitás méréssel (OD600, Biotek Synergy mikrotiterlemez olvasó) követtük nyomon, és az MIC-t teljes növekedésgátlásként definiáltuk (OD600 < 0,05). Az antibiotikum-érzékenység vizsgálatát két technikai és két biológiai ismétlésben végeztük. A relatív MIC változást a következőképpen számoltuk ki: MIC (evolált)/MIC (ős).

3. A baktériumok túlélésének mérése antibiotikum kezelést követően

Ezen kísérlet során a baktériumkultúrákat antibiotikumoknak tettük ki 96-lyukú lemezekben, majd 4 órás antibiotikumokkal (MIC*10 koncentrációt használva) való kitettség után az élő sejtek számát a sejtek fluoreszcens festésével, majd QUANTOM™ sejtszámláló segítségével határoztuk meg (6. ábra).

Ezt a kísérletet az alábbi lépéseket követve végeztük: **(1) baktériumtörzsek előkészítése:** A baktérium törzseket egy éjszakán át növesztettük MHB táptalajban, 37 °C-on, 160 rpm-en. Az éjszakai kultúrákat 1:1000 arányban hígítottuk 30 mL MHB-ben és 37 °C-on 160 rpm-en inkubáltuk, amíg az optikai denzitás (OD) 0,25 értéket elérte, ami a baktériumkultúra exponenciális növekedési fázisát jelenti. **(2) antibiotikumok előkészítése:** 96-lyukú lemezeket 235 μ L MHB-vel töltöttünk meg, és antibiotikumokat adtunk hozzá. Minden antibiotikumot a MIC tízszeresének megfelelő dózisban használtuk, három párhuzamos ismétléssel. **(3) antibiotikum kezelés:** Ezt követően a baktériumkultúrákat a 96-lyukú antibiotikumos lemezekbe adagoltuk (15 μ L kultúra; össztérfogat 250 μ L) körülbelül 10^7 kolónia formáló egység (CFU) sűrűséggel. Ez az inokulum sűrűség megfelel az ajánlott klinikai tesztelési szabványoknak a baktérium ölési kísérletekhez³⁴. Minden lemezen kijelöltünk egy vagy két sor üres kontroll, az egyik sorban növekedési kontroll volt antibiotikum nélkül, a másik baktérium nélküli kontroll volt a szennyeződés ellenőrzésére. A baktériumokat 4 órán át inkubáltuk 37 °C-

on, ami elegendő időt biztosított a legtöbb baktérium számára, hogy jelentős populációcsökkenést mutasson. **(4) élő sejtek meghatározása:** A négy órás kezelés után a baktériumsejteket QUANTOM™ Viable Cell Staining Dye fluoreszcens festékkel kezeltük. A sejtek életképességét QUANTOM™ Tx Microbial Cell Counter segítségével mértük, amely lehetővé tette a fluoreszkáló sejtek pontos kvantifikálását.



6.ábra. A baktériumok túlélésének mérése Quantum™ élő sejszámláló segítségével.
(forrás: saját ábra biorender)

IV. Eredmények

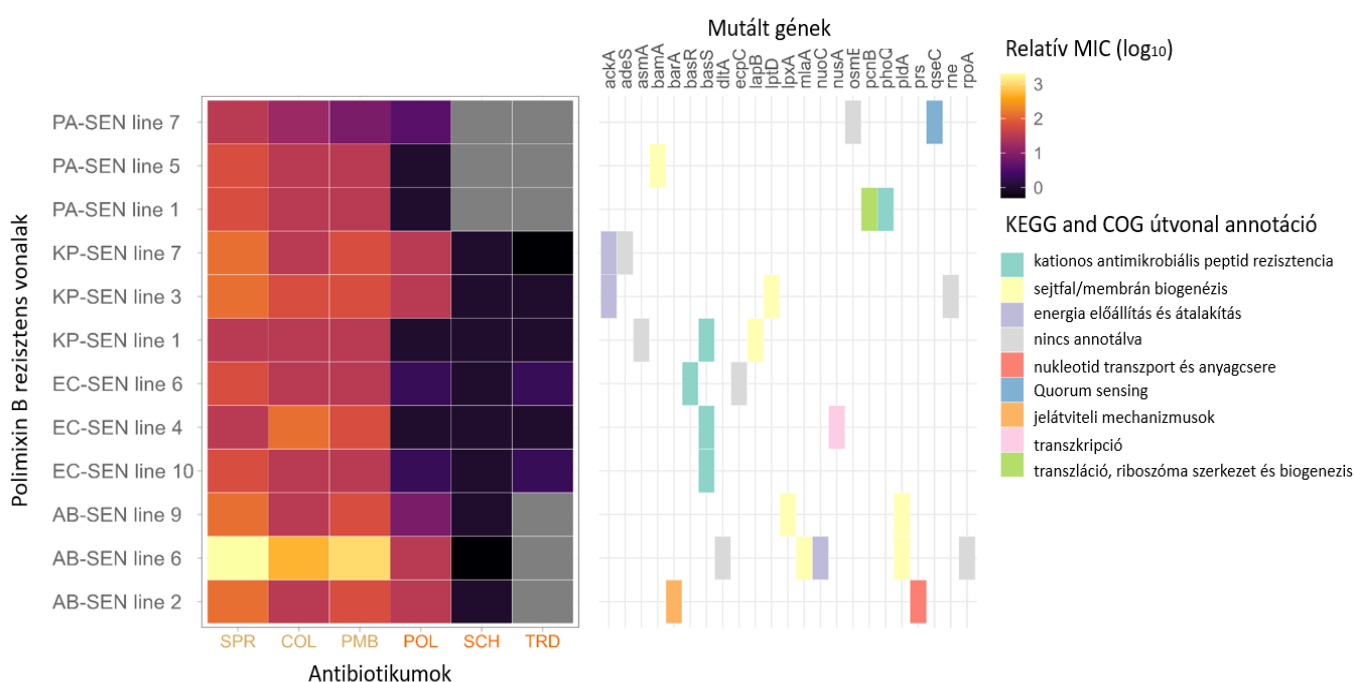
1. A polimixin B rezisztens baktériumtörzsek nem mutatnak keresztrezisztenciát kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumokkal szemben

A keresztrezisztencia lehetséges mechanizmusainak feltárásához 12 vonalat vizsgáltunk meg, amelyek laboratóriumi evolúciós kísérletekből származtak, és mindegyikük jelentős rezisztenciát mutatott polimixin B-vel szemben. A vizsgálatok során elemeztük ezen vonalak és ősök érzékenységét a kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumokkal (POL7306, SCH79797 és TRD), és az egyszeres célpontú permeabilizáló antibiotikumokkal (SPR-206 és a kontrollként alkalmazott kolisztin) szemben az MIC értékek meghatározásával.

Eredményeink azt mutatták, hogy a polimixin B-hez való alkalmazkodás keresztrezisztenciát váltott ki az SPR-206 és a kolisztin esetében. Ezzel ellentétben az SCH79797 és a TRD

érzékenysége nem változott az evolúciós nyomás során kialakult rezisztens vonalaknál (7. ábra).

A polimixin B-rezisztens vonalak egy része csökkent érzékenységet mutatott a POL7306-ra, bár ez a keresztrezisztencia nem volt annyira kifejezett, mint amit az SPR-206 és kolisztin esetében figyeltünk meg. Ez a jelenség elsősorban a *K. pneumoniae* és *A. baumannii* törzsekre volt jellemző.



7. ábra. A polimixin B rezisztens vonalak keresztrezisztenciája egyszeres és kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumokkal szemben. A hőtérkép a 12 polimixin B-rezisztens vonal relatív MIC-ját ábrázolja. Ezeket az értékeket úgy számoltuk ki, hogy az evolált vonalak MIC-ját elosztottuk a megfelelő ősi MIC-jával, majd log₁₀-transzformációnak vetettük alá. Minél nagyobb a relatív MIC értéke, annál kifejezettebb a keresztrezisztencia. A 12 polimixin B-rezisztens vonal adaptív laboratóriumi evolúció eredményeként jött létre, és minden vizsgált fajból három függetlenül evolválódott vonalat tartalmaz, beleértve az *E. coli* (EC), *K. pneumoniae* (KP), *A. baumannii* (AB) és *P. aeruginosa* (PA) törzseket. A hőtérkép szürke színe olyan kombinációkat jelöl, amelyeket nem vizsgáltak az ősi törzs természetes, intrinszik rezisztenciája miatt. A jobb oldalon található hőtérkép azokat a géneket ábrázolja, amelyek mutációt hordoznak a polimixin B-rezisztens vonalak esetében. Ezeknek a géneknek

a specifikus sejtes folyamatokban betöltött szerepét a KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) és a COG (Clusters of Orthologous Genes) adatbázisok alapján vizsgáltuk.

A polimixin B rezisztens vonalak esetében a mutálódott gének többsége a kationos antimikrobiális peptidrezisztenciához és a sejtfal/membrán bioszintézishez kapcsolódik. Ezek közé tartoznak például a *basS-basR* kétkomponensű rendszer mutációi, melyek szerepet játszanak a baktériumok ellenálló képességében az LPS módosításával, ezzel elősegítik a rezisztenciát a polymixin B antibiotikumokkal szemben.³⁵ Ezen kívül mutációk figyelhetők meg a *pldA* génben, amely a külső membrán foszfolipáz aktivitásáért felelős, valamint az LPS bioszintézist és szabályozást irányító génekben, mint például az *lpxA*, *phoQ*. A foszfolipid szállításban szerepet játszó gének, mint az *lptD* és *mlaA*, szintén mutálódhatnak. Ezen gének mutációi növelik a baktériumok ellenálló képességét az egyszeres célpontú permeabilizálókkal és esetenként POL7306-tal szemben.

2. A kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumok csoportján belül nem jellemző a keresztrezisztencia

A következő elemzésben azt vizsgáltuk, hogy a kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumokhoz adaptált baktériumvonalak milyen szintű keresztrezisztenciát mutatnak az egyszeres célpontú permeabilizáló antibiotikumokkal szemben. Ennek vizsgálatára összesen 15 baktériumvonalat használtunk, amelyek különböző kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumhoz adaptálódtak egy korábbi ALE kísérlet során. Ebből hat vonal Tridecaptin M152-P3-hoz, három SCH79797-hez, és szintén hat vonal POL7306-hoz adaptálódott. A vizsgálat során összehasonlítottuk ezeknek a vonalaknak és az eredeti törzsnek az érzékenységét a kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumokkal (SCH79797, TRD és POL7306) és az egyszeres célpontú permeabilizáló antibiotikumokkal (SPR-206 és kontrollként kolisztin) szemben, az MIC értékek mérésével.

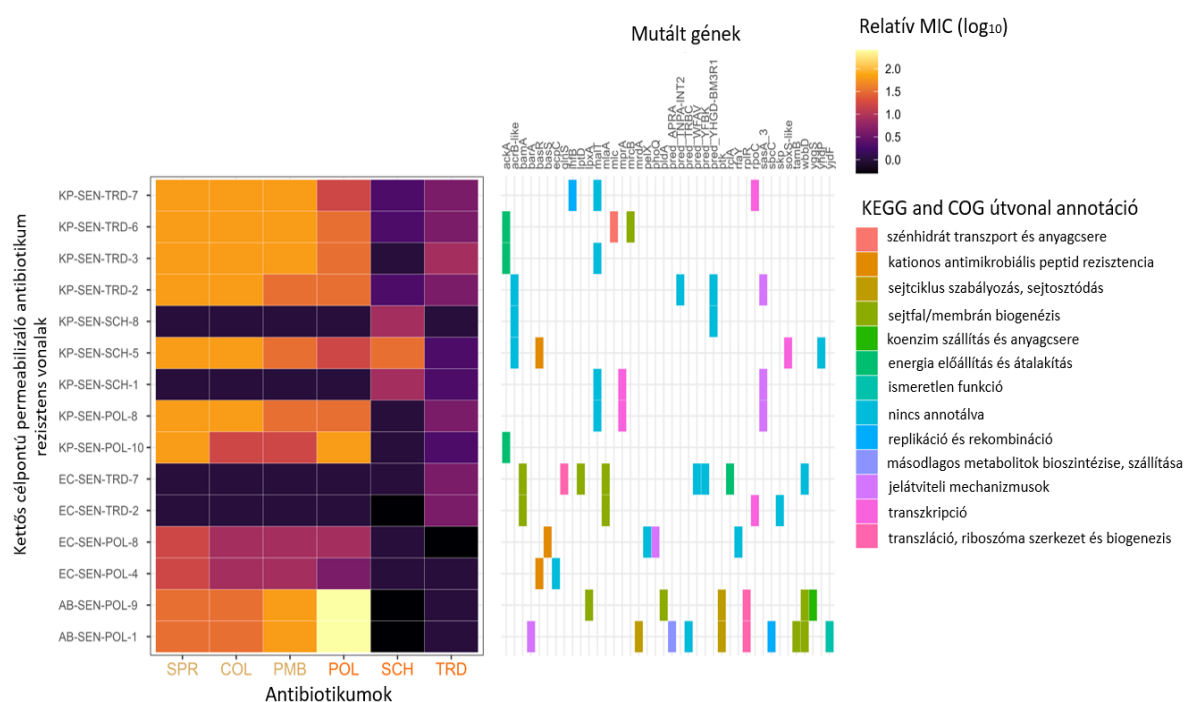
Eredményeink alapján a kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumok (SCH7979, POL7306 és TRD) között általában limitált a keresztrezisztencia, amely többnyire nincs jelen, vagy csak kétszeres, maximum négyszeres mértékben figyelhető meg. Ezzel szemben a kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumokhoz való adaptáció a keresztrezisztenciát eredményezett az egyszeres célpontú permeabilizáló antibiotikumokkal (SPR-206, COL, PMB) szemben.

Elemzésünk kimutatta, hogy ezeknél a keresztrezisztens vonalaknál ritkábban jelentkeztek olyan mutációk, amelyek kationos antimikrobiális peptidrezisztenciában résztvevő géneket

érintenek. Továbbá a mutációk többsége olyan génekben történt, amelyek funkciója nem klasszikus antibiotikum-rezisztenciával függ össze, és több gén esetében az annotáció hiánya miatt nem ismert a pontos biológiai szerep.

Két SCH79797 és két TRD rezisztens vonal kivételt jelentett a fentebb említettekhez képest, mivel ezekben nem figyeltünk meg keresztrezisztenciát az egyszeres célpontú permeabilizáló antibiotikumokkal történő kezelés után. Az SCH7979-rezisztens vonalakban főként efflux pumpa (*acrB-like*) mutációkat azonosítottunk, amelyek önmagukban nem eredményeztek keresztrezisztenciát más vizsgált antibiotikumokra, amennyiben azonban a *basR* gén is mutálódott mellettük, keresztrezisztencia alakult ki az egyszeres célpontú permeabilizáló antibiotikumok és a POL7306-tal szemben. A TRD rezisztens vonalak az *E. coli* esetében gyakran mutációkat tartalmaztak az *mfaA* és *lptD* génekben, amelyek szerepet játszanak a sejtmembrán szerkezeti stabilitásában és a foszfolipid transzportban.

Továbbá a POL7306-ra adaptált vonalak csak az egyszeres célpontú permeabilizáló antibiotikumokkal szemben mutattak keresztrezisztenciát, de SCH79797-re és TRD-re nem, vagy csak minimális mértékben (8. ábra).



8.ábra. A Tridecaptin M152-P3, SCH79797 és POL7306 rezisztens vonalak keresztrezisztenciája egyszeres és kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumokkal szemben. A hőtérkép hat TRD, három SCH és hat POL rezisztens vonal MIC-ját ábrázolja.

Ezeket az értékeket úgy számítottuk ki, hogy az evolúciós vonalak MIC-értékeit a megfelelő ősi MIC-értékekhez viszonyítottuk, majd a kapott hányadokat log₁₀-transzformációnak vetettük alá. A relatív MIC értékének emelkedése a keresztrezisztencia fokozottabb megjelenését jelzi. A 15 kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumhoz adaptáltatott vonal laboratóriumi evolúció eredményeként jött létre. A *K. pneumoniae*, *E. coli* és *A. baumannii* fajokból két vagy három függetlenül evolválódott vonalat elemeztünk. A jobb oldalon található hőtérkép azokat a géneket ábrázolja, amelyek mutációkon mentek keresztül a kettős célpontú permeabilizáló antibiotikum rezisztens vonalak esetében. Ezeknek a géneknek a specifikus sejtes folyamatokban betöltött szerepét a KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) és a COG (Clusters of Orthologous Genes) adatbázisok alapján vizsgáltuk.

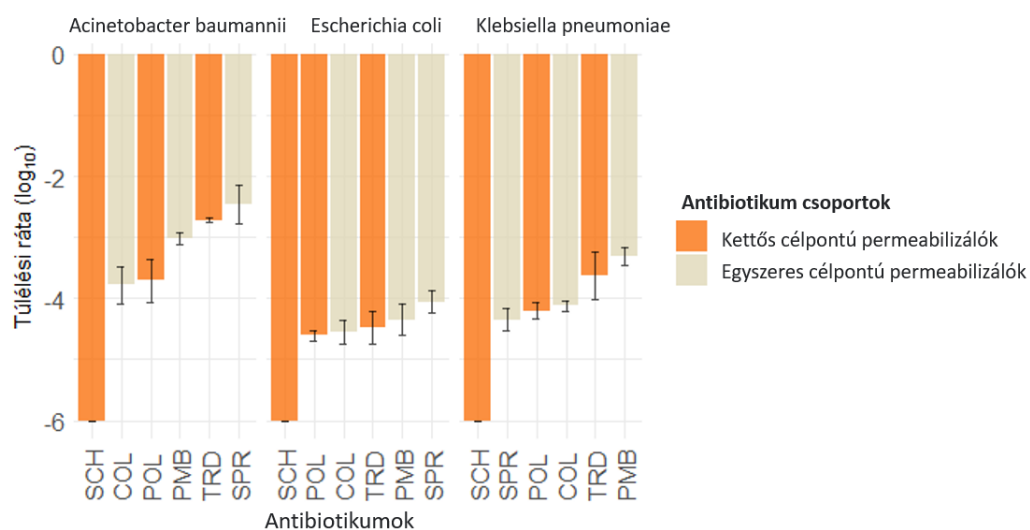
3. A legjobb ölési kinetikát az SCH79797 kettős célpontú permeabilizáló antibiotikum mutatta mindhárom vizsgált baktériumfaj esetében

Mivel tudjuk, hogy a polimixin antibiotikumok egyik kedvező tulajdonsága közé tartozik, hogy gyorsan eradikálják a baktérium populációkat³⁶, arra is kíváncsiak voltunk, hogy a kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumok megtartották-e a gyors ölési kinetikájukat, valamint, hogy ez a gyors baktériumölő hatás milyen mértékben járult hozzá az alacsony rezisztenciaprofilhoz.

Ennek tanulmányozására a kísérlet során három baktériumtörzs (*A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*) túlélését vizsgáltuk olyan antibiotikumokat alkalmazva, amelyekkel szemben ezek a törzsek érzékenyek voltak. Egy korábban kidolgozott kísérleti protokoll szerint az élő sejtek meghatározását 4 órás antibiotikumoknak való kitettség után végeztük, valamint az alkalmazott antibiotikumok koncentrációjának az MIC tízszeresét használtuk³⁷

Az ölési kinetikát úgy határoztuk meg, hogy kiszámoltuk az antibiotikumkezelés utáni életképes sejtek arányát a teljes kezdeti életképes sejtszámhoz viszonyítva.

Az elemzés kimutatta, hogy a kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumok hasonló ölési kinetikát mutatnak, mint az egyszeres célpontú permeabilizálók, kivéve az SCH79797, amely minden vizsgált faj esetében 4 órán belül teljes mértékben kiirtotta a bakteriális populációt (9. ábra).



9.ábra. Az egyszeres és kettős célpontú antibiotikumok ölési kinetikája *A. baumannii*, *E. coli* és *K. pneumoniae* baktériumok esetében 4 órás antibiotikum expozíció után. Az ábrán a túlélési arányt (log₁₀) tüntettük fel a kezelés előtti életképes sejtszámhoz viszonyítva, a szórások pedig az 5 biológiai ismétlés alapján mért standard hibát (SE) ábrázolják. A két antibiotikumcsoportot színekkel különítettük el.

V. Diskusszió

Tekintettel arra az aggasztó tényre, hogy a polimixin antibiotikumok (egyszeres célpontú permeabilizálók) széles körű alkalmazása következtében számos polimixin rezisztens baktériumtörzs jelent meg, egy új terápia kihívással kell szembenéznünk.

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumok, mint az SCH79797 és Tridecaptin M152-P3 nem voltak érzékenyek a polimixin B-re kialakult rezisztenciára, a POL7306 esetében a vonalak egy része csökkent érzékenységet mutatott, míg az SPR-206 és kolisztin esetében jelentős keresztrezisztenciát figyeltünk meg. Ez azt jelzi, hogy a kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumok hatékonyabb alternatívát kínálhatnak a polimixin B rezisztens baktériumtörzsek kezelésében.

A felsorolt három antibiotikum (SCH79797, Tridecaptin M152-P3, POL7306) közös tulajdonsága, hogy egyaránt támadják a bakteriális membrán integritását és egy másik intracelluláris célpontot, bár specifikus hatásmechanizmusuk eltérő minden esetben.

Ezzel ellentétben az egyszeres célpontú permeabilizáló antibiotikumok (polimixin-B és SPR-206) a baktériumok LPS-ének lipid A részéhez kötődnek majd károsítják a külső membránt. Ezekkel az antimikrobiális szerekkel szemben azonban könnyen kialakulhat rezisztencia, mivel az LPS struktúrája az azt szintetizáló enzimek mutációinak hatására könnyen módosítható. A POL7306 szintén képes az LPS-hez kötődni, mint az egyszeres célpontú permeabilizálók, mert szerkezetileg és funkcionálisan hasonlóságot mutat a polimixin B-vel. Feltételezhetően ezért figyelhető meg keresztrezisztencia a vonalak egy részénél.

A kettős célpontú permeabilizálók közül az SCH79797 és a TRD nem érintettek az LPS-t módosító mutációk által, amit alátámaszt, hogy nem alakul ki keresztrezisztencia a polimixin B rezisztens vonalakkal szemben.

A kettős célpontú permeabilizálókra rezisztens vonalak esetén érdemes kiemelni, hogy a POL7306, az SCH79797 és TRD antibiotikumok egymással szemben nem mutattak keresztrezisztenciát, ami arra enged következtetni, hogy a klinikai alkalmazás során egymás után is használhatók lennének, a rezisztencia kockázatának minimalizálásával. Ez a megfigyelés kiemelten fontos, mivel így több terápiás lehetőség maradhat a polimixin rezisztens baktériumok kezelésére. Ezzel szemben az egyszeres célpontú permeabilizáló antibiotikumok (SPR-206, COL, PMB) esetében a keresztrezisztencia gyakrabban fordul elő, vagyis ha egy baktériumtörzs ellenállóvá válik az egyik ilyen antibiotikummal szemben, akkor nagy valószínűséggel a többi egyszeres célpontú permeabilizálóra is rezisztenssé válik. Ez jelentősen korlátozza a terápiás opciókat, mivel az ilyen típusú rezisztencia esetén kevesebb antibiotikum marad hatékony az adott patogén ellen.

Továbbá a kettős célpontú permeabilizálókra adaptált vonalak esetében keresztrezisztenciát figyeltünk meg az egyszeres célpontú permeabilizáló antibiotikumokkal (SPR-206, kolisztin, polimixin B) szemben. Ez klinikai szempontból kevésbé aggasztó, mivel a polimixin-rezisztens baktériumok már jelen vannak, és ezekkel szemben éppen a kettős célpontú permeabilizáló antibiotikumokra van szükség, hogy kiegészítő terápiát nyújtsanak a polimixin rezisztens fertőzésekkel szemben, nem pedig fordítva.

Fontos megjegyezni, hogy az SCH79797 kivételes baktericid hatékonyságot mutatott, mert teljesen elpusztította a baktérium populációkat négy órán belül. Sikeresége feltételezéseink szerint abban rejlik, hogy aktiválja a baktériumok egy mechanoszenzitív csatornáját (MscL), ezáltal idézi elő a membránkárosodást. Ez az új célpont különösen figyelemreméltó új

antibiotikumok fejlesztése szempontjából, hiszen egy erősen konzervált fehérje a baktériumok körében és hiányzik az emlősökből.³⁸

Az ölési kinetikát vizsgáló kísérlet azt mutatta, hogy a baktériumölési képesség nem befolyásolja közvetlenül a rezisztencia kialakulását, mivel mind az egyszeres, mind a kettős célpontú permeabilizálók hasonlóan jó baktériumölési hatékonyságot mutattak. Az SCH79797 gyors baktériumölő hatása viszont hozzájárulhat a rezisztencia kialakulásának megakadályozásához, míg a POL7306 és a TRD esetében a jó rezisztenciaprofil inkább a speciális célpontjaik miatt figyelhető meg, nem pedig a gyors ölési kinetika miatt.

Összességében kutatásunk eredményei rávilágítanak arra, hogy a kettős célpontú antibiotikumok sokkal összetettebb hatásmechanizmusokkal rendelkeznek, amelyek hatékonyan minimalizálják a rezisztencia kialakulását. Ezek az antimikrobiális szerek különösen ígéretesnek tűnnek a Gram-negatív patogénekkel szembeni küzdelemben, amelyek esetében a jelenleg elérhető terápiás lehetőségek egyre korlátozottabbak. A jövőbeni antibiotikum-fejlesztési irányvonalaknak ezért érdemes figyelembe venniük ezt a kettős mechanizmust, amely egyszerre támadja meg a bakteriális membránt és más kulcsfontosságú sejtes folyamatokat is.

Az eredményeink által nyújtott perspektíva megerősíti azt az elképzelést, hogy azok a kettős célpontú antibiotikumok, amelyek a membránt is célozzák, hosszú távon fenntarthatóbbak lehetnek a rezisztenciával szemben, így potenciálisan nagyobb hatékonyságot biztosítanak a nehezen kezelhető fertőzések esetén, mint azok a kettős célpontú antibiotikumok, amelyek nem célozzák a membránt. Ezek az eredmények hangsúlyozzák a célzott és átgondolt tervezés fontosságát a jövő antibiotikumainak kialakításában és alkalmazásában, hogy hatékonyabban vehessük fel a harcot a globális antibiotikum-rezisztencia problémájával.

VI. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőimnek: Prof. Dr. Pál Csabának és Dr. Czikkely Mártonnak, hogy irányították a munkámat és átnézték a kéziratot. Továbbá köszönöm Elvin Maharramov-nak az ábrák elkészítésében nyújtott segítséget és Mészáros Lénának a munka során nyújtott segítséget.

VII. Irodalomjegyzék

1. Andersson, D. I. VIII.3 Evolution of Antibiotic Resistance,. *The Princeton University Press* (2013).
2. Appelbaum, P. C. 2012 and beyond: Potential for the start of a second pre-antibiotic era? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **67**, 2062–2068 (2012).
3. Patangia, D. V., Anthony Ryan, C., Dempsey, E., Paul Ross, R. & Stanton, C. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health,. *MicrobiologyOpen* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1002/mbo3.1260> (2022).
4. Bennett, J. W. & Chung, K.-T. Alexander Fleming and the Discovery of Penicillin,. *Advances in Applied Microbiology* **49**, 163-184 (2001).
5. Hutchings, M., Truman, A. & Wilkinson, B. Antibiotics: past, present and future,. *Current Opinion in Microbiology* vol. 51 72–80 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008> (2019).
6. Murray, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis,. *The Lancet* **399**, 629–655 (2022).
7. Hall, W., McDonnell, A & O'Neill, J. *Superbugs: An Arms Race against Bacteria*,. *Harvard University Press* (2018).
8. Clatworthy, A. E., Pierson, E. & Hung, D. T. Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy,. *Nature Chemical Biology* vol. 3 541–548 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.24> (2007).
9. World Health Organization. 2023 antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240094000> (2023).
10. Alanis, A. J. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research* vol. 36 697–705 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009> (2005).
11. Mohr, K. I. History of antibiotics research,. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **398**, 237–272 (2016).
12. Réka, S. A bakteriális antibiotikum rezisztencia de novo evolúciója és járulékos következményei (Doctoral dissertation, Szegedi Tudományegyetem (Hungary)) (2018).
13. Darby, E. M. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited,. *Nature Reviews Microbiology* vol. 21 280–295 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y> (2023).
14. Abebe, E., Tegegne, B. & Tibebe, S. A review on molecular mechanisms of bacterial resistance to antibiotics,. *European Journal of Applied Sciences* vol. 8 301-310 Preprint at <https://doi.org/10.5829/idosi.ejas.2016.8.5.1143> (2020).
15. Walsh, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance,. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 331–340 (2005).
16. Mayers, D. L., Sobel, J. D., Ouellette, M., Kaye, K. S. & Marchaim, D. *Antimicrobial Drug Resistance*,. In *Clinical and Epidemiological Aspects* vol. 2 (Springer, Berlin, 2017).
17. Webber, M. A. & Piddock, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance,. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**, 9–11 (2003).
18. Blair, J. M. A., Richmond, G. E. & Piddock, L. J. V. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance,. *Future Microbiology* vol. 9 1165–1177 Preprint at <https://doi.org/10.2217/FMB.14.66> (2014).
19. Piddock, L. J. V. Multidrug-Resistance Efflux Pumps-Not Just for Resistance,. *Nature Reviews Microbiology* **8**, 629-36 (2006).
20. Piddock, L. J. V. Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance: An Update 1994-1998,. *Drugs* vol. 58 (1999).

21. Poole, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine* vol. 39 162–176 Preprint at <https://doi.org/10.1080/07853890701195262> (2007).
22. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* vol. 13 42–51 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380> (2015).
23. Pál, T. *Az Orvosi Mikrobiológia Tankönyve*. (Medicina Zrt., Budapest, 2011).
24. Avison, M. B. New approaches to combating antimicrobial drug resistance., *Genome Biology* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-13-243> (2005).
25. Sommer, M. O. A., Munck, C., Toft-Kehler, R. V. & Andersson, D. I. Prediction of antibiotic resistance: Time for a new preclinical paradigm? *Nature Reviews Microbiology* vol. 15 689–696 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.75> (2017).
26. MacLean, R. C. & Millan, A. S. The evolution of antibiotic resistance., *Science* (1979) **365**, 1082–1083 (2019).
27. Miethke, M. *et al.* Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics., *Nature Reviews Chemistry* vol. 5 726–749 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1> (2021).
28. Provenzani, A. *et al.* Multidrug-resistant gram-negative organisms: a review of recently approved antibiotics and novel pipeline agents., *International Journal of Clinical Pharmacy* vol. 42 1016–1025 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11096-020-01089-y> (2020).
29. Daruka, L. *et al.* Title: *Antibiotics of the Future Are Prone to Resistance in Gram-Negative Pathogens.*, bioRxiv 2023.07.23.550022 (2023) doi:10.1101/2023.07.23.550022.
30. Lewis, K. The Science of Antibiotic Discovery., *Cell* vol. 181 29–45 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056> (2020).
31. Li, Y. *et al.* Identification of a Compound That Inhibits the Growth of Gram-Negative Bacteria by Blocking BamA–BamD Interaction., *Frontiers in Microbiology* **11**, (2020).
32. Bann, S. J., Ballantine, R. D. & Cochrane, S. A. The tridecaptins: non-ribosomal peptides that selectively target Gram-negative bacteria., *RSC Medicinal Chemistry* vol. 12 538–551 Preprint at <https://doi.org/10.1039/d0md00413h> (2021).
33. Wray, R., Wang, J., Blount, P. & Iscla, I. Activation of a Bacterial Mechanosensitive Channel, MscL, Underlies the Membrane Permeabilization of Dual-Targeting Antibacterial Compounds., *Antibiotics* **11**, (2022).
34. Lorian, V. *Antibiotics in laboratory medicine*. 5th edn (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005).
35. Chen, H. D. & Groisman, E. A. The biology of the PmrA/PmrB two-component system: The major regulator of lipopolysaccharide modifications., *Annual Review of Microbiology* **67**, 83–112 (2013).
36. Moubareck, C. A. Polymyxins and bacterial membranes: A review of antibacterial activity and mechanisms of resistance., *Membranes* vol. 10 1–30 Preprint at <https://doi.org/10.3390/membranes10080181> (2020).
37. Lázár, V., Snitser, O., Barkan, D. & Kishony, R. Antibiotic combinations reduce *Staphylococcus aureus* clearance., *Nature* **610**, 540–546 (2022).
38. Wray, R., Wang, J., Blount, P. & Iscla, I. Activation of a Bacterial Mechanosensitive Channel, MscL, Underlies the Membrane Permeabilization of Dual-Targeting Antibacterial Compounds., *Antibiotics* **11**, (2022).