

Egy új antibakteriális peptid, az A3-APO  
hatékonyságának in vitro és in vivo vizsgálata  
multirezisztens baktériumokkal szemben

**Dr.Ostorházi Eszter**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ötvös László egyetemi tanár, MTA doktor Temple  
University

Konzulens: Dr. Rozgonyi Ferenc egyetemi tanár, MTA doktor Semmelweis  
Egyetem

Programvezető: Dr. Kárpáti Sarolta egyetemi tanár, MTA doktor

Hivatalos bírálók: Dr. Kalász Huba szaktanácsadó, MTA doktor  
Dr. Majoros László egyetemi docens, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Papp Zoltán egyetemi tanár, MTA  
doktor

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Anderlik Piroska prof. emer.,  
orvostudományok kandidátusa  
Dr. Rókus László osztályvezető főorvos,  
PhD

Budapest  
2011

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke .....	2
2. Bevezetés .....	4
3. Célkitűzések .....	17
4. Anyagok és Módszerek .....	18
4.1. Felhasznált baktérium törzsek .....	18
4.1.1. In vitro mérésekhez használt baktérium törzsek.....	18
4.1.2. In vivo mérésekhez használt baktérium törzsek.....	18
4.1.3. Általános bakteriológiai módszerek .....	18
4.2. Felhasznált anyagok .....	19
4.2.1. Antibakteriális peptidek.....	19
4.2.2. Egyéb antibiotikumok .....	20
4.2.3. Egyéb a kezelése során felhasznált anyagok.....	20
4.3. In vitro antibakteriális hatás vizsgálata .....	20
4.4. In vivo kísérletek .....	21
4.4.1. Felhasznált állatok .....	21
4.4.2. Toxicitás vizsgálatok .....	22
4.4.3. Farmakokinetikai vizsgálatok.....	22
4.4.4. Hatékonysági vizsgálatok <i>Escherichia coli</i> szisztémás fertőzések kezelésében .....	23
4.4.5. Hatékonysági vizsgálatok <i>Acinetobacter baumannii</i> szisztémás fertőzések kezelésében .....	24
4.4.6. Hatékonysági vizsgálatok különböző sebfertőzés modellekben .....	25
4.5. Statisztikai számítások.....	26
5. Eredmények .....	28
5.1. In vitro antibakteriális hatékonyság.....	28
5.2. In vivo vizsgálatok eredményei.....	31
5.2.1. Toxicitási vizsgálatok eredménye .....	31
5.2.2. Farmakokinetikai vizsgálat eredménye .....	34
5.2.3. <i>E. coli</i> szisztémás fertőzés kezelése .....	34
5.2.4. <i>A. baumannii</i> szisztémás fertőzés kezelése .....	44
5.2.5. <i>A. baumannii</i> sebfertőzés kezelés eredménye .....	52
6. Megbeszélés .....	63
7. Következtetések.....	74
8. Összefoglalás .....	76
9. Summary.....	77
10. Irodalomjegyzék .....	78
11. Saját publikációk jegyzéke .....	84
11.1.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények .....	84
11.1.2. Az értekezéssel kapcsolódó közlemény .....	84
11.2. Az értekezéstől független közlemények .....	85
12. Köszönetnyilvánítás .....	87

## 1. Rövidítések jegyzéke

A3-APO: all peptide optimized, a család összes tagjára optimalizált peptid

ATCC: American Type Culture Collection, Amerikai tipizált törzsgyűjtemény

ATP: adenzin-trifoszfát

BORSA: borderline oxacillin rezisztens *Staphylococcus aureus*

Chex: 1-amino-ciklohexán-carboxil-sav

CFU: colony forming unit, telepképző egység

DNS: dezoxiribo-nukleinsav

EAB: Egyetemi Állatkísérleti Bizottság

ED<sub>100</sub>: 100% effective dose, 100%-os hatékony dózis

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay, enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat

ESBL: Extended Spectrum Beta Lactamase, kiterjedt spektrumú  $\beta$ -laktamáz

9-Fmoc: 9-fluorenilmetiloxi-karbonil

HPLC: high performance liquid chromatography, nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia

im: intramuscularis

ip: intraperitonealis

IU: International Unit, Nemzetközi Egység

iv: intravénás

MAB: Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság

MACI: multirezisztens *Acinetobacter*

MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight; matrix segített lézer ionizációs / deszorpciós tömegspektroszkópia, melyben a detektálás a repülési idő alapján történik

MBC: Minimális Baktericid Koncentráció

MBL: Metallo Beta Laktamáz

MIC: Minimális Inhibitor Koncentráció

MRSA: methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus*

MH: Müller-Hinton

NOAEL: no observed adverse effect level, nem kimutatható káros hatás határértéke

OEK: Országos Epidemiológiai Központ

PAE: post-antibiotic effect, post-antibiotikus hatás

PBP: penicillin binding protein, penicillinkötő fehérje

PBS: phosphate buffered saline, foszfáttal pufferolt sóoldat

Rpm: rotation/minute, fordulatszám/perc

Shv: sulfhydryl variant, szulfhidril variáns, egy  $\beta$ -laktamáz típus

SMX/TMP: szulfametoxazol-trimethoprim

TEM: Temoniera, egy  $\beta$ -laktamáz típus

TCA: triklór ecetsav

TFA: trifluor ecetsav

Ttkg: test tömeg kilogramm

VISA: vancomycin intermediate sensitive *Staphylococcus aureus*, vancomycin mérsékelten érzékeny *Staphylococcus aureus*

VRE: vancomycin rezisztens *Enterococcus*

## 2. Bevezetés

Az első élőlények, a baktériumok körülbelül 3,5 milliárd évvel ezelőtt jelenhettek meg a Földön, jelen vannak az élettelen környezetünk tárgyain, hasznos, vagy károsító módon, de minden más élőlényel is együtt élnek. A gerincesek, így az emberi szervezet számára is vannak nélkülözhetetlen, a bőrön és nyálkahártya felszíneken élő normál flórához tartozó baktériumok, melyek a szervezet egyéb területeire kerülve súlyos megbetegedést hozhatnak létre, és léteznek obligát patogén baktériumok, melyek fogékony szervezetbe kerülve megbetegítik azt. 1530 körül *Girolamo Fracastoro* tankölteményében, már a syphilisről, mint fertőző betegségről írt. A holland kereskedő *Anton van Leeuwenhoek* pedig 1674-ben kezdetleges mikroszkópjával látott már mikrobákat, de a mikroszkópikus méretű élőlények fertőzéseket okozó szerepe ekkor még nem merült fel. *Louis Pasteur* 1865-ben a selyemhernyókat pusztító járvány kapcsán kezdett először foglalkozni a fertőző betegségek kórokozóival, majd 1877-ben megjelent tanulmányában igazolta, hogy az *anthrax* (lépfene) betegség okozója egy különleges baktériumfajta. *Robert Koch* 1881-ben tenyésztett baktériumokat először agar tartalmú szilárd táptalajon, ami egyrészt megmutatta, hogy a baktérium fajták telepformológiájuk alapján elkülöníthetők, másrészt lehetőséget adott a baktériumok szaporodását gátló vegyületek vizsgálatára. *Paul Ehrlich* 1910-ben fedezte fel az arzén származék *Salvarsant*, mellyel több-kevesebb sikert tudtak elérni a *syphilis* kezelésében. *Alexander Flemming* 1928-as penicillin-, és *Selman Waksman* 1941-es streptomycin-termelő mikroorganizmus felfedezése a fertőző betegségek elleni gyógyszerkutatások két új irányát indította el; felfedezni környezetünk antimikrobiális hatású vegyületeit, illetve ezekből olyan származékokat előállítani, melyek az emberi gyógyításban hatékonyan használhatóak.

Anélkül, hogy a pontos hatásmechanizmust ismerték volna, antimikrobiális hatású növényeket és a természetben fellelhető egyéb anyagokat évezredek óta használtak az emberek. Régészek Észak-Irak területén olyan 50000 éves emberi maradványokat találtak, amiket feltehetőleg konzerválás céljából, különböző növényekkel temettek el. Ezen növények közül többről tudott, hogy magas antibiotikum tartalmuk van, a környék őshonos lakossága ma is gyógyításra használja őket. Az első írásos emlékeink az ie. 1550 körül Egyiptomban keletkezett *Ebers* papiruszban találhatóak, itt pontos receptek

adják meg, hogyan kell méz és zsírtartalmú kenőcsöt készíteni sebek kezelésére. Hasonló összetételű volt a Római-korban elterjedten használt *Tincta in melle linamenta*, az ókori görögök rezet is tartalmazó méz alapú krémeket használtak a sebek gyógyítására. Ezt a módszert használták még a II. Világháborúban megsérült shanghai-i katonák is, az akkori feljegyzések szerint a disznózsírba kevert méz jó hatékonysággal gyógyította a bőr- és sebfertőzéseket. Nemcsak mézet, de illatos gyantákat, tömjént és mirhát is használtak az egyiptomiak a fertőzések kezelésére. Ma már tudjuk, hogy a tömjén, a *Boswellia* fa gyantája alfa- és béta-boswellinsavat, valamint más pentaciklikus triterpénsavakat is tartalmaz, melyek antibakteriális és antimikotikus hatásúak. A mirha a szomáliai balzsamfa (*Commiphora myrrha*) szirupos gyantája, melyet még a XIX. században is szívesen használtak urethritisek kezelésére. Hatóanyagai, a furanosequiterpének fertőtlenítő, fájdalomcsillapító és antioxidáns hatásúak, a fejlődő országokban ma is használják *Ascaris*, *Shistosoma* és *Fasciola* ellenes szerként. Az egyiptomi múmiák testüregeiben gyakran találtak vörös és fokhagymát, ezek antibakteriális hatóanyaga az allicin is hozzájárult a balzsamozás mellett a holttestek konzerválásához. Gyógynövényként ismerték Egyiptomban a reket is melynek raphanin hatóanyaga is széles spektrumú antibakteriális szer. Szintén az *Ebers* papiruszban található a gennyes sebek gyógyításának útmutatója is, ezekre penészes árpakenyér felhelyezése ajánlott. Az ókori Kínában is gyakran használtak különböző penészgombákat bőrfertőzések kezelésére (1,2). Az ősi Núbiai Királyság isz. 300-350 közötti kultúra volt a mai Szudán területén. Írásos emlékek erről a korszakról nem maradtak ránk. A núbiai emberi csontmaradványokban nagy mennyiségű tetraciklin felhalmozódást mutattak ki. Az egyiptomi coffin szövegekben számos recept található fogíny betegségek kezelésére főzött sörről, melynek egyik fontos összetevője az arany színű *Streptomyces aureofaciens* által termelt tetraciklin lehetett. *Armelagos és munkatársai* megállapították, hogy a núbiai halottak csontmaradványai életkortól függetlenül nagy mennyiségű tetraciklint tartalmaznak. Az archeológusok valószínűsítik, hogy ezek az Egyiptomtól délre élő népcsoportok is hasonló összetételű sört fogyaszthattak napi gyakorisággal (3).

Bár az antibiotikumok kutatása, ipari méretű gyártása és fokozott használata a lakosság körében, csak a II. Világháború után terjedt el, a környezetünkben élő baktériumok már előzetesen is számos antibakteriális hatású vegyülettel találkoztak. Az antibiotikumok helytelen használata rezisztens baktériumtörzsek szelektálásához és

azok elszaporodásához vezet. Norvég kutatók igazolták, hogy az emberi környezettől távol a Spitzbergákon élő jegesmedvék székletéből egyedenként átlag 4 különböző rezisztencia mechanizmust hordozó baktériumfajt lehet izolálni, addig kórházi betegekből vett székletmintákban egyéneenként átlag 40 különböző antibiotikum rezisztencia gént hordozó baktériumtörzs található (4).

Maga *Flemming* nyilatkozta 1945-ben a New York Times magazinnak, hogy „A legnagyobb gondot az jelentheti abban, ha hagyjuk, hogy az emberek önmagukat szabadon kezeljék, ha túl kicsi dózisokat alkalmaznak, így ahelyett, hogy a fertőzést megszüntetnék, olyan mikrobák fejlődnek ki, amelyek penicillinre rezisztensekké válnak. Gazdájuk pedig addig adja tovább ezeket a penicillintűrő organizmusokat, míg egy olyan személyt fertőznek meg végül, akinek szeptikémiája vagy pneumóniája már penicillinnel kezelhetetlen lesz (5).” *Flemming* gondolata, nemcsak a penicillinre, de minden az óta felfedezett antibiotikumra igazzá vált. Az első táblázatban látható néhány antibiotikum család felfedezésének éve, és az időpont, amikor az antibiotikummal szemben rezisztens első baktérium törzset észlelték (**1. táblázat**).

**1. táblázat.** A különböző antibiotikumok felfedezésének (forgalomba kerülésének), és az ellenük kialakult rezisztencia első észlelésének éve (5,6)

<b>Antibiotikum neve</b>	<b>Felfedezés éve (forgalomba kerülés éve)</b>	<b>Első rezisztencia felfedezésének éve</b>
szulfonamid	1930	1940
penicillin	1928 (1943)	1946
streptomycin	1943	1959
chloramphenicol	1947	1959
tetracyclin	1948	1959
erythromycin	1952	1988
methicillin	1960	1961
ampicillin	1961	1963
I. generációs cefalosporinok	1960-tól	1968
gentamicin	1967	1969
vancomycin	1972	1987
III. generációs cefalosporin/ cefotaxim	1981	1983
linezolid	1999	2000



*Flemming* 1928-ban fedezte fel a penicillint, de nagyobb mennyiségű előállítás, tisztítása, gyógyászatban való alkalmazhatósága csak 1943-tól *Florey* és *Chain* munkássága nyomán vált lehetővé. A Gram-pozitív coccusok valaha 100%-ban érzékenyek voltak penicillinre, de mára ez már csak a *Streptococcus pyogenes*ről mondható el.

A *Staphylococcusok*  $\beta$ -laktamáz termelésükkel, vagy a  $\beta$ -laktámok hatáspontjának, a Penicillin Binding Protein-nek (PBP) megváltoztatásával válnak rezisztenssé az antibiotikum család különböző tagjaival szemben. A megváltozott kötőhely, a PBP 2a megjelenéséért a *mecA* gén felelős, az ilyen methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsekkel szemben egyetlen  $\beta$ -laktám antibiotikum sem képes hatását kifejteni. Ritkán előfordulhat a *mecA* gén hiányában is emelkedett oxacillin/methicillin MIC érték, ennek hátterében  $\beta$ -laktamáz hiperprodukción áll. Ezeket borderline (határeset) oxacillin rezisztens *Staphylococcus aureus*, BORSA törzseknek nevezzük (7).

Az *Enterococcusok* természetes rezisztenciával rendelkeznek a cefalosporinokkal szemben, mert PBP 5-jük a cefalosporinokat egyáltalán nem köti meg, de a penicillin származékokat is csak csökkent affinitással. Az *E. faecalis*-nál előfordulhat  $\beta$ -laktamáz termelődésen alapuló alacsony szintű  $\beta$ -laktám rezisztencia is, a felelős rezisztencia gének a *Staphylococcusoktól* erednek (7).

A *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* és egyéb *Streptococcus* törzsek is olyan PBP enzimekkel rendelkezhetnek, melyek az eredetileg penicillinek iránt érzékeny fajoknál különböző szintű rezisztenciák megjelenését eredményezik (7).

Az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktérium fajok számos  $\beta$ -laktám antibiotikummal szembeni rezisztenciával rendelkezhetnek, ezek egy része intrinszcikromoszómális (AmpC enzim), más részük plazmid-kódolt, melyet a törzsek átadhatnak egymásnak. A plazmid kódolt TEM (Temoniera) és SHV (szulfhidril variáns) enzimek (*Klebsielláknál* kromoszómálisan is jelen vannak) aminopenicillinekkal, 1. generációs cefalosporinokkal szembeni rezisztenciát eredményezhetnek, ami enzimgátlóval felfüggeszthető. Ugyanakkor a plazmid-kódolt kiterjedt spektrumú  $\beta$ -laktamáz (ESBL) enzimek, melyek a TEM és SHV enzimek génjeinek mutációja során alakultak ki, már rezisztenciát eredményeznek aminopenicillinek, ureidopenicillinekkal, carboxypenicillinekkal, 1. 2. 3. és 4. generációs cefalosporinokkal, valamint monobactamokkal szemben is. Metallo- $\beta$ -laktamáz termelő törzsek pedig a

carbapenemekre is rezisztenssé válnak, ezek ellen csak az aztreonam marad hatékony. A *Pseudomonasok* mindezen rezisztencia mechanizmusokat birtokolhatják, valamint megjelenhet náluk önálló carbapenemáz termelődés vagy efflux pumpa mechanizmus is. A *Haemophilusok*, *Neisseriák* és *Moraxellák* mind PBP változás, mind TEM  $\beta$ -laktamáz termelése során rezisztenssé válhatnak a  $\beta$ -laktám antibiotikumokkal szemben (7).

A következő antibakteriális hatású szert, a folsavszintézis-gátló szulfonamidot 1935-ben *Domagk* tudta előállítani. Az *Enterococcusok* rezisztensek rá, mert környezetükből kész folsavat vesznek fel, de más baktériumok is rezisztenciára tettek szert vele szemben, a folsavszintézisben részt vevő enzimeik megváltoztatásával, fokozott prekursor termeléssel, vagy az antibakteriális szer inaktiválásával (10).

1943-ban *Waksman* felfedezte az első antituberkulotikumot, a streptomycint, de mára a *Mycobacteriumok* nagy része a riboszómális kötőhelyük mutációs változása következtében már rezisztens vele szemben (10).

A következő 30 évben sorra jelentek meg aminoglikozid származékok, úgymint a neomycin, a kanamycin, a gentamicin, a tobramycin, a netilmicin, az amikacin, és a paromomycin. Az ellenük kialakuló rezisztenciák közül legfontosabbak az enzimatisz inaktiváción alapulóak, az acetiláló, foszforiláló és nukleotidáló enzimek révén. Az *Enterococcusok* és a *Neisseria gonorrhoeae* streptomycin és spectinomycin rezisztenciája a megváltozott riboszómális kötőhely miatt alakul ki. Az aminoglikozidok baktériumsejtbe jutása egy oxigénfüggő aktív transzport, így az anaerob baktériumok természetes rezisztenciával rendelkeznek velük szemben. Az *Enterococcusok* anaerob metabolizmus révén juthatnak az aminoglikozidokkal szembeni alacsony szintű rezisztenciához. Permeabilitás csökkenés is szerepel a *Staphylococcusok* és *Pseudomonasok* aminoglikozid rezisztencia folyamataiban (8,9,10).

Az 1947-ben felfedezett *Streptomyces venezuelae* által termelt chloramphenikol széles spektrumú fehérjeszintézis gátló szer, de rendkívüli toxicitása miatt a fejlett országokban manapság ritkán használjuk. Acetilálás során az antibiotikum molekula inaktívvá válik, ez a rezisztencia jellemző az *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* és *Pseudomonas aeruginosa* törzsekre (8).

A tetraciklinek 1952-ben kerültek forgalomba, fehérjeszintézis gátló, széles spektrumú antibiotikumok. A természetben is legelterjedtebb antibiotikum rezisztencia, a gabona magvakon élő *Streptomyces aureofaciens* által termelt tetraciklinnel szemben

alakul ki. Ritka a kromoszómális eredetű porinacsatorna változás, mely miatt az antibiotikum csökkent mértékben jut a baktériumsejtekbe, gyakori viszont az aktív efflux, vagy a riboszómát védő fehérje termelés megjelenése mind a *Gram*-pozitív, mind a *Gram*-negatív baktériumokban. Ez utóbbi két mechanizmus plazmid-kódolt, így a baktériumok között vertikálisan is gyorsan terjed (10).

Szintén 1952-ben került forgalomba az első makrolid antibiotikum az erythromycin, melynek számos származéka is ismert; spiramycin, josamycin, clarithromycin, roxithromycin, dirithromycin és azithromycin. Kémiaiailag különbözőek, de hatáspontjukban és rezisztencia mechanizmusokban a makrolidokkal együtt tárgyalhatók a linkozamid és streptogramin vegyületek. Az *Enterobacteriaceae* család és a nem fermentáló *Gram*-negatív pálcák természetes rezisztenciával rendelkeznek a csoport minden tagjával szemben. A *Staphylococcusok*, *Streptococcusok* eredetileg érzékenyek ezek iránt a fehérjeszintézisgátló antibiotikumok iránt. A szerzett rezisztenciák közül leggyakoribb a riboszómális RNS metilációja miatt kialakuló rezisztencia, ami a csoport minden tagjára keresztrezisztenciát eredményez. Az efflux pumpák okozhatnak csak a makrolidokkal szembeni rezisztenciát, míg a linkozamid és streptogramin érzékenység ép marad. Ritka, különösen *Staphylococcusoknál* fordul elő enzimatis bontás, ami csak egy-egy vegyületet érint, és leírtak már permeabilitás csökkenésen alapuló rezisztenciát is. Az *Enterococcusok* clindamycinnel szemben mindig rezisztensek (10).

1964-ben jelent meg a kinolon antibiotikumok első tagja a nalidix-sav, amely csak az *Enterobacteriaceae* család tagjai által okozott húgyúti fertőzések kezelésére volt alkalmas. A második generációs fluorokinolonok már *Pseudomonas* ellenes aktivitással is rendelkeznek, de még mindig csak húgyúti infekciók kezelésére alkalmasak. A nagy áttörést a harmadik generációs vegyületek megjelenése hozta, ezek meningitis kivételével minden szisztémás infekció kezelésére alkalmasak, bár *Streptococcus* ellenes hatásosságuk csak marginális. A negyedik generációs fluorokinolonok *Gram*-pozitív baktériumokkal szembeni aktivitása erős, hatékonyak anaerob és intracelluláris fertőzések ellen is, bár *Gram*-negatív ellenes hatékonyságuk kissé gyengébb. A leggyakoribb rezisztencia kialakulása a célmolekula, a giráz, vagy topoizomeráz enzim génjén bekövetkező mutáció következménye. Ez jelenik meg a *Staphylococcusok*, a *Streptococcus pneumoniae*, a *Pseudomonasok* és az *Enterobacteriaceae* család esetén. A rezisztencia másik lehetséges útja a permeabilitás csökkenés, az OmpF porin csatorna

csökkent mennyisége okolható a *Pseudomonasok* és *E. coli* ilyen fluorokinolon csökkent érzékenységeért. Harmadik út a rezisztencia kialakulásában az aktív efflux megjelenése, *S. aureus* és *P. aeruginosa* törzseknél (10).

1972-ben vált engedélyezett gyógyszeré a vancomycin, 1987-ben már vancomycin rezisztens *Enterococcusok* (VRE), majd vancomycin mérsékelten érzékeny *Staphylococcus aureus* (VISA) törzsek is megjelentek. Az *Enterococcusok* glikopeptid rezisztenciája a *vanA*, *vanB* vagy *vanC* gének által kódolt ligáz termelésnek köszönhető, ezek az enzimek a peptidoglikán szintézis prekursorait módosítva, a vancomycin kötődését megakadályozva, továbbra is lehetőséget biztosítanak a transzpeptidációhoz. A *Staphylococcusok* glikopeptid rezisztenciája multifaktoriális eredetű; sejtfalvastagodás, csökkent mennyiségű és megváltozott szerkezetű keresztkötések, fals antibiotikum kötőhelyek megjelenése, sejtfal prekursorok túlzott mennyiségű termelése és PBP2 túltermelés is okozhatják. Izoláltak már olyan magas szintű glikopeptid rezisztenciával bíró *Staphylococcus* törzseket is amelyek *vanA* gént hordoztak (7).

Az előbb felsorolt néhány példán is látszik, hogy a baktériumok gyorsan alkalmazkodnak az újonnan bevezetésre kerülő antibiotikumokhoz, az új antibiotikumok kutatóinak nehéz velük lépést tartani.

A kutatások egyik iránya meglévő antibiotikumok újabb származékainak vizsgálata, hogy antibakteriális spektrumuk, bakteriális rezisztencia mechanizmusokkal szembeni ellenálló képességük, az alapvegyülethez képest fokozódjon. Más kutatások arra irányulnak, hogy a baktériumok által eddig ismeretlen, új hatásmechanizmusokkal bíró, új, esetenként több támadásponttal is rendelkező antibakteriális hatású szereket állítsanak elő. Ilyen új hatásmechanizmussal rendelkezik például a daptomycin, egy ciklikus szerkezetű lipopeptid, mely a bakteriális membránba beilleszkedve, kalcium ionok jelenlétében, a membrán hirtelen depolarizációját, a baktérium pusztulását okozza. A 2000 óta forgalomba került új antibiotikumok, mint a linezolid, quinupristin/dalfopristin, vagy daptomycin bízatóan jó hatásúak a VRE, MRSA és VISA törzsek ellen.

Továbbra is nagy gondot okoz a multirezisztens *Gram*-negatív baktériumok által okozott fertőzések kezelése. Egy 3,5 éves intenzív osztályon fekvő betegeket vizsgáló amerikai tanulmány szerint, a betegek 2%-a kolonizálódott ESBL termelő *E. coli* vagy *K. pneumoniae* törzsszel, és a kolonizáltak közül a betegek negyede fertőződött is az adott baktérium törzsszel (11). Az amerikai honvédségi kórházakban, különösen az

Afganisztánból és Irakból hazatérő sérültekből kitenyészett *A. baumannii* törzseknél, a carbapenem rezisztencia előfordulása 2 év alatt 13%-ról 46%-ra nőtt. A következő kezelésre választható szerrel, ami toxikus mellékhatásai ellenére még hatékonynak számított, a colistinrel szemben is egyre gyakrabban jelennek meg rezisztens törzsek (12). Az Országos Epidemiológiai Központ (OEK) surveillance rendszerében 2010-ben jelentett adatok szerint a magyarországi *E. coli* törzsek 8,1 %-a ESBL termelő, de az intenzív osztályok betegei esetén ez az arány 14,2 %. *A. baumannii* esetén az OEK adatai szerint a carbapenem rezisztens törzsek előfordulási aránya 2010-ben Magyarországon 45,1 %, de az intenzív osztályokon tenyésztett *A. baumannii* törzsek esetén már 60%-ot jelentettek (13). Ugyanakkor az elmúlt négy évben a multirezisztens *A. baumannii* (MACI) fertőzések száma is ugrásszerű növekedést mutatott; 2007-ben a surveillance rendszerben jelentő 78 kórházban 84 betegnél igazolódott MACI fertőzés, 2009-ben 230 fertőzést jelentett 81 kórház, 2010-ben 352 fertőzést jelentett 90 kórház (13).

Számos kutatás folyik a természetben megtalálható antibakteriális szerekkel, mint potenciális antibiotikumokkal kapcsolatban. Antibakteriális hatású peptidok az élővilág minden szintjén előfordulnak, mint az aspecifikus védekezés első résztvevői. Éppúgy jelen vannak, az emlősöknél (14), mint az ízeltlábúaknál (15). Az ismertebb antibakteriális peptidok szerkezetük és hatékonyságuk alapján 5 különböző családba csoportosíthatók. A sokszoros cisztein hidat tartalmazó defensinek anti-*Gram*-pozitív aktivitásúak, a lineáris  $\alpha$ -hélix szerkezetű cecropinek és magaininek *Gram*-pozitív és *Gram*-negatív baktériumok ellen egyaránt hatékonyak, a prolinban gazdag peptidok főként anti-*Gram*-negatív szerek, míg a glicin-gazdag csoport tagjai *Gram*-negatív hatékonyságuk mellett mérsékelt *Gram*-pozitív hatásspektrummal is rendelkeznek. A csoportok között nincsenek éles határok (16). A felemáásszárnyúak alrendjébe tartozó *Podisus maculiventris* antibakteriális peptidje, a thanatin szekvenciája nagyban hasonlít a békákból izolált breveninekéhez. A selyemlepke (*Bombyx mori*) moricin peptidje viszont egyetlen más antibakteriális peptidhez sem hasonlít (16). Összeségében minden antibakteriális peptidről elmondható, hogy a baktériumok membránjához kapcsolódva, vagy azonnali depolarizációt eredményeznek, vagy permeabilitás zavart okoznak. Az erős membránroncsoló vegyületekkel szemben, mint például a magainin, a prolin-gazdag peptidok, ha D-aminósavakat tartalmaznak, veszítenek aktivitásukból. Abból, hogy a konfiguráció a hatékonyságot befolyásolja, arra lehet következtetni, hogy

nemcsak a membránhoz kapcsolódva érik el antibakteriális hatásukat, de valamelyik intracelluláris királis tulajdonságokkal rendelkező makromolekula is a támadáspontjuk (17). A legtöbb prolingazdag antibakteriális peptid ízeltlábúaktól származik, elnevezésük az eredetüket tükrözi, nincs összefüggésben alkotóelemeik szekvenciájával. Amerikai kutatók az európai verőköltő bodobácsból (*Pyrrhocoris apterus*) (**1.ábra**) 1994-ben izolált pyrrhocoricinen (18) végeztek részletes szerkezet-hatásvizsgálatokat (20), melyekbe belevonták a muslicából származó drosocint és a vadméhből származó apidaecint is. Ugyan mindhárom vegyület képes megbontani a bakteriális membrán ionáteresztő egyensúlyát, ezek a peptidek szintén hatnak intracelluláris fehérjékre is. Modern biokémiai vizsgálatokkal kimutatták, hogy a fő célfehérje a 70 kDa nagyságú DnaK hősokk protein, ami az eukariota Hsp70 közvetlen analógjának tekinthető (19). Összehasonlító vizsgálatokkal kiderült, hogy amíg a három vegyület közül a pyrrhocorin dominánsan a hősokk proteinhez kötődik, addig a drosocin fejt ki antibakteriális hatását legerőteljesebben a membrán dezintegrációval. A peptidek molekuláris struktúráját vizsgálva kiderült, hogy az N-terminális szakasz felelős a DnaK kötődésért, míg a C-terminális szakasz a membrán penetrációhoz szükséges. A pyrrhocorin sokáig alapul szolgált új antibiotikumok kifejlesztéséhez, mivel a három vizsgált vegyület közül több jó tulajdonságával is kiemelkedett. A három eredeti vegyület közül a pyrrhocoricinnek volt legerőteljesebb az antibakteriális hatékonysága, a teljes biológiai aktivitásának eléréséhez glikolizáció nem volt szükséges, és a természetes peptid a drosocinhoz hasonlítva egerek szérumban nagyobb stabilitást mutatott (20). A természetben található összes prolingazdag antibakteriális peptid szekvenciájának összehasonlítása és a nem prolingazdag peptidek hatásmechanizmusának figyelembe vétele után készült el az a megtervezett származék, mely erősebbnek bizonyult a membrán destrukcióban, javult az ellenállása a proteolitikus enzimekkel szemben, és megőrizte a bakteriális DnaK-ra gyakorolt hatékonyságát. Ez a tervezett származék az (All Peptides Optimized) A3-APO nevet kapta (21). A névben szereplő A3 kifejezés csak az eluáló oszlop sorszámát, az APO rövidítés pedig arra utal, hogy ez az új vegyület minden prolingazdag antibakteriális peptid minden előnyös tulajdonságát ötvözi magában.

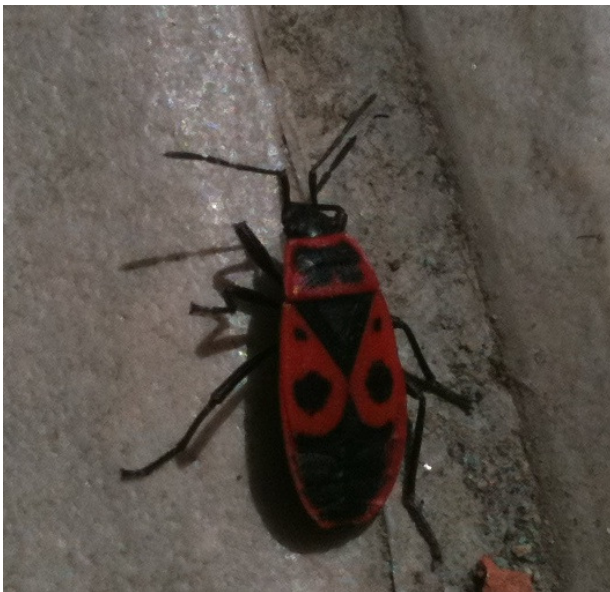
Az A3-APO szerkezeti képlete a **2. ábrán** látható. Az Asp2-Lys3 dipeptid és Tyr6-Leu-Pro-Arg-Pro10 pentapeptid fragmensek elengedhetetlenek a DnaK-hoz kötődésben. Ezek a konzervatív szakaszok (amelyeknek DnaK kötődését a

pyrrhocoricin-alapú vizsgálatok idejéből ismerjük) az A3-APO-ban is megmaradtak, csak az N-terminális végre 3 új aminosav került. Ezek közül a valin-analóg, a természetben nem előforduló 1-amino-ciklohexán-karbonsav (Chex) védi a peptidet az exopeptidázok hasításától, az újonnan beépített arginin és prolin pedig segíti a membrán penetrációt. A C-terminális vég a membrán penetrációban játszik fontos szerepet, ide pozitív töltésű aminosavak kerültek további prolin hozzáadásával. Az arginin és prolin segítik az antibakteriális peptidek áthaladását a baktérium membránján. Az optimalizált 20 aminosavas monomer egy 1,4-diamino-vaajsav gerincre épül fel. A dimer forma tovább növeli a bakteriális membrán roncsoló hatást (21). Ugyan az A3-APO dimer stabil humán és eger szérumban ex vivo, és ezzel a tulajdonságával a tervezők elérték céljukat, egerekbe injektálva a peptid elbomlik, amikor is az egérvérből izolálható degradációs termék, a 20 aminosavból álló Chex1-Arg20, az alapvegyület monomer változata keletkezik (22).

Az A3-APO hatékonynak bizonyult in vitro vizsgálataink során számos *Gram*-negatív baktériummal szemben, ezek egy része más antibiotikumok iránt is érzékeny volt, más részük klinikai vizsgálati anyagokból izolált multirezisztens kórokozó volt. In vivo toxicitási vizsgálatainkkal azt tapasztaltuk, hogy intravénás (iv) adagolás alkalmával jelentkezik a legalacsonyabb dózis esetén toxikus tünet (25 mg/ttkg), ugyanakkor intraperitoneális (ip) adagolás esetén még 4 óránként 3-szor ismételt kezelés után sem jelentkeztek toxikus tünetek 20 mg/ttkg dózisonál. Intramuszkuláris (im) bólus adagolással pedig csak 75 mg/ttkg esetén látszódtott kisméretű és gyorsan elmúló toxikus hatás. Az *E. coli* szisztémás fertőzések kezelésekor ip adagolt 10 mg/ttkg A3-APO legalább olyan eredményt ért el, mint a kontrolkezelésnek alkalmazott 40 mg/ttkg imipenem, ESBL termelő törzs esetén is. Az MBL termelő *A. baumannii* szisztémás fertőzés kezelésében az iv adott 2,5 mg/ttkg A3-APO kis mértékben javította az egerek túlélési arányát a kezeletlen, vagy imipenem kezelt csoporthoz képest. Ugyancsak szisztémás *A. baumannii* fertőzés után az im 5 mg/ttkg A3-APO kezelés viszont hatékonyabbnak bizonyult, mint a 40 mg/ttkg imipenem kezelés. A különböző *A. baumannii* sebfertőzőes kísérletek során bizonyítást nyert, hogy az A3-APO im adagolásával már 5 mg/ttkg dózisban is kivédi a sebfertőzésből kialakuló bakterémiát. A masszív sebfertőzéssel létrehozott szisztémás fertőzésben kiváló gyógyító, antibakteriális hatással bír. Naponta egyszeri 5 mg/ttkg A3-APO adagolással pedig kivédhető a nosokomiális *A. baumannii* sebfertőzés is, számottevően jobban, mint

hasznosító dózisú colistines kezeléssel. Mivel im adagolással az 50 mg/ttkg dózis sem okoz káros, toxikus mellékhatásokat CD-1 egereken, és hatékony kezelések érhetőek el a legsúlyosabb szisztémás fertőzésekben is tized ekkora dózissal, érdemes az A3-APO-val további kutatásokat folytatni, egy klinikumban alkalmazható új antibiotikum megjelenésének reményében.





**1. ábra** *Pyrrhocoris apterus*, verőköltő bodobács, 20-szoros nagyítás, saját felvétel

(H-Chex-Arg-Pro-Asp-Lys-Pro-Arg-Pro-Tyr-Leu-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Pro-Arg-Pro-Val-Arg)<sub>2</sub>-Dab

**2. ábra** Az A3-APO kémiai szerkezete

A DnaK enzimmel szorosán kapcsolódó részletek aláhúzóttak, az eredeti pyrrhocorin vegyületben is megtalálhatók. Az N-terminális végen 1-amino-ciklohexán-karbonsav véd az exopeptidázok hasításától, a C terminális részen 1,4-diamino-vajsav kapcsolja össze a két monomert dimer formává.

### 3. Célkitűzések

1. Munkánk során célunk volt meghatározni, hogy az A3-APO, mint a természetből izolált prolingazdag antibakteriális peptidok mesterségesen tervezett származéka, az alapvegyületekhez képest in vitro milyen spektrumú és erősségű antibakteriális hatással rendelkezik. Ennek érdekében az A3-APO MIC értékét számos vásárolt American Type Culture Collection (ATCC) és klinikai anyagból izolált baktériumtörzsön meghatároztuk.
2. Korábbi farmakokinetikai mérések alapján az A3-APO iv adagolás után az egerek véréből nem izolálható, csak a Chex1-Arg20 monomer. Farmakokinetikai méréseinkkel megcéloltuk megmutatni az A3-APO vérszintjének változását im adagolás után, amely terápiás módszer tűnik ez idő szerint a leghatékonyabbnak.
3. Toxicitási vizsgálatokat végeztünk, hogy megállapítsuk mi az a maximálisan beadható A3-APO dózis, amelynél toxikus hatás nem jelentkezik az állatokon, ez a NOAEL (no observed adverse effect level) érték. Célunk volt meghatározni a NOAEL értéket egyszeri és ismételt ip, egyszeri iv és egyszeri im adagolások után is.
4. Szisztémás *E. coli* fertőzésekben összehasonlító vizsgálatot végeztünk, hogy megállapítsuk a 40 mg/ttkg imipenem in vivo hatását milyen ip dózisú A3-APO kezeléssel lehet ugyanolyan szinten elérni. Ezzel az összehasonlítással a multirezisztens, ESBL termelő *E. coli* infekciók kezelésére szeretnénk az A3-APO-t, mint alternatív kezelési lehetőséget felmutatni.
5. Szisztémás, MBL termelő *A. baumannii* fertőzésben célunk volt megvizsgálni, hogy hatékony-e az A3-APO akár iv, akár im adagolás után.
6. Célunk volt megállapítani, hogy különböző modellekkel, a multirezisztens *A. baumannii* sebfertőzés, és a belőle kialakuló szisztémás fertőzés gyógyítható-e A3-APO im adagolásával.
7. Célul tűztük ki bizonyítani, hogy a naponta egyszer im adagolt 5 mg/ttkg A3-APO megvédi az egereket az általunk *A. baumannii*val kísérletesen előidézett, és az egerek környezetében fellelhető egyéb kontamináns baktériumok által okozott nosokomiális sebfertőzésekkel szemben.

## **4. Anyagok és Módszerek**

### **4.1. Felhasznált baktérium törzsek**

#### **4.1.1. In vitro mérésekhez használt baktérium törzsek**

Az in vitro MIC mérésekhez 13 különböző *Escherichia coli*, 13 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, 5 *Enterobacter cloacae*, 9 *Acinetobacter baumannii*, 5 *Proteus vulgaris*, 3 *Enterococcus faecalis* és 8 különböző *Pseudomonas aeruginosa* törzset használtunk, melyek részben ATCC, részben klinikai anyagból izolált törzsek voltak.

#### **4.1.2. In vivo mérésekhez használt baktérium törzsek**

Az in vivo vizsgálatokhoz az in vitro mérések eredményei alapján olyan törzseket választottunk, melyekkel sikerült a vizsgálati modellnek megfelelő fertőzést a CD-1 egereken létrehozni.

Intraperitoneális fertőzéshez *E. coli* Neumann és 5770, *A. baumannii* BAA-1805 ATCC törzseket használtunk.

A sebfertőzéses modellnél is az *A. baumannii* BAA-1805 baktériumtörzs került felhasználásra, ezt a törzset először egy Afganisztánban sérült kanadai katona sebéből izolálták (23).

Az *E. coli* 5770 Extended Spectrum  $\beta$  Lactamase (ESBL) termelő, az *A. baumannii* BAA-1805 pedig Metallo Beta Laktamase (MBL) termelő törzs.

#### **4.1.3. Általános bakteriológiai módszerek**

A klinikai anyagból izolált baktériumtörzsek azonosítása részben a tenyésztés utáni hagyományos csöves biokémiai eljárásokkal, részben automata identifikáló módszerek használatával történt: ATB, API 20E, API NE, VITEK II, VITEK III (Diagnosticum Zrt). A baktérium törzseket  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on Cryobank (MAST Frank Diagnosztika Kft) rendszerben tároltuk. A törzsek rutinszerű tenyésztését véres agaron

(bioMérieux) végeztük 37 °C-on. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatokhoz Müller-Hinton (MH) (bioMérieux) táptalajt használtunk. A klinikai izolátumok esetén, a fenotípusosan megmutató rezisztencia mechanizmussal rendelkező törzseket kiválasztottuk, és a rezisztenciáért felelős gének jelenlétét PCR-rel igazoltuk. Az így bevizsgált törzseket használtuk fel az in vitro A3-APO érzékenységi vizsgálatokhoz. Amennyiben a kísérlethez meghatározott csíraszámú baktérium szuszpenzióra volt szükség, azt előzőleg elkészített CFU/OD<sub>600</sub> kalibrációs görbék segítségével denzitometriás módszerrel állítottuk be, 1 cm úthosszúságú egyszerhasználatos műanyag küvetákban (GREINER), melyeket a mérés előtt gázsterilizáltunk. Minden törzsre külön kalibrációs görbét használtunk. Ha a kísérletekhez a mérési határ alatti csíraszámra volt szükség, a szuszpenziós töménységet 10<sup>8</sup> CFU/ml-re állítottuk, és ebből a baktérium szuszpenzióból végeztünk hígítást. A kísérletekben felhasznált szuszpenziók baktérium sűrűségét sorozathígításokból történt kioltással és telepképző egység meghatározással ellenőriztük és igazoltuk.

## **4.2. Felhasznált anyagok**

### **4.2.1. Antibakteriális peptidok**

Az A3-APO peptid és a kontroll analógok egy CEM (North Carolina, USA) Liberty típusú automata peptid szintetizátoron standard Fmoc (9-fluorenilmetiloxikarbonil) N-terminális védőcsoport felhasználásával készültek. A peptideket trifluor ecetsavval (TFA) hasították le a gyantáról. A hagyományos víz/acetónitril/TFA rendszerben végrehajtott fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadék kromatográfiás (HPLC) tisztítás után 2 %-os vizes ecetsavas liofilizálás történt, hogy a kromatográfia után fennmaradó oldószerek és trifluorecetsav ionok is eltűnjenek a preparátumból. A kész peptid magas tisztasági fokát mátrix-segített lézer ionizációs és deszorpciós tömegspektrometriával igazolták (24). Az egyes kísérletek ismételt elvégzésekor különböző gyártási sarzsból származó peptideket használtunk, hogy kizárható legyen valamilyen a gyártás során bekerülő kontamináns szer antibakteriális hatása.

A colistin szulfát készítményt (15,000 IU/mg) a Sigma-Aldrich Kft (Budapest, Hungary)-tól vásároltuk.

#### 4.2.2. Egyéb antibiotikumok

Imipenemet az MSD Hungary Merck-től vásároltunk tienamycin-formamidine-monohydrate-sodium-cilastatin formában, amely Tienam néven van forgalomban.

A felhasznált meropenemet az AstraZeneca Hungary Meronem néven meropenem-trihidrát formában forgalmazza.

Amoxicillin a Sigma-Aldrich Kft-től került beszerzésre.

Ciprofloxacinból a Teva Hungary Ciprofloxacin-Human készítményét használtuk.

#### 4.2.3. Egyéb a kezelések során felhasznált anyagok

Na-barbiturátot, dietil étert és Cisplatint, cis-diammineplatinum-dichlorid formában a Sigma-Aldrich Kft-től vásároltunk.

Ketamint Calipsol formában a Richter Gedeon Zrt; xilazint CP-Xylasin A.U.V 2%-os injekció formában a Medicus Partner Kft-től vettünk.

#### 4.3. *In vitro* antibakteriális hatás vizsgálata

Az *in vitro* antibakteriális hatás vizsgálatához 96 lyukú mikrotitrátor lemezt használtunk (Bovimex Hungary Kft). A mikrodilúciós Minimális Inhibitor Koncentráció (MIC) meghatározásának végtérfogata 100 µl volt. *Müller-Hinton* levesben (Biolab) készítettünk  $5 \times 10^5$  CFU /ml csíraszámú baktérium szuszpenziót, melyet a vizsgált antibakteriális szer feles léptékű sorozathígításának 50 µl térfogatához adtunk hozzá. Az antibakteriális szerek hígításának kezdő legmagasabb koncentrációja 128 vagy 64 mg/l volt. A tenyészetek 37 °C-on 16-20 órás rázás nélküli inkubációra kerültek, majd 600 nm-en abszorbancia ( $A_{600}$ ) mérés következett. MIC-nek azt a legalacsonyabb koncentrációt tekintettük, amelynél az inkubáció utáni  $A_{600}$  nem növekedett a kiindulási érték abszorbanciájához képest. Az objektív műszeres mérést a hagyományos MIC méréssel is megerősítettük; 100 µl *Müller-Hinton* levesben feles léptékű hígítást készítettünk a vizsgálandó antibakteriális szerből 256 mg/l kiindulási koncentrációtól 0,5 mg/l-ig. Ehhez az oldathoz adtuk hozzá a 24 órás szilárd táptalajon tenyésztett baktérium törzsek 0,5 McFarland sűrűségű fiziológiás sóoldatban készült

szuszpenziójának 10-10 µl mennyiségét. 24 óra rázás nélküli inkubálás után sötét háttér mellett szabad szemmel a zavarosodást figyelve állapítottuk meg a MIC értékeket. Mindkét módszer után Minimális Baktericid Koncentrációt (MBC) is mértünk. A MIC értéket megelőző eggyel hígabb oldattól kezdve, és minden töményebb mintából 10 µl mennyiséget szilárd *Müller-Hinton* táptalajra oltottunk. MBC-nek azt a legkisebb antibakteriális szer koncentrációt tekintettük, melynél már 24 órás inkubálás után nem jelentek meg telepek a szilárd táptalaj felszínén.

Több baktériumtörzs esetén az A3-APO aktivitást amoxicillin, meropenem és ciprofloxacin aktivitáshoz hasonlítottuk, in vitro mindegyik vegyület MIC értékét meghatározva, hogy az in vivo kísérletekhez használható törzseket és a kontrolkezelés antibiotikumait kiválasszuk.

Az in vivo kísérletekben szereplő baktérium törzseknél meghatároztuk azoknak az antibiotikumoknak a MIC értékét is, amelyeket kontrolkezelésnek használtunk. Így az *E. coli* Neumann és 5770 esetében imipenem, az *A. baumannii* BAA-1805 esetén imipenem és colistin MIC meghatározás is történt.

#### **4.4. In vivo kísérletek**

##### **4.4.1. Felhasznált állatok**

Minden in vivo méréshez CD-1 nőtény egereket használtunk, amiket a Charles River Magyarország Kft-től vásároltunk. Az egerek egységesen 20-25 g testtömegűek voltak a felhasználás időpontjában. Egy-egy „2” típusú ketrecben 3-5 állatot helyeztünk el, alomként puha hánscot használtunk. 21-25 °C közötti állandó hőmérséklet mellett olyan helyiségben voltak a ketrecek, ahol a 12 óránkénti sötét-világos ciklusok változása biztosított volt. Ivóvízhez és száraz rágcsáló eledelhez az állatoknak folyamatos szabad hozzáférést biztosítottunk. A kezeléssel vizsgálatokat az állatok 3 hetes akklimatizációja után kezdtük. Minden állatot csak egy vizsgálathoz használtunk fel, ennek végeztével az állatok eutanáziája 150 mg/ttkg (test tömeg kilogramm) Na-barbiturát felhasználásával, vagy dietil éter belélegeztetésével történt. Az állatok elhelyezése és kezelése a 243/1998 Kormányrendelet az állatkísérletek végzéséről alapján a Semmelweis Egyetem Egyetemi Állatkísérleti Bizottság (EAB) engedélyével, és a Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (MAB) ellenőrzése mellett történt, engedély száma: 399/003/2005.

#### 4.4.2. Toxicitás vizsgálatok

Az A3-APO toxicitásának vizsgálata is többször ismételve, mindig más gyártási sarzsból származó peptid felhasználásával történt, hogy a gyártás és tisztítás során a termékben maradt egyéb szerek toxicitása kizárható legyen. Az A3-APO feloldása minden esetben desztillált vízben történt, az állatok testtömegüknek megfelelően grammonként 10 µl folyadékban kapták meg a különböző töménységben feloldott peptidet.

Először 10, 25, 50 mg/ttkg mennyiségű peptid akut toxicitását vizsgáltuk ip egyszeri adagolás után. Az ismételt adagolás toxicitási vizsgálatához a hatékonysági vizsgálatához használt mennyiségeket; 10, 20 és 40 mg/ttkg dózisokat adtunk ip háromszor ismételve négy óránként.

Az iv toxicitás értékeket 10, 25 és 50 mg/ttkg A3-APO egyszeri adagolása után határoztuk meg.

Az im vizsgálatok során akut toxicitásként először 20, 40, 60 mg/ttkg A3-APO-t kaptak az állatok egy bólusban a bal hátsó comb izomzatukba. Második méréskor a bólusok peptid tartalmát 25, 50, 75 és 100 mg/ttkg-ra emeltük. Ezzel a méréssel párhuzamosan colistin-szulfát akut toxicitását is vizsgáltuk, szintén 25, 50, 75 és 100 mg/ttkg adagban kaptak antibiotikumot a vizsgálatban résztvevő egerek a bal hátsó combjukba.

Az akut toxicitási vizsgálatok során a kezelés után 24 órán keresztül megfigyeltük az egerek viselkedését. Az ismételt adagolás toxicitási vizsgálatokor is az egerek viselkedését figyeltük, de az utoljára kapott kezelés után még 24 óráig. Az állatok viselkedésében a következő jelenségeket figyeltük meg: összehúzódtott szemrés megjelenése, szőrzet csapzottsága, a mozgás, az étkezés és ivás szüneteltetése, összebújás csoportokba, remegés, aluszékonyság és elhalálozás. A túlélő állatokat a megfigyelési idő elteltével túlaltatás után felboncoltuk, belső szerveiket makroszkóposan megvizsgáltuk, hogy toxikus jel látszódik-e rajtuk.

#### 4.4.3. Farmakokinetikai vizsgálatok

A farmakokinetikai vizsgálatokhoz 100 µg A3-APO (5 mg/kg) peptidet 200 µl steril foszfát pufferált sóoldatban (PBS) (pH 7.2) oldottunk fel, amit egyszeri adagban

egészséges 20 g tömegű CD-1 nőtény egerek bal hátsó combjába im injektáltunk be. Minden mérési időponthoz négy egértől vettünk vért, de egy-egy egeret csak két időpontban használtunk. A vérvétel az egerek szemzúgából üveg kapilláris (Clinitubes WIP Kft Budapest) használatával történt. A peptid beadásakor (0 perc), majd 5, 15, 45, 90 és 120 perccel a kezelés után 100-100 µl vér levétele történt. A levett mintákat azonnal 5,000 rpm fordulatszámon lecentrifugáltuk, hogy a plazmát a vér sejtes elemeitől elválasszuk, majd a plazma 60 µl mennyiségéhez 20 µl triklór ecetsav (TCA) 15%-os vizes oldatát adtuk. 12,000 rpm fordulatszámon ismételt centrifugálással a fehérjeket kicsaptuk. A felülúszót két részre osztottuk. Egyrészt a peptid bomlási termékeit vizsgáltuk, 0.5 µl felülúszó Voyager matrix-segített lézer ionizációs/deszorpciós tandem tömeg spektrométerre került (MALDI-TOF/TOF-MS, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) matrixként α-ciano-4-hidroxifahéjsavat használva. Az abszorbancia mérés 214 nm-en történt.

A felülúszó másik felének kvantitatív analízisére fordított fázisú HPLC-t (high performance liquid chromatography, nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia) használtunk. 210 µl oldatot egy olyan C18 oszlopra vittünk fel, amit 10 ng-10 µg A3-APO peptiddel kalibráltunk.

#### **4.4.4. Hatékonysági vizsgálatok *Escherichia coli* szisztémás fertőzések kezelésében**

Az első vizsgálat alkalmával az *E. coli* Neumann baktériumtörzsből  $1,1 \times 10^7$  CFU/ttkg mennyiségű baktériumot kaptak az egerek ip. Csoportonként 5 állatot vizsgáltunk, az első csoport nem kapott antibakteriális kezelést, a második csoport 40 mg/ttkg ip imipenem kezelésben részesült, a harmadik csoport 2,5 mg/ttkg, a negyedik csoport egerei 10 mg/ttkg, az ötödik csoport egyedei 20 mg/ttkg A3-APO-t kaptak ip. Az antibakteriális kezelések a fertőzés után 30 perccel, majd 4 és 8 óra múlva történtek. Öt napig tartó megfigyelés során feljegyeztük a túlélő egyedek számát.

A második kísérletben az *E. coli* 5770, ESBL termelő törzset használtuk. A baktériumot  $1,6 \times 10^8$  CFU/g mennyiségben fiziológias dextrán oldatban kapták az állatok ip (25). A kezelés a fertőzés után 4, 8 és 12 órával történt. Csoportonként 10 egeret használva kezeletlen kontrol, 2,5 mg/ttkg A3-APO, 5 mg/ttkg A3-APO, 10 mg/ttkg A3-APO és 40 mg/ttkg imipenem kezelés hatékonyságát hasonlítottuk össze.



Minden kezelés előtt és az utolsó kezelés után 4 órával csoportonként 3-3 egér farokvénájából 10 µl vért vettünk, vér baktérium csíraszám meghatározásra. A kísérlet után a túlélő egyedek viselkedését még 5 napig megfigyeltük.

A harmadik kísérletsorozat esetén három nappal az antibakteriális hatékonysági vizsgálat kezdete előtt az állatok egyszeri dózisban 18 mg/ttkg cisplatint kaptak ip. Az állatokat ip.  $1,2 \times 10^8$  CFU/g *E. coli* 5770 baktériummal fertőztük. A kezeletlen kontrol, a 10 mg/ttkg A3-APO, a 20 mg/ttkg A3-APO és a 40 mg/ttkg imipenem kezelt csoportban is 10-10 egér volt. Minden kezelés előtt és az utolsó kezelés után 4 órával csoportonként 3-3 egér farokvénájából 10 µl vért vettünk, vér baktérium csíraszám meghatározásra. A kísérlet után a túlélő egyedek viselkedését még 5 napig megfigyeltük.

A második és harmadik kísérletet legalább két alkalommal megismételtük. Az ismétlések során kapott eredményekből átlagot és szórást számoltunk.

#### **4.4.5. Hatékonysági vizsgálatok *Acinetobacter baumannii* szisztémás fertőzések kezelésében**

Az A3-APO antibakteriális hatékonyságát *A. baumannii* szisztémás fertőzésben három különböző modellben vizsgáltuk. Minden kísérletsorban csoportonként 7-7 egér volt.

Az első vizsgálat során a CD-1 nőtény egereket ip  $4 \times 10^7$  CFU/g *A. baumannii* BAA-1805 baktériummal fertőztük, majd 4, 8 és 12 órával a fertőzés után 2,5 mg/ttkg imipenem, illetve A3-APO kezelést kaptak iv.

A második próba során az egereket  $2 \times 10^6$  CFU/g mennyiségű baktériummal fertőztük ip, majd 4, 8, 12 órával a fertőzés után 5 mg/ttkg A3-APO, illetve 40 mg/ttkg imipenem kezelést kaptak im.

A harmadik modellben  $3 \times 10^7$  CFU/g *A. baumannii* ip fertőzés után 4, illetve 8 órával 5 mg/ttkg A3-APO vagy 40 mg/ttkg imipenem im kezelésben részesültek az egerek.

Az antibakteriális kezelések helyének sorrendje minden esetben a következő volt: jobb majd bal hátsó comb, háromszori kezelés esetén utoljára jobb első comb izomzata. Mindhárom kísérletnél a kezelés befejeztével még 24 óráig megfigyeltük az állatok viselkedését, és a túlélők számát időben feljegyeztük. Vér baktérium csíraszám

meghatározáshoz minden kezeléskor és az utolsó antibakteriális kezelés után négy órával az egerek farokvénájából 10 µl vért vettünk.

#### 4.4.6. Hatékonysági vizsgálatok különböző sebfertőzés modellekben

Mindegyik kísérlet sorozat esetén standard méretű égett sebet hoztunk létre a vizsgált egerek hátán. Az állatokat elaltattuk 6 mg/kg ketamin és 1 mg/kg xylazin felhasználásával, és leborotvált bőrükön égett sebet hoztunk létre egy 11 mm átmérőjű 90 °C-ra izzított 1 g tömegű fém súly hozzáérintésével (26). A súly egy éppen már nem feszülő zsinegen lógva ért hozzá az egér bőréhez, így csak a saját súlya okozott a seb létrehozásakor nyomást. A behatási idő 2 perc volt. A sebek fertőzése a seb kialakítása után 3 órával történt különböző mennyiségű *A. baumannii* BAA-1085 baktériummal. A különböző kísérletek más-más időpontjaiban farokvénából vett vérből, és a kimetszett sebekből baktérium csíraszámot határoztunk meg. A vérből tömény kioltást is készítettünk így a baktériumok kimutathatósági szintje  $10^2$  CFU/ml. A kimetszett sebeket lemértük, felaprítottuk kb. 2 mg nagyságúakra, homogenizáltuk, majd 1-1 mg mennyiséget töményen, a további mennyiségeket fiziológiás sóoldatban feloldva oltottunk ki csíraszám meghatározáshoz. A baktérium kimutathatóság szintje így  $10^1$  CFU/mg volt.

„A” kísérlet sorozat: Az alacsony csíraszámú *A. baumannii* naponta ismételt fertőzés és A3-APO napi kezelések modellt használtuk annak vizsgálatára, hogy a baktérium által okozott nozokomiális fertőzések az A3-APO-val kivédhetők-e.  $2 \times 10^3$  CFU/seb/nap mennyiségben *A. baumannii* BAA-1805 baktériummal fertőztünk 5 egymás utáni napon 6 egeret. Az első bakteriális megfertőzés az égett seb kialakítása után 3 órával történt. Három egér 5 mg/kg A3-APO kezelést kapott közvetlen a fertőzés után im a 0., 1., 2., 3., és 4. napokon. Három órával a fertőzés után, valamint a 2. és 4. napon vért vettünk az állatok farokvénájából vér baktérium csíraszám meghatározáshoz. Az 5. napon dietiléter inhalációval az egereket túlaltattuk, sebeiket baktérium csíraszám meghatározáshoz kimetsztük. A kontroll csoport 3 egerének sebet fertőztük naponta, de semmilyen antibakteriális kezelést nem kaptak.

„B” kísérlet sorozat: Egyszeri magas csíraszámú *A. baumannii* fertőzés esetén összehasonlítottuk egyszeri A3-APO, imipenem és colistin kezelés hatékonyságát a kialakult bakteriémia és a fertőzött seb gyógyításában.  $7.2 \times 10^9$  CFU/seb *A. baumannii*

BAA-1805 baktériummal 28 egér égett sebet fertőztük a fent leírt módszerrel. Az egereket négy csoportra osztottuk. Az első 7 tagú csoport állatai nem kaptak semmilyen antibakteriális kezelést, a második csoport 5 mg/kg A3-APO-t, a harmadik 5 mg/kg colistin, végül a negyedik csoport 40 mg/kg imipenemet kapott egyszeri dózisban közvetlenül a fertőzés után. 1, 2, 3 és 4 órával a kezelés után az egerek farok vénájából vért vettünk baktérium csíraszám méréshez. A túlélő állatokat az 5. napon lefényképeztük, dietil éter túlaltatással elpusztítottuk, sebeiket kimetszettük és meghatároztuk a seb baktérium csíraszámot.

„C” kísérlet sorozat: Extrém magas csíraszámú egyszeri *A. baumannii* fertőzés, naponta ismételt A3-APO, imipenem és colistin kezelés 5 napig.  $2 \times 10^{11}$  CFU/seb *A. baumannii* BAA-1805 baktériummal fertőztük 28 egér égett sebet a 0. napon. Az egereket négy csoportra osztottuk. Az első 7 egyedből álló csoport nem kapott semmilyen antibakteriális kezelést. A következő csoport 5 mg/ttkg A3-APO, a harmadik csoport 5 mg/ttkg colistin, a negyedik pedig 40 mg/kg imipenem kezelést kapott im a 0., 1., 2., 3., és 4. napon a fertőzéstől számítva. A túlélő egereket dietil éterrel túlaltattuk az 5. napon, sebeiket kimetszettük, megmértük a sebek baktérium csíraszámát.

Az A3-APO hatása a nem fertőzött égett sebeken: Az égett sebet létrehozása után nyolc egér esetén nem fertőztük be baktériummal, de négyen semmilyen kezelésben sem részesültek, míg a másik négy egér az égetés után 3 órával és az azt követő 4 egymás utáni napban 5 mg/ttkg A3-APO-t kapott im. Az ötödik napon az állatokat dietil éter belélegeztetésével túlaltattuk, a sebeiket szövettani vizsgálathoz kimetszettük, pH 7.4 mellett 10%-os pufferolt formaldehid oldatba helyeztük a kivágott szövetdarabokat. 24 órás fixálás után a mintákat etanollal és methylbenzoáttal dehidráltuk 1 órán keresztül, majd a szövetdarabokat xylenebe áthelyeztük és paraffinba ágyasztuk. 6 micron vastagságú paraffin metszeteket készítettünk, majd deparaffinálás után hematoxylin eosinnal megfestettük. Zeiss fénymikroszkóp segítségével fényképeket készítettünk a szövettani metszetekről 100-szoros végső nagyításban.

#### **4.5. Statisztikai számítások**

A statisztikai értékelés számításai a STATISTICA szoftver 10 verziójával (StatSoft, Inc. 2011.) készültek. Az in vivo kísérletek túlélési adatait a Gehan's

Wilcoxon teszttel, a csíraszám változásokat két mintás  $t$ -próbával hasonlítottuk össze. A számolt  $p$  érték az a valószínűség, amellyel a próbastatisztika a talált, vagy annál nagyobb értéket vesz föl, amennyiben a nullhipotézis igaz, vagyis pusztán a véletlen ingadozásnak tulajdoníthatóan. Minél kisebb ez a  $p$  érték, annál kisebb a valószínűsége, hogy a véletlen műveként vegyen föl legalább akkora értéket, amekkorát találtunk, vagyis annál biztosabbak lehetünk benne, hogy az nem a véletlen következménye, hanem valóságos eltérésé. Akkor minősítjük a különbséget statisztikai értelemben szignifikánsnak, ha  $p < 0,05$ .

## 5. Eredmények

### 5.1. *In vitro* antibakteriális hatékonyság

Mind az 5 különböző *Proteus vulgaris*, 3 *Enterococcus faecalis* és 7 *Pseudomonas aeruginosa* törzs esetén az A3-APO MIC értéke 64 mg/l-nél nagyobb volt. 1 *P. aeruginosa* törzs esetén a MIC 64 mg/l volt. Az MBC érték mindegyik törzs esetén 256 mg/l fölött volt.

Az *Escherichia coli* törzsekre vonatkozó MIC/MBC értékek a következőképpen alakultak: 2 mg/l / 32 mg/l: 1 törzs, 4 mg/l / 32 mg/l: 2 törzs, 8 mg/l / 64 mg/l: 3 törzs, 16 mg/l / 64 mg/l: 2 törzs, 32 mg/l / 256 mg/l: 3 törzs, 64 mg/l / 256 mg/l: 1 törzs és 1 törzs esetén nagyobb, mint 64 mg/l / 256 mg/l.

A *Klebsiella pneumoniae* törzsek érzékenysége (MIC/MBC) is hasonló volt A3-APO iránt: 1 törzs: 4 mg/l / 16 mg/l, 2 törzs: 8 mg/l / 64 mg/l, 5 törzs: 16 mg/l / 64 mg/l, 2 törzs: 32 mg/l / 128 mg/l, 1 törzs: 64 mg/l / 128 mg/l és 2 törzs nagyobb, mint 64 mg/l / 256 mg/l értékkel bírt.

A vizsgált két *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* egyiknél 8 mg/l / 32 mg/l, a másikonál 32 mg/l / 128 mg/l voltak az A3-APO MIC/ MBC értékek.

A vizsgált *Enterobacter cloacae* törzsek közül egynek 4 mg/l / 32 mg/l, háromnak 8 mg/l / 64 mg/l és az utolsónak 16 mg/l / 128 mg/l volt az A3-APO minimális inhibitor/ baktericid koncentrációja.

9 különböző *Acinetobacter baumannii* törzsnél határoztuk meg az A3-APO MIC/MBC értékét, háromnál 32 mg/l / 256 mg/l, háromnál 64 mg/l / 256 mg/l, háromnál több mint 64 mg/l / 256 mg/l volt.

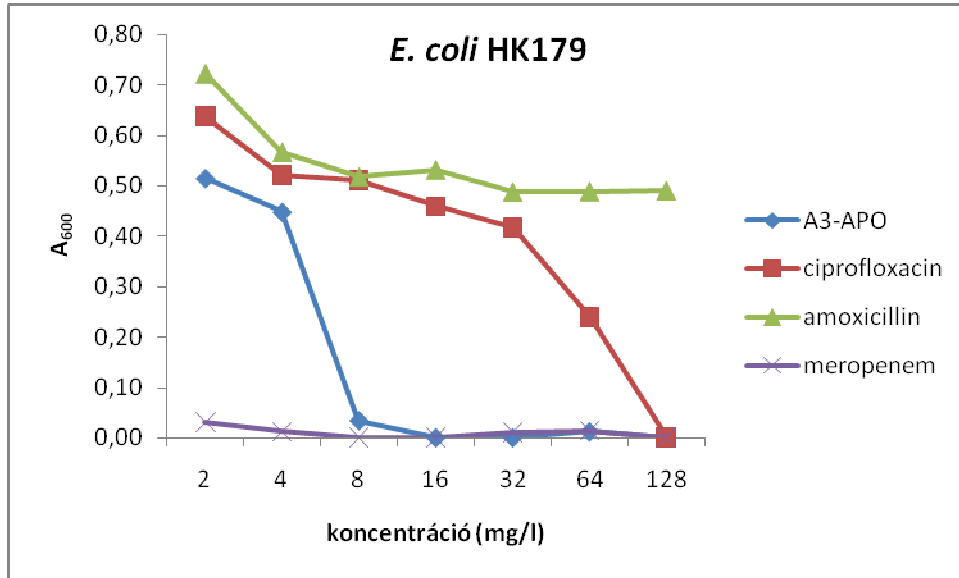
Az *E. coli* HK 179 törzs esetén nemcsak az A3-APO, hanem másik három antibakteriális szer MIC értékét is meghatároztuk. A **3. ábra** mutatja, hogy az inkubáció 20. órájában a vizsgált antibakteriális szerek különböző koncentrációi közül melyik gátolta a baktérium szaporodását, ahol változatlan maradt a kezdeti 600 nm-en mérhető abszorbancia. Az *E. coli* HK 179 törzsnél az ampicillin MIC értéke nagyobb, mint 128 mg/l, a meropenemé 2 mg/l, a ciprofloxaciné is nagyobb, mint 128 mg/l és az A3-APO-é 8 mg/l volt.

Az *in vitro* MIC meghatározás eredményeit a **2. táblázat** foglalja össze.

Az in vivo mérésekhez használt baktériumtörzsek esetén meghatároztuk a kontroll kezelésnek használt antibiotikumok MIC értékeit is, *E.coli* Neumann imipenem MIC értéke 0,5 mg/l, *E.coli* 5770 imipenem MIC értéke 1 mg/l volt. Az in vivo kísérletbe vont *A. baumannii* BAA-1805 imipenem MIC értéke 32 mg/l, colistin MIC értéke 0,5 mg/l volt.

**2. Táblázat.** Különböző baktérium törzsekre vonatkozó A3-APO MIC értékek (mg/l)

Baktérium faj (vizsgált törzsek száma)	MIC mg/l (törzsek száma)
<i>Proteus vulgaris</i> (5)	>64 (5)
<i>Enterococcus faecalis</i> (3)	>64 (3)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (8)	>64 (7), 64 (1)
<i>Escherichia coli</i> (13)	2 (1), 4 (2), 8 (3), 16 (2), 32 (3), 64 (1), >64 (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (13)	4 (1), 8 (2), 16 (5), 32 (2), 64 (1), >64 (2)
<i>Salmonella enterica</i> (2)	8 (1), 32 (1)
<i>Enterobacter cloacae</i> (5)	4 (1), 8 (3), 16 (1)
<i>Acinetobacter baumannii</i> (9)	32 (3), 64 (3), >64 (3)



**3. ábra.** A 20 órás *E.coli* HK 179 tenyészet 600 nm-en mért abszorbanciája A3-APO, ciprofloxacin, amoxicillin és meropenem koncentrációk függvényében.

A *E. coli* HK 179 törzsre vonatkozó MIC értékek: ampicillin >128 mg/l, meropenem 2 mg/l, ciprofloxacin >128 mg/l és A3-APO 8 mg/l.

## **5.2. In vivo vizsgálatok eredményei**

### **5.2.1. Toxicitási vizsgálatok eredménye**

Elsőként 10, 25, 50 mg/ttkg mennyiségben ip egyszeri adagban adott peptid akut toxicitását vizsgáltuk. 10 mg/ttkg adagnál semmilyen kóros reakció nem volt az egereken tapasztalható. 25 mg/ttkg A3-APO egyszeri ip adagolása után az egerek csoportokban összebújva helyezkedtek el, 2-3 órán keresztül, mind mozgásukban, mind evés-ivás terén lecsökkent az aktivitásuk. 50 mg/ttkg A3-APO egyszeri ip dózistól az állatok elpusztultak.

Az A3-APO ip ismételt adagolás toxicitási vizsgálatához a hatékonysági vizsgálatokhoz használt mennyiségeket; 10, 20 és 40 mg/ttkg dózisokat adtunk háromszor ismételve négy óránként. A 3 x 20 mg/ttkg ismételt dózis nem okozott a vizsgált állatokban semmilyen toxikus tünetet, de a 40 mg/ttkg háromszor ismételt dózis után, bár túléltek a kezeléseket az egerek, boncolási leletként esetükben számos belső vérzést találtunk.

Az iv toxicitás értékeket 10, 25 és 50 mg/ttkg A3-APO egyszeri adagolása után határoztuk meg. 50 mg/ttkg A3-APO iv adagolás során az állatok 2 percen belül mind elpusztultak. Boncolásuk során itt is számos belső vérzést találtunk. 25 mg/ttkg iv dózis után is elájultak az egerek, de 8 perc eszméletvesztés után magukhoz tértek, és 10 perccel a kezelés után viselkedésükben már semmilyen kóros nem volt tapasztalható. Boncolásukkor makroszkópos kóros eltérést nem találtunk. 10 mg/ttkg iv A3-APO nem okozott toxikus hatást az állatokon, sem viselkedésükben, sem bonctani leletükben.

Az im vizsgálatok során akut toxicitásként először 20, 40, 60 mg/ttkg A3-APO-t kaptak az állatok egy bólusban a bal hátsó comb izomzatukba. Bár közvetlen a peptid beadása után a dózistól függetlenül az állatokon látszott, hogy mozgásuk lelassult, a bal hátsó lábukat nem mozdították, állapotuk gyorsan rendeződött, tünetük hamar megszűnt. Valószínűleg a peptid előállításánál trifluór ecetsav maradhatott a preparátumban helyi diszkomfort érzést, vagy fájdalmat eredményezve. Ezt az A3-APO sarsot újra liofilizáltuk hígított ecetsav oldatból, majd az antibakteriális hatásvizsgálat során felhasználtuk. Ekkor már nem volt semmilyen káros hatás tapasztalható.



Második méréskor a bólusok peptid tartalmát 25, 50, 75 és 100 mg/ttkg-ra emeltük. Ezzel a méréssel párhuzamosan colistin-szulfát akut toxicitását is vizsgáltuk, 5, 25 és 50 mg/ttkg adagban. Az A3-APO nem okozott szisztémás toxikus hatást 25 mg/kg vagy 50 mg/kg dózisban sem. Az első jel mely káros mellékhatásra utalt 75 mg/kg dózisonál jelentkezett, itt egy egér szeme beszűkült a háromtagú csoportból. 100 mg/ttkg adagnál a csoport mindhárom egerén súlyos rosszullét tünetei látszódtak, szőrük csapzott volt, gubbasztva összebújtak, nem mozogtak, nem ettek és nem ittak. Minden egér állapota 3 órán belül rendeződött. Alacsony dózisban, a szigorúan tisztított A3-APO intramuscularisan adva semmilyen káros mellékhatást nem eredményezett, a nagyobb 75 mg/ttkg és 100 mg/ttkg dózisok az egerek viselkedésén látható toxikus jelet váltottak ki, de bonctani eltérést egyik dózis sem okozott.

A colistin im toxicitását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a gyógyszer már 25 mg/ttkg mennyiségben adva is két egernél kisebb toxikus tüneteket (összehúzott szemhéj, csoportban gubbasztás) idézett elő, 50 mg/ttkg-nál pedig súlyos rosszullét volt tapasztalható a csoport minden tagján. A colistinnel kezelt állatok fizikális állapota is rendeződött három óra elteltével, de mind a 25, mind az 50 mg/ttkg dózis colistin után, a boncoláskor belső vérzéseket találtunk.

Intraperitonealis adagolás esetén az A3-APO-nak egyszeri dózisban adva 50 mg/ttkg a letális dózisa, nem letális toxikus hatást tapasztaltunk egyszeri 25 mg/ttkg bólus adag esetén is. Ezzel összhangban van a háromszor ismételt 40 mg/ttkg-nál tapasztalt belső vérzéses tünet is. Azt a határértéket ahol káros hatás nem volt tapasztalható, NOAEL ip adagolásnál 20 mg/ttkg-nál határoztuk meg, ez az érték az egyszeri adagolásra is természetesen igaz, bár a háromszori ismételt dózis esetén állapítottuk meg.

Iv egyszeri adagolással is 50 mg/ttkg-nál tapasztaltuk a letális dózist, míg a NOAEL értéket 10 mg/ttkg-ban állapítottuk meg. A fertőzőes vizsgálatok iv kezelésekor 2,5 mg/ttkg dózist 4 óránként 3-szor ismételve az egereken káros jelet nem tapasztaltunk.

Im egyszeri alkalmazás után a NOAEL értéket 50 mg/ttkg dózisonál tapasztaltuk. 5 napon keresztül naponta egyszer alkalmazott 5 mg/ttkg A3-APO esetén a kísérletben részt vevő egereken toxikus jeleket nem tapasztaltunk (**3.táblázat**).

**3. Táblázat.** Az A3-APO letális dózisa és NOAEL értéke CD1 egereken különböző beadási módok után mg/ttkg értékben

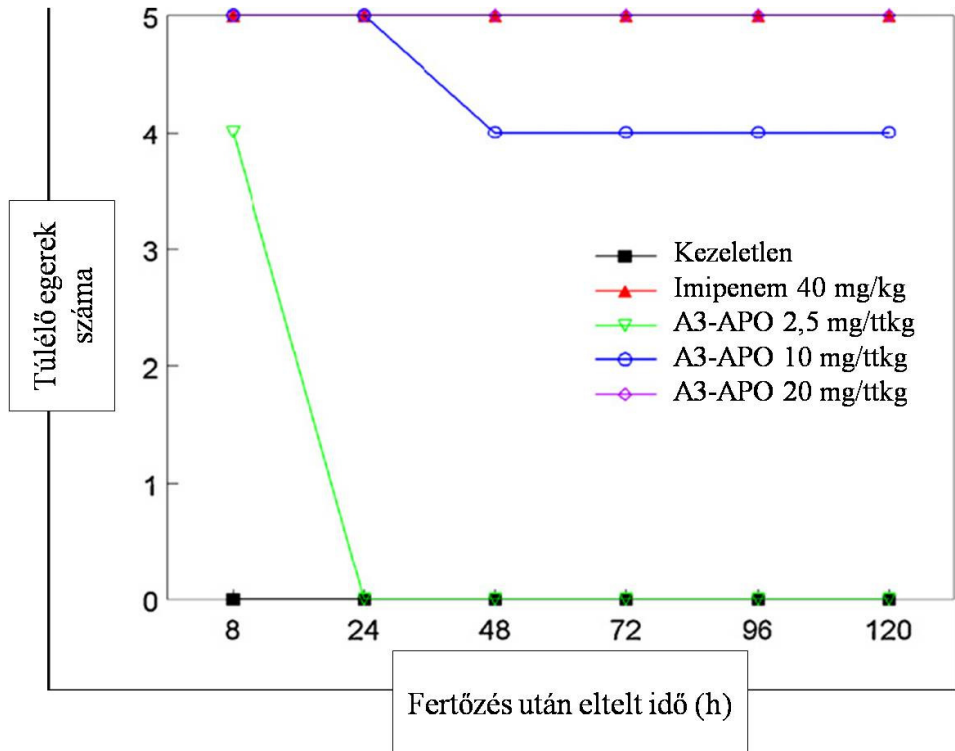
Adagolás módja	NOAEL mg/ttkg	Letális dózis mg/ttkg
intraperitonealis	20	50
intravenas	10	50
intramuscularis	50	> 100

### 5.2.2. Farmakokinetikai vizsgálat eredménye

Egyszeri 5 mg/ttkg A3-APO intramuszkuláris adagolása után az egerek savójából az antibakteriális peptid beadása utáni 0 perc-2 óra intervallumban nem sikerült szabad peptidet kimutatni, fehérjekicsapószerként TCA-t felhasználva.

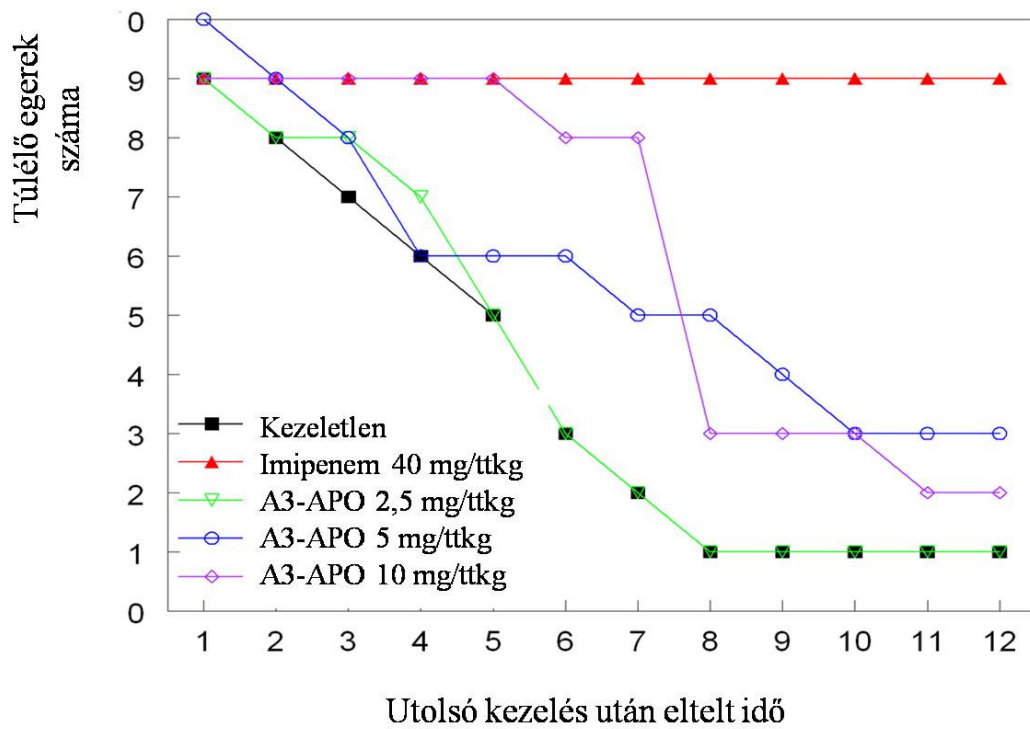
### 5.2.3. *E. coli* szisztémás fertőzés kezelése

Az első vizsgálatkor a gyógyszeriparban használatos bakteriémia kezelés modellt használtuk. A terápiára alkalmazott szert az állatok először 30 perccel, majd 4 és 8 órával az *E. coli* Neumann ip fertőzés után kapták szintén intraperitoneálisan. Ez a 30 perces időintervallum elegendő a baktériumok egész szervezetben történő egyenletes eloszlásához. A kísérletben csoportonként 5-5 egeret használtunk. A kezeletlen csoport egerei mind elpusztultak a 8. és 10. óra között, a 2,5 mg/ttkg adagú peptid kezelés is hatástalan volt, a csoport egy tagja sem élte túl a fertőzés utáni 24 órát. Ugyanakkor a 10 mg/ttkg és a 20 mg/ttkg adagú A3-APO kezelés 80 illetve 100 %-os hosszútávú (5 megfigyelési nap) túlélést biztosított. A fertőzés ilyen korai stádiumából indított kezeléssel imipenemből a 100%-os hatásos dózis, az ED<sub>100</sub> (100 % effective dose), 5 mg/ttkg-nál határozható meg, de a kísérletben a klinikai fertőzések esetén alkalmazott 40 mg/ttkg imipenem terápiát használtunk. A 40 mg/ttkg imipenem terápia is teljesen sikeres volt (**4. ábra**). A kezeletlen csoporthoz képest nemcsak az imipenem és 20 mg/ttkg A3-APO kezelés túlélésre gyakorolt hatása esetén mondható ki a szignifikáns különbség, a 10 mg/ttkg A3-APO is szignifikánsan javította a túlélők számát a kezeletlen csoporthoz képest,  $p=0,00467$ . Ugyanakkor nincs szignifikáns különbség a 10 mg/ttkg A3-APO és a 40 mg/ttkg imipenem túlélésre gyakorolt hatása között,  $p=0,94058$ .



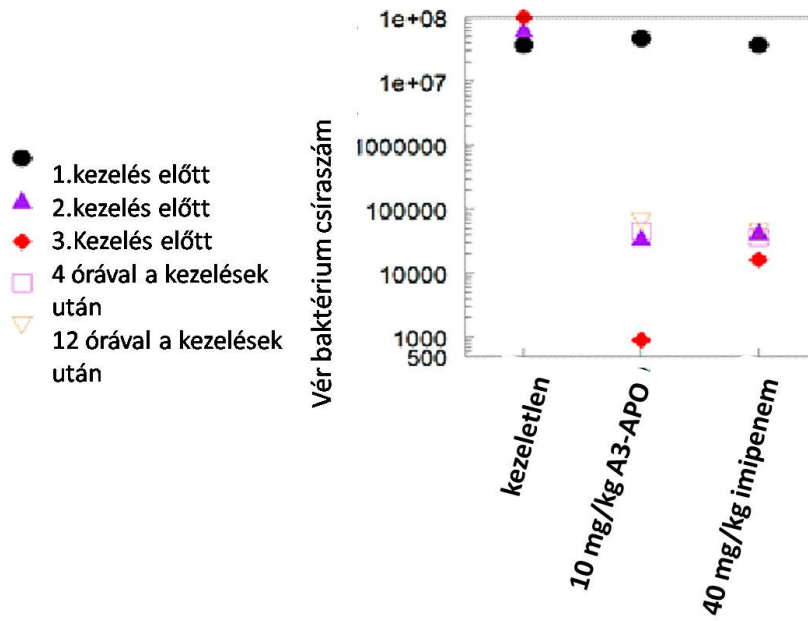
**4. ábra.** CD-1 egerek túlélési görbéje *E.coli* Neumann ip fertőzés után különböző dózisú A3-APO és imipenem kezelés mellett

A második kísérlet során mivel az emberi megbetegedések esetén is ritka, hogy a fertőzött személy közvetlen a mikroba szervezetbe jutása után célzott kezelésben részesüljön, a fertőzött egerek gyógyítására is olyan modellt alkalmaztunk, hogy csak négy órával a fertőzés kialakítása után kezdtük a kezelést.  $1,6 \times 10^8$  CFU/g mennyiségben *E. coli* 5770 baktériummal fertőztük az egereket ip, de a baktériumot fiziológias dextrán oldatban kapták. A dextrán tartalommal az volt a célunk, hogy a peritoneális makrofágok fagocitáló képességét ezzel telítsük, és így megakadályozzuk a hirtelen kialakuló szepszist és szeptikus sokk állapotot (25). Csoportonként 10 egeret vizsgálva összehasonlítottuk a 2,5; 5 és 10 mg/ttkg A3-APO valamint a 40 mg/ttkg imipenem hatékonyságát. A kezeletlen kontrol csoportból a fertőzés utáni 19. órában (korai túlélés) 2 (20%), a 25. órában 1 (10%) egér élt, ez az egy egyed a megfigyelés 5. napjáig is túlélte. Az imipenem kezelésben részesült állatok közül a fertőzés utáni 13. órában egy elpusztult, de 9 további kezelése nélkül is életben maradt 5 megfigyelési napig. Az A3-APO korai túlélésre gyakorolt hatása dóziszfüggőnek bizonyult, a 19. órában 2,5 mg/ttkg esetén a túlélő egerek száma 2 (20%), 5 mg/ttkg mellett 5 (50%) egér élt, 10 mg/ttkg A3-APO kezelés után pedig 8 (80%) maradt életben. Gehan's Wilcoxon teszttel számolva, az A3-APO 10 mg-os kezelés, és a kezeletlen csoport túlélési görbéje szignifikánsan különbözik egymástól,  $p=0,02222$ . A korai túlélést vizsgálva az imipenem és a 10 mg-os A3-APO antibiotikus kezelés hatásában nincs különbség,  $p=0,60495$ . A 25. órában már nem ítéhető meg a késői túlélés alapján az A3-APO antibakteriális hatékonysága, itt a 2,5 mg/ttkg csoportból 1, az 5 mg/ttkg csoportból 3, a 10 mg/ttkg csoportból 2 állat maradt életben. Az A3-APO 10 mg-os kezelés késői túlélésre gyakorolt hatása sem különbözik szignifikánsan a kezeletlen csoportétól,  $p=0,32897$  (**5. ábra**).



**5. ábra.** CD-1 egerek túlélési görbéje *E. coli* 5770 ip fertőzés utáni különböző dózisu A3-APO és 40 mg/ttkg imipenem kezelés után.

Ugyanebben a kísérletben az egerek farokvénájából vett vérminták baktérium csíraszámát sugallja, hogy bár hatékony az antibakteriális kezelés, a nagy mennyiségű hirtelen felszabaduló endotoxin elpusztítja az állatokat (27, 28). Minden időpontban minden csoportból 2-2 állattól vettünk vért. A kezeletlen csoport vérében a fertőzés utáni negyedik órában (a többi csoportban az antibakteriális kezelés kezdete) a baktérium csíraszám  $10^7$  CFU/ml nagyságrendű ( $1,2 \times 10^7$ ;  $4,6 \times 10^7$ ), a 12. órára már  $10^8$ -ra emelkedik ( $5,1 \times 10^8$ ;  $6,3 \times 10^8$ ). A 10 mg/ttkg A3-APO első kezelés hatására a fertőzés 8. órájában a vér baktérium csíraszámát már kevesebb, mint  $10^5$  CFU/ml ( $8,1 \times 10^4$ ;  $1,1 \times 10^5$ ), ami a második kezelés hatására, a 12. órára a kimutathatóság szintje ( $10^3$  CFU/ml) alá csökkent. A kezelések felfüggesztése után a kísérlet 19. és 25. órájában a 10 mg/ttkg A3-APO kezelt csoport egereinek vérében újra megemelkedett a baktérium csíraszám  $10^4$  CFU/ml értékre (19. óra:  $1,6 \times 10^4$ ;  $7,2 \times 10^4$ ; 25. óra:  $4,7 \times 10^4$ ;  $5,9 \times 10^4$ ). A 40 mg/ttkg kezelés imipenem hatására az első dózis után a vér baktérium csíraszámát  $10^5$  CFU/ml értékű ( $2,3 \times 10^5$ ;  $9,1 \times 10^5$ ), a második dózis hatására csak  $10^4$ -re csökken ( $2,2 \times 10^4$ ;  $4,8 \times 10^4$ ), de a kísérlet végéig a kezelések felfüggesztése után is ennyi marad ( $2,7 \times 10^4$ ;  $3,9 \times 10^4$ ) (**6. ábra**). A kezeletlen és az A3-APO 10 mg/kg-os csoport csíraszámának összehasonlítása a 12. óráig kétmintás t-próbával számolva  $p = 0,0109$  értéket mutat, vagyis a két csoportban a 12. órában a csíraszám szignifikánsan különböző. Imipenem 40 mg/kg és az A3-APO 10 mg/kg-os kezelés csíraszámának összehasonlítása a 4-12. óra között kétmintás t-próbával számolva  $p = 0,1204$ , vagyis a két csoportban a 12. órában a csíraszám szignifikánsan nem különbözik egymástól. A 10 mg/kg A3-APO ugyanolyan szignifikánsan hatásosan csökkentette a vér baktérium csíraszámát, mint a 40 mg/kg imipenem kezelés.



**6. ábra.** CD-1 egerek vér baktérium csíraszama a kezeléseik időpontjaihoz viszonyítva  $1,6 \times 10^8$  CFU/g *E. coli* 5770 ip. fertőzés után kezeletlen, 10 mg/ttkg A3-APO és 40 mg/ttkg imipenem kezelés hatására.

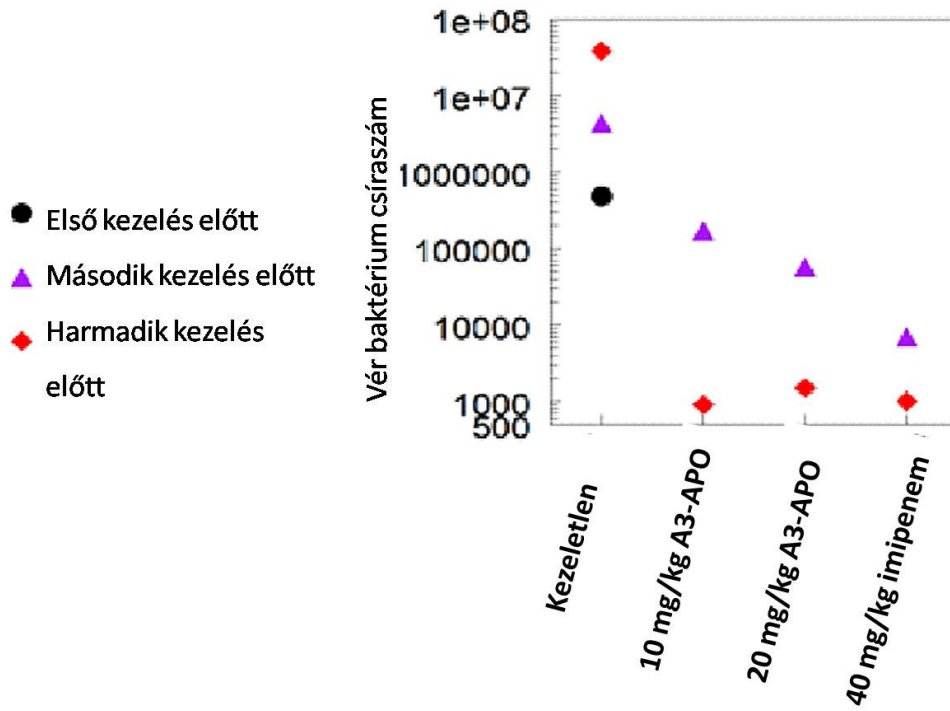


A harmadik ip kezelések során figyelembe vettük, hogy a peptid vegyületek, így az antibakteriális hatású peptidek is vesén keresztül választódnak ki (29), ami 8-10-szer gyorsabban történik egerekben, mint főemlősökben (30). Az egereken vese clearance csökkenést idéztünk elő azzal, hogy a fertőzéses kísérlet megkezdése előtt 3 nappal 18 mg/ttkg cisplatin előkezelést kaptak (25). Ezzel a peptid kiválasztódási ütemét az emberi szervezetben végbemenő folyamathoz hasonlóvá kívántuk alakítani. Ugyanakkor a cisplatin vesekárosító hatása miatt az egerek általános állapota is romlott. Ez a jelenség látható abban, hogy bár a fertőzés mértéke hasonló volt, a kezeletlen egerek túlélése a 48. órában a cisplatin előkezeléssel is 10%, ugyanúgy, mint cisplatin előkezelés nélkül, az antibakteriális szerek már nem tudtak a cisplatin előkezelés nélküli esethez hasonló sikert elérni az állatok túlélésében. 40 mg/ttkg imipenem hatására a cisplatin előkezeltek túlélése a 24. órában csak 83%, szemben az előkezelés nélküli 90%-os túléléssel, a 48. órában az arány még tovább romlik; cisplatin előkezelés nélküli túlélés 90%, cisplatin előkezelés után csak 56%. 10 mg/ttkg A3-APO kezelés hatására a cisplatin előkezelt egerek fertőzés utáni túlélése a 24. órában 70%, a 48. órában 40% volt. Az A3-APO dózisének emelése 20 mg/ttkg-ra nem javított a kezelés hatékonyságán a túlélés a 24. órában átlag 60%, a 48. órában 20 % körüli volt (**4. táblázat**).

**4. Táblázat.** *E. coli* 5770 fertőzés után 24/48 órával CD-1 egerek túlélésének százalékos eloszlása cisplatin előkezelés nélkül vagy cisplatin előkezelés után 40 mg/ttkg imipenem, 10 mg/ttkg A3-APO vagy 20 mg/ttkg A3-APO kezelés után. A méréseket háromszor ismételtük, minden esetben csoportonként 10-10 egeret használtunk, az adatok átlagos % értékek és szórás.

Alkalmazott kezelések	cisplatin előkezelés nélkül az egerek túlélésének %-a (24 / 48 órával a fertőzés után)	cisplatin-előkezelt egerek túlélési eloszlása (24 / 48 órával a fertőzés után)
Kezeletlen fertőzött	10 / 10	55 ± 5 / 10
Imipenem 3x40 mg/kg	90 / 90	83 ± 13 / 56 ± 14
A3-APO 3x10 mg/kg	80 / 80	70 / 40 ± 10
A3-APO 3x20 mg/kg	90 / 90	60 ± 20 / 20 ± 10

A kezeletlen, csak fertőzött egerek vér baktérium csíraszám a 12. óráig folyamatosan növekedett. A kezelések kezdetekor mérhető  $5,4 \times 10^5$  CFU/ml átlag értékről ( $5,1 \times 10^5$ ;  $2,6 \times 10^5$ ;  $6,9 \times 10^5$ ;  $1,1 \times 10^5$ ;  $1,5 \times 10^6$ ;  $1,7 \times 10^5$ ), a 8. órában  $4,1 \times 10^6$  ( $3,8 \times 10^6$ ;  $1,7 \times 10^6$ ;  $5,2 \times 10^6$ ;  $8,2 \times 10^6$ ;  $1,1 \times 10^6$ ;  $4,6 \times 10^6$ ) CFU/ml átlagértéken át emelkedve, a 12. órában elérte az átlag  $5,8 \times 10^7$  CFU/ml ( $1,2 \times 10^7$ ;  $4,8 \times 10^7$ ;  $5,3 \times 10^7$ ;  $7,9 \times 10^7$ ;  $2,4 \times 10^7$ ;  $1,3 \times 10^8$ ) nagyságrendet. Az első dózis imipenem kezelés hatására a vér baktérium csíraszám  $10^5$  CFU/ml-re csökkent ( $3,4 \times 10^5$ ;  $6,8 \times 10^5$ ;  $1,1 \times 10^6$ ;  $4,8 \times 10^5$ ;  $2,1 \times 10^5$ ;  $1,3 \times 10^5$ ), és a második dózis után a mérhető  $10^3$  CFU/ml alá esett. 10 mg/ttkg A3-APO első dózisa a csíraszámot 40-ed részére csökkentette; átlag  $1,4 \times 10^5$ -re ( $8,1 \times 10^4$ ;  $1,2 \times 10^5$ ;  $3,6 \times 10^5$ ;  $1,4 \times 10^4$ ;  $5,5 \times 10^4$ ;  $2,1 \times 10^5$ ), a kontrol kezeletlen csoporthoz képest, a második dózis után az egerekből baktérium nem tenyésztett vissza. 20 mg/ttkg A3-APO első kezelés után hatvanad részére,  $9,6 \times 10^4$ -re csökkent a csíraszám ( $2,1 \times 10^5$ ;  $1,2 \times 10^4$ ;  $1,1 \times 10^5$ ;  $3,1 \times 10^4$ ;  $1,2 \times 10^5$ ;  $2,1 \times 10^5$ ). A második dózis a kimutathatóság szintjére,  $10^3$  CFU/ml-re csökkentette a csíraszámot (**7. ábra**). A 8. órás adatok összehasonlítása kétmintás *t*-próbával azt mutatja, hogy csíraszám változásban a kezeletlen csoporthoz viszonyítva mind a 40 mg/kg imipenem ( $p=0,01808$ ), mind a 10 mg/kg A3-APO ( $p=0,01298$ ), és a 20 mg/kg A3-APO is ( $p=0,01271$ ) szignifikáns csökkenést eredményezett.



**7. ábra.** Cisplatin előkezelt egerek vér baktérium csíraszám alakulása *E. coli* 5770 ip fertőzés után 40 mg/ttkg imipenem, 10 mg/ttkg A3-APO vagy 20 mg/ttkg A3-APO kezelés hatására

#### 5.2.4. *A. baumannii* szisztémás fertőzés kezelése

Az első vizsgálatnál  $4 \times 10^7$  CFU/g *A. baumannii* BAA-1805 ip fertőzés után 4, 8 és 12 órával 2,5 mg/ttkg imipenem, illetve A3-APO iv kezelés történt. A csoportonként 7-7 állat vér baktérium csíraszámát a fertőzés után 4 órával, vagyis a kezelés kezdetekor  $4,6 \times 10^7$  CFU/ml volt. Ezt a kezdeti csíraszám értéket, esetlegesen kiválasztott 7 állattól levett vérből határoztuk meg ( $4,1 \times 10^7$ ;  $3,8 \times 10^7$ ;  $5,1 \times 10^7$ ;  $4,6 \times 10^7$ ;  $5,3 \times 10^7$ ;  $3,4 \times 10^7$ ;  $5,9 \times 10^7$  CFU/ml). Az egerek fizikai állapota ekkor azonosnak látszódt, összehúzott szemhéj és kissé csapzott szőrzet volt látható. A 8. és 12. órában csoportonként 3-3 egér vér baktérium csíraszámát határoztuk meg. A 24. órára a kezeletlen csoportban már nem volt túlélő egér, az imipenem és A3-APO kezelt csoportok 1-1 túlélő egerének vér baktérium csíraszámát tudtuk meghatározni. A kezeletlen csoport vér baktérium csíraszámát folyamatosan emelkedett; a 8. órában átlag  $9,4 \times 10^7$  CFU/ml ( $1,8 \times 10^8$ ;  $5,5 \times 10^7$ ;  $4,7 \times 10^7$ ), a 12. órában átlag  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml ( $2,5 \times 10^8$ ;  $1,1 \times 10^8$ ;  $9,1 \times 10^7$ ). A két kezelt csoport esetén a vér baktérium csíraszám ugyan csökkent, de a 12. órában is imipenem esetén csak 1 log egységnyit  $3,2 \times 10^6$  CFU/ml-re ( $4,1 \times 10^6$ ;  $2,7 \times 10^6$ ;  $2,8 \times 10^6$ ), míg A3- APO átlag  $1,2 \times 10^7$  CFU/ml ( $1,8 \times 10^7$ ;  $9,2 \times 10^6$ ;  $8,7 \times 10^6$ ) esetén ez még kevesebb változás. A 24. órában az imipenem csoport egyetlen túlélő egere teljesen egészségesnek látszott, vérből baktériumot nem tudtunk visszatenyészteni. Az A3-APO csoport túlélő egerének vér baktérium csíraszámát csak  $2,6 \times 10^6$  CFU/ml –re csökkent (**5. táblázat**). A kísérletben résztvevő túlélő egerek száma viszont a 12. órában magasabb A3-APO kezelés esetén, mint a kezeletlen, vagy imipenem kezelt csoportban. A legtöbb halálozás a 11-18. óra között történt, a 12. órában a kezeletlen és imipenem kezelt csoportokból 4-4 egér élt, az A3-APO csoport tagjai mindannyian életben voltak (**6.táblázat**)

**5. Táblázat.** Vér baktérium csíraszám értékek változása *A. baumannii* BAA-1805 ip fertőzés és 2,5 mg/ttkg imipenem, vagy A3-APO iv kezelése során

Fertőzés után eltelt idő	Kezeletlen csoport (CFU/ml)	Imipenem 2,5 mg/ttkg kezelés (CFU/ml)	A3-APO 2,5 mg/ttkg kezelés (CFU/ml)
4 óra, kezelés kezdete	$4,6 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$
8 óra	$9,4 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$
12 óra	$1,5 \times 10^8$	$3,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$
24 óra	Nincs élő egér	kimutathatósági küszöb alatt	$2,6 \times 10^6$

**6. Táblázat.** Túlélő egerek száma *A. baumannii* BAA-1805 ip fertőzés és 2,5 mg/ttkg imipenem, vagy A3-APO iv kezelése során

Fertőzés után eltelt idő	Kezeletlen csoport	Imipenem 2,5 mg/ttkg kezelés	A3-APO 2,5 mg/ttkg kezelés
4 óra, kezelés kezdete	7	7	7
8 óra	7	6	7
12 óra	4	4	7
18. óra	0	1	1
24. óra	0	1	1

A második próbánál  $2 \times 10^6$  CFU/g *A. baumannii* BAA-1805 ip fertőzés után 4, 8, 12 órával 5 mg/ttkg A3-APO, illetve 40 mg/ttkg imipenem im kezelést kaptak az állatok. Az azonos csoporton belüli állatok vér baktérium csíraszám értékei nagyon eltérőek voltak minden mérési időpontban. A kezdeti  $1,6 \times 10^6$  CFU/ml átlagértékről nagy egyéni változatosságot mutatva alakult az egerek vérének baktérium tartalma ( $1,2 \times 10^6$ ;  $2,5 \times 10^6$ ;  $5 \times 10^5$ ;  $3,1 \times 10^6$ ;  $2,1 \times 10^6$ ;  $1,9 \times 10^5$  CFU/ml). A 8. órában a kezeletleneknél  $3 \times 10^7$  ( $7,2 \times 10^7$ ;  $1,7 \times 10^7$ ;  $9,8 \times 10^6$ ;) CFU/ml, az imipenemmel kezeltéknél  $3 \times 10^6$  CFU/ml ( $9,1 \times 10^6$ ;  $1,8 \times 10^5$ ;  $4,6 \times 10^4$ ) az A3-APO csoportban  $3,5 \times 10^4$  ( $1 \times 10^5$ ;  $2 \times 10^3$ ;  $4 \times 10^3$ ) CFU/ml értékeket mértünk. A kezeletlen csoportban a 12. órára  $1,9 \times 10^7$  ( $2,3 \times 10^7$ ;  $2,1 \times 10^7$ ;  $1,3 \times 10^7$ ) CFU/ml-re emelkedett az átlag vér baktérium csíraszám. Az imipenem kezelt állatok átlag vér baktérium csíraszám értéke  $1,1 \times 10^3$  ( $1 \times 10^3$ ;  $1 \times 10^3$ ;  $1 \times 10^4$ ) CFU/ml, míg ugyanebben az időpontban az A3-APO kezelték vér baktérium csíraszám  $1,1 \times 10^5$  ( $2,9 \times 10^5$ ;  $4,1 \times 10^4$ ;  $2 \times 10^3$ ) CFU/ml volt. A további túlélők vér baktérium csíraszám átlagai  $0-10^4$  CFU/ml nagyságrendűek voltak.

A különböző csoportokban túlélő egerek száma biztonságosabban értékelhető. A kezeletlen kontroll csoport állatok több mint fele már a 12. órára elpusztult (3/7 túlélő), míg ebben az időpontban mind az imipenem, mind az A3-APO kezelték közül csak 1-1 pusztult el. Az A3-APO a korai túlélésre gyakorolt pozitív hatását még a 18. órában is megőrizte, ebben a csoportban a túlélők száma ekkor 5, az imipenem csoportban 3 volt. **(7. táblázat)**



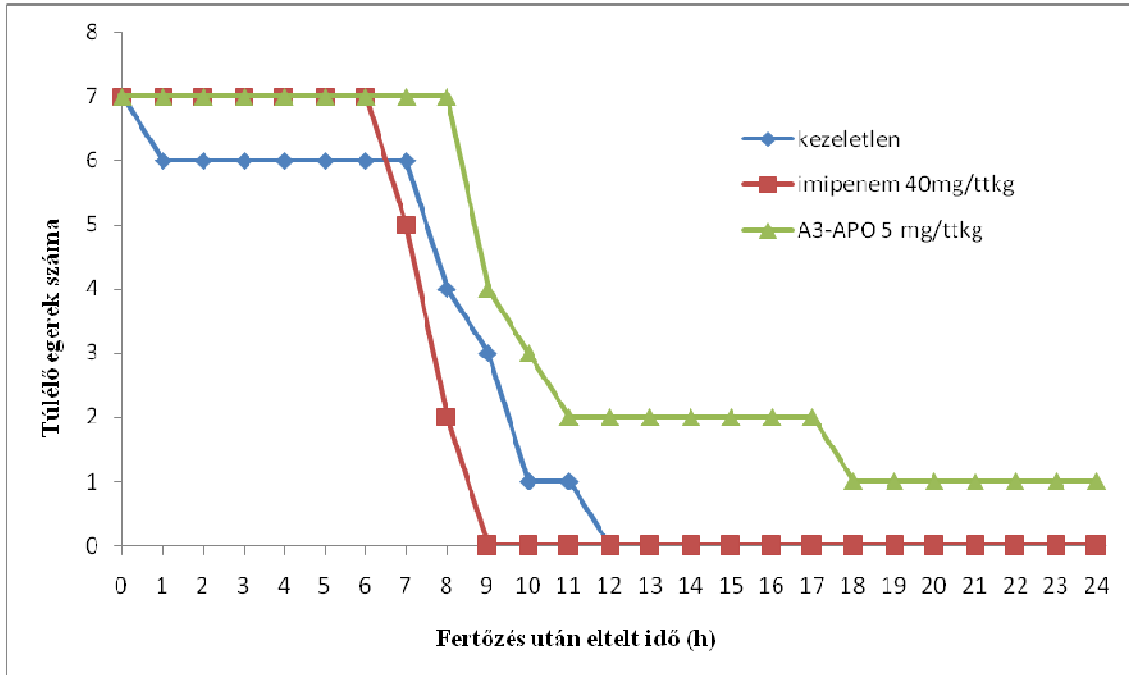
**7. Táblázat.** Vér baktérium csíraszám értékek változása és a túlélő egerek száma *A. baumannii* BAA-1805 ip fertőzés és 40 mg/ttkg imipenem vagy 5 mg/ttkg A3-APO im kezelés során

Fertőzés után eltelt idő	Túlélő kezeletlen egerek száma	Kezeletlen egerek vér csíraszám (CFU/ml)	Imipenemmel kezelt túlélők száma	Imipenemmel kezelt egerek vér csíraszám (CFU/ml)	A3-APO kezelt túlélők száma	A3 APO kezelt egerek vér csíraszám (CFU/ml)
4 óra, kezelés kezdete	7	$1,6 \times 10^6$	7	$1,6 \times 10^6$	7	$1,6 \times 10^6$
8 óra	6	$3 \times 10^7$	7	$3 \times 10^6$	7	$3,5 \times 10^4$
12 óra	3	$1,9 \times 10^7$ C	6	$1,1 \times 10^3$	6	$1,1 \times 10^5$
18 óra	2	0 kimutathatósági küszöb alatt	3	$1,6 \times 10^3$	5	$1,4 \times 10^5$
24 óra	2	0 kimutathatósági küszöb alatt	2	$1,9 \times 10^3$	3	$9,5 \times 10^4$

A harmadik szisztémás *A. baumannii* fertőzés ip  $3 \times 10^7$  CFU/g baktérium mennyiséggel történt. 4 és 8 órával a fertőzés kialakítása után 5 mg/ttkg A3-APO, illetve 40 mg/ttkg imipenem kezelést kaptak az állatok. A fertőzés utáni negyedik órában az átlag vér baktérium csíraszám  $3,2 \times 10^7$  ( $1,1 \times 10^7$ ;  $3,4 \times 10^7$ ,  $2,7 \times 10^7$ ;  $9,1 \times 10^7$ ;  $1,4 \times 10^7$ ;  $1,5 \times 10^7$ ) CFU/ml. A kezeletlen kontrol csoport vér baktérium csíraszám értéke a 8. órában  $4,2 \times 10^7$  ( $3,8 \times 10^7$ ;  $3,6 \times 10^7$ ;  $5,3 \times 10^7$ ;). Az imipenem kezelés hatására a csíraszám  $2,8 \times 10^5$  ( $4,9 \times 10^5$ ,  $7,1 \times 10^4$ ) CFU/ml-re csökkent. Ugyanakkor az imipenem kezelés a korai túlélést nem segítette, a 8. órában már csak a két alacsony vér baktérium csíraszámú egyed maradt életben, de a második kezelés már hatástalan volt, ez a két egér is elpusztult a 12. órára. Ezzel szemben az A3-APO kezelés hatására mindkét kezelés csíraszám csökkenést eredményezett, a 8. órában átlag  $2,8 \times 10^6$  ( $5,1 \times 10^6$ ;  $3,2 \times 10^6$ ;  $1,6 \times 10^5$ ) de a 8. órában a csoport mindegyik egyede életben volt még. A 8. órabeli csíraszámok összehasonlítása kétmintás t-próbával azt mutatja, hogy a csíraszám szignifikánsan különböző a kezeletlen és az A3-APO csoportban,  $p=0,002063$ . A 12. órát is 2 egyed megélte az A3-APO kezelt csoportból, ezek vér baktérium csíraszámá átlag  $2,5 \times 10^5$  ( $1,4 \times 10^5$ ;  $3,6 \times 10^5$ ) CFU/ml. Az A3-APO kezelés utáni 24. órában az egyetlen túlélő véreből baktérium nem tenyésztett vissza (**8. táblázat, 8. ábra**).

**8. Táblázat.** Vér baktérium csíraszám értékek változása *A. baumannii* BAA-1805 ip fertőzés és 40 mg/ttkg imipenem vagy 5 mg/ttkg A3-APO im kezelés során

Fertőzés után eltelt idő	Kezeletlen egerek vér csíraszám (CFU/ml)	Imipenemmel kezelték vér csíraszám (CFU/ml)	A3-APO kezelték vér csíraszám (CFU/ml)
4 óra	$3,2 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$
8 óra	$4,2 \times 10^7$	$2,8 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$
12 óra	$3,9 \times 10^7$	Nincs túlélő egér	$2,5 \times 10^5$
24 óra	Nincs túlélő egér	Nincs túlélő egér	kimutathatósági küszöb alatt



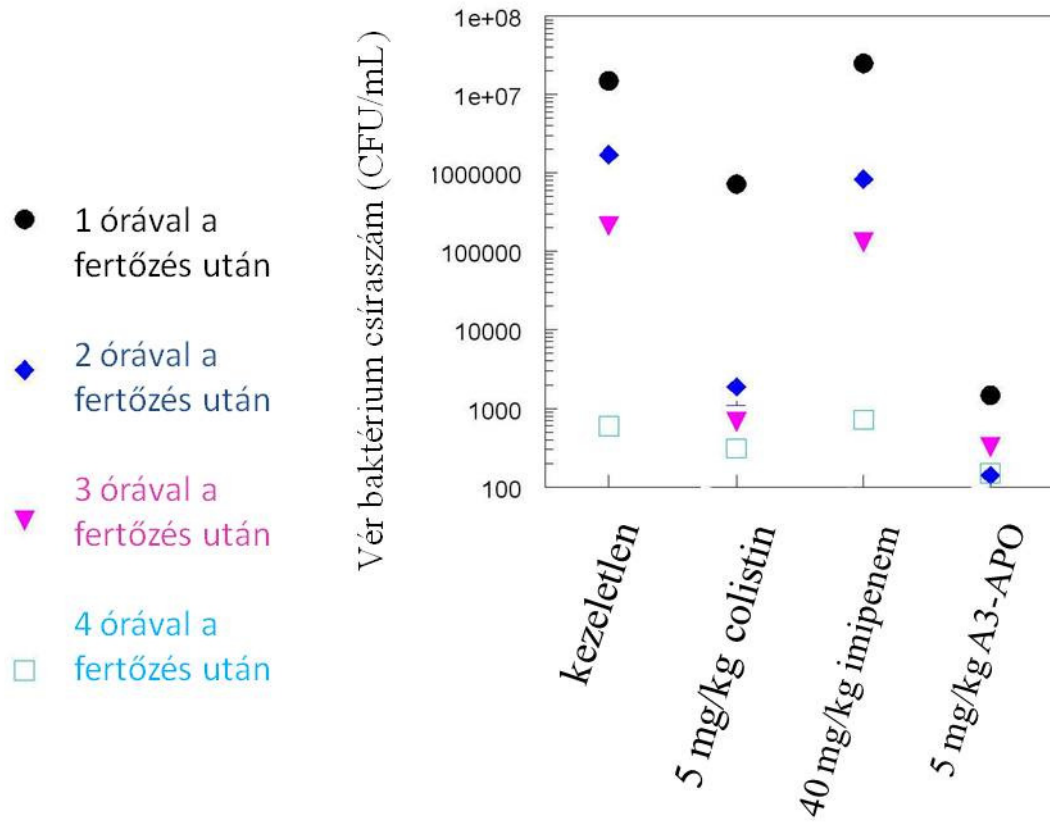
**8. ábra.** Túlélő egerek száma *A. baumannii* BAA-1805 ip fertőzés és 40 mg/ttkg imipenem vagy 5 mg/ttkg A3-APO im kezelés során

### 5.2.5. A. *baumannii* sebfertőzés kezelése eredménye

„A” kísérlet sorozat:  $2 \times 10^3$  *A. baumannii* BAA-1805 CFU/seb/nap mennyiségben fertőztük 5 egymás utáni napon 6 egér égett sebét. Az első napon a fertőzés 3 órával az égett seb létrehozása után történt, majd ettől az időponntól számítva 24 óránként. Három egér közvetlen a fertőzés után minden nap 5 mg/kg A3-APO kezelést kapott im. Három órával a fertőzés után, valamint a 2. és 4. napon az állatok farokvénájából vett vérből baktérium nem tenyésztett vissza. Mindkét csoport állatai a kísérlet ideje alatt jó általános állapotban voltak, szisztémás fertőzésre utaló tünetek a kezeletlen csoportban sem jelentkeztek. Az 5. napon a seb baktérium csíraszám átlag az A3-APO kezelt egerekben  $3,4 \times 10^1$  CFU/mg ( $1,4 \times 10^1$ ,  $4,5 \times 10^1$ ,  $4,2 \times 10^1$  CFU/mg) volt. A kezeletlen csoport sebéből 3 log<sub>10</sub> egységgel nagyobb mennyiségben tenyésztett vissza a sebfertőző baktérium: átlag  $1,5 \times 10^4$  ( $1,5 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $4,2 \times 10^4$ ) CFU/mg értékben.

„B” kísérlet sorozat: Egyszeri magas csíraszámú,  $7,2 \times 10^9$  CFU/seb *A. baumannii* BAA-1805 fertőzés egy dózisu kezelése A3-APO, imipenem és colistin antibakteriális szerekkel. *A. baumannii* baktériummal fertőzött egerek közül az antibakteriális kezelés nélküli csoportban a vér baktérium csíraszám a fertőzés utáni 1 órában  $2 \times 10^7$  ( $1,6 \times 10^7$ ;  $2,4 \times 10^7$ ) CFU/ml volt, ez az érték a második órára  $2,5 \times 10^6$  ( $4,7 \times 10^6$ ;  $3 \times 10^5$ ) CFU/ml-re, a harmadik órában  $1,8 \times 10^5$  ( $1,2 \times 10^5$ ;  $2,4 \times 10^5$ ) CFU/ml-re és a negyedik órában  $5 \times 10^2$  ( $2 \times 10^2$ ;  $8 \times 10^2$ ) CFU/ml-re csökkent. A második csoport egereiben, akik 5 mg/kg A3-APO-t kaptak, már az első órában mérhető vér baktérium csíraszám is csak  $2 \times 10^3$  ( $1,3 \times 10^3$ ;  $2,7 \times 10^3$ ) CFU/ml volt, a második órában ez tovább csökkent  $1,7 \times 10^2$  ( $1,2 \times 10^2$ ;  $2,2 \times 10^2$ ) CFU/ml-re. A harmadik órában az A3-APO kezeltékben  $3,3 \times 10^2$  ( $1,5 \times 10^2$ ;  $5,1 \times 10^2$ ) CFU/ml, a negyedik órában  $2,3 \times 10^2$  ( $3,4 \times 10^2$ ;  $1,2 \times 10^2$ ) CFU/ml vér baktérium csíraszámot mértünk. A harmadik csoport egerei 5 mg/kg colistin kezelést kaptak, ennek hatására vér baktérium csíraszámuk az 1. órában  $5,8 \times 10^5$  ( $9,2 \times 10^5$ ;  $2,4 \times 10^5$ ) CFU/ml, a második órában  $2,5 \times 10^3$  ( $3,1 \times 10^3$ ;  $1,9 \times 10^3$ ) CFU/ml, a harmadik órában  $6 \times 10^2$  ( $2 \times 10^2$ ;  $1 \times 10^3$ ) és a negyedik órában  $3 \times 10^2$  ( $2 \times 10^2$ ;  $4 \times 10^2$ ) CFU/ml volt. A negyedik csoport egereinek vérében, 40 mg/kg imipenem kezelés után, az első órában  $3 \times 10^7$  ( $4,2 \times 10^7$ ;  $1,8 \times 10^7$ ) CFU/ml, a második órában  $8 \times 10^5$  ( $6,4 \times 10^5$ ;  $9,6 \times 10^5$ ) CFU/ml, a harmadik órában  $1,3 \times 10^5$  ( $1,4 \times 10^5$ ;  $1,2 \times 10^5$ ) CFU/ml, végül a negyedik órában  $6 \times 10^2$

( $4 \times 10^2$ ;  $8 \times 10^2$ ) CFU/ml baktérium volt (9.ábra). A kezeletlen, az imipenem és a colistin kezelt állatok az első három órában gubbasztottak, szőrük csapzott volt, szemrészük beszűkült, de tüneteik a negyedik órára megszűntek, általános állapotuk javult. Az A3-APO kezelt csoport egereinek általános állapota a kísérlet 5 napja alatt végig kifogástalan volt, szisztémás fertőzés tüneteit nem tapasztaltuk rajtuk.

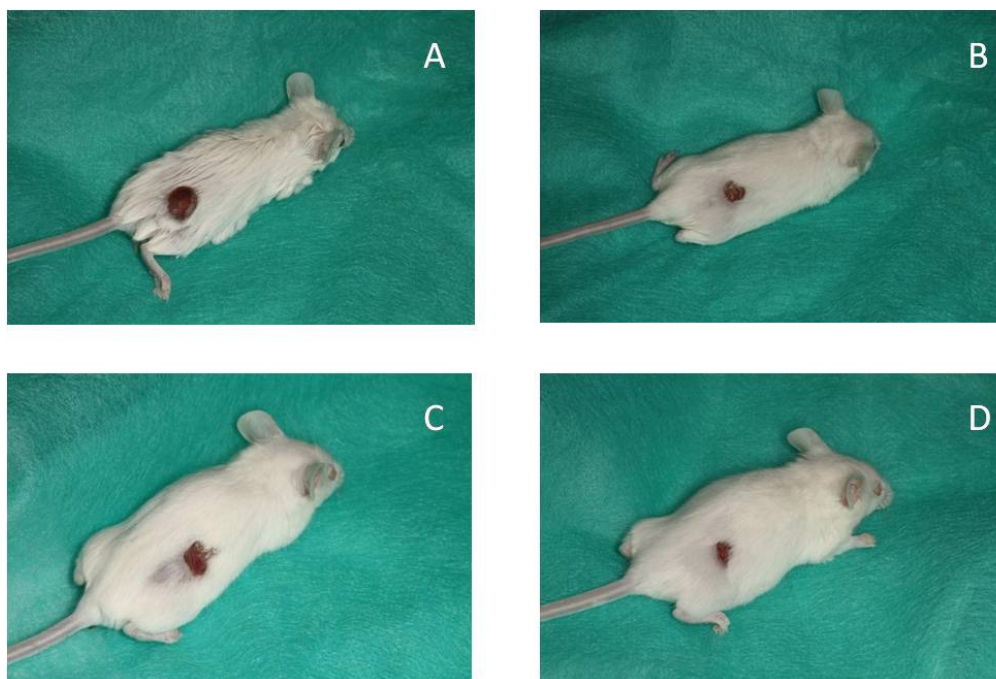


**9. ábra.** Vér baktérium csíraszám változása egyszeri  $7.2 \times 10^9$  CFU/seb *A. baumannii* BAA-1805 fertőzés és egy dózisú im kezelései után.

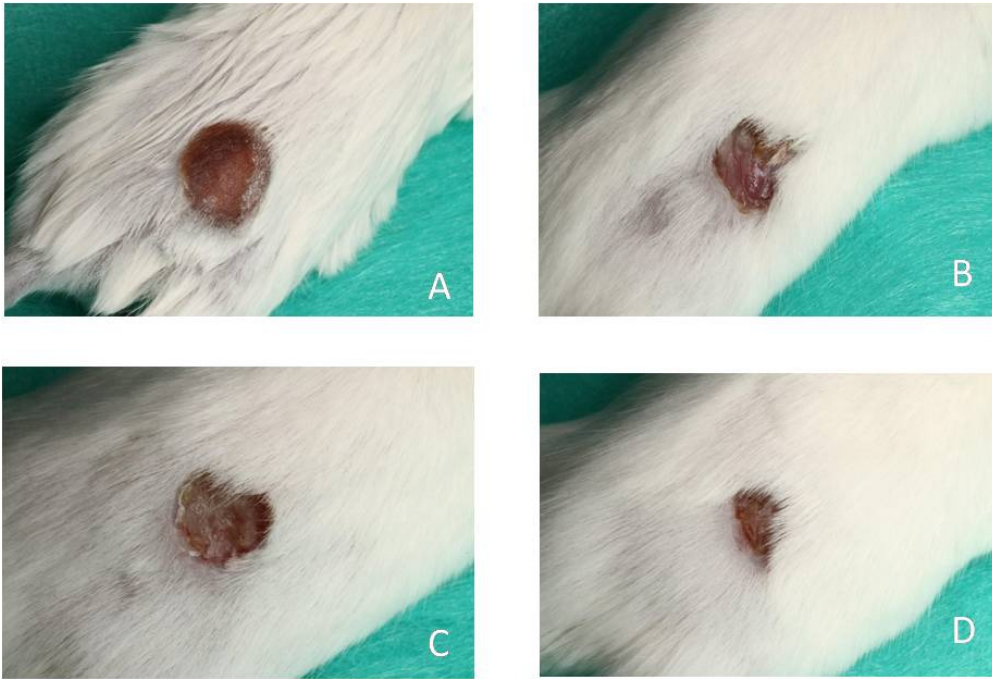
A kezeletlen csoportból a második napon 2 állat elpusztult.

A túlélő állatokat az 5. napon lefényképeztük. A 10. ábrán jól látható, hogy a kezeletlen csoport egereinek szőre csapzott, a kísérlet 5 napja alatt a kezdeti 20-25 g súlyukról 14-18 g-ra lefogytak. A többi csoport állatai szisztémás fertőzés tünetét nem mutatták. Az imipenem és A3-APO kezelésben részesült egerek a kezelés elején mért súlyukból nem veszítettek, a colistin kezelt csoport átlagos tömege is 16 g-ra csökkent. A kezeletlen csoportban az 5. napon az állatok sebe még mindig a létrehozott 11 mm nagyságú, míg a kezelésben részesültek sebeinek mérete látványos mértékben a következő sorrendben csökkent: Imipenem kezelt állatok, colistin kezelt állatok, A3-APO kezelt állatok (**11. ábra**). A kimetszett sebek miligrammonkénti baktérium csíraszámát a kezeletlen egereknél  $10^7$  ( $9,8 \times 10^6$ ;  $1,1 \times 10^7$ ), az imipenem kezeltéknél  $10^6$  ( $1,2 \times 10^6$ ;  $1 \times 10^6$ ), a colistin kezeltéknél  $10^5$  ( $1,1 \times 10^5$ ;  $1,2 \times 10^5$ ) és az A3-APO kezeltékekben  $10^3$  ( $2,8 \times 10^3$ ;  $3,4 \times 10^3$ ) nagyságrendű (**12. ábra**). A seb baktérium csíraszámának összehasonlítása után látható, hogy nemcsak a kezeletlen csoporthoz képest szignifikánsan hatékonyabb az A3-APO kezelés,  $p=0,0367$ , de összehasonlítva a colistin és A3-APO kezelés eredményét is szignifikáns a különbség,  $p=0,0020$ , az A3-APO a colistinnél is hatásosabban működött.

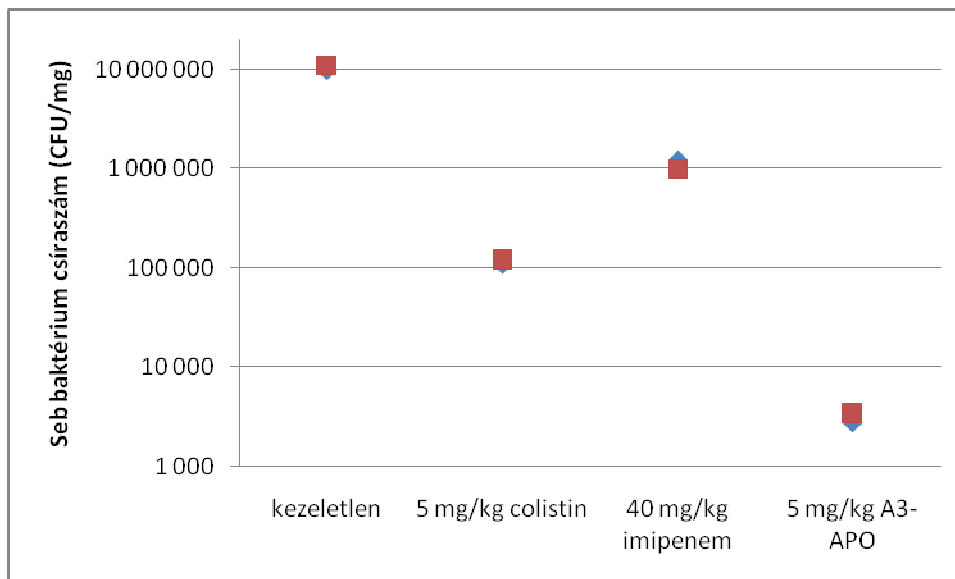




**10. ábra.** *A. baumannii* sebfertőzött állatok képe a fertőzés utáni 5. napon **A.** kezeletlen állapot, **B.** colistin kezelés után, **C.** Imipenem kezelés után, **D.** A3-APO kezelés után. A kezeletlen állat szőre csapzott, tömege és a colistin kezelt állat tömege 16 g. A kezelt állatokon szisztémás fertőzés tünetei nem láthatók. Az imipenem és A3-APO kezelt állatok tömege 23 g.



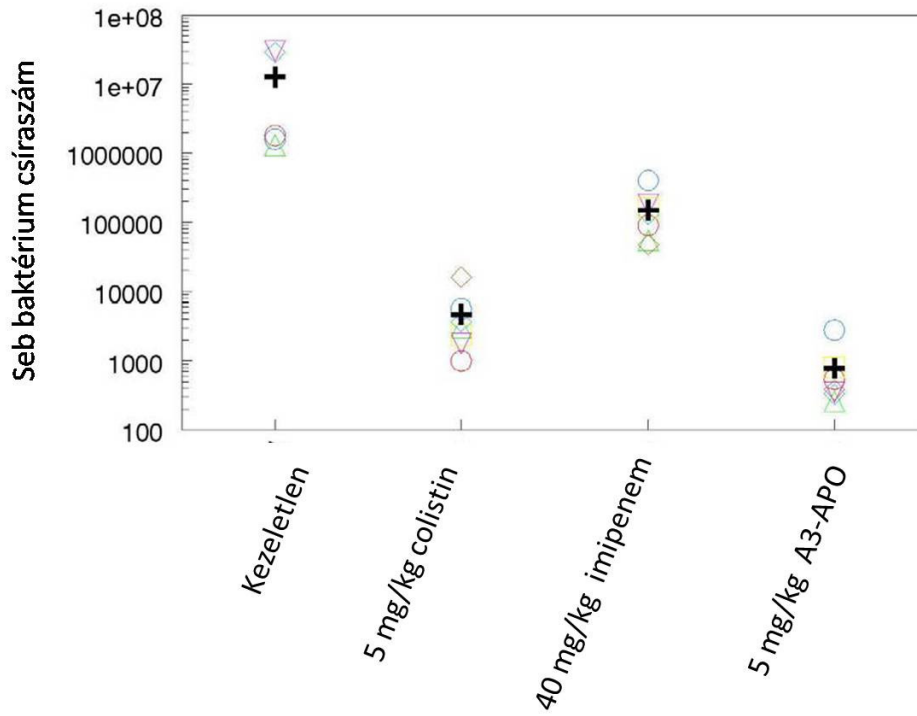
**11. ábra.** A 10. ábrán bemutatott egerek sebei kinagyítva. **A:** kezeletlen, **B:** imipenem kezelt, **C:** colistin kezelt, **D:** A3-APO kezelt egerek esetén.



**12. ábra.** Seb baktérium csíraszámok  $7.2 \times 10^9$  CFU/seb *A. baumannii* BAA-1805 fertőzés és egy dózisú kezelés hatására a kezelés 5. napján

„C” kísérlet sorozat: Extrém magas csíraszámú,  $2 \times 10^{11}$  CFU/seb egyszeri *A. baumannii* BAA-1805 fertőzés, naponta ismételt A3-APO, imipenem és colistin kezelés 5 napig. 28 egér égett sebét a 0. napon *A. baumannii* baktériummal fertőztük. Az első, antibakteriális szerrel nem kezelt csoport 7 egyedéből 2 állat a második napon elpusztult. Az imipenem kezelt csoport mind a hét tagja életben maradt az ötödik napig, de általános állapotuk rossz volt, szőrük csapzott, szemük behúzott. A colistin kezeléseket után a harmadik csoport állatai 1-1 órát gubbasztottak, majd állapotuk javult. A negyedik A3-APO kezelt csoport az öt kezelési napon végig jó általános állapotban volt, egészségesnek tűnt.

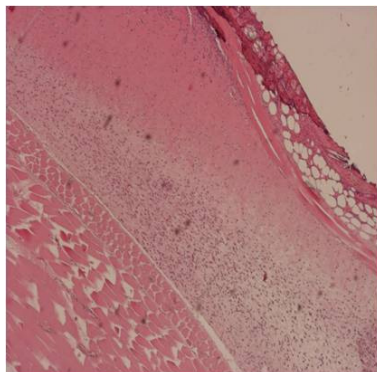
Az ötödik napon kimetszett sebek baktérium csíraszám értékei a **13. ábrán** láthatók. A kezeletlen csoport sebéből átlag  $1,27 \times 10^7$  ( $1,8 \times 10^6$ ;  $1,3 \times 10^6$ ;  $1,6 \times 10^6$ ;  $2,9 \times 10^7$ ;  $3 \times 10^7$ ) CFU/mg, az imipenemmel kezeltből  $1,5 \times 10^5$  ( $9 \times 10^4$ ;  $5,5 \times 10^4$ ;  $4 \times 10^5$ ;  $1,3 \times 10^5$ ;  $1,8 \times 10^5$ ;  $1,6 \times 10^5$ ;  $4,7 \times 10^4$ ) CFU/mg baktérium tenyésztett vissza. Ezzel szemben a colistin kezelés a seb baktérium csíraszámot  $4,7 \times 10^3$  ( $1 \times 10^3$ ;  $3 \times 10^3$ ;  $5,6 \times 10^3$ ;  $3,7 \times 10^3$ ;  $1,8 \times 10^3$ ;  $2,4 \times 10^3$ ;  $1,6 \times 10^3$ ) CFU/mg nagyságrendűre csökkentette, az A3-APO kezelés után pedig  $7,8 \times 10^2$  ( $5,4 \times 10^2$ ;  $2,6 \times 10^2$ ;  $2,8 \times 10^2$ ;  $3,3 \times 10^2$ ;  $3,5 \times 10^2$ ;  $8 \times 10^2$ ;  $3,8 \times 10^2$ ) CFU/mg baktérium volt a sebből visszatenyésztendő.



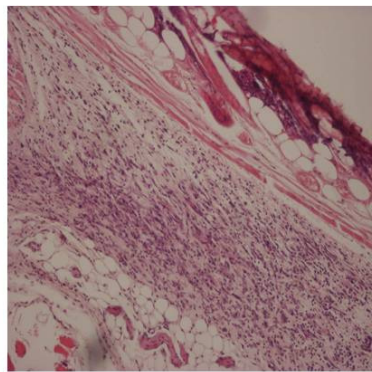
**13. ábra.** Seb baktérium csíraszámok  $2 \times 10^{13}$  CFU/seb *A. baumannii* BAA-1805 fertőzés után 5 napig naponta adott kezelés hatására az 5. napon. Az üres jelek az egyénekenként mért csíraszámokat jelölik, a kereszt pedig ezek átlagát.

Az A3-APO hatása a nem fertőzött égett sebeken: Ebben a kísérlet sorozatban az égett sebeket nem fertőztük *A. baumannii* baktériummal. Az égett sebek gyakran az őket körülvevő, velük érintkező környezetből fertőződnek. Feltételeztük, hogy az A3-APO kezelés megakadályozhatja az ily módon kialakuló sebfertőzést is. Ezért ebben a kísérletben 4 égett sebű egér, mint kontroll csoport nem kapott kezelést, rajtuk a spontán sebgyógyulás folyamatát követtük. Másik négy állat viszont az égett seb kialakulása után négy órával, majd a következő négy napon im 5 mg/ttkg A3-APO kezelésben részesült. Mind a 8 állat jó általános állapotban volt végig a kísérlet ideje alatt. Már a kísérlet 3. napján jól látható különbség volt a két sebcsoport között. A kezeletlen állatok sebei mélyebb, vörösebb, duzzadtabb, ödémásabb volt, gyulladtnak látszódtak. Az A3-APO kezeltéké békés, nyugodt, világos színű volt, ödéma és gyulladás jelei nem látszódtak.

Az ötödik napon kimetszett sebek mikroszkópos vizsgálatakor igazolódott, hogy a kezeletlen sebek felszínén a metszet 2/3-ára kiterjedő hámfosztott terület alatt homogén eosinophil nekrotikus anyag helyezkedik el, benne gennysejtekkel, illetve ezt körülvevő laza sarjszövettel. Az A3-APO kezelt egerek mintáiban a nekrotikus felszín alatt kezdődő hámszövet regeneráció jelei látszanak, a bőrfüggelékek burjánzása látható, gennysejtek nem figyelhetők meg, a sarjszövet gyulladáshozos infiltrációja is mérsékeltebb **(14. ábra)**.



kezeletlen



A3-APO kezelt

**14. ábra.** Nem fertőzött égett sebek szövettani képe kezelés nélküli vagy 5 napon át ismételt 5 mg/kg A3-APO kezelés után. Hematoxylin-eosin festés 400-szoros nagyítás

## 6. Megbeszélés

Napjaink orvoslásának egyik legrémisztőbb problémája a környezetünk baktériumaiban folyamatosan megjelenő antibiotikum rezisztencia. Aggodalomra nemcsak az ad okot, hogy a legújabb bevezetésre kerülő antibiotikumokkal szemben is hamar megjelennek rezisztens törzsek, hanem az is, hogy a rezisztencia hamar eléri a kórházi törzseket is, közülük a multirezisztensek kisselektálódva elszaporodnak, az antibiotikumokat gyakran használó kórházi környezet szelekciós hatására. A multirezisztens kórokozók nozokomiális infekcióit leküzdeni pedig gyakran már nem állnak rendelkezésünkre hatékony antibiotikumok.

Ismert hatásmechanizmusú, kémiai szerkezetű vegyületekkel szemben a baktériumok gyorsabban megtalálják a védekező utat, ezért talán biztatóbb jövője van azoknak az antibiotikum kutatásoknak, amelyek új támadáspontú szerekre irányulnak. Az elmúlt húsz évben sokan, sokféle antibakteriális hatású peptidet izoláltak különböző rovarokból (18, 31, 32, 33, 34). Számos antibakteriális peptid hatását membránroncsolással éri el. Vannak olyanok is, amelyek hatékonyságukat elveszítik, ha aminosavaikat D-konfigurációjú változataikra cserélik (17, 35). Ez utóbbi származékok valamilyen intracelluláris királis tulajdonságokkal rendelkező makromolekulához illeszkedve fejtik ki hatásukat. A buforin típusúak közvetlenül a bakteriális DNS-hez (dezoxi-ribo-nukleinsav) kapcsolódnak (36), a prolin-gazdag peptidek pedig a bakteriális DnaK hő sokk proteinhez. A DnaK a bakteriális chaperone fehérjék egyik tagja. A chaperone, más néven dajkafehérjék más fehérjék nemnatív állapotához kötődnek, és általában ATP (adenozin-trifoszfát) felhasználással azokat segítik a natív állapot felvételében. A fehérjeszintézis során a naszcens polipeptidlánc saját magával, vagy a környezetében lévő más molekulákkal kapcsolatba lépve, inkorrekt konformációt vehet fel. A membránokon áthaladó fehérjék, csak részben vagy teljesen legombolyodott állapotban tudnak transzlokálódni. A chaperonok segítik a fehérjéket az átbújás ideje alatt legombolyodni, majd végül az eredeti szerkezetüket újra felvenni. Számos fehérje funkciójához elengedhetetlen, hogy disszociálni, majd újra összeállni legyenek képesek az aleggységei, ehhez is elengedhetetlenek a chaperonok. Stressz hatásra, mint például hő sokkra a fehérjék denaturálódnak, aggregálódnak, regenerálódásukhoz szükségesek a hő sokk fehérjék (19).



A prolin-gazdag peptidek közül az apidaecin, drosocin és pyrrocoricin keltette fel a kutatók legnagyobb érdeklődését. Az apidaecin 18, a drosocin 19, a pyrrocoricin 20 aminosavból áll, ez utóbbi kettő a lánc közepén egy diszacharidot is tartalmaz (18, 34). A biotinnal jelölt pyrrocoricin, és a fluoreszcensen jelölt is megtartja *E. coli* elleni baktericid hatását (20), tehát a jelölés nem befolyásolja a célmolekulához való kötődést. Biotin-jelölt pyrrocoricin segítségével sikerült igazolni, hogy az antibakteriális peptid a 70 kDa nagyságú DnaK hő-sokk-proteinhez és a 60 kDa nagyságú GroEL chaperon fehérjéhez kötődik, bár ez utóbbihoz való kötődése nem specifikus. Ugyanakkor a DnaK humán megfelelőjéhez a Hsp70-hez, és a GroEL humán megfelelőjéhez a Hsp60-hoz a biotin jelzett pyrrocoricin nem kötődik. Külön-külön fluoreszcens jelzést adva a pyrrocoricin N- illetve C-terminális részéhez, megállapítható volt, hogy az N-terminális rész épsége szükséges a DnaK kötődéshez, míg a C-terminális rész a membrán destrukcióban játszik fontos szerepet, miközben a peptid két lipopoliszacharid (LPS) részhez kötődik. Megvizsgálva a két másik prolin-gazdag antibakteriális peptidet, a drosocint és apidaecint kiderült, hogy a DnaK kötődés legerősebb a pyrrocoricin, a membránhoz kötődés a drosocin esetén, az apidaecin különböző fajtái más-más baktérium fajok membránjához különböző aktivitással kötődtek (37). Az apidaecin összefoglaló neve a különböző méhfajok által termelt prolin-gazdag antibakteriális peptideknek (16). A három legtöbbet vizsgált prolin-gazdag antibakteriális peptid közül, bár mindegyik több támadásponton keresztül vesz részt a baktériumok elpusztításában, további kutatásokra a pyrrocoricin látszott legérdekesebbnek, mert ennek az intracelluláris hatása kiemelkedő volt. Ráadásul összehasonlítva, hogy a drosocin a baktériumok elpusztításához in vitro 12 óra behatási időt igényel, de akár egér, akár humán szérumban 4 óra alatt teljesen elbomlik, jól látható volt, hogy in vivo miért nem hatékony *E. coli* fertőzésekben (38).

A pyrrocoricin származékok sorozatának antibakteriális hatékonyságát vizsgálva kiderült, hogy az Asp2-Lys3 dipeptid és a Tyr6-Leu-Pro-Arg-Pro10 aminosavak nélkülözhetetlenek az N-terminális vég DnaK kötődésében. Ugyanakkor más területeken, különösen a C-terminális membránhoz kapcsolódó végen előnyös, ha a peptid pozitív töltésű, így a megtervezett szekvenciában ide arginin és prolin aminosavak kerültek (39). Felismerésre került, hogy az eredeti pyrrocoricin peptiden az endopeptidázok hasítóhelye a Ser6 és Tyr7 aminosavak között van, ez a hely a tervezett módosításban már nem szerepelt. A végleges molekula megtervezéséhez a

kutatók figyelembe vették az összes prolin-gazdag antibakteriális peptid és fehérjefragmens pozitív tulajdonságait. Meg kellett védeni a végső peptidet az exopeptidázok hasításától is, így került az N-terminális végre a természetben nem megtalálható 1-amino-ciklohexán-karbonsav, a C-terminális végeket összekötve, dimert formálva pedig az 1,4-diamino-vaajsav került. A dimer struktúra is hozzájárul a membránon való könnyebb átjutáshoz (20). Az így megtervezett és létrehozott új peptid az A3-APO nevet kapta (40).

Az *Enterobacteriaceae* családra jellemző DnaK hősokk-proteinhez képesek kötődni mind a drosocin, mind a pyrrolicorin és ezek mesterséges származéka az A3-APO. Az antibakteriális aktivitásukat fokozza, hogy a membrán dezintegrációban is részt tudnak venni. Azokra a baktérium fajokra, amelyek DnaK szekvenciája nem komplementje a prolingazdag peptidek N-terminális szakaszának, az antibakteriális hatásuk gyengébb, a baktériumok elpusztításához magasabb peptid koncentráció szükséges. Ezt az emelkedettebb MIC értékkel megjelenő hatékonyságot látjuk *P. aeruginosa* esetén, ahol az antibakteriális hatások közül, csak a membránroncsolás lehetséges (41). Saját in vitro antibakteriális vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az ATCC és kórházi anyagból izolált *Enterobacteriaceae* családba tartozó *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* és *Salmonella typhimurium* törzsek esetén az A3-APO MIC értéke 2-64 mg/l érték között változott, de a törzsek többsége 16 mg/l alatti MIC értékkel rendelkezett. A vizsgált *Pseudomonas aeruginosa* törzsekre vonatkozó MIC érték 64 mg/l-rel egyenlő, vagy magasabb volt.

A pyrrolicorin alapvegyületből kiindulva számos antibakteriális peptid született, melyek hatásukat egyrészt a baktérium membrán roncsolásával, másrészt az intracellulárisan elhelyezkedő DnaK hősokk proteinhez és más chaperonokhoz kapcsolódva fejtik ki. Az A3-APO 20-szor aktívabb antibakteriális hatású, mint a kiindulási pyrrolicorin alapú dimer vegyület, minden más tervezett származéknál legalább 10-szer, a pyrrolicorin-apidaecin-kiméránál pedig 5-ször aktívabb (21). Összehasonlítva az A3-APO és ciprofloxacín antibakteriális hatékonyságát számos *S. typhimurium* és húgyúti fertőzésekből izolált *E. coli* és *K. pneumoniae* törzseken a peptid átlagosan négyszer hatékonyabbnak bizonyult, a 12 mg/l átlagos MIC értékével (21). Az A3-APO jó hatékonyságú az *Enterobacteriaceae* család baktériumai ellen, melyek a húgyúti fertőzések nagy részét okozzák. A SENTRY Európai Antimikrobiális Surveillance Program 1997-es mérései szerint a húgyúti fertőzések oka 52%-ban *E. coli*

és további 7%-ban *K. pneumoniae* (42). A húgyúti fertőzések egy kisebb részéért felelős *S. saprophyticus* törzsek ellen is van alacsonyabb fokú antibakteriális hatása az A3-APO-nak. Ennek a Gram-pozitív baktériumnak a DnaK hőszokkproteinje más szerkezetű, mint az *Enterobacteriaceae* családba tartozóké. A DnaK-hoz kötődés *S. saprophyticus* esetén nem lehetséges, ezért az antibakteriális hatékonyság itt csak a membránon valósul meg (41). A SENTRY Antimikrobiális Surveillance Program irányítása alatt a világ számos országának kórházaiból összegyűjtött részben katéter-asszociált húgyúti fertőzést okozó *E. coli* és *K. pneumoniae* törzseket. Ezen törzsek ellen az A3-APO hatékonyságát összehasonlították ciprofloxacinnal és szulfametoxazol-trimethoprim (SMX/TMP) hatékonyságával. A vizsgálatra kiválasztott kinolon rezisztens törzsek mind magas rezisztenciával rendelkeztek az SMX/TMP kombinációval szemben is, 128 mg/l fölötti MIC értékekkel. Ezek ellen a világszerte összegyűjtött fluorokinolon rezisztens törzsek ellen az A3-APO MIC értékek 8-16 mg/l között változtak (21).

A következő lépés eldönteni, hogy az *in vitro* antibakteriális hatékonyság, *in vivo* is értékes lesz-e, annak a vizsgálata lett, hogy *ex vivo* savóban, teljes vérben és *in vivo* a peptid mennyi ideig képes stabilitását megőrizni. A desztillált vízzel 25%-ra hígított egér savóban az A3-APO felezési ideje kb. 230 perc volt, ez hígítatlan savóra visszaszámolva, azt jelenti, hogy az első órában, az A3-APO-nak több mint fele ép marad. Ugyanakkor hígítatlan egérsavóban 30 perc inkubáció után tömegspektroszkópiával kimutatható volt az alapvegyület, de nem volt kimutatható semmilyen degradációs származéka (22). Ha ugyanezt a vizsgálatot teljes vérben végezték, már megjelent 2 olyan degradációs termék, melyek a C-terminális argininek és prolinok körüli hasítással keletkezhetnek. Feltételezhető, hogy a teljes vér valamelyik sejtjes eleméből származnak azok a proteázok, amik ezeket a hasítási termékeket létrehozták. Intravénásan 5 mg/ttkg mennyiségű A3-APO beadása után a farmakokinetikai vizsgálatok eredménye az volt, hogy 30 perc elteltével az egerektől vett vérből tömegspektroszkópiával A3-APO nem volt kimutatható. Megjelent a spektrumon két degradációs terméknek megfelelő jel, melyek a Chex1-Arg20 és az Arg7-Arg20 fragmentumoknak voltak betudhatóak. Az *in vivo* jó antibakteriális hatékonyságot lehetséges, hogy ezek a degradációs termékek hozzák létre (22). A fragmensek MIC értékeit vizsgálva az *Enterobacteriaceae* családba tartozó fajok törzsein kiderült, hogy a Chex1-Arg20 több mint kétszer olyan hatékony, mint az A3-

APO. A rövidebb Arg7-Arg20 fragmens viszont elveszítette antibakteriális hatékonyságát (21).

Saját in vivo farmakokinetikai vizsgálatunk során, 5 mg/ttkg A3-APO-t adtunk im a vizsgálatban részt vevő egereknek, ezután 0-90 perc intervallumban a szemzúg vénájukból levett vérből A3-APO nem volt kimutatható TCA-t használva detergensként. Az iv és im adagolás utáni eltérő farmakokinetikai jellemzők háttérében valószínűleg az áll, hogy a peptid im adminisztráció során kötődik egy hordozó biopolimerhez, valószínűleg fehérjéhez. Ez a hordozó fehérje lehet felelős a kiemelkedő in vivo hatásokért, mivel peptid alapú gyógyszerek általában nem intravénás adagolás után hatástalanok szoktak maradni. A megjavult toxicitási mutatók is egy hordozó fehérje jelenlétére mutatnak, figyelembe véve hogy peptid és fehérje alapú gyógyszerek toxicitása hordozókhoz kötve csökkenthető (43).

Az antibakteriális kutatások során előállított peptid vegyületek gyakran csak lokálisan használhatóak. Terápiás felhasználhatóságuk azért ilyen szűk, mert eukarióta sejteken is toxikus hatásúak (44,45). Olyan antibakteriális peptid vegyületeket lehet szisztémás terápiában is alkalmazni, amelyek nem roncsoják az eukarióta sejtmembránokat, specifikusan csak bakteriális intracelluláris célmolekulákhoz kötődnek, és csak azok működését gátolják. A pyrrolicorinról és származékairól már korábban kiderült, hogy intracelluláris célmolekulájuk csak a bakteriális DnaK és GroEL az eukarióta sejtek azonos funkciójú hőszokk proteinjeihez nem, vagy csak gyengén kapcsolódnak (37). Ugyanakkor az A3-APO-ról az is tudott, hogy pozitív töltésű aminosavai miatt a baktériumokhoz erősebben vonzódnak, az eukarióta membránok kevésbé negatív felszínűek, mint a prokarióták, így ott kisebb mértékű vonzás fordulhat csak elő (16). A membránra ható peptidek a hirtelen transzmembrán potenciál változás révén érik el baktériumkárosító hatásukat, de az eukarióta sejtek transzmembrán potenciálja jóval alacsonyabb. A bakteriális membránhoz kötődésüket, az eukarióta sejtmembránokkal szemben a koleszterin hiánya is segíti (46). Cudic és társai először vörösvértesteken vizsgálták a pyrrolicorin származékok toxicitását, később valódi sejttaggal rendelkező COS sejt kultúrát használtak ugyanezekre a vizsgálatokra. A vörösvérsejtek sokkal kevésbé érzékenyek peptidek iránt, mint az eredetileg majom vese fibroblastokból immortalizált COS sejt kultúra. 50-500  $\mu\text{M}$  koncentrációk mellett sem a vörösvértestek, sem az élő COS sejtek száma nem csökkent 24 órás A3-APO kezelés alatt. Ugyanakkor a *Xenopus* békák bőréről izolálható

magainin peptid már 300  $\mu$ M koncentrációban 24 óra alatt elpusztította a COS sejteket (47).

In vivo kísérleteink során egyszeri ip adagolás esetén toxikus tünetek az egereken 25 mg/ttkg adagnál jelentkeztek, de szintén ip adagolással a 20 mg/ttkg 4 óránként háromszor ismételt adag nem váltott még ki toxikus jeleket. Iv egyszeri adagolás esetén is 25 mg/ttkg-nál láttuk először a toxikus hatást. Ezeknél a dózisonál csak az egerek viselkedésén lehetett kóros jeleket észrevenni, de a boncolás során erre okot nem találtunk. Mind ip, mind iv adagolásnál a letális dózis 50 mg/ttkg volt, ezeket az egereket felboncolva belső vérzéseket találtunk. Im adagolás esetén 50 mg/ttkg semmilyen kóros mellékhatást nem eredményezett. Az első viselkedési eltérések, amik toxikus hatásra utaltak 75 mg/ttkg-nál jelentkeztek im adagolás után.

További aggodalomra ad okot nemcsak az antibakteriális peptidek, de minden peptid alapú gyógyszer esetén, hogy a klinikai használat során nem idéznek-e elő allergia kialakulást. 5 mg/ttkg A3-APO-t subcutan 3 hét különbséggel adva vizsgálták, hogy a második immunizáló oltás után négy héttel megjelenik-e az egerek savójában A3-APO ellenes antitest. Enzim-jelölt immunoszorbens vizsgálattal (Enzim linked immunosorbent assay, ELISA) IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgM és IgE szignifikáns szintemelkedést a nem immunizált szérumhoz képest nem tapasztaltak. Az A3-APO és antibakteriális peptid rokona a korábban vizsgált diptericin allergizáló hatással nem rendelkezik (22). Ugyan a kísérleti gyógyszerek klinikai kipróbálásához az immunogenitás hiánya nem kötelező paraméter, a későbbi fejlesztésben az A3-APO ide vonatkozó pozitív tulajdonsága még előnyös lehet.

Az újonnan felfedezett antibiotikumok alkalmazhatósága attól is függ, milyen gyorsan alakul ki velük szemben bakteriális rezisztencia. *E. coli* és *K. pneumoniae* törzseket az antibakteriális szerekből a MIC érték felének megfelelő koncentrációt tartalmazó folyékony táptalajban 18 egymás utáni passzázzsal 24-24 óráig inkubáltak. A sorozatos passzálások utáni MIC méréskor az A3-APO esetén nem volt változás, de monomer származéka a Chex1-Arg20 esetén a kiindulási 0,5-4 mg/l MIC értékek 64 mg/l-ig növekedtek. A monomer ellen rezisztencia valószínűleg a membránok szintjén alakul ki (48).

A prolin-gazdag peptidek, köztük az A3-APO is, képesek más antibakteriális peptidekkel, vagy egyéb antibiotikumokkal is szinergista hatást kifejteni (49). Az A3-APO fokozni képes azon antibiotikumok hatékonyságát, melyek ellen kialakuló

rezisztencia aktív enzimműködést igényel. A3-APO előinkubálás után TEM-1  $\beta$ -laktamáz termelő törzsek ellen az amoxicillin visszanyeri baktericid hatását (50). Az A3-APO más ismert antibiotikumok elveszített hatékonyságát is segít visszaállítani, mint a chloramphenicolét, vagy a szulfonamid-trimethoprimét *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* és *Haemophilus influenzae* törzsek esetén is (41). Ugyanakkor az A3-APO-nak vagy monomerjének, a Chex1-Arg20 peptidnek az egerekben tapasztalható sikeres antibakteriális hatása nagy mennyiségű endotoxin felszabadulást eredményez (28). A nagy mennyiségű endotoxin in vivo a kísérleti állatok pusztulását eredményezi, a peptid kezelése a túlélők száma szempontjából így kevésbé voltak meggyőzőek, mint a kontrollként használt imipenem esetében. Ez a klinikai alkalmazás során felmerülő nehézség talán kiküszöbölhető, ha más antibiotikumokkal kombinációban adják a peptideket. *E. coli*, köztük ESBL termelő *E. coli* és *K. pneumoniae* törzseket vizsgálva az a tapasztalat, hogy az A3-APO post antibiotikus hatása (PAE) is 1,5 óra hosszúságú, ami nem marad el szignifikánsan az azonos törzseken mérhető imipenem 2 órás PAE mögött (51). További vizsgálatokkal érdemes lenne megnézni, hogy egy A3-APO kezdőterápia hatását más használatos antibiotikumok komplettálni tudják-e.

Az A3-APO antibakteriális hatékonyságát először in vitro mérésekkel vizsgáltuk. Mind vásárolt ATCC törzseken, mind magyarországi kórházakban izolált klinikai törzseken in vitro hatékonysági vizsgálatokat végeztünk, hogy kiválasszunk az in vivo mérésekre alkalmas törzseket. Az *Enterobacteriaceae* családba tartozó 13 *E. coli*, 13 *K. pneumoniae*, 2 *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, és 5 *Enterobacter cloacae* törzs esetén a minimális inhibitor koncentrációk átlagosan 16 mg/l értékűek voltak, bár voltak a törzsek között 64 mg/l MIC-cel rendelkezők is. Az általunk vizsgált 5 *Proteus vulgaris* törzsre vonatkozó A3-APO MIC érték 64 mg/l volt. Saját méréseink alapján nem mondható ki, hogy az A3-APO minden *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktérium fajra és törzsre egyaránt hatékony, de a vizsgált törzsek nagy része valóban olyan MIC értékkel rendelkezik, ami alapján in vivo mérésekre is érdemes kipróbálni. A vizsgált 7 *P. aeruginosa* és 3 *E. faecalis* törzsre vonatkozó MIC érték a vártnak megfelelően 64 mg/l fölötti volt. Itt a DnaK hőszokkprotein fajra jellemző szerkezete alapján a peptidnek in vitro csak a membránon kifejtett hatásával számolhatunk, hiszen az intracelluláris targethez a peptid nem kötődik. Kilenc különböző *A. baumannii* törzs in vitro vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy ezen

baktériumfaj törzseire is kevésbé hatékony az A3-APO, a MIC értékek 32-64 mg/l között változtak.

In vivo kísérleteinket *E. coli* Neumann törzssel kezdtük, intraperitoneálisan fertőzött egereket kezeltünk különböző dózisu A3-APO-val illetve 40 mg/ttkg imipenemmel. A kezelést a fertőzés létrehozása után 30 perccel kezdtük. Ilyen korán indított kezelés hatására a 10 és 20 mg/ttkg dózisban ip adott A3-APO és imipenem 80-100%-os 5 napos hosszútávú túlélést biztosított az egereknek, míg a kezeletlen csoport egerei már az első 10 órában elpusztultak. Második in vivo kísérletünk során a hirtelen kialakuló sepsis és septikus sokk megelőzésére a fertőzéshez használt baktérium inokulumot fiziológiás dextrán oldatban készítettük (25). Ebben a kísérletben az antibakteriális kezelést nem azonnal a befertőzés után indítottuk, hanem a valós élethez hasonlatosabban megvárva, amíg a baktériumok a szervezetet ellepik. A fertőzéshez használt *E. coli* 5770 törzs ESBL termelő törzs volt. A korai (19 órás) túlélésre az A3-APO még dózisufüggő hatást gyakorolt, a 2,5 mg/ttkg kezelésnél 20%, 5 mg/ttkg kezelésnél 50%, 10 mg/ttkg kezelésnél 80% túlélést biztosított. A késői túléléssel már nem igazolható az A3-APO antibakteriális hatékonysága, 2,5 mg/ttkg nál 10, 5 mg/ttkg-nál 30, 10 mg/ttkg-nál az egerek 20%-a maradt életben. A kezeletlen kontrollnál korai 20%-os, késői 10 %-os, a 40 mg/ttkg imipenem kezelésnél 90%-os rövid és hosszútávú túlélést láttunk. Ugyanakkor az egerek farokvénájából vett vérből meghatározott baktérium csíraszám értékek az A3-APO jó antibakteriális hatékonyságát igazolták. Míg a kezeletlen kontroll csoport vérében a baktérium csíraszám  $10^8$  CFU/ml nagyságrendig emelkedett, addig mind az A3-APO mind az imipenem kezelés a 8. órában ezt  $10^5$  CFU/ml nagyságúra csökkentette. Az A3-APO következő kezelés már a kimutathatóság szintje alá csökkentette a baktérium csíraszámot, míg az imipenem kezelt állatok vér baktérium koncentrációja a kísérlet során végig  $10^4$  CFU/ml nagyságrendű maradt. Az A3-APO hatására in vivo hirtelen bekövetkező baktériumpusztulás, endotoxin felszabadulás okozhatta az egerek elhullását (28). A harmadik *E. coli* fertőzés kezelésekor figyelembe vettük, hogy a peptid antibiotikumok vesén át történő kiválasztódása 8-10-szer gyorsabb egerekben, mint főemlősökben (29, 30), de cisplatin előkezeléssel, a vesék károsítása révén, a kiválasztódás mértéke az emberihez hasonló szintre csökkenthető (25). Ez a cisplatin előkezelés viszont sokat rontott az egerek általános állapotán. Míg a kezeletlen kontrol csoportban mérhető halálozás, és csíraszám értékek hasonlóak voltak a cisplatin előkezelés nélküli csoport értékeihez, az

antibakteriális kezelések kedvezőtlenebb eredményt hoztak. A vér csíraszám értékek a cisplatin előkezelés nélküliekhez hasonlóak lettek, de a cisplatin előkezelt állatok kevésbé tudtak az antibakteriális kezelés hatására szabaddá váló endotoxinnal megküzdeni, a túlélők száma minden csoportban jelentősen csökkent. Imipenem kezelés esetén a rövidtávú túlélés 90% helyett csak 86%, a hosszútávú szintén 90% helyett csak 56%-os lett. Ehhez a kontrol értékhez viszonyítva a 10 mg/ttkg A3-APO kezelés 40%-os, a 20 mg/ttkg A3-APO kezelés 20%-os hosszútávú túlélést biztosított.

Az általunk vizsgált 9 *A. baumannii* törzs ugyan emelkedettebb MIC értékekkel rendelkezett, mint az *Enterobacteriaceae* család törzsei, mégis megvizsgáltuk, hogy in vivo szisztémás *A. baumannii* fertőzés ellen az A3-APO milyen terápiás védelmet jelent. Az *A. baumannii* BAA-1805 egy MBL termelő törzs, amire in vitro 32 mg/l A3-APO MIC értéket határoztunk meg. Intraperitoneális fertőzés után iv adott 2,5 mg/ttkg imipenem és A3-APO hatékonyságát hasonlítottuk össze. Az MBL termelő törzs ellen nem vártuk, hogy az imipenem hatékonyan működjön, valóban a kontrollcsoporthoz képest csak 1 log egységnyi csíraszám csökkenést eredményezett, az egerek pusztulása viszont a kontroll csoporttal azonos volt. Bár ebben az alacsony dózisban, 2,5 mg/ttkg esetén az A3-APO sem okozott a vér baktérium csíraszámában 1 log egységnél nagyobb csökkenést, az egerek túlélési esélyeit nagymértékben javította. A kontroll és imipenem kezelt csoportokban a 12. órában csak 4-4, az A3-APO kezelt csoportban 7 egér maradt életben. A következő kísérletben ip fertőzés után a kezelés új alternatíváját, az imipenem kezelést próbáltuk, 5 mg/ttkg A3-APO és 40 mg/ttkg imipenem hatását vizsgáltuk. A kezeletlen csoporthoz képest az imipenem egy, az A3-APO 2 log<sub>10</sub> egységnyi csíraszám esést eredményezett. A 18 órás túlélés a kiindulási 7 egérhez képest a kezeletlen csoportban 1, az imipenem kezeltben 3, az A3-APO kezeltben 5 volt. Részben megismételve ezt a mérést ip fertőzés után 40 mg/ttkg imipenem és 5 mg/ttkg A3-APO négy óránkénti kétszeri adagolása után azt tapasztaltuk, hogy az imipenem kezelések a vér baktérium csíraszámot a kezeletlen kontrollhoz képest 2-2 log<sub>10</sub> egységnyivel, az A3-APO csak 1-1 log<sub>10</sub> egységnyivel csökkentette, de az A3-APO az egerek túlélésére jobb hatást gyakorolt. A kísérlet 8. órájában a kiindulási 7 egérből csak 2 imipenem kezelt maradt életben, míg az A3-APO kezelték mind éltek. Bár az in vitro mérhető MIC érték alapján nem volt várható in vivo kifejezett hatékonyság az A3-APO-tól *A. baumannii* ellen, mégis mind a vér baktérium csíraszámok alakulásában, mind az egerek túlélésére gyakorolt hatásban az A3-APO jó eredményeket mutatott.



Az égett sebek *Gram*-negatív bakteriális felülfertőződése jelentős morbiditás és mortalitás értékekkel jelentkezik. A leggyakoribb égett sebfertőzés kórokozó az *A. baumannii* (33%) az Afganisztánban és Irakban sérült katonák között, az MBL termelő *A. baumannii* által okozott súlyos szepszis kialakulása 30% fölé emelkedett (52,53). Kísérletesen létrehoztunk standard méretű égett sebeket (26), melyeket különböző mennyiségben és alkalommal fertőztünk *A. baumannii* BAA-1805 törzsszel. Első kísérletünk során a nosokomiális fertőzések kialakulását modelleztük, és az égett sebeket 5 napon keresztül kis csíraszámú *A. baumannii*-vel mesterségesen fertőztük. Azt vizsgáltuk, hogy a mindennapos A3-APO kezelés ki tudja-e védeni az így kialakuló sebfertőzést. A kísérlet 5. napjára a kezeletlen kontroll csoport egereinek sebéből grammonként számítva  $10^4$  nagyságrendben, míg az A3-APO kezelt sebéből csak  $10^1$  nagyságrendben tenyésztett vissza a baktérium. Sem a kezeletlen, sem az A3-APO kezelt csoport egereinél nem alakult ki szisztémás fertőzés az alacsony inokulum hatására.

Nagyobb  $10^9$  nagyságrendű baktérium mennyiséggel is fertőztünk égett sebeket. A nagyobb inokulum hatására már kialakult bakteriémia a kísérletbe bevont állatokban. Az egyszeri dózisban adott A3-APO a kezeletlen csoportban kialakuló  $10^7$  vér baktériumszámhoz képest, csak  $10^3$  nagyságrendben engedte a baktériumokat a véráramba betörni, ezzel még a colistinél is hatékonyabb védelmet nyújtott. A vérkeringésbe jutott baktériumok pusztításában is az A3-APO érte el a legnagyobb sikert, összehasonlítva az imipenem vagy a colistin hatásával. Az egerek sebéből az 5. napon visszatenyészthető baktérium mennyisége a kezeletlen kontrollhoz képest az imipenemnél 1, a colistinél 2 az A3-APO-nál 4  $\log_{10}$  értékkel volt kevesebb. A kísérletben résztvevő állatok általános állapota, és sebének gyógyulása is az A3-APO kezelt sebekben volt a legjobb.

$10^{11}$  CFU/seb, nagyon sűrű inokulummal is fertőztünk meg égett sebeket, itt komoly szisztémás fertőzés alakult ki, a kezeletlen csoport 7 egeréből 2 a második napon elpusztult. Ilyen masszív fertőzés gyógyítására 5 napon keresztül napi egyszeri 5mg/ttkg A3-APO, vagy colistin és 40 mg/ttkg imipenem im kezelést próbáltunk. A kezelt egerek mind túléltek az 5. napig, de közülük csak az A3-APO kezelt egerek egészségesnek. A seb baktérium csíraszámok a kezeletlen  $10^7$  CFU/g-hoz képest az imipenem csoportban  $10^5$ , a colistin csoportban  $10^3$  nagyságrendűek lettek, az A3-APO csoport seb baktérium csíraszámja a kimutathatóság határára csökkent.

Megvizsgáltuk, hogy az A3-APO hogyan hat a spontán sebgyógyulásra, az égett sebeket nem fertőztük mesterségesen. 5 nap 5 mg/ttkg A3-APO kezelés után a kezeletlen sebekhez képest makroszkóposan is jól látható eredményesebb gyógyulást, a szövettani metszeten látható mikroszkópikus jelek is alátámasztották. Az A3-APO talán vagy részben azzal segítette a spontán sebgyógyulást, hogy a környezet kontamináló baktériumait sem engedte megtelepedni, vagy elszaporodni. További kísérleteink során a sebfertőzés modellben MRSA baktériumot használtunk, illetve egy lábszárfekélyből izolált *K. pneumoniae*-*A. baumannii*-*Proteus mirabilis* törzsekkel hoztunk létre kevert fertőzést. Ez a négy baktérium törzs in vitro méréseink alapján rezisztensnek bizonyult A3-APO-val szemben. A kezeletlen kontrol egerekhez képest az MRSA fertőzött, de A3-APO kezelt egerek sebei nem voltak gennyesek, gyulladásos jelek a sebek környékén nem látszódtak. A kevert fertőzésből kialakult sepsis esetén az A3-APO az egerek túlélését megnyújtotta, a vér baktérium csíraszámokat csökkentette. Az in vivo mérések alapján az A3-APO jótékony hatása nem magyarázható az antibakteriális aktivitással (54). Humán perifériás vérből izolált mononuclearis sejtkultúrán az A3-APO negyed illetve hatod részben csökkentette az interleukin-4 és interleukin-10 termelődést. Az A3-APO in vivo jótékony hatásának egyik lehetséges magyarázata, hogy a fertőzés helyén a gyulladást mérsékli (54).

## 7. Következtetések

1. Az A3-APO, mint a természetből izolált prolin-gazdag antibakteriális peptidek mesterséges tervezett származéka, az alapvegyületekhez képest megőrizte in vitro antibakteriális spektrumát és hatékonyságát, ezt 57 különböző vásárolt ATCC és klinikai anyagból izolált baktériumtörzs A3-APO MIC értékét meghatározva bizonyítottuk. Az A3-APO különösen az *Enterobacteriaceae* család baktériumai ellen hatékony, bár a családban kivételt képez a *Proteus vulgaris* faj. Közepes hatékonysággal rendelkezik a peptid az *Acinetobacter baumannii* törzsekkel szemben, míg *Pseudomonas aeruginosa*, és Gram-pozitív baktériumok ellen szinte hatástalan. Minimális hatékonysága ezekkel a baktériumokkal szemben a bakteriális membránokra kifejtett hatásának tudható be, míg az A3-APO iránt érzékeny baktériumok esetében a baktériumban intracellulárisan elhelyezkedő DnaK hősokk-protein és chaperon fehérjék működésének gátlása hozzáadódik ehhez a membránhatáshoz.
2. Farmakokinetikai méréseinkkel im adagolás után nem sikerült 0-90 perc intervallumban a beadás után a kísérleti állatok véréből A3-APO-t kimutatni, így nem tudtuk megmérni sem a kiürülés sebességét, sem a maximálisan elérhető szérumszintet. In vitro szérumban hosszú felezési idők mérhetők, így feltételezhető, hogy a peptid im adagolás után egy hordozófehérjéhez kötődik, ezzel az antibakteriális hatása megmarad, sőt a toxicitási paraméterei is javulnak. Az is lehetséges, hogy a peptid valamelyik sejtes elemhez kötődve is fejt ki in vivo hatást, ezért nem mérhető szintje a sejtmentes savóban, de hatásos fertőzésekkel szemben. Módosított farmakokinetikai tesztekkel és különböző vérsejtek sejt kultúráival végzett in vivo mérések ezekre a kérdésekre választ adhatnak.
3. Toxicitási vizsgálatainkkal meghatároztuk azt a maximálisan beadható A3-APO dózist, amelynél toxikus hatás még nem jelentkezik az állatokon, ez a NOAEL (no observed adverse effect limit) érték. Az egyszeri intraperitonealis adagolás során 10 mg/ttkg-nál nem jelentkezett még toxikus hatás, míg 25 mg/ttkg esetén már észleltünk ilyet. Ismételt iv adagolásoknál a 20 mg/ttkg mennyiség bizonyult a NOAEL értéknek. Egyszeri iv adagolás NOAEL értéke 10 mg/ttkg,

25 mg/ttkg esetén már toxikus jelek mutatkoznak. Im adagolás után az 50 mg/ttkg-ot kaptuk NOAEL értéknek és csak 75 mg/ttkg esetén láttunk toxikus hatást. Mind iv mind ip adagolás esetén az 50 mg/ttkg már halálos dózis volt.

4. Szisztémás *E. coli* fertőzésekben elvégzett összehasonlító vizsgálattal megállapítottuk, hogy az ip 40 mg/ttkg imipenem in vivo vér baktérium csíraszám csökkentő hatását ip 10 mg/ttkg dózis A3-APO kezeléssel is ugyanúgy el lehet érni, de az A3-APO valószínűleg hirtelen nagy mennyiségű endotoxin felszabadulást okoz, ami az egerek túlélési esélyeit rontja. A multirezisztens, ESBL termelő *E. coli* infekciók kezelésére az A3-APO, mint alternatív kezelési lehetőség felmerülhet, de a hirtelen endotoxin felszabadulást megelőzve inkább alacsonyabb dózisban, más szinergistaként működő antibiotikumokkal kombinálva.
5. Szisztémás, MBL termelő *A. baumannii* fertőzésben megállapítottuk, hogy az A3-APO akár intravénás 2,5 mg/ttkg, akár intramuscularis 5 mg/ttkg adagolás után nemcsak a vér baktérium csíraszámot csökkentette, de az elhullott egerek száma is jóval kevesebb volt a kezelések hatására, mint a kezeletlen csoportban.
6. Két különböző méretű multirezisztens *A. baumannii* inokulumot használva sebfertőzést alakítottunk ki. Megállapítottuk, hogy a kisebb inokulum hatására kialakuló átmeneti bakteriémia is kisebb fokú, és gyorsabban eliminálódik egyszeri 5 mg/ttkg im A3-APO, mint imipenem vagy colistin hatására. Ugyanebben a kísérletben látható volt, hogy a seb csíraszám csökkentés terén is az A3-APO volt a legsikeresebb. Nagyobb kezdeti inokulum erőteljesebb szisztémás fertőzése, és a mellette fennálló sebfertőzés is sikeresen gyógyítható volt 5 napon keresztül adott A3-APO-val.
7. Bizonyítottuk, hogy az A3-APO megvédi az egereket az általunk *A. baumannii*-val kísérletesen előidézett, és az egerek környezetében fellelhető egyéb kontamináns baktériumok által okozott sebfertőzéstől. Ezzel bizonyítottuk, hogy a naponta egyszer im adagolt 5 mg/ttkg A3-APO védelmet biztosít a nosocomialis sebfertőzésekkel szemben.

## 8. Összefoglalás

Napjaink egyik legsúlyosabb felmerülő egészségügyi problémája az antibiotikum-rezisztens baktérium törzsek megjelenése és elterjedése. Az új antibakteriális szerek fejlesztése nem halad olyan ütemben, mint ahogy hiány jelentkezik a meglévő antibiotikumok terápiás hatékonyságában. Fontos, hogy az új antibakteriális vegyületek olyan új hatásmechanizmussal rendelkezzenek, ami ellen a baktériumok nem tudnak gyorsan reagálva rezisztenssé válni. A főleg rovarokból izolált antimikrobiális peptideket régóta lehetséges alternatívának gondoljuk a kis molekulájú antibiotikumok mellett. Az európai verőköltő bodobácsból, a *Pyrrhocoris apterus*-ből izolált pyrrhocoricin számos tervezett analóg származéka közül a prolinban gazdag A3-APO bizonyult preklinikai vizsgálatokra érdemes antibakteriális peptidnek. Az A3-APO kimagasló membránkárosító hatású, gátolja a 70 kDa nagyságú hősokk-proteint, a DnaK-t, nem toxikus az eukarióta sejtekkel szemben és ellenáll a testnedvek proteolitikus roncsolásának.

A doktori értekezés összefoglalást ad az A3-APO szerkezetéről és hatásmechanizmusáról, az in vitro antibakteriális vizsgálatok közül a post-antibiotikus hatás és a rezisztencia indukció vizsgálatáról. A tézisek részletesen tárgyalják az in vitro antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok eredményeit, az in vivo toxicitási értékeket, és a szisztémás és helyi fertőzések kezelésében tapasztalt hatékonyságot.

In vitro az *Enterobacteriaceae* családba tartozó 33 baktériumtörzs ellen a peptid átlagos Minimális Inhibitor Koncentrációja (MIC) 16 mg/l volt. A *P. vulgaris* kivételt jelentett ebben a családban, MIC tartománya magas 64-128 mg/l volt, hasonlóan a *P. aeruginosa* és *E. faecalis* törzseknél mérhetőkhöz. A vizsgált 9 *A. baumannii* törzsre vonatkozó MIC érték a 32-64 mg/l tartományba esett. A még nem észlelhető toxikus hatás határértékek ismételt iv adagoláskor 20 mg/ttkg-nál, iv adagolás esetén 10 mg/ttkg-nál, im beadás során 50 mg/ttkg-nál voltak mérhetőek. Az A3-APO, a tervezett antibakteriális peptid hatékonynak bizonyult különböző *E. coli* és *A. baumannii* szisztémás fertőzés, valamint *A. baumannii* égett seb fertőzés egérmodellben is. Az A3-APO peptid ígéretes tulajdonságokkal rendelkezik, hogy a multirezisztens kórokozók elleni antibiotikum arzenál tagja legyen.

## 9. Summary

One of the most serious emerging health concerns today is the appearance and spread of antibiotic resistant bacterial strains. The development rate of new antimicrobial agents cannot keep up with the lack of therapeutic potency of existing antimicrobial drugs. It is important to identify antimicrobial compounds with novel modes of action for which the bacteria are unable to mount a quick response to build resistance. Antimicrobial peptides, isolated mainly from insects have long been considered to be viable alternatives to small molecule antibiotics. From a series of designer antibacterial peptides, analogs of pyrrhocoricin, an antibacterial peptide isolated from the European sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus*, A3-APO emerged as a viable preclinical candidate. A3-APO has superior ability to disintegrate the bacterial membrane and inhibit the 70-kDa heat shock protein DnaK, lack of eukaryotic toxicity and withstand proteolytic degradation in body fluids.

In this PhD thesis the structure and modes of action, from the in vitro antibacterial effects the postantibiotic effect and the resistance induction of A3-APO are summarized. The results of in vitro antimicrobial susceptibility tests, and in vivo properties like toxicity and antimicrobial effect against systemic and local infections are discussed in details.

In vitro the peptide exhibited a median minimal inhibitory concentration (MIC) of 16 mg/l against 33 strains from *Enterobacteriaceae* family bacteria. *Proteus vulgaris* was an exception in this family with his high MIC range of 64-128 mg/l, what we could measured also against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* strains. Against the examined 9 *Acinetobacter baumannii* strains the MIC range was 32-64 mg/l. The No Observed Adverse Effect Limits at repeated intraperitoneal, at intravenous and at intramuscular peptide administration were 20 mg/kg, 10 mg/kg and 50 mg/kg, respectively. The designer antibacterial peptide A3-APO was efficacious in different mouse models of *E. coli* and *A. baumannii* systemic infections, and in *A. baumannii* wound infections after burn injury.

## 10. Irodalomjegyzék

1. [www.mindennapi.hu/cikk/tudomany/napkeleti](http://www.mindennapi.hu/cikk/tudomany/napkeleti)
2. [www.herbs2000.com/medica/\\_2](http://www.herbs2000.com/medica/_2) antibiotics
3. Nelson ML, Dinardo A, Hochberg J, Armelagos GJ. (2010) Brief communication: Mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350-550 CE. *Am J Phys Anthropol*, 143: 151-154.
4. Glad T, Bernhardsen P, Nielsen KM, Brusetti L, Andersen M, Aars J, Sundset MA. (2010) Bacterial diversity in faeces from polar bear (*Ursus maritimus*) in Arctic Svalbard. *BMC Microbiol*,10:10.
5. Noskin GA. Contemporary diagnosis and management of antimicrobial-resistant bacteria. *Handbooks in Health care Company*, Newtown, 2008: 16-17.
6. Palumbi SR. (2001) Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science*, 293: 1786-1790.
7. Rozgonyi F, Fekete F, Kristóf K, Cser V. Antibacterialis szerek. In: Rozgonyi F (szerk.), *Klinikai járóbeteg-szakorvosi és háziiorvosi microbiologiai gyorsdiagnostica*. Homir, Budapest, 2006: 297-357.
8. Lorian V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1996.
9. Gomez-Lus R, Vergara Y. (1995) The Aminoglycoside Resistance in *Haemophilus influenzae*. *J Chemother*, 7: 97-99.
10. Nagy E, Konkoly Thege M. A baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának mechanizmusai. In: Czirok É (szerk.), *Klinikai és járványügyi bakteriológia*. Melania, Budapest, 1999: 576-593.

11. Harris AD, McGregor JC, Johnson JA, Strauss SM, Moore AC, Standiford HC, Hebden JN, Morris JG Jr. (2007) Risk factors for colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria and intensive care unit admission. *Emerg Infect Dis*, 13:1144-1149.
12. Cudic M, Bulet P, Hoffmann R, Craik DJ, Otvos LJr. (1999) Chemical synthesis, antibacterial activity and conformation of diptericin, an 82-mer peptide originally isolated from insects. *Eur J Biochem*, 266: 559-565.
13. [www.oek.hu](http://www.oek.hu)
14. Andreu D, Rivas L. (1998) Animal antimicrobial peptides an overview. *Biopolymers*, 47: 415-433.
15. Engstrom Y. (1999) Induction and regulation of antimicrobial peptides in *Drosophila*. *Dev Comp Immunol*, 23: 345-358.
16. Otvos LJr. (2002) The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cell Mol Life Sci*, 59: 1138-1150.
17. Casteels P, Tempst P. (1994) Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. *Biochem Biophys Res Commun*, 199: 339-345.
18. Cociancich S, Dupont A, Hegy G, Lanot R, Holder F, Hetru C, Hoffmann JA, Bulet P. (1994) Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap sucking bug *Pyrrhocoris apterus*. *Biochem J*, 300: 567-575.
19. Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R, Otvos LJr. (2001) The antibacterial peptid pyrrhocoricin inhibits the ATP-ase actions of DnaK and prevents chaperon assisted protein folding. *Biochemistry*, 40: 3016-3026.
20. Otvos LJr, Bokonyi K, Varga I, Otvos BI, Hoffmann R, Ertl HC, Wade JD, McManus AM, Craik DJ, Bulet P. (2000) Insect peptides with improved protease-resistance protect mice against bacterial infection. *Protein Sci*, 9: 742-749.
21. Otvos LJr, Wade JD, Lin F, Condie BA, Hanrieder J, Hoffmann R. (2005) Designer antibacterial peptides kill fluoroquinolon resistant clinical isolates *J Med Chem*, 48: 5349-5359.



22. Noto PB, Abbadessa G, Cassone M, Mateo GD, Agelan A, Wade JD, Szabo D, Kocsis B, Nagy K, Rozgonyi F, Otvos LJr. (2008) Alternative stabilities of a proline-rich antibacterial peptide in vitro and in vivo. *Protein Sci*, 17: 1249-1255
23. Tien HC, Battad A, Bryce EA, Fuller J, Mulvey M, Bernard K, Brisebois R, Doucet JJ, Rizoli SB, Fowler R, Simor A. (2007) . Multi-drug resistant *Acinetobacter* infections in critically injured Canadian forces soldiers. *BMC Infect Dis*, 7: 95.
24. Fields GB, Noble RL. (1990) Solid-phase peptide synthesis using 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res*, 35:161–214.
25. Mathe A, Komka K, Forczig M, Szabó D, Anderlik P, Rozgonyi F. (2006) The effect of different doses of cisplatin on the pharmacokinetic parameters of cefepime in mice. *Lab anim*, 40: 296-300.
26. Yamakawa T, Mitsuyama J, Hayashi K. (2002) In vitro and in vivo antibacterial activity of T-3912, a novel non-fluorinated topical quinolone. *J Antimicrob Chemother*, 49: 455-465.
27. Fumarola D, Marcuccio L, Fransvea P, Paschetto M, Miragliotta G, Brienza A. (1975) Attempted protection against experimental endotoxic shock. *G Bacteriol Virol Immunol* 68: 224-230.
28. Byl B, Clevenbergh P, Kentos A, Jacobs F, Marchant A, Vincent JL, Thys JP. (2001) Ceftazidime- and imipenem-induced endotoxin release during treatment of gram-negative infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 20: 804-807.
29. Klootwijk W, Sleddens-Linkels E, de Boer R, Jansen CA, Autar R, de Herder WW, Boeve ER, Visser TJ, de Greef WJ. (1997) Renal clearance of the thyrotropin-releasing hormone-like peptide pyroglutamyl-glutamyl-prolineamide in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 3068-3073.
30. Sakamoto H, Hatano K, Higashi Y, Mine Y, Nakamoto S, Tawara S, Kamimura T, Matsumoto F, Kuwahara S. (1993) Animal pharmacokinetics of FK037, a novel parenteral broad-spectrum cephalosporin. *J Antibiot*, 46: 120-130.
31. Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P. (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J*, 8: 2387-2391.
32. Dimarcq LJ, Keppi E, Dunbar B, Lambert J, Reichhart JM, Hoffmann D, Rankine SM, Fothergill JE, Hoffmann JA. (1988) Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from

- immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipterin A. *Eur J Biochem*, 171: 17-22.
33. Mackintosh JA, Veal DA, Beattie AJ, Gooley AA. (1998) Isolation from an ant *Myrmecia gulosa* of two inducible O-glycosylated proline-rich antibacterial peptides. *J Biol Chem*, 273: 6139-6143.
  34. Bulet P, Dimarcq JL, Hetru C, Lagueux M, Charlet M, Hegy G, Van Dorssealer A, Hoffmann JA. (1993) A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J Biol Chem*, 268: 14893-14897.
  35. Bulet P, Urge L, Ohresser S, Hetru C, Otvos LJr. (1996) Enlarged scale chemical synthesis and range of activity of drosocin, an O-glycosylated antibacterial peptide of *Drosophila*. *Eur J Biochem*, 238: 64-69.
  36. Markossian KA, Zamyatnin AA, Kurganov BI. (2004) Antibacterial proline-rich oligopeptides and their target proteins. *Biochemistry*, 69: 1082-1091.
  37. Otvos LJr, Insug O, Rogers ME, Consolvo PJ, Condie BA, Lovas S, Bulet P, Blaszczyk-Thurin (2000) Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry*, 39: 14150-14159.
  38. Hoffmann R, Bulet P, Urge L, Otvos LJr. (1999) Range of activity and metabolic stability of synthetic antibacterial glycopeptides from insects. *Biochim Biophys Acta*, 1426: 459-467.
  39. Kragol G, Hoffmann R, Chattergoon MA, Lovas S, Cudic M, Bulet P, Condie BA, Rosengren KJ, Montaner LJ, Otvos LJr. (2002) Identification of crucial residues for the antibacterial activity of the proline-rich peptide, pyrrhocoricin. *Eur J Biochem*, 269: 4226-4237.
  40. Cudic M, Condie BA, Weiner DJ, Lysenko ES, Xiang ZQ, Insug O, Bulet P, Otvos LJr. (2002) Development of novel antibacterial peptides that kill resistant isolates. *Peptides*, 23: 2071-2083.
  41. Cassone M, Vogiatz P, La Montagna R, De Olivier IV, Cudic P, Wade JD, Otvos LJr. (2008) Scope and limitations of the designer proline-rich antibacterial peptide dimer, A3-APO, alone or in synergy with conventional antibiotics. *Peptides*, 29: 1878-1886.
  42. Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J. (2000) Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood

- isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. *Clin Infect Dis*, 30: 454-460.
43. MacEwan SR, Chilkoti A. (2010) Elastin-like polypeptides: biomedical applications of tunable biopolymers. *Biopolymers*, 94: 60-77.
  44. Chen J, Falla TJ, Liu H, Hurst MA, Fujii CA, Mosca DA, Embree JR, Lousy DJ, Radel PA, Cheng Chang C, Gu L, Fiddes JC. (2000) Development of protegrins for the treatment and prevention of oral mucositis: structure-activity relationships of synthetic protegrin analogues. *Biopolymers*, 55: 88-98.
  45. Ge Y, MacDonald D, Henry MM, Hait HI, Nelson KA, Lipsky BA, Zasloff MA, Holroyd KJ. (1999) In vitro susceptibility to pexiganan of bacteria isolated from infected diabetic foot ulcers. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 35: 45-53.
  46. Powers JP, Hancock RE. (2003) The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24: 1681-1691.
  47. Cudic M, Lockett CV, Johnson DE, Otvos LJr. (2003) In vitro and in vivo activity of an antibacterial peptide analog against uropathogens. *Peptides*, 24: 807-820.
  48. Cassone M, Frith N, Vogiatzi P, Wade JD, Otvos LJr. (2009) Induced resistance to the designer proline-rich antimicrobial peptide A3-APO does not involve changes in the intracellular target DnaK. *Int J Pept Res Ther*, 15: 121-128.
  49. Credito K, Lin G, Koeth L, Sturgess MA, Appelbaum PC. (2009) Activity of levofloxacin alone and in combination with a DnaK inhibitor against gram-negative rods, including levofloxacin-resistant strains. *AAC*, 53: 814-817.
  50. Otvos LJr, de Olivier IV, Wade JD, Cudic P. (2006) Prior antibacterial peptide-mediated inhibition of protein folding in bacteria mutes resistance enzymes. *AAC*, 50: 3146-3149.
  51. Rozgonyi F, Szabo D, Kocsis B, Ostorhazi E, Abbadessa G, Cassone M, Wade JD, Otvos LJr. (2009) The antibacterial effect of a proline-rich antibacterial peptide A3-APO. *Curr Med Chem*, 16: 3996-4002.
  52. Hawley JS, Murray CK, Griffith ME, McElmeel ML, Fulcher LC, Hospenthal DR, Jorgensen JH. (2007) Susceptibility of acinetobacter strains isolated from deployed U.S. military personnel. 51: 376-378.
  53. Murray CK, Wilkins K, Molter NC, Yun HC, Dubick MA, Spott MA, Jenkins D, Eastridge B, Holcomb JB, Blackburne LH, Hospenthal DR. (2009)

Infections in combat casualties during Operations Iraqi and Enduring Freedom. 66: 138-144.

54. Ostorhazi E, Holub MC, Rozgonyi F, Harnos F, Cassone M, Wade JD, Otvos LJr. (2011) Broad-spectrum antimicrobial efficacy of peptide A3-APO in mouse models of multidrug-resistant wound and lung infections cannot be explained by in vitro activity against the pathogens involved. *Int J Antimicrob Agents*, 37: 480-484.

## 11. Saját publikációk jegyzéke

### 11.1.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Rozgonyi F, Szabo D, Kocsis B, **Ostorhazi E**, Abbadessa G, Cassone M, Wade JD, Otvos LJr. (2009) The antibacterial effect of a proline-rich antibacterial peptide A3-APO. *Curr Med Chem*, 16: 3996-4002.

**IF: 4,708**

2. Szabo D<sup>1</sup>, **Ostorhazi E**<sup>1</sup>, Binas A, Rozgonyi F, Kocsis B, Cassone M, Wade JD, Nolte O, Otvos LJr. (2010) The designer proline-rich antibacterial peptide A3-APO is effective against systemic *Escherichia coli* infections in different mouse models. *Int J Antimicrob Agents*, 35: 357-361.

**IF: 3,032**

3. **Ostorhazi E**, Rozgonyi F, Szabo D, Binas A, Cassone M, Wade JD, Nolte O, Bethel CR, Bonomo RA, Otvos LJr. (2010) Intramuscularly administered peptide A3-APO is effective against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in mouse models of systemic infections. *Biopolymers*, 96: 126-129.

**IF: 2,605**

4. **Ostorhazi E**, Rozgonyi F, Sztodola A, Harnos F, Kovalszky I, Szabo D, Knappe D, Hoffmann R, Cassone M, Wade JD, Bonomo RA, Otvos LJr. (2010) Preclinical advantages of intramuscularly administered peptide A3-APO over existing therapies in *Acinetobacter baumannii* wound infections. *J Antimicrob Chemother*, 65: 2416-2422.

**IF: 4,352**

### 11.1.2. Az értekezéssel kapcsolódó közlemény

1. **Ostorhazi E**, Holub MC, Rozgonyi F, Harnos F, Cassone M, Wade JD, Otvos LJr. (2011) Broad-spectrum antimicrobial efficacy of peptide A3-APO in mouse models of multidrug-resistant wound and lung infections cannot be explained by

in vitro activity against the pathogens involved. *Int J Antimicrob Agents*, 37: 480-484.

**IF: 3,032**

### ***11.2. Az értekezéstől független közlemények***

1. Rozgonyi F, **Ostorhazi E**, Marodi CL, Ghidan A. (2001) Resistance to beta-lactams and glycopeptides in staphylococci and streptococci. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 48: 359-391.
2. Ponyai K, Marschalko M, Schoffler M, **Ostorhazi E**, Rozgonyi F, Varkonyi V, Karpati S. (2009) Syphilis és gonorrhoeae esetek elemzése, a Semmelweis Egyetem Bőr-,Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika Országos STD Centrum adatai alapján (2005-2008). *Orv Hetil*, 150: 1765-1772.
3. Pinter G, Batta G, Keki S, Mandi A, Komaromi I, Takacs-Novak K, Sztaricskai F, Roth E, **Ostorhazi E**, Rozgonyi F, Naesens L, Herczegh P. (2009) Diazo transfer-click reaction route to new, lipophilic teicoplanin and ristocetin aglycon derivatives with high antibacterial and anti-influenza virus activity: an aggregation and receptor binding study. *J Med Chem*, 52: 6053-6061.

**IF: 4,802**

4. Pinter G, Bereczki I, Batta G, Otvos R, Sztaricskai F, Roth E, **Ostorhazi E**, Rozgonyi F, Naesens L, Szarvas M, Boda Z, Herczegh P. (2010) Click reaction synthesis of carbohydrate derivatives from ristocetin aglycon with antibacterial and antiviral activity. *Bioorg Med Chem Lett*, 20: 2713-2717.

**IF: 2,650**

5. Pinter G, Bereczki I, Roth E, Sipos A, Varghese R, Udo EE, **Ostorhazi E**, Rozgonyi F, Phillips OA, Herczegh P. (2011) The effect of systematic structural modifications on the antibacterial activity of novel oxazolidinones. *Med Chem*, 7: 45-55.

**IF: 1,642**

6. Toth V, Hornyak C, Kovacs T, Toth B, Varallyay G, **Ostorhazi E**, Koles J, Bereczki D, Marschalko M, Karpati S. (2011) Meningovascularis

neurosyphilis miatti fiatalkori ischemiás cerebrovascularis betegség. Orv Hetil, 152: 763-767.

7. Farkas B, **Ostorhazi E**, Pónyai K, Toth B, Adlan E, Parducz L, Marschalko M, Karpati S, Rozgonyi F. (2011) Az *Ureaplasma urealyticum* és a *Mycoplasma hominis* antibiotikum-érzékenysége és gyakorisága szexuálisan aktív egyének genitális mintáiban. Orv Hetil, 152: 1698-1702.

## **12. Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Ötvös Lászlónak, Dr. Rozgonyi Ferencnek, Dr. Szabó Dórának, Dr. Kocsis Bélának, Dr. Kristóf Katalinnak, Pestiné Bősze Natasának, Sztodola Andrásnak, közvetlen munkatársaimnak és családomnak.

Köszönöm a rendelkezésemre bocsájtott anyagi támogatást, melyet részben a Dr. Rozgonyi Ferenc által nyert OTKA T 46186 pályázattól kaptam, illetve a Dr. Ötvös László által biztosított összegeket.