

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

Dr.Ostorházi Eszter

Doktori tézisek

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

1. Bevezetés

Súlyos problémát jelent napjainkban, hogy az új antibiotikumok kutatása nem halad olyan gyors ütemben, mint ahogyan megjelennek és elterjednek a meglévő antibiotikumokkal szemben rezisztens baktériumok az emberi kórokozók között. Az európai verőköltő bodobácsból, a *Pyrrhocoris apterus*-ből izolált pyrrhocoricin egy, a természetben megtalálható antibakteriális hatású peptid. Számos tervezett analóg származéka közül az A3-APO bizonyult preklinikai vizsgálatokra érdemesnek. Az A3-APO egyrészt membránkárosító hatású, másrészt gátolja a 70 kDa nagyságú hősokk-proteint, a DnaK-t, ugyanakkor nem toxikus az eukarióta sejtekkel szemben, és ellenáll a testnedvek proteolitikus roncsolásának.

Az in vitro mérhető antibakteriális hatékonyság vizsgálatok eredményei alapján, érdemesnek találtuk kipróbálni, hogy az A3-APO in vivo hogyan alkalmazható. Toxikológiai mérések alapján legbiztonságosabbnak az intramuscularis (im) adagolás bizonyult, 50 mg/ttkg beadott dózissal sem tapasztaltunk káros melléthatást. A helyes adagolás beállításához farmakokinetikai méréseket végeztünk, de triklór-ecetsavat használva kicsapószerként, az A3-APO szérumszintje nem volt mérhető.

Az A3-APO hatékonynak bizonyult különböző *Escherichia coli* és *Acinetobacter baumannii* szisztémás fertőzés, valamint *A. baumannii* égett seb fertőzés egérmodellben is. Az A3-APO peptid ígéretes tulajdonságokkal rendelkezik, hogy a multirezisztens kórokozók elleni új antibiotikum lehessen.

2. Célkitűzések

1. Munkánk során célunk volt meghatározni, hogy az A3-APO, a pyrrhocoricin alapvegyületekhez képest in vitro milyen spektrumú és erősségű antibakteriális hatással rendelkezik
2. Farmakokinetikai méréseinkkel megcéloltuk megmutatni az A3-APO vérszintjének változását im. adagolás után.
3. Toxicitási vizsgálatokat végeztünk, hogy megállapítsuk mi az a maximálisan beadható A3-APO dózis, amelynél toxikus hatás nem jelentkezik az állatokon.

4. Szisztémás *E. coli* fertőzésekben összehasonlító vizsgálatot végeztünk, hogy megállapítsuk a 40 mg/ttkg imipenem in vivo hatását milyen intraperitoneális 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 intravénás, akár intramuszkuláris adagolás után.
6. Célunk volt megállapítani, hogy a multirezisztens *A. baumannii* sebfertőzés, és a belőle kialakuló szisztémás fertőzés gyógyítható-e A3-APO intramuszkuláris adagolásával.
7. Célul tűztük ki bizonyítani, hogy a naponta egyszer im adagolt 5 mg/ttkg A3-APO megvédi az egereket az általunk *A. baumannii*-vel kísérletesen előidézett, és az egerek környezetében fellelhető egyéb kontamináns baktériumok által okozott nosokomiális sebfertőzésekkel szemben.

3. Módszerek

3.1. Felhasznált 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.

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

3.2. *In vitro* antibakteriális hatás vizsgálata

Az *in vitro* antibakteriális hatás vizsgálatát két különböző módszerrel is elvégeztük, 96 lyukú mikrotitrátor lemezen. Elsőként 50 µl Mueller-Hinton levesben 5×10^5 /ml csíraszámú baktérium oldatot a vizsgált antibakteriális szer feles léptékű sorozathígításának 50 µl térfogatához adtunk hozzá. 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, ahol az inkubáció utáni A_{600} nem növekedett a kiindulási érték abszorbanciájához képest. Az objektív műszeres mérést a hagyományos MIC méréssel is megerősítettük; 100 µl Mueller-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 oldatának 10-10 µl mennyiségét. 24 óra rázás nélküli inkubálás után sötét háttér mellett szabad szemmel a zavarosodást figyelve állapítottuk meg a MIC értékeket.

3.3. *In vivo* kísérletek

3.3.1. 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 nagyságúak voltak a felhasználás időpontjában. Egy-egy „2” típusú ketrecben 3-5 állatot helyeztünk el, alomként puha hánccsot 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 kezelési 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 (Sigma Aldrich, Budapest, Hungary) felhasználásával 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.

3.3.2. Toxicitás vizsgálatok

Vizsgáltuk 10, 25, 50 mg/ttkg mennyiségű peptid akut toxicitását 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. Második méréskor a bólusok peptid tartalmát 25, 50, 75 és 100 mg/ttkg-ra emeltük.

3.3.3. Farmakokinetikai vizsgálat

A farmakokinetikai vizsgálatokhoz 5 mg/kg peptidet egyszeri adagban CD-1 nőtény egerek combjába im injektáltunk be. A vérvétel az egerek szemzúgából üveg kapilláris 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 centrifugáltuk le, majd a plazma 60 µL mennyiségéhez 20 µL triklór ecetsav 15%-os vizes oldatát adtuk hozzá. 12,000 rpm fordulatszámon ismételt centrifugálás után, 0.5 µL felülúszó Voyager DE matrix-segített lézer ionizációs/deszorpció tandem tömeg spektrométerre került, matrixként α-ciano-4-hidroxi-fahéjsavat használva. Az abszorbancia mérés 214 nm-en történt.

3.3.4. Hatékonysági vizsgálatok E. coli szisztémás fertőzések kezelésében

1,1 x 10⁷ CFU/g *E. coli* Neumann ip fertőzés után összehasonlítottuk ip kezelés során a 40 mg/ttkg imipenem a 2,5 mg/ttkg, a 10 mg/ttkg és a 20 mg/ttkg A3-APO hatékonyságát. Az antibakteriális kezelések a fertőzés után 30 perccel, majd 4 és 8 óra múlva történtek. Öt napig tartó megfigyelés során rögzítettük a túlélő egyedek számát.

1,6x10⁸ CFU/g *E. coli* 5770 baktériummal fiziológias dextrán oldatban ip fertőztünk egereket. A kezelés a fertőzés után 4, 8 és 12 órával történt. 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.

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. 1,2x10⁸ CFU/g *E. coli* 5770 baktériummal fertőztük. Összehasonlítottuk 10 mg/ttkg, 20 mg/ttkg A3-APO és a 40 mg/ttkg imipenem hatékonyságát.

A 2. és 3. kísérletsorozatban 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.

3.3.5. Hatékonysági vizsgálatok *Acinetobacter baumannii* szisztémás fertőzések kezelésében

4 x 10⁷CFU/g ip *A. baumannii* BAA-1805 fertőzés után 4, 8 és 12 órával 2,5 mg/ttkg imipenem illetve A3-APO iv kezelést alkalmaztunk.

2x10⁶ CFU/g ip fertőzés után, 4, 8, 12 órával 5 mg/ttkg A3-APO, illetve 40 mg/ttkg imipenem kezelést kaptak az állatok im.

3x10⁷ CFU/g ip *A. baumannii* fertőzés után 4 illetve 8 órával 5 mg/ttkg A3-APO vagy 40 mg/ttkg imipenem im kezelésben részesültek az egerek.

Mindhárom kísérletnél a kezelés befejeztével még 24 óráig megfigyeltük az állatok viselkedését, és a túlélők számát időben rögzítettük. Vér baktérium csíraszám meghatározáshoz minden kezeléskor és az utolsó antibakteriális kezelés után négy órával az egerek farokvénájából 10 µl vért vettünk.

3.3.6. Hatékonysági vizsgálatok különböző sebfertőzés modellekben

Mindegyik kísérlet sorozat esetén standard méretű égett sebet hoztunk létre a vizsgált egerek hátán. Az állatokat elaltattuk és leborotvált bőrükön égett sebet hoztunk létre egy 11 mm átmérőjű 90 °C 1 g tömegű fém súly hozzányomásával. A behatási idő 2 perc volt. A sebek fertőzése a seb kialakítása után 3 órával történt különböző mennyiségű *A. baumannii* BAA-1085 baktériummal.

A kísérlet sorozat: Az alacsony csíraszámú, 2×10^3 cfu/seb/nap mennyiségben *A. baumannii* BAA-1805 baktériummal fertőztünk 5 egymás utáni napon 6 egeret. Három eger 5 mg/kg A3-APO kezelést kapott közvetlen a fertőzés után im a 0., 1., 2., 3., és 4. napokon. 3 órával a fertőzés után, valamint a 2. és 4. napon vért vettünk az állatok farokvénájából vér baktérium csíraszám meghatározáshoz. Az 5. napon az egereket túlaltattuk, sebeiket baktérium csíraszám meghatározáshoz kimetszettük.

B kísérlet sorozat: Egyszeri magas csíraszámú, 7.2×10^9 cfu/seb *A. baumannii* BAA-1805 baktériummal sebfertőzést készítettünk. 5 mg/kg A3-APO, 5 mg/kg colistint és 40 mg/kg imipenem egyszeri közvetlen a fertőzés utáni im dózis hatékonyságát vizsgáltuk. 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. 2×10^{11} cfu/seb *A. baumannii* fertőzés után naponta ismételt 5 mg/ttkg A3-APO, 40 mg/kg imipenem és 5 mg/ttkg colistin im kezelés hatását vizsgáltuk 5 napig. A túlélő egereket dietil éterrel túlaltatva elpusztítottuk 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 eger esetén nem fertőztük be baktériummal, de négyen semmilyen kezelésben sem részesültek, míg a másik négy eger 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 elpusztítottuk, a sebeiket szövettani vizsgálatához 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 xylenbe 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. Eredmények

4.1. *In vitro* antibakteriális hatékonyság

Mind az 5 különböző *P. vulgaris*, 3 *E. faecalis* és 7 *P. 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 *E. coli* és *K. pneumoniae* törzsek MIC értékei 2-64 mg/l között alakultak,

A vizsgált két *S. enterica* serovar *typhimurium* egyikének 8 mg/l, a másiknak 32 mg/l volt a MIC értéke.

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

9 különböző *A. baumannii* MIC értékét határoztuk meg, háromnak 32 mg/l, háromnak 64 mg/l, háromnak több mint 64 mg/l volt.

4.2. *In vivo* vizsgálatok eredményei

4.2.1. Toxicitási vizsgálatok eredménye

Az A3-APO toxicitási vizsgálata során azt a határértéket ahol káros hatás nem volt tapasztalható, No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) ip. adagolásnál 20 mg/ttkg-nál, iv egyszeri adagolással 10 mg/ttkg-nál, im egyszeri alkalmazás után 50 mg/ttkg dózisonál állapítottuk meg. Az A3-APO im adagolás után nem okozott szisztémás toxikus hatást 50 mg/kg dózisban sem. Mind ip, mind iv alkalmazással 50 mg/kg A3-APO dózis az egerek halálát okozta. Még a 100 mg/kg A3-APO dózis is csak rosszulétet okozott a kísérleti állatoknál im adagolás után.

4.2.2. Farmakokinetikai vizsgálat eredménye

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

4.2.3. E. coli szisztémás fertőzés kezelése

E. coli Neumann ip fertőzés után 30 perccel, majd 4 és 8 órával, szintén ip kezeltük az állatokat. Ez a 30 perces időintervallum elegendő a baktériumok egész szervezetben történő egyenletes eloszlásához. 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 40 mg/ttkg imipenem terápia is 100 %-os túlélést biztosított. 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, $p=0,94058$.

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 septicus sokk állapotot. A kezeletlen kontrol csoportból a fertőzés utáni 19. órában (korai túlélés) 20%, a 25. órában 10% egér élt. Az imipenem kezelésben részesült állatok közül 90 % túlélte 5 megfigyelési napig. Az A3-APO korai túlélésre gyakorolt hatása dózisfüggőnek bizonyult, a 19. órában 2,5 mg/ttkg esetén a túlélő egerek aránya 20%, 5 mg/ttkg mellett 50% egér élt, 10 mg/ttkg A3-APO kezelés

után pedig 80% maradt életben. 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 csoportban 10, az 5 mg/ttkg csoportból 30, a 10 mg/ttkg csoportból 20 %-os volt a túlélés.

Ugyanebben az időpontban az egerek farokvénájából vett vérminták baktérium csíraszámát azt sugallja, hogy bár hatékony az antibakteriális kezelés, a nagy mennyiségű hirtelen felszabaduló endotoxin elpusztítja az állatokat. A kezeletlen csoport vérében a fertőzés utáni negyedik órában (a többi csoportban az antibakteriális kezelés kezdete) a baktérium mennyisége 10^7 CFU/ml nagyságrendű, a 12. órára már 10^8 -ra emelkedik. A 10 mg/ttkg A3-APO első kezelés hatására a fertőzés 8. órájában a vér baktérium mennyisége már kevesebb, mint 10^5 CFU/ml, ami a második kezelés hatására, a 12. órára a kimutathatóság szintje 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. A 40 mg/ttkg kezelés imipenem hatására az első dózis után a vér baktérium csíraszámát 10^5 CFU/ml értékű, a második dózis hatására csak 10^4 -re csökken, de a kísérlet végéig a kezelések felfüggesztése után is ennyi marad. A kezeletlen csoporthoz képest az A3-APO 10 mg/kg-os dózis szignifikánsan csökkentette a 12. óráig a csíraszámokat, kétmintás t-próbával számolva $p = 0,0109$. Imipenem 40 mg/kg és az A3-APO 10 mg/kg-os kezelés csíraszámának összehasonlításakor $p=0,1204$, vagyis az imipenem és a peptid ugyanolyan hatékonysággal csökkentette a baktérium csíraszámot.

A harmadik ip kezelések során figyelembe vettük, hogy a peptid vegyületek, így az antibakteriális hatású peptidek is vesén keresztül választódnak ki, ami 8-10-szer gyorsabban történik egerekben, mint főemlősökben. Az egereken vese clearance csökkenést idéztünk elő azzal, hogy a fertőzések kísérlet megkezdése előtt 3 nappal 18 mg/ttkg ciszplatin előkezelést kaptak. Ezzel a peptid kiválasztódási üteme az emberi szervezetben végbemenő folyamathoz hasonlóvá vált. Ugyanakkor a ciszplatin 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 ciszplatin előkezeléssel is 10%, ugyanúgy, mint ciszplatin előkezelés nélkül, az

antibakteriális szerek már nem tudtak a ciszplatin előkezelés nélküli esethez hasonló sikert elérni az állatok túlélésében. 40 mg/ttkg imipenem hatására a ciszplatin előkezeltek túlélése a 24. órában csak 83%, a 48. órában csak 56% szemben az előkezelés nélküli 90%-os túléléssel. 10 mg/ttkg A3-APO kezelés hatására a ciszplatin előkezelt egerek fertőzés utáni túlélése a 24. órában 70%, a 48. órában 40% volt. Az A3-APO dózisának emelése 20 mg/ttkg-ra nem javított a kezelés hatékonyságán a túlélés a 24. órában átlag 60%, a 48. órában 20 % körüli volt.

A kezeletlen, csak fertőzött egerek vér baktérium csíraszám a 12. óráig folyamatosan növekedett, míg elérte a 10^7 CFU/ml nagyságrendet. Az első dózis imipenem kezelés hatására a vér baktérium csíraszám 10^5 CFU/ml-re csökkent, 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, 20 mg/ttkg A3-APO első kezelés hatvanad részére csökkentette a baktérium csíraszámot. A második dózis után az egerekből baktérium nem tenyésztett vissza 10 mg/ttkg A3-APO esetén 100 %-ban, 20 mg/kg peptid kezelés után 40%-ban. 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.

4.2.4. A. baumannii szisztémás fertőzés kezelése

Miután ip fertőztük a kísérleti állatokat, az iv adott 2,5 mg/kg A3-APO a 4. és 8. órában adott első 2 dózissal $0,5 \log_{10}$ egységgel, a harmadik dózissal a 12. órában $1,5 \log_{10}$ egységgel csökkentette a baktérium csíraszámot. A peptid kezelés a korai túlélést jobban elősegítette, mint a 2,5 mg/kg imipenem. A 12. órában az A3-APO kezelt egerek mind a heten életben voltak, míg a kezeletlen és imipenem kezelt egerek, csak négyen maradtak élve.

Az im kezelések hatékonyságának összehasonlításakor a klinikai gyakorlatban ajánlott 40 mg/kg imipenem dózist használtuk. Az imipenem a vér baktérium csíraszám értéket 10^6 CFU/ml majd 10^3 CFU/ml-re csökkentette a 8. és 12. órában a fertőzés után. Az A3-APO kezelés 10^5 CFU/ml és 10^4 CFU/ml értékű csökkenést eredményezett ezekben az időpontokban, de a túlélés időtartamát jobban segítette. Az imipenem kezelt

csoportban a 18. órában már csak 3 élő állat volt, míg a peptid kezelt csoport 7 állatából még 5 élt.

A harmadik szisztémás fertőzőkor 4 és 8 órával a fertőzés kialakítása után kezeltük az állatokat 40 mg/kg imipenemet vagy 5 mg/kg A3-APOt adva im. Az imipenem ugyan 2 log₁₀ egységnyit csökkentette már az első kezelésnél is a baktérium csíraszámot, de a túlélést nem nyújtotta meg, a 8. órában a csoportból csak 2 egér maradt életben. Az A3-APO kezelés a 4. és 8. órában is csak 1-1 log₁₀ egységnyi csökkenést eredményezett a vér baktérium csíraszámokban, de ebben a csoportban a túlélő egerek száma még a nyolcadik órában is a kezdeti 7.

4.2.5. A. baumannii sebfertőzés kezelés eredménye

A kísérlet: Az alacsony fertőző csíraszámoknak megfelelően sem a kezelt sem a kezeletlen csoport egereinek véréből nem tenyésztett baktérium 3 órával majd 2 és 4 nappal a kísérlet kezdete után. Az 5. napon a seb baktérium csíraszám átlag az A3-APO kezelt egerekben $3,4 \times 10^1$ CFU/mg volt. A kezeletlen csoport sebéből átlag $1,5 \times 10^4$ baktérium tenyésztett vissza.

B kísérlet sorozat: A kezeletlen kontrol csoport egerei közül a 2. napon kettő sepsisben elpusztult, a magas fertőző inoculum következtében. A kezeletlen, az imipenem és a colistin kezelt állatok az első három órában rossz általános állapotban voltak, de tüneteik a negyedik órára megszűntek. Az A3-APO kezelt csoport egereinek általános állapota a kísérlet 5 napja alatt végig kifogástalan volt. A vér baktérium csíraszámok magyarázatot adtak az állatok fizikai állapotának alakulására. Egy órával az első antibakteriális kezelés után a kezeletlen, imipenem- és colistin kezelt állatokban lehetett 10^6 CFU/ml feletti vér baktérium csíraszámot is mérni, míg az A3-APO kezelt csoport esetén ez alig 10^3 CFU/ml volt. 5 nap kezelés után is látható volt a túlélő egerek hátán a seb, de a sebek mérete és minősége a kezelésekkkel változott. A legnagyobb sebek a kezeletlen állatokon jelentkeztek, az imipenem és colistin kezelt állatok sebei kisebbek voltak, de a seb környezete is gyulladtnak látszódott. Az A3-APO kezelt egerek sebei voltak a legkisebb átmérőjű, a sebkörnyék békésnek bizonyult. A kezeletlen egerek sebéből tenyésztett vissza a legtöbb baktérium 10^7 CFU/mg mennyiségben, ezt követte az imipenem kezelt csoport átlag 10^6 CFU/mg csíraszám, majd a colistin kezelt 10^5 CFU/mg baktérium mennyisége. Az A3-APO-kezelt egerek sebéből a kimutathatósági

küszöbhez közeli 1000 CFU/mg baktérium tenyésztett vissza. 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, $p=0,0020$.

C kísérlet sorozat: A kiemelkedően nagy mennyiségű sebfertőző baktérium az egerek általános állapotát erősebben rontotta. A kezeletlen csoportból (7 egér) 2 a 2. napon elpusztult. Az imipenem kezelt csoport tagjai is mind nagyon betegek voltak, a colistin kezelt állatok a kezeléseket után egy-egy órán keresztül szenvedtek, de állapotuk később rendeződött. Azok az egerek akik A3-APO kezelést kaptak az egész kísérlet sorozat alatt egészségesnek látszódtak. A B kísérletsorozatánál nagyobb kezdeti fertőző baktérium mennyiséget naponta adott antibiotikumokkal kezeltük. Az 5. napra az imipenem a seb baktérium csíraszámot a kontrollhoz képest 100-ad részére, 10^5 CFU/mg-ra csökkentette, a colistin még nagyobb csíraszám csökkenést eredményezett 10^3 CFU/mg tartományig. Az A3-APO kezelt csoportban a seb baktérium csíraszámok 1000 CFU/mg alatti értékűek voltak.

Az A3-APO hatása a nem fertőzött égett sebekben: 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 5 mg/ttkg A3-APO kezelésben részesült. 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 gyulladással infiltrációja is mérsékeltebb.

5. Következtetések

1. Az A3-APO, mint a természetből izolált prolin-gazdagantibakteriális peptidek mesterséges tervezett származéka, az alapvegyületekhez képest megőrizte in vitro antibakteriális spektrumát és hatékonyságát, ezt 57 különböző 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 *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 chaperone fehérjék működésének gátlása ehhez a membránhatáshoz hozzáadódik.
2. Farmakokinetikai méréseinkkel im adagolás után nem sikerült 0-90 perc intervallumban a beadás után a kísérleti állatok véréből A3-APO-t kimutatni, kicsapószerként TCA-t használva. Így nem tudtuk megmérni sem a kiürülés sebességét, sem a maximálisan elérhető szérumszintet. In vitro szérumban mérhető hosszú felezési idők, így feltételezhető, hogy a peptid im adagolás után egy hordozófehérjéhez kötődik. A kötődés után 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 sejtkultúrákban, de hatásos fertőzésekkel szemben. Módosított farmakokinetikai tesztek és különböző véresejtek sejt kultúráival végzett in vitro mérések ezekre a kérdésekre választ adhatnak.
3. Toxicitási vizsgálatainkkal meghatároztuk azt a maximálisan beadható A3-APO dózist, ahol toxikus hatás nem jelentkezik az állatokon, ez a NOAEL (no observed adverse effect limit) érték. Az egyszeri intraperitoneális adagolás során 10 mg /ttkg-nál nem jelentkezett még toxikus hatás, míg 25 mg/ttkg esetén már észleltünk illet. Ismételt ip. adagolásoknál a 20 mg/ttkg mennyiség bizonyult a NOAEL értéknek. Egyszeri intravénás adagolás NOAEL értéke 10 mg/ttkg, 25 mg/ttkg esetén már toxikus jelek mutatkoznak. Intramuszkuláris adagolás után 50 mg/ttkg-ot határoztuk meg 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 elérhetni. Sajnos 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 intramuszkuláris 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 mennyiségű multirezisztens *A. baumannii* inokulumot használva sebfertőzést alakítottunk ki. Megállapítottuk, hogy a kisebb inokulum hatására kialakuló átmeneti bakterémia is kisebb fokú, és gyorsabban javul 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*-vel 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 nosokomiális sebfertőzésekkel szemben.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. 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 D¹, **Ostorhazi E¹**, 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**

6.2. 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**

6.3. 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) Analysis of syphilis and gonorrhoea cases, based on data from the National STD Centre, Department of Dermatology and Venerology, Semmelweis University (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) Meningovascular neurosyphilis as the cause of ischemic cerebrovascular disease in a young man. *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.

7. 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.