

# MEHANIZMI RAZVOJA BAKTERIJSKE ODPORNOSTI PROTI ANTIBIOTIKOM

## UNDERSTANDING THE MECHANISMS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE

AVTOR / AUTHOR:

Doc. dr. Nace Zidar, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Katedra za farmacevtsko kemijo,  
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: nace.zidar@ffa.uni-lj.si

## 1 UVOD

Odkritje antibiotikov je v številnih pogledih spremenilo sodobno medicino in velja za enega največjih znanstvenih dosežkov vseh časov (1). V prvih desetletjih po odkritju penicilina so zaradi intenzivnih raziskav odkrili večino strukturnih razredov protibakterijskih učinkovin, ki so v uporabi še da-

## POVZETEK

Hitro širjenje bakterijske odpornosti proti uveljavljenim antibiotikom predstavlja eno izmed največjih groženj za javno zdravje. Vzroki za pomanjkanje učinkovitih antibiotikov na trgu so v veliki meri povezani z njihovo neustrezno uporabo in manjšim številom novih odobrenih učinkovin. Bakterije lahko odpornost proti antibiotikom razvijejo na dva načina, z mutacijo genov, ki so povezani z delovanjem antibiotika, ali s privzemom tuje DNA, ki vsebuje zapis za gene, odgovorne za razvoj odpornosti. Obstaja več mehanizmov za razvoj odpornosti, med katere spadajo otežen dostop antibiotika do tarče, sprememba strukture tarče ali neposredna sprememba strukture antibiotika. Poznavanje teh mehanizmov je ključnega pomena za načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin, pri uporabi katerih bi bil razvoj odpornosti manj verjeten. Zaradi splošne uveljavljenosti izraz antibiotik v članku uporabljamo kot sopomenko za protibakterijsko učinkovino.

## KLJUČNE BESEDE:

antibiotik, bakterijska odpornost, izlivna črpalka, mutacija, protibakterijska učinkovina,

## ABSTRACT

Occurrence of resistance of the most prevalent bacterial pathogens to antibiotics is one of the major threats to public health. The main reasons for the lack of effective antibiotics have been the misuse of those agents and the unavailability of newer drugs. Bacteria adapt to antibiotics using two main strategies: with mutations of genes that are associated with the action of antibiotics or with the acquisition of foreign DNA coding for such genes. There are several mechanisms for the development of antibiotic resistance, which include prevention of access to drug targets, changes in the structure of antibiotic targets and direct modification of antibiotic structures. It is important to understand these mechanisms in order to successfully design new antibacterial drugs with a lower probability for resistance development. Because the terms have become interchangeable, for the purpose of this article, the term antibiotic is used as a synonym for an antibacterial drug.

## KEY WORDS:

antibacterial drug, antibiotic, bacterial resistance, efflux pump, mutation



nes, kot so cefalosporini, makrolidi, tetraciklini, aminoglikozidi, glikopeptidi in kloramfenikol (2). V 60. letih prejšnjega stoletja je veljalo prepričanje, da lahko večino nalezljivih bolezni nadzorujemo z obstoječimi učinkovinami in da zato razvoj novih protibakterijskih učinkovin ni več potreben. Množična uporaba antibiotikov je v nadaljnjih letih povzročila razvoj bakterijskih sevov, ki izkazujejo odpornost proti posameznim ali več različnim antibiotikom, t. i. multirezistentnih (MDR, *multidrug-resistant*) in zelo rezistentnih (XDR, *extensively drug-resistant*) bakterijskih sevov. Med najbolj problematične odporne patogene bakterije spadajo npr. na meticilin odporen *Staphylococcus aureus* (MRSA), na vankomicin odporni enterokoki (VRE) (3) in nekatere po Gramu negativne bakterije, ki so odporne proti večini antibiotikov, npr. *Pseudomonas aeruginosa* (4), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* in *Escherichia coli* (5, 6). Zaradi okužb s proti antibiotikom odpornimi bakterijami umre na leto okoli 700.000 ljudi (7). Svetovna zdravstvena organizacija (WHO, *World Health Organisation*) je označila bakterijsko odpornost za eno izmed treh največjih groženj za javno zdravje v 21. stoletju (8). Na hiter razvoj bakterijske odpornosti v veliki meri vplivajo neustrezno in prekomerno predpisovanje antibiotikov, njihovo nepravilno jemanje s strani pacientov in uporaba v preventivne namene v veterini. Z množično uporabo antibiotikov izvajamo selekcijski pritisk, ki pospešuje nastanek oz. rast odpornih bakterijskih sevov. Na hitrost nastanka odpornosti vpliva več dejavnikov, kot so velikost bakterijske populacije, stabilnost in sestava okolja, prilagojenost bakterij na okolje in pomen mutacije za preživetje bakterij (9, 10).

## 2 NARAVNA IN PRIDOBLENA ODPORNOST

Bakterije so naravno odporne proti antibiotikom ali pa odpornost pridobijo preko mutacij v genih ali s horizontalnim prenosom genov. Naravna odpornost določenih bakterijskih sevov proti antibiotikom je posledica njihove značilne zgradbe ali fizioloških funkcij. Primer je naravna odpornost nekaterih po Gramu negativnih bakterij proti učinkovinam, ki ne morejo prehajati zunanje membrane teh bakterij. To je značilno npr. za glikopeptidni antibiotik vankomicin, ki je aktiven le na po Gramu pozitivne bakterije (11). K naravni odpornosti številnih po Gramu negativnih bakterij pripomorejo tudi izlivne črpalke, ki številne antibiotike aktivno črpajo iz bakterijskih celic.

Pridobljena odpornost je značilna le za nekatere seve znotraj vrste ali rodu in nastane zaradi mutacij v genih za tarčo antibiotika ali zaradi prenosa genetske informacije med bakterijami s plazmidi (krajšimi krožnimi izvenkromosomskimi segmenti DNA) ali transpozoni (odseki DNA, ki se s transpozicijo prenašajo z enega dela kromosomske DNA na drugega ali s kromosomske DNA na plazmid). Za razvoj odpornosti je navadno potrebnih več točkovnih mutacij, njihova pogostost pa se ob izpostavljenosti antibiotikom poveča. Bolj razširjena kot točkovne mutacije je odpornost, ki nastane zaradi vertikalnega prenosa genov preko bakterijskega kromosoma iz generacije v generacijo ali s horizontalnim prenosom dednega materiala med bakterijami. Plazmidi se lahko med bakterijami prenašajo skozi cevasto tvorbo, imenovano pilus, čemur pravimo konjugacija. Drugi možen način za prenos dednega materiala med bakterijami je transdukcija, tj. prenos DNA preko bakteriofagnega vektorja. Bakterije lahko v svoj genom vključijo tudi golo DNA iz okolice, kar imenujemo transformacija (12). Dobro razvita sposobnost izmenjevanja dednega materiala v kombinaciji z izjemno hitrim razmnoževanjem bakterijam omogoča, da se zanje ugodne spremembe v populaciji zelo hitro razširijo.

## 3 MEHANIZMI RAZVOJA BAKTERIJSKE ODPORNOSTI

Ločimo štiri glavne mehanizme, po katerih bakterije razvijejo odpornost proti protibakterijskim učinkovinam: zmanjšanje prepustnosti zunanje bakterijske membrane, aktivno črpanje antibiotikov iz bakterijske celice s pomočjo izlivnih črpalk, sprememba tarčnega mesta za antibiotik in razvoj encimov, ki razgradijo ali spremenijo strukturo antibiotika.

### 3.1. ZMANJŠANJE PREPUSTNOSTI ZUNANJE BAKTERIJSKE MEMBRANE

Številni antibiotiki, ki jih uporabljamo v kliniki, delujejo na tarče, ki se nahajajo v notranjosti bakterijske celice, zaradi česar morajo učinkovine najprej preiti skozi bakterijsko ovojnico. Zaradi kompleksne zgradbe njihove zunanje membrane so po Gramu negativne bakterije in mikobakterije naravno odporne proti številnim antibiotikom. Zunanja membrana teh bakterij deluje kot zaščita pred vdorom zanje toksičnih snovi iz okolice, med katere spadajo tudi antibiotiki.

Primer antibiotika, ki ni učinkovit proti po Gramu negativnim bakterijam zaradi nezmožnosti prehajanja zunanje membrane, je glikopeptid vankomicin. Nekatere majhne hidrofile molekule lahko prehajajo v celico po Gramu negativnih bakterij s prosto difuzijo skozi z vodo napolnjene kanale, imenovane porini. Med takšne spojine uvrščamo  $\beta$ -laktamske antibiotike, tetracikline in nekatere fluorokinolone. Bakterije lahko omejijo prehajanje teh antibiotikov v celico s spremembo nivoja izražanja porinov ali z mutacijami v genih za porine (13). Primer odpornosti, ki nastane zaradi spremenjenega izražanja porinov, je odpornost bakterije *K. pneumoniae* proti  $\beta$ -laktamskim antibiotikom. Primerjava bakterijskih sevov pred terapijo z  $\beta$ -laktamskimi antibiotiki in po njej je pokazala, da je po terapiji prišlo do povečanega izražanja porinov, ki so imeli manjšo velikost por, zaradi česar so bakterije postale manj dovzetne za antibiotike (14).

### 3.2. AKTIVNO ČRPANJE ANTIBIOTIKOV IZ BAKTERIJSKE CELICE

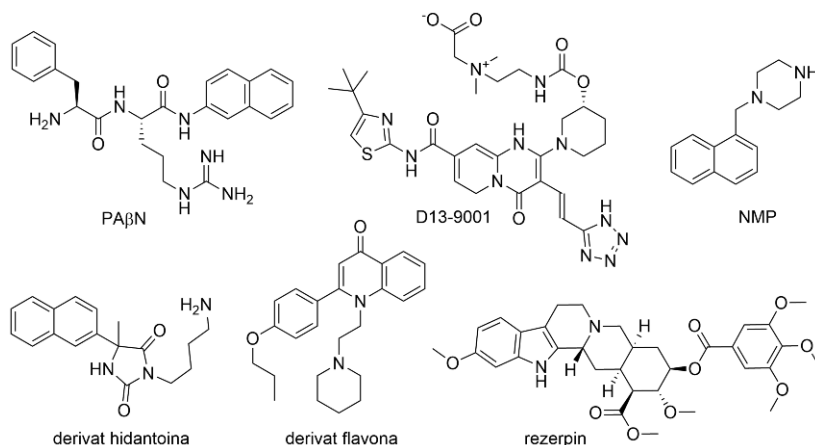
Antibiotike lahko bakterijske celice aktivno odstranjujejo s pomočjo izlivnih črpalk (15, 16). Ta mehanizem odpornosti je bolj izražen pri po Gramu negativnih bakterijah, vendar je značilen tudi za nekatere po Gramu pozitivne bakterije. Kot vir energije izlivne črpalke uporabljajo energijo, ki jo dobijo iz gradienta ionov – najpogosteje protonov ali natrijevih ionov – oz. s pomočjo hidrolize ATP. Nekatere izlivne črpalke so delno specifične za določen substrat, številne pa prenašajo strukturno različne spojine. Geni za izlivne črpalke so lahko del bakterijskega kromosoma ali pa se med bakterijami prenašajo s plazmidi, zaradi česar se odpornost med bakterijami hitro širi.

Eden izmed najbolj raziskanih predstavnikov izlivnih črpalk je sistem AcrAB-TolC, ki ga najdemo v bakteriji *E. coli* (17, 18). S to črpalko bakterije aktivno odstranjujejo številne antibiotike, barvila, površinsko aktivne snovi in težke kovine. Črpalčka je zgrajena iz kanala skozi zunanjo membrano, imenovanega TolC, sekundarnega transporterja, ki se nahaja v citoplazemski membrani, imenovanega AcrB, in dela, imenovanega AcrA, ki povezuje oba integralna membranska proteina in se nahaja v periplazemskem prostoru. S pomočjo izlivne črpalke AcrAB-TolC bakterije odstranjujejo številne kemijsko nesorodne snovi, kar lahko privede do odpornosti proti širokemu spektru različnih antibiotikov (19). Poleg črpalke AcrAB-TolC vsebuje bakterija *E. coli* tudi druge skupine izlivnih črpalk, ki so odgovorne za črpanje številnih ksenobiotikov (20). Aktivno črpanje antibiotikov iz bakterijskih celic s pomočjo izlivnih črpalk predstavlja enega izmed največjih izzivov pri načrtovanju

novih protibakterijskih učinkovin z aktivnostjo na po Gramu negativne bakterije (21). V zadnjih letih smo dosegli velik napredek pri razumevanju strukture in funkcije izlivnih črpalk (22), kar bi v prihodnosti lahko uporabili za načrtovanje spojin, ki ne bodo substrati za te črpalke. Možen je tudi razvoj učinkovin, ki bi vplivale na manjše izražanje izlivnih črpalk, ali spojin, ki bi zavrle delovanje izlivnih črpalk (23).

#### 3.2.1. Zaviralci izlivnih črpalk

Zaviralci izlivnih črpalk lahko povečajo učinkovitost tistih antibiotikov, ki so dobri substrati za te črpalke (24). Obstaja več načinov, kako lahko zavremo delovanje izlivnih črpalk. Eden je, da prekinemo vir energije za črpanje, tako da onemogočimo nastanek elektrokemičnega protonskega gradienta, ki je potreben za proizvodnjo ATP (25, 26). Drugi način zaviranja izlivnih črpalk je priprava spojin, ki so dobri substrati za izlivne črpalke in zaradi tega tekmujejo za vezavo z antibiotikom (27). Med najbolj poznane zaviralce s tem mehanizmom delovanja spada dipeptid fenilalanin-arginin  $\beta$ -naftilamid (PA $\beta$ N) (slika 1) (28, 29). Zaradi toksičnosti PA $\beta$ N in njegovih derivatov ti niso uporabni v terapiji (30). Poleg PA $\beta$ N so razvili tudi druge zaviralce izlivnih črpalk, kot so piridopirimidini in arilpiperazini (31). Predstavnik piridopirimidinov je spojina D13-9001 (slika 1), ki se je izkazala kot specifičen zaviralec izlivne črpalke MexAB-OprM iz bakterije *P. aeruginosa* (32), medtem ko je najaktivnejši zaviralec med arilpiperazini 1-(1-naftilmetil)-piperazin (NMP) (slika 1) (33). Pred kratkim so razvili tudi derivate hidantoina (slika 1) z zaviralnim delovanjem na črpalko AcrAB-TolC iz bakterije *Enterobacter aerogenes*, ki so ob hkratni uporabi izboljšali protibakterijsko delovanje nalidiksne kisline in klo-ramfenikola (34). Širok nabor spojin, ki služijo za razvoj učinkovin z delovanjem na izlivne črpalke, je rastlinskega izvora, kamor spadajo glikozidi, flavoni, izoflavoni in kempferol ramnozid. Primer flavonskega derivata, ki izkazuje delovanje na izlivno črpalko NorA iz bakterije *S. aureus*, je prikazan na sliki 1 (35). Zaviralno delovanje na izlivne črpalke so dokazali tudi za rezepin (slika 1), alkaloid iz rauwolfije (*Rauwolfia serpentina*), ki pa je nevrotoksičen in zato ni primeren za terapevtsko uporabo (36). Kljub številnim raziskavam na tem področju trenutno v klinični praksi ni nobenega zaviralca bakterijskih izlivnih črpalk. Opisane spojine, ki so v različnih raziskovalnih fazah, predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnji razvoj učinkovitejših zaviralcev. Poleg izboljšanja njihovega delovanja na izlivne črpalke bo potrebno izboljšati tudi njihove farmakokinetične lastnosti in zmanjšati njihovo toksičnost (37).



Slika 1: Strukture zaviralcev izlivnih črpalk: fenilalanin-arginin β-naftilamid (PAβN), piridopirimidin D13-9001, arilpiperazin NMP, derivat hidantoina, derivat flavona in rezerpin.

Figure 1: Structures of efflux pump inhibitors: phenylalanine-arginine β-naphthylamide (PAβN), pyridopyrimidine D13-9001, arylpiperazine NMP, hydantoin derivative, flavone derivative and reserpine.

### 3.3. SPREMEMBA TARČNEGA MESTA

Odpornost proti antibiotikom se lahko razvije s spremembo strukture tarče, pri čemer se zmanjša njena afiniteta do antibiotika, ne spremeni pa se njena osnovna funkcija. Za razvoj te vrste odpornosti je pogosto dovolj, da pride do mutacije le enega izmed aminokislinskih ostankov v vezavnem mestu za antibiotik. Ta vrsta odpornosti se lahko med bakterijami prenaša s transformacijo, tj. s privzemom gena za protein, ki je homologen osnovni tarči, vendar ni občutljiv na antibiotik. Primer je odpornost, ki nastane s privzemom gena, ki kodira penicilinvezoči protein PBP2a, ki ni občutljiv na β-laktamaze (38). Do razvoja odpornosti lahko pride tudi z mutacijo na mestu encima, ki ni neposredno udeležen pri vezavi antibiotika, vendar se na ta način spremeni konformacija proteina ali dinamika vezave antibiotika.

Poznamo tudi odpornost, za katero ni potrebna mutacija gena, ki kodira tarčni protein, ampak se tarčno mesto spremeni z encimsko modifikacijo, ki zmanjša afiniteto tarče do antibiotika. Primer takšne odpornosti je metiliranje ribosomske RNA s pomočjo metiltransferaz, ki lahko preprečijo vezavo makrolidov, linkozaminov in streptograminov na bakterijski ribosom (39). Podoben mehanizem odpornosti so odkrili tudi za kloramfenikol, klindamicin, oksazolidinon in aminoglikozide (40). Geni za encime, ki modificirajo tarčna mesta antibiotikov, se med bakterijami pogosto prenašajo s konjugacijo (41).

Fluorokinoloni so protibakterijske učinkovine, ki se vežejo na kompleks med molekulo DNA in DNA-girazo ali topoizomerozo IV in preprečijo uvedbo ali odstranitev dodatnega

zvitja v molekulo DNA. Odpornost proti fluorokinolonom se lahko razvije na več načinov: s pomočjo mutacij tarčnih proteinov, s povečanim izražanjem izlivnih črpalk ali s tvorbo proteinov iz skupine PRP (*pentapeptide repeat protein*) (42). Proteini PRP se predvidoma vežejo na kompleks med DNA in encimom in povzročijo disociacijo vezane učinkovine, kar omogoči, da topoizomeroza dokonča svojo običajno funkcijo (43).

Do spremembe tarče lahko pride tudi pri uporabi polimik-sinskih antibiotikov, med katere spada kolistin. Polimik-sinski antibiotiki so zgrajeni iz cikličnega peptida, na katerega je pritrjena dolga, hidrofobna veriga. Mehanizem njihovega delovanja je vezava na lipopolisaharide (LPS) v celični membrani po Gramu negativnih bakterij, s čimer motijo funkcijo membran. Odpornost proti polimik-sinskim antibiotikom se lahko razvije s kemijsko spremembo LPS, npr. s povečanim izražanjem proteina, ki kemijsko modificira del LPS z vezavo fosfoetanolamina na lipid A. Ker se pri tem zmanjša negativni naboj LPS, je vezava antibiotikov šibkejša (44).

Glikopeptid vankomicin zavre sintezo bakterijske celične stene tako, da se veže na terminalno skupino prekurzorja v sintezi peptidoglikana, zgrajeno iz dveh aminokislin D-alanina (D-Ala-D-Ala). Odpornost proti vankomicinu se razvije tako, da se spremeni topologija vezavnega mesta za vankomicin, zaradi spremembe terminalnega dipeptida iz D-Ala-D-Ala v D-alanil-D-laktat (D-Ala-D-Lac) ali D-alanil-D-serin (D-Ala-D-Ser). S tem se afiniteta do vankomicina močno zmanjša (45).

Bakterije lahko odpornost razvijejo tudi tako, da popolnoma zaobidejo določeno tarčo z razvojem novega encima ali

privzemom gena za encim, ki lahko opravi podobno biokemijsko vlogo, vendar ni tarča za antibiotik. Primer takšne odpornosti je odpornost bakterije *S. aureus* proti  $\beta$ -laktamskemu antibiotiku meticilinu zaradi privzema tujega gena za penicilin vezoči protein (PBP), ki ima nizko afiniteto do  $\beta$ -laktamskih antibiotikov (46).

### 3.4. RAZGRADNJA ALI SPREMEMBA STRUKTURE ANTIBIOTIKA

Najbolj znan primer encimov, ki razgrajujejo antibiotike, so  $\beta$ -laktamaze, ki so jih odkrili že leta 1940 (47).  $\beta$ -Laktamaze so encimi, ki hidrolizirajo  $\beta$ -laktamski obroč antibiotikov, kot so penicilini, cefalosporini in cefamicini, pri čemer se obroč odpre, antibiotiki pa izgubijo svojo aktivnost. Glede na strukturno podobnost ločimo štiri razrede  $\beta$ -laktamaz. Razredi A, C in D imajo v aktivnem mestu serin, ki kot nukleofil odpre  $\beta$ -laktamski obroč antibiotika, razred B pa ima v aktivnem mestu encima ione  $Zn^{2+}$  (48). Sprva so bile  $\beta$ -laktamaze aktivne le na omejenem naboru antibiotikov, z leti pa so se razvile  $\beta$ -laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL, *extended spectrum  $\beta$ -laktamases*) (49). Skupina  $\beta$ -laktamskih antibiotikov, imenovana karbapenemi, je bila sprva na  $\beta$ -laktamaze razmeroma odporna, kasneje pa so se razvili encimi, ki so sposobni cepiti tudi karbapeneme, imenovani karbapenemaze (50). Odpornost proti  $\beta$ -laktamskim antibiotikom se je s pomočjo plazmidov in vertikalnega prenosa genov z leti hitro širila in danes predstavlja velik klinični problem. Ena izmed možnih rešitev je sočasna uporaba zaviralcev  $\beta$ -laktamaz, kot so klavulanska kislina, sulbaktam in tazobaktam. Poleg  $\beta$ -laktamaz obstajajo tudi drugi encimi, ki razgrajujejo npr. aminoglikozide, kloramfenikol in makrolide (11). Primer takšnih encimov so esterase, ki hidrolizirajo makrolidne antibiotike, ali epoksidaze, ki povzročijo odpiranje epoksidnega obroča v fosfomicinu (51).

Poleg razgradnje antibiotika se lahko odpornost razvije tudi s spremembo kemijske strukture antibiotika. Do tega lahko pride npr. z uvedbo acilne, fosfatne ali nukleotidilne skupine na antibiotik (52). Uvedba teh skupin zaradi steričnih ovir oteži vezavo antibiotika na njegovo tarčo. Med antibiotike, ki so najbolj dovzetni za kemijsko spremembo, spadajo aminoglikozidi, ker vsebujejo veliko prostih hidrosilnih inaminskih skupin. Obstajajo tri glavne skupine encimov, ki modificirajo strukturo aminoglikozidov: acetiltransferaze, fosfotransferaze in nukleotidiltransferaze (53). Primer antibiotika, ki ga bakterije lahko encimatsko spremenijo, je tudi kloramfenikol. Odpornost proti kloramfenikolu se lahko razvije s proizvodnjo acetiltransferaz imenovanih CAT (klo-

ramfenikol-acetiltransferaze), ki jih proizvajajo tako po Gramu pozitivne kot po Gramu negativne bakterije. Poznamo tudi inaktivacijo antibiotika zaradi oksidacije, kar se zgodi npr. z oksidacijo tetraciklinskega antibiotika s pomočjo encima TetX (54).

## 4 SKLEP

Pojav in širjenje odpornosti proti antibiotikom je neizbežen pojav, povezan z množično rabo te skupine učinkovin. Problem bakterijske odpornosti poznamo že zelo dolgo, vendar se je razumevanje mehanizmov njenega nastanka v zadnjih letih močno povečalo. K temu so pomembno prispevali napredek genomike ter sistemske in strukturne biologije. Dobro poznavanje molekularnih mehanizmov razvoja odpornosti bo v prihodnje ključno za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. S trenutnimi tehnologijami lahko že v zgodnjih stopnjah razvoja novih učinkovin ocenimo verjetnost za razvoj odpornosti in kakšen bo njen mehanizem. To znanje lahko nato uporabimo za načrtovanje učinkovin, pri katerih bo verjetnost razvoja odpornosti manjša. K razvoju tega področja bodo pomembno prispevale metode strukturno podprtega načrtovanja. Strukture izlivnih črpalk z vezanimi substrati in zaviralci nam bodo omogočile načrtovanje novih učinkovin, ki bodo imele manjšo afiniteto do teh črpalk, ali pa zaviralcev, ki bodo bolj učinkovito zavirali njihovo delovanje. Za uspešen boj proti bakterijskim okužbam bo v prihodnje ključna kombinacija več različnih pristopov, od razvoja novih učinkovin, bolj premišljene uporabe antibiotikov v zdravstvu in živinoreji, do večjega zavedanja pomena varstva okolja.

## 5 LITERATURA

1. Davies J, Davies D. *Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(3):417-33.
2. Lederberg J. *Infectious history. Science.* 2000;288(5464):287-93.
3. Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC. *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in the United States, 2002–2006. Clin Infect Dis.* 2008;46(5):668-74.
4. Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect.* 2007;13(6):560-78.



5. Falagas ME, Bliziotis IA. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Internat J Antimicrob Agents*. 2007;29(6):630-6.
6. Slama TG. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Critical Care*. 2008;12.
7. Tagliabue A, Rappuoli R. Changing priorities in vaccinology: antibiotic resistance moving to the top. *Front Immunol*. 2018;9:1068.
8. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. World Health Organization 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancerepor t/en/>
9. de Visser JAGM. The fate of microbial mutators. *Microbiology*. 2002; 148:1247-52.
10. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2).
11. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Rev Microbiol*. 2015;13(1):42-51.
12. Gubina M, Ihan A. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. *Medicinski razgledi: Ljubljana* 2002; 3-56, 137-158, 427-446.
13. Tamber S, Hancock REW. On the mechanism of solute uptake in *Pseudomonas*. *Front Biosci*. 2003;8:S472-83.
14. Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P, Pagès JM. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *J Clin Microbiol*. 2004;42(6):2701-6.
15. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(10):1486-513.
16. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;453(2):254-67.
17. Fraick JA. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1996;178(19):5803-5.
18. Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(8):629-36.
19. Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, et al. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*. 2014;509(7501):512-5.
20. Davis TD, Gerry CJ, Tan DS. General platform for systematic quantitative evaluation of small-molecule permeability in bacteria. *ACS Chem Biol*. 2014;9(11):2535-44.
21. Silver LL. Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(1):71-109.
22. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Matsumoto T, Yamaguchi A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature*. 2006;443(7108):173-9.
23. Zalucki YM, Dhulipala V, Shafer WM. Dueling regulatory properties of a transcriptional activator (MtrA) and repressor (MtrR) that control efflux pump gene expression in *Neisseria gonorrhoeae*. *MBio*. 2012;3(6).
24. Pages JM, Masi M, Barbe J. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends Mol Med*. 2005;11(8):382-9.
25. Zhang Z, Liu ZQ, Zheng PY, Tang FA, Yang PC. Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*. 2010;16(10):1279-84.
26. Olivares J, Bernardini A, Garcia-Leon G, Corona F, B Sanchez M, Martinez JL. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front Microbiol*. 2013;4:103.
27. Masi M, Refregiers M, Pos KM, Pages JM. Mechanisms of envelope permeability and antibiotic influx and efflux in Gram-negative bacteria. *Nat Microbiol*. 2017;2:17001.
28. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(1):105-16.
29. Sanchez P, Le U, Martinez JL. The efflux pump inhibitor Phe-Arg-beta-naphthylamide does not abolish the activity of the *Stenotrophomonas maltophilia* SmeDEF multidrug efflux pump. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(4):1042-5.
30. Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic - a vision for applied use. *Biochem Pharmacol*. 2006;71(7):910-8.
31. Nakayama K, Ishida Y, Ohtsuka M, Kawato H, Yoshida K, Yokomizo Y, et al. MexAB-OprM-specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 1: discovery and early strategies for lead optimization. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13(23):4201-4.
32. Yoshida K, Nakayama K, Ohtsuka M, Kuru N, Yokomizo Y, Sakamoto A, et al. MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 7: highly soluble and in vivo active quaternary ammonium analogue D13-9001, a potential preclinical candidate. *Bioorg Med Chem*. 2007;15(22):7087-97.
33. Bohnert JA, Kern WV. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(2):849-52.
34. Otrebska-Machaj E, Chevalier J, Handzlik J, Szymanska E, Schabikowski J, Boyer G, et al. Efflux pump blockers in gram-negative bacteria: the new generation of hydantoin based modulators to improve antibiotic activity. *Front Microbiol*. 2017;8:17001.
35. Sabatini S, Gosetto F, Manfroni G, Tabarrini O, Kaatz GW, Patel D, et al. Evolution from a natural flavones nucleus to obtain 2-(4-propoxyphenyl)quinoline derivatives as potent inhibitors of the *S. aureus* NorA efflux pump. *J Med Chem*. 2011;54(16):5722-36.
36. Garvey MI, Piddock LJV. The Efflux Pump Inhibitor Reserpine Selects Multidrug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Strains That Overexpress the ABC Transporters PatA and PatB. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(5):1677-85.
37. Handzlik J, Matys A, Kieć-Kononowicz K. Recent advances in multi-drug resistance (MDR) efflux pump inhibitors of Gram-positive bacteria *S. aureus*. *Antibiotics*. 2013;2(1):28-45.
38. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, *Staphylococcus cassette chromosome mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(6):1549-55.
39. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(3):577-85.
40. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(7):2500-5.
41. Zhang WJ, Xu XR, Schwarz S, Wang XM, Dai L, Zheng HJ, et al. Characterization of the IncA/C plasmid pSEEC2 from *Escherichia coli* of swine origin that harbours the multi-resistance gene *cfr*. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(2):385-9.
42. Vetting MW, Hegde SS, Wang MH, Jacoby GA, Hooper DC, Blanchard JS. Structure of QnrB1, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor. *J Biol Chem*. 2011;286(28):25265-73.

43. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):118-25.
44. Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, et al. Phosphoethanolamine modification of Lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the *pmrAB* two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3370-9.
45. Courvalin P. Genetics of glycopeptide resistance in Gram-positive pathogens. *Int Journal Med Microbiol.* 2005;294(8):479-86.
46. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Rev Microbiol* 2009. 7(9):629-41.
47. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin (Reprinted from *Nature* 1940; 146: 837). *Rev Infect Dis.* 1988;10(4):677-8.
48. Reeve SM, Lombardo MN, Anderson AC. Understanding the structural mechanisms of antibiotic resistance sets the platform for new discovery. *Future Microbiol.* 2015;10(11):1727-33.
49. Lynch JP, Clark NM, Zhanel GG. Evolution of antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* (focus on extended spectrum beta-lactamases and carbapenemases). *Expert Opin Pharmacother* 2013;14(2):199-210.
50. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-58.
51. Džidić S, Šušković J, Kos B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotechnol.* 2008;46(1):11-21.
52. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(10):1451-70.
53. Norris AL, Serpersu EH. Ligand promiscuity through the eyes of the aminoglycoside N3 acetyltransferase IIa. *Protein Sci.* 2013;22(7):916-28.
54. Yang W, Moore IF, Koteva KP, Bareich DC, Hughes DW, Wright GD. TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. *J Biol Chem.* 2004;279(50):52346-52.

