

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**POKROČILÉ TESTOVÁNÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY
KANDIDÁTNÍCH NOVĚ SYNTETIZOVANÝCH SLOUČENIN**

Simona Novotná

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Simona Novotná

Ráda bych poděkovala RNDr. Kláře Konečné, Ph.D. za cenné rady a připomínky k obsahové i formální stránce této práce. Poděkování patří také paní laborantce Idě Dufkové za pomoc při práci v laboratoři.

Obsah

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Úvod..... | 10 |
| 2 | Zadání diplomové práce - cíl práce..... | 11 |
| 3 | Teoretická část..... | 12 |
| 3.1 | Antibiotická rezistence | 12 |
| 3.1.1 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 15 |
| 3.1.2 | <i>Enterococcus faecium</i> | 15 |
| 3.1.3 | Příčiny rezistence bakterií k antibakteriálním látkám..... | 17 |
| 3.1.4 | Antimicrobial stewardship - cesta k racionálnímu nakládání s antimikrobiálními látkami..... | 20 |
| 3.2 | Antibiotická terapie | 23 |
| 3.2.1 | Kombinační terapie infekčních onemocnění | 28 |
| 3.2.1.1 | Vybrané mechanismy kombinovaného působení antibiotik | 29 |
| 3.3 | Vývoj nových antimikrobiálních léčiv | 32 |
| 3.3.1 | Historie vývoje antibiotik | 33 |
| 3.3.2 | Nové přístupy k léčbě bakteriálních infekcí..... | 35 |
| 3.3.3 | Rhodaninové deriváty jako strukturní základ nových léčiv..... | 37 |
| 3.3.3.1 | Antibakteriální aktivita..... | 38 |
| 3.3.3.2 | Protinádorová aktivita | 39 |
| 3.3.3.3 | Antidiabetická aktivita | 39 |
| 3.4 | Hodnocení citlivosti bakterií k antibakteriálním látkám | 41 |
| 3.4.1 | Autority v oblasti hodnocení citlivosti | 41 |
| 3.4.2 | Disková difúzní metoda | 42 |
| 3.4.3 | E-test..... | 43 |
| 3.4.4 | Bujónová diluční metoda | 45 |
| 3.4.5 | Testování synergie antibakteriálních látek | 46 |
| 4 | Experimentální část | 49 |
| 4.1 | Použitý materiál..... | 49 |
| 4.2 | Testované látky | 50 |
| 4.3 | Metodika | 50 |
| 4.3.1 | Rozšířený screening antibakteriální aktivity testovaných látek s využitím klinických izolátů bakterií rodu <i>Staphylococcus</i> a <i>Enterococcus</i> | 50 |
| 4.3.1.1 | Příprava ředící řady testovaných látek..... | 50 |
| 4.3.1.2 | Příprava Honeycomb destiček | 52 |
| 4.3.1.3 | Příprava testovacích bakteriálních suspenzí..... | 53 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.3.1.4 | Spektrofotometrická detekce hodnoty minimální inhibiční koncentrace pomocí přístroje Bioscreen | 53 |
| 4.3.2 | Studium kombinovaného účinku testované látky a komerčně dostupného antibiotika proti stafylokokům | 54 |
| 4.3.2.1 | Příprava Honeycomb destiček za účelem provedení „checkerboard“ studie | 54 |
| 4.3.2.2 | Spektrofotometrická detekce a hodnocení pomocí indexu frakční inhibiční koncentrace ... | 55 |
| 4.4 | Výsledky..... | 57 |
| 5 | Diskuze..... | 73 |
| 6 | Závěr | 78 |
| 7 | Seznam použitých zkratk | 80 |
| 8 | Seznam obrázků..... | 82 |
| 9 | Seznam tabulek | 83 |
| 10 | Bibliografie..... | 84 |

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Farmacie

Autor: Simona Novotná

Školitel: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Název diplomové práce: Pokročilé testování antibakteriální aktivity kandidátních nově syntetizovaných sloučenin

Cíl práce: Cílem této práce bylo provést rozšířenou studii antibakteriální aktivity vybraných nově syntetizovaných sloučenin ze skupiny derivátů rhodaninu. V rámci této studie byla hodnocena aktivita vůči klinickým izolátům bakteriálních kmenů rodu *Staphylococcus* a *Enterococcus*. Stěžejní část práce rovněž zahrnuje hodnocení antibakteriální aktivity jedné vybrané látky v kombinaci s komerčně dostupnými antibiotiky prostřednictvím metody „checkerboard“.

Metody: Hodnocení antibakteriální aktivity testovaných látek bylo provedeno s využitím mikrodiluční bujónové metody dle směrnic EUCAST (s drobnými obměnami). Aktivita těchto látek byla hodnocena proti klinickým izolátům bakterií rodu *Staphylococcus* a *Enterococcus* a jednomu sbírkovému kmenu *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC 43300, CCM 4750). U vybrané sloučeniny s prokazatelně slibným antistafylokokovým účinkem byl prostřednictvím metody „checkerboard“ testován kombinovaný účinek této látky vždy s jedním ze tří vybraných komerčně dostupných antibiotik (ciprofloxacin, rifampicin, vankomycin). Pro testování kombinovaného antibakteriálního účinku byl využit sbírkový kmen *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC 43300, CCM 4750). V rámci této metody byly za účelem určení hodnoty MIC voleny tři způsoby odečtu výsledků, a to spektrofotometrická detekce, odečet nárůstu bakterií pouhým okem a odečet barevné změny metabolického indikátoru alamarBlue.

Výsledky: Bylo testováno devět látek ze skupiny derivátů rhodaninu. Tyto látky prokázaly aktivitu zejména proti kmenům *Staphylococcus aureus*, naopak nejmenší aktivita byla zaznamenána proti kmenu *Enterococcus faecium* VRE. Vybraná látka s kódovým označením RHO-y vykazovala synergní účinek v kombinaci s ciprofloxacinem v poměru 0,25*MIC (RHO-y) : 0,125*MIC (ciprofloxacin), dále aditivní účinek v poměrech 0,5*MIC : 0,5*MIC; 0,25*MIC : 0,5*MIC; 0,125*MIC : 0,5*MIC; 0,0625*MIC : 0,5*MIC a 0,03125*MIC : 0,5*MIC. V dalších koncentračních poměrech prokázala tato kombinace pouze indiferentní účinek. V kombinaci s rifampicinem prokázala látka RHO-y aditivní účinek v poměrech 0,5*MIC (RHO-y) : 0,25*MIC (rifampicin) a 0,5*MIC : 0,5*MIC. V dalších koncentračních poměrech pak tyto látky prokázaly pouze indiferentní účinek. U kombinace látky

RHO-y s vankomycinem byl ve všech koncentračních poměrech prokázán pouze indiferentní účinek. U žádné z kombinací látky RHO-y s komerčně dostupnými antibiotiky nebyl prokázán antagonistický účinek.

Závěr: V rámci pokročilého testování byla u devíti látek ze skupiny rhodaninů prokázána antistafylokoková aktivita, zejména vůči kmenu *Staphylococcus aureus*. S využitím metody „checkerboard“ byl zjištěn synergní účinek látky RHO-y v kombinaci s ciprofloxacinem a aditivní účinek v kombinaci s rifampicinem. Kombinace látky RHO-y s vankomycinem prokázala pouze indiferentní účinek. U žádné z testovaných kombinací těchto látek nebyl prokázán antagonismus.

Klíčová slova: antibakteriální aktivita *in vitro*, "checkerboard" test, rhodaniny, rezistence, kombinační terapie

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Pharmacy

Author: Simona Novotná

Supervisor: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Title of diploma thesis: Advanced antibacterial activity testing of candidate newly synthesized compounds

Background: The aim of this thesis was to perform an extended study of the antibacterial activity of selected newly synthesized rhodanine derivatives. In this study, activity against clinical isolates of bacterial strains of the genus *Staphylococcus* and *Enterococcus* was evaluated. The main part of the work also includes the evaluation of the antibacterial activity of one selected substance in combination with commercially available antibiotics using the checkerboard method.

Methods: Evaluation of the antibacterial activity of tested substances was performed using the broth microdilution method according to EUCAST guidelines (with minor modifications). The activity of these substances was evaluated against clinical isolates of bacteria of the genera *Staphylococcus* and *Enterococcus* and one *Staphylococcus aureus* MRSA reference strain (ATCC 43300, CCM 4750). For a selected compound with a demonstrably promising antistaphylococcal effect, the combined effect of this substance was tested with three selected commercially available antibiotics (ciprofloxacin, rifampicin, vancomycin) using the checkerboard method. The *Staphylococcus aureus* MRSA reference strain (ATCC 43300, CCM 4750) was used to test the combined antibacterial effect. In order to determine the MIC value, three methods of reading the results were chosen, namely spectrophotometric detection, reading of the growth of bacteria with the naked eye and reading of the colour change of the metabolic indicator alamarBlue.

Results: Nine substances from the group of rhodanine derivatives were tested. These substances showed activity mainly against *Staphylococcus aureus* strains. On the contrary, the lowest activity was observed against *Enterococcus faecium* VRE strain. The selected substance codenamed RHO-γ showed a synergistic effect in combination with ciprofloxacin at a concentration ratio of 0,25*MIC (RHO-γ) : 0,125*MIC (ciprofloxacin), as well as an additive effect at a ratio of 0,5*MIC : 0,5*MIC; 0,25*MIC : 0,5*MIC; 0,125*MIC : 0,5*MIC; 0,0625*MIC : 0,5*MIC and 0,03125*MIC : 0,5*MIC. In other concentration ratios, these substances showed only an indifferent effect. In combination with rifampicin, RHO-γ showed an additive effect in combinations of 0,5*MIC (RHO-γ) : 0,25*MIC

(rifampicin) and 0,5*MIC : 0,5*MIC. In other concentration ratios, these substances showed only an indifferent effect. The combination of RHO-y with vancomycin showed only an indifferent effect in all concentration ratios. None of the combinations of RHO-y with commercially available antibiotics showed an antagonistic effect.

Conclusion: In advanced testing, nine rhodanine derivatives showed antistaphylococcal activity, especially against the *Staphylococcus aureus* strain. Using the checkerboard method, a synergistic effect of RHO-y in combination with ciprofloxacin and an additive effect in combination with rifampicin were found. The combination of RHO-y with vancomycin showed only an indifferent effect. None of the tested combinations of these substances showed evidence of antagonism.

Keywords: antibacterial activity *in vitro*, checkerboard test, rhodanines, resistance, combination therapy

1 Úvod

Podle odhadů by mohly do roku 2050 infekce vyvolané rezistentními mikroorganismy způsobovat celosvětově úmrtí až 10 milionů osob ročně. [1] Jen v Evropě už teď každý rok umírá následkem infekcí způsobených rezistentními bakteriemi asi 25 000 osob. [2] Jedním ze způsobů, jak podobnému vývoji předejít, je i výzkum nových antibakteriálních léčiv. Kromě obměn stávajících struktur je snaha objevovat zejména látky s úplně novým mechanismem účinku. Jednou ze skupin, které jsou zkoumány jako potenciální nová antibakteriální léčiva, jsou i rhodaniny.

V úvodu práce je zařazena kapitola věnovaná aktuálnímu problému antibiotické rezistence. Mimo vývoj nových strukturních typů antibiotik je také důležité se zaměřit na způsoby, jak zachovat účinnost již používaných léčiv. K tomu slouží i nástroje antibiotické politiky, které mají vést k zodpovědnému nakládání s antibakteriálními léčivy. I tímto tématem se zabývá úvodní kapitola. Dále se práce zabývá možnostmi terapie bakteriálních infekcí, se zaměřením na kombinační terapii, a také způsoby hledání nových terapeutických možností v této oblasti. Jedním ze směrů současného výzkumu na poli nových antibakteriálních léčiv je i snaha o vývoj kombinací stávajících antibiotik s novými látkami, které by dokázaly podpořit účinek antibiotika proti rezistentním bakteriálním kmenům. Závěrečná kapitola teoretické části této práce je pak věnována metodám používaným při testování citlivosti bakterií k antibakteriálním látkám se zaměřením na problematiku hodnocení kombinovaného antibakteriálního účinku.

Experimentální část této práce je věnována testování antistafylokokové a antienterokokové aktivity nově syntetizovaných sloučenin ze skupiny derivátů rhodaninu. Byla testována antibakteriální aktivita skupiny rhodaninových derivátů syntetizovaných na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Tyto látky byly nejprve podrobeny testům, které sloužily k určení jejich vlastní antibakteriální aktivity. Následně byla vybrána jedna látka pro hodnocení kombinovaného antibakteriálního účinku s komerčně dostupnými antibiotiky pomocí metody „checkerboard“.

2 Zadání diplomové práce - cíl práce

- Práce s odbornou literaturou (recentní, relevantní zdroje).
- Zaměření se na metodické přístupy volené v rámci preklinických studií kandidátních antibiotických látek, zejména na studium interakce antimikrobiálních látek *in vitro* v rámci „checkerboard“ studie.
- Testování antibakteriální aktivity vybraných kandidátních látek syntetizovaných na jiných vědecko-výzkumných pracovištích Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.
- Studium synergního účinku kandidátní antimikrobiální látka vs. komerčně dostupné antibiotikum, tzv. „checkerboard“ testy.

3 Teoretická část

3.1 Antibiotická rezistence

Rezistence mikroorganismů k antimikrobiálním látkám patří mezi nejpálčivější problémy současné medicíny. Součástí tohoto problému je i rezistence bakterií k antibiotikům. Přestože uvedení prvního antibiotika do klinické praxe znamenalo revoluci v terapii bakteriálních infekcí, počáteční nadšení bylo velmi brzy zmírněno zjištěním, že jsou bakterie schopné si k těmto přípravkům vytvořit rezistenci.¹ Přesto stále přetrvával optimismus a velké naděje byly vkládány do nových antibakteriálních přípravků, které produkoval farmaceutický průmysl. Větší pozornost sice začala být rezistenci věnovaná již v 60. letech, až na přelomu tisíciletí se ale tato problematika dostala do popředí zájmu nejen mezi odbornou veřejností. To je způsobeno především uvědoměním, že vývoj nových antibiotik nedokáže udržet krok s rapidním nárůstem výskytu rezistence, a nelze tak na něj spoléhat jako na jediný způsob řešení tohoto problému. Na lokální i mezinárodní úrovni dochází k tvorbě mnohých opatření, která mají pomoci se zachováním účinnosti antibiotik. [3] Zásahu na tom nepochybně mají i odhady globálních ekonomických dopadů neřešené antibiotické rezistence, která by mohla do roku 2050 způsobit roční finanční ztráty až do výše 100 bilionů amerických dolarů a stát ročně život až 10 milionů lidí. [1] V současné době se jen v Evropě odhadují roční ztráty spojené s rezistencí asi na 1,5 miliardy euro a stojí za úmrtím asi 25 000 osob ročně. [2]

Zásadní roli již od počátku užívání antibiotik hrají rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus*. Ty získaly nejprve rezistenci k penicilinu, později také rezistenci k meticilinu a nejnověji se objevují i kmeny rezistentní k vankomycinu, který slouží jako rezervní antibiotikum v terapii stafylokokových infekcí. Seznam významných bakteriálních kmenů s narůstající mírou rezistence je ale mnohem delší. **Světová zdravotnická organizace** (WHO, World Health Organization) v roce 2017 zveřejnila pod názvem „**Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**“ seznam nejvýznamnějších rezistentních bakterií, kterým má být věnována maximální pozornost v oblasti výzkumu a vývoje nových antibiotik (viz Obr. 1). Tento seznam rozlišuje tři kategorie podle závažnosti aktuální situace. Přehled nezahrnuje

¹ Na tuto skutečnost upozorňoval již Alexandr Fleming ve své řeči při převzetí Nobelovy ceny za fyziologii nebo lékařství v roce 1945. [3]

Mycobacterium tuberculosis, protože léčba tuberkulózy je již v současnosti považována za celosvětovou prioritu. [4]

Priorita 1: KRITICKÁ

Acinetobacter baumannii, karbapenem-rezistentní

Pseudomonas aeruginosa, karbapenem-rezistentní

*Enterobacteriaceae**, karbapenem-rezistentní , rezistentní ke 3. generaci cefalosporinů

Priorita 2: VYSOKÁ

Enterococcus faecium, vankomycin-rezistentní

Staphylococcus aureus, meticilin-rezistentní , vankomycin-rezistentní , se sníženou citlivostí k vankomycinu

Helicobacter pylori, klaritromycin-rezistentní

Campylobacter, fluorochinolon-rezistentní

Salmonella spp., fluorochinolon-rezistentní

Neisseria gonorrhoeae, rezistentní ke 3. generaci cefalosporinů , fluorochinolon-rezistentní

Priorita 3: STŘEDNÍ

Streptococcus pneumoniae, necitlivý k penicilinu

Haemophilus influenzae, ampicilin-rezistentní

Shigella spp., fluorochinolon-rezistentní

Obr. 1 Seznam prioritních patogenů dle Světové zdravotnické organizace

**Enterobacteriaceae*: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, and *Providencia spp.*, *Morganella spp.*

Převzato a upraveno z: Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. [4]

I přes četné snahy autorit se v Evropě stále příliš nedaří snižovat míru rezistence a u některých bakteriálních kmenů dochází dokonce k jejímu nárůstu. To se týká především gramnegativních bakterií, významnou se ale v posledních letech stává například i strmě

narůstající rezistence enterokoků. Přestože je míra rezistence hodnocena pro každý bakteriální kmen zvlášť, je možné u většiny z nich pozorovat určité trendy v geografickém výskytu rezistence. Obecně lze říct, že míra rezistence u většiny z nich narůstá směrem na jih a východ Evropy, opačný trend je možné sledovat ve státech severní a západní Evropy. Souvisí to především s úrovní zdravotnictví v daných státech a schopností těchto států realizovat dostatečně efektivní opatření v boji s rezistencí. [5]

Pro sledování rezistence v Evropě slouží **Evropská síť pro sledování antimikrobiální rezistence** (EARS-Net, The European Antimicrobial Resistance Surveillance Network), která je nástrojem **Evropského střediska pro prevenci a kontrolu nemocí** (ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control). V rámci tohoto projektu dochází ke shromažďování a analýze dat o rezistenci získávaných na národní úrovni. Do projektu jsou zapojeny členské státy EU spolu s Norskem a Islandem. V rámci EU je dále sledována spotřeba antimikrobiálních látek prostřednictvím **Evropské sítě pro sledování spotřeby antimikrobiálních látek** (ESAC-Net, The European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network) a také výskyt infekcí spojených se zdravotní péčí přes **Systém sledování infekcí spojených se zdravotní péčí** (HAI-Net, Healthcare-associated Infections Surveillance Network). Data shromážděná na území Evropy jsou také dále odesílána do **Globálního systému pro sledování antimikrobiální rezistence** (GLASS, Global Antimicrobial Resistance Surveillance System), který je součástí komplexní strategie WHO pro boj s antimikrobiální rezistencí. [5]

Mimo Evropu je situace často ještě mnohem závažnější, především pak v rozvojových zemích. Podílí se na tom zejména nízká úroveň místního zdravotnictví, nedostatečná hygiena a prevence onemocnění nebo nadužívání antibiotik a jejich dostupnost i bez lékařského předpisu. [6] V roce 2015 vydala WHO dokument s názvem **Globální akční plán pro boj s antimikrobiální rezistencí** (Global action plan on antimicrobial resistance), který shrnuje doporučení pro boj s antibiotickou rezistencí. Tímto dokumentem si WHO vytyčila pět hlavních cílů, skrze jejichž naplňování chce snižovat míru antibiotické rezistence a zabránit nástupu tzv. **post-antibiotické éry**, kdy již nebude možné antibiotiky léčit ani běžné infekce, stejně jako v období před objevem antibiotik. Mezi tyto cíle patří zlepšování povědomí o antibiotické rezistenci, podpora výzkumu, důraz na prevenci infekčních onemocnění, podpora racionálního užívání antibiotik a zajištění dostatečných investic do

boje s rezistencí. Kromě dodržování zásad globálního akčního plánu klade WHO důraz především na tvorbu regionálních plánů pro boj s rezistencí, které zohlední konkrétní situaci daného státu. [2]

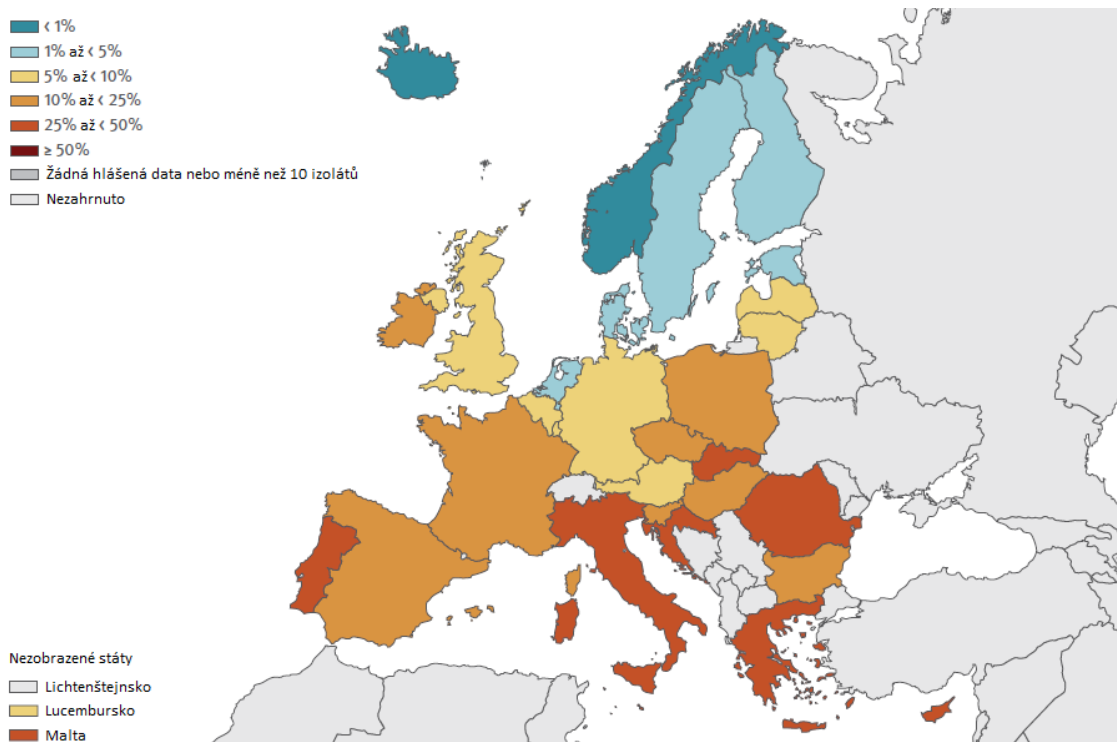
3.1.1 *Staphylococcus aureus*

Příkladem úspěšných opatření vedoucích ke snižování míry rezistence u bakterií je meticilin-rezistentní ² *Staphylococcus aureus* (MRSA, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Přestože kmeny MRSA patří stále mezi nejvýznamnější patogeny, dochází dle dat ECDC k setrvalému poklesu výskytu těchto rezistentních kmenů. I u výskytu MRSA jsou však patrné výrazné rozdíly mezi jednotlivými evropskými státy. Například Island hlásil ECDC v roce 2018 nulový výskyt kmenů MRSA v testovaných izolátech. Opačným příkladem je velmi nepříznivá situace v Rumunsku, kde bylo nahlášeno závratných 43 % MRSA kmenů. I přes takto vysoká čísla je tam ale patrný výrazný pokles rezistentních kmenů v porovnání s předchozími roky. V roce 2015 dosahovala v Rumunsku rezistence u testovaných izolátů 57 %, v předchozích letech dokonce 64,5 % (2013), nebo 70,5 % (2004). [5; 7]

3.1.2 *Enterococcus faecium*

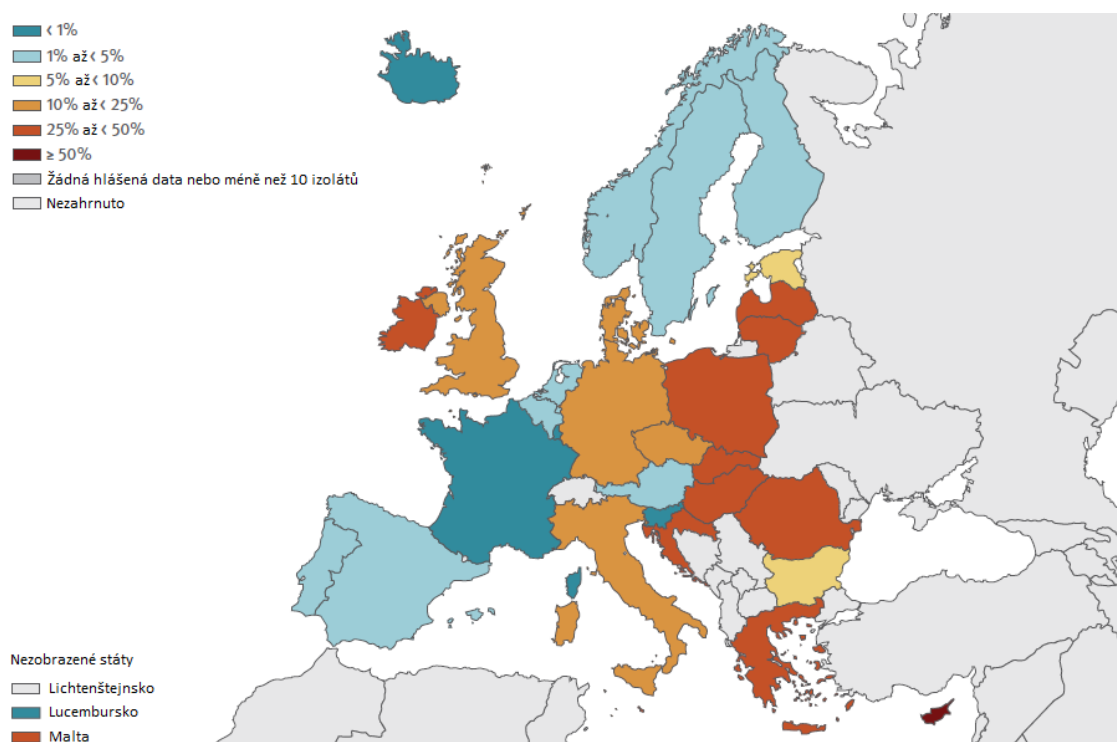
Opačný trend ve výskytu rezistence než u MRSA je možné sledovat u enterokoků. V posledních letech dochází k rapidnímu nárůstu výskytu vankomycin-rezistentních enterokoků (VRE, vancomycin-resistant enterococci). Mezi lety 2015 a 2018 došlo v Evropě k nárůstu průměrné rezistence u *E. faecium* z 10,5 % na 17,3 %. Zajímavé je, že u VRE není tak jasný trend v geografickém rozložení rezistentních kmenů, jako je tomu u většiny jiných bakteriálních kmenů. Nejvyšší výskyt rezistence je sice možné pozorovat ve východní Evropě, ale určitě to neplatí univerzálně. Například v Bulharsku bylo v roce 2018 hlášeno 9,9 % rezistentních kmenů, zatímco Irsko ve stejném roce hlásilo míru rezistence 40,2 %. Srovnání výskytu kmenů MRSA a VRE v Evropě je znázorněno na Obr. 2 a Obr. 3. [5]

² V ČR není registrován žádný přípravek s obsahem meticilinu. Z protistafylokokových penicilinů je u nás registrován pouze **oxacilin**.



Obr. 2 Procento invazivních izolátů *St. aureus* rezistentních k metilcinu (MRSA), 2018

Převzato a upraveno z: Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. [5]

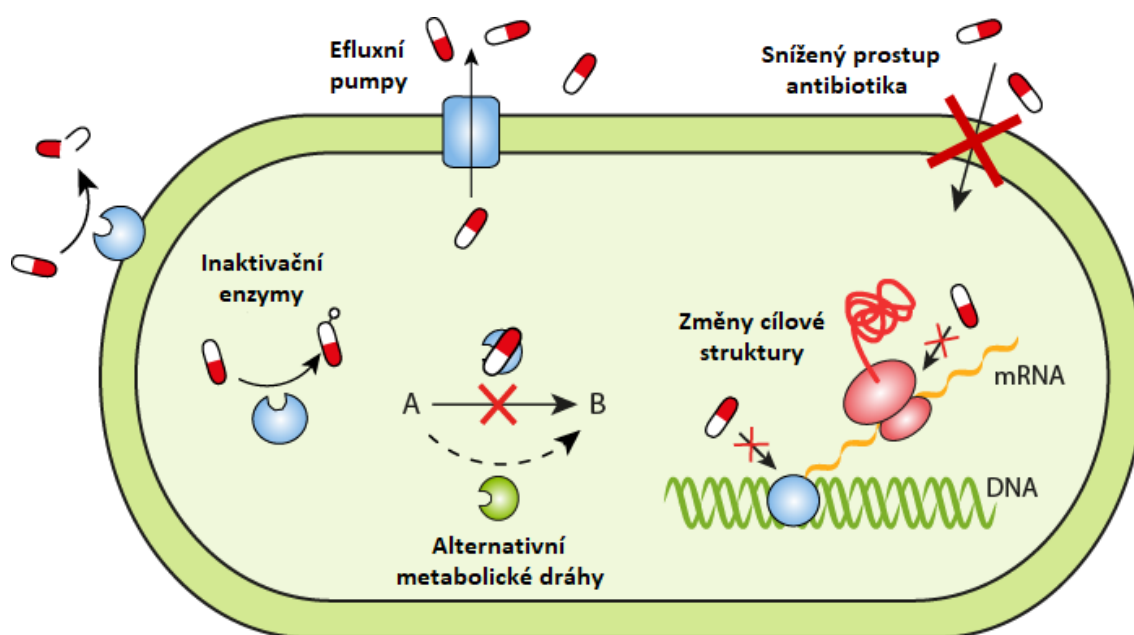


Obr. 3 Procento invazivních izolátů *E. faecium* rezistentních k vankomycinu (VRE), 2018

Převzato a upraveno z: Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. [5]

3.1.3 Příčiny rezistence bakterií k antibakteriálním látkám

Rezistenci bakterií k antibiotikům je možné rozdělit na přirozenou (vrozenou) a získanou. **Přirozeně** rezistentní jsou bakterie, které mají díky specifické stavbě nebo metabolismu schopnost odolávat účinkům některých antibiotik. Tato vlastnost se nerozvíjí jako obranný mechanismus a je těmto bakteriím vrozená. Jedná se tak o vlastnost, která je společná celému druhu. Může jít například o nedostupnost, případně úplnou neexistenci cílové struktury daného antibiotika. Oproti tomu rezistence **získaná** vzniká u bakterií, které jsou přirozeně k účinku antibiotik vnímavé, ale následkem selekčního tlaku se u nich rozvíjejí různé mechanismy k obraně proti jejich působení. Tato vlastnost se proto, na rozdíl od rezistence přirozené, omezuje jen na část bakteriální populace. [8] Různé mechanismy obrany proti účinkům antibiotik jsou vyobrazeny na Obr. 4.

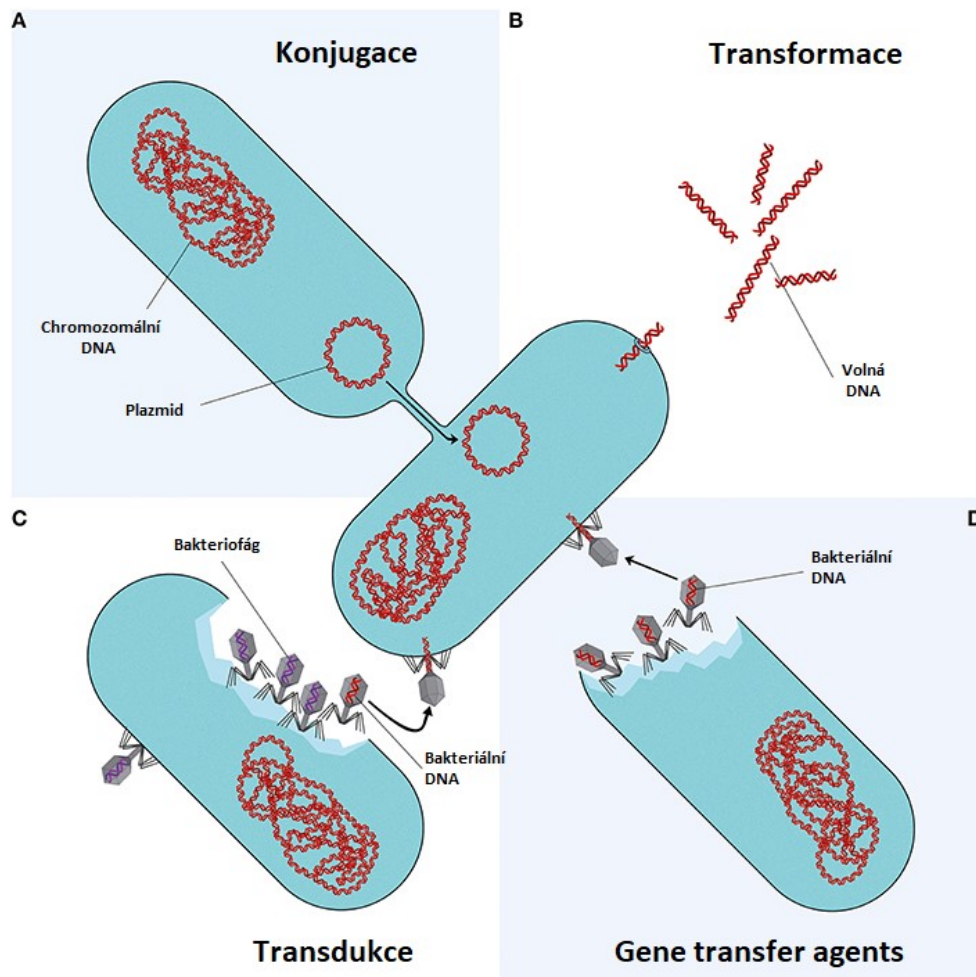


Obr. 4 Mechanismy rezistence bakterií k účinkům antibiotik

Převzato a upraveno z: <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/resistance-mechanisms-in-bacteria/> [9]

Podkladem pro vznik rezistence jsou změny na úrovni genetického kódu. Může k nim docházet buď mutacemi, nebo převzetím exogenní genetické informace od okolních buněk, které mají geny pro rezistenci (viz Obr. 5). [5] Zejména druhý zmíněný způsob představuje závažný problém, protože díky horizontálnímu přenosu genů rezistence dochází k rychlému

šíření rezistence v bakteriální populaci, a to i mezi nepříbuznými bakteriemi. Vznik rezistence k jednomu antibiotiku je často spojen s rezistencí k celé skupině příbuzných antibiotik se stejným mechanismem účinku. Stále častěji bohužel také nastává situace, kdy jsou bakterie současně rezistentní k více různým skupinám antibiotik.



Obr. 5 Mechanismy horizontálního přenosu genetické informace u bakterií

K horizontálnímu přenosu genů rezistence může docházet konjugací (A), transformací (B), transdukci (C) nebo s pomocí částic podobných virům označovaných jako „gene transfer agents“ (GTAs).

Převzato a upraveno z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00173/full> [10]

Je důležité rozlišovat mezi pojmy rezistence, tolerance a perzistence. Zatímco při vzniku **rezistence** dochází ke změnám na úrovni genetického kódu, které se přenáší na další generace, **tolerance** popisuje stav, kdy bakteriální populace reaguje na nepříznivé životní podmínky úpravou metabolismu, která vede k dočasnému zvýšení odolnosti k

antimikrobiálními látkami (např. snížení účinnosti β -laktamových antibiotik u bakterií s nízkou metabolickou aktivitou). Na rozdíl od rezistence nevede tolerance ke snížení citlivosti bakterie k danému antibiotiku, ale dochází pouze k prodloužení času potřebného k dosažení účinku. Pojem **perzistence** pak označuje situaci, kdy získá zvýšenou odolnost vůči antibiotikům pouze malá část bakteriálních buněk v populaci. To může vést k přežívání těchto buněk v přítomnosti antibiotika a následnému obnovení populace po ukončení expozice. Podkladem perzistence může být jak rezistence, tak tolerance, obnovená populace však nepřebírá vlastnosti přeživších buněk, ale dochází ke vzniku populace s obdobným zastoupením perzistentních buněk jako v původní populaci. Perzistence také bývá někdy označována jako **heterorezistence**. [11]

Od roku 2011 existuje mezinárodně uznávaná terminologie pro klasifikaci rezistentních bakteriálních kmenů, která vznikla díky spolupráci evropských a amerických expertů z ECDC a **Center pro kontrolu a prevenci nemocí** (CDC, Centers for Disease Control and Prevention). Jako „**multidrug-resistant**“ (MDR) jsou označovány bakterie se získanou rezistencí k alespoň jednomu antibiotiku nejméně ze třech rozdílných skupin, jako „**extensively drug-resistant**“ (XDR) poté bakterie rezistentní ke všem skupinám antibiotik s výjimkou nejvýše dvou skupin a nakonec „**pandrug-resistant**“ (PDR) s rezistencí ke všem používaným skupinám antibiotik. Do zmíněných kategorií jsou bakteriální kmeny zařazovány na základě *in-vitro* testování citlivosti s využitím tzv. breakpointů (více viz kapitola 3.4.1). Tato kategorizace rezistentních kmenů nachází využití především v epidemiologických studiích a klade si za cíl zlepšení porovnatelnosti dat o rezistenci z různých částí světa. [12]

Nadměrné nebo nesprávné používání antibiotik vede k vytváření selekčního tlaku, který podporuje přežívání bakterií s takovými změnami genetického kódu, které zvyšují jejich schopnost přežít v prostředí antibakteriálně působící látky. K takovým změnám dochází především při dlouhodobé expozici nízkým koncentracím antibiotika, které nejsou dostatečné pro zábranu růstu bakterií, ale stačí k tomu, aby rezistence bakteriální buňce poskytla dostatečnou konkurenční výhodu v rámci populace (tzv. subinhibiční koncentrace). [8]

Udržování genů pro rezistenci obecně nebývá pro bakterie příliš výhodné, protože jejich exprese je zpravidla energeticky náročná a poskytují výhodu jen po omezený čas

v době expozice antibiotiku. Mimo toto období se naopak stávají zátěží, která bakterii v rámci populace znevýhodňuje oproti bakteriím bez těchto genů pro rezistenci. Právě proto se předpokládá, že by se tyto geny měly v bakteriálních populacích udržovat jen krátkodobě a po ukončení expozice antibiotiku by mohly z populace postupně zmizet. Zatím se ale zdá, že je tento proces poměrně zdlouhavý a geny pro rezistenci nemizí z populace tak rychle, jak se předpokládalo. [13; 14] Tento stav může být mimo jiné i následkem vzniku tzv. kompenzačních mutací. [15] Bakteriální buňka tak může například exprimovat daný gen jen v případě potřeby a nezatěžuje ji v období, kdy není antibiotiku vystavena. Díky tomu se tak geny rezistence v populaci mohou udržet dlouhodobě, protože buňkám neposkytují nevýhodu oproti těm, které geny pro rezistenci nemají. [8] Vzácně může docházet i k situaci, kdy geny rezistence životaschopnost bakteriální buňky dokonce zvýší, tato buňka tak získá výhodu oproti zbytku bakteriální populace nejen při expozici antibiotiku, ale i bez ní. [16]

3.1.4 Antimicrobial stewardship - cesta k racionálnímu nakládání s antimikrobiálními látkami

Jako „**antimicrobial stewardship**“ je označován souhrn aktivit, které mají za cíl zodpovědnější nakládání s antimikrobiálními látkami a následné snížení výskytu rezistence. Toho se snaží dosáhnout především na úrovni preskripce antimikrobiálních látek. Zodpovědná preskripce a užívání antimikrobiálních léčiv je také součástí globálního plánu WHO na boj s rezistencí. V návaznosti na tento plán vydala WHO v roce 2019 dokument „**Antimicrobial stewardship programmes in health-care facilities in low- and middle-income countries**“, který má sloužit jako praktický návod k zavádění programů v oblasti „antimicrobial stewardship“ na úrovni státu i zdravotnických zařízení. Nejedná se o univerzální instrukce pro všechny státy, ale má sloužit jako podklad pro tvorbu národních plánů v oblasti kontroly zacházení s antimikrobiálními léčivy. Tento plán se zaměřuje především na zdravotnictví zemí s nízkými a středními příjmy³, kde se předpokládá v oblasti antimikrobiální rezistence nižší úroveň přijímaných opatření. [17]

Pokyny pro správné zacházení s antimikrobiálními látkami existují i v rámci Evropské unie. Z roku 2017 pochází úřední věstník Evropské unie **Pokyny EU pro uvážlivé používání**

³ Jedná se o kategorizaci zemí podle Světové banky na základě tzv. hrubého národního důchodu (GNI, gross national income). Do těchto kategorií spadají především země v Africe, Asii nebo Jižní Americe.

antimikrobiálních látek v humánním lékařství. Tento dokument vznikl ve spolupráci s ECDC a členskými státy a vychází z plánu Evropské komise pro boj s antimikrobiální rezistencí a z Globálního akčního plánu pro boj s antimikrobiální rezistencí WHO. [18] Ještě o dva roky dříve vznikl obdobný dokument i pro používání antimikrobiálních látek ve veterinárním lékařství. [19]

Protože se rezistentní kmeny z populace jen těžko odstraňují, je důležité vzniku rezistence především předcházet pomocí vhodně zvolených preventivních opatření na všech úrovních systému zdravotní péče. Na úrovni zdravotníků a pacientů je důležitá především zodpovědná preskripce a následné užívání antibiotik. Základem je předepisovat antibiotika pouze v indikovaných případech a vyvarovat se jejich použití u virových onemocnění nebo takových bakteriálních infekcí, které nutně nevyžadují antibiotickou terapii. S tím souvisí také důsledná diagnostika, která dokáže nejen odlišit bakteriální a virovou infekci, ale také umožňuje cílit antibiotickou terapii podle původce.⁴ Taková terapie je s ohledem na vznik rezistence vždy výhodnější než terapie empirická (více o antibiotické terapii v kapitole 3.2). V oblasti edukace pacientů je vhodné se zaměřit především na správné dávkování, dodržování délky terapie a správnou likvidaci nepoužitých léčiv. Je také vhodné zdůraznit nevhodnost užívání antibiotik, která byla předepsána jinému pacientovi, případně užívání antibiotik, která pacientovi zůstala po předchozí léčbě. [18]

Na úrovni státu je nezbytné zajistit tvorbu a dohled nad dodržováním pravidel pro zodpovědné nakládání s antibiotiky. Role státních orgánů spočívá především v kontrole přístupu k antibiotikům a regulaci jejich preskripce, dále například v zajištění sběru dat o spotřebě antibiotik. Pravidla vytvořená státem dopadají nejvíce na zdravotnická zařízení, která mají zásadní roli v nakládání s antibiotiky. Mohou totiž ovlivnit zacházení s nimi hned na několika úrovních. Podílí se na regulaci jejich předepisování, jejich správném užívání i na jejich likvidaci. Ve zdravotnických zařízeních je zpravidla přístup k antibiotikům omezován prostřednictvím seznamů tzv. vázaných antibiotik. Pokud se antibiotikum nachází na takovém seznamu, je možné ho použít pouze se souhlasem antibiotické komise. Ta zhodnotí především správnost výběru konkrétního antibiotika s ohledem na léčenou infekci

⁴ Vzorky pro mikrobiologickou diagnostiku musí být vždy odebrány správným způsobem a ještě před zahájením antibiotické terapie. V případě odebrání vzorků až v průběhu terapie hrozí zkreslení výsledků a chybná identifikace původce onemocnění. To může vést k nesprávnému cílení antibiotické terapie a následnému selhání léčby. (viz kapitola 3.2)

i na stav pacienta, kterému je předepsáno. Zpravidla se jedná o rezervní antibiotika, která by měla být využívána jen v terapii závažných infekcí. Úkolem zdravotnických zařízení je i důsledná edukace zdravotnických pracovníků se zaměřením na zodpovědné nakládání s antibiotiky a předcházení vzniku rezistence. [18]

Hlavním orgánem antibiotické politiky v České republice je **Státní zdravotní ústav** (SZÚ). Ten je zodpovědný za realizaci **Národního antibiotického programu** (NAP), který byl ustanoven vládou ČR v roce 2009. Základní principy NAP jsou definovány **dlouhodobou strategií**, aktuální cíle pak určují **akční plány**. V současnosti je platný akční plán pro roky 2019-2022. Mezi činnosti NAP patří především formulace zásad národní antibiotické politiky, sledování stavu antibiotické rezistence, sledování spotřeby antibiotik, prevence infekčních onemocnění, podpora vzdělávání a výzkumu a spolupráce v oblasti rezistence na mezinárodní úrovni. Na tomto programu spolupracuje Ministerstvo zdravotnictví s Ministerstvem zemědělství, které má v působnosti používání antimikrobiálních látek ve veterinární oblasti. Sledování vývoje rezistence má u nás na starosti **Národní referenční laboratoř pro antibiotika**, která kromě vyšetřování citlivosti k antibiotikům slouží také jako národní koordinátor projektu EARS-Net. Odbornou stránku antibiotické politiky pak zajišťuje **Subkomise pro antibiotickou politiku ČLS JEP** (Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně), která má za úkol především tvorbu doporučených postupů se zaměřením na správné užívání antibiotik, postupy v léčbě vybraných infekcí a prevenci vzniku antibiotické rezistence. [20]

3.2 Antibiotická terapie

Přestože cílem antibiotické terapie je především úspěšné zvládnutí bakteriální infekce, stále více se do popředí dostává také požadavek na zodpovědné užívání antibiotik s ohledem na celosvětový nárůst rezistence. Jednou z možností, jak ovlivnit nárůst rezistence, je právě správné vedení antibiotické terapie a dodržování postupů, které brání selekci rezistentních bakteriálních kmenů.

Základem je omezit užívání antibiotik jen na opodstatněné případy, u kterých je prokázán bakteriální původ infekce. Užívání u jiných druhů infekcí, případně u stavů bez přítomnosti infekce (např. některá zánětlivá onemocnění s příznaky podobnými infekci) nejen že poškozuje pacienta, ale může také napomáhat rozvoji rezistence. Zvážit podání antibiotik je vhodné také u běžných infekcí s mírným průběhem, které často bývají samoúzdravné a antibiotika jsou v jejich léčbě nasazována především pro prevenci komplikací. Řešení některých infekcí může spočívat také v odstranění jejich zdroje, například chirurgickým zásahem. Naopak velmi rychlé zahájení antibiotické terapie je důležité u život ohrožujících infekcí. I v těchto případech je ale vždy nutné před zahájením léčby odebrat vzorky pro následné mikrobiologické vyšetření. U vzorků odebraných až po zahájení léčby je riziko chybné identifikace původce onemocnění a následně špatné volby antibiotika. To může vést nejen ke zvýšené selekci rezistentních bakterií, ale u takto závažných stavů i ohrozit pacienta na životě. [21]

Mikrobiologické vyšetření není vždy prováděno jen za účelem zjištění původce již probíhající infekce. Jedním z postupů využívaných především v nemocničním prostředí je provádění bakteriálního screeningu pacientů. Hodnotí se při něm kolonizující mikroorganismy především u pacientů patřících do rizikových skupin, například pacientů na jednotkách intenzivní péče, onkologických pacientů nebo pacientů s jinak narušenou funkcí imunitního systému. Důvody pro takový screening jsou v zásadě dva. Jedním důvodem pro sledování kolonizace pacientů je předpoklad, že kolonizující mikroflóra může za určitých okolností způsobit rozvoj infekce, případně může signalizovat počáteční fázi infekčního onemocnění. Druhým z důvodů je snaha sledovat výskyt různých bakteriálních kmenů na daném oddělení, a to zejména těch rezistentních (např. MRSA, VRE). Při zjištění výskytu rezistentních kmenů se dále postupuje v souladu s pokyny daného zdravotnického zařízení. Takoví pacienti bývají zpravidla izolováni a tato skutečnost je uvedena v jejich zdravotní

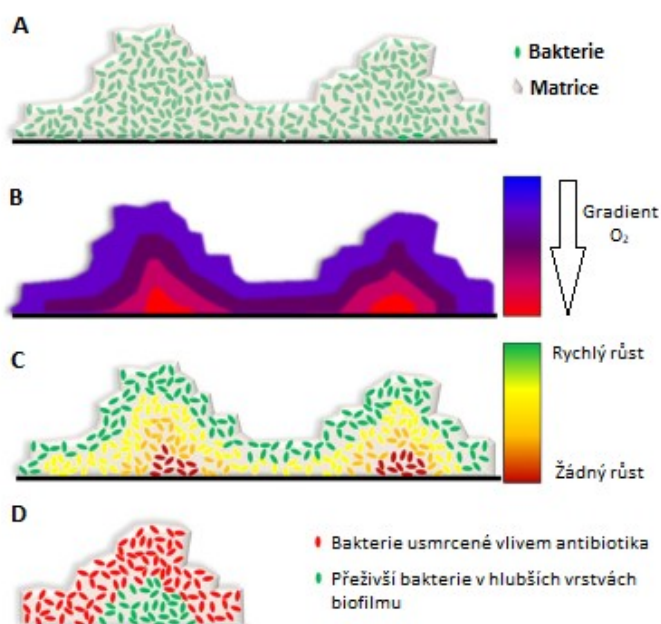
dokumentaci. Vyšší pravděpodobnost výskytu rezistentních bakteriálních kmenů je například u pacientů, kteří byli v nedávné době hospitalizováni, u pacientů ze zařízení sociálních služeb, u osob pracujících ve zdravotnictví nebo v zemědělství (zejména ve velkochovech, kde se často ve zvýšené míře podávají antibiotika), případně u osob, které přicestovaly zemi s vysokým výskytem rezistentních bakteriálních kmenů. [8; 21; 22]

S ohledem na vznik rezistence je nejméně výhodná **empirická terapie**. Při ní se výběr antibiotika řídí především zkušenostmi lékaře a nejčastějšími původci diagnostikované infekce. Právě kvůli neznalosti původce je často nutné podávat širokospektrá antibiotika, která podporují vznik rezistence a také častěji u pacientů způsobují dysmikrobie. [8] Tento přístup se uplatňuje zejména v ambulantní praxi u běžných komunitních infekcí, například bronchitid nebo infekcí močových cest. Výhodnějším postupem je v tomto směru **cílená terapie**, kdy je vhodné antibiotikum zvoleno na základě výsledků kultivace. V případě nutnosti okamžitého zahájení terapie je nejprve zvoleno antibiotikum se širším spektrem v rámci **úvodní terapie** a po získání výsledků mikrobiologického vyšetření se buď v této terapii pokračuje, nebo se přechází na jiný preparát s užším spektrem účinku (k přehodnocení terapie dochází většinou po 48-72 hodinách od nasazení úvodní terapie [8]). Přejít z antibiotika se širokým spektrem na antibiotikum s úzkým spektrem se nazývá **deescalace** antibiotické terapie. V případě méně akutních infekcí je někdy možné se zahájením terapie počkat a nasadit rovnou cílenou terapii. [21; 23]

Výběr antibiotika se řídí nejen typem infekce, ale také dobou jejího trvání. Jednodušší situace zpravidla nastává u **akutní infekce**. Ta je většinou způsobena jen jedním patogenem, bakteriální populace se rychle množí a nachází se v dobře prokrvených místech, kam snáze pronikají antibiotika. Tyto skutečnosti zvyšují šanci na úspěšné vyléčení infekce za relativně krátkou dobu. Oproti tomu u **chronické infekce** dochází k tvorbě infekčního ložiska, které bývá sekundárně kolonizováno dalšími bakteriemi. V takovém ložisku také dochází ke změně prostředí z aerobního na anaerobní, což nahrává kolonizaci především mikroaerofilními nebo anaerobními mikroorganismy. Ty mohou často infekční ložisko udržovat i přesto, že se v něm původní bakterie už nenachází. Terapie chronických infekcí je většinou komplikovaná právě přítomností více mikroorganismů, jejich nízkou metabolickou aktivitou a také špatnou dostupností ložiska, které bývá jen málo prokrvené,

nebo z jiných příčin nedostupné pro vstup antibiotika. To často vede k nutnosti dlouhodobého podávání antibiotik, někdy dokonce i jejich kombinace. [8]

Příkladem zdroje chronické infekce může být i **mikrobiální biofilm**. Ten hraje roli například v patogenezi infekční endokarditidy, osteomyelitidy nebo chronických zánětů dásní. [24] Biofilmy se ale zdaleka netvoří jen v živých organismech, často se vyskytují také na různých neživých površích, které jsou v kontaktu s proudící tekutinou. V oblasti medicíny je jejich přítomnost významná především na zdravotnických prostředcích (např. katetry, cévky, implantáty,...), kde mohou fungovat jako potenciální zdroj infekce. Biofilm je komplexní struktura složená z mikrobiálních kolonií ukotvených k živému nebo neživému povrchu. Tyto kolonie jsou chráněny tzv. maticí, jejíž hlavní složku tvoří polysacharidy. Ta poskytuje mikrobiálním populacím vhodné podmínky pro přežití. Biofilm hraje zásadní roli v obraně mikroorganismů proti nepříznivým vlivům okolního prostředí, mimo jiné proti působení antibiotik a imunitního systému hostitele. Kromě ochrany jim ale poskytuje také relativně stabilní životní prostředí s dostatkem živin. V rámci jeho struktury může také docházet k přenosu genetické informace, včetně genů pro rezistenci, a předpokládá se, že v takové mikrobiální komunitě dochází i ke vzájemné komunikaci. [24; 25] Struktura biofilmu je velmi dynamická a neustále se mění. Je tvořena mnoha vrstvami, které se odlišují nejen podmínkami, které v nich panují (obsah kyslíku, pH,...), ale také složením mikrobiální populace. [26] Složení biofilmu i jeho tloušťka také značně znesnadňují vstup antibiotik. Aby antibiotikum proniklo do biofilmu, musí postupně difundovat přes mnoho jeho vrstev. Tím ale dochází k postupnému snižování koncentrace antibiotika v hlubších vrstvách biofilmu a vzniku subinhibičních koncentrací, jejichž působení podporuje vznik rezistence. Schématické zobrazení vrstev bakteriálního biofilmu viz Obr. 6. [27]

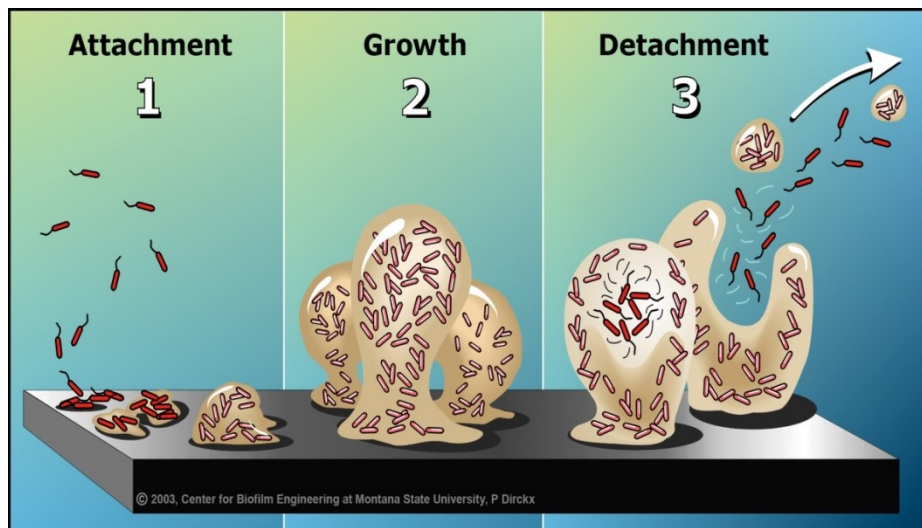


Obr. 6 Schématické zobrazení vrstev bakteriálního biofilmu

Na obrázku je zobrazena zjednodušená struktura bakteriálního biofilmu (A). Obsah kyslíku se postupně snižuje od nejvyšších po nejhlubší vrstvy biofilmu (B). Ve vyšších vrstvách také dochází k rychlému růstu bakterií, v těch hlubších je naopak růst bakterií velmi omezený (C). Bod D zobrazuje omezený průnik antibiotika do biofilmu, který způsobuje nedostatečný účinek na bakterie obývající jeho hlubší vrstvy.

Převzato a upraveno z: Microenvironmental characteristics and physiology of biofilms in chronic infections of CF patients are strongly affected by the host immune response. [27]

Životní cyklus bakteriálního biofilmu je zobrazen na Obr. 7. Začíná přichycením volně plovoucích (flotujících) bakterií k povrchu. Takto přisedlé (sesilní) bakterie začnou produkovat polysacharidovou matici biofilmu a následuje období růstu. V jeho průběhu dochází k odlučování částí biofilmu, které se mohou následně uchytit k jinému povrchu a kolonizovat tak další prostředí. Jedním z faktorů, který pravděpodobně ovlivňuje odlučování biofilmu, je i množství nutrientů v okolním prostředí. [28] Přisednutí bakterií nemusí být trvalé a může dojít k jejich opětovnému přechodu do flotující formy. Přestože je tento způsob přežití pozorován při kultivaci v laboratorních podmínkách, v běžném prostředí bakterie nemají tak příznivé podmínky a je pro ně výhodnější přežít v přisedlé podobě uvnitř biofilmu. [24]



Obr. 7 Životní cyklus biofilmu

Přichycení bakterií k povrchu (1), růst biofilmu (2), odloučení částí biofilmu (3).

Převzato z: http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics/what_are_biofilms.html [29]

3.2.1 Kombinační terapie infekčních onemocnění

Zásadní roli hraje **kombinační terapie** především v terapii velmi závažných infekcí, které není možné zvládnout pouze monoterapií. To platí zejména pro těžké stavy, jako například sepse nebo komplikované nitrobrříšní infekce. [21] V klinické praxi je možné při používání kombinace více přípravků v zásadě rozlišit dva hlavní pojmy, a to **synergie** a **antagonismus** (o těchto pojmech více v kapitole 3.4.5). A právě dosažení synergního účinku dvou (nebo i více) přípravků je cílem kombinační terapie. Synergní účinek se většinou projevívá v případech, kdy obě látky zasahují podobný cíl, nebo na sebe jejich účinek nějakým způsobem navazuje. [8] Konkrétní důvody pro využití kombinační terapie mohou být různé, ale mezi nečastější patří například potřeba dosažení dvojího antibakteriálního účinku, rozšíření spektra účinku použitého přípravku nebo snaha o zabránění rozvoje rezistence (viz dále). [8] Naopak antagonismus je jev, kterému je dobré se při terapii vyhnout. Nesprávně zvolená kombinace antibiotik, která vede ke vzájemnému antagonistickému působení těchto přípravků, totiž může vést přinejmenším ke snížení účinku terapie, v horším případě dokonce k jejímu selhání. To nejen ohrožuje pacienta, ale může také napomáhat rozvoji rezistence.

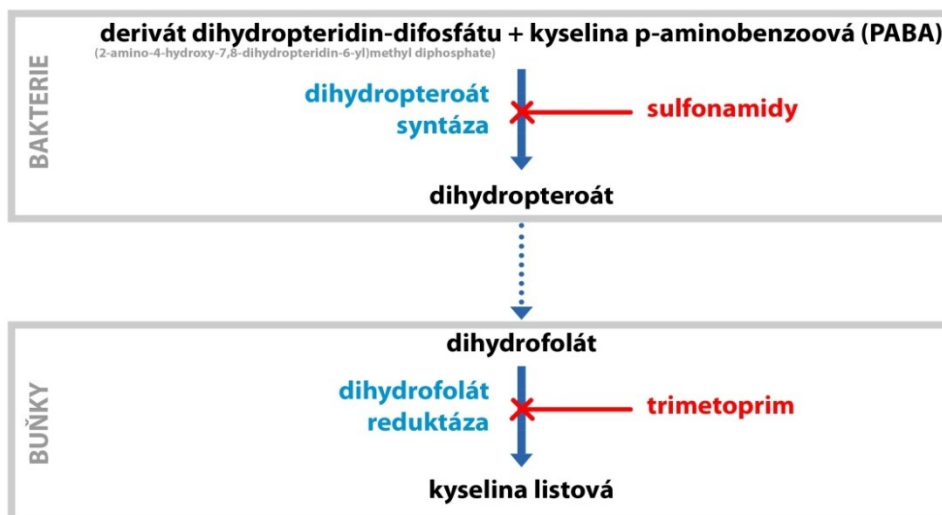
Příkladem situace, kdy je potřeba dosáhnout **dvojího účinku** antibiotik, jsou infekce spojené s tvorbou bakteriálních toxinů. Ta provází například syndrom toxického šoku, který je nejčastěji způsoben bakterií *Staphylococcus aureus* produkující TSST-1 toxin (toxic shock syndrome toxin, toxin syndromu toxického šoku) nebo enterotoxiny, případně bakterií *Streptococcus pyogenes* produkující pyrogenní exotoxiny. Při terapii tohoto onemocnění se využívá kombinace baktericidního β -laktamového antibiotika (nejčastěji oxacilin nebo penicilin, v závislosti na původci) a bakteriostatického klindamycinu. Důvodem použití klindamycinu je jeho schopnost inhibovat proteosyntézu, čímž zabrání tvorbě bakteriálních exotoxinů, které jsou zásadní pro patogenezi tohoto onemocnění. [8; 30]

Rozšíření spektra účinku je potřeba zejména u smíšených infekcí, případně při úvodní terapii těžkých infekcí s nejasným původcem, u kterých zatím nejsou k dispozici výsledky mikrobiologického vyšetření. Příkladem je využití metronidazolu při léčbě nitrobrříšních infekcí, kde lze předpokládat přítomnost anaerobních bakterií. U těchto infekcí se podává nejčastěji v kombinaci s β -laktamovými antibiotiky nebo aminoglykosidy, které pokryjí aerobní část spektra. [8]

Kombinace antibiotik je také jednou z možností, jak u bakterií v průběhu terapie **zabránit rozvoji rezistence**. Jedním z onemocnění, u kterých se tento přístup využívá, je tuberkulóza. Základem je dlouhodobá kombinovaná terapie, která má za úkol zasáhnout původce současně na více úrovních životního cyklu a tím mimo jiné bránit rozvoji rezistence. Ani tato strategie ale není vždy úspěšná a rezistence k používaným léčivům v posledních letech neustále narůstá. V případě rezistentních kmenů *Mycobacterium tuberculosis* je někdy využívána kombinace až pěti antimikrobiálních látek. [31] Dalším typickým příkladem jsou infekce způsobené bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, u kterých dochází často k rozvoji rezistence během terapie. β -laktamové antibiotikum se proto při léčbě pseudomonádových infekcí posiluje přidáním aminoglykosidu. [8]

3.2.1.1 Vybrané mechanismy kombinovaného působení antibiotik

Sulfametoxazol a trimetoprim. Tato kombinace je založena na sekvenční blokádě enzymů při syntéze kyseliny listové, která je pro bakterie důležitá pro následnou syntézu nukleových kyselin (viz Obr. 8). Přestože působí obě antibiotika při samostatném podání pouze bakteriostaticky, jejich kombinovaný účinek je baktericidní. Výhodou je také možnost nižšího dávkování jednotlivých složek a snížení pravděpodobnosti rozvoje rezistence. Standardně používaná kombinace sulfametoxazol a trimetoprim v poměru 5:1 (400mg/80mg) se nazývá **kotrimoxazol**.



Obr. 8 Biosyntéza kyseliny listové

První část schématu popisuje procesy, které probíhají pouze v bakteriálních buňkách, druhá část je společná pro bakteriální i lidské buňky. Ve schématu jsou vyznačena místa zásahu sulfonamidů a trimetoprimu do biosyntézy kyseliny listové.

Převzato z: <http://fblt.cz/skripta/ix-travici-soustava/7-vitaminy-a-vyziva/> [32]

β -laktamová antibiotika a vankomycin. Obě tato antibiotika usmrcují bakterie narušením syntézy jejich buněčné stěny na úrovni spojování jednotek peptidoglykanu. Každé z nich toho ale dosahuje mírně odlišným mechanismem. Zatímco β -laktamová antibiotika blokují enzymy potřebné k tvorbě peptidoglykanové sítě (transpeptidázy), vankomycin se naváže na volné konce peptidových řetězců peptidoglykanu a brání tak jejich spojování. Kombinaci oxacilinu a vankomycinu je možné využít například v terapii infekcí způsobených kmeny *Staphylococcus aureus* se sníženou citlivostí k vankomycinu (VISA)⁵, případně kmeny MRSA. [8; 33; 34; 35]

β -laktamová antibiotika a inhibitory β -laktamáz jsou příkladem kombinace dvou látek, z nichž jedna má pouze zanedbatelný antibakteriální účinek, ale svým působením dokáže podpořit látku, která takový účinek má. Tato kombinace má samozřejmě význam jen u infekcí způsobených bakteriemi s produkcí β -laktamáz. Tyto inhibitory fungují jako

⁵ Jako VISA (vancomycin-intermediate *St. aureus*) jsou označovány kmeny *St. aureus* se sníženou citlivostí k vankomycinu podmíněnou změnou uspořádání vrstvy peptidoglykanu (např. zvýšení tloušťky buněčné stěny, snížení zesíťení peptidoglykanu). Pod označením VRSA (vancomycin-resistant *St. aureus*) se skrývají kmeny s úplnou rezistencí k vankomycinu způsobenou změnou koncové části peptidových řetězců peptidoglykanu. Podstatou je záměna koncového D-alaninu za D-laktát, na který se vankomycin nedokáže navázat. [8; 35]

falešný substrát, čímž omezí degradaci antibiotika. Nedochozí tím k posílení účinku antibiotika, ale spíše ke kompenzaci jeho sníženého účinku. [8]

β -laktamová antibiotika a aminoglykosidy. Mechanismus této synergie dosud není zcela objasněný. Aminoglykosidy prokazatelně inhibují bakteriální proteosyntézu, ale kromě působení na ribozomy se u nich předpokládá také účinek na bakteriální buněčnou stěnu nebo buněčnou membránu. Tyto úvahy jsou založené zejména na rychlém baktericidním účinku aminoglykosidů, kterým se liší od ostatních antibiotik inhibujících bakteriální proteosyntézu. Synergie aminoglykosidů s β -laktamovými nebo glykopeptidovými antibiotiky se využívá například při terapii závažných enterokokových a pseudomonádových infekcí. [8]

Antagonismus bakteriostatických a stěnových antibiotik. Mechanismem antagonistického působení je omezení růstu bakterií vlivem bakteriostatického antibiotika (např. makrolidy, tetracykliny,...), které vede ke snížení baktericidního účinku antibiotik působících na buněčnou stěnu bakterií. Ta totiž cílí primárně na rychle rostoucí bakteriální buňky narušením syntézy jejich buněčné stěny. Pokud je tedy syntéza buněčné stěny vlivem bakteriostatického antibiotika omezena, stěnová antibiotika nemají kde působit. Význam této interakce v běžné praxi není úplně jasný, ale předpokládá se, že by mohla mít negativní vliv na úspěšnost léčby především u těžkých infekcí. [8]

3.3 Vývoj nových antimikrobiálních léčiv

Vývoj nových léčiv je obecně velmi náročný a zdlouhavý proces. Antimikrobiální léčiva mají ale mnohá specifika, která je od jiných léčiv značně odlišují. Asi nejdůležitějším z nich je rozvoj rezistence, díky které u těchto přípravků často dochází k postupné ztrátě účinku. To způsobuje neustálou poptávku po nových látkách, které by dokázaly zasáhnout rezistentní mikroorganismy novým, dosud nevyužívaným mechanismem. S ohledem na rychlost šíření rezistentních bakteriálních kmenů se ale stále více ukazuje, jak obtížné je s tímto trendem udržet krok. I proto je důležité hledat inovativní způsoby vývoje nových antiinfektiv.

Základním požadavkem na látky s antibakteriálním působením je selektivita pro bakteriální buňky a zároveň co nejmenší toxicita pro buňky lidské. To komplikují mimo jiné poměrně vysoké koncentrace antibiotik, kterých je potřeba dosáhnout pro efektivní usmrcování bakterií. Na rozdíl od jiných léčiv se u nich totiž není možné spokojit pouze s částečným účinkem, který není dostatečný pro vyléčení infekce a může vést k rozvoji rezistence z důvodu působení subinhibičních koncentrací antibiotika. Obzvláště důležité je dosažení vyšších koncentrací u špatně dostupných infekčních ložisek, u kterých je prostup antibiotika omezený (viz kapitola 3.2). [36]

Problematická je také finanční stránka vývoje nových antibiotik. Výrobci potřebují, aby jim jejich léčiva přinášela dostatečný zisk, který slouží nejen k pokrytí nákladů za vývoj daného léčiva (až několik miliard dolarů), ale také jako zdroj příjmů pro financování dalšího výzkumu. Antibiotika se ale od jiných léčiv liší tím, že bývají po uvedení na trh často rovnou zařazena mezi rezervní přípravky a jejich předepisování je tak poměrně omezené. Také doba terapie je většinou poměrně krátká a i přes vyšší cenu nových přípravků je pro výrobce výhodnější vyvíjet jiné skupiny léčiv, které jsou určeny spíše pro dlouhodobou terapii. Antibiotika tak nejsou z pohledu zisku dostatečně atraktivní, navíc je jejich vývoj v mnoha ohledech náročnější než u jiných skupin léčiv. V posledních letech také tento sektor opouští stále více velkých farmaceutických firem (Novartis, Sanofi, AstraZeneca,...), což dále snižuje přísun nových antibiotik na trh. [37]

Z těchto důvodů se čím dál častěji objevuje snaha podpořit výzkum antibiotik pomocí různých finančních pobídek a výjimek, které mají farmaceutické firmy motivovat k vývoji nových přípravků. [8] Financováním vývoje nových antibiotik se zabývá i mezinárodní

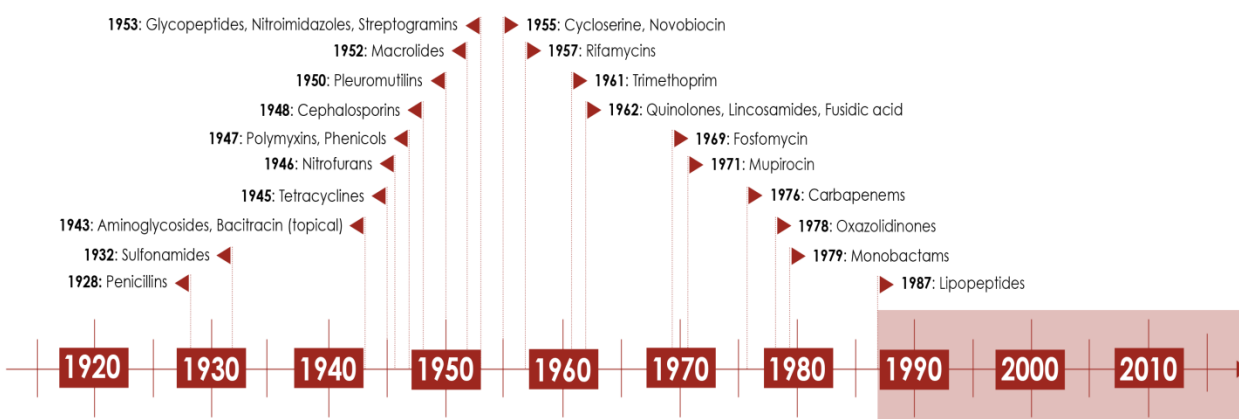
nezisková organizace s názvem **Globální partnerství pro výzkum a vývoj antibiotik** (GARDP, Global Antibiotic Research and Development Partnership), která za pomoci veřejných prostředků podporuje výzkum v soukromém sektoru. Tato organizace vznikla roku 2016 v návaznosti na Globální akční plán pro boj s antimikrobiální rezistencí WHO a má napomáhat realizaci jeho cílů. Svou pozornost zaměřuje primárně na boj s rezistentními bakteriemi, které WHO považuje za prioritní v oblasti výzkumu a vývoje (viz kapitola 3.1). Heslem této organizace pro období let 2020-2025 se stalo „**5 BY 25**“, což vyjadřuje cíl vyvinout nejméně pět nových způsobů léčby bakteriálních infekcí vyvolaných rezistentními kmeny do roku 2025. Mezi hlavní oblasti zájmu této organizace patří léčba infekcí u dětí (např. novorozenecká sepsa) a sexuálně přenosných onemocnění, protože jim není podle GARDP v oblasti výzkumu věnována dostatečná pozornost. Svého cíle nechce tato organizace dosáhnout pouze vývojem nových léčiv, ale věnuje se také dodatečným studiím prováděným u již používaných léčiv. Tuto strategii uplatňuje především v pediatrii, kde například financuje klinické studie zaměřené na používání již registrovaných přípravků u pediatrických pacientů, u kterých jejich užívání často brání pouze opatrnost z důvodu nedostatku údajů z klinických studií. Mezi další strategie patří také snaha o znovuzavedení do praxe některých starších přípravků nebo zkoušení kombinací různých již využívaných přípravků. V oblasti výzkumu nových léčiv se momentálně GARDP podílí například na vývoji nového antibiotika pro léčbu kapavky.⁶ [38] Obecně se tato organizace zaměřuje především na podporu pokročilejších fází klinického hodnocení léčiv, čímž chce dosáhnout urychlení vstupu těchto přípravků na trh. [39]

3.3.1 Historie vývoje antibiotik

Počátky cíleného využívání antibiotik v léčbě bakteriálních infekcí spadají již do počátku 20. století. Do té doby byly v jejich léčbě využívány například různé sloučeniny rtuti nebo arsenu, které ale byly jen málo účinné, zato značně toxické. Arsen byl základem také prvního léčiva, které bylo úspěšně využíváno v terapii syfilidy. Sloučenina arsfenamin, jejímž autorem je německý chemik Paul Ehrlich, byla uvedena na trh v roce 1910 pod komerčním názvem Salvarsan a byla využívána (později v upravené podobě s nižší toxicitou

⁶ Lék s názvem zoliflodacin (ETX0914) působí jako inhibitor bakteriálních topoizomeráz typu II. Mechanismus účinku je podobný jako u fluorochinolonů, způsob inhibice topoizomeráz je ale mírně odlišný a nebyla prokázána zkřížená rezistence zoliflodacinu s fluorochinolony. Kromě účinku na *Neisseria gonorrhoeae* působí i na jiné gramnegativní i grampozitivní bakterie, například *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus* spp. nebo *Streptococcus* spp. Zoliflodacin se momentálně nachází ve třetí fázi klinického hodnocení. [38; 39]

jako Neosalvarsan) až do 40. let, kdy ji nahradil penicilin. V polovině 30. let se díky německému lékaři Gerhardu Domagkovi objevil na trhu nový přípravek s názvem Prontosil, který byl prvním zástupcem antibiotik ze skupiny sulfonamidů. Tuto skupinu bohužel již od počátku provázely problémy s rychlým rozvojem rezistence, přesto jsou někteří její zástupci využíváni v terapii dodnes. Pravý rozmach užívání antibiotik přinesl až příchod asi nejznámějšího antibiotika, penicilinu. Přestože byl objeven skotským lékařem Alexanderem Flemिंगem již v roce 1928, na jeho terapeutické využití došlo až po roce 1940, kdy ho na univerzitě v Oxfordu poprvé úspěšně izolovali Howard Florey a Ernest Chain. Masově pak začal být penicilin produkován až na konci druhé světové války. Až do 60. let pokračovala tzv. **zlatá éra antibiotik**. Během tohoto období došlo k objevu většiny skupin používaných antibiotik a po jejím konci tempo vývoje rychle přestalo stačit poptávce po nových léčivech pro boj s narůstající rezistencí (viz Obr. 9). [8; 36; 40]



© ReAct Group 2015

Obr. 9 Časová osa vývoje nových antibiotik

Časová osa s roky objevení nových skupin antibiotik. Část osy označená červeně vyznačuje období, kdy nedošlo k objevu žádné významné skupiny antibiotik s novým mechanismem účinku.

Převzato a upraveno z: <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/how-did-we-end-up-here/few-antibiotics-under-development/> [41]

Mezi nejnovější léčiva, která se v posledních letech objevila na trhu, patří například **linezolid** (2000). Je zástupcem skupiny oxazolidinonů, které účinkují jako inhibitory bakteriální proteosyntézy. Přestože byla tato skupina objevena již v 70. letech, větší pozornost jí byla věnována až na přelomu tisíciletí. Jako zatím poslední zástupce této

skupiny byl v roce 2014 schválen **tedizolid**. Oxazolidinony jsou využívány v léčbě infekcí způsobených rezistentními grampozitivními bakteriemi (např. MRSA, VRE), některé látky z této skupiny jsou zkoušeny i v terapii tuberkulózy. Dalším poměrně novým léčivem je lipopeptidové antibiotikum **daptomycin**. To bylo objeveno v 80. letech, ale na trh se dostalo až v roce 2003. Mechanismem jeho účinku je rozrušení buněčné membrány bakterií, které vede k jejich usmrcení. Podobně jako oxazolidinony je daptomycin účinný proti grampozitivním bakteriím. Další skutečností, kterou mají oxazolidinony a daptomycin společné, je jejich dlouhá cesta před uvedením na trh. Vývoj oxazolidinonů byl brzy po jejich objevení ukončen pro přílišnou toxicitu, daptomycin neprošel klinickým zkoušením kvůli obavám ze závažných nežádoucích účinků. V 90. letech ale dostala tato antibiotika druhou šanci a po dalším vývoji se je podařilo uvést na trh. [8; 42]

3.3.2 Nové přístupy k léčbě bakteriálních infekcí

Vývoj nových antibakteriálních léčiv je stále velmi důležitou součástí boje proti rezistentním bakteriím. V současné době ale přibývá množství inovativních přístupů, které nespolehnají jen na nová léčiva. Vyvíjet antibiotika s úplně novým mechanismem účinku je totiž stále složitější a častá je proto například snaha o opětovné využití již existujících léčiv. Může jít o využití starších, již nepoužívaných přípravků, nebo podporu účinku používaných přípravků kombinací s jinou látkou. Existuje také řada experimentálních přístupů k léčbě bakteriálních infekcí. Mezi ně patří například imunoterapie (využití monoklonálních protilátek k vychytávání bakteriálních toxinů, značení bakterií pro podporu fagocytózy,...), využití bakteriofágů, inhibitorů tvorby bakteriálních biofilmů, inhibitorů bakteriální komunikace prostřednictvím „*quorum sensing*“⁷ nebo metody cílené na ovlivnění mikrobiomu. Objevují se také pokusy o využití různých hemofiltračních zařízení, která by dokázala odfiltrovat bakterie z krevního oběhu. Všechny tyto postupy jsou ale stále ve fázi výzkumu a jejich využití v klinické praxi je zatím v nedohlednu. Protože tyto metody většinou nejsou schopné bakterie přímo usmrcovat, předpokládá se jejich využití především jako doplněk k antibiotické terapii. [43; 44; 45]

Jednou z možných cest, jak zajistit přísun nových antibakteriálních látek, je i tzv. „**drug repurposing**“. Obecně se jedná o strategii, kdy jsou léčiva zkoumána pro jinou indikaci, než

⁷ Jako *quorum sensing* je označován komunikační systém bakterií, který slouží k regulaci genové exprese na základě denzity okolní bakteriální populace. [45]

pro kterou byla původně registrována. Výhodou tohoto přístupu je urychlení případných klinických studií vedoucích k uvedení takového léčiva na trh, protože jsou známy jeho farmakologické vlastnosti a jeho bezpečnost byla již jednou v rámci klinického zkoušení ověřována. I takový přístup ale má svá úskalí. Přestože daná látka může *in vitro* vykazovat i aktivitu, která se odlišuje od původní indikace, ne vždy je možné ji k tomuto účelu v klinické praxi opravdu využít. Problémem může být například příliš vysoké dávkování nutné pro dosažení požadovaného účinku. Je také snaha začít znovu využívat stará, již nepoužívaná antibiotika. Někdy jsou použita pouze jako základ pro vývoj nových sloučenin s výhodnějšími vlastnostmi, jindy jsou využívána v nezměněné podobě. U některých léčiv může být například zmírněna toxicita pouhou změnou dávkovacího schématu (např. aminoglykosidy, daptomycin,...). [46; 47]

Příkladem již existujícího léčiva, které by mohlo najít využití v terapii bakteriálních infekcí, je antidiaroeikum **loperamid**. Vlastní antibakteriální aktivitu sice nevykazuje, byla u něj ale prokázána schopnost podpořit účinek tetracyklinových antibiotik proti některým gramnegativním bakteriím, a to ovlivněním protonového gradientu a zvýšením prostupu antibiotika přes buněčnou membránu. *In vivo* byla například prokázána synergie mezi loperamidem a minocyklinem proti *Salmonella* Typhi. [48] Dalším příkladem může být **celecoxib**. Ten, podobně jako loperamid, nemá vlastní antibakteriální účinek, ale dokáže podpořit účinek antibiotik mechanismem blokování funkce efluxních pump, které snižují efekt antibiotik jejich odčerpáváním z bakteriální buňky. [49]

Perspektivním přístupem v boji s rezistencí se zdá být kombinace antibiotik. Tradiční způsob vývoje nových antibiotik je založen na hledání jedné sloučeniny, která bude zasahovat jeden konkrétní cíl. A právě tato vlastnost se ukazuje jako problematická s ohledem na vznik rezistence, protože k rozvoji rezistence k těmto látkám často stačí mutace jediného genu. Jako příklad mohou sloužit sulfonamidy, které zasahují jeden konkrétní enzym (dihydropteroát syntáza) a jsou díky tomu náchylnější k rozvoji rezistence. Oproti tomu antibiotika, která cílí zároveň na několik molekulárních struktur, mají nižší potenciál pro rozvoj rezistence, protože je pro bakterie složitější jejich působení odolávat. Tento způsob účinku je pak typický především pro antibiotika získaná z přírodních zdrojů. Mikroorganismy chrání se v přírodě pomocí antimikrobiálních látek ale zpravidla nevyužívají jen jednu sloučeninu. Naopak vytvářejí směsi různých látek s antimikrobiálním

účinkem, které poskytují mnohem efektivnější obranu proti konkurenčním organismům. Na stejném principu je založena i strategie kombinace antibiotik. Nejčastěji jsou využívány kombinace již existujících antibiotik, případně jejich kombinace s látkami, které vlastní antibakteriální aktivitu nemají a účinek antibiotik pouze doplňují. Souvisí to mimo jiné s problematickým vývojem kombinace dvou nových látek, který by byl mnohem složitější a nákladnější než testování pouze jedné nové sloučeniny. [36]

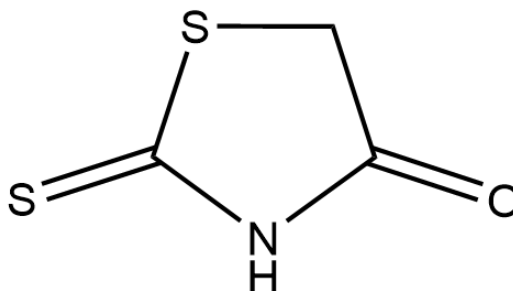
Látky, které bez vlastní antibakteriální aktivity doplňují účinek antibiotik, jsou označovány jako tzv. **antibiotická adjuvancia**. Ta se podle způsobu účinku dělí do dvou tříd. Třída I zahrnuje látky, které podporují účinek antibiotika ovlivněním mechanismů rezistence na úrovni bakterií, látky patřící do třídy II působí naopak ovlivněním hostitele a posilují účinek antibiotika podporou jeho přirozené obranyschopnosti. První třídu je možné ještě dále rozdělit na třídu Ia, která cílí na ovlivnění mechanismů získané rezistence, a třídu Ib, která ovlivňuje přirozené mechanismy napomáhající bakteriím odolávat účinku antibiotik. Všechna dosud využívaná antibiotická adjuvancia spadají do třídy Ia, ostatní třídy jsou zatím pouze předmětem výzkumu. Příkladem látek patřících do třídy Ia jsou inhibitory β -laktamáz, které působí na enzymy produkované bakteriemi pouze za účelem omezení účinku antibiotik. Do této skupiny se řadí také výše zmíněný celekoxib, který blokuje efluxní systémy spojené s rezistencí. Do třídy Ib patří například blokátory některých metabolických drah nebo experimentální inhibitory různých nescifických efluxních systémů, které se podílí na běžném metabolismu buňky, ale bakterie je dokážou využít také k efluxu antibiotik. K této třídě je možné zařadit také loperamid, který usnadňuje prostup antibiotik přes buněčnou membránu. Třída II poté zahrnuje imunomodulační látky, které podporují odpověď hostitelského organismu vůči bakteriím. [50]

3.3.3 Rhodaninové deriváty jako strukturní základ nových léčiv

Jednou ze skupin, které jsou zkoumány pro svůj potenciální antibakteriální účinek, jsou i rhodaniny. Základem těchto derivátů je rhodanin, chemicky 2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on (viz Obr. 10), který je dále substituován za vzniku derivátů s poměrně širokou škálou farmakologických účinků. Rhodaniny jsou nejčastěji substituovány na uhlíku v poloze 5, dále na dusíku v poloze 3, případně v obou těchto polohách rhodaninového jádra. V případě derivátů se substitucí v poloze 5 se pak jedná především o tzv. 5-en rhodaniny,

tedy deriváty se substituentem v poloze pět, který je na rhodaninové jádro připojen dvojnou vazbou. [51]

Látky z této skupiny jsou známy již od druhé poloviny minulého století a byly zkoumány například jako protinádorová léčiva, antidiabetika, protizánětlivá léčiva, ale také pro své antibakteriální účinky. Přesto našla zatím v praxi uplatnění jen jedna látka z této skupiny, a to v oblasti prevence vzniku pozdních komplikací diabetu (viz dále). [52] Mechanismus účinku rhodaninů se vzhledem k jejich strukturní rozmanitosti nedá zobecnit a je závislý na konkrétní modifikaci základní struktury. Podle dostupných údajů se zdá, že nebývají výrazně toxické a nejsou ani považovány za mutagenní. Vlastnosti těchto látek se ale v závislosti na struktuře mohou značně lišit. [52; 53]



Obr. 10 Strukturní základ látek ze skupiny derivátů rhodaninu (2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on)

3.3.3.1 Antibakteriální aktivita

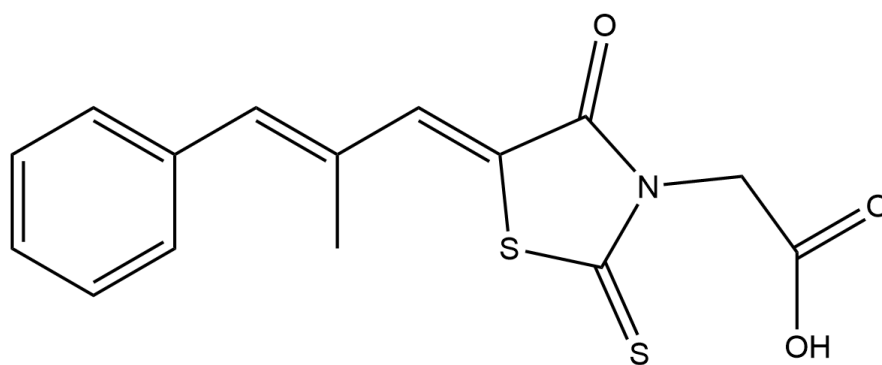
Snad i díky strukturní podobnosti s β -laktamovými antibiotiky byl u některých rhodaninových derivátů prokázán inhibiční vliv na syntézu buněčné stěny, látky z této skupiny ale mohou účinkovat například i jako inhibitory β -laktamáz. [54] U některých strukturních typů se dále předpokládá také inhibiční vliv na různé jiné bakteriální enzymy (např. na sortázu A u *Staphylococcus aureus* [55] nebo UDP-galaktopyranóza mutázu u *Mycobacterium tuberculosis* [56]). Obecně rhodaniny vykazují aktivitu spíše proti grampozitivním bakteriím [57], včetně meticilin-rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus*. [58] Zdá se, že pro antibakteriální aktivitu je důležitá především 5-en substituce. Význam v tomto případě má také halogenace takového substituentu. [59; 60] Pozitivně ovlivnit antibakteriální aktivitu je možné také substitucí na dusíku v poloze 3. [61; 62]

3.3.3.2 Protinádorová aktivita

Kromě antibakteriální aktivity je v oblasti výzkumu derivátů rhodaninu často zkoumána i jejich potenciální protinádorová aktivita. Pozornost je zaměřena především na jejich možné využití v terapii leukémie. [63; 64] Mechanismem jejich protinádorového účinku se zdá být zejména indukce apoptózy, případně zásah do buněčného dělení. [65; 66] Kromě aktivity proti leukemickým buňkám byla například zkoumána aktivita také proti buňkám kolorektálního karcinomu, plicního karcinomu nebo hepatocelulárního karcinomu. [67] Strukturální obměny rhodaninů v oblasti výzkumu protinádorových léčiv jsou velmi rozmanité. [51] Protinádorový účinek ale vykazují i poměrně jednoduché molekuly, výraznou aktivitu proti leukemickým buňkám prokázal například 5-benzyliden-3-ethyl rhodanin. [65]

3.3.3.3 Antidiabetická aktivita

Dobře známá je také antidiabetická aktivita rhodaninových derivátů. I přes jejich nápadnou strukturální podobnost s thiazolidindiony (glitazony), které působí agonisticky na receptoru PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor, receptor aktivovaný proliferátorem peroxizomů) a využívají se jako antidiabetika, jsou ale rhodaninové deriváty zkoumány spíše jako nové inhibitory aldehyd reduktázy v terapii pozdních komplikací diabetu. Na tomto principu účinkuje i léčivo s názvem epalrestat (viz Obr. 11), které bylo jako zatím jediné léčivo s rhodaninovou strukturou uvedeno do praxe. Aldehyd reduktáza přeměňuje glukózu na sorbitol, jehož intracelulární akumulace se podílí na patogenezi pozdních komplikací diabetu. [68] Toto léčivo je využíváno jako základní struktura pro látky v této skupině, obměny se zaměřují především na substituent v poloze 5. [69] I rhodaniny ale prokázaly agonistický účinek na PPAR receptorech, podobně jako glitazony. [70] Mimo to byla také například zkoumána možnost využití rhodaninových derivátů jako inhibitorů α -glukosidázy. [71]



Obr. 11 Strukturní vzorec léčiva epalrestat (inhibitor aldehyd reduktázy)

3.4 Hodnocení citlivosti bakterií k antibakteriálním látkám

Testování citlivosti bakterií k antibiotikům je základním kamenem mikrobiologické diagnostiky při terapii bakteriálních infekcí a slouží také k monitorování aktuální situace na poli antibiotické rezistence. Účelem stanovení citlivosti bakterií k antibiotikům je odpovědět na otázku, jestli budou reagovat na terapii konkrétním antibiotikem v běžně používaném dávkování. Takové zhodnocení probíhá na základě přesně daných kritérií, která určují hraniční hodnoty jednotlivých kategorií citlivosti. Kritéria pro hodnocení citlivosti jsou přesně definována mezinárodními autoritami a jsou pravidelně revidována na základě aktuálních dat o rezistenci. Mezi základní metody testování citlivosti patří disková difúzní metoda, E-test a bujónová diluční metoda. V průběhu let prošly tyto metody různými proměnami a došlo u nich v různé míře také k zavedení automatizace. [72] Kromě těchto základních metod existuje také mnoho nových přístupů k hodnocení citlivosti bakterií k antibiotikům, které jsou často založeny na genotypizaci daných bakterií. [73]

3.4.1 Autority v oblasti hodnocení citlivosti

Aby bylo možné klinicky využít výsledky testů prováděných k určení citlivosti bakterií k antibiotikům, je nutné určit závazné parametry, které odliší citlivé a rezistentní kmeny. K tomu slouží tzv. **klinické breakpointy**, které vyjadřují hraniční hodnotu parametru, od které je již bakterie považována za rezistentní a léčba daným antibiotikem tak bude pravděpodobně neúspěšná. Hodnoty breakpointů nejsou jednotné a liší se v závislosti na organizaci, která je vydala. Pro evropské státy je závazná metodologie **Evropské komise pro testování antimikrobiální citlivosti** (EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Tato komise spadá pod **Evropskou společnost klinické mikrobiologie a infekčních nemocí** (ESCMID, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) a ECDC. Hlavním úkolem EUCAST je určovat a pravidelně revidovat klinické breakpointy, podílí se ale také na vývoji a standardizaci metod pro testování citlivosti. [74] Na základě klinických breakpointů jsou bakterie zařazeny do třech kategorií citlivosti. Od roku 2019 došlo ke změnám v definicích těchto kategorií podle EUCAST. Původní terminologie využívala označení **C** (citlivý), **I** (intermediární) a **R** (rezistentní). Bakterie je označena jako citlivá, pokud je jí způsobenou infekci možné léčit běžnými dávkami daného antibiotika. Intermediární kategorie vyjadřuje, že účinek antibiotika je nejistý a jeho použití je vhodné zejména v případě, kdy je možné dosáhnout zvýšené

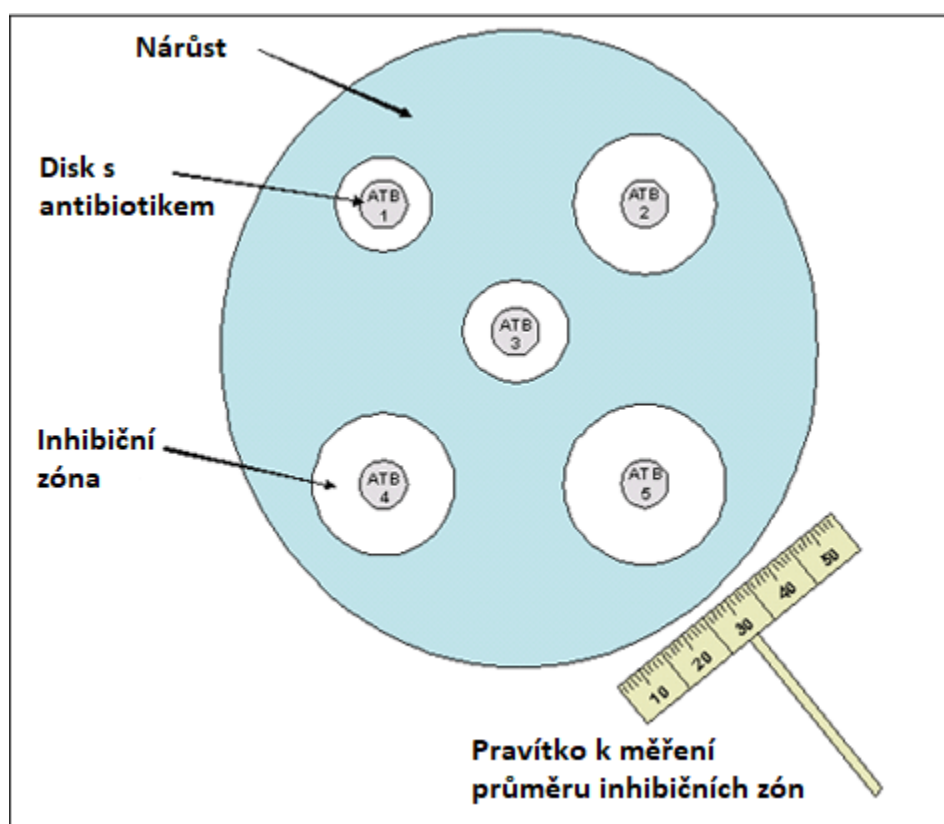
koncentrace antibiotika v místě infekce (např. v případě jeho kumulace v dané tělesné struktuře nebo při možnosti použití vyššího dávkování). Označení R pak znamená vysokou pravděpodobnost selhání terapie. Změna definic se do určité míry dotkla všech tří kategorií, nejvýraznější je ale u kategorie I. Ta se nově nazývá „citlivý, zvýšená expozice“ a má vyjadřovat situaci, kdy je bakterie k antibiotiku citlivá, ale pouze za podmínky zvýšené expozice. Došlo tak ke zpřesnění původní definice, která nebyla příliš konkrétní. I přes změnu názvu ale bylo zachováno již vžitě označení „I“. [75] Mimo klinických breakpointů EUCAST publikuje také tzv. **epidemiologické cut-off hodnoty** (ECOFF, epidemiological cut-off value), což jsou hraniční hodnoty citlivosti, které neslouží k rozhodování o volbě vhodné terapie, ale jsou určeny pro odlišení kmenů se získanou rezistencí. Taková hodnota by tedy měla odpovídat nejvyšší zjištěné hodnotě daného parametru u kmenů bez mechanismů získané rezistence. [76]

Další mezinárodně uznávanou autoritou v oblasti testování citlivosti k antibiotikům je americký **Institut pro klinické a laboratorní standardy** (CLSI, The Clinical and Laboratory Standards Institute). Metodiky této organizace jsou využívány primárně v USA, ale také v mnoha mimoevropských zemích. Hodnoty breakpointů EUCAST a CLSI se do určité míry liší, významným rozdílem je ale zejména dostupnost těchto breakpointů a metodik. CLSI totiž vyžaduje pro přístup ke svým metodikám placení ročního členského poplatku, zatímco všechny materiály vydané EUCAST jsou volně přístupné na jejich internetových stránkách. Z těchto důvodů některé státy zvažují přechod od CLSI k EUCAST, výhodné by to mohlo být zejména pro státy s nízkými příjmy. [77; 78]

3.4.2 Disková difúzní metoda

Jedná se o kvalitativní metodu hodnocení citlivosti k antibiotikům, jejímž základem je využití papírových disků napuštěných definovanou koncentrací antibiotika. Antibiotikum následně difunduje do okolí a jeho působením na bakterie se vytváří tzv. **inhibiční zóna**, jejíž průměr je úměrný citlivosti bakterie k danému antibiotiku (viz Obr. 12). Dle metodiky EUCAST je standardizovanou půdou pro tuto metodu **Mueller-Hinton agar**, pro náročné bakterie se tento agar dále obohacuje o 5 % mechanicky defibrinovanou koňskou krev a 20 mg/l β -NAD (β -nikotinamidadenin dinukleotid). Plotna se očkuje bakteriální suspenzí upravenou na 0,5 stupně podle McFarlanda (odpovídá přibližně $1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml). Po naočkování jsou na plotnu aplikovány antibiotické disky a probíhá inkubace při 35°C po

dobu 16-20 hodin. Hodnocení se provádí na základě měření průměru inhibičních zón, jejichž hodnota je porovnána s tabulkovými hodnotami pro jednotlivé kategorie citlivosti konkrétní kombinace bakterie a antibiotika. [79] Výhodami tohoto testu jsou jednoduchost provedení a poměrně nízká cena v porovnání s jinými testy. Provedení testu nevyžaduje žádné speciální laboratorní vybavení, bohužel se ale také poměrně těžko automatizuje. [72] Přesto existují různé automatizované systémy pro měření průměru inhibičních zón, nejsou ale tak široce využívané jako u jiných metod. Tyto systémy mají za cíl především eliminaci lidského faktoru a zrychlené vyhodnocování výsledků. [80]



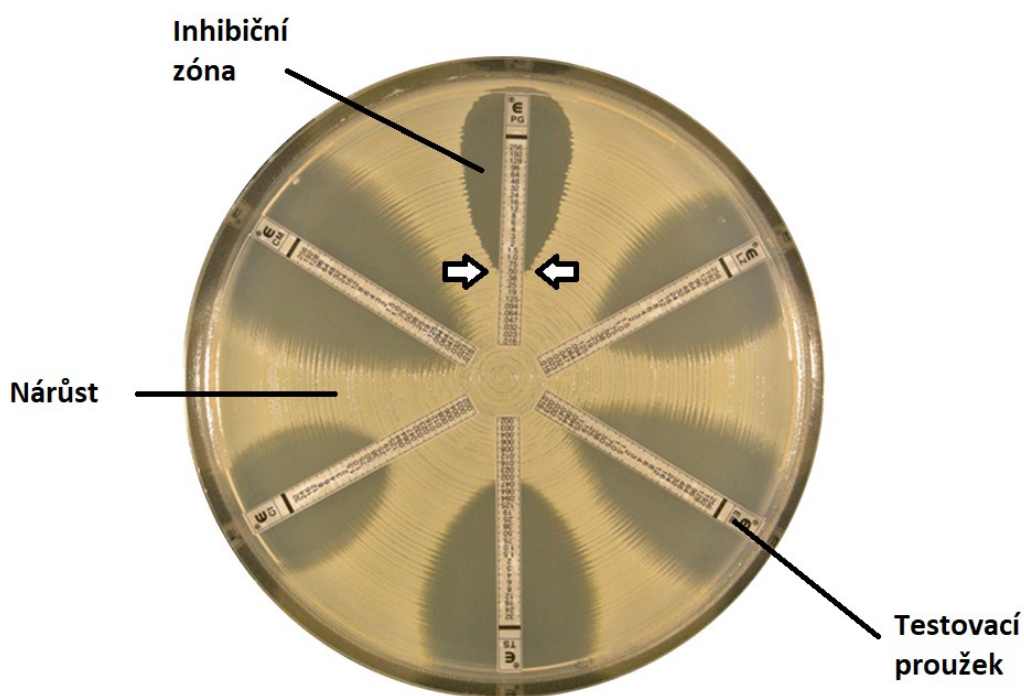
Obr. 12 Schématické zobrazení diskové difúzní metody

Převzato a upraveno z: <https://microbeonline.com/why-mueller-hinton-agar-is-used-in-routine-antibiotic-susceptibility-testing/> [81]

3.4.3 E-test

Další metodou využívající princip difúze antibiotika do agaru je E-test. Na rozdíl od diskové difúzní metody je využívána tzv. gradientová difúze. Místo antibiotického disku s danou koncentrací antibiotika je využíván proužek s odstupňovanými koncentracemi

antibiotika, který umožňuje kvantitativní vyhodnocení výsledku testu. V místě protnutí inhibiční zóny se stupnicí na proužku s antibiotikem je možné odečíst hodnotu tzv. **minimální inhibiční koncentrace** (MIC, minimum inhibitory concentration), což je nejmenší koncentrace antibiotika, která inhibuje bakteriální růst (viz Obr. 13). Hodnocení citlivosti pak probíhá podobně jako u předchozího testu porovnáním s referenčními hodnotami danými mezinárodní autoritou (např. EUCAST, CLSI,...). Na rozdíl od diskové difúze a bujónové diluční metody ale není E-test standardizovanou metodou. Výhody tohoto testu jsou podobné jako u diskové difúze, tedy především jednoduchost provedení a nenáročnost na vybavení. Navíc je tento test schopen poskytnout nejen kvalitativní údaj o citlivosti bakterie, ale také kvantitativní hodnotu MIC. Přestože tento test obecně poskytuje výsledky srovnatelné s ostatními metodami, může docházet k odchýlkám od hodnot standardizovaných s využitím jiné metody (disková difúze, bujónová diluční metoda). [72; 82; 83]



Obr. 13 Fotografie demonstrující provedení E-testu

Na plotně je zaočkovaný jeden bakteriální kmen a je testována jeho citlivost vůči šesti vybraným antibiotikům pomocí antibiotických proužků. Mléčně zakalená plocha odpovídá nárůstu bakterie, projasněná místa odpovídají inhibiční zóně, kde byl vlivem difúze antibiotika do agaru potlačen bakteriální růst. Šipky znázorňují místo odečtu hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC).

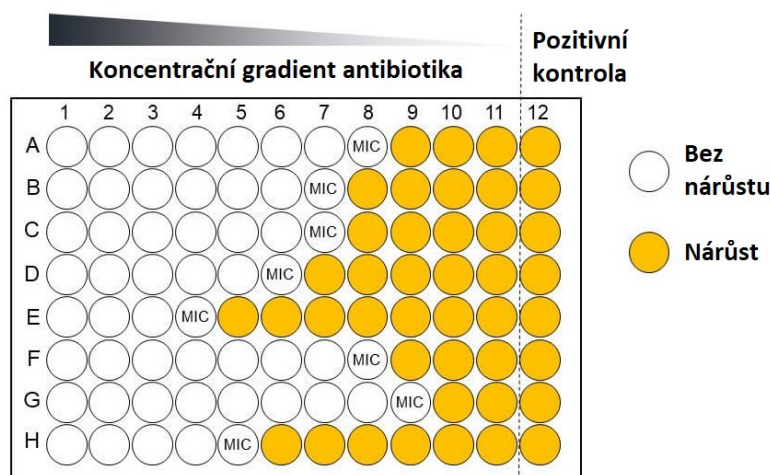
Převzato a upraveno z: <https://www.biomerieux-industry.com/products/etest> [84]

3.4.4 Bujónová diluční metoda

Jedná se o jednu z nejstarších metod pro určování citlivosti bakterií k antibiotikům, jejíž počátky sahají až do 19. století. Na rozdíl od dříve zmiňovaných metod není k testování použita pevná půda, ale tekuté médium. Principem je využití dvojkové ředící řady antibiotika v živném médiu, do kterého je pipetována bakteriální suspenze. Po inkubaci je sledován nárůst bakterií a první koncentrace, při které již není pozorován růst bakterií (který se projeví zákalem), odpovídá hodnotě MIC. Je to tedy nejnižší koncentrace, při které již dochází k inhibici bakteriálního růstu vlivem antibiotika. [73]

Starším postupem je tzv. **makrodiluční metoda**, kdy jsou k provedení testu využity zkumavky. Tato metoda je ale náročná na spotřebu materiálu a neumožňuje testování více antibiotik současně. Z těchto důvodů je v současnosti využívána zejména tzv. **mikrodiluční metoda**, kdy jsou zkumavky nahrazeny mikrotitrační destičkou (viz Obr. 14). Při její přípravě se pracuje s velmi malými objemy a tato metoda také pomáhá výrazně navýšit kapacitu testování. Nejčastěji je využívána 96-jamková destička, která umožňuje zároveň testovat citlivost až ke dvanácti antibiotikům. Výhodou je také možnost automatizace odečítání výsledků a jejich zpracování počítačovým programem, což zvyšuje přesnost hodnocení. V porovnání s předchozími postupy je ale tato metoda pracnější a více časově náročná. [72; 73] Hodnocení standardně probíhá pouhým okem, je ale možné provádět také spektrofotometrickou detekci. [85] Bujónová mikrodiluční metoda je referenční metodou pro stanovování hodnot MIC podle metodiky EUCAST.⁸ [86] Ta doporučuje pro testování využívat **Mueller-Hinton bujón s upravenými kationty** (CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth), v případě kultivace na nutriční náročnějších bakterií je pak bujón obohacen o 5 % mechanicky defibrinovanou koňskou krev a 20 mg/l β -NAD. [87]

⁸ Výjimkou jsou mecililam a fosfomycin, u nichž je za referenční považována agarová diluční metoda.



Obr. 14 Stanovení hodnoty minimální inhibiční koncentrace pomocí mikrodiluční bujónové metody

Příklad stanovení hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC). Ta odpovídá nejnižší koncentraci, při které již dochází k inhibici růstu bakterií a v jamce není patrný nárůst (zákal).

Převzato a upraveno z: <https://emerypharma.com/biology/minimum-inhibitory-concentration/> [88]

3.4.5 Testování synergie antibakteriálních látek

Pro testování citlivosti bakterií k antibakteriálním látkám existují spolehlivé standardizované metody, které jsou ale primárně určeny pro zkoumání účinku pouze jedné látky. Aby mohl být zkoumán efekt kombinace více látek, musí být možné takovou metodou posoudit, jak se liší účinek dané kombinace od samostatného účinku jednotlivých složek. Výsledkem takové testu může být buď synergie, aditivita, indiference nebo antagonismus zkoušených látek. **Synergie** vyjadřuje situaci, kdy je účinek kombinace větší než součet účinků jednotlivých složek. Pokud účinek odpovídá prostému součtu účinků obou složek, lze ho označit za **aditivní**. V případě **indiference** se látky vzájemně neovlivňují, **antagonismus** pak nastává v případě, že je výsledný účinek nižší než účinek jednotlivých složek použitých samostatně. Pro zkoušení kombinovaného účinku je možné využít různé postupy, zpravidla se jedná o modifikace metod, které se běžně využívají pro zkoumání aktivity antibakteriálních látek. Ani jedna z těchto metod ale zatím není považována za standardní a neexistují ani dostatečná data, která by dokládala korelaci výsledků *in vitro* s následnou úspěšností terapie v praxi. [89]

Pro testování synergie je možné využít například modifikovaný **E-test**. Oproti běžnému testování jsou využity dva testovací proužky, které jsou na agar umístěny kolmo na sebe.

Další možností je nejprve použít proužek s jedním antibiotikem, který je po určité době odebrán, nahrazen proužkem s druhým antibiotikem a je zhodnocen jejich kombinovaný účinek. [90] E-test může být také kombinován s metodou agarové difúze, kdy je využita fixní koncentrace jednoho antibiotika přímo v agaru a testovací proužek s koncentračním gradientem druhého. [91] Předností tohoto testu je především jednoduchost provedení, tímto způsobem je ale možné testovat jen kombinace látek, které jsou dostupné ve formě komerčních testovacích proužků. Další metodou využívanou pro testování synergie je tzv. „**time-kill**“ test. Zhodnocení kombinovaného účinku v tomto případě probíhá na základě křivky usmrcování bakterií v čase. Provedení je založeno na bujónové makrodiluční metodě, kdy jsou nejprve zjištěny hodnoty MIC pro každou látku zvlášť a následně pro jejich kombinace v různých poměrech. V pravidelných intervalech jsou odebírány vzorky pro kultivaci. Tento test je považován za spolehlivý, ale jeho nevýhodou je velká časová náročnost, což do značné míry limituje jeho rutinní používání. [90]

Na principu bujónové mikrodiluce je založena tzv. „**checkerboard**“ metoda (z angl. checkerboard – šachovnice). Principem je pipetování gradientu koncentrací obou zkoušených látek do mikrotitrační destičky, jedna z látek je ale pipetována ve svislém a druhá ve vodorovném směru. V jednotlivých jamkách tak vzniknou všechny možné kombinace těchto látek v daném koncentračním rozmezí. Hodnocení interakce následně probíhá pomocí výpočtu tzv. **FIC indexu** (fractional inhibitory concentration, frakční inhibiční koncentrace), který srovnává hodnoty MIC získané kombinací těchto látek a hodnoty MIC obou látek použitých samostatně (viz Obr. 15). Jako synergie je označována hodnota FIC indexu menší než 0,5 (viz Obr. 16). Taková hodnota znamená, že došlo u zkoušené kombinace ke čtyřnásobnému poklesu hodnoty MIC oproti použití jednotlivých látek samostatně. [89] Výhodou tohoto testu je především možnost otestovat danou kombinaci v širokém rozmezí koncentrací, oproti E-testu může být tato metoda využita i ke zkoušení látek, které nejsou dostupné ve formě komerčních proužků s antibiotiky. Nevýhodou této metody je především pracnost a časová náročnost. Nejčastěji jsou touto metodou testovány kombinace dvou látek, může ale být přidána i další látka ve fixní koncentraci. [92]

$$FIC = \left(\frac{MIC_{A\text{komb}}}{MIC_A} \right) + \left(\frac{MIC_{B\text{komb}}}{MIC_B} \right)$$

Obr. 15 Výpočet hodnoty frakční inhibiční koncentrace

Vzorec pro výpočet hodnoty frakční inhibiční koncentrace (FIC). Hodnota $MIC_{A\text{komb}}$ ($MIC_{B\text{komb}}$) vyjadřuje hodnotu MIC testované látky v kombinaci, hodnota MIC_A (MIC_B) je hodnotou MIC samotné látky A (B).

Převzato a upraveno z: When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. [89]

| Hodnota FIC | Zhodnocení |
|-------------|--------------|
| ≤ 0,5 | Synergie |
| 0,5-1 | Aditivita |
| 1-4 | Indiference |
| ≥ 4 | Antagonismus |

Obr. 16 Zhodnocení kombinovaného účinku na základě hodnot frakční inhibiční koncentrace

Na základě hodnoty frakční inhibiční koncentrace (FIC) může být kombinovaný účinek zhodnocen jako synergie, aditivita, indiference nebo antagonismus.

Převzato a upraveno z: When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. [89]

4 Experimentální část

4.1 Použitý materiál

Pomůcky:

- Mikrotitrační destičky Honeycomb (DYNEX Česká republika)
- Automatické pipety (Fisher Scientific s.r.o.)
- Sterilní zkumavky (GAMEDIUM spol. s r.o.)
- Stojánek na zkumavky (GAMEDIUM spol. s r.o.)
- Jednorázové očkovací kličky (GAMEDIUM spol. s r.o.)

Přístroje:

- Bioscreen C MBR (DYNEX Česká republika)
- Laminární box Esco Class II type A2 (DYNEX Česká republika)
- Vortex MS2 Minishaker IKA (P-LAB a.s.)
- Denzitometr DEN-1B McFarland Densitometer Biosan (P-LAB a.s.)

Chemikálie:

- Mueller-Hinton bujón s upravenými kationty (SIGMA-ALDRICH spol. s r.o.)
- Dimethylsulfoxid (SIGMA-ALDRICH spol. s r.o.)
- Barvivo alamarBlue (SIGMA-ALDRICH spol. s r.o.)

Bakteriální kmeny použité pro testování:

Tab. 1 Seznam bakteriálních kmenů použitých pro testování

| Interní laboratorní označení | Bakteriální kmen | Původ | Zdroj |
|------------------------------|------------------------|--------------|---|
| 136-2016 | <i>St. aureus</i> | Výtěr z krku | Dr. Voxová, Fakultní nemocnice Hradec Králové |
| 137-2016 | <i>St. aureus</i> | Popálenina | Dr. Voxová, Fakultní nemocnice Hradec Králové |
| 131-2016 | <i>St. aureus</i> MRSA | Výtěr z krku | Dr. Voxová, Fakultní nemocnice Hradec Králové |
| 134-2016 | <i>St. aureus</i> MRSA | Proleženina | Dr. Voxová, Fakultní nemocnice Hradec Králové |

| | | | |
|----------|-------------------------|--------------------------------------|---|
| 111-2016 | <i>St. haemolyticus</i> | Cévka | Dr. Voxová, Fakultní nemocnice Hradec Králové |
| 196-2016 | <i>St. epidermidis</i> | Drén | Dr. Voxová, Fakultní nemocnice Hradec Králové |
| 198-2016 | <i>E. faecium</i> VRE | Původ neznámý | Dr. Voxová, Fakultní nemocnice Hradec Králové |
| 143-2016 | <i>St. aureus</i> MRSA | Sbírkový kmen (ATCC 43300, CCM 4750) | Česká sbírka mikroorganismů |

Legenda: **MRSA** – meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*; **VRE** – vankomycin-rezistentní *Enterococcus faecium*; **ATCC** – American Type Collection Cultures (kódové označení pro kmen pocházející ze sbírky organizace ATCC); **CCM** – Czech Collection of Microorganisms (kódové označení pro kmen pocházející z České sbírky mikroorganismů)

4.2 Testované látky

Celkem bylo testováno devět látek ze skupiny rhodaninů (RHO-f, RHO-i, RHO-j, RHO-m, RHO-r, RHO-w, RHO-x, RHO-y, RHO-z) nově syntetizovaných na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a ředěny tak, aby byla vytvořena dvojková ředící řada o koncentracích v rozmezí 500 $\mu\text{mol/l}$ až 0,488 $\mu\text{mol/l}$. Finální koncentrace DMSO u každého člena dvojkové ředící řady činila 1%.

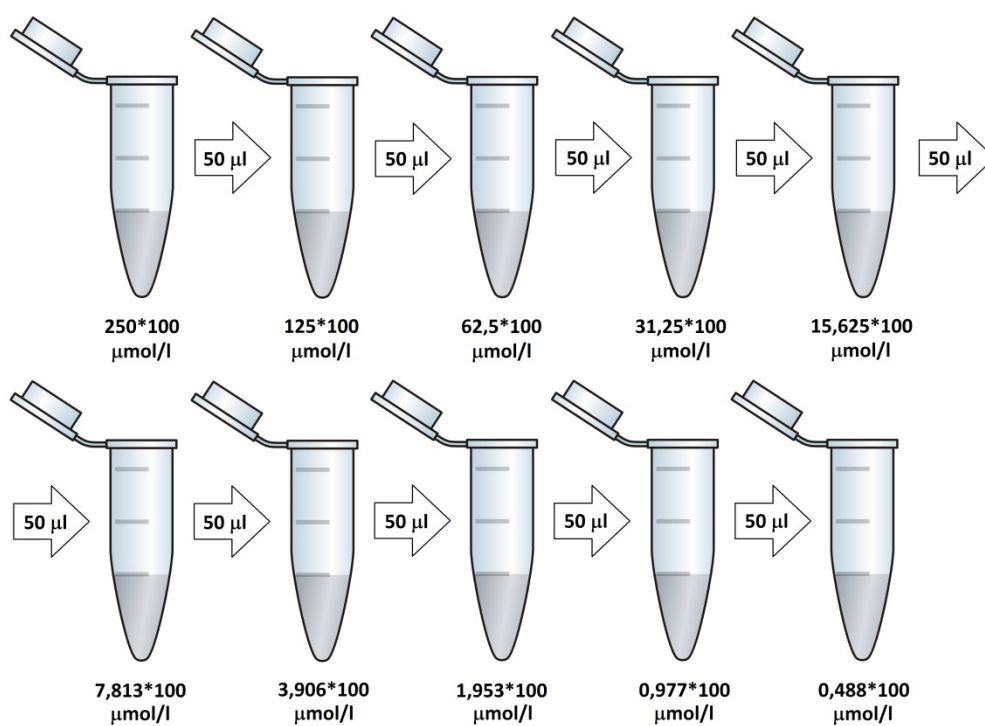
4.3 Metodika

4.3.1 Rozšířený screening antibakteriální aktivity testovaných látek s využitím klinických izolátů bakterií rodu *Staphylococcus* a *Enterococcus*

4.3.1.1 Příprava ředící řady testovaných látek

Před samotným testováním bylo nejprve nutné vytvořit ředící řadu testovaných látek. Ty byly rozpouštěny v DMSO tak, aby vznikla koncentrace stokrát vyšší než koncentrace, která měla být následně použita pro testování. Koncentrace takto vzniklého zásobního roztoku tedy byla 500*100 $\mu\text{mol/l}$. Tento zásobní roztok byl následně ředěn dvojkovou ředící řadou až po koncentraci 0,488*100 $\mu\text{mol/l}$ (viz Obr. 17). Do první zkumavky bylo pipetováno 50 μl zásobního roztoku a 50 μl DMSO (tím vznikla koncentrace 250*100

$\mu\text{mol/l}$), do každé další zkumavky v řadě byl poté vždy přenášen objem $50\ \mu\text{l}$ z předchozí zkumavky a smísen s $50\ \mu\text{l}$ DMSO. Obsah zkumavek byl před každým dalším krokem ředění důkladně promíchán na vortexu. Poté byly tyto roztoky dále ředěny v Mueller-Hinton bujónu s upravenými kationty (CAMHB) tak, že bylo pipetováno $20\ \mu\text{l}$ roztoku testované látky do $1980\ \mu\text{l}$ kultivačního média. Došlo tím ke stonásobnému zředění těchto roztoků a vznikla koncentrační řada v rozsahu od $250\ \mu\text{mol/l}$ do $0,488\ \mu\text{mol/l}$. Výsledná koncentrace DMSO v takto naředěných roztocích byla 1%, což je dostatečně nízká koncentrace na to, aby při testování negativně neovlivnila růst bakterií.

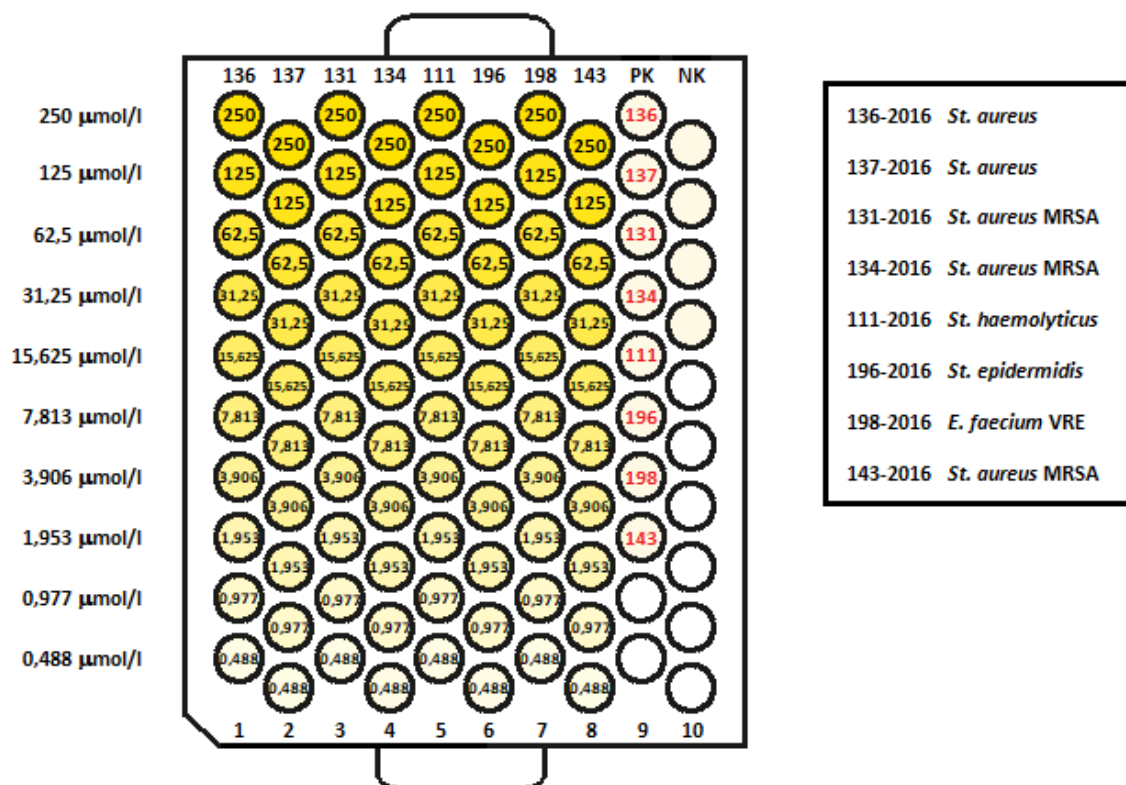


Obr. 17 Schéma přípravy dvojkové ředící řady testovaných látek

Do první zkumavky bylo pipetováno $50\ \mu\text{l}$ zásobního roztoku o koncentraci $500 \cdot 100\ \mu\text{mol/l}$ a $50\ \mu\text{l}$ dimethylsulfoxidu (DMSO). Tím došlo ke zředění roztoku v první zkumavce na koncentraci $250 \cdot 100\ \mu\text{mol/l}$. Do každé další zkumavky v řadě byl poté vždy přenášen objem $50\ \mu\text{l}$ ředěné látky z předchozí zkumavky k $50\ \mu\text{l}$ DMSO. Tím se koncentrace v dané zkumavce snížila vždy na polovinu.

4.3.1.2 Příprava Honeycomb destiček

Po vytvoření ředící řady byly testované látky pipetovány do mikrotitrační destičky typu Honeycomb. Do jamek v prvních osmi sloupcích bylo pipetováno vždy 200 μ l roztoku testované látky. Pipetování probíhalo po řadách směrem shora dolů s postupně klesající koncentrací od 250 μ mol/l po 0,488 μ mol/l. Každý z těchto sloupců byl určen ke zkoušení aktivity testované látky vůči jednomu bakteriálnímu kmenu. Jamky devátého sloupce sloužily pro pozitivní kontroly (kultivační médium spolu s testovacím kmenem, bez přítomnosti testované látky) a bylo do nich pipetováno po 200 μ l CAMHB. Do posledního sloupce destičky byla pipetována negativní kontrola (kultivační médium bez testovacího kmenu i bez přítomnosti testované látky), tedy 210 μ l CAMHB (viz Obr. 18).



Obr. 18 Schéma pipetování testované látky a testovacích kmenů do Honeycomb destičky

Do destičky byla po řadách pipetována sestupná koncentrace testované látky. Do sloupců 1-8 byly pipetovány jednotlivé bakteriální kmeny, které byly následně ve stejném pořadí pipetovány do jamek ve sloupci pozitivní kontroly. Poslední sloupec sloužil jako negativní kontrola. Číslo vyznačená černým písmem ve sloupcích 1-8 uvádí hodnoty koncentrace testované látky v jednotlivých jamkách destičky v μ mol/l. Číslo uvedené červeným písmem uvádí identifikační číslo testovacího bakteriálního kmenu.

Legenda: **MRSA** – meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*; **VRE** – vankomycin-rezistentní *Enterococcus faecium*; **PK** – pozitivní kontrola; **NK** – negativní kontrola

4.3.1.3 Příprava testovacích bakteriálních suspenzí

Z bakteriálních kultur inkubovaných v termostatu při 37°C po dobu 16-24 hodin byly připravovány bakteriální suspenze v CAMHB. Očkovací kličkou byly odebrány kolonie a třením této kličky o stěnu zkumavky byla vytvořena suspenze. Následně byla měřena optická denzita (OD) této suspenze a byla upravena na denzitu odpovídající hodnotě 0,5 stupňů dle McFarlanda (odpovídá přibližně $1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml). V případě, že byla naměřená denzita vyšší, bylo do zkumavky přidáno čisté médium. Pokud byla naopak nižší, byla kličkou přidána další část kolonie. Takto připravené suspenze byly dle instrukcí uvedených v dokumentaci EUCAST dále upraveny tak, aby finální koncentrace bakteriálního agens v každé jamce odpovídala počtu buněk $5 \cdot 10^5$ CFU/ml. Následně bylo z těchto suspenzí pipetováno po 10 μ l na jamku v prvních devíti sloupcích Honeycomb destičky, které obsahovaly 200 μ l roztoku testovaných látek, případně obsahovaly 200 μ l média (pozitivní kontrola). Do každého z prvních osmi sloupců byl pipetován jeden bakteriální kmen, ve sloupci pozitivní kontroly byl každý kmen pipetován do jedné jamky (viz Obr. 18).

4.3.1.4 Spektrofotometrická detekce hodnoty minimální inhibiční koncentrace pomocí přístroje Bioscreen

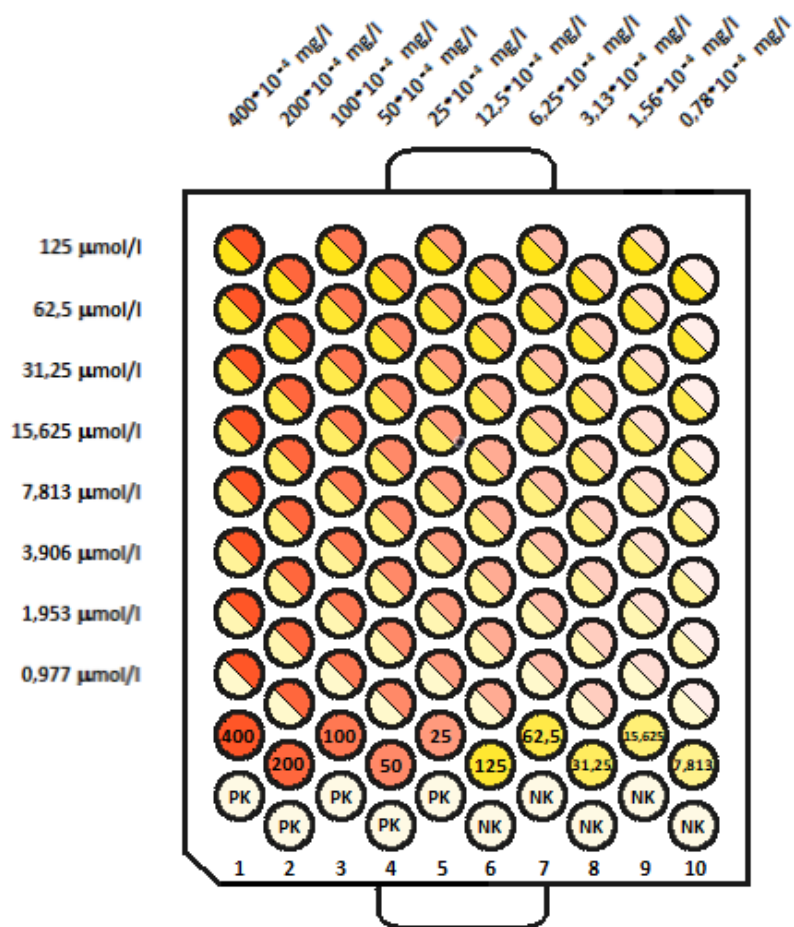
Poté, co byla do destičky pipetována bakteriální suspenze, byla destička vložena do přístroje Bioscreen, kde byla inkubována při 37°C po dobu 24 hodin. Spektrofotometrické měření optické denzity probíhalo automaticky v hodinových intervalech při vlnových délkách 540 a 600 nm. Pokud v průběhu měření docházelo v jamce k dynamickému nárůstu optické denzity, bylo to důsledkem růstu a množení bakterií a nebylo tedy dosaženo bakteriostatického či baktericidního efektu testované látky. Pokud v jamce naopak nebyl v průběhu 24 hodin zaznamenán nárůst optické denzity, došlo k zábraně růstu bakterií vlivem testované látky. Hodnota MIC byla následně odečítána v jamce s nejnižší koncentrací testované látky, která již vedla k inhibici růstu bakterií. Výsledky získané prostřednictvím spektrofotometrické detekce byly potvrzeny odečtem zákalu v jamkách pouhým okem.

4.3.2 Studium kombinovaného účinku testované látky a komerčně dostupného antibiotika proti stafylokokům

4.3.2.1 Příprava Honeycomb destiček za účelem provedení „checkerboard“ studie

Příprava ředící řady testovaných látek probíhala stejným způsobem jako v kapitole 4.3.1.1. Komerčně dostupná antibiotika zvolená pro testování kombinovaného účinku byla rozpuštěna ve vodě a ředěna na požadovanou koncentraci. Obdobně jako u testovaných látek byla koncentrace zásobních roztoků stokrát vyšší než požadovaná koncentrace pro testování a tyto látky byly dále ředěny v CAMHB v poměru 20 μ l roztoku antibiotika a 1980 μ l média. Do jamek bylo následně pipetováno vždy 100 μ l roztoku testované látky a 100 μ l antibiotika. Tím došlo k ředění těchto látek a výsledná koncentrace v jamce odpovídala vždy poloviční hodnotě koncentrace, než která byla do příslušné jamky pipetována.

Testovaná látka byla, podobně jako u předchozího postupu, pipetována po řadách směrem shora dolů s klesající koncentrací. Antibiotikum bylo naopak pipetováno po jednotlivých sloupcích. Vždy byla otestována kombinace osmi koncentrací testované látky v rozsahu 125 až 0,977 μ mol/l s deseti koncentracemi komerčně dostupného antibiotika. Celkem tak bylo testováno osmdesát možných kombinací daných látek na každé destičce. Předposlední řada byla využita ke zjištění hodnot MIC jednotlivých látek, poslední řada poté sloužila pro pozitivní a negativní kontrolu (viz Obr. 19). Do jamek bylo dále pipetováno po 10 μ l bakteriální suspenze na jamku. Pro studium kombinovaného účinku byl vybrán referenční bakteriální kmen, meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300, CCM 4750), interní laboratorní označení 143-2016. Pracovní suspenze tohoto kmene byla připravena postupem uvedeným v kapitole 4.3.1.3.



Obr. 19 Schéma pipetování testované látky a komerčně dostupného antibiotika do destičky Honeycomb za účelem provedení metody „checkerboard“

Testovaná látka byla v sestupné koncentraci pipetována po jednotlivých řadách, komerčně dostupné antibiotikum (zde rifampicin) bylo pipetováno po sloupcích. Předposlední řada sloužila k hodnocení obou látek samostatně, poslední řada patřila pozitivní (PK) a negativní kontrole (NK). Do jamek s kombinací obou látek byla každá z nich pipetována v objemu 100 μ l, čímž došlo k jejich zředění na polovinu původní koncentrace. Koncentrace uvedené ve schématu jsou koncentrace po tomto zředění.

4.3.2.2 Spektrofotometrická detekce a hodnocení pomocí indexu frakční inhibiční koncentrace

Spektrofotometrické měření optické denzity probíhalo v přístroji Bioscreen při teplotě 37°C po dobu 24 hodin, s hodinovým intervalem měření. Hodnocení kombinovaného účinku bylo následně prováděno na základě výpočtu FIC indexu (viz Obr. 15 a Obr. 16, kapitola 3.4.5). Konfirmace výsledků ze spektrofotometrické detekce může být provedena pomocí vizuální kontroly přítomnosti zákalu v jamkách. Mimo to ale existuje i možnost využití barviva alamarBlue (rezasurin), které slouží jako indikátor metabolické aktivity.

Do jamek bylo přidáno vždy po 20 µl barviva alamarBlue a následovala inkubace při 37°C po dobu 30 minut. Hodnotit metabolickou aktivitu prostřednictvím tohoto indikátoru lze několika způsoby. První z nich spočívá ve vizuální kontrole. V případě, že se obsah jamky po inkubaci zbarví růžově, došlo k redukci barviva vlivem metabolické aktivity bakterií v této jamce. Pokud obsah jamky naopak zůstává zbarven modře, nedošlo k redukci barviva díky tomu, že bakterie v této jamce během inkubace nevykazovaly žádnou metabolickou aktivitu, případně v ní vůbec nebyly přítomny. Barevnou změnu tohoto indikátoru je možné vyjádřit i kvantitativně pomocí fluorimetrické či spektrofotometrické (kolorimetrické) detekce. Fluorimetrická detekce se provádí při excitační vlnové délce 530 až 590 nm a emise je detekována při vlnové délce 590 nm. V případě spektrofotometrické detekce se volí dvě různé vlnové délky a následně je vypočítána procentuální redukce barviva v jednotlivých jamkách podle uvedeného vzorce (viz Obr. 20). S ohledem na to, že Honeycomb destičky jsou tvarově nekompatibilní s klasickými 96-jamkovými panely (jde o speciální destičky pro spektrofotometrický přístroj Bioscreen) a nelze je tedy vsadit do běžných multidetekčních readerů, byl v našem případě volen způsob spektrofotometrické detekce s následným propočtem procentuální redukce barviva.

$$Red_{\%} = \frac{A_{LW} - (A_{HW} \times R_0)_{test}}{A_{LW} - (A_{HW} \times R_0)_{kontrola}} \times 100$$

$$R_0 = AO_{LW}/AO_{HW}$$

Obr. 20 Výpočet procentuální redukce barviva alamarBlue

Procentuální redukce barviva alamarBlue se vypočítá jako poměr absorbancí naměřených v jamce s testovanou látkou a v jamce s negativní kontrolou, měřených při dvou vlnových délkách. Korekční faktor R_0 se vypočítá jako podíl absorpance oxidované formy alamarBlue v čistém médiu při vyšší a nižší vlnové délce. Od hodnot těchto absorbancí musí být vždy odečtena hodnota absorpance čistého média bez přidání alamarBlue. Legenda: **Red_%** – procento redukce barviva alamarBlue, **A_{LW}** – absorpance při nižší vlnové délce, **A_{HW}** – absorpance při vyšší vlnové délce, **R₀** – korekční faktor, **AO_{LW}** – absorpance oxidované formy alamarBlue při nižší vlnové délce, **AO_{HW}** – absorpance oxidované formy alamarBlue při vyšší vlnové délce

Převzato a upraveno z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/spectrophotometry-calculations-alarBlue-different-filters.html> [93]

4.4 Výsledky

Na základě výsledků základního testování souboru patnácti rhodaninových derivátů bylo pro pokročilé hodnocení vybráno pouze devět látek (viz Tab. 2). Následně byla hodnocena antistafylokoková a antienterokoková aktivita těchto látek v rozmezí koncentrací od 250 $\mu\text{mol/l}$ do 0,488 $\mu\text{mol/l}$ s využitím klinických izolátů, laskavě poskytnutých PharmDr. Barborou Voxovou (Ústav klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové). Ne vždy ale bylo možné dosáhnout maximální koncentrace s ohledem na omezenou rozpustnost těchto látek (viz Tab. 3). Pokud v testovaném koncentračním rozmezí nebylo dosaženo hodnoty MIC, byla hodnota MIC vyjádřena jako přesahující nejvyšší dosažitelnou koncentraci.

Tab. 2 Soubor devíti rhodaninových derivátů vybraných pro pokročilé studie antibakteriální aktivity

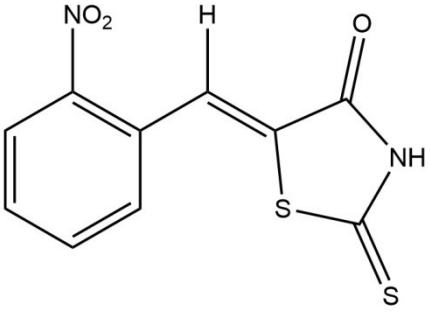
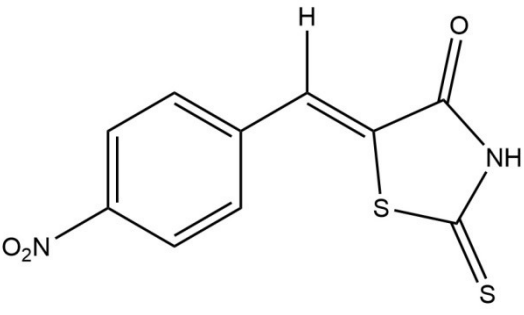
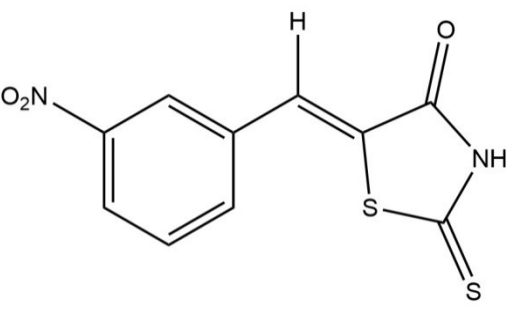
| Testovaná látka (kód) | Doba inkubace | MIC ($\mu\text{mol/l}$) | | | | | | | |
|-----------------------|---------------|---------------------------|-------|--------|------|------|------|------|------|
| | | SA | MRSA | SE | EF | EC | KP | SEMA | PA |
| RHO-f | 24 hod | 31,25 | 62,5 | 62,5 | 500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48 hod | 62,5 | 62,5 | 125 | 500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| RHO-i | 24 hod | 15,625 | 62,5 | 62,5 | 500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48 hod | 31,25 | 125 | 250 | 500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| RHO-j | 24 hod | 31,25 | 125 | 125 | >125 | >125 | >125 | >125 | >125 |
| | 48 hod | 62,5 | >125 | >125 | >125 | >125 | >125 | >125 | >125 |
| RHO-m | 24 hod | 15,625 | 62,5 | 62,5 | >125 | >125 | >125 | >125 | >125 |
| | 48 hod | 15,625 | 62,5 | >125 | >125 | >125 | >125 | >125 | >125 |
| RHO-r | 24 hod | 15,625 | 62,5 | 62,5 | >125 | >125 | >125 | >125 | >125 |
| | 48 hod | 31,25 | 125 | >125 | >125 | >125 | >125 | >125 | >125 |
| RHO-w | 24 hod | 7,813 | 31,25 | 31,25 | 500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48 hod | 7,813 | 125 | 62,5 | 500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| RHO-x | 24 hod | 31,25 | 62,5 | 31,25 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48 hod | 62,5 | 125 | 125 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| RHO-y | 24 hod | 3,906 | 31,25 | 15,625 | 250 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48 hod | 7,813 | 62,5 | 31,25 | 500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| RHO-z | 24 hod | 15,625 | 32,5 | 15,625 | >125 | >125 | >125 | >125 | >125 |
| | 48 hod | 31,25 | 125 | 62,5 | >125 | >125 | >125 | >125 | >125 |

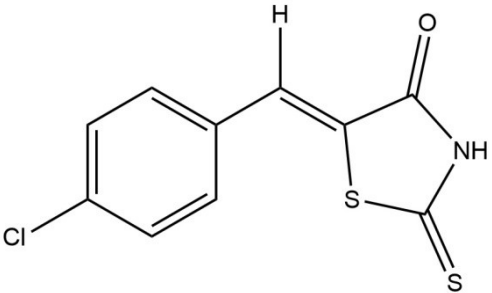
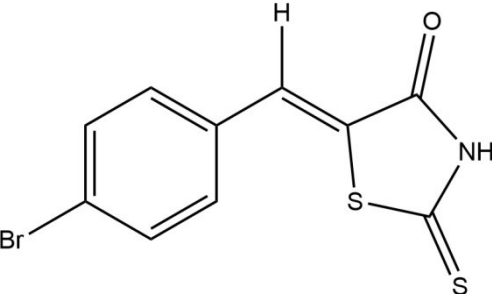
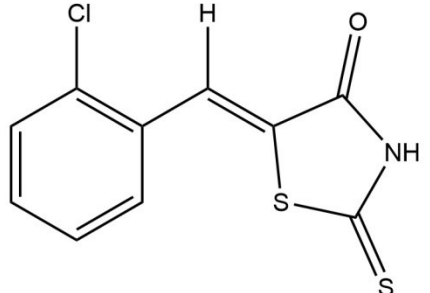
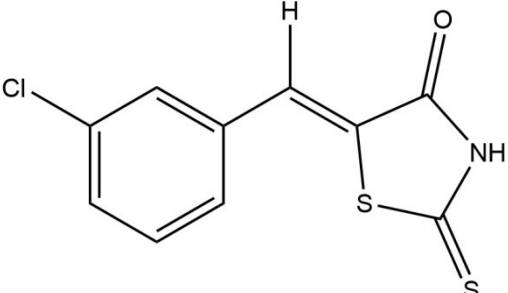
Legenda: **SA** – *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213, CCM 4223), **MRSA** – metilicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300, CCM 4750), **SE** – *Staphylococcus epidermidis* (klinický izolát), **EF** – *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212, CCM 4224), **EC** – *Escherichia coli* (ATCC 25922, CCM 3954), **KP** – *Klebsiella pneumoniae* (klinický izolát), **SEMA** – *Serratia marcescens* (klinický izolát), **PA** – *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853, CCM 3955). Testování provedla a výsledky poskytla: Ida Dufková, Katedra biologických a lékařských věd FaF UK HK

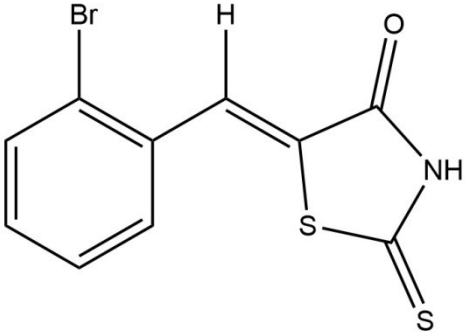
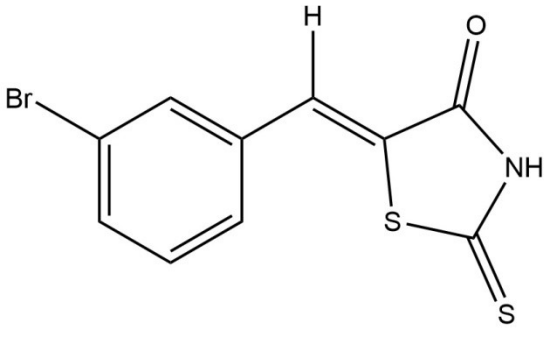
Prostřednictvím základního screeningu bylo zjištěno, že testované látky, které se dostaly do užšího výběru pro pokročilé studie, vykazovaly selektivní antistafylokokový

účinek. Aktivita látek v přijatelném rozmezí koncentrací vůči vybraným gramnegativním bakteriím nebyla prokázána.

Tab. 3 Kódová označení a strukturní vzorce rhodaninových derivátů vybraných pro další hodnocení antibakteriální aktivity

| Kód látky | Vzorec | Název látky | Nejvyšší dosažitelná koncentrace v DMSO ($\mu\text{mol/l}$) |
|-----------|---|--|---|
| RHO-f |  | (Z)-5-(2-nitrobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on | 500 |
| RHO-i |  | (Z)-5-(4-nitrobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on | 500 |
| RHO-j |  | (Z)-5-(3-nitrobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on | 125 |

| | | | |
|--------------|---|---|-----|
| RHO-m |  | (Z)-5-(4-chlorobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on | 125 |
| RHO-r |  | (Z)-5-(4-bromobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on | 125 |
| RHO-w |  | (Z)-5-(2-chlorobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on | 500 |
| RHO-x |  | (Z)-5-(3-chlorobenzylidene)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on | 500 |

| | | | |
|-------|---|---|-----|
| RHO-y |  | (Z)-5-(2-bromobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on | 500 |
| RHO-z |  | (Z)-5-(3-bromobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on | 125 |

V tabulce jsou uvedena kódová označení a strukturální vzorce rhodaninových derivátů vybraných pro další hodnocení antibakteriální aktivity. Dále je v tabulce uveden také chemický název dané látky a nejvyšší koncentrace v dimethylsulfoxidu (DMSO), při které nedocházelo k postupnému srážení látky a tvorbě zákalu.

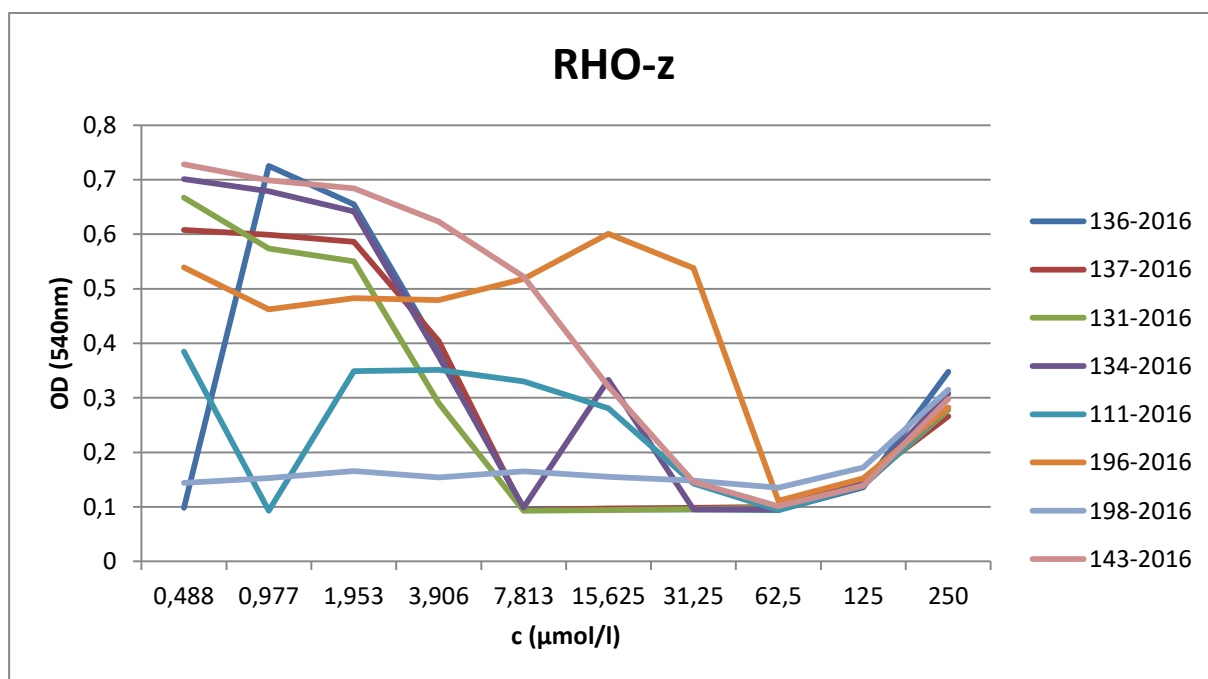
Devět vybraných rhodaninových derivátů bylo dále podrobeno studiu antibakteriální aktivity s využitím klinických izolátů. Jednalo se o klinické izoláty taxonomicky spadající do skupiny bakterií rodu *Staphylococcus* a jeden izolát spadající do rodu *Enterococcus*. Do studie byl rovněž zařazen jeden referenční kmen, konkrétně meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300, CCM 4750), interní laboratorní označení 143-2016. Odečet hodnot MIC probíhal vždy po 24 a 48 hodinách. U látek RHO-f, RHO-i, RHO-x a RHO-y proběhlo z důvodu závady na přístroji hodnocení pouze po 24 hodinách. (viz Tab. 4) Podobně jako v předchozím hodnocení prokázaly tyto látky aktivitu zejména proti kmenům *Staphylococcus aureus* (kmény s označením 136-2016 a 137-2016). Naopak nejmenší aktivita byla zaznamenána proti vankomycin-rezistentnímu kmenu *Enterococcus faecium* (198-2016).

Tab. 4 Stanovené hodnoty minimální inhibiční koncentrace u devíti vybraných rhodaninových derivátů

| Testovaná látka (kód) | Doba inkubace | MIC ($\mu\text{mol/l}$) | | | | | | | |
|-----------------------|---------------|---------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | 136-2016 | 137-2016 | 131-2016 | 134-2016 | 111-2016 | 196-2016 | 198-2016 | 143-2016 |
| RHO-f | 24 hod | 31,25 | 62,5 | 125 | 62,5 | 125 | 125 | >125 | 125 |
| | 48 hod | | | | | | | | |
| RHO-i | 24 hod | 62,5 | 62,5 | 62,5 | 125 | 125 | 125 | >125 | 125 |
| | 48 hod | | | | | | | | |
| RHO-j | 24 hod | 31,25 | 31,25 | 62,5 | >125 | >125 | >125 | 125 | >125 |
| | 48 hod | 31,25 | 31,25 | >125 | >125 | >125 | >125 | 125 | >125 |
| RHO-m | 24 hod | 15,625 | 15,625 | 62,5 | 31,25 | 62,5 | 125 | >250 | 125 |
| | 48 hod | >250 | 125 | 62,5 | 62,5 | 62,5 | 125 | >250 | 125 |
| RHO-r | 24 hod | 62,5 | 62,5 | 15,625 | 62,5 | >125 | 62,5 | >125 | 125 |
| | 48 hod | 62,5 | 62,5 | 15,625 | 62,5 | >125 | >125 | >125 | 125 |
| RHO-w | 24 hod | 31,25 | 31,25 | 31,25 | 62,5 | >125 | 125 | 125 | 125 |
| | 48 hod | 125 | 62,5 | 31,25 | 125 | >125 | 125 | >125 | >125 |
| RHO-x | 24 hod | 7,813 | 15,625 | 62,5 | 7,813 | 62,5 | 62,5 | | 62,5 |
| | 48 hod | | | | | | | | |
| RHO-y | 24 hod | 15,625 | 31,25 | 62,5 | 62,5 | 31,25 | 1,953 | 125 | 125 |
| | 48 hod | | | | | | | | |
| RHO-z | 24 hod | 7,813 | 7,813 | 7,813 | 31,25 | 62,5 | >62,5 | >125 | 62,5 |
| | 48 hod | 15,625 | 15,625 | 31,25 | 31,25 | 62,5 | >125 | >125 | 62,5 |

Z důvodu závady na přístroji nebylo možné provést odečet některých hodnot (pole označena šedou barvou).
 Legenda: **136-2016** (*Staphylococcus aureus*, klinický izolát), **137-2016** (*Staphylococcus aureus*, klinický izolát), **131-2016** (*Staphylococcus aureus* MRSA, klinický izolát), **134-2016** (*Staphylococcus aureus* MRSA, klinický izolát), **111-2016** (*Staphylococcus haemolyticus*, klinický izolát), **196-2016** (*Staphylococcus epidermidis*, klinický izolát), **198-2016** (*Enterococcus faecium* VRE, klinický izolát), **143-2016** (*Staphylococcus aureus* MRSA, ATCC 43300, CCM 4750)

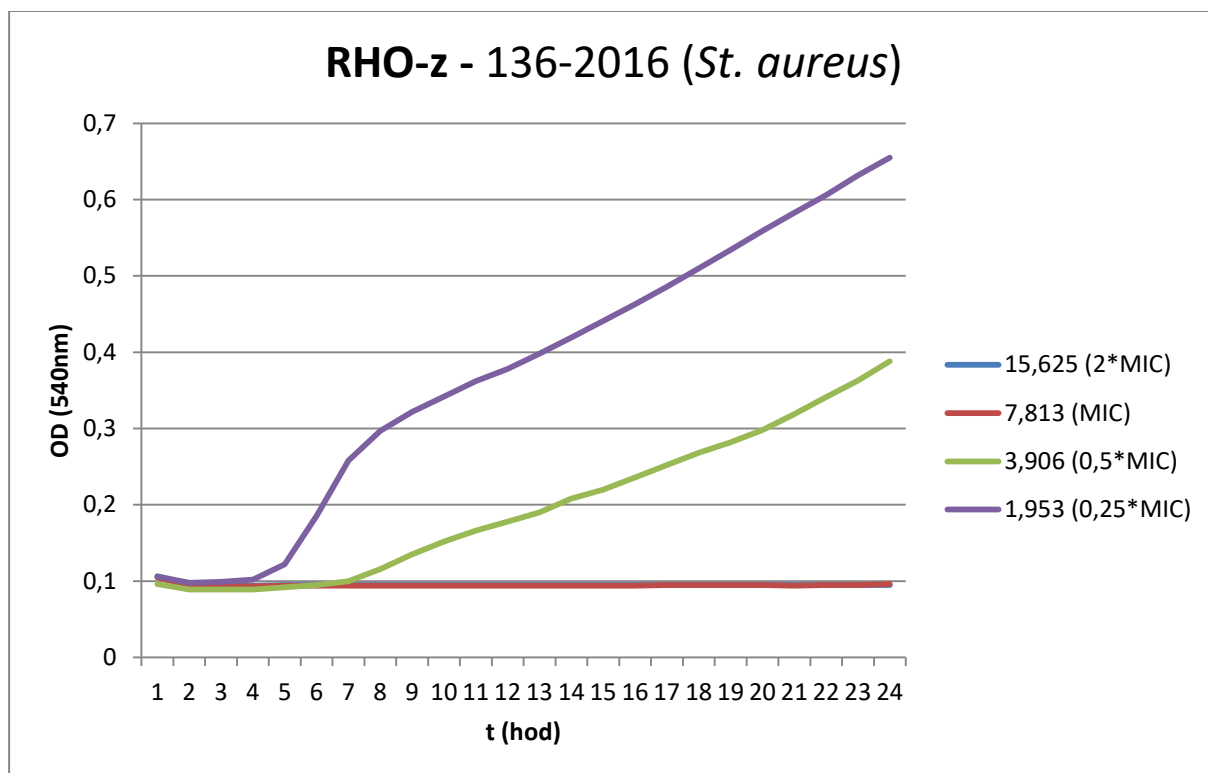
Jednou z výhod spektrofotometrické detekce optické denzity (OD) je to, že lze graficky vyjádřit závislost OD (vyovídající o kvantitativním zastoupení přítomných bakterií v jamce) na hodnotách koncentrací testovaných látek, kterým byly jednotlivé bakteriální kmeny vystaveny (viz Obr. 21). Pro vynesení grafické závislosti se nejčastěji volí data získaná po 18, 20, či 24 hodinách kultivace. Díky měření OD v hodinových intervalech je také možné graficky vyjádřit dynamiku růstu testovací bakterie pod vlivem různých koncentrací testované látky v průběhu 18, 20 nebo 24 hodin. Většinou se pro grafické vyjádření této závislosti volí koncentrace testované látky odpovídající hodnotám 0,25*MIC, 0,5*MIC, MIC a 2*MIC. Pro ilustraci byla sestavena tato závislost pro látku s označením RHO-z (viz Obr. 22 a Obr. 23).



Obr. 21 Závislost optické denzity na různých koncentracích testované látky (RHO-z).

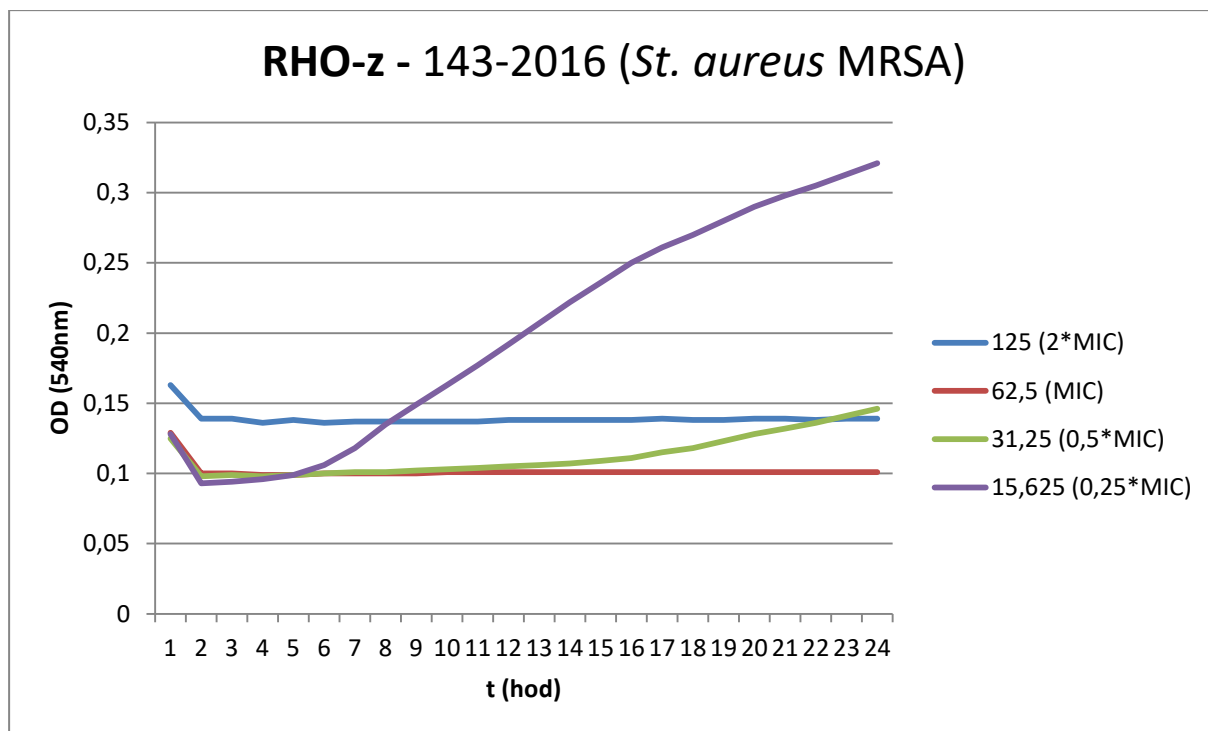
Naměřené hodnoty optické denzity (OD) odrážejí celkovou kvantitu bakteriální masy v jamce. Pro tuto grafickou závislost byla využita data získaná po 24hodinové inkubaci. Nárůst optické denzity při vyšších koncentracích testované látky (125, 250 µmol/l) je způsoben tím, že samotné testované látky při vyšších koncentracích vykazují zákal. Vynesená data nebyla subtrahována.

Legenda: **136-2016** (*Staphylococcus aureus*, klinický izolát), **137-2016** (*Staphylococcus aureus*, klinický izolát), **131-2016** (*Staphylococcus aureus* MRSA, klinický izolát), **134-2016** (*Staphylococcus aureus* MRSA, klinický izolát), **111-2016** (*Staphylococcus haemolyticus*, klinický izolát), **196-2016** (*Staphylococcus epidermidis*, klinický izolát), **198-2016** (*Enterococcus faecium* VRE, klinický izolát), **143-2016** (*Staphylococcus aureus* MRSA, ATCC 43300, CCM 4750)



Obr. 22 Vývoj hodnot optické denzity v průběhu 24 hodin při cílových koncentracích testované látky (RHO-z) odpovídajících hodnotám 0,25*MIC, 0,5*MIC, MIC a 2*MIC.

Uvedené hodnoty koncentrací jsou v jednotkách $\mu\text{mol/l}$. Naměřené hodnoty optické denzity (OD) odrážejí celkovou kvantitu bakteriální masy v jamce. Závislost byla vynesena pro kmen *Staphylococcus aureus* (klinický izolát, interní laboratorní označení 136-2016). Vynesená data nebyla subtrahována.



Obr. 23 Vývoj hodnot optické denzity v průběhu 24 hodin při cílových koncentracích testované látky (RHO-z) odpovídajících hodnotám 0,25*MIC, 0,5*MIC, MIC a 2*MIC.

Uvedené hodnoty koncentrací jsou v jednotkách $\mu\text{mol/l}$. Naměřené hodnoty optické denzity (OD) odrážejí celkovou kvantitu bakteriální hmoty v jamce. Závislost byla vynesena pro referenční kmen *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC 43300, CCM 4750), interní laboratorní označení 143-2016. Nárůst optické denzity při vyšších koncentracích testované látky (125, 250 $\mu\text{mol/l}$) je způsoben tím, že samotné testované látky při vyšších koncentracích vykazují zákal. Vynesená data nebyla subtrahována.

Pro další testování metodou „checkerboard“ byla vybrána látka s kódovým označením RHO-y. Její účinek byl testován v kombinaci se třemi antibiotiky. Vankomycin byl vybrán jako zástupce antibiotik zasahujících buněčnou stěnu, rifampicin zasahuje do syntézy bakteriální RNA a ciprofloxacin svým účinkem narušuje syntézu bakteriální DNA. Účinek těchto kombinací byl hodnocen proti referenčnímu kmenu *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC 43300, CCM 4750). Na základě vypočtených hodnot FIC indexu pro jednotlivé kombinace prokázala látka RHO-y slibný účinek zejména v kombinaci s ciprofloxacinem. V pěti kombinacích byl prokázán aditivní účinek, v jednom případě byl účinek zhodnocen jako synergní (viz Tab. 6). Aditivní účinek byl prokázán také ve dvou kombinacích látky RHO-y s rifampicinem (viz Tab. 8). Kombinace s vankomycinem prokázala pouze indiferentní působení (viz Tab. 10). Žádné z antibiotik pak nevykazovalo v kombinaci s testovanou látkou antagonistický účinek. V následujících tabulkách jsou vždy nejprve

uvedeny vypočtené hodnoty FIC indexu pro všechny testované kombinace látek a následně jen hodnoty v jamkách s MIC, které se využívají pro hodnocení kombinovaného účinku.

Tab. 5 Vypočtené hodnoty indexu frakční inhibiční koncentrace pro kombinaci látky RHO-y s ciprofloxacinem

| RHO-y ($\mu\text{mol/l}$) | Ciprofloxacín (mg/l) | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------------|-------|-------|-------|--------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,0625 | 0,03125 | 0,015625 | 0,007813 | 0,003906 | 0,001953 |
| 125 | 8,000 | 3,000 | 2,500 | 2,250 | 2,125 | 2,063 | 2,031 | 2,016 | 2,008 | 2,004 |
| 62,5 | 6,000 | 2,000 | 1,500 | 1,250 | 1,125 | 1,063 | 1,031 | 1,016 | 1,008 | 1,004 |
| 31,25 | 2,500 | 1,500 | 1,000 | 0,750 | 0,625 | 0,563 | 0,531 | 0,516 | 0,508 | 0,504 |
| 15,625 | 2,250 | 1,250 | 0,750 | 0,500 | 0,375 | 0,313 | 0,281 | 0,266 | 0,258 | 0,254 |
| 7,813 | 2,125 | 1,125 | 0,625 | 0,375 | 0,250 | 0,188 | 0,156 | 0,141 | 0,133 | 0,129 |
| 3,906 | 2,063 | 1,063 | 0,563 | 0,313 | 0,188 | 0,125 | 0,094 | 0,078 | 0,070 | 0,066 |
| 1,953 | 2,031 | 1,031 | 0,531 | 0,281 | 0,156 | 0,094 | 0,063 | 0,047 | 0,039 | 0,035 |
| 0,977 | 2,016 | 1,016 | 0,516 | 0,266 | 0,141 | 0,078 | 0,047 | 0,031 | 0,023 | 0,020 |

Uvedené hodnoty byly získány pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace. Šedá ohraničená oblast vyjadřuje jamky, ve kterých byl pomocí spektrofotometrické detekce prokázán bakteriální růst. V jamkách, ve kterých prokazatelně došlo k inhibici bakteriálního růstu, jsou barevně odlišeny vypočtené hodnoty indexu frakční inhibiční koncentrace na základě hodnocení účinku daného koncentračního poměru testovaných látek. Zelená barva vyjadřuje synergii, modrá aditivitu, žlutá indifferenci a červená antagonismus. Tučně vyznačené hodnoty koncentrací značí hodnoty minimální inhibiční koncentrace jednotlivých látek.

Tab. 6 Hodnocení kombinovaného antibakteriálního účinku látky RHO-y a ciprofloxacínu vůči kmenu *Staphylococcus aureus* MRSA (interní laboratorní označení 143-2016) pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace.

| 143-2016 (<i>St. aureus</i> MRSA) - RHO-y + ciprofloxacín | | | | |
|--|-------|---------|-------------------|-------------|
| c (y/cip) | FIC y | FIC cip | FIC index (y+cip) | Hodnocení |
| 62,5 / - | 1,00 | / | 1,000 | / |
| 62,5 / 0,0019 | 1,000 | 0,004 | 1,004 | Indiference |
| 62,5 / 0,0039 | 1,000 | 0,008 | 1,008 | Indiference |
| 62,5 / 0,0078 | 1,000 | 0,016 | 1,016 | Indiference |
| 62,5 / 0,0156 | 1,000 | 0,031 | 1,031 | Indiference |
| 62,5 / 0,0312 | 1,000 | 0,063 | 1,063 | Indiference |
| 31,25 / 0,0625 | 0,500 | 0,125 | 0,625 | Indiference |
| 15,625 / 0,0625 | 0,250 | 0,125 | 0,375 | Synergie |
| 62,5 / 0,125 | 1,000 | 0,250 | 1,250 | Indiference |
| 31,25 / 0,25 | 0,500 | 0,500 | 1,000 | Aditivita |
| 15,625 / 0,25 | 0,250 | 0,500 | 0,750 | Aditivita |
| 7,812 / 0,25 | 0,125 | 0,500 | 0,625 | Aditivita |
| 3,906 / 0,25 | 0,063 | 0,500 | 0,563 | Aditivita |
| 1,953 / 0,25 | 0,031 | 0,500 | 0,531 | Aditivita |
| 1,953 / 0,5 | 0,031 | 1,000 | 1,031 | Indiference |
| - / 0,5 | / | 1,000 | 1,000 | / |

Legenda: **c (y/cip)** – poměr koncentrací látky RHO-y a ciprofloxacínu (koncentrace látky RHO-y je vyjádřena v jednotkách $\mu\text{mol/l}$ a koncentrace ciprofloxacínu v jednotkách mg/l); **FIC** – frakční inhibiční koncentrace

Tab. 7 Vypočtené hodnoty indexu frakční inhibiční koncentrace pro kombinaci látky RHO-y s rifampicinem

| RHO-y ($\mu\text{mol/l}$) | Rifampicin (mg/l) | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------------|------|------|-------|--------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,005 | 0,0025 | 0,00125 | 0,000625 | 0,000313 | 0,000156 | 0,000078 |
| 125 | 10,00 | 6,00 | 4,00 | 3,00 | 2,50 | 2,25 | 2,13 | 2,06 | 2,03 | 2,02 |
| 62,5 | 9,00 | 5,00 | 3,00 | 2,00 | 1,50 | 1,25 | 1,13 | 1,07 | 1,03 | 1,02 |
| 31,25 | 8,50 | 4,50 | 2,50 | 1,50 | 1,00 | 0,75 | 0,63 | 0,56 | 0,53 | 0,52 |
| 15,625 | 8,25 | 4,25 | 2,25 | 1,25 | 0,75 | 0,50 | 0,38 | 0,31 | 0,28 | 0,27 |
| 7,813 | 8,13 | 4,13 | 2,13 | 1,13 | 0,63 | 0,38 | 0,25 | 0,19 | 0,16 | 0,14 |
| 3,906 | 8,06 | 4,06 | 2,06 | 1,07 | 0,56 | 0,31 | 0,19 | 0,13 | 0,09 | 0,08 |
| 1,953 | 8,03 | 4,03 | 2,03 | 1,03 | 0,53 | 0,28 | 0,16 | 0,09 | 0,06 | 0,05 |
| 0,977 | 8,02 | 4,02 | 2,02 | 1,02 | 0,52 | 0,27 | 0,14 | 0,08 | 0,05 | 0,03 |

Uvedené hodnoty byly získány pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace. Šedá ohraničená oblast vyjadřuje jamky, ve kterých byl pomocí spektrofotometrické detekce prokázán bakteriální růst. V jamkách, ve kterých prokazatelně došlo k inhibici bakteriálního růstu, jsou barevně odlišeny vypočtené hodnoty indexu frakční inhibiční koncentrace na základě hodnocení účinku daného koncentračního poměru testovaných látek. Modrá barva vyjadřuje aditivitu, žlutá indifferenci a červená antagonismus. Tučně vyznačené hodnoty koncentrací značí hodnoty minimální inhibiční koncentrace jednotlivých látek.

Tab. 8 Hodnocení kombinovaného antibakteriálního účinku látky RHO-y a rifampicinu vůči kmenu *Staphylococcus aureus* MRSA (interní laboratorní označení 143-2016) pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace.

| 143-2016 (<i>St. aureus</i> MRSA) - RHO-y + rifampicin | | | | |
|---|-------|---------|-------------------|-------------|
| c (y/rif) | FIC y | FIC rif | FIC index (y+rif) | Hodnocení |
| 62,5/- | 1,00 | / | 1,00 | / |
| 62,5/0,000078 | 1,00 | 0,02 | 1,02 | Indiference |
| 62,5/0,000156 | 1,00 | 0,03 | 1,03 | Indiference |
| 62,5/0,000313 | 1,00 | 0,06 | 1,07 | Indiference |
| 62,5/0,000625 | 1,00 | 0,13 | 1,13 | Indiference |
| 31,25/0,00125 | 0,50 | 0,25 | 0,75 | Aditivita |
| 31,25/0,0025 | 0,50 | 0,50 | 1,00 | Aditivita |
| 15,625/0,005 | 0,25 | 1,00 | 1,25 | Indiference |
| 7,813/0,005 | 0,13 | 1,00 | 1,13 | Indiference |
| 3,906/0,005 | 0,06 | 1,00 | 1,07 | Indiference |
| 1,953/0,005 | 0,03 | 1,00 | 1,03 | Indiference |
| 0,977/0,005 | 0,02 | 1,00 | 1,02 | Indiference |
| -/0,005 | / | 1,00 | 1,00 | / |

Legenda: **c (y/rif)** – poměr koncentrací látky RHO-y a rifampicinu (koncentrace látky RHO-y je vyjádřena v jednotkách $\mu\text{mol/l}$ a koncentrace rifampicinu v jednotkách mg/l); **FIC** – frakční inhibiční koncentrace

Tab. 9 Vypočtené hodnoty indexu frakční inhibiční koncentrace pro kombinaci látky RHO-y s vankomycinem

| Rho-y ($\mu\text{mol/l}$) | Vankomycin (mg/l) | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------------|------|------|------|------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,0625 | 0,0313 | 0,0156 | 0,0078 |
| 125 | 6,00 | 4,00 | 3,00 | 2,50 | 2,25 | 2,13 | 2,06 | 2,03 | 2,02 | 2,01 |
| 62,5 | 5,00 | 3,00 | 2,00 | 1,50 | 1,25 | 1,13 | 1,07 | 1,03 | 1,02 | 1,01 |
| 31,25 | 4,50 | 2,50 | 1,50 | 1,00 | 0,75 | 0,63 | 0,56 | 0,53 | 0,52 | 0,51 |
| 15,625 | 4,25 | 2,25 | 1,25 | 0,75 | 0,50 | 0,38 | 0,31 | 0,28 | 0,27 | 0,26 |
| 7,813 | 4,13 | 2,13 | 1,13 | 0,63 | 0,38 | 0,25 | 0,19 | 0,16 | 0,14 | 0,13 |
| 3,906 | 4,06 | 2,06 | 1,07 | 0,56 | 0,31 | 0,19 | 0,13 | 0,09 | 0,08 | 0,07 |
| 1,953 | 4,03 | 2,03 | 1,03 | 0,53 | 0,28 | 0,16 | 0,09 | 0,06 | 0,05 | 0,04 |
| 0,977 | 4,02 | 2,02 | 1,02 | 0,52 | 0,27 | 0,14 | 0,08 | 0,05 | 0,03 | 0,02 |

Uvedené hodnoty byly získány pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace. Šedá ohraničená oblast vyjadřuje jamky, ve kterých byl pomocí spektrofotometrické detekce prokázán bakteriální růst. V jamkách, ve kterých prokazatelně došlo k inhibici bakteriálního růstu, jsou barevně odlišeny vypočtené hodnoty indexu frakční inhibiční koncentrace na základě hodnocení účinku daného koncentračního poměru testovaných látek. Žlutá barva vyjadřuje indifferenci a červená antagonismus. Tučně vyznačené hodnoty koncentrací značí hodnoty minimální inhibiční koncentrace jednotlivých látek.

Tab. 10 Hodnocení kombinovaného antibakteriálního účinku látky RHO-y a vankomycinu vůči kmenu *Staphylococcus aureus* MRSA (interní laboratorní označení 143-2016) pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace.

| 143-2016 (<i>St. aureus</i> MRSA) - RHO-y + vankomycin | | | | |
|---|-------|---------|-------------------|-------------|
| c (y/van) | FIC y | FIC van | FIC index (y+van) | Hodnocení |
| 62,5/- | 1,00 | / | 1,00 | / |
| 62,5/0,0078 | 1,00 | 0,01 | 1,01 | Indiference |
| 62,5/0,0156 | 1,00 | 0,02 | 1,02 | Indiference |
| 62,5/0,0313 | 1,00 | 0,03 | 1,03 | Indiference |
| 62,5/0,0625 | 1,00 | 0,06 | 1,07 | Indiference |
| 62,5/0,125 | 1,00 | 0,13 | 1,13 | Indiference |
| 62,5/0,25 | 1,00 | 0,25 | 1,25 | Indiference |
| 62,5/0,5 | 1,00 | 0,50 | 1,50 | Indiference |
| 31,25/1 | 0,50 | 1,00 | 1,50 | Indiference |
| 15,625/1 | 0,25 | 1,00 | 1,25 | Indiference |
| 7,813/1 | 0,13 | 1,00 | 1,13 | Indiference |
| 3,906/1 | 0,06 | 1,00 | 1,07 | Indiference |
| 1,953/1 | 0,03 | 1,00 | 1,03 | Indiference |
| 0,977/1 | 0,02 | 1,00 | 1,02 | Indiference |
| -/1 | / | 1,00 | 1,00 | / |

Legenda: **c (y/van)** – poměr koncentrací látky RHO-y a vankomycinu (koncentrace látky RHO-y je vyjádřena v jednotkách $\mu\text{mol/l}$ a koncentrace vankomycinu v jednotkách mg/l); **FIC** – frakční inhibiční koncentrace

Kromě hodnocení kombinovaného antibakteriálního účinku pomocí výpočtu FIC indexu byla zkoušena i metoda hodnocení tohoto účinku s využitím metabolického indikátoru alamarBlue. Tento indikátor reaguje barevnou změnou na přítomnost metabolicky aktivních mikroorganismů. Jeho barevnou konverzi lze detekovat dvojím způsobem, spektrofotometricky a fluorimetricky. Míra konverze indikátoru na jeho redukovanou formu byla v našem případě měřena pouze spektrofotometricky, protože pomocí použitého přístroje Bioscreen není možné provést fluorimetrické měření. Na základě proměření optické denzity při dvou vlnových délkách lze pak vypočítat procentuální redukci barviva. (viz Tab. 11 – Tab. 13).

Tab. 11 Hodnocení kombinace látky RHO-y s ciprofloxacinem pomocí alamarBlue

| RHO-y ($\mu\text{mol/l}$) | Ciprofloxacin (mg/l) | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|
| | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,0625 | 0,0313 | 0,0156 | 0,0078 | 0,0039 | 0,00195 |
| 125 | 6,55% | 8,28% | 10,78% | 13,05% | 8,40% | 11,80% | 11,32% | 15,82% | 12,50% | 12,61% |
| 62,5 | 7,99% | 12,62% | 14,73% | 14,87% | 11,62% | 18,03% | 13,97% | 16,52% | 15,78% | 16,60% |
| 31,25 | 8,38% | 12,64% | 17,76% | 49,55% | 12,98% | 76,22% | 92,90% | 89,07% | 93,09% | 103,36% |
| 15,625 | 7,82% | 11,31% | 13,03% | 49,97% | 12,60% | 95,18% | 106,91% | 107,38% | 108,05% | 124,93% |
| 7,813 | 8,52% | 12,99% | 13,97% | 54,09% | 84,34% | 92,18% | 95,67% | 105,81% | 99,58% | 130,70% |
| 3,906 | 8,38% | 13,50% | 23,85% | 54,60% | 82,39% | 85,99% | 92,12% | 96,07% | 96,23% | 115,40% |
| 1,953 | 6,86% | 20,88% | 30,63% | 55,44% | 78,48% | 83,20% | 85,71% | 88,73% | 94,10% | 109,33% |
| 0,977 | 7,89% | 36,11% | 49,32% | 75,87% | 81,92% | 85,00% | 85,60% | 88,62% | 93,30% | 109,54% |

Výsledky jsou vyjádřeny jako vypočtené hodnoty procentuální redukce barviva alamarBlue, ke které dochází následkem metabolické aktivity bakterií. V tabulce je označeno rozhraní mezi jamkami s prokazatelným nárůstem bakterií a jamkami, ve kterých byl bakteriální růst vlivem kombinace testovaných látek inhibován. Toto rozhraní bylo vyznačeno na základě údajů získaných s využitím spektrofotometrické detekce bez použití indikátoru alamarBlue.

Tab. 12 Hodnocení kombinace látky RHO-y s rifampicinem pomocí alamarBlue

| RHO-y ($\mu\text{mol/l}$) | Rifampicin (mg/l) | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------------|-------|-------|-------|--------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,005 | 0,0025 | 0,00125 | 0,000625 | 0,000313 | 0,000156 | 0,000078 |
| 125 | 5,20% | 4,53% | 3,86% | 3,95% | 3,75% | 4,72% | 4,54% | 4,54% | 3,96% | 6,09% |
| 62,5 | 3,63% | 4,85% | 3,76% | 3,95% | 3,25% | 5,01% | 4,12% | 5,47% | 3,66% | 7,28% |
| 31,25 | 3,77% | 5,74% | 2,76% | 2,52% | 4,74% | 19,70% | 28,37% | 32,00% | 31,87% | 35,19% |
| 15,625 | 3,51% | 4,18% | 3,51% | 3,58% | 23,37% | 46,22% | 78,03% | 84,42% | 87,41% | 89,93% |
| 7,813 | 3,69% | 5,08% | 3,62% | 3,90% | 31,54% | 79,53% | 93,62% | 102,60% | 104,42% | 110,24% |
| 3,906 | 3,61% | 5,59% | 3,91% | 3,98% | 40,43% | 90,51% | 97,36% | 100,59% | 105,42% | 111,50% |
| 1,953 | 3,64% | 4,27% | 3,62% | 1,70% | 39,96% | 91,54% | 101,88% | 105,77% | 104,28% | 107,51% |
| 0,977 | 3,47% | 4,25% | 4,26% | 2,11% | 31,63% | 92,17% | 103,35% | 107,43% | 104,60% | 109,71% |

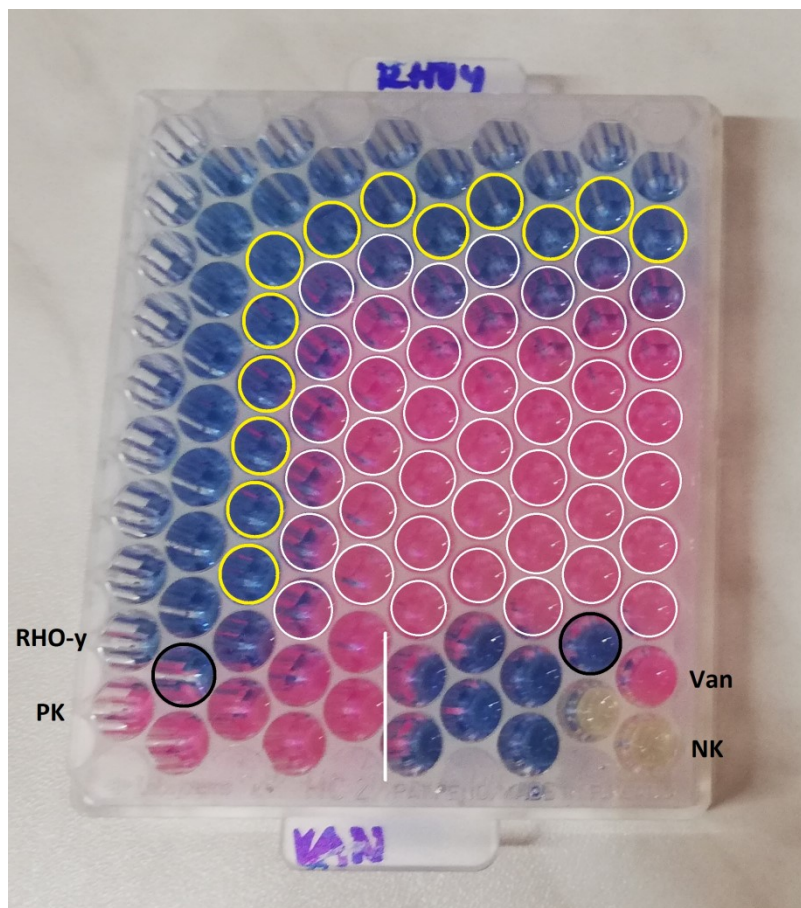
Výsledky jsou vyjádřeny jako vypočtené hodnoty procentuální redukce barviva alamarBlue, ke které dochází následkem metabolické aktivity bakterií. V tabulce je označeno rozhraní mezi jamkami s prokazatelným nárůstem bakterií a jamkami, ve kterých byl bakteriální růst vlivem kombinace testovaných látek inhibován. Toto rozhraní bylo vyznačeno na základě údajů získaných s využitím spektrofotometrické detekce bez použití indikátoru alamarBlue.

Tab. 13 Hodnocení kombinace látky RHO-y s vankomycinem pomocí alamarBlue

| RHO-y ($\mu\text{mol/l}$) | Vankomycin (mg/l) | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|----------|----------|
| | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,0625 | 0,03125 | 0,015625 | 0,007813 |
| 125 | 8,24% | 8,58% | 7,48% | 20,50% | 7,64% | 8,96% | 6,71% | 10,29% | 8,50% | 11,88% |
| 62,5 | 5,50% | 7,40% | 4,28% | 4,63% | 5,23% | 9,92% | 4,96% | 12,33% | 7,90% | 14,03% |
| 31,25 | 5,11% | 8,30% | 4,19% | 55,54% | 26,24% | 27,39% | 26,74% | 35,57% | 45,03% | 57,09% |
| 15,625 | 4,50% | 8,40% | 4,30% | 83,15% | 71,83% | 82,91% | 74,30% | 100,81% | 79,54% | 91,44% |
| 7,813 | 5,60% | 10,28% | 44,62% | 82,43% | 79,73% | 85,25% | 85,00% | 98,83% | 87,55% | 106,45% |
| 3,906 | 5,36% | 10,69% | 14,44% | 87,84% | 82,04% | 86,85% | 87,13% | 98,55% | 95,63% | 111,67% |
| 1,953 | 5,29% | 8,17% | 5,01% | 87,22% | 82,68% | 90,03% | 86,85% | 97,91% | 97,88% | 104,90% |
| 0,977 | 4,98% | 8,93% | 4,79% | 93,27% | 88,92% | 94,42% | 91,97% | 103,39% | 95,51% | 105,80% |

Výsledky jsou vyjádřeny jako vypočtené hodnoty procentuální redukce barviva alamarBlue, ke které dochází následkem metabolické aktivity bakterií. V tabulce je označeno rozhraní mezi jamkami s prokazatelným nárůstem bakterií a jamkami, ve kterých byl bakteriální růst vlivem kombinace testovaných látek inhibován. Toto rozhraní bylo vyznačeno na základě údajů získaných s využitím spektrofotometrické detekce bez použití indikátoru alamarBlue.

Podle původních předpokladů měla míra redukce tohoto indikátoru plně korelovat s mírou metabolické aktivity bakterií. V našem případě se však prokázalo, že tento způsob pro hodnocení antibakteriálního efektu při vzájemné interakci dvou látek nelze plnohodnotně využít. Jak je patrné z předchozích tabulek, v jamkách, kde byla jednoznačně prokázána inhibice růstu na základě spektrofotometrické detekce, vizuální detekce zákalu i vizuální detekce barevné konverze indikátoru (viz Obr. 24), lze detekovat pomocí tohoto přístupu relativní redukci barviva. Například v jamce, kde byl pipetován ciprofloxacín o koncentraci 0,00195 mg/l a RHO-y o koncentraci 62,5 $\mu\text{mol/l}$ bylo zjevně dosaženo MIC v kombinaci. Přesto zde byla detekována míra redukce 16,60 %. Dokonce v jamce, kam byl pipetován ciprofloxacín o cílové koncentraci 0,25 mg/l a RHO-y o cílové koncentraci 1,953 $\mu\text{mol/l}$ bylo dosaženo míry redukce 30,63 %. Jedno z vysvětlení by mohlo souviset i s možným mechanismem působení testované kombinace látek. Pokud by kombinace látek působila pouze bakteriostaticky, došlo by sice v těchto jamkách k inhibici růstu bakterií, ale ne k jejich usmrcení. Díky tomu mohl indikátor reagovat na určitou míru metabolické aktivity těchto bakterií i přesto, že nedošlo v jamce k viditelnému nárůstu.



Obr. 24 Hodnocení kombinovaného antibakteriálního účinku látky RHO-y a vankomycinu s využitím vizuální detekce barevné konverze metabolického indikátoru alamarBlue

Na fotografii je zobrazena barevná změna metabolického indikátoru alamarBlue v přítomnosti metabolicky aktivních bakterií (jamky s růžovým zbarvením). Pro srovnání s výsledky získanými s využitím spektrofotometrické detekce jsou na fotografii označeny jamky, kde byl takto detekován bakteriální růst (jamky ohraničené bílou barvou). Žlutě jsou pak ohraničeny jamky odpovídající hodnotě minimální inhibiční koncentrace (MIC). Do předposledního řádku byly pipetovány látky RHO-y (zleva pipetovány koncentrace 125 – 7,813 $\mu\text{mol/l}$) a vankomycin (Van, zleva pipetovány koncentrace 8 – 0,5 mg/l) samostatně, jejich hodnoty MIC zjištěné s využitím spektrofotometrické detekce jsou ohraničeny černou barvou. Do posledního řádku byly pipetovány pozitivní (PK) a negativní (NK) kontroly. Do dvou jamek NK zprava nebyl pipetován indikátor alamarBlue.

V případě jamek, kde nedošlo k inhibici růstu bakterií vlivem působení obou látek v kombinaci, byly v některých případech dokonce zjištěny hodnoty redukce převyšující hodnoty pro pozitivní kontroly. Při nižších koncentracích zkoušených látek tedy došlo k nárůstu metabolické aktivity oproti bakteriím, na které daná kombinace nepůsobila. To je možné vysvětlit zvýšeným metabolismem bakterií v odpovědi na přítomnost nepříznivých podmínek v podobě subinhibičních koncentrací antibakteriální látky. Lze tedy konstatovat,

že tento způsob hodnocení je nejednoznačný a pro jeho užití by bylo zapotřebí navolit hraniční (cut-off) hodnoty jako rozhraní pro hodnocení mezi inhibicí a růstem bakterií v jamkách, a to vždy pro každou jednotlivou kombinaci testované látky a komerčně dostupného antibiotika.

5 Diskuze

Antibiotická rezistence patří v současnosti mezi nejzásadnější témata v oblasti medicíny. S ohledem na závažnost tohoto problému je jí celosvětově věnována stále větší pozornost [3] a za jednu z priorit si boj s antibiotickou rezistencí vytyčila i Světová zdravotnická organizace. [2] A není zdaleka jediná. Počátek nového tisíciletí probudil enormní zájem o tuto problematiku a povědomí o nebezpečí antibiotické rezistence se přesunulo z vědeckých kruhů i mezi širokou veřejnost. Kromě pozornosti je také snaha problému antibiotické rezistence věnovat i stále více finančních prostředků. Dochází také k nárůstu podílu veřejných financí na výzkumu nových antibakteriálních léčiv, který se dlouhodobě potýká s nedostatkem prostředků. [37; 38; 39]

Problematický je především rychlý nárůst počtu rezistentních bakteriálních kmenů, na který bohužel farmaceutický průmysl nedokáže dostatečně reagovat. V počátcích antibiotického výzkumu docházelo k produkci mnoha strukturních typů nových antibiotik, díky kterým bylo možné úspěšně léčit většinu bakteriálních infekcí. V posledních letech ale bylo představeno jen minimum nových antibakteriálních léčiv a ta, která se na trh dostala, zpravidla nenabízí nový mechanismus účinku, ale jen obměnu již známých struktur. Objevují se proto také četné snahy o inovativní přístupy k terapii bakteriálních infekcí. [40; 44]

Kromě hledání inovativních přístupů pro boj s rezistentními kmeny je ale také důležité zabránit jejich vzniku a dalšímu šíření. Díky tomu bude možné nejen zachovat účinnost v současnosti používaných antibiotik, ale také zabránit tomu, aby případná nová léčiva, kterých je velmi málo, ztratila v budoucnu svou účinnost. Základem boje proti šíření rezistence bakterií k antibiotikům je zodpovědné zacházení s antibiotiky na všech úrovních zdravotní péče. Zásadní je v tomto odpovědnost státu za národní antibiotickou politiku, která určuje pravidla pro nakládání s antibiotiky na jeho území. [17; 20] Realizaci této politiky v kontextu zdravotnického systému mají poté na starosti zdravotníci, kteří zodpovídají za správné nakládání s antibiotiky na celé jejich cestě až k pacientovi. [21; 23]

S ohledem na náročnost vývoje nových skupin antibiotik se jako perspektivní směr nabízí také opětovné využití již existujících látek. Poměrně časté jsou proto například snahy o zkoušení starších, již nevyužívaných antibiotik, která by mohla znovu najít své místo v terapii bakteriálních infekcí. [42; 47] Nemusí jít ale jen o využívání starších antibiotik. Pro

svoje antibakteriální účinky jsou zkoušena také mnohá léčiva, která byla vyvíjena pro zcela odlišnou indikaci. [43; 49] Výhodou takových léčiv je především to, že už jednou úspěšně prošla klinickým hodnocením a jsou tak dobře známy jejich farmakologické vlastnosti. Díky tomu by se mohla do praxe rychleji dostat nová léčiva a do značné míry by tak odpadl zdoluhavý proces klinického zkoušení nových přípravků. [46]

Jednou z dalších možností, jak využít již objevené, je snaha podpořit účinek v současnosti využívaných léčiv jejich kombinací s jinými látkami. Kromě často využívaných kombinací více antibiotik [8] je zkoumána i možnost jejich kombinace s novými látkami, které často ani vlastní antibakteriální účinek nemají. Může se jednat buď o využití již existujících léčiv s jinou indikací, nebo vývoj úplně nových látek, které by dokázaly podpořit účinek antibiotik, která ztrácí účinnost vlivem rozvoje bakteriální rezistence. [48; 50]

Hledání nových látek s antibakteriálním účinkem bylo i podstatou této práce. Bylo prováděno hodnocení antibakteriální aktivity rhodaninových derivátů nově syntetizovaných na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, konkrétně se jednalo o 5-arylmethylidenrhodaniny. Rhodaninové deriváty s obdobnou substitucí jsou v posledních letech často zkoumány pro své široké farmakologické účinky. [51; 52] Kromě protinádorové nebo antidiabetické aktivity jsou rhodaniny také zkoumány právě pro svou potenciální antibakteriální aktivitu. [55; 56; 59] Některé látky z této skupiny sice nemají vlastní antibakteriální aktivitu, ale byla u nich prokázána schopnost podpořit účinek jiných antibakteriálně působících látek. [54]

Na základě výsledků základního testování bylo pro pokročilé studie vybráno devět látek, které vykazovaly potenciál jako nové antibakteriálně působící sloučeniny. Hodnocení antibakteriální aktivity těchto látek probíhalo prostřednictvím zjišťování hodnot MIC za použití mikrodiluční bujónové metody. Tato metoda je uznávaným standardem pro určování hodnot MIC při testování citlivosti bakterií k antibakteriálním látkám. Při provádění této metody bylo postupováno v souladu s metodikou EUCAST. [86] Výhodou této metody je především možnost testovat antibakteriální aktivitu dané látky současně proti několika bakteriálním kmenům v širokém koncentračním rozmezí. Na druhou stranu je ale tato metoda poměrně časově náročná a v porovnání s jinými metodami (např. E-test, disková difúzní metoda) také pracnější. [82; 83] S ohledem na to, že bylo prováděno hodnocení nově syntetizovaných látek, by ale nebylo možné tyto metody použít, protože

jsou prováděny s využitím antibiotických proužků a disků, které obsahují pouze komerčně dostupná antibiotika.

Pro pokročilé hodnocení vybraných rhodaninových derivátů byly zvoleny klinické izoláty bakterií rodu *Staphylococcus* a *Enterococcus*. Bakterie těchto rodů se řadí mezi významné patogeny, zejména meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* a vankomycin-rezistentní *Enterococcus faecium*. Oba tyto bakteriální kmeny byly Světovou zdravotnickou organizací zařazeny na seznam prioritních bakterií s rezistencí k antibiotikům, kterým má být věnována pozornost v oblasti výzkumu a vývoje. [4]

Pro odečítání hodnot MIC při provedení mikrodiluční bujónové metody byla zvolena spektrofotometrická detekce optické denzity s následnou konfirmací výsledků vizuální inspekcí. Díky spektrofotometrické detekci je, mimo jiné, možné vyjádřit závislost růstu bakterií (vyjádřen jako nárůst optické denzity) na koncentraci testované látky. Výhodou kontinuální spektrofotometrické detekce je pak zejména možnost sledovat dynamiku bakteriálního růstu v čase (v našem případě v průběhu 24 hodin). I přes tyto výhody je ale hodnocení pouhým okem stále považováno za standard v určování hodnot MIC při provádění této metody, z toho důvodu byla následně prováděna konfirmace za pomoci vizuální inspekce. [85]

V souladu s výsledky základního testování prokázaly testované rhodaninové deriváty aktivitu zejména proti bakteriálním kmenům *Staphylococcus aureus*. Naopak nejnižší aktivita byla zaznamenána v případě vankomycin-rezistentní bakterie *Enterococcus faecium*. Tyto výsledky odpovídají dosavadním poznatkům o antibakteriální aktivitě rhodaninových derivátů, které obecně vykazují aktivitu proti grampozitivním bakteriím, ale nejvýraznější je tato aktivita právě proti *Staphylococcus aureus* [57; 58].

Ze souboru devíti rhodaninových derivátů vybraných pro pokročilé studie byla pro testování antibakteriální aktivity v kombinaci s komerčně dostupnými antibiotiky zvolena látka s kódovým označením RHO-y. Pro hodnocení kombinované antibakteriální aktivity této látky s komerčně dostupnými antibiotiky byla použita metoda „checkerboard“. V oblasti testování kombinovaného účinku zatím neexistuje žádná metoda, která by byla považována za standardní. Problematická je nejen porovnatelnost různých používaných metod (E-test, „checkerboard“, „time-kill“ metoda), ale také zatím nedostatečně prozkoumaná korelace výsledků tohoto testování s následnou úspěšností dané kombinace

antibiotik v klinické praxi. [90; 91] Metoda „checkerboard“ je obdobou standardní mikrodiluční bujónové metody a z toho důvodu je poměrně časově náročná. V porovnání s využitím E-testu ale poskytuje širší možnosti hodnocení naměřených údajů a automatizace detekce. Naopak je ale méně časově náročná než „time-kill“ metoda a umožňuje také testovat širší rozmezí koncentrací zkoušených látek.

Pro zkoušení kombinovaného účinku s testovanou látkou byla vybrána tři komerčně dostupná antibiotika. Antibiotika ciprofloxacin, rifampicin a vankomycin byla zvolena jako zástupci látek s různými mechanismy účinku. Hodnocení následně probíhalo na základě výpočtu FIC indexu, který se používá ke zhodnocení kombinovaného účinku při provádění metody „checkerboard“. [89] Jediné komerčně dostupné antibiotikum, které prokázalo v určitém poměru koncentrací synergní účinek s testovanou látkou, byl ciprofloxacin. Ten vykazoval synergii v jedné kombinaci s testovanou látkou a aditivní účinek v pěti dalších kombinacích. Aditivní účinek byl prokázán také u dvou kombinací testované látky s rifampicinem. V kombinaci s vankomycinem pak byl prokázán ve všech poměrech koncentrací pouze indiferentní účinek. U žádné kombinace testované látky a komerčně dostupného antibiotika nebyl prokázán antagonistický účinek.

Jako alternativní způsob zhodnocení kombinovaného antibakteriálního účinku bylo zvoleno hodnocení metabolické aktivity bakterií s využitím barviva alamarBlue. Tento způsob hodnocení se ale oproti našemu původnímu předpokladu ukázal jako poměrně nejednoznačný. Vypočtená hodnota procentuální redukce barviva totiž ne vždy korelovala s výsledky získanými předchozí spektrofotometrickou detekcí a k redukci barviva, která by měla vypovídat o metabolické aktivitě bakterií, docházelo i v jamkách bez prokazatelného nárůstu bakterií. Tato redukce ale mohla být způsobena tím, že látka nevykazovala baktericidní aktivitu a v jamce tak byla prokázána určitá míra metabolické aktivity i v případě buněk s inhibovaným růstem. Pro případné vyhodnocení kombinovaného antibakteriálního účinku s využitím tohoto indikátoru by tedy bylo vždy nutné nejprve určit nějaké hraniční (cut-off) hodnoty pro různé kombinace testované látky s komerčně dostupnými antibiotiky, které by umožnily jednoznačně rozlišit jamky, ve kterých došlo k inhibici bakteriálního růstu.

Přestože testované látky v mnoha případech prokázaly slibnou antibakteriální aktivitu samostatně i v kombinaci, není možné jejich potenciál hodnotit jen na základě tohoto

testování. Pro případné budoucí využití takových látek v terapii je důležitá nejen jejich antibakteriální aktivita *in vitro*, ale zejména výsledky testů toxicity a následné testování jejich aktivity *in vivo*. Zásadní jsou také jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, které značně ovlivňují především možnosti případného technologického zpracování. Zejména v případě zjišťování antibakteriální aktivity v kombinacích s jinými antibiotiky pak není možné příliš odhadovat jejich účinnost *in vivo*. To je dané především neexistencí standardní metody pro testování kombinovaného účinku a nedostatečným množstvím dat, která by určila míru korelace dat *in vitro* a *in vivo*.

6 Závěr

- Na základě výsledků základního testování antibakteriální aktivity nově syntetizovaných látek ze skupiny derivátů rhodaninu bylo vybráno devět těchto látek pro pokročilé testování antibakteriální aktivity.
- Antibakteriální aktivita těchto látek byla hodnocena mikrodiluční bujónovou metodou s využitím klinických izolátů bakterií rodu *Staphylococcus* a *Enterococcus* a jednoho referenčního kmene *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC 43300, CCM 4750).
- Testované látky vykazovaly ve shodě s předchozím hodnocením selektivní antistafylokokovou aktivitu, nejnižší aktivita byla zaznamenána proti *Enterococcus faecium* VRE.
- Z testovaných látek byla vybrána látka s kódovým označením RHO-y pro zkoušení kombinovaného antibakteriálního účinku s komerčně dostupnými antibiotiky.
- Byl prokázán synergní účinek této látky v kombinaci s ciprofloxacinem v koncentračním poměru 0,25*MIC (RHO-y) : 0,125*MIC (ciprofloxacin). Dále vykazovala tato kombinace aditivní účinek v poměrech 0,5*MIC : 0,5*MIC; 0,25*MIC : 0,5*MIC; 0,125*MIC : 0,5*MIC; 0,0625*MIC : 0,5*MIC a 0,03125*MIC : 0,5*MIC. V dalších koncentračních poměrech prokázala tato kombinace pouze indiferentní účinek.
- Dále látka RHO-y vykazovala aditivní účinek ve dvou kombinacích s rifampicinem, konkrétně v poměrech 0,5*MIC (RHO-y) : 0,25*MIC (rifampicin) a 0,5*MIC : 0,5*MIC.
- V případě vankomycinu byl ve všech kombinacích s látkou RHO-y prokázán pouze indiferentní účinek. U žádné z testovaných kombinací látky RHO-y a komerčně dostupného antibiotika pak nebyl prokázán antagonismus.
- V rámci metody „checkerboard“ byly voleny tři způsoby odečtu výsledků, a to spektrofotometrická detekce, odečet nárůstu bakterií (zákalu) pouhým okem a odečet barevné změny metabolického indikátoru alamarBlue. Ten byl proveden pouhým okem i spektrofotometricky s následným výpočtem procentuální redukce barviva.
- Využití barviva alamarBlue pro hodnocení kombinovaného antibakteriálního účinku na základě výpočtu procentuální redukce barviva alamarBlue se ukázalo jako

nejednoznačné a pro jeho případné využití k odečtu jamek s hodnotou MIC by bylo nutné stanovit cut-off hodnoty pro různé kombinace testované látky s komerčně dostupnými antibiotiky.

- Jako nejspolehlivější způsob odečítání výsledků byla vyhodnocena spektrofotometrická detekce, která dobře korelovala s odečtem bakteriálního nárůstu (zákalu) pouhým okem a barevnou změnou metabolického indikátoru (při odečtu pouhým okem).

7 Seznam použitých zkratk

| | |
|--------------|---|
| ATCC | <u>American Type Collection Cultures</u> (nezisková organizace, která shromažďuje a uchovává sbírkové mikroorganismy) |
| β -NAD | <u>β-nikotinamidadeninukleotid</u> |
| CAMHB | <u>Cation-adjusted Mueller-Hinton broth</u> , Mueller-Hinton bujón s upravenými kationty |
| CCM | <u>Czech Collection of Microorganisms</u> , Česká sbírka mikroorganismů |
| CDC | <u>Centers for Disease Control and Prevention</u> , Centra pro kontrolu a prevenci nemocí |
| CFU | <u>Colony-forming unit</u> , kolonie tvořící jednotka |
| CLSI | The <u>Clinical and Laboratory Standards Institute</u> , Institut pro klinické a laboratorní standardy |
| ČLS JEP | <u>Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně</u> |
| DMSO | <u>Dimethylsulfoxid</u> |
| DNA | <u>Deoxyribonucleic acid</u> , deoxyribonukleová kyselina |
| EARS-Net | The <u>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</u> , Evropská síť pro sledování antimikrobiální rezistence |
| ECDC | <u>European Centre for Disease Prevention and Control</u> , Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí |
| ECOFF | <u>Epidemiological cut-off value</u> , epidemiologická cut-off hodnota |
| ESAC-Net | The <u>European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network</u> , Evropská síť pro sledování spotřeby antimikrobiálních látek |
| ESCMID | <u>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</u> , Evropská společnost klinické mikrobiologie a infekčních nemocí |
| EUCAST | <u>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</u> , Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti |
| FIC | <u>Fractional inhibitory concentration</u> , frakční inhibiční koncentrace |
| GARDP | <u>Global Antibiotic Research and Development Partnership</u> , Globální partnerství pro výzkum a vývoj antibiotik |
| GLASS | <u>Global Antimicrobial Resistance Surveillance System</u> , Globální systém pro sledování antimikrobiální rezistence |

| | |
|---------|--|
| GNI | <u>G</u> ross <u>n</u> ational <u>i</u> ncome, hrubý národní důchod |
| GTAs | <u>G</u> ene <u>t</u> ransfer <u>a</u> gents (částic podobné virům, které jsou produkovány bakteriemi a jsou schopné přenosu genetické informace) |
| HAI-Net | <u>H</u> ealthcare- <u>a</u> ssoiated <u>I</u> nfections <u>S</u> urveillance <u>N</u> etwork, Systém sledování infekcí spojených se zdravotní péčí |
| MDR | <u>M</u> ultidrug- <u>r</u> esistant (označení pro bakterie se získanou rezistencí k alespoň jednomu antibiotiku nejméně ze třech rozdílných skupin) |
| MIC | <u>M</u> inimum <u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration, minimální inhibiční koncentrace |
| MRSA | <u>M</u> ethicillin- <u>r</u> esistant <u>S</u> taphylococcus <u>a</u> ureus, meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> |
| NAP | <u>N</u> árodní <u>a</u> ntibiotický <u>p</u> rogram |
| OD | <u>O</u> ptická <u>d</u> enzita |
| PDR | <u>P</u> andrug- <u>r</u> esistant (označení pro bakterie s rezistencí ke všem používaným skupinám antibiotik) |
| PPAR | <u>P</u> eroxisome <u>p</u> roliferator- <u>a</u> ctivated <u>r</u> eceptor, receptor aktivovaný proliferátorem peroxizomů |
| RNA | <u>R</u> ibonucleic <u>a</u> cid, ribonukleová kyselina |
| SZÚ | <u>S</u> tátní <u>z</u> davatní <u>ú</u> stav |
| TSST-1 | <u>T</u> oxic <u>s</u> hock <u>s</u> yndrom <u>t</u> oxin, toxin syndromu toxického šoku |
| UDP | <u>U</u> ridine <u>d</u> iphosphate, uridindifosfát |
| VISA | <u>V</u> ancomycin- <u>i</u> ntermediate <u>S</u> taphylococcus <u>a</u> ureus, <i>Staphylococcus aureus</i> se sníženou citlivostí k vankomycinu |
| VRE | <u>V</u> ancomycin- <u>r</u> esistant <u>e</u> nterococci, vankomycin-rezistentní enterokoky |
| VRSA | <u>V</u> ancomycin- <u>r</u> esistant <u>S</u> taphylococcus <u>a</u> ureus, vankomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> |
| WHO | <u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization, Světová zdravotnická organizace |
| XDR | <u>E</u> xtensively <u>d</u> rug- <u>r</u> esistant (označení pro bakterie rezistentní ke všem skupinám antibiotik s výjimkou nejvýše dvou skupin) |

8 Seznam obrázků

| | | |
|---------|--|----|
| Obr. 1 | Seznam prioritních patogenů dle Světové zdravotnické organizace | 13 |
| Obr. 2 | Procento invazivních izolátů <i>St. aureus</i> rezistentních k meticilinu (MRSA), 2018 | 16 |
| Obr. 3 | Procento invazivních izolátů <i>E. faecium</i> rezistentních k vankomycinu (VRE), 2018 | 16 |
| Obr. 4 | Mechanismy rezistence bakterií k účinkům antibiotik..... | 17 |
| Obr. 5 | Mechanismy horizontálního přenosu genetické informace u bakterií | 18 |
| Obr. 6 | Schématické zobrazení vrstev bakteriálního biofilmu | 26 |
| Obr. 7 | Životní cyklus biofilmu..... | 27 |
| Obr. 8 | Biosyntéza kyseliny listové | 30 |
| Obr. 9 | Časová osa vývoje nových antibiotik..... | 34 |
| Obr. 10 | Strukturní základ látek ze skupiny derivátů rhodaninu (2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on)..... | 38 |
| Obr. 11 | Strukturní vzorec léčiva epalrestat (inhibitor aldehyd reduktázy)..... | 40 |
| Obr. 12 | Schématické zobrazení diskové difúzní metody..... | 43 |
| Obr. 13 | Fotografie demonstrující provedení E-testu | 44 |
| Obr. 14 | Stanovení hodnoty minimální inhibiční koncentrace pomocí mikrodiluční bujónové metody | 46 |
| Obr. 15 | Výpočet hodnoty frakční inhibiční koncentrace..... | 48 |
| Obr. 16 | Zhodnocení kombinovaného účinku na základě hodnot frakční inhibiční koncentrace..... | 48 |
| Obr. 17 | Schéma přípravy dvojkové ředící řady testovaných látek..... | 51 |
| Obr. 18 | Schéma pipetování testované látky a testovacích kmenů do Honeycomb destičky..... | 52 |
| Obr. 19 | Schéma pipetování testované látky a komerčně dostupného antibiotika do destičky Honeycomb za účelem provedení metody „checkerboard“ | 55 |
| Obr. 20 | Výpočet procentuální redukce barviva alamarBlue | 56 |
| Obr. 21 | Závislost optické denzity na různých koncentracích testované látky (RHO-z)..... | 62 |
| Obr. 22 | Vývoj hodnot optické denzity v průběhu 24 hodin při cílových koncentracích testované látky (RHO-z) odpovídajících hodnotám 0,25*MIC, 0,5*MIC, MIC a 2*MIC..... | 63 |
| Obr. 23 | Vývoj hodnot optické denzity v průběhu 24 hodin při cílových koncentracích testované látky (RHO-z) odpovídajících hodnotám 0,25*MIC, 0,5*MIC, MIC a 2*MIC..... | 64 |
| Obr. 24 | Hodnocení kombinovaného antibakteriálního účinku látky RHO-y a vankomycinu s využitím vizuální detekce barevné konverze metabolického indikátoru alamarBlue..... | 71 |

9 Seznam tabulek

| | | |
|---------|--|----|
| Tab. 1 | Seznam bakteriálních kmenů použitých pro testování..... | 49 |
| Tab. 2 | Soubor devíti rhodaninových derivátů vybraných pro pokročilé studie antibakteriální aktivity..... | 57 |
| Tab. 3 | Kódová označení a strukturní vzorce rhodaninových derivátů vybraných pro další hodnocení antibakteriální aktivity | 58 |
| Tab. 4 | Stanovené hodnoty minimální inhibiční koncentrace u devíti vybraných rhodaninových derivátů..... | 61 |
| Tab. 5 | Vypočtené hodnoty indexu frakční inhibiční koncentrace pro kombinaci látky RHO-y s ciprofloxacinem | 65 |
| Tab. 6 | Hodnocení kombinovaného antibakteriálního účinku látky RHO-y a ciprofloxacinu vůči kmenu <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (interní laboratorní označení 143-2016) pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace. | 65 |
| Tab. 7 | Vypočtené hodnoty indexu frakční inhibiční koncentrace pro kombinaci látky RHO-y s rifampicinem..... | 66 |
| Tab. 8 | Hodnocení kombinovaného antibakteriálního účinku látky RHO-y a rifampicinu vůči kmenu <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (interní laboratorní označení 143-2016) pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace. | 66 |
| Tab. 9 | Vypočtené hodnoty indexu frakční inhibiční koncentrace pro kombinaci látky RHO-y s vankomycinem..... | 67 |
| Tab. 10 | Hodnocení kombinovaného antibakteriálního účinku látky RHO-y a vankomycinu vůči kmenu <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (interní laboratorní označení 143-2016) pomocí výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace. | 67 |
| Tab. 11 | Hodnocení kombinace látky RHO-y s ciprofloxacinem pomocí alamarBlue..... | 68 |
| Tab. 12 | Hodnocení kombinace látky RHO-y s rifampicinem pomocí alamarBlue | 69 |
| Tab. 13 | Hodnocení kombinace látky RHO-y s vankomycinem pomocí alamarBlue | 69 |

10 Bibliografie

1. **O'Neill, J.** Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *The Review on Antimicrobial Resistance*. [Online] 19. 5. 2016. [Citace: 3. 5. 2020.] Dostupné z: <https://amr-review.org/>.
2. Global action plan on antimicrobial resistance. *WHO*. [Online] [Citace: 14. 12. 2019.] ISBN: 9789241509763. Dostupné z: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>.
3. **Podolsky, S. H.** The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). *Palgrave Communications*. 2018, 4, 124. doi:10.1016/j.femsle.2004.06.005. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41599-018-0181-x>.
4. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *WHO*. [Online] 27. 2. 2017. [Citace: 17. 3. 2020.] Dostupné z: <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>.
5. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. *European Centre for Disease Prevention and Control*. [Online] [Citace: 7. 12. 2019.] ISBN 978-92-9498-387-9. doi: 10.2900/22212. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018>.
6. Antibiotic resistance. *WHO*. [Online] [Citace: 8. 12. 2019.] Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
7. Surveillance Atlas of Infectious Diseases. *European Centre for Disease Prevention and Control*. [Online] [Citace: 7. 12. 2019.] Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>.
8. **Beneš, J.** *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha : Grada Publishing, 2018. ISBN 9788027106363.
9. Resistance mechanisms. *ReAct*. [Online] [Citace: 15. 4. 2020.] Dostupné z: <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/resistance-mechanisms-in-bacteria/>.
10. **von Wintersdorff, C. J., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H., Wolffs, P. F.** Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in microbiology*. 2016, 7, 173. doi:10.3389/fmicb.2016.00173. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00173/full>.
11. **Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., Balaban, N. Q.** Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*. 2016, 14(5), 320-330. doi:10.1038/nrmicro.2016.34. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.34>.
12. **Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens,**

- M. , Vatopoulos, A., Weber, J., Monnet, D.** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*. 2012, 18(3), 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Dostupné z: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)61632-3/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61632-3/fulltext).
13. **Andersson, D. I.** The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Current opinion in microbiology*. 2006, 9(5), 461–465. doi:10.1016/j.mib.2006.07.002. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527406001214>.
14. **Andersson, D. I., Hughes, D.** Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature reviews. Microbiology*. 2010, 8(4), 260–271. doi:10.1038/nrmicro2319. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2319>.
15. **Schulz zur Wiesch, P., Engelstädter, J., Bonhoeffer, S.** Compensation of fitness costs and reversibility of antibiotic resistance mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010, 54(5), 2085–2095. doi:10.1128/AAC.01460-09. Dostupné z: <https://aac.asm.org/content/54/5/2085.long>.
16. **Marcusson, L. L., Frimodt-Møller, N., Hughes, D.** Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS pathogens*. 2009, 5(8): e1000541. doi:10.1371/journal.ppat.1000541. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000541>.
17. Antimicrobial stewardship programmes in health-care facilities in low- and middle-income countries. *WHO*. [Online] [Citace: 18. 1. 2020.] ISBN 978-92-4-151548-1. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/329404>.
18. Pokyny EU pro uvážlivé používání antimikrobiálních látek v humánním lékařství. *Úřad pro publikace Evropské unie*. [Online] 7. 1. 2017. [Citace: 26. 1. 2020.] 2017/C 212/01. Dostupné z: <https://op.europa.eu/cs/publication-detail/-/publication/c1222a2d-5e22-11e7-954d-01aa75ed71a1>.
19. Pokyny pro uvážlivé používání antimikrobiálních látek ve veterinárním lékařství. *Úřad pro publikace Evropské unie*. [Online] 11. 9. 2015. [Citace: 26. 1. 2020.] 2015/C 299/04. Dostupné z: <https://op.europa.eu/cs/publication-detail/-/publication/202c8681-5813-11e5-afbf-01aa75ed71a1>.
20. **Šturma, J.** Činnosti a funkce NAP. *Státní zdravotní ústav*. [Online] 16. 8. 2011. [Citace: 16. 3. 2020.] Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/cinnosti-a-funkce>.
21. **Paterová, P., Králíčková, P., Vávrová, P., Žemličková, H.** Principy racionální léčby antibiotiky (část I.). *Intervenční a akutní kardiologie*. 2016, 15(2), 85-89. Dostupné z: https://www.solen.cz/artkey/kar-201602-0006_Principy_racionalni_lecby_antibiotiky_cast_I.php.
22. **Kocmanová, I.** Význam bakteriologického screeningu kolonizačních kmenů u hematoonkologických nemocných. *Postgraduální medicína*. 2011, 13(5), 9-11. ISSN 1212-4184. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha-vyznam-bakteriologickeho-screeningu-kolonizacnich-kmenu-u-hematoonkologickych-nemocnych-462237>.

23. **Paterová, P., Králíčková, P., Vávrová, P., Žemličková, H.** Principy racionální léčby antibiotiky (část II.). *Intervenční a akutní kardiologie*. 2016, 15(2), 90-93. Dostupné z: https://www.solen.cz/artkey/kar-201602-0007_Principy_racionalni_lecby_antibiotiky_cast_II.php.
24. **Jefferson, K. K.** What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*. 2004, 236(2), 163-73. doi:10.1016/j.femsle.2004.06.005. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article/236/2/163/535288>.
25. **Solano, C., Echeverz, M., Lasa, I.** Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current opinion in microbiology*. 2014, 18, 96–104. doi:10.1016/j.mib.2014.02.008. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527414000290>.
26. **Stewart, P. S., Franklin, M. J.** Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature reviews. Microbiology*. 2008, 6(3), 199–210. doi:10.1038/nrmicro1838. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1838>.
27. **Jensen, P. Ø., Kolpen, M., Kragh, K. N., Kühn, M.** Microenvironmental characteristics and physiology of biofilms in chronic infections of CF patients are strongly affected by the host immune response. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2017, 125(4), 276–288. doi:10.1111/apm.12668. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/apm.12668>.
28. **Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S., Tolker-Nielsen, T.** Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental microbiology*. 2005, 7(6), 894–906. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00775.x. Dostupné z: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-2920.2005.00775.x>.
29. Biofilm basics: Section 1. *Montana State University*. [Online] [Citace: 17. 3. 2020.] Dostupné z: http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics/what_are_biofilms.html.
30. **Táborská, J.** Syndrom toxického šoku. *Interní medicína pro praxi*. 2009, 11(9), 405-409. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200909-0009_Syndrom_toxickeho_soku.php.
31. Tuberkulóza dospělých (Standard léčebného plánu). *Česká pneumologická a ftizeologická společnost ČLS JEP*. [Online] 2019. [Citace: 11. 3. 2020.] Dostupné z: <http://www.pneumologie.cz/guidelines/>.
32. Vitaminy a výživa. *Funkce buněk a lidského těla - Multimediální skripta*. [Online] [Citace: 19. 3. 2020.] Dostupné z: <http://fblt.cz/skripta/ix-travici-soustava/7-vitaminy-a-vyziva/>.
33. **Climo, M. W., Patron, R. L., Archer, G. L.** Combinations of vancomycin and beta-lactams are synergistic against staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999, 43(7), 1747–1753. doi: 10.1128/AAC.43.7.1747. Dostupné z: <https://aac.asm.org/content/43/7/1747.long>.
34. **Bakthavatchalam, Y. D., Ralph, R., Veeraraghavan, B., Babu, P., Munusamy, E.** Evidence from an In Vitro Study: Is Oxacillin Plus Vancomycin a Better Choice for Heteroresistant Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*? *Infectious diseases and therapy*. 2019, 8(1), 51–62.

doi:10.1007/s40121-018-0224-z. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40121-018-0224-z>.

35. **McGuinness, W. A., Malachowa, N., DeLeo, F. R.** Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Yale journal of biology and medicine*. 2017, 90(2), 269–281. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5482303/>.
36. **Tyers, M., Wright, G. D.** Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. *Nature reviews microbiology*. 2019, 17(3), 141–155. doi:10.1038/s41579-018-0141-x. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41579-018-0141-x>.
37. **Paton, J., Kresge, N.** Superbugs Win Another Round as Big Pharma Leaves Antibiotics. *Bloomberg*. [Online] 13. 7. 2018. [Citace: 26. 3. 2020.] Dostupné z: <https://www.bloomberg.com/news/articles/2018-07-13/superbugs-win-another-round-as-big-pharma-leaves-antibiotics>.
38. **Basarab, G. S., Kern, G. H., McNulty, J., Mueller, J. P., Lawrence, K., Vishwanathan, K., Alm, R. A., Barvian, K., Doig, P., Galullo, V., Gardner, H., Gowravaram, M., Huband, M., Kimzey, A., Morningstar, M., Kutschke, A., Lahiri, S. D., Perros, M.** Responding to the challenge of untreatable gonorrhea: ETX0914, a first-in-class agent with a distinct mechanism-of-action against bacterial Type II topoisomerases. *Scientific reports*. 2015, 5, 11827. doi:10.1038/srep11827. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/srep11827>.
39. Uniting against antibiotic resistance. *GARDP*. [Online] [Citace: 21. 3. 2020.] Dostupné z: <https://gardp.org/who-we-are/strategy/>.
40. **Aminov, R. I.** A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*. 2010, 1, 134. doi:10.3389/fmicb.2010.00134. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2010.00134/full>.
41. Few antibiotics under development. *ReAct*. [Online] [Citace: 22. 3. 2020.] Dostupné z: <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/how-did-we-end-up-here/few-antibiotics-under-development/>.
42. **Livermore, D. M.** Quinupristin/dalfopristin and linezolid: where, when, which and whether to use? *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2000, 46(3), 347–350. doi:10.1093/jac/46.3.347. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jac/article/46/3/347/881866>.
43. **Opal, S. M.** Non-antibiotic treatments for bacterial diseases in an era of progressive antibiotic resistance. *Critical care*. 2016, 20(1), 397. doi:10.1186/s13054-016-1549-1. Dostupné z: <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-016-1549-1>.
44. **Theuretzbacher, U., Piddock, L.** Non-traditional Antibacterial Therapeutic Options and Challenges. *Cell host & microbe*. 2019, 26(1), 61–72. doi:10.1016/j.chom.2019.06.004. Dostupné z: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(19\)30293-8](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(19)30293-8).
45. **Miller, M. B., Bassler, B. L.** Quorum sensing in bacteria. *Annual review of microbiology*. 2001, 55, 165–199. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.165. Dostupné z: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.55.1.165>.

46. **Schein, C. H.** Repurposing approved drugs on the pathway to novel therapies. *Medicinal research reviews*. 2020, 40(2), 586–605. doi:10.1002/med.21627. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/med.21627>.
47. **Serio, A. W., Keepers, T., Andrews, L., Krause, K. M.** Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus*. 2018, 8(1). doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2018. Dostupné z: <https://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2018>.
48. **Ejim, L., Farha, M. A., Falconer, S. B., Wildenhain, J., Coombes, B. K., Tyers, M., Brown, E. D., Wright, G. D.** Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nature chemical biology*. 2011, 7(6), 348–350. doi:10.1038/nchembio.559. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nchembio.559>.
49. **Kalle, A. M., Rizvi, A.** Inhibition of bacterial multidrug resistance by celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011, 55(1), 439–442. doi:10.1128/AAC.00735-10. Dostupné z: <https://aac.asm.org/content/55/1/439.long>.
50. **Wright, G. D.** Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends in microbiology*. 2016, 24(11), 862–871. doi:10.1016/j.tim.2016.06.009. Dostupné z: [https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(16\)30072-5](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(16)30072-5).
51. **Kaminsky, D., Kryshchyshyn, A., Lesyk, R.** 5-Ene-4-thiazolidinones - An efficient tool in medicinal chemistry. *European journal of medicinal chemistry*. 2017, 140, 542–594. doi:10.1016/j.ejmech.2017.09.031. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523417307456>.
52. **Kaminsky, D., Kryshchyshyn, A., Lesyk, R.** Recent developments with rhodanine as a scaffold for drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*. 2017, 12(12), 1233–1252. doi:10.1080/17460441.2017.1388370. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17460441.2017.1388370>.
53. **Tang, S. Q., Lee, Y. Y., Packiaraj, D. S., Ho, H. K., Chai, C. L.** Systematic Evaluation of the Metabolism and Toxicity of Thiazolidinone and Imidazolidinone Heterocycles. *Chemical research in toxicology*. 2015, 28(10), 2019–2033. doi:10.1021/acs.chemrestox.5b00247. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.5b00247>.
54. **Brem, J., van Berkel, S. S., Aik, W., Rydzik, A. M., Avison, M. B., Pettinati, I., Umland, K. D., Kawamura, A., Spencer, J., Claridge, T. D., McDonough, M. A., Schofield, C. J.** Rhodanine Hydrolysis Leads to Potent Thioenolate Mediated Metallo- β -Lactamase Inhibition. *Nature chemistry*. 2014, 6(12), 1084–1090. doi:10.1038/nchem.2110. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nchem.2110>.
55. **Suree, N., Yi, S. W., Thieu, W., Marohn, M., Damoiseaux, R., Chan, A., Jung, M. E., Clubb, R. T.** Discovery and structure-activity relationship analysis of Staphylococcus aureus sortase A inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2009, 17(20), 7174–7185. doi:10.1016/j.bmc.2009.08.067. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089609008414>.

56. **Carlson, E. E., May, J. F., Kiessling, L. L.** Chemical probes of UDP-galactopyranose mutase. *Chemistry & biology*. 2006, 13(8), 825–837. doi:10.1016/j.chembiol.2006.06.007. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552106002171>.
57. **Song, M. X., Zheng, C. J., Deng, X. Q., Wang, Q., Hou, S. P., Liu, T. T., Xing, X. L., Piao, H. R.** Synthesis and bioactivity evaluation of rhodanine derivatives as potential anti-bacterial agents. *European journal of medicinal chemistry*. 2012, 54, 403–412. doi:10.1016/j.ejmech.2012.05.023. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523412003340>.
58. **Song, M. X., Li, S. H., Peng, J. Y., Guo, T. T., Xu, W. H., Xiong, S. F., Deng, X. Q.** Synthesis and Bioactivity Evaluation of N-Arylsulfonylindole Analogs Bearing a Rhodanine Moiety as Antibacterial Agents. *Molecules*. 2017, 22(6), 970. doi:10.3390/molecules22060970. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/6/970>.
59. **Vicini, P., Geronikaki, A., Anastasia, K., Incerti, M., Zani, F.** Synthesis and antimicrobial activity of novel 2-thiazolylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2006, 14(11), 3859–3864. doi:10.1016/j.bmc.2006.01.043. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089606000745>.
60. **Vicini, P., Geronikaki, A., Incerti, M., Zani, F., Dearden, J., Hewitt, M.** 2-Heteroarylimino-5-benzylidene-4-thiazolidinones analogues of 2-thiazolylimino-5-benzylidene-4-thiazolidinones with antimicrobial activity: synthesis and structure-activity relationship. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2008, 16(7), 3714–3724. doi:10.1016/j.bmc.2008.02.001. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089608000941>.
61. **Desai, N. C., Satodiya, H. M., Kotadiya, G. M., Vaghani, H. V.** Synthesis and antibacterial and cytotoxic activities of new N-3 substituted thiazolidine-2,4-dione derivatives bearing the pyrazole moiety. *Archiv der Pharmazie*. 2014, 347(7), 523–532. doi:10.1002/ardp.201300466. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ardp.201300466>.
62. **Desai, N. C., Satodiya, H. M., Rajpara, K. M., Joshi, V. V., Bhatt, K., Vaghani, H. V.** Synthesis and Evaluation of N-Substituted Thiazolidine-2,4-dione Containing Pyrazole as a Potent Antimicrobial Agents. *Anti-Infective Agents*. 2014, 12: 85. doi:10.2174/22113525113119990117. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/110089/article>.
63. **Vatolin, S., Phillips, J. G., Jha, B. K., Govindgari, S., Hu, J., Grabowski, D., Parker, Y., Lindner, D. J., Zhong, F., Distelhorst, C. W., Smith, M. R., Cotta, C., Xu, Y., Chilakala, S., Kuang, R. R., Tall, S., & Reu, F. J.** Novel Protein Disulfide Isomerase Inhibitor with Anticancer Activity in Multiple Myeloma. *Cancer research*. 2016, 76(11), 3340–3350. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3099. Dostupné z: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/76/11/3340.long>.
64. **Bataille, C. J., Brennan, M. B., Byrne, S., Davies, S. G., Durbin, M., Fedorov, O., Huber, K. V., Jones, A. M., Knapp, S., Liu, G., Nadali, A., Quevedo, C. E., Russell, A. J., Walker, R. G., Westwood, R., Wynne, G. M.** Thiazolidine derivatives as potent and selective inhibitors of the PIM kinase family. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2017, 25(9), 2657–2665. doi:10.1016/j.bmc.2017.02.056. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089616314213>.

65. **Moorthy, B. T., Ravi, S., Srivastava, M., Chiruvella, K. K., Hemlal, H., Joy, O., Raghavan, S. C.** Novel rhodanine derivatives induce growth inhibition followed by apoptosis. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2010, 20(21), 6297–6301. doi:10.1016/j.bmcl.2010.08.084. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960894X10012205>.
66. **Huang, M. J., Cheng, Y. C., Liu, C. R., Lin, S., Liu, H. E.** A small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, induces cell-cycle arrest, apoptosis, and myeloid differentiation of human acute myeloid leukemia. *Experimental hematology*. 2006, 34(11), 1480–1489. doi:10.1016/j.exphem.2006.06.019. Dostupné z: [https://www.exphem.org/article/S0301-472X\(06\)00428-0/fulltext](https://www.exphem.org/article/S0301-472X(06)00428-0/fulltext).
67. **Dago, C. D., Ambeu, C. N. T., Coulibaly, W. K., Békro, Y. A., Mamyrbekova-Bekro, J. A., Guével, R. L., Corlu, A., Bazureau, J. P.** Investigation on the synthesis of new 3-[4-(aryloxy)phenylethyl]-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-ones and their biological evaluation against cancer cells. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2017, 53, 341–349. doi:10.1007/s10593-017-2056-2. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10593-017-2056-2>.
68. **Steele, J. W., Faulds, D., Goa, K. L.** Epalrestat. A review of its pharmacology, and therapeutic potential in late-onset complications of diabetes mellitus. *Drugs & aging*. 1993, 3(6), 532–555. doi:10.2165/00002512-199303060-00007. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.2165%2F00002512-199303060-00007>.
69. **Reddy, T. N., Ravinder, M., Bagul, P., Ravikanti, K., Bagul, C., Nanubolu, J. B., Srinivas, K., Banerjee, S. K., Rao, V. J.** Synthesis and biological evaluation of new epalrestat analogues as aldose reductase inhibitors (ARIs). *European journal of medicinal chemistry*. 2014, 71, 53–66. doi:10.1016/j.ejmech.2013.10.043. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523413006843>.
70. **Choi, J., Ko, Y., Lee, H. S., Park, Y. S., Yang, Y., Yoon, S.** Identification of (beta-carboxyethyl)-rhodanine derivatives exhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity. *European journal of medicinal chemistry*. 2010, 45(1), 193–202. doi:10.1016/j.ejmech.2009.09.042. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523409004930>.
71. **Wang, G. C., Peng, Y. P., Xie, Z. Z., Wang, J., Chen, M.** Synthesis, α -glucosidase inhibition and molecular docking studies of novel thiazolidine-2,4-dione or rhodanine derivatives. *MedChemComm*. 2017, 8(7), 1477–1484. doi:10.1039/c7md00173h. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/MD/C7MD00173H#!divAbstract>.
72. **Jorgensen, J. H., Ferraro, M. J.** Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009, 49(11), 1749–1755. doi:10.1086/647952. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article/49/11/1749/344384>.
73. **Khan, Z. A., Siddiqui, M. F., Park, S.** Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics*. 2019, 9(2), 49. doi:10.3390/diagnostics9020049. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2075-4418/9/2/49>.
74. EUCAST Statutes. *EUCAST*. [Online] 11. 4. 2016. [Citace: 4. 4. 2020.] Dostupné z: <http://www.eucast.org/organization/eucaststatutes/>.

75. Redefinice kategorií vyšetření citlivosti C, I a R. *Státní zdravotní ústav*. [Online] 27. 1. 2020. [Citace: 4. 4. 2020.] Dostupné z: <http://www.szu.cz/klinicke-breakpointy>.
76. **Kahlmeter, G.** Wild-type MIC distributions and ECOFFs. *ESCMID eLibrary*. [Online] 20. 9. 2016. [Citace: 5. 4. 2020.] Dostupné z: https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/?q=Wild-type+MIC+distributions+and+ECOFFs&id=2173&L=0&x=22&y=27.
77. **Kassim, A., Omuse, G., Premji, Z., Revathi, G.** Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional stud. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2016, 15, 21. doi:10.1186/s12941-016-0135-3. Dostupné z: <https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-016-0135-3>.
78. **Cusack, T. P., Ashley, E. A., Ling, C. L., Roberts, T., Turner, P., Wangrangsimakul, T., Dance, D.** Time to switch from CLSI to EUCAST? A Southeast Asian perspective. *Clinical microbiology and infection*. 2019, 25(7), 782–785. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.016. Dostupné z: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(19\)30118-1/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(19)30118-1/fulltext).
79. Disková difuzní metodologie EUCAST. *Státní zdravotní ústav*. [Online] 19. 2. 2019. [Citace: 3. 4. 2020.] Dostupné z: <http://www.szu.cz/diskova-difuzni-metoda-eucast>.
80. **Idelevich, E. A., Becker, K., Schmitz, J., Knaack, D., Peters, G., Köck, R.** Evaluation of an Automated System for Reading and Interpreting Disk Diffusion Antimicrobial Susceptibility Testing of Fastidious Bacteria. *PLoS one*. 2016, 11(7). doi:10.1371/journal.pone.0159183. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0159183>.
81. Mueller Hinton Agar (MHA): Composition, preparation and uses. *Microbe Online*. [Online] [Citace: 3. 4. 2020.] Dostupné z: <https://microbeonline.com/why-mueller-hinton-agar-is-used-in-routine-antibiotic-susceptibility-testing/>.
82. **Huang, M. B., Baker, C. N., Banerjee, S., Tenover, F. C.** Accuracy of the E test for determining antimicrobial susceptibilities of staphylococci, enterococci, *Campylobacter jejuni*, and gram-negative bacteria resistant to antimicrobial agents. *Journal of clinical microbiology*. 1992, 30(12), 3243–3248. Dostupné z: <https://jcm.asm.org/content/30/12/3243.long>.
83. **Prakash, V., Lewis, J. S., 2nd, Jorgensen, J. H.** Vancomycin MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates differ based upon the susceptibility test method used. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008, 52(12), 4528. doi:10.1128/AAC.00904-08. Dostupné z: <https://aac.asm.org/content/52/12/4528.long>.
84. ETEST. *bioMérieux industrial microbiology*. [Online] [Citace: 3. 4. 2020.] Dostupné z: <https://www.biomerieux-industry.com/products/etest>.
85. Bujónová mikrodiluce - návod k odečítání EUCAST. *Státní zdravotní ústav*. [Online] 19. 2. 2019. [Citace: 4. 4. 2020.] Dostupné z: <http://www.szu.cz/vysetreni-mic>.

86. **European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)**. EUCAST Discussion Document E. Dis 5.1: determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical microbiology and infection*. 2003, 9, 1-7. doi:10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x. Dostupné z: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)64063-5/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)64063-5/fulltext).
87. Příprava pŮd EUCAST. *Státní zdravotní ústav*. [Online] 20. 2. 2017. [Citace: 4. 4. 2020.] Dostupné z: <http://www.szu.cz/priprava-medii-eucast>.
88. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Testing. *Emery Pharma*. [Online] [Citace: 4. 4. 2020.] Dostupné z: <https://emerypharma.com/biology/minimum-inhibitory-concentration/>.
89. **Doern, C. D.** When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *Journal of clinical microbiology*. 2014, 52(12), 4124–4128. doi:10.1128/JCM.01121-14. Dostupné z: <https://jcm.asm.org/content/52/12/4124.long>.
90. **White, R. L., Burgess, D. S., Manduru, M., Bosso, J. A.** Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1996, 40(8), 1914–1918. Dostupné z: <https://aac.asm.org/content/40/8/1914.long>.
91. **Sopirala, M. M., Mangino, J. E., Gebreyes, W. A., Biller, B., Bannerman, T., Balada-Llasat, J. M., Pancholi, P.** Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010, 54(11), 4678–4683. doi:10.1128/AAC.00497-10. Dostupné z: <https://aac.asm.org/content/54/11/4678.long>.
92. **Hamoud, R., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M.** Synergistic interactions in two-drug and three-drug combinations (thymol, EDTA and vancomycin) against multi drug resistant bacteria including *E. coli*. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2014, 21(4), 443–447. doi:10.1016/j.phymed.2013.10.016. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S094471131300425X>.
93. Protocol: alamarBlue Spectrophotometry Calculations with Different Filters. *Bio-Rad*. [Online] [Citace: 20. 4. 2020.] Dostupné z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/spectrophotometry-calculations-alarmaBlue-different-filters.html>.