

# Állatorvostudományi Egyetem

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék



## **Antibakteriális rezisztencia kialakulását gátló hatóanyagok vizsgálata**

Készítette: Antal Mónika

Témavezetők: Dr. Móritz Alma Virág, PhD-hallgató

Dr. Farkas Orsolya, tudományos főmunkatárs

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

# 1. Tartalom

1	Rövidítések jegyzéke.....	3
2	Bevezetés.....	5
3	Irodalmi áttekintés.....	6
3.1	Antibiotikumokkal szembeni rezisztencia.....	6
3.2	Antibiotikumok helyzete az állatgyógyászatban .....	7
3.3	Fluorokinolon antibiotikumok.....	8
3.3.1	Fluourokinolonok elleni rezisztencia mechanizmusok .....	9
3.3.2	Enrofloxacin .....	12
3.4	Az <i>Escherichia coli</i> rezisztencia helyzete .....	13
3.5	Oxidatív stressz szerepe a baktériumokban.....	14
3.6	Az antioxidánsok jelentősége .....	17
3.6.1	Kurkumin .....	18
3.6.2	Dimetil-fumarát.....	19
3.6.3	Kvercetin .....	19
3.6.4	Antipirin .....	21
3.6.5	Edaravon.....	22
4	Célkitűzések .....	24
5	Anyag és módszer .....	25
5.1	DPPH Antioxidáns Assay.....	25
5.2	Érzékenységi vizsgálatok .....	26
5.3	<i>E. coli</i> MG1655 törzsek passzálása .....	27
5.4	MEGA-plate .....	28
6	Eredmények.....	31
6.1	DPPH Antioxidáns Assay.....	31
6.2	Érzékenységi vizsgálatok .....	31
6.3	<i>E. coli</i> MG1655 törzsek passzálása .....	32
6.4	MEGA-plate .....	33
7	Megbeszélés, következtetések.....	35
8	Összefoglaló .....	37
9	Abstract .....	38
10	Irodalomjegyzék.....	39
11	Köszönetnyilvánítás .....	50

# 1 Rövidítések jegyzéke

ABR= antibiotikumrezisztens baktériumok

ABTS= 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfon sav

AMR= antimikrobiális rezisztencia

ANT= antipirin

ARG= antibiotikumrezisztencia gének

CFU= telepképző egységek

CPE= karbapenemázt termelő *Enterobacteriaceae*

DMF= dimetil-fumarát

DPPH=  $\alpha,\alpha$ -difenil- $\beta$ -pikrilhidrazil

DSB= DNS kettős száltörés

EDA= edaravon

ESBL= kiterjedt-spektrumú  $\beta$ -laktamázt termelő törzsek

ExPEC= extraintesztinális patogén *E. coli*

IC<sub>50</sub>= 50%-os gátló hatást okozó koncentráció (half maximal inhibitory concentration)

KUR= kurkumin

MBC= minimális baktériumölő koncentráció

MCR= *Enterobacteriaceae* plazmid mediált kolisztinrezisztens törzs

MDR= multidrog-rezisztens

MIC= minimális gátló koncentráció

MPC= mutáció prevenció koncentráció

MRSA= methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*

PBP= penicillin kötőfehérje

PDR= pánrezisztens baktériumtörzsek

PMQR= plazmid-mediált kinolonrezisztenciát

QRDR= kinolon-rezisztens meghatározó régió

QS= quorum sensing

RNS= reaktív nitrogén származékok

ROS= reaktív oxigén származékok

SOD= szuperoxid-dizmutáz

ssDNS= egyszálú DNS

TSA= tripton szója agar

TSB= tripton szója leves

WHO= Egészségügyi Világszervezet (World Health Organisation)

XDR= extenzív gyógyszerrezisztens

## 2 Bevezetés

Az antimikrobiális rezisztencia (AMR) sürgető globális probléma, amely veszélyezteti a létfontosságú orvosi kezelések és közegészségügyi beavatkozások hatékonyságát. Az antibiotikumoknak ellenálló baktériumtörzsek megjelenése és elszaporodása nemcsak a humán-, hanem az állatgyógyászatban is komoly kihívást jelent.

Ez a tanulmány az AMR kérdéskörének egy fontos szempontját vizsgálja, az antioxidánsok antibiotikumokkal való együttes alkalmazására összpontosítva. A közöttük lévő kölcsönhatás vizsgálatával célunk, hogy megvilágítsuk az antioxidánsoknak az AMR kialakulására és progressziójára gyakorolt lehetséges hatását.

Kutatási céljaink eléréséhez kiválasztottunk néhány antioxidánst. A vizsgálatunkba bevont szerek közé tartozik az edaravon, a dimetil-fumarát, az antipirin, a kvercetin és a kurkumin. A vegyületek kiválasztása ismert antioxidáns tulajdonságaik átfogó értékelésén alapult, különös tekintettel az antioxidánsok és az antibiotikumok közötti lehetséges szinergiára a rezisztencia mérséklésében. Érdeemes megjegyezni, hogy az antipirin, mely egy szintetikus vegyület, és az olyan flavonoidok, mint a kvercetin, melyek erős antioxidáns tulajdonságaikról ismertek, ígéretesnek bizonyultak a korábbi kutatások alapján. Továbbá az edaravont is több kutatás során tanulmányozták, kifejezetten az AMR elleni küzdelemben betöltött potenciális szerepével kapcsolatban.

Az Enterobacteriaceae családba tartozó *E. coli* kiemelt állat-egészségügyi jelentőségű baktérium. A gyakorlatban az *E. coli* fertőzések gyakoriak, és az állatok széles körét érinthetik, beleértve a haszonállatokat, a háziállatokat és a vadon élő állatokat. Sajnos az antibiotikumokkal szemben ellenálló törzsek terjedése jelentős kihívást jelent az állatorvosok és az egész mezőgazdasági ágazat számára. Ez a fokozódó probléma szükségessé teszi az AMR jelenlegi helyzetének mélyebb megértését az állatorvosi környezetben, és hangsúlyozza az *E. coli* és más patogén baktériumok AMR elleni küzdelemre irányuló kutatásának sürgősségét.

## 3 Irodalmi áttekintés

### 3.1 Antibiotikumokkal szembeni rezisztencia

Bármely terápiás szer sikeres alkalmazását idővel veszélyeztetheti az adott vegyülettel szembeni adaptáció vagy rezisztencia kialakulása, akár bakteriális, gombás, parazita vagy vírusfertőzések kezelésében. A rezisztencia különböző biokémiai és fiziológiai mechanizmusokon keresztül alakulhat ki, különösen az antimikrobiális szerek esetében, ahol a ehhez vezető folyamatok összetettsége jelentős aggodalomra ad okot [1].

A baktériumok az evolúció évmilliói során bonyolult mechanizmusokat fejlesztettek ki, amelyek lehetővé teszik számukra, hogy hatékonyan kerüljék ki az egyes vegyületeket, mint például az antimikrobiális hatóanyagokat. Ezek a rezisztencia mechanizmusok gyakran sokrétűek, sőt egyetlen baktériumsejt számos stratégiát alkalmaz az antibiotikum expozíció túlélésére [2, 3].

Beszélhetünk kromoszómális és plazmidon kódolt rezisztenciáról. A kromoszómális rezisztencia magában a bakteriális kromoszómában bekövetkező mutációkból ered, amelyek az antibiotikumok hatásának elkerülése érdekében az alapvető sejtkomponensek, például a célfehérjék vagy az egyes biokémiai folyamatok megváltoztatásához vezetnek. Ezzel szemben a plazmid-mediált rezisztencia a plazmidoknak nevezett, kromoszómán kívüli DNS-darabokon hordozott rezisztenciagének megszerzésével jár, amelyek átvihetők a baktériumok között, lehetővé téve a rezisztencia gyors terjedését a baktériumpopulációkon belül. A kromoszómális rezisztencia kevésbé tekinthető aggályosnak a széles körű elterjedés lehetősége szempontjából, mivel gyakran az egyes baktériumok spontán mutációinak eredményeként jön létre. A plazmidok által közvetített rezisztencia viszont jelentősebb veszélyt jelent, mivel képes a rezisztenciagének baktériumok közötti horizontális átvitelére, ami megkönnyíti az AMR gyors és terjedését a különböző baktériumfajok között [4, 5].

Az átfogó osztályozás érdekében ezeket biokémiai útvonalak alapján is kategorizálják. Vannak antibiotikumokat elbontó enzimek, azokat átalakító enzimek, valamint a baktériumok képesek a sejtfall permeabilitását megváltoztatni, efflux pumpákat expresszálni, illetve a hatóanyag kötőhelyének módosításával annak kapcsolódását megakadályozni [2].

Azt, hogy az egyes baktériumfajoknál, illetve, hogy melyik antibiotikum ellen milyen mechanizmus lehetséges számos faktor befolyásolja. Már a sejtfallszerkezetük következtében is eltérést mutathatnak. Egy rendkívül jó példa erre, ha a penicillineket vizsgáljuk. A Gram-negatív baktériumok  $\beta$ -laktamázokat termelnek, ezzel szemben a Gram-pozitív

mikroorganizmusok elsősorban a penicillinkötő fehérjék (PBP) néven ismert célpontjaikat módosítják, a rezisztencia kialakítása érdekében. Más mikroorganizmusok, például a *Mycoplasmák* pedig *ab ovo* rezisztensek ezekre a vegyületekre, mivel nem rendelkeznek sejtfallal [6, 7]. A fluorokinolonok a humángyógyászat szempontjából kritikusan fontos antibiotikumcsoport, rezisztencia ellenük három biokémiai úton alakulhat ki, amelyek mindegyike egy adott időpontban egyazon baktériumban is előfordulhat. Ezek a hatóanyagok célpontját kódoló gének mutációi, a sejtől kiürítő effluxpumpa expressziójának növekedése, és a fluorokinolon célpontjának védelme a qnr nevű fehérje által [8].

Az antibiotikumok túlzott használata, tehát jelentős szerepet játszik, ezen folyamatok összességében. Továbbá egyik fő tényezőként kell elismernünk a haszonállatgyógyászatban alkalmazott antibiotikum felhasználás és az emberi fertőzéseket okozó rezisztens organizmusok közötti kapcsolatot is [9].

### **3.2 Antibiotikumok helyzete az állatgyógyászatban**

Élelmiszertermelő állatok antibiotikum rezisztenciájával kapcsolatos esetet először 1951-ben jelentették pulykákban, melyeknek sztreptomicint adtak [10]. Később 2015-ben komoly fejleménnyé vált az Enterobacteriaceae család plazmid mediált kolisztinrezisztens (MCR) törzseinek felfedezése. Ezt a rezisztenciát az újonnan azonosított MCR-1 génnek tulajdonították, melyet eredetileg az élelmiszer termelő állatok vizsgálata során Kínában mutattak ki először [11]. A bejelentést követően minden kontinensről érkeztek jelentések MCR-1-pozitív törzsekről; emberekből, haszon- és vadon élő állatokból, élelmiszerekből, valamint környezeti mintákból és vízi környezetből is kimutatták [12]. A pozitív *E. coli* törzsek aránya jelentősen magasabb volt az állatállományban, mint az emberekből, ami azt jelzi, hogy az állatok lehetnek az elsődleges rezervoárjai, így terjed át humán vonalra [13].

Az antibiotikumok elterjedtsége a baromfiiparban jelentős aggodalomra ad okot. A hozamfokozásra vonatkozó korlátozások és tilalmak ellenére számos régióban a reziduumok továbbra is jelen vannak a baromfitermékekben és a trágyában, ami helyszíni szelekciós nyomást, antibiotikumrezisztens baktériumok (ARB) és antibiotikum rezisztenciagének (ARG) jelenlétét eredményezi. Ez a környezeti szennyeződés veszélyt jelent az emberi és állati egészségre, mivel hozzájárul a multidrog-rezisztens (MDR) baktériumok megjelenéséhez [14].

A baromfiágazat a globális hús- és tojástermelés jelentős piacát képviseli, így az élelmiszerlánc egyik legkritikusabb részét alkotja, a komoly termelési mennyiség és a nagy fogyasztás miatt. Az antibiotikumokat a baromfityénységben különböző célokra, például

betegségmegelőzésre és terápiás célokra alkalmazták. Sajnálatos módon egyes nemzetek rutinszerűen alkalmazzák a mai napig ezeket a gyógyszereket profilaxisra, sőt, a humángyógyászatban kritikusan fontosnak tartott antibiotikumokat is [15, 16].

Ezen túlmenően a baromfiipar az AMR rezervoárjaként szolgál, bizonyítja ezt, hogy a baromfi alomban gyakran jelen lévő ARG-k hosszabb ideig megmaradhatnak a környezetben. Ez a perzisztencia elősegítheti a rezisztenciagének baktériumok közötti horizontális génátvitelét, ami tovább súlyosbítja az AMR terjedését. Különös aggodalomra ad okot a plazmidok által közvetített rezisztencia jelenléte olyan kritikusan fontos antibiotikumokkal szemben, mint a kolisztin, amely létfontosságú a rezisztens Gram-negatív baktériumok által okozott súlyos fertőzések kezelésében [17].

Az AMR felfedezése óta biztonsági irányelveket és megelőzési technikákat alkalmaznak, hogy ne a termelés hatékonyságának növelésére használják és, hogy kiküszöböljék a zoonózisok kockázatát. E megállapítások fényében feltétlenül fel kell ismerni, hogy az ellenőrizetlen és túlzott antibiotikum használat a környezetszennyezés és a rezisztencia terjedésének komoly kockázatát jelenti. A fenntartható és felelős gyakorlatok döntő fontosságúak ezen aggályok enyhítésére, a közegészségügy védelmére és a gyógyszerek hatékonyságának fenntartása érdekében mind az állat-, mind a humángyógyászatban.

### **3.3 Fluorokinolon antibiotikumok**

A fluorokinolonok a széles spektrumú antibakteriális szerek fontos osztályát alkotják, amelyeket elsősorban antibakteriális spektrumuk alapján generációkba sorolnak [18].

Az első generáció képviselőjének a nalidixinsav tekinthető. A hatóanyagot kezdetben Gram-negatív húgyúti fertőzések kezelésére alkalmazták embereken és állatokon. Szűk spektruma és a rezisztencia nagymértékű kialakulása miatt az antimikrobiális szerek újabb, szélesebb spektrummal rendelkező generációi váltották fel [19].

A kinolonok második generációja a fluorokinolonokkal kezdődött, amelyeket a kinolon molekula C6-os pozíciójában történő fluoratom hozzáadásával nyertek. E generáció képviselői a norfloxacin és a flumekvin. Klinikai használatban azonban jobban elterjedtek az újabb hatóanyagok, mint a ciprofloxacin, enrofloxacin és marbofloxacin [20]. A gyógyszerek a Gram-negatív és Gram-pozitív kórokozók széles skálájával szemben aktívak, és jobb orális felszívódást és szisztémás eloszlást mutatnak. Így alkalmazásuk kiterjedtebb, beleértve az alsó légúti fertőzések, bőr- és lágyrészfertőzések, genitális betegségek és húgyúti fertőzések



kezelését [21]. A kinolonok ezen csoportja azonban korlátozott aktivitással rendelkezik számos klinikailag releváns Gram-pozitív baktériummal és anaerobokkal szemben [22].

A fluorokinolonok szerkezeti változtatásai számos új hatóanyagot biztosítottak, amelyek alkalmasak a különböző bakteriális fertőzések kezelésére. A harmadik generáció képviselői a levofloxacin [23], a gatifloxacin [24] és a moxifloxacin [25], amelyek jobb baktericid aktivitást mutatnak Gram-pozitív baktériumokkal szemben [18]. A pradofloxacin egy új, szintén harmadik generációs, szájon át alkalmazható fluorokinolon, amely egyaránt hat Gram-pozitív aerob baktériumok és anaerobok ellen is. Ezért jelentős szerepet kapott az állatgyógyászatban, a kritikusan fontos esetek kezelésében [26].

A negyedik generáció hatóanyagai, mint például a gemifloxacin [27], jó aktivitást mutatnak Gram-pozitív coccusok ellen [28] és jelentős aktivitást az anaerobok ellen [29].

Generációktól függetlenül hatásmódjuk alapján a fluorokinolonok rendkívül hatékony baktericid antibiotikumok, amelyek két rokon enzimet, a DNS-girázt (topoizomeráz II) és a topoizomeráz IV enzimet célozzák meg [30]. A topoizomeráz IV felelős a negatív szupertekercsek DNS-be történő bevezetéséért, és a transzkripciós és replikációs komplexek előtt felhalmozódó torziós feszültség enyhítéséért. Mind a DNS-giráz, mind a topoizomeráz IV esszenciális enzim, az előbbi főleg a Gram-negatív, az utóbbi pedig főleg a Gram-pozitív baktériumokban kerül blokkolásra. Blokkolják a DNS replikációját azáltal, hogy stabilizálják a DNS-enzim komplexeket, és kettős töréseket hoznak létre benne. Ez a baktericid aktivitásuk alapja [31, 32]. Ezen mechanizmusok összessége vezet ahhoz, hogy a fluorokinolonok ilyen széles spektrummal rendelkeznek.

A kinolonok használata elterjedt az 1990-es évek elejétől fogva az állatorvosi gyakorlatban [33]. Ez annak köszönhető, hogy számos bakteriális kórokozóval szemben hatékonyak, az orális alkalmazhatóságuk egyszerűbbé teszi a tömegkezelést és számos állatfajban viszonylag biztonságosak [34]. Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organisation, WHO) azonban jelenleg az ide sorolandó hatóanyagok nagyrészt kritikusan fontos antibiotikumoknak tekinti, ezért az állatgyógyászati gyakorlatban való felhasználásuk korlátozottá vált [35].

### **3.3.1 Fluorokinolonok elleni rezisztencia mechanizmusok**

A fluorokinolonokkal szembeni rezisztencia többféle mechanizmus révén alakulhat ki, a plazmidon elhelyezkedő, valamint a kromoszómákon kódolt gének fokozott expressziója következtében [17, 36].

A fluorokinolonok a DNS-replikációt azáltal akadályozzák, hogy az alapvető enzimeket, a DNS-giráz és a topoizomeráz IV-et veszik célba. A DNS-giráz két A és két B típusú alegységből áll, amelyeket a *gyrA* és *gyrB* gének kódolnak [32]. Az antibiotikumok komplexeket képeznek a DNS-sel és az enzimekkel, megzavarva a replikációs folyamatot. A rezisztencia pontmutációk révén alakul ki a kinolon-rezisztens meghatározó régiókban (QRDR), a *gyrA* és a *parC* génszakaszaiban. A mutációk a két enzim egyikében vagy mindkettőben létrejöhetnek [37]. Leggyakoribb lokalizációjuk *E. coli* GyrA esetében a Ser83, illetve az Asp87, amelyek kulcsfontosságúak a kinolonok GyrA-hoz vagy ParC-hez való kötődésében [38]. A GyrB és a ParE rezisztencia mutációi lényegesen ritkábbak [39, 40]. A genomban történő változások aminosavcserét eredményeznek, amelyek megváltoztatják a célfehérjék 3D szerkezetét, csökkentve a fluorokinolonok és az enzimek közötti affinitást, így csökkentve a gyógyszer kötődését az enzim-DNS komplexhez [41]. Ezenkívül a PorB fehérje mutációi csökkent gyógyszerfelhalmozódáshoz vezethetnek, hozzájárulva a fluorokinolon rezisztenciához [42].

A plazmid-mediált kinolonrezisztenciát (PMQR) először 1998-ban azonosították, jóval azután, hogy a nalidixinsav klinikai alkalmazásba került, illetve a modern fluorokinolonok engedélyezése után [43]. Kezdetben, az 1970-es években a kutatók nehezen találtak átvihető nalidixinsavval szembeni plazmid-mediált rezisztenciát, sőt valószínűtlennek tartották, mivel a kinolonok szintetikus gyógyszerek [44, 45]. A legtöbb vizsgálatban a PMQR-determinánsokat többszörösen rezisztens baktériumokban azonosították, különösen a kiterjedt spektrumú  $\beta$ -laktamáz termelőknél.

A *qnrA* gén volt az első azonosított PMQR gén, amely a pentapeptid fehérjecsaldához tartozik. Bizonyítottan különböző Gram-negatív baktériumokban a ciprofloxacinnal szembeni alacsony szintű rezisztencia átvitelét tette lehetővé. Kezdetben a *qnrB* volt az egyik legelterjedtebb PMQR-determináns, melyet elsősorban az Enterobacteriaceae családba tartozó baktériumok izolátumai között azonosítottak [46, 47]. Az ezt követő kutatások a *qnr* gének részletesebb vizsgálatát, azoknak PCR segítségével történő azonosítását tették szükségessé [48]. Hamarosan a *qnr*-géneket világszerte alacsony gyakorisággal találták meg plazmidokon a Gram-negatív baktériumokban [31]. A későbbi tanulmányok a *qnr* család rokon génjeinek felfedezését bizonyították, beleértve a *qnrS*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* és *qnrVC* géneket [28, 49–52]. Kromoszómáisan lokalizált *qnr*-géneket is azonosítottak, eltérő klinikai és környezeti forrásokból származó baktériumokban [53, 54]. Tudományos kutatásokkal alátámasztásra került, hogy a *qnr* fehérjék nem feltétlenül blokkolják azonban a DNS-giráz GyrB alegységére ható szereket [31].

A qnr homológok számos Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium kromoszómáján kódolva megtalálhatóak, köztük a *Bacillus*, *Enterococcus*, *Listeria* és *Mycobacterium* fajok, valamint egyes anaerobok, például a *Clostridium difficile* és a *Clostridium perfringens* esetében [54–56]. Egyes vízi baktériumokból is izolálásra kerültek, beleértve az *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Shewanella* és *Vibrio* fajokat [57, 58]. A qnr-gének világméretű elterjedése arra utal, hogy jóval a kinolonok felfedezése előtt jelen lehettek. Ezt bizonyítja, hogy qnrB géneket és pszeudogéneket fedeztek fel az 1930-as években gyűjtött *Clostridium freundii* törzsek kromoszómáján [59].

Az első pentapeptid-repeat fehérje, az MfpA volt, amelyet mikobaktériumok kromoszómája kódol, és amely szerepet játszik a kinolonrezisztenciában [60, 61]. Az MfpA egy dimer, amelynek mérete, alakja és töltése a DNS B-formáját utánozza, és éppen olyan méretű, hogy a DNS-giráz és a topoizomeráz IV kationos DNS-kötő apparátusához illeszkedik. *In vitro* az MfpA ugyan nem blokkolja a kinolon által okozott giráz gátlást, mégis képes egész sejtek kinolonrezisztenciáját biztosítani azáltal, hogy a DNS-sel versengve csökkenti a kinolon által létrehozott letális DNS kettős száltörés (DSB) számát [60].

Az *E. coli* kinolonrezisztenciájának vizsgálata során, a kutatók 2006-ban erősítették meg véglegesen az aminoglikozid-modifikáló enzim, az AAC(6)-Ib-cr-nek a létezését [62, 63]. Úgy találták, hogy ez a változat alacsony szintű rezisztenciát biztosít bizonyos kinolonokkal, például a ciprofloxacinnal és a norfloxacinnal szemben, miközben megtartja az aminoglikozid antibiotikumok inaktiválására való képességét [63]. Az AAC(6)-Ib-cr-t világszerte azonosították, plazmidokon vagy kromoszómális DNS-en kódolva, beleértve a környezeti mikroorganizmusokból vett mintákat is [11, 64–67]. Ez arra utal, hogy széles körben elterjedt. A fentiek ismeretében felvetődik a kérdés, hogy az antibakteriális szerek módosítására képes enzimek későbbi adaptációi képesek-e további keresztrezisztencia lehetőséget létrehozni [68].

Plazmidon kódolt efflux pumpákkal kapcsolatos PMQR mechanizmust is jegyeztek már le [69, 70]. Az egyik az OqxAB, amely a sertések növekedését fokozó élelmiszer-adalékanyaggal, az olaquinox-szal szembeni rezisztenciát biztosított. Később kimutatták, hogy a ciprofloxacinnal és a norfloxacinnal, valamint más antimikrobiális szerekkel, köztük a klóramfenikollal, a nitrofurantoinnal és a trimetoprimmel szemben is rezisztenciát biztosít [70, 71]. Egy Kínában végzett kutatás során az állatok és mezőgazdasági dolgozók székletmintáit vizsgálták azokon a területeken, ahol az olaquinoxot használták. A vizsgálatok kimutatták, hogy az állatokból izolált *E. coli* baktériumok 40%-a és az emberekből izolált baktériumok 30%-a ezekben a régiókban egy bizonyos típusú, oqxAB nevű PMQR gént hordozott [72]. A

QepA efflux pumpát *E. coli*-ban plazmidokon találták, az izolátumok az *rmtB* riboszómális metiláz jelenléte miatt gyakran aminoglikozid-rezisztenciával voltak kapcsolatban [73–75].

A kinolon antibiotikumokkal szembeni rezisztencia jelentős problémává vált, annak ellenére, hogy szintetikus vegyületek és ezeknek a gyógyszereknek két létfontosságú bakteriális célpontjuk van.

### 3.3.2 Enrofloxacin

Az enrofloxacin a fluorokinolon családba tartozik, azon belül a második generáció tagjai közé sorolandó. Hatékony a legtöbb Gram-negatív és Gram-pozitív baktériummal szemben, de spektruma nem foglalja magába az anaerob mikroorganizmusokat. Aktív metabolitja, a ciprofloxacin, amely elsősorban humán gyógyszerként kapható.

A hatóanyagot először a farmakokinetikai és farmakodinámiai aspektusából érdemes jellemezni. Az enrofloxacin biológiai hasznosulása szájon át történő beadást követően jelentősen változik, 10% és 80% között mozog, valamint különbségek figyelhetők meg a összetett gyomrú és monogasztrikus állatok között [76, 77]. Ennek következtében sertés, baromfi, borjú és húsevő esetében elsősorban az orális készítményeket alkalmazzák, míg szarvasmarhánál a parenterálisan alkalmazható oldatokat részesítik előnyben. Felszívódását befolyásolja, hogy az állatokat etetik-e vagy koplaltatják a beadás előtt, valamint egyes ionok jelenléte az emésztőrendszerükben [76, 78]. Ezek az eltérések a kationok és a fluorokinolonok közötti komplexek képződésével magyarázhatók, amelyek akadályozhatják a bélből történő hasznosulásukat. A víz keménysége szintén változtathatja a biológiai hasznosulás mértékét. Ennek jelentősége a nagyüzemi állattartásban van, mikor a vízzel hígítják a hatóanyagot [79]. További tényező, hogy nem csak a passzív diffúzió révén, hanem a lipofilitása következtében az aktív transzporterek is szerepet játszanak a felszívódásában és eliminációjában [80, 81]. Intramuszkulárisan beadva az enrofloxacin körülbelül 3 órán belül eléri a maximális plazmakoncentrációt. A szilárd lipofil nanorészecskék fokozhatják az intramuszkuláris hasznosulást, illetve meghosszabbíthatják az enrofloxacin véráramban töltött idejét [82].

A legtöbb fajban az enrofloxacin jelentős része ciprofloxacinná alakul át. Átalakulása során más metabolitok is keletkeznek, ezek azonban nem rendelkeznek antimikrobiális tulajdonságokkal [82]. A baromfi abban különbözik más fajoktól, hogy az enrofloxacin viszonylag kis százalékban, mindössze 7%-ban metabolizálódik ciprofloxacinná a kezdeti hepatikus átalakulás során [83].

Megoszlását a fehérjékhez való kötődés befolyásolja. Megemlítendő, hogy az enrofloxacin kölcsönhatásba léphet más fehérjékhez kötődő gyógyszerekkel, befolyásolva azok kiürülését [84]. Elmondható, hogy nagy megoszlási térfogattal rendelkezik a különböző fajokban, ami erős szöveti penetrációra utal.

Az exkréció elsősorban a vesén keresztül történik [85, 86], azonban bélrendszeri recirkulációt is mutat [85]. A laktáció folyamata jelentősen befolyásolhatja az eliminációját [87].

Az első enrofloxacin alapú állatgyógyászati készítményt a Bayer laboratórium hozta forgalomba 1991-ben. Ma már több enrofloxacin alapú állatgyógyászati készítmény van forgalomban különböző formákban, beleértve az orális (tabletta, bolus) és injekciós formákat. Számos célállatfajra elérhető törzskönyvezett formája, többek között a házi húsevő állatokra, a haszonállatokra és az egzotikus háziállatokra is [82]. Sokoldalú antibiotikum, amelyet a Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok által okozott fertőzések széles körének kezelésére használnak. A különböző állatfajok esetében elsődlegesen a légúti fertőzések kezelésére szolgál, de emésztőrendszeri, húgyúti, izületi, nemi szervi, emlő- és bőrfertőzések kezelésére is hatásos lehet [88].

### **3.4 Az *Escherichia coli* rezisztencia helyzete**

Az *E. coli* az Enterobacteriaceae családba tartozó laktóz pozitív, Gram-negatív baktérium, a bélmikrobióta tagja. Míg sok *E. coli* törzs ártalmatlan, kommenzalista mikrobaként van jelen, egyesek patogének lehetnek. Ezeket két csoportba soroljuk, vannak az intesztinális és extraintesztinális törzsek. Az elmúlt években a multidrog-rezisztens *E. coli* törzsek megjelenése jelentős globális egészségügyi kihívást jelentett, különösen az antibiotikum-rezisztencia tekintetében. A közelmúltban végzett tanulmányok összefüggést találtak a háziállatok és állati termékek antimikrobiális rezisztenciája és a humán klinikai környezetben előforduló AMR között [89].

Az MDR, az extenzív gyógyszerrezisztens (XDR) és a pánrezisztens (PDR) baktériumtörzsek, mint például az *E. coli*, a *Klebsiella pneumoniae*, az *Acinetobacter baumannii* és a *Pseudomonas aeruginosa* terjedése globális aggodalomra ad okot. A fajok közötti és fajon belüli horizontális génátvitel az AMR terjedésének egyik fő tényezője, legfőképpen kórházi környezetben [90, 91].

Az elmúlt években az *E. coli* törzsek rezisztenciát mutattak a főbb antibiotikum-osztályokkal szemben, beleértve a kiterjedt spektrumú  $\beta$ -laktamázokat (ESBL), karbapenemeket, fluorokinolonokat, aminoglikozidokat és trimetoprim-szulfametoxazolt.

A fertőzések karbapenem rezisztenciája különösen aggasztó, mivel a karbapenemek gyakran a súlyos fertőzések kezelésére utolsó választásként használt antibiotikumok a humán gyógyászatban. Az baktériumokban világszerte a legelterjedtebb, leggyakoribb változatai a karbapenemázt termelő Enterobacteriaceae (CPE) esetében a KPC, NDM, OXA-48, VIM és IMP, de számos más enzim is jelen van [13]. Továbbá felfedezték az Enterobacteriaceae plazmid mediált kolisztinrezisztens (MCR) törzseket. Ezt az MCR-1 génnek tulajdonították [11].

Az extraintesztinális patogén *E. coli* (ExPEC) globális emberi kórokozó, amely a szisztémás fertőzések széles skálájáért felelős, beleértve a húgyúti fertőzéseket és egyéb nozokomiális fertőzéseket. Rendkívül komoly problémákat okoz az ESBL *E. coli* fertőzések számának növekedése, amely nagyrészt a világszerte elterjedt ST131-es ExPEC-klónnak tulajdonítható. Az *E. coli* ST131 az ESBL-termeléssel és fluorokinolon-rezisztenciával való társulása miatt vált ismertté, ami gyakori kezelési kudarckokat eredményez [92, 93].

Egy tanulmány az *E. coli* izolátumok kinolon antibiotikumokkal szembeni rezisztencia-mintázatát és a qnr-génekkal való kapcsolatát vizsgálta [94]. Az eredmények azt mutatták, hogy a qnr-génnel rendelkező izolátumok többsége magas rezisztenciát mutatott a ciprofloxacinnal, a levofloxacinnal, a norfloxacinnal és a nalidixinsavval szemben, az egyes antibiotikumok esetében változó százalékos arányban [95]. A tanulmány a qnr-gének gyakoriságát is feltárta az *E. coli* izolátumokban, az izolátumok 70%-a hordozta ezeket a géneket. A qnrS volt a legelterjedtebb, ezt követte a qnrB és a qnrA. A különböző földrajzi régiókban és populációkban eltérések mutatkoznak [96].

### **3.5 Oxidatív stressz szerepe a baktériumokban**

A szervezetben anyagcsere folyamatai során, fiziológias metabolikus folyamatok közben reaktív oxigén származékok (ROS) és reaktív nitrogén származékok (RNS) keletkezhetnek. Ezek közé olyan molekulák tartoznak, mint a szuperoxid gyökök, a hidrogén-peroxid és a nitrogén-oxid. Egyes enzimek, mint a NADPH-oxidázok, a xantin-oxidáz és a citokróm P450 enzimek szintén termelhetnek ROS-t fiziológias tevékenységük részeként [97].

Amikor a sejtekben túlzott mennyiségű ROS és RNS képződik, akkor oxidatív stressz alakul ki. Ezek a vegyületek instabilak, párosítatlan elektronokkal rendelkeznek, így rendkívül

reaktívak és hajlamosak más vegyületekkel való reakcióra. Ennek a rendkívül összetett biokémiai folyamatnak a révén számos káros hatás jöhet létre, mint a lipidperoxidáció, fehérje- és DNS-károsodás vagy a sejt apoptózisa. Míg ezek a molekulák alapvető szerepet játszanak a különböző sejt folyamatokban, a termelésük és eliminációjuk egyensúlyának felborulása oxidatív stresszhez vezethet. Az antioxidánsok döntő szerepet játszanak ennek mérséklésében azáltal, hogy semlegesítik ezeket a reaktív származékokat, így védik a sejteket a károsodástól [98].

A sejtek bonyolult antioxidáns védelmi rendszerrel rendelkeznek, a felesleges ROS és RNS semlegesítésére. Fontos enzimek közé tartozik a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a kataláz és a glutation-peroxidáz, valamint olyan nem enzimikus antioxidánsokat is meg kell említeni, mint a glutation, a C- és E-vitamin [99].

Az oxidatív stressz olyan intracelluláris jelátviteli útvonalakat indít el, mint az NF- $\kappa$ B és a MAPK, ami gyulladásos válaszok aktiválásához vezet. Az Nrf2 útvonal egy fontos sejtes jelátviteli rendszer, amely részt vesz a szervezet oxidatív egyensúlyának fenntartásában és az oxidatív stressz elleni védekezésben. Fiziológiás esetben az Nrf2 transzkripciós faktor a citoplazmában tartózkodik, a Keap1-hez kötődve, de oxidatív stressz vagy xenobiotikumok hatására a nukleáris transzlokációja megindul. Egyes gének olyan enzimeket és fehérjéket kódolnak, amelyek segítenek a sejteknek a ROS semlegesítésben és a káros anyagok méregtelenítésében. Aktiválásakor az Nrf2 a sejtmagba kerül, ahol a DNS-ben lévő antioxidáns válasz elemekhez kötődik. Ez különböző antioxidánsok és egyéb gének átíródásához vezet [100, 101].

Egy másik kaszkád az ún. SOS-válasz, amelyet eredetileg akkor figyeltek meg, amikor a DNS-replikációban hibák keletkeztek. Ma már egyértelmű, hogy az egyszálú DNS (ssDNS) kialakulása a SOS indukció végső kiváltó oka. A SOS-válasz három fő útvonalon keresztül segíti elő a DNS-léziók javítását; homológ rekombináció, nukleotid-kivágás javítása és transzléziós szintézise révén [102].

Tanulmányok kimutatták, hogy a SOS-válasz döntő szerepet játszhat a bakteriális mutációk kialakulásának elősegítésében, amelyek viszont bizonyos antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát eredményeznek. Eredetileg az AMR-t a DNS-replikációs hibák miatt a baktériumgenomokban bekövetkező elkerülhetetlen mutációknak tulajdonították. Az újabb eredmények azonban arra utalnak, hogy a baktériumok a DNS-t károsító szerekre válaszul aktívan is előidézhetnek mutációkat, a mutációt kiváltó fehérjék expressziójának elősegítésével. Azonban ha az antibiotikum-rezisztencia mutációi is az ilyen fehérjék indukcióján alapulnak,

akkor hatásuk gátlása új megközelítést kínálhat a gyógyszerrezisztencia elleni küzdelemben [103].

Egy kutatás az indukált mutáció szerepének megértésére összpontosít, ennek során az AMR kialakulását ciprofloxacint vizsgálva értékelték [104]. Az alapvető bakteriális DNS-topizomerázokat veszik célba a fluorokinolonok, ami végső soron a DSB-k kialakulásához vezet. A gyógyszer gátolja ezeknek a DSB-knek a javítását, ami a DNS fehérje kötések hidrolízisével szabad kettős szálvégeket eredményezhet. Mivel a hatóanyag javítási útvonalakat indukál, amelyek a RecA-ssDNS-szálak képződését is magukba foglalják, a gyógyszer maga is előidézheti a rezisztenciát biztosító mutációkat. Ez a hipotézis összhangban van azokkal a megfigyelésekkel, amelyek szerint a kinolonok mutagén hatásúak lehetnek és indukálhatják a SOS-választ [105]. A LexA szintjének csökkenése a Pol II, Pol IV és Pol V kódoló gének átíródásához vezet. Ezek a gének a DNS-károsodás mutációjához szükséges, nem esszenciális DNS-polimerázokat kódolnak. A tanulmány feltárja, hogy a LexA autoproteolízisének megzavarása patogén *E. coli*-ban megakadályozza a mutációt és a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulását. Hangsúlyozza továbbá a Pol II, Pol IV és Pol V DNS-polimerázok szerepét az AMR kialakulásában [106, 107].

Egy másik tanulmány a ROS termelődése, a SOS-válasz és az ubikinon baktériumsejtekben betöltött szerepe közötti kapcsolatot tárgyalja. Megállapították, hogy a genetikai mutációkhoz vezető folyamatok, csökkentik az UbiD-t egyes sejtekben. Úgy tűnik, hogy az UbiD és az ubikinon a sejtek stresszre adott válaszrendszerének, a SOS-nak a prekursora. Továbbá a vizsgálatban megfigyelték az ubikinonhiányos sejtekben a  $\sigma^S$  felhalmozódását és a ROS csökkenését. Ez arra utal, hogy az ubikinon, az elektrontranszferlánc egyik alapvető összetevője, szükséges az  $\sigma^S$ -válasz indukciójához, és szerepet játszik a ROS-termelés elősegítésében. Tehát a SOS ugyan szükséges az  $\sigma^S$  indukcióhoz vezető kaszkádhoz, de nem elegendő, mivel a legtöbb SOS-indukált sejtben nem mutatkozik magas ROS vagy  $\sigma^S$  szint [108].

Az oxidatív stressz útvonalainak megértése, az oxidatív károsodás mérséklését célzó terápiás beavatkozások kifejlesztéséhez vezethet. A folyamatra és a vele járó egészségügyi kockázatok csökkentésére általában antioxidáns-kiegészítőket és életmódbeli módosításokat javasolnak. Egyes vegyületek különböző mikroorganizmusokban befolyásolni tudják az antioxidáns kaszkádot, aminek a rezisztencia kialakulásában van jelentősége [108].



### 3.6 Az antioxidánsok jelentősége

Az antioxidánsok döntő szerepet játszanak az oxidatív stresszel kapcsolatos betegségek megelőzésében vagy enyhítésében azáltal, hogy ellensúlyozzák a ROS káros hatásait. Segítenek semlegesíteni a szabadgyököket és támogatják az optimális sejtfunkciókat. Az antioxidánsoknak széles skálája létezik, ezeket különböző aspektusokból csoportosíthatjuk.

A természetes antioxidánsokon belül az endogén antioxidánsok lehetnek enzimátikusak vagy nem enzimátikusak [109]. Az enzimátikus antioxidánsok közé tartozik a glutation-peroxidáz, a SOD és a kataláz, míg a nem enzimátikus antioxidánsok közé olyan anyagok tartoznak, mint a húgysav, a liponsav, a bilirubin, a glutation és a melatonin [110, 111]. Az exogén antioxidánsok közé tartoznak a karotinoidok, az E-, A- és C-vitaminok, a természetes flavonoidok és számos más vegyület. A C-vitamin például egy vízben oldódó antioxidáns, amely az E-vitaminnal együtt védi a lipideket a peroxidációtól.

Léteznek szintetikus antioxidánsok, például a butilált hidroxitoluol, az oktil-gallát, a butilált hidroxianizol, a propil-gallát és a tert-butil-hidrokinon. Ezeket gyakran használják az élelmiszerek frissességének, tápértékének, ízének és színének megőrzésére [112].

Egy másik csoportosítási mód alapján beszélhetünk direkt és indirekt antioxidánsokról. A direkt antioxidánsok olyan kémiai vegyületek vagy molekulák, amelyek aktívan és közvetlenül kapcsolódnak a ROS-okhoz és semlegesítik azokat, leadva egy elektront. Az indirekt csoportba tartozók támogatják és fokozzák a szervezetben termelődő endogén antioxidáns enzimek működését. Ezek az enzimek, beleértve a SOD-ot, a katalázt és a glutation-peroxidázt, kulcsszerepet játszanak a ROS eliminációban és a szervezet általános antioxidáns védelmi rendszerének fenntartásában [113].

Az antioxidánsok klinikai alkalmazásai széles spektrumot ölelnek fel. Alkalmazzák rákos betegek terápiája során, a szürkehályog elleni kezeléseknél, valamint cukorbetegeknek is javasolják. Használják még gyulladáscsökkentő stratégiákban kiegészítésként, az antimikrobiális alkalmazások, szív- és érrendszeri betegségek megelőzésére, illetve hepatoprotektív, nefro- és neuroprotektív hatásaik miatt is [114].

Tanulmányok összesített eredményei rávilágítanak az antioxidánsok baktériumokra gyakorolt hatására is. A különböző vegyületek értékelésén keresztül nyilvánvalóvá vált, hogy bizonyos molekulák nemcsak az oxidatív stressz leküzdésére képesek, hanem figyelemre méltó antimikrobiális potenciállal is rendelkeznek, mind a Gram-negatív, mind a Gram-pozitív baktériumokkal szemben. Ezek az eredmények együttesen alátámasztják az antioxidánsok kulcsfontosságú szerepét az oxidatív stressz mérséklésében. A megfigyelt hatások kiemelik a

vegyületek potenciális hasznosságát a terápiás stratégiák fejlesztésében, különösen az antimikrobiális és antioxidáns alkalmazások összefüggésében [115, 116].

### 3.6.1 Kurkumin

A kurkumin egy természetes polifenolos vegyület, amelyet a *Curcuma longa*-ból vonnak ki [117]. Számos antimikrobiális vizsgálat tárgyát képezte a kiterjedt hagyományos felhasználása miatt [118].

Egy tanulmány a kurkumin bakteriosztatikus mechanizmusait vizsgálta, feltárva a baktériumok növekedésének gátlásában való különböző alkalmazásait. A mechanizmusokat a kurkumin quorum sensing (QS) rendszerre, DNS-re, fehérjékre, sejtfalra és sejtmembránokra gyakorolt hatása alapján kategorizálták [119]. A kurkumin megzavarja a QS-rendszert, különösen hatékony a biofilmképződés megakadályozásában. Gátolja a baktériumok tapadását, ezáltal csökkenti a biofilm vastagságát és a baktériumok ellenálló képességét. Továbbá a kurkumin a QS-rendszer révén szabályozott virulencia-géneket is gátolja [120, 121].

A baktériumok maguk is rendelkeznek egy SOS-válaszrendszerrel, amellyel a sérült DNS-t gyorsan azonosítják és aktiválják a DNS-károsodás kijavítását, a gyógyszerek által okozott károsodás reparációját [122]. A kurkumin beleavatkozik a bakteriális génexpresszióba, akadályozza a bakteriális SOS-indukált válaszokat, és kölcsönhatásba lép a DNS-molekulákkal, ami bakteriosztatikus hatásokat eredményez [119].

A fehérjeszintézis kaszkádba és a sejtosztódásba is be tud avatkozni. A kurkumin kötődik a tubulinhoz, és kölcsönhatásba lép egyes fehérjékkel és enzimekkel [123]. A kurkumin növeli a sejtmembrán polaritását, kötődik a peptidoglikánhoz, és tönkreteszi a sejtmembránokat, ami sejtlízishez vezet. A sejtfalhoz is kapcsolódhat, annak integritását befolyásolhatja [124].

Továbbá a kurkumin autooxidációja során különböző közti- és melléktermékek keletkeznek, amelyek jelentős biológiai aktivitással rendelkeznek, fokozva az antibiofilm és baktériumölő tulajdonságait [119].

Több kutatásban a kurkuminról megállapították, hogy különböző antibiotikumokkal vagy bakteriosztatikus szerekkel együttesen alkalmazva, például a cefalosporinoximmal, cefotaximmal, vankomicinnel, tetraciklinekkel, ampicillinnel, norfloxacinnal és ciprofloxacinnal is szinergista hatást mutat [125, 126].

### 3.6.2 Dimetil-fumarát

A fumarátok a fumársav származékai, amelyek természetes módon számos gyümölcsben és zöldségben előfordulnak. Először a *Fumaria officinalis* (*Fumariaceae*) vadon élő lágyszárú növény gyökeréből izolálták. A dimetilfumarát (DMF) egy fumársavészter, amelyet elsősorban a relapszáló remittáló szklerózis multiplex kezelésére használnak.

Az Nrf2 útvonal aktiválásával citoprotektív és antioxidáns hatást fejt ki, illetve rákellenes tulajdonságokat mutat az Nrf2 dóziszfüggő gátlásával [127]. A kaszkád alapvető fontosságú a sejtek oxidatív károsodástól való védelme és az általános sejtegészség fenntartása szempontjából. Az Nrf2 aktivitása összefüggésben áll az NF $\kappa$ B útvonallal. Vizsgálatok során a kölcsönhatás arra utal, hogy a DMF mindkét útvonal befolyásolásával képes ellensúlyozni a gyulladást. Alkalmazása javíthatja a különböző állapotok kezelését, beleértve a neurodegeneratív betegségeket is, amint az *in vitro* és *in vivo* kutatások is alátámasztanak [101, 127].

Bár a DMF nem egy széles körben elismert antibakteriális szer, egyes kutatások szerint, mégis rendelkezik ezzel a tulajdonságokkal. Egy tanulmány szerint antimikrobiális aktivitását befolyásoló tényezők három szempontból foglalhatók össze. A DMF koncentrációja az, ami jelentős mértékben meghatározza az antimikrobiális aktivitást. Még kis koncentrációban is gátló hatást mutatott az *E. coli* ellen, teljes növekedési gátlás azonban 300 ppm körül következett be. Megállapításra került továbbá, hogy létezik a DMF-nek egy optimális koncentrációja, amely felett a további növelés már nem nyújt gyakorlati hasznot. Második szempont a hőkezelés hatása. Fontos aspektussá válik, amikor a DMF-et közvetlenül élelmiszerrendszerekhez adják. Hőkezelés hatására a hatékonysága csökkent, valószínűleg a hidrolízis miatt. A harmadik szempont a pH értéke. Általában a DMF *E. coli* elleni gátló hatása pH-független volt, hasonlóan a gombaölő hatásához. Ez a pH-függetlenség figyelemre méltó, mivel néhány más gyakori élelmiszer tartósítószer csak savas körülmények között hatékony [128].

### 3.6.3 Kvercetin

A kvercetin egy flavonoid, amely számos zöldségben és gyümölcsben megtalálható [129]. Antioxidáns és gyulladáscsökkentő tulajdonságait gyakran használják ki növényvédőszerként és a nehézfémek okozta mérgezések megelőzésében és kezelésében.

Ezenkívül a kvercetin alapvető szerepet játszik a mikotoxinok és egyéb, a sejtek károsodását okozó ágensek elleni védelemben [130].

A szervezetben zajló anyagcserefolyamatok ROS-okat termelnek, amelyek genetikai mutációkhoz, sejtmembrán-károsodáshoz, különböző betegségekhez, például szívbetegségekhez, májbetegségekhez és cukorbetegséghez, valamint gyorsabb öregedéshez vezethetnek. Ezeket a hatásokat a kvercetin a glutation szintjének befolyásolásával segít ellensúlyozni [131, 132].

A kvercetin egy olyan természetes vegyület, amely antibakteriális tulajdonságairól is ismert a baktériumtörzsek széles skálájával szemben [133, 134]. Ezt az oldhatóságának és a bakteriális sejtmembránokkal való kölcsönhatásának tulajdonítják, amelyet elsősorban a hidroxilcsoportjainak köszönhet [135]. A Gram-negatív baktériumok általában ellenállóbbak, valószínűleg a sejtmembrán összetételében mutatkozó különbségek miatt. Egyes származékai azonban erősebb antibakteriális aktivitást mutattak a Gram-negatív baktériumokkal szemben. Leírásra került, hogy különböző gyógyszerrezisztens baktériumokban, köztük a karbapenem-rezisztens *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* és *Klebsiella pneumoniae* baktériumokban megbontja a sejtmembrán szerkezetét és integritását [136, 137]. Ezek az eredmények rávilágítanak arra, hogy ígéretes lehet az AMR elleni küzdelemben azáltal, hogy az említett baktériumok sejtstruktúrájának kulcsfontosságú összetevőit célozza meg [138–140]. Elemezték a flavonoidok szerkezete és antibakteriális aktivitása közötti kapcsolatot, és ezek szoros összhangban vannak [141].

A kvercetin jelentős gátló hatást fejt ki a patogén baktériumokra, valamint az *Aspergillus* gombára. Gátolja továbbá a biofilmképződést, a baktériumok adhézióját, a plazmamembránokat és gátolja az efflux pumpákat [131]. Ezenkívül a kvercetin potenciózza más antibiotikumok hatását a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* elleni küzdelemben.

Az olyan módosítások, mint a foszforilálás és szulfatálás a különböző hidroxilcsoportokon, fokozhatják vagy csökkenthetik a kvercetin oldhatóságát, ezáltal megváltoztathatják antibakteriális potenciálját [135, 142]. A kvercetin és származékainak antibakteriális aktivitása a különböző baktériumfajok esetében eltérő, a minimális gátló koncentrációk (MIC) széles skálán mozognak [133].

Ezen túlmenően kulcsfontosságú szerepet játszik az oxidatív stressz megelőzésében azáltal, hogy szabályozza az antioxidánsok és oxidánsok közötti egyensúlyt a szervezetben. Figyelemre méltó képességeket mutat a ROS által kiváltott oxidatív károsodás elleni küzdelemben. Hatása kiterjed az antioxidáns hatással kapcsolatos gének expressziójára és növeli a glutationszintet, miközben csökkenti a ROS-termelést [143].

Képes aktiválni a sejtek egyes jelátviteli útvonalait. Gátolja az oxidatív folyamatokban részt vevő enzimek, például az acetilkolinészteráz és a butil-kolinészteráz aktivitását. Emellett növeli az olyan antioxidáns enzimek kifejeződését, mint a SOD, a kataláz és a glutation. Fokozva ezzel a szervezet oxidatív stressz elleni védekező képességét [144]. Megállapították, hogy a hatékonyan gátolja a ROS-termelést emberi mononukleáris sejtekben és polimorf leukocitákban, felülmúlva a C-vitamin hatékonyságát. A szarvasmarha spermasejtekben a vasionok által okozott oxidatív károsodást is képes visszafordítani [145, 146].

Megerősítették, hogy a kvercetin *E. coli* elleni antibakteriális hatása legalább részben a DNS-giráz gátlásának tulajdonítható [147, 148]. Egyes kutatások a fluorokinolon-flavonoid hibrid vegyületek szintézisét és értékelését írják le [149]. Ezeket a vegyületeket úgy tervezték, hogy gátolják a bakteriális topoizomerázt, és jelentős antibakteriális hatást mutattak ki, különösen a rezisztens törzsek ellen. A szintetizált hibridek közül egyesek erős gátló hatást mutattak az efflux pumpákra és a DNS-girázra. Ezek a vegyületek hatékonyak voltak olyan baktériumtörzsek ellen, amelyek más antibiotikumokkal szemben rezisztenciát fejlesztettek ki. Ez esetben a iprofloxacin-naringenin hibridek mutatták a legnagyobb aktivitást [150].

### **3.6.4 Antipirin**

Az antipirin egy olyan gyógyszer, amely elsősorban fájdalom- és lázcsillapítóként lehet alkalmazni. Bár az antipirin még mindig kapható néhány országban, felváltották a korszerűbb és hatékonyabb gyógyszerek.

A gyógyszert Ludwig Knorr szintetizálta Németországban, nem sokkal később klinikai alkalmazásra került a humángyógyászatban. Az 1930-as években azonban a toxicitással kapcsolatos aggodalmak miatt az újabb, mára modernebb fájdalomcsillapítókat javasoltak [151]. Elsősorban a májban metabolizálódik, a vizelettel választódik ki [152].

Az antipirin antibiotikumokkal való együttes adagolását egyes tanulmányok vizsgálták. Az eredmények azt mutatták, hogy a tiamulin kezelés jelentősen befolyásolta az antipirin farmakokinetikáját. A tiamulinnal kezelt csirkékben csökkent az antipirin kiürülése a szervezetből, ami magasabb plazmakoncentrációhoz és megnövekedett eliminációs felezési időhöz vezetett. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a tiamulin gátolja az antipirin oxidatív metabolizmusát, tehát hatással lehet más, egyidejűleg alkalmazott gyógyszerek metabolizmusára [153, 154]. Egy patkányokon végzett kísérlet során hasonló eredményeket mutatott az antipirin ciprofloxacinnal való együttes adása [155]. Egy másik publikációban meghatározták, hogy napi kétszer 125 mg-os adagban a ciprofloxacinnal való antipirin

felezési idejének enyhe növekedését okozta. Az eredmény dóziszfüggő volt, és klinikailag nem jelentős [156].

Összességében elmondható, hogy egyes antibiotikumok befolyásolhatják az antipirin metabolizmusát és eliminációját, valamint hangsúlyozzák a gyógyszerinterakciók figyelembevételének fontosságát a klinikai gyakorlatban [155].

### 3.6.5 Edaravon

Az edaravon egy új antioxidáns, amelyet jelenleg az agyi infarktus akut szakaszában lévő betegek kezelésére használnak egyes országokban, például Japánban. Képes semlegesíteni a ROS-t és gátolja a proinflammatorikus válaszokat az agyi iszkémia után állatokban és emberekben. Kimutatták, hogy megakadályozza a különböző extracerebrális szervek oxidatív károsodását is, ezért az edaravon az infarktus kezelésében való hasznosságán túlmenően számos, oxidatív stresszel összefüggő betegség kezelésében is szerves szerepet játszhat [157, 158].

Az edaravon pKa értéke 7,0, amelynek körülbelül 50%-a anionos formában létezik fiziológiás pH-n, ami lehetővé teszi, hogy reagáljon az agyban lévő reaktív oxigén származékokkal. Kísérletek során kimutatták, hogy az edaravon anionja képes elektronokat átadni a peroxilgyököknek, és egy 2-oxo-3-butánsav nevű végterméket képezni, amit az edaravonnal kezelt iszkémiás patkányok vizsgálata során kinyert adatok is alátámasztanak [158, 159].

A kutatók megállapították az edaravon és a ciprofloxacin között interakciókat. Az edaravon képes gátolni a ciprofloxacin által kiváltott mutagenézist anélkül, hogy befolyásolná az antibiotikum baktériumokkal szembeni aktivitását. Amikor az klinikailag releváns koncentrációban (100 mM) alkalmazták, hatékonyan gátolta az  $\sigma^S$ -magas sejtek, az  $\sigma^S$ -füziós fehérjék, a ROS-ban gazdag sejtek és a legtöbb RifR mutagenézisének kialakulását [160]. Aktiválja a SOS-választ, gátolja a sejtnövekedést, illetve befolyásolja a béta-galaktozidáz aktivitást. Ez arra utal, hogy specifikusan gátolja az  $\sigma^S$  indukcióját a baktériumokban. Fontos, hogy az edaravon nem befolyásolta a ciprofloxacin azon képességét, hogy DSB-ket indukáljon, vagyis nem csökkentette a ciprofloxacin baktericid aktivitását nagy dózisokban. Ennek következtében hatékonyan csökkentheti az AMR-rel járó mutagenézist anélkül, hogy a ciprofloxacin antibiotikumként való hasznosságát veszélyeztetné.

Egy másik kutatás a ciprofloxacin antibiotikum által kiváltott SOS/ROS válasz mérséklésére összpontosított. Az antioxidáns molekula jelentősen csökkentette a ROS-szinteket

és a SOS-hez kapcsolódó gének expresszióját is a ciprofloxacinnal kezelt mintákban Megfigyelték a plazmidátviteli sebesség csökkenését és a SOS-válasz expressziója közötti korrelációt. Az edaravon azonban csak részben gátolta azt az útvonalat, amelyen keresztül a ciprofloxacinnal a SOS-választ indukálta. A tanulmány azt erősíti meg, hogy az antioxidáns molekulák antibiotikumokkal kombinálva potenciálisan enyhíthetik az antibiotikumok által kiváltott plazmidon kódolt rezisztencia terjedését [161].

Egyes kutatók az új antibiotikumok hagyományos kifejlesztése mellett alternatív stratégiát javasolnak a rezisztenciát kiváltó molekuláris mechanizmusok felfedezésére és gátlására [108]. A fluorokinolon antibiotikumokra összpontosítva, ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia gyakran *de novo* mutációk révén alakul ki. Figyelemre méltó, hogy a ciprofloxacinnal szubinhibitorikus koncentrációjának való alkalmazása vagy az annak való kitettség indukálhatja és szelektálhatja a ciprofloxacinnal szembeni rezisztenciát [104]. Ez a mutagenézis, a gyógyszer által indukált ROS keletkezésével jár [162].

Az edaravon antioxidáns tulajdonságát más aspektusból is elemezték. A sejtmembránokkal kölcsönhatásba lépni képes antioxidánsok felfedezésére törekedve a kutatók módosították az edaravont. A módosítás során egy C-18 szénhidrogénláncot adtak az edaravon egyik oldalláncához, ami növelte lipofilitását a liposzómákkal való fokozott kölcsönhatás érdekében [163]. A módosított, C18-edaravonnak nevezett vegyületet antioxidáns hatását *in vitro* kísérletekben a DPPH teszttel és lipidperoxidációs tesztekkel értékelték mesterséges lipidmembránokon vízoldható és lipidoldható szabadgyököket alkalmazva. Továbbá a retina degeneratív betegségeiben betöltött jelentősége miatt a C18-edaravonnak a 2-amidinopropán-hidroklorid által kiváltott sejthalál ellensúlyozására való képességét vizsgálták retinális pigmentált epithel sejtekben [164]. Az eredmények azt mutatták, hogy a módosított molekula erős affinitást mutatott a lipidmembránokhoz, ami javította a lipidperoxidáció elleni védőhatást a nem módosított edaravonhoz képest, különösen, ha lipidfázisú gyökök indítói voltak érintettek. Ezek együttesen azt sugallták, hogy a C18-edaravon hatékony antioxidánsként ígéretes mind sejtes, mind sejtmentes rendszerekben. Az eredmények arra utalnak, hogy az oxidatív stresszel összefüggő betegségek új terápiás jelöltjeként is alkalmazható [165].

## 4 Célkitűzések

A projekt elsődleges célja olyan vegyületek azonosítása, melyeket antibiotikumokkal együtt alkalmazva, additív vagy szinergista kölcsönhatást érhetünk el, hogy az AMR kialakulását és terjedését csökkenteni tudjuk.

Kutatásunk alapvető részét képezi az oxidatív stressz, mint a baktériumok rezisztenciájának kialakulásának hátterében álló egyik legfontosabb kaszkádjának vizsgálata. Ennek érdekében számos, elismert antioxidáns tulajdonsággal rendelkező vegyületet azonosítottunk. Figyelembe vettük ezeknek az egyes antibiotikumokkal való interakcióját, az enrofloxacinra koncentrálva. Antioxidáns hatású vegyületek közül kísérleteinkhez az edaravont, az antipirint, a kurkumint, a dimetil-fumarátot és kvercetin használtuk.

A céljaink eléréséhez, az azonosított vegyületeket három fő kísérlet során vizsgáltuk. Első lépésben meghatározásra került az egyes vegyületek gyökfogó képessége. Az így kapott információkból következtethetünk a vegyületek antioxidáns kapacitására. Ezzel párhuzamosan szinergizmus-vizsgálatokat, mikrobiológiai elemzéseket végeztünk. Az *in vitro* passzálások során *E. coli*-t vizsgáltunk, antibiotikumként az enrofloxacint választottuk, illetve annak antioxidánsokkal való kombinációit is teszteltük. Itt elsősorban a MIC értékek közötti különbségekre voltunk kíváncsiak. Végezetül egy innovatív rendszert a MEGA-plate -et is igénybe vettük, mely segítségével nagymennyiségű baktérium szaporodását tudtuk egyszerre vizsgálni enrofloxacin, illetve enrofloxacin és edaravon, mint választott antioxidáns együttes kezelése során.

Célunk, hogy bemutassunk egy olyan kísérlet sorozatot, amely az antioxidáns vegyületek AMR mérséklésében rejlő lehetőségeinek vizsgálatára alkalmas. Ez az előzetes *in vitro* kutatás döntő alapként szolgál egy tágabb, hosszabb távú célnak. Egy olyan készítmény kifejlesztésére törekszünk, amely az antibiotikumok és antioxidáns vegyületek kombinációját tartalmazza. Munkánk fő célja, hogy hozzájáruljunk az AMR kritikus, globális problémájának kezelésére szolgáló stratégiák kidolgozásához, fokozva az antibiotikum terápiák hatékonyságát.



## 5 Anyag és módszer

### 5.1 DPPH Antioxidáns Assay

A DPPH Antioxidáns Assay egy kémiai módszer, amelyet különféle anyagok antioxidáns aktivitásának mérésére, pontosabban gyökfogó képességük vizsgálatára használnak. A DPPH a 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil rövidítése, amely egy stabil szabadgyökvegyület [166].

Alapja, hogy a DPPH oxidált formában lila színű oldat. Amikor antioxidáns vegyülettel találkozik, redukálódik és elveszíti a színét. Az elszíneződés mértéke egyenesen arányos a vizsgált minta antioxidáns aktivitásával [167].

Kísérletünkben a DPPH Antioxidant Assay Kit-et (Dojindo EU, München, Németország) használtuk. Az előkészítés során a DPPH-reagens tartalmú csőbe körülbelül 1 ml etanolt adtunk, majd 60 másodperces ultrahangos homogenizálásnak vetettük alá. Ez a lépés a nehezen oldódó DPPH-reagens feloldásának megkönnyítésére szolgált. Ezt követően a kapott teljes oldatot egy 10 ml-es mérőlombikba öntöttük át, biztosítva a további előkészítéshez szükséges pontos térfogatot. Ezután, körülbelül 1 ml etanolt tartalmazó folyadékot juttattunk ugyanabba a csőbe, amelyet korábban az első lépésben használtunk, majd további 60 másodperces homogenizálás következett. E lépés megismétlése a DPPH-reagens oldódási folyamatának elősegítésére szolgált, mert ha nem sikerül feloldani az összes DPPH-részecskét, az fals eredményeket adhat. Az így elkészült a DPPH oldatnak jellegzetes lila színe volt, a reakciók előrehaladtával ennek változását követtük nyomon.

Minden egyes vizsgált hatóanyagból készítettünk egy hígítási sort, 0,1-1000  $\mu\text{g/ml}$  között. A mintákat, esetünkben az edaravont, a kvercetin, a kurkumint, a dimetil-fumarátot és az antipirint hozzáadtuk a DPPH-oldathoz és elvégezzük az assay-t a gyártó utasításainak megfelelően. A reagensek hozzáadását követően a mikrolemezt szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percig, sötétben tartva. Az az inkubációs idő alatt a DPPH-gyök és az antioxidáns vegyület között kölcsönhatás kialakult. A DPPH redukcióját, a lila szín csökkenésének spektrofotométerrel történő mérésével követtük nyomon [168]. Ezt követően a minták abszorbanciáját 517 nm-en vizsgáltuk spektrofotométerrel, Spectramax iD3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Ezután adott matematikai módszerrel kiszámítottuk a kapott abszorbancia értékek alapján az antioxidánsok  $\text{IC}_{50}$  értékeit.

Az oxidatív hatás erősségét általában azzal az antioxidáns koncentrációval tudjuk jellemzni, amely felezi a szabadgyökök koncentrációját, így kapjuk meg az 50%-os gátló hatást okozó koncentrációt, az  $\text{IC}_{50}$ -et. Ennek ismeretében az egyes hatóanyagok gyökfogó kapacitása

egymással összehasonlítható. Az antioxidáns aktivitást általában a minta által megkötött DPPH százalékos arányában fejezik ki, az alacsonyabb érték magasabb antioxidáns aktivitást jelez.

Az első mérést követően egy hozzávetőleges képet kaptunk a tesztanyagok gyökfogó kapacitásának mértékéről, míg a második mérés az IC<sub>50</sub> érték tényleges meghatározását jelentette. Itt egy másik hígítási sort készítettünk, általában 10-200 µg/ml-es koncentrációkat használtunk.

## 5.2 Érzékenységi vizsgálatok

Ebben a tanulmányban célunk az volt, hogy megállapítsuk az *E. coli* MG1665 törzsenrofloxacin érzékenységét. Ezek a mikrobiológiai értékek alapul szolgáltak a további kísérleteinkhez.

Először egy 1024 µg/ml-es koncentrációjú enrofloxacin törzsoldatot állítottunk elő, majd ezt követően a vizsgált törzs beoltása következett. A baktériumot 5 ml tripton szója levesben (TSB) szaporítottuk és 24 órán át termosztátban 37 °C fokon inkubáltuk.

A kezdeti baktériumszámot a McFarland-sztenderd segítségével határoztuk meg. A folyamat során a szuszpenziót egymás után többször centrifugáltuk, majd az így kapott felülúszókat eltávolítottuk. A megfelelő opálosság elérése érdekében steril fiziológiás sóoldattal is reszuszpendáltuk. Az opálossága alapján következtettünk a szuszpenzióban lévő baktériumok számára, összehasonlítva az általunk meglévő sztenderd oldathoz. A pontos baktériumszám megállapításához 10-es alapú hígítási sort készítettünk és a mintákat tripton szója agarra (TSA) oltottuk. A 24 órás inkubáció után megszámloltuk a baktériumtelepeket, hogy meghatározzuk a telepképző egységeket (CFU).

A MIC értéket 96 lyukú mikrolemezes rendszer segítségével határoztuk meg, 3 párhuzamos mintával dolgozva. A baktériumszuszenzió kioltását követően, majd 24 órán át tartó 37 °C-os inkubáció után értékeltük a kapott eredményt.

A MIC plate-ek segítségével a minimális baktériumölő koncentráció (MBC) értékét is meghatároztuk. Ez definíció szerint egy antibiotikum azon legkisebb koncentrációja, amely a kórokozók 99,9%-át elpusztítja. Egy napig tartó antibiotikummal történő inkubáció után mintákat vettünk a plate-ről, 10-es alapú hígítási sort készítettünk, majd TSA agarra kentük. 24 óra inkubáció után leolvastuk a telepszámot és meghatároztuk a CFU-t.

Végül a mutáció prevenciós koncentráció (MPC) is kiértékelésre került. Szintén a MIC-hez hasonló protokollt követett, de más baktériumkoncentrációt és hosszabb inkubációs időt

alkalmaztunk. A hozzáadott baktérium oldat töményebb szuszpenzióból készül, az 1-es McFarland-sztenderd beállításával és az inkubációs idő 72 óra volt.

### 5.3 *E. coli* MG1655 törzsek passzálása

Ebben a kísérletben az *E. coli* MG1655 törzs elleni MIC-ek meghatározása volt a célunk különböző komponensek hozzáadásával. Ennek eléréséhez antioxidánsokat és enrofloxacinot használtunk fel. Oldószerként a TWEEN80-at választottuk. Ez az anyag használható a baktériumok passzálási protokolljaiban, hogy segítse a hidrofób vegyületek vagy antimikrobiális szerek egyenletes eloszlását a tápoldatban. Amfifil tulajdonságainak köszönhetően különösen hasznos ezeknek az anyagoknak a diszpergálására, biztosítva a baktériumpopuláció egyenletes expozícióját a passzázs során.

A szükséges anyagok törzsoldatának koncentrációja a lemezen elérni kívánt kezdőkoncentráció előre meghatározásra került (1. táblázat). A kísérlet előtt a por formátumú vegyületeket kimértük, az enrofloxacin esetében desztillált vízzel, a vizsgált vegyületeink esetében TWEEN80-nal koncentrált oldatokat készítettünk,

Szükséges anyagok	Enrofloxacin	Edaravon	Antipirin	Kurkumin	Dimetil-fumarát	Kvercetin
<b>Törzsoldat konc.</b>	1024 µg/ml	1750 µg/ml	1750 µg/ml	10.000 µg/ml	10.000 µg/ml	5000 µg/ml
<b>Végkoncentrációk</b>	4 µg/ml	35 µg/ml	35 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml

#### 1. táblázat A felhasznált vegyületek törzsoldatának koncentrációi és végkoncentrációi µg/ml-ben

Először a fagyasztott baktériumokat friss táplevesbe oltva egy éjszaka alatt felszaporítottuk. A baktérium szuszpenziót 250-szeresre hígítottuk.

Ezután elvégeztük az enrofloxacin hígítását, melynek során törzsoldatot 64-szeresére hígítottuk. A továbbiakban ezt használtuk fel. Az elkészített kezelőoldatokat hűtőben 2°C-on tároltuk és a kísérlet során 10 napon keresztül felhasználtuk. A kezdőoldatok minden nap frissen hígításra kerültek a törzsoldatokból. Mindegyik esetében 0,08 ml törzsoldathoz adtunk 1,92 ml Müller hinton levest (MH).

A további szakaszban a MIC-lemezek előkészítését ismertetném, kiemelve a különbségeket az 1. sorra, a 2-8. sorra, illetve a 11-12. oszlopokra. A MIC-lemezek 1. sorában

a 2-12. oszlopaihoz tartozó lyukakat 90 µl MH-nal töltöttük fel. Ez az oldat a baktériumok és a kísérlethez szükséges egyéb komponensek növekedési közegeként szolgált. Az 1. sor 1. oszlopában 135 µl MH leveshez 45 µl-t adtunk a 16 µg/ml-os enrofloxacin kezelőoldatból, majd kettes alapú hígítási sort készítettünk a 10. oszlopig. A 2-8. sor 1-10-ig tartó oszlopait 45 µl MH-nal töltöttük fel. Az 1. sorhoz hasonlóan ezeknek a soroknak az 1. oszlopához is 45 µl enrofloxacin kezelőoldatot adtunk. Ezután ezekben a sorokban is elvégeztük a kettes alapú hígítást a 10. oszlopig. 2.-8. sorig az 1.-10. oszlop lyukaiba a vizsgált anyagok kezelőoldataiból 45-45 µl-t mértünk. A MIC plateken az enrofloxacin koncentrációja jobbról balra csökkent, de a vizsgált vegyületek koncentrációja a sorokban állandó. A MIC-lemezek 11. és 12. oszlopába 90 µl MH-t adtunk. Ezeket az oszlopokat nem kezeltük, pozitív és negatív kontrollként szolgáltak a kísérletben. A hígított baktériumszuszpenzióból 10 µl-nyit adtunk a MIC-lemezek minden egyes mélyedésébe, kivéve a negatív kontrollként szolgáló 12. oszlop lyukaihoz. A beoltást követően a lemezeket 37°C-on inkubáltuk a baktériumok szaporodásának elősegítése érdekében.

A kísérlet 3-11. napja során a passzálás és a MIC-meghatározás döntő fontosságú szakasza zajlott. Ennek során 18 órás inkubálási idővel dolgoztunk. A passzálást összesen 9 alkalommal végeztük el, ami végül 10 MIC-érték meghatározásához vezetett.

A MIC értékét leves hígítással módszerrel határoztuk meg. A definíció alapján abban a koncentrációban nincs látható baktériumszaporodás, a mintát emellől vettük, ahol az oldat még opálos volt, vagyis jelen voltak a baktériumok. A kivett oldatot, ami konstans 20 µl volt, hígítottuk 200 µl táplevessel. Egy új plate-en újabb hígítási sort készítettünk az enrofloxacinból és elkészítettük a vizsgált anyagokkal kombinált sorokat is, az előző napnak megfelelően. Majd ráoltottunk a hígított baktériumszuszpenziókból 10 µl-t.

A MIC-lemezek második, hatodik és tizedik passzálásának leolvasása után, a megmaradt hígított baktériumtenyészetet TSA-agarra oltottuk ki, másnap pedig a telepeket 800 µl MH és 200 µl glicerin oldatban gyűjtöttük és lefagyasztottuk későbbi esetleges géntechnológiai vizsgálatokhoz.

A plateken az MPC értékeket is vizsgáltuk, ehhez 72 órás inkubációkat végeztünk, de a passzálási folyamatok teljes mértékben megegyeztek a MIC plateknél ismert módszerekkel.

## **5.4 MEGA-plate**

A MEGA-plate egy 60 x 30 centiméteres téglalap alakú polikarbonát edény, mely 5 milliméter vastag anyagból áll. Az edény alja kilenc egyenlő sávra van osztva. Ezeket a

felosztások azért vannak benne, hogy megkönnyítsék a hatóanyagok szétválasztását az edényben. Ebbe az edénybe baktériumok szaporodására alkalmas táptalajt öntünk.

Az öntési folyamat során három különböző réteget hoztunk létre. A legalsó réteg tehát, kilenc különálló rekeszből állt. Ezek a rekeszek a vizsgált antibiotikum növekvő és antioxidáns állandó koncentrációit tartalmazták. Az edény legkülső szélénél kezdve, befelé haladva ezekbe a rekeszekbe az antibiotikum 0x, 1x, 10x, 100x és 1000x koncentrációban került bele. Szimmetrikusan kívülről befelé öntöttük, így a legmagasabb koncentráció az ötödik rekeszben volt. Az ezt követő második réteg egy összefüggő szilárd réteg volt, amelyet úgy terveztünk, hogy biztosítsa az első és a harmadik réteg közötti egyenletességet és konzisztenciát. A harmadik réteg félig folyékony jellegű, és a baktériumok diffúziós növekedésének elősegítéséért volt felelős. Ebben a rétegben a baktériumok növekedése a gyógyszerkoncentráció növekvő gradiensevel szemben következett be, olyan környezetet teremtve, amely elősegítette az antibiotikum hatásainak vizsgálatát.

Mindegyik rekeszbe először 252 ml különböző antibiotikum-koncentrációt tartalmazó táptalaj került. A táptalajt 2% BD Bacto Agar hozzáadásával állítottuk össze. Ezt 40 percig kellett autoklávozni 121 °C-on, a megfelelő sterilitás eléréséhez. A tápanyagokkal való dúsítása érdekében LB-Lennox kapszulát is kevertünk bele. A gombás kontamináció megelőzése érdekében a táptalajhoz 20 mg/ml koncentrációban cikloheximidet adtunk. A baktérium szaporodás láthatósága miatt akrilfestéket kevertünk mindegyik részhez.

A második réteg egy agarrétegből állt, mely 760 ml desztillált vizet és 15,2 gramm Bacto Agart tartalmazott. Ez egy egységes, szilárd réteget eredményez az első és harmadik réteg között. Az ismételt autoklávozás és hűtés után a rétegbe cikloheximidet és akrilfestéket mértünk. Ezt egyenletesen rétegeztük rá az első rétegre.

Végül az egész tetejére egy 0,28%-os félfolyékony táptalaj került. Festéket már nem, de cikloheximidet még adtunk hozzá. Ennek a rétegnek a célja, hogy megkönnyítse a baktériumok diffúzióját a közegben a növekvő antibiotikum-koncentrációval szemben. Az autoklávozás után megvártuk, míg 40 °C körüli lesz a hőmérséklete, majd a MEGA-plate-re került.

Befejezésként a MEGA-plate táptalajának két szélére oltottuk az *E. coli* MG1655 törzset pipetta segítségével. Ezt követően a MEGA-plate-t 37 °C-os termosztátba helyeztük.

A baktérium növekedés ellenőrzéséhez, oltókaccsal mintát vettünk a MEGA-plate rekeszeinek megfelelően. A mintákat agarra kikentük, majd másnap egy telepet TSB-be oltottuk. A felszaporodott baktériumok enrofloxacin érzékenységét MIC platen ellenőriztük. Ez a rendszer jól alkalmazható egy adott baktérium antimikrobiális rezisztenciájának

nyomonkövetéséhez, illetve az edaravon rezisztenciát befolyásoló tulajdonságának ellenőrzéséhez.

Az enrofloxacin MIC értékét a vizsgált *E. coli* MG1655 törzs esetében már korábban megállapítottuk. Az egyes sávokhoz szükséges hatóanyagmennyiség kiszámolásához ez egy elengedhetetlen lépés volt. A szélső két sávba nem került antibiotikum, a 2. és 8. rekeszbe 0,03 µg/ml, a 3. és 7. rekeszbe 0,3 µg/ml, a 4. és 6. rekeszbe 3 µg/ml és végül az 5. rekeszbe 30 µg/ml hatóanyag került. Elkészítettünk hasonlóan egy másik platet, amiben a befelé növekvő antibiotikum koncentráció mellett egy állandó edaravon kezelést is alkalmaztunk. Az antibiotikum koncentrációk a második plate esetén megegyeztek az első plate koncentrációival, míg az edaravon koncentrációja a 2.-8. rekeszekig végig 35 µg/ml volt.

## 6 Eredmények

### 6.1 DPPH Antioxidáns Assay

Az 2. táblázat összefoglalja a DPPH antioxidáns assay során kapott eredményeket. A mérés során a vizsgált vegyületek IC<sub>50</sub> értéke került meghatározásra.

A dimetil-fumarát és az antipirin a vizsgált koncentrációtartományon belül nem mutatott DPPH gyökfogó kapacitást. A kurkumin esetében -feltételezhetően igen intenzív sárga színe miatt- a DPPH assay nem tűnik alkalmasnak a gyökfogó kapacitás vizsgálatára, a keletkezett termék színe az assay-ben halványsárga. Az edaravon és kvercetin antioxidáns kapacitása volt csak vizsgálható, az edaravon IC<sub>50</sub> értékét 167 µg/ml, míg a kvercetinét 24,8 µg/ml koncentrációban határoztuk meg (2. táblázat).

Hatóanyag	Edaravon	Kvercetin	Dimetil-fumarát	Antipirin	Kurkumin
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	167	24,8	nem mutatott gyökfogó aktivitást	nem mutatott gyökfogó aktivitást	nem meghatározható

2. táblázat A hatóanyagok IC<sub>50</sub> értéke

### 6.2 Érzékenységi vizsgálatok

Az általunk vizsgált *E. coli* MG1655 törzs értékei az alábbi táblázatban vannak feltüntetve (3. táblázat).

MIC	0,015
MBC	0,015
MPC	0,03 v. 0,06

3. táblázat *E. coli* MG1665 érzékenységi vizsgálatok

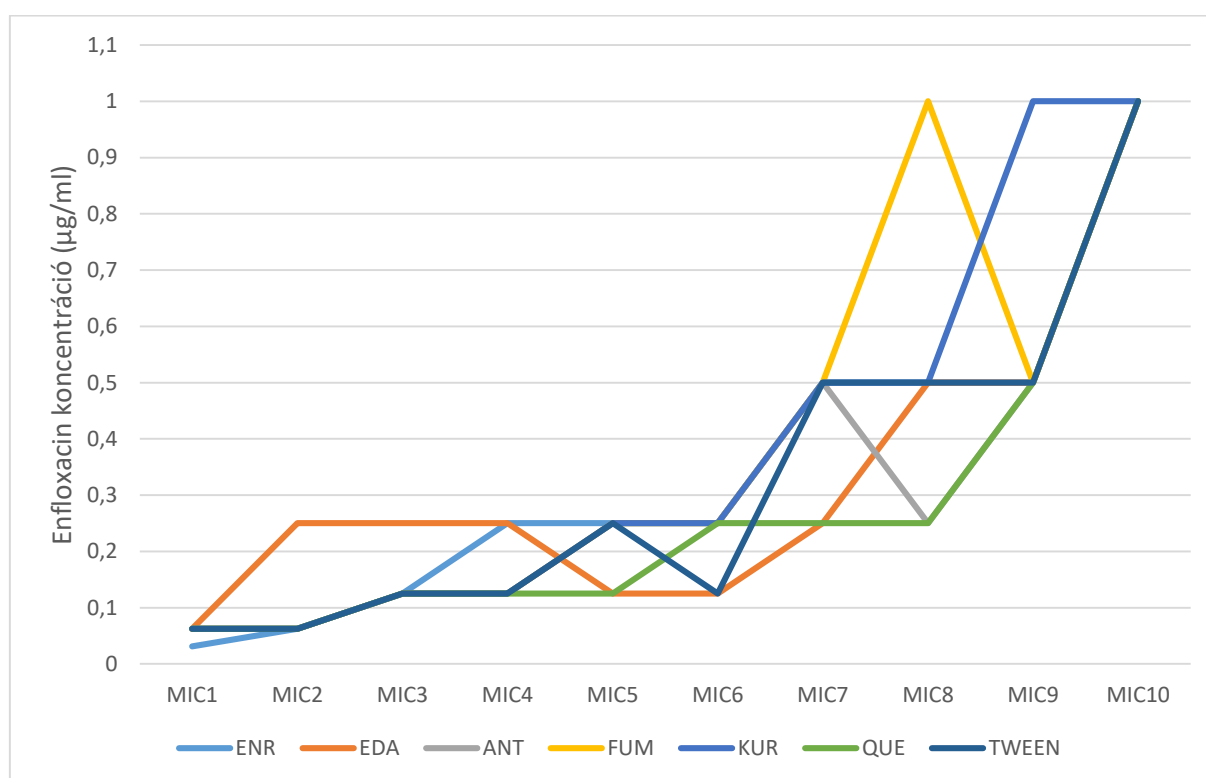
MIC (minimális gátló koncentráció), MBC (minimális baktériumölő koncentráció), MPC (mutáció prevenció koncentráció)

### 6.3 *E. coli* MG1655 törzsek passzálása

A MIC-értékek a vizsgált mikroorganizmusok különböző mértékű érzékenységét jelzik a különböző antimikrobiális szerekkel szemben.

A vizsgálat kezdetekor az *E. coli* törzs MIC értéke 0,03125  $\mu\text{g/l}$  volt, ami a 10 napos passzálás alatt 1  $\mu\text{g/ml}$ -re emelkedett. Ehhez viszonyítva az EDA, ANT, FUM, KUR, QUE és TWEEN értékek 10 nagyságrenddel nagyobb MIC értékeket 0,0625  $\mu\text{g/ml}$ -t mutattak kezdetben, illetve a 10 napos passzálást követően a kezdeti MIC érték az enrofloxacin önmagában való kezeléshez hasonlóan emelkedett 0,5 vagy 1  $\mu\text{g/ml}$ -re.

Az antioxidáns vegyületekkel történő kombináció nem segített a végső MIC értékek szignifikáns csökkentésében. Ugyan ezt a tendenciát figyelhetük meg az MPC értékek esetén is, csak magasabb végső koncentrációkkal, mind az enrofloxacin és mind az enrofloxacin-antioxidáns kombinációkban (1. és 2. ábra).

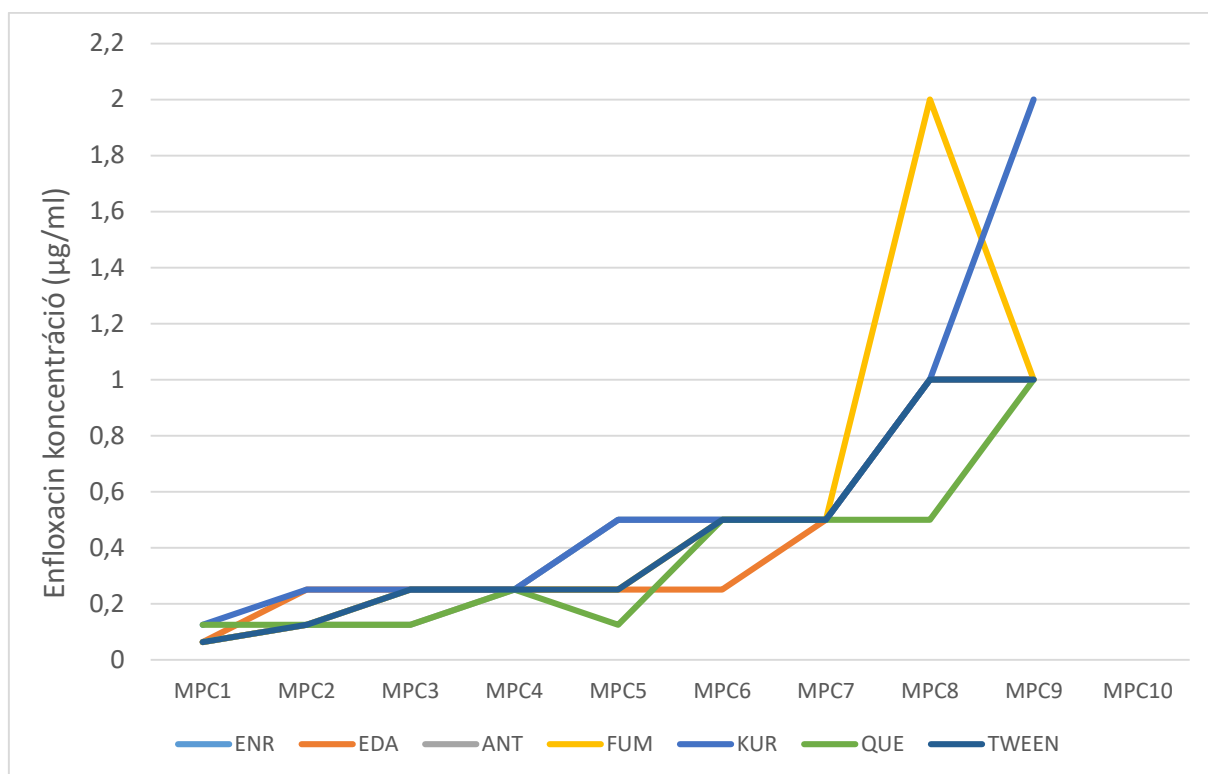


**1. ábra Az enrofloxacinnal történő passzálás MIC eredményei**

**Magyarázat: EDA=edaravon (35  $\mu\text{g/ml}$ ), ANT= antipirin (35  $\mu\text{g/ml}$ ), FUM= dimetil-fumarát (200  $\mu\text{g/ml}$ ), KUR=kurkumin (200  $\mu\text{g/ml}$ ), QUE= kvercetin (100  $\mu\text{g/ml}$ ), TWEEN=Tween80 (oldószer) 2 V/V%**

**Az ábrán a MIC utáni értékek a passzálás során eltelt napok számát jelölik**





**2. ábra Az enrofloxacinnal történő passzálás MPC eredményei**  
**Magyarázat: EDA=edaravon (35 µg/ml), ANT= antipirin (35 µg/ml), FUM= dimetil-fumarát (200 µg/ml), KUR=kurkumin (200 µg/ml), QUE= kvercetin (100 µg/ml), TWEEN=Tween80 (oldószer) 2 V/V%**  
**Az ábrán az MPC utáni értékek a passzálás során eltelt napok számát jelölik**

## 6.4 MEGA-plate

A MEGA-plate rendszer lehetővé tette az antibiotikum és az edaravon baktériumok növekedésére gyakorolt hatásának ellenőrzött értékelését.

A vizsgálat elsődleges célja annak felmérése volt, hogy az enrofloxacinnal kombinált edaravon képes-e meghosszabbítani a baktériumok növekedéséhez szükséges időt az enrofloxacinnal önmagában összehasonlítva. Az eredmények azt mutatták, hogy a baktériumok 7 napon belül növekedtek mind enrofloxacin, mind edaravon-enrofloxacin körülmények között. Ez arra utal, hogy az edaravon hozzáadása nem változtatta meg lényegesen a baktériumok növekedési ütemét, illetve nem befolyásolta az enrofloxacin hatékonyságát az *E. coli* MG1665 törzssel szemben (3. ábra).



**3. ábra A MEGA-plate a 7. napon (enrofloxacin + edaravon)**

**Az agar fekete színű az akril festéknek köszönhetően**

**A plate-en a baktérium szaporodást, fehér telepekként láthatjuk**

**Az enrofloxacin koncentrációk: 2. és 8. rekeszbe 0,03 µg/ml, a 3. és 7. rekeszbe 0,3 µg/ml, a 4. és 6. rekeszbe 3 µg/ml és az 5. rekeszbe 30 µg/ml. Az edaravon koncentrációja a 2.-8. rekeszekig végig 35 µg/ml**

## 7 Megbeszélés, következtetések

Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy milyen mértékben és milyen gyorsan alakul ki a baktériumokban az enrofloxacinnal szembeni rezisztencia, ha összehasonlítjuk az enrofloxacinnal kezelt *E. coli* törzseket azokkal, melyeknél enrofloxacint antioxidánsokkal (kurkumin, edaravon, antipirin, dimetil-fumarát) együttesen alkalmaztunk.

Több tanulmány is ír arról, hogy az antioxidáns vegyületek gátolják az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulását. Első kísérletünkben, az antioxidánsok IC<sub>50</sub> értékének meghatározását tűztük ki célul, ami ezeknek a vegyületeknek a gyökfogyó kapacitását jellemzi. Az IC<sub>50</sub> értékek ismerete értékes információt szolgáltat arról, hogy egy hatóanyag antioxidáns hatása milyen mechanizmus által valósul meg. Az eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a kvercetinnek és az edaravonnak van értékelhető gyökfogyó kapacitása. Az antipirin és a dimetil-fumarát esetében az IC<sub>50</sub> értékét nem tudtuk meghatározni, és a szakirodalomban sem találtunk adatot erre vonatkozóan. A kurkumin vizsgálatára ez a módszer nem alkalmas, mert elnyomja a kurkumin színe az assay színét.

A szakirodalomban fellelhető adatok alapján tudjuk, hogy az edaravon esetében a DPPH módszerrel meghatározva 29 mmol/l-es IC<sub>50</sub> értéket kaptak [169]. Ezzel szemben egy 2017-es tanulmányban az IC<sub>50</sub> értéket 4,7 mM-re becsülték [170]. Egy tanulmány DPPH módszerrel megállapította a kvercetin IC<sub>50</sub> értékét 8,14 µg/ml-nek, itt másik módszert is említésre kerül a DPPH mellett, az ABTS-t, amely szintén a gyökfogyó kapacitás meghatározására irányul. Továbbá vizsgálták a kvercetin és kurkumin származékainak kombinációit, amelynek során azt állapították meg, hogy a kombinált kezelések, a kvercetines kezeléshez képest kisebb IC<sub>50</sub>-et (15,38-23,70 µg/ml) eredményeztek [171]. Tehát vizsgálataink összhangban vannak a szakirodalmi adatokkal, ugyanis flavonoidokról és az edaravonról is jól ismert, hogy direkt antioxidáns hatással rendelkeznek, ezeket a tulajdonságaikat a gyógyászatban kihasználják [130, 172, 173].

A mikrobiológiai vizsgálatok során meghatározásra került a vizsgált *E. coli* törzs MIC értéke, majd passzálások során értékeltük ennek változását. A 96 lyukú plate-en külön vizsgáltuk az enrofloxacinnal szembeni rezisztenciát, illetve a választott antioxidáns vegyületek és enrofloxacin kombinációjával is elvégeztük a passzálást, arra számítva, hogy az antioxidánsok jelenléte mérsékli az enrofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulását. Az eredményeink alapján nem kaptunk szignifikáns különbséget a MIC értékekben a csak enrofloxacinnal illetve enrofloxacin-antioxidáns kezeléseket kapott csoportok között. Ezzel szemben szakirodalomban leírják egyes vegyületek antibakteriális hatását, tehát lehet, hogy a

módszeren kell finomítanunk, ahhoz, hogy bizonyítani tudjuk ezeknek a hozzáadott vegyületeknek a hasznosságát [174, 175].

Az edaravon esetében egyes kutatások alátámasztották, hogy képes gátolni a ciprofloxacín által kiváltott mutagenezist anélkül, hogy befolyásolná az antibiotikum baktériumokkal szembeni aktivitását [108]. A passzálós módszernél kevés térfogattal dolgoztunk, 100 µl/lyuk, így kevesebb baktériummal is, ezért a mutációk kialakulásának az esélye kevesebb.

A passzálásoknál a MIC értékek 10 nap alatt csak 0,5-1 µg/ml-re emelkedtek, így azt feltételeztük, hogy esetleg a relatív kis mértékű mutáció miatt nem mutatható ki szignifikáns különbség az enrofloxaccinnal önmagában és az antioxidánsokkal kiegészített csoportok között. Ezért módszert váltottunk és a legígéretesebb antioxidáns vegyületünkkel egy másik módszert is kipróbáltunk. A MEGA-plate esetén nagyon nagy mennyiségű baktérium van jelen így a mutációk kialakulásának az esélye jóval nagyobb. A kísérlet során 7 nap inkubáció után 30 µg/ml-es MIC értékeket mérhettünk. Reméltük, hogy ebben a rendszerben sikerül igazolnunk az edaravon hatékonyságát, de ennek hozzáadásával sem tudtunk változtani a rezisztencia megjelenésének a mértékén és kialakulásának az idején.

Vizsgálati eredményeinkből arra következtethetünk, hogy az általunk, tanulmányozott módszerekkel és választott koncentrációkkal nem tudtuk csökkenteni a rezisztencia kialakulását. További vizsgálatok szükségesek a megfelelő modell elsajátításához és a megfelelő antioxidáns koncentrációk kiválasztásához.

## 8 Összefoglaló

Az antimikrobiális rezisztencia (AMR) növekedése a 21. század egyik legfontosabb egészségügyi kihívásának tekinthető. Minden egyes olyan lehetőség, ami hozzájárul az antimikrobiális szerek hatékonyságának megőrzéséhez, kiemelt érdeklődésre tart számot. Az *E. coli* humán és állategészségügyi szempontból is kiemelt fontosságú, rezisztencia kialakítására hajlamos patogén baktérium. Az állategészségügyben gyakran alkalmaznak fluorokinolon antibiotikumokat, többek között enrofloxacint az *E. coli* által okozott megbetegedések kezelésére. Az elmúlt években több kísérlet is rávilágított az oxidatív stressz fontos szerepére a baktériumok antibiotikum rezisztenciájának kialakulásának hátterében, ezért antioxidáns vegyületek felhasználása ezen a területen is felmerülhet. Kutatásunk során egyes antioxidáns hatóanyagok AMR elleni küzdelemben rejlő lehetőségeit vizsgáltuk.

Kísérleteink során öt antioxidáns hatóanyagot (edaravon, kvercetin, kurkumin, dimetil-fumarát és antipirin) hatását vizsgáltuk többféle aspektusból. A DPPH módszerrel meghatároztuk a hatóanyagok gyökfogó képességét, mely a direkt antioxidáns hatás egyik markere. Ezt követően mikrobiológiai vizsgálatokat végeztünk, az *E. coli* MG1665 törzs felhasználásával, és meghatároztuk az enrofloxacin MIC, MBC és MPC értékét. Ezután egy passzálós kísérlet során 10 napon keresztül figyelemmel kísértük a MIC értékek változását enrofloxacin kezelés, illetve enrofloxacin-antioxidáns kombinációs kezelés során. Egy másik rendszerben vizsgáltuk az egyik kiválasztott antioxidáns, az edaravon esetleges rezisztencia mérséklő hatását. A MEGA-plate használata lehetővé tette az antibiotikumok és az edaravon baktériumok gyakorolt hatásának ellenőrzött értékelését.

Az edaravon és a kvercetin gyökfogó kapacitását a DPPH assay segítségével meghatároztuk. A passzálás során az *E. coli* az enrofloxacinnal szemben mutatott érzékenysége az idő múlásával fokozatos csökkent. Az antioxidánsok hozzáadása nem változtatott a MIC értékek növekedésének intenzitásán. A MEGA-platen 7. napos inkubációt követően a baktériumok eljutottak a legtöményebb enrofloxacint tartalmazó rekeszbe, az enrofloxacint önmagában és az enrofloxacin-edaravon tartalmú plate-en is. Ez arra utal, hogy az edaravon hozzáadása nem változtatta meg a baktériumok növekedési sebességét, és nem befolyásolta az enrofloxacin hatékonyságát az *E. coli* MG1655 törzssel szemben.

Összefoglalva, vizsgálatunk rávilágít az antioxidánsok és antibiotikumok közötti összetett kölcsönhatásokra az AMR kezelésében. Az eredmények alátámasztják az *E. coli* rezisztencia fejlődő jellegét, és hangsúlyozzák a folyamatos kutatás és az új stratégiák szükségességét ezen kritikus közegészségügyi probléma leküzdésében.

## 9 Abstract

The rise of antimicrobial resistance (AMR) is considered one of the most important health challenges of the 21st century. Every opportunity that contributes to preserving the effectiveness of antimicrobials is of particular interest. *E. coli* is a pathogenic bacterium of major importance from both human and animal health perspective and is also susceptible to the development of resistance. In veterinary medicine, fluoroquinolone antibiotics, including enrofloxacin, are frequently used to treat diseases caused by *E. coli*. Recent experiments have highlighted the important role of oxidative stress in the development of antibiotic resistance in bacteria and the use of antioxidant compounds in this field may be considered. In our research, we investigated the potential of some antioxidant compounds to combat AMR.

Our experiments have investigated the effects of five antioxidant compounds (edaravone, quercetin, curcumin, dimethyl fumarate and antipyrine) from different aspects. Using the DPPH method, we determined the radical scavenging capacity of the active substances as a markers of direct antioxidant activity. Then, microbiological studies were performed using *E. coli* MG1665 strain and the MIC, MBC and MPC of enrofloxacin were determined. Afterwards, we monitored the changes in MIC values during enrofloxacin treatment and enrofloxacin-antioxidant combination treatment for 10 days in a passaging experiment. In another system, we investigated the potential resistance mitigating effect of one of the selected antioxidants, edaravone. The use of MEGA-plate allowed a controlled evaluation of the effect of antibiotics and edaravone on bacterial growth.

The radical scavenging capacity of edaravone and quercetin was determined by the DPPH assay. During passaging, the sensitivity of *E. coli* to enrofloxacin decreased over time. The addition of antioxidants did not change the intensity of the increase in MIC values. After 7 days of incubation on the MEGA-plate, the bacteria reached the most concentrated compartment containing enrofloxacin, both on the enrofloxacin alone and on the plate containing enrofloxacin-edaravone. This suggests that the addition of edaravone did not alter the growth rate of the bacteria and did not affect the efficacy of enrofloxacin against *E. coli* strain MG1655.

In conclusion, our study highlights the complex interactions between antioxidants and antibiotics in the treatment of AMR. The results support the evolving nature of *E. coli* resistance and highlight the need for continued research and new strategies to combat this critical public health problem.

## 10 Irodalomjegyzék

1. Davies J, Davies D (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 74:417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
2. Munita JM, Arias CA (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 4:. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
3. Spagnolo F, Trujillo M, Dennehy JJ (2021) Why Do Antibiotics Exist? *mBio* 12:e0196621. <https://doi.org/10.1128/mBio.01966-21>
4. Andersson DI, Patin SM, Nilsson AI, Kugelberg E (2007) The Biological Cost of Antibiotic Resistance. In: *Enzyme-Mediated Resistance to Antibiotics*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 339–348
5. Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual Á (2011) Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother* 17:149–182. <https://doi.org/10.1007/s10156-010-0120-2>
6. Card DH (1948) Penicillin resistance of staphylococci. *Med J Aust* 1:767. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1948.tb55377.x>
7. Iwuji C, Pillay D, Shamu P, Murire M, Nzenze S, Cox LA, Mullick S (2022) A systematic review of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* in sub-Saharan Africa. *J Antimicrob Chemother* 77:2074–2093. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac159>
8. Vila J (2005) Fluoroquinolone Resistance. In: *Frontiers in Antimicrobial Resistance*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 41–52
9. Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL (2012) A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. *Public Health Rep* 127:4–22. <https://doi.org/10.1177/003335491212700103>
10. Starr MP, Reynolds DM (1951) Streptomycin Resistance of Coliform Bacteria from Turkeys Fed Streptomycin. *Am J Public Health Nations Health* 41:1375–1380
11. Liu J-H, Deng Y-T, Zeng Z-L, Gao J-H, Chen L, Arakawa Y, Chen Z-L (2008) Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC(6′)-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2992–2993. <https://doi.org/10.1128/AAC.01686-07>
12. Skov RL, Monnet DL (2016) Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 21:30155. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155>
13. Paitan Y (2018) Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol* 416:181–211. [https://doi.org/10.1007/82\\_2018\\_110](https://doi.org/10.1007/82_2018_110)
14. Afridi OK, Ali J, Chang JH (2020) Next-Generation Sequencing Based Gut Resistome Profiling of Broiler Chickens Infected with Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. *Anim Open Access J MDPI* 10:2350. <https://doi.org/10.3390/ani10122350>
15. Roth N, Käsbohrer A, Mayrhofer S, Zitz U, Hofacre C, Domig KJ (2019) The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poult Sci* 98:1791–1804. <https://doi.org/10.3382/ps/pey539>
16. Diarra MS, Malouin F (2014) Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Front Microbiol* 5:282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00282>

17. Wang R, van Dorp L, Shaw LP, Bradley P, Wang Q, Wang X, Jin L, Zhang Q, Liu Y, Rieux A, Dorai-Schneiders T, Weinert LA, Iqbal Z, Didelot X, Wang H, Balloux F (2018) The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat Commun* 9:1179. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03205-z>
18. Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J (2009) Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol* 2:40–61. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x>
19. Suh B, Lorber B (1995) Quinolones. *Med Clin North Am* 79:869–894. [https://doi.org/10.1016/s0025-7125\(16\)30044-x](https://doi.org/10.1016/s0025-7125(16)30044-x)
20. Zhanel GG, Ennis K, Vercaigne L, Walkty A, Gin AS, Embil J, Smith H, Hoban DJ (2002) A critical review of the fluoroquinolones: focus on respiratory infections. *Drugs* 62:13–59. <https://doi.org/10.2165/00003495-200262010-00002>
21. TW Chu D (1996) Section Review Anti-infectives: The future role of quinolones. *Expert Opin Ther Pat* 6:711–737. <https://doi.org/10.1517/13543776.6.8.711>
22. Ball P, Fernald A, Tillotson G (1998) Therapeutic advances of new fluoroquinolones. *Expert Opin Investig Drugs* 7:761–783. <https://doi.org/10.1517/13543784.7.5.761>
23. Fish DN, Chow AT (1997) The clinical pharmacokinetics of levofloxacin. *Clin Pharmacokinet* 32:101–119. <https://doi.org/10.2165/00003088-199732020-00002>
24. Perry CM, Barman Balfour JA, Lamb HM (1999) Gatifloxacin. *Drugs* 58:683–696; discussion 697–698. <https://doi.org/10.2165/00003495-199958040-00010>
25. Barrett JF (2000) Moxifloxacin Bayer. *Curr Opin Investig Drugs Lond Engl* 2000 1:45–51
26. Sykes JE, Blondeau JM (2014) Pradofloxacin: a novel veterinary fluoroquinolone for treatment of bacterial infections in cats. *Vet J Lond Engl* 1997 201:207–214. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.06.008>
27. Lowe MN, Lamb HM (2000) Gemifloxacin. *Drugs* 59:1137–1147; discussion 1148. <https://doi.org/10.2165/00003495-200059050-00009>
28. Bhavnani SM, Ballow CH (2000) New agents for Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* 3:528–534. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00134-x](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00134-x)
29. Kim OK, Ohemeng K, Barrett JF (2001) Advances in DNA gyrase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 10:199–212. <https://doi.org/10.1517/13543784.10.2.199>
30. Levine C, Hiasa H, Marians KJ (1998) DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim Biophys Acta* 1400:29–43. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(98\)00126-2](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(98)00126-2)
31. Hooper DC, Jacoby GA (2016) Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6:a025320. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025320>
32. Drlica K (1999) Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol* 2:504–508. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00008-9)
33. Endtz HP, Ruijs GJ, van Klingeren B, Jansen WH, van der Reyden T, Mouton RP (1991) Quinolone resistance in campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J Antimicrob Chemother* 27:199–208. <https://doi.org/10.1093/jac/27.2.199>
34. Pallo-Zimmerman LM, Byron JK, Graves TK (2010) Fluoroquinolones: then and now. *Compend Contin Educ Vet* 32:E1-9; quiz E9
35. Collignon P, Powers JH, Chiller TM, Aidara-Kane A, Aarestrup FM (2009) World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing



risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 49:132–141. <https://doi.org/10.1086/599374>

36. Brar RK, Jyoti U, Patil RK, Patil HC (2020) Fluoroquinolone antibiotics: An overview. *Adesh Univ J Med Sci Res* 2:26–30. [https://doi.org/10.25259/AUJMSR\\_12\\_2020](https://doi.org/10.25259/AUJMSR_12_2020)
37. Piddock LJV (1999) Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance: An Update 1994–1998. *Drugs* 58:11–18. <https://doi.org/10.2165/00003495-199958002-00003>
38. Hooper DC (2003) Mechanisms of Quinolone Resistance. In: *Quinolone Antimicrobial Agents*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 41–67
39. Ito H, Yoshida H, Bogaki-Shonai M, Niga T, Hattori H, Nakamura S (1994) Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 38:2014–2023
40. Breines DM, Ouabdesselam S, Ng EY, Tankovic J, Shah S, Soussy CJ, Hooper DC (1997) Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* 41:175–179. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.1.175>
41. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S (1990) Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 34:1271–1272. <https://doi.org/10.1128/aac.34.6.1271>
42. Tanaka M, Sakuma S, Takahashi K, Nagahuzi T, Saika T, Kobayashi I, Kumazawa J (1998) Analysis of quinolone resistance mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae* isolates in vitro. *Sex Transm Infect* 74:59–62. <https://doi.org/10.1136/sti.74.1.59>
43. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA (1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet Lond Engl* 351:797–799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07322-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07322-4)
44. Burman LG (1977) Apparent absence of transferable resistance to nalidixic acid in pathogenic Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 3:509–516. <https://doi.org/10.1093/jac/3.5.509>
45. Courvalin P (1990) Plasmid-mediated 4-quinolone resistance: a real or apparent absence? *Antimicrob Agents Chemother* 34:681–684. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.5.681>
46. Strahilevitz J, Engelstein D, Adler A, Temper V, Moses AE, Block C, Robicsek A (2007) Changes in *qnr* prevalence and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. collected from 1990 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3001–3003. <https://doi.org/10.1128/AAC.00256-07>
47. Shao Y, Xiong Z, Li X, Hu L, Shen J, Li T, Hu F, Chen S (2011) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Citrobacter freundii* isolates from Anhui province, PR China. *J Med Microbiol* 60:1801–1805. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.034082-0>
48. Tran JH, Jacoby GA (2002) Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5638–5642. <https://doi.org/10.1073/pnas.082092899>
49. Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K, Ibe S, Sakae K (2005) Cloning of a Novel Gene for Quinolone Resistance from a Transferable Plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob Agents Chemother* 49:801–803. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.801-803.2005>
50. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC (2006) *qnrB*, Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1178–1182. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1178-1182.2006>
51. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM (2009) *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother* 53:603–608. <https://doi.org/10.1128/AAC.00997-08>

52. Fonseca EL, Vicente ACP (2013) Epidemiology of qnrVC alleles and emergence out of the Vibrionaceae family. *J Med Microbiol* 62:1628–1630. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.062661-0>
53. Rodríguez-Martínez JM, Pichardo C, García I, Pachón-Ibañez ME, Docobo-Pérez F, Pascual A, Pachón J, Martínez-Martínez L (2008) Activity of ciprofloxacin and levofloxacin in experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* deficient in porins, expressing active efflux and producing QnrA1. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 14:691–697. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02020.x>
54. Sánchez MB, Hernández A, Rodríguez-Martínez JM, Martínez-Martínez L, Martínez JL (2008) Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. *BMC Microbiol* 8:148. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-148>
55. Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Briales A, García I, Conejo MC, Pascual A (2008) Qnr-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother* 61:1240–1243. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn115>
56. Boulund F, Johnning A, Pereira MB, Larsson DJ, Kristiansson E (2012) A novel method to discover fluoroquinolone antibiotic resistance (qnr) genes in fragmented nucleotide sequences. *BMC Genomics* 13:695. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-695>
57. Poirel L, Liard A, Rodriguez-Martinez J-M, Nordmann P (2005) Vibrionaceae as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* 56:1118–1121. <https://doi.org/10.1093/jac/dki371>
58. Poirel L, Rodriguez-Martinez J-M, Mammeri H, Liard A, Nordmann P (2005) Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3523–3525. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3523-3525.2005>
59. Saga T, Sabtcheva S, Mitsutake K, Ishii Y, Tateda K, Yamaguchi K, Kaku M (2013) Characterization of qnrB-Like Genes in *Citrobacter* Species of the American Type Culture Collection. *Antimicrob Agents Chemother* 57:2863–2866. <https://doi.org/10.1128/aac.02396-12>
60. Hegde SS, Vetting MW, Roderick SL, Mitchenall LA, Maxwell A, Takiff HE, Blanchard JS (2005) A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* 308:1480–1483. <https://doi.org/10.1126/science.1110699>
61. Montero C, Mateu G, Rodriguez R, Takiff H (2001) Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3387–3392. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3387-3392.2001>
62. Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC (2003) Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2242–2248. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2242-2248.2003>
63. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC (2006) Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 12:83–88. <https://doi.org/10.1038/nm1347>
64. Ruiz E, Sáenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, Martínez-Martínez L, Arlet G, Torres C (2012) qnr, aac(6′)-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *J Antimicrob Chemother* 67:886–897. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr548>
65. de Toro M, Rojo-Bezares B, Vinué L, Undabeitia E, Torres C, Sáenz Y (2010) In vivo selection of aac(6′)-Ib-cr and mutations in the gyrA gene in a clinical qnrS1-positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104B strain recovered after fluoroquinolone treatment. *J Antimicrob Chemother* 65:1945–1949. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq262>

66. Warburg G, Korem M, Robicsek A, Engelstein D, Moses AE, Block C, Strahilevitz J (2009) Changes in aac(6′)-Ib-cr Prevalence and Fluoroquinolone Resistance in Nosocomial Isolates of *Escherichia coli* Collected from 1991 through 2005. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1268–1270. <https://doi.org/10.1128/AAC.01300-08>
67. Jung CM, Heinze TM, Strakosha R, Elkins CA, Sutherland JB (2009) Acetylation of fluoroquinolone antimicrobial agents by an *Escherichia coli* strain isolated from a municipal wastewater treatment plant. *J Appl Microbiol* 106:564–571. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04026.x>
68. Ruiz J, Pons MJ, Gomes C (2012) Transferable mechanisms of quinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents* 40:196–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.02.011>
69. Sørensen AH, Hansen LH, Johannesen E, Sørensen SJ (2003) Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox. *Antimicrob Agents Chemother* 47:798–799. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.798-799.2003>
70. Ho P-L, Ng K-Y, Lo W-U, Law PY, Lai EL-Y, Wang Y, Chow K-H (2015) Plasmid-Mediated OqxAB Is an Important Mechanism for Nitrofurantoin Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:537–543. <https://doi.org/10.1128/AAC.02156-15>
71. Hansen LH, Jensen LB, Sørensen HI, Sørensen SJ (2007) Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother* 60:145–147. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm167>
72. Zhao J, Chen Z, Chen S, Deng Y, Liu Y, Tian W, Huang X, Wu C, Sun Y, Sun Y, Zeng Z, Liu J-H (2010) Prevalence and Dissemination of oqxAB in *Escherichia coli* Isolates from Animals, Farmworkers, and the Environment. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4219–4224. <https://doi.org/10.1128/AAC.00139-10>
73. Périchon B, Courvalin P, Galimand M (2007) Transferable Resistance to Aminoglycosides by Methylation of G1405 in 16S rRNA and to Hydrophilic Fluoroquinolones by QepA-Mediated Efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 51:2464–2469. <https://doi.org/10.1128/AAC.00143-07>
74. Habeeb MA, Haque A, Iversen A, Giske CG (2014) Occurrence of virulence genes, 16S rRNA methylases, and plasmid-mediated quinolone resistance genes in CTX-M-producing *Escherichia coli* from Pakistan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 33:399–409. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1970-1>
75. Zhao L, Zhang J, Zheng B, Wei Z, Shen P, Li S, Li L, Xiao Y (2015) Molecular epidemiology and genetic diversity of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates from patients with community-onset infections in 30 Chinese county hospitals. *J Clin Microbiol* 53:766–770. <https://doi.org/10.1128/JCM.02594-14>
76. Nielsen P, Gyrd-Hansen N (1997) Bioavailability of Enrofloxacin after Oral Administration to Fed and Fasted Pigs. *Pharmacol Toxicol* 80:246–250. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1997.tb01967.x>
77. Vancutsem PM, Babish JG, Schwark WS (1990) The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Vet* 80:173–186
78. Steinman A, Britzi M, Levi O, Lavy E, Lichter A, Soback S (2006) Lack of effect of diet on the pharmacokinetics of enrofloxacin in horses. *J Vet Pharmacol Ther* 29:67–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2006.00717.x>
79. Coulet M, Morello C, Cox P, Lohuis J (2005) Pharmacokinetics of ibafloxacin in healthy cats. *J Vet Pharmacol Ther* 28:37–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00623.x>
80. Dautrey S, Felice K, Petiet A, Lacour B, Carbon C, Farinotti R (1999) Active intestinal elimination of ciprofloxacin in rats: modulation by different substrates. *Br J Pharmacol* 127:1728–1734. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702703>

81. Dautrey S, Felice K, Petiet A, Lacour B, Carbon C, Farinotti R (1999) Active intestinal elimination of ciprofloxacin in rats: modulation by different substrates. *Br J Pharmacol* 127:1728–1734. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702703>
82. Troughon T, Lefebvre S (2016) A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. *Open J Vet Med* 6:40–58. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2016.62006>
83. Cester CC, Toutain PL (1997) A Comprehensive Model for Enrofloxacin to Ciprofloxacin Transformation and Disposition in Dog. *J Pharm Sci* 86:1148–1155. <https://doi.org/10.1021/js9603461>
84. Ogino T, Mizuno Y, Ogata T, Takahashi Y (2005) Pharmacokinetic interactions of flunixin meglumine and enrofloxacin in dogs. *Am J Vet Res* 66:1209–1213. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.1209>
85. Wiuff C, Lykkesfeldt J, Aarestrup FM, Svendsen O (2002) Distribution of enrofloxacin in intestinal tissue and contents of healthy pigs after oral and intramuscular administrations. *J Vet Pharmacol Ther* 25:335–342. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2002.00430.x>
86. Hwang YH, Kim MS, Song IB, Lim JH, Park BK, Yun HI (2009) Altered pharmacokinetics of enrofloxacin in experimental models of hepatic and renal impairment. *Vet Res Commun* 33:481–487. <https://doi.org/10.1007/s11259-008-9195-y>
87. Idowu OR, Peggins JO, Cullison R, Bredow J von (2010) Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. *Res Vet Sci* 89:230–235. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.12.019>
88. Lopez-Cadenas C, Sierra-Vega M, Garcia-Vieitez JJ, Diez-Liebana MJ, Sahagun-Prieto A, Fernandez-Martinez N (2013) Enrofloxacin: Pharmacokinetics and Metabolism in Domestic Animal Species. *Curr Drug Metab* 14:1042–1058
89. Loayza F, Graham JP, Trueba G (2020) Factors Obscuring the Role of *E. coli* from Domestic Animals in the Global Antimicrobial Resistance Crisis: An Evidence-Based Review. *Int J Environ Res Public Health* 17:3061. <https://doi.org/10.3390/ijerph17093061>
90. Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL (2012) Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 25:682–707. <https://doi.org/10.1128/CMR.05035-11>
91. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J (2009) Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 48:1–12. <https://doi.org/10.1086/595011>
92. Nicolas-Chanoine M-H, Bertrand X, Madec J-Y (2014) *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev* 27:543–574. <https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>
93. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL (2011) *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother* 66:1–14. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq415>
94. Fadhil Abdul-Husin I, Sabri Abdul-Razzaq M (2021) Plasmid-Mediated Mechanism of Quinolone Resistance on *E. coli* Isolates from Different Clinical Samples. *Arch Razi Inst* 76:561–573. <https://doi.org/10.22092/ari.2021.355392.1679>
95. Pirko E, Ali M, Nateq I (2017) The Relationship between Phylogenic Typing and Antimicrobial Susceptibility Patterns for *Escherichia coli* Isolated from UTIs in Many Hospitals at Baghdad City. *Glob J Pharm Technol* 9:
96. Al-Hasnawy H, Jodi M, Hamza H (2018) Molecular characterization and sequence analysis of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum beta-lactamases producing uropathogenic *Escherichia coli* in Babylon Province, Iraq. *Rev Med Microbiol* 29:129–135. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000136>

97. Z Ď (2010) Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 59:.  
<https://doi.org/10.33549/physiolres.931844>
98. Rani A, Saini KC, Bast F, Mehariya S, Bhatia SK, Lavecchia R, Zuorro A (2021) Microorganisms: A Potential Source of Bioactive Molecules for Antioxidant Applications. *Mol Basel Switz* 26:1142.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26041142>
99. Ďuračková Z, Gvozdjaková A (2008) Oxidants, Antioxidants and Oxidative Stress. In: Gvozdjaková A (ed) *Mitochondrial Medicine: Mitochondrial Metabolism, Diseases, Diagnosis and Therapy*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 19–54
100. Ma Q (2013) Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53:401–426.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>
101. Scuderi SA, Ardizzone A, Paterniti I, Esposito E, Campolo M (2020) Antioxidant and Anti-inflammatory Effect of Nrf2 Inducer Dimethyl Fumarate in Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants* 9:630.  
<https://doi.org/10.3390/antiox9070630>
102. Baharoglu Z, Mazel D (2014) SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev* 38:1126–1145. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077>
103. Role of the SOS Response in the Generation of Antibiotic Resistance In Vivo | Antimicrobial Agents and Chemotherapy. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aac.00013-21>. Accessed 27 Oct 2023
104. Cirz RT, Chin JK, Andes DR, Crécy-Lagard V de, Craig WA, Romesberg FE (2005) Inhibition of Mutation and Combating the Evolution of Antibiotic Resistance. *PLOS Biol* 3:e176.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030176>
105. Drlica K, Zhao X (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:377–392. <https://doi.org/10.1128/mmbr.61.3.377-392.1997>
106. Vogelman B, Gudmundsson S, Leggett J, Turnidge J, Ebert S, Craig WA (1988) Correlation of Antimicrobial Pharmacokinetic Parameters with Therapeutic Efficacy in an Animal Model. *J Infect Dis* 158:831–847. <https://doi.org/10.1093/infdis/158.4.831>
107. Pham P, Rangarajan S, Woodgate R, Goodman MF (2001) Roles of DNA polymerases V and II in SOS-induced error-prone and error-free repair in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 98:8350–8354.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.111007198>
108. Pribis JP, García-Villada L, Zhai Y, Lewin-Epstein O, Wang AZ, Liu J, Xia J, Mei Q, Fitzgerald DM, Bos J, Austin RH, Herman C, Bates D, Hadany L, Hastings PJ, Rosenberg SM (2019) Gamblers: An Antibiotic-Induced Evolvable Cell Subpopulation Differentiated by Reactive-Oxygen-Induced General Stress Response. *Mol Cell* 74:785-800.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.037>
109. Morales-Gonzalez JA, Morales-González Á, Madrigal-Santillan EO (2016) A Master Regulator of Oxidative Stress The Transcription Factor Nrf2. *BoD – Books on Demand*
110. Bouayed J, Bohn T (NaN/NaN/NaN) Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxid Med Cell Longev* 3:228–237. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>
111. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 91 Spec No:179–194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>
112. Liu R, Xing L, Fu Q, Zhou G, Zhang W (2016) A Review of Antioxidant Peptides Derived from Meat Muscle and By-Products. *Antioxidants* 5:32. <https://doi.org/10.3390/antiox5030032>
113. Dinkova-Kostova AT, Talalay P (2008) Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52:S128–S138. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700195>

114. Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS (2019) Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur J Med Chem* 178:687–704. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>
115. Dezsi Ștefan, Bădărău AS, Bischin C, Vodnar DC, Silaghi-Dumitrescu R, Gheldiu A-M, Mocan A, Vlase L (2015) Antimicrobial and Antioxidant Activities and Phenolic Profile of *Eucalyptus globulus* Labill. and *Corymbia ficifolia* (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson Leaves. *Molecules* 20:4720–4734. <https://doi.org/10.3390/molecules20034720>
116. Tharun G, Pindi PK (2013) Evaluation of antioxidant potential and antimicrobial activity of successive extracts of *Pimpinella tirupatiensis*. *J Pharm Res* 7:817–822. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.08.025>
117. Chen H, Zhang M, Bhandari B, Yang C (2019) Novel pH-sensitive films containing curcumin and anthocyanins to monitor fish freshness. *Food Hydrocoll* 100:105438. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105438>
118. Zorofchian Moghadamtousi S, Abdul Kadir H, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K (2014) A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. *BioMed Res Int* 2014:e186864. <https://doi.org/10.1155/2014/186864>
119. Zheng D, Huang C, Huang H, Zhao Y, Khan MRU, Zhao H, Huang L (2020) Antibacterial Mechanism of Curcumin: A Review. *Chem Biodivers* 17:e2000171. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000171>
120. Izui S, Sekine S, Maeda K, Kuboniwa M, Takada A, Amano A, Nagata H (2016) Antibacterial Activity of Curcumin Against Periodontopathic Bacteria. *J Periodontol* 87:83–90. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.150260>
121. Packiavathy IASV, Priya S, Pandian SK, Ravi AV (2014) Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin – An anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chem* 148:453–460. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.002>
122. Recacha E, Machuca J, Díaz-Díaz S, García-Duque A, Ramos-Guelfo M, Docobo-Pérez F, Blázquez J, Pascual A, Rodríguez-Martínez JM (2019) Suppression of the SOS response modifies spatiotemporal evolution, post-antibiotic effect, bacterial fitness and biofilm formation in quinolone-resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 74:66–73. <https://doi.org/10.1093/jac/dky407>
123. Aggarwal BB, Sung B (2009) Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci* 30:85–94. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.11.002>
124. Barry J, Fritz M, Brender JR, Smith PES, Lee D-K, Ramamoorthy A (2009) Determining the effects of lipophilic drugs on membrane structure by solid-state NMR spectroscopy: the case of the antioxidant curcumin. *J Am Chem Soc* 131:4490–4498. <https://doi.org/10.1021/ja809217u>
125. Teow S-Y, Ali SA (2015) Synergistic antibacterial activity of Curcumin with antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Pak J Pharm Sci* 28:2109–2114
126. Marathe SA, Kumar R, Ajitkumar P, Nagaraja V, Chakravorty D (2013) Curcumin reduces the antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi*. *J Antimicrob Chemother* 68:139–152. <https://doi.org/10.1093/jac/dks375>
127. Saidu NEB, Kavian N, Leroy K, Jacob C, Nicco C, Batteux F, Alexandre J (2019) Dimethyl fumarate, a two-edged drug: Current status and future directions. *Med Res Rev* 39:1923–1952. <https://doi.org/10.1002/med.21567>
128. Wang H-H, Sun D-W, Kuang R (2001) Inhibition of *Escherichia coli* by dimethyl fumarate. *Int J Food Microbiol* 65:125–130. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00504-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00504-3)
129. Fischer C, Speth V, Fleig-Eberenz S, Neuhaus G (1997) Induction of Zygotic Polyembryos in Wheat: Influence of Auxin Polar Transport. *Plant Cell* 9:1767–1780. <https://doi.org/10.2307/3870523>

130. Yang D, Wang T, Long M, Li P (2020) Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine. *Oxid Med Cell Longev* 2020:8825387. <https://doi.org/10.1155/2020/8825387>
131. Qi W, Qi W, Xiong D, Long M (2022) Quercetin: Its Antioxidant Mechanism, Antibacterial Properties and Potential Application in Prevention and Control of Toxipathy. *Mol Basel Switz* 27:6545. <https://doi.org/10.3390/molecules27196545>
132. Ghosh N, Chakraborty T, Mallick S, Mana S, Singha D, Ghosh B, Roy S (2015) Synthesis, characterization and study of antioxidant activity of quercetin–magnesium complex. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 151:807–813. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.07.050>
133. Shu Y, Liu Y, Li L, Feng J, Lou B, Zhou X, Wu H (2011) Antibacterial activity of quercetin on oral infectious pathogens. *Afr J Microbiol Res* 5:5358–5361. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.849>
134. Anand David AV, Arulmoli R, Parasuraman S (2016) Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacogn Rev* 10:84–89. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>
135. Osonga FJ, Akgul A, Miller RM, Eshun GB, Yazgan I, Akgul A, Sadik OA (2019) Antimicrobial Activity of a New Class of Phosphorylated and Modified Flavonoids. *ACS Omega* 4:12865–12871. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00077>
136. Pal A, Tripathi A (2020) Demonstration of bactericidal and synergistic activity of quercetin with meropenem among pathogenic carbapenem resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Pathog* 143:104120. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104120>
137. Pal A, Tripathi A (2019) Quercetin potentiates meropenem activity among pathogenic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *J Appl Microbiol* 127:1038–1047. <https://doi.org/10.1111/jam.14388>
138. Nguyen TLA, Bhattacharya D (2022) Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle. *Molecules* 27:2494. <https://doi.org/10.3390/molecules27082494>
139. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC (1997) Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res* 152:239–246. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(97\)80034-1](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(97)80034-1)
140. Wang S, Yao J, Zhou B, Yang J, Chaudry MT, Wang M, Xiao F, Li Y, Yin W (2018) Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro. *J Food Prot* 81:68–78. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-214>
141. Cushnie TPT, Lamb AJ (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 26:343–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>
142. Ahmad A, Kaleem M, Ahmed Z, Shafiq H (2015) Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review. *Food Res Int* 77:221–235. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.021>
143. Zerín T, Kim Y-S, Hong S-Y, Song H-Y (2013) Quercetin reduces oxidative damage induced by paraquat via modulating expression of antioxidant genes in A549 cells. *J Appl Toxicol* 33:1460–1467. <https://doi.org/10.1002/jat.2812>
144. Chagas M do SS, Behrens MD, Moragas-Tellis CJ, Penedo GXM, Silva AR, Gonçalves-de-Albuquerque CF (2022) Flavonols and Flavones as Potential anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antibacterial Compounds. *Oxid Med Cell Longev* 2022:e9966750. <https://doi.org/10.1155/2022/9966750>
145. Vipin C, Saptami K, Fida F, Mujeeburahiman M, Rao SS, Athmika, Arun AB, Rekha PD (2020) Potential synergistic activity of quercetin with antibiotics against multidrug-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 15:e0241304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241304>

146. Tvrda E, Tušimová E, Kováčik A, Paál D, Libová E, Lukáč N (2016) Protective Effects of Quercetin on Selected Oxidative Biomarkers in Bovine Spermatozoa Subjected to Ferrous Ascorbate. *Reprod Domest Anim* 51:524–537. <https://doi.org/10.1111/rda.12714>
147. Ince D, Hooper DC (2003) Quinolone Resistance Due to Reduced Target Enzyme Expression. *J Bacteriol* 185:6883–6892. <https://doi.org/10.1128/JB.185.23.6883-6892.2003>
148. Ohemeng KA, Schwender CF, Fu KP, Barrett JF (1993) DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones(1). *Bioorg Med Chem Lett* 3:225–230. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80881-7](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80881-7)
149. Xiao Z-P, Wang X-D, Peng Z-Y, Huang S, Yang P, Li Q-S, Zhou L-H, Hu X-J, Wu L-J, Zhou Y, Zhu H-L (2012) Molecular docking, kinetics study, and structure-activity relationship analysis of quercetin and its analogous as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *J Agric Food Chem* 60:10572–10577. <https://doi.org/10.1021/jf303393n>
150. Alizadeh SR, Ebrahimzadeh MA (2022) Quercetin derivatives: Drug design, development, and biological activities, a review. *Eur J Med Chem* 229:114068. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.114068>
151. Stevenson I (1977) Factors influencing antipyrine elimination. *Br J Clin Pharmacol* 4:261–265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1977.tb00710.x>
152. Elattar KM, Fadda AA (2016) Chemistry of antipyrine. *Synth Commun* 46:1567–1594. <https://doi.org/10.1080/00397911.2016.1211703>
153. Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Díaz M j., Bringas P (1989) Effect of tiamulin on antipyrine kinetics in chickens. *J Vet Pharmacol Ther* 12:94–98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1989.tb00646.x>
154. Danhof M, de Groot-van der Vis E, Breimer DD (1979) Assay of antipyrine and its primary metabolites in plasma, saliva and urine by high-performance liquid chromatography and some preliminary results in man. *Pharmacology* 18:210–223. <https://doi.org/10.1159/000137254>
155. Tan KKC, Allwood MC, Shawket S (1990) Effect of Ciprofloxacin on the Pharmacokinetics of Antipyrine in Healthy Volunteers. *J Clin Pharm Ther* 15:151–154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.1990.tb00370.x>
156. Ludwig E, Székely É, Csiba A, Graber H (1988) The effect of ciprofloxacin on antipyrine metabolism. *J Antimicrob Chemother* 22:61–67. <https://doi.org/10.1093/jac/22.1.61>
157. Watanabe T, Tahara M, Todo S (2008) The novel antioxidant edaravone: from bench to bedside. *Cardiovasc Ther* 26:101–114. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3466.2008.00041.x>
158. Yamamoto T, Yuki S, Watanabe T, Mitsuka M, Saito KI, Kogure K (1997) Delayed neuronal death prevented by inhibition of increased hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia. *Brain Res* 762:240–242. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00490-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00490-3)
159. Amekura S, Shiozawa K, Kiryu C, Yamamoto Y, Fujisawa A (2022) Edaravone, a scavenger for multiple reactive oxygen species, reacts with singlet oxygen to yield 2-oxo-3-(phenylhydrazono)-butanoic acid. *J Clin Biochem Nutr* 70:240–247. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.21-133>
160. Parikh A, Kathawala K, Tan CC, Garg S, Zhou X-F (2016) Development of a novel oral delivery system of edaravone for enhancing bioavailability. *Int J Pharm* 515:490–500. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.10.052>
161. Ortiz de la Rosa JM, Nordmann P, Poirel L (2021) Antioxidant Molecules as a Source of Mitigation of Antibiotic Resistance Gene Dissemination. *Antimicrob Agents Chemother* 65:e02658-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.02658-20>
162. Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ (2010) Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. *Mol Cell* 37:311–320. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.003>



163. Minnelli C, Laudadio E, Galeazzi R, Rusciano D, Armeni T, Stipa P, Cantarini M, Mobbili G (2019) Synthesis, Characterization and Antioxidant Properties of a New Lipophilic Derivative of Edaravone. *Antioxidants* 8:258. <https://doi.org/10.3390/antiox8080258>
164. Viso E, Rodriguez-Ares MT, Gude F (2009) Prevalence of and associated factors for dry eye in a Spanish adult population (the Salnes Eye Study). *Ophthalmic Epidemiol* 16:15–21. <https://doi.org/10.1080/09286580802228509>
165. Masuda T, Shimazawa M, Hara H (2017) Retinal Diseases Associated with Oxidative Stress and the Effects of a Free Radical Scavenger (Edaravone). *Oxid Med Cell Longev* 2017:9208489. <https://doi.org/10.1155/2017/9208489>
166. Í G (2020) Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol* 94:. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
167. Sirivibulkovit K, Nouanthavong S, Sameenoi Y (2018) Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Anal Sci* 34:795–800. <https://doi.org/10.2116/analsci.18P014>
168. Apak R (2019) Current Issues in Antioxidant Measurement. *J Agric Food Chem* 67:9187–9202. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03657>
169. Wang L-F, Zhang H-Y (2003) A theoretical investigation on DPPH radical-Scavenging mechanism of edaravone. *Bioorg Med Chem Lett* 13:3789–3792. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.07.016>
170. Tokumaru O, Shuto Y, Ogata K, Kamibayashi M, Bacal K, Takei H, Yokoi I, Kitano T (2018) Dose-dependency of multiple free radical-scavenging activity of edaravone. *J Surg Res* 228:147–153. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.03.020>
171. Chittasupho C, Manthaisong A, Okonogi S, Tadtong S, Samee W (2022) Effects of Quercetin and Curcumin Combination on Antibacterial, Antioxidant, In Vitro Wound Healing and Migration of Human Dermal Fibroblast Cells. *Int J Mol Sci* 23:142. <https://doi.org/10.3390/ijms23010142>
172. Vdovychenko YP, Loskutov OA, Halushko OA, Trishchynska MA, Dziuba DO, Povietkina TM, Vitiuk AD (2021) ACUTE ISCHEMIC STROKE IN WOMEN: EFFICACY OF THE FREE RADICAL SCAVENGER EDARAVONE. *Wiadomosci Lek Wars Pol* 1960 74:72–76
173. Tang S-M, Deng X-T, Zhou J, Li Q-P, Ge X-X, Miao L (2020) Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 121:109604. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109604>
174. Kim S-J, Kim G-H (2006) Quantification of Quercetin in Different Parts of Onion and Its DPPH Radical Scavenging and Antibacterial Activity. *Food Sci Biotechnol* 15:39–43
175. Li M, Xu Z (2008) Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. *Arch Pharm Res* 31:640–644. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1206-5>

## **11 Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom Dr. Móritz Alma Virág és Dr. Farkas Orsolya témavezetőimnek, hogy részt vehettem a tudományos munkában. Hálás vagyok a lelkes oktatásért, motivációért és a munkában való segítségért.

További köszönet illeti Dr. Kovács Dórát és Dr. Kerek Ádámot a tudományos munkában való segítségért.

Valamint köszönöm Dr. Jerzsele Ákosnak a szívélyes fogadtatást a Gyógyszertani és Méregtani Tanszéken. Hálás vagyok a tanszék valamennyi munkatársának a segítségéért.



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: Autal Mónika

Neptun-kódja: Q50C13

A témavezető neve és beosztása: Dr. Faruk Özye t. pu., Dr. Mohin Palme Viraj PhD. hallg.

Tanszék: Cytopatológiai és Mikrobiológiai Tanszék

A diplomadolgozat címe: Antibiotikus rezisztencia kialakulásáért felelős genetikai mutációk vizsgálata

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	03	13	Témamegbeszélés	
2.	2023	03	14	Passzív labor vizsgálat	
3.	2023	04	03	Passzív labor vizsgálat	
4.	2023	04	04	Passzív labor vizsgálat	
5.	2023	04	10	MEGA plek	

Érdemjegy az első félév végén: jeles (5)

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	09	19	DPPH mutató	
2.	2023	09	26	ROS eredmény értékelés	
3.	2023	10	09	MEGA plek értékelés	
4.	2023	10	17	Konzultáció dolgozat	
5.	2023	10	27	Konzultáció dolgozat	

Érdemjegy a második félév végén: jeles (5)

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védeésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: *Atal Jóni*

*[Signature]*  
témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása: *[Signature]* Átvétel dátuma: *2023.06.26.*