

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd



**CHARAKTERIZACE ANTIBAKTERIÁLNÍHO POTENCIÁLU
NOVĚ SYNTETIZOVANÝCH LÁTEK A BAKTERIÁLNÍCH
SPOLEČENSTVÍ**

Disertační práce

Mgr. Adéla Diepoltová

Studijní program: Xenobiochemie a patobiochemie

Školitel: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Konzultantka: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Hradec Králové

Duben 2024

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením svého školitele a konzultantky). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Tato disertační práce vznikla za podpory Ministerstva zdravotnictví České republiky, grant č. NU21-05-00482; START MED: *"Grant Schemes at CU „(reg. no. CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016935)“*; SVV projektu Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy č. 260 622, a Grantové agentury České republiky, číslo projektu: 20-19638Y.

V Hradci Králové dne 22/4/2024

.....
Mgr. Adéla Diepoltová

V úvodu bych ráda poděkovala RNDr. Kláře Konečné, Ph.D. nejen za cenné rady během vypracování a sepisování této disertační práce, ale též za odborné vedení během celého pregraduálního i postgraduálního studia. Vážím si vynaloženého času a energie, jež do mého počínání paní doktorka investovala, a cenných znalostí a zkušeností, které mi byly v průběhu uplynulých let trpělivě předávány. Za vedení a revizi této i předešlých prací rovněž děkuji svému školiteli, prof. PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD.

Za milou spolupráci, odborné rady a revizi prací též děkuji PharmDr. Ondřeji Jandourkovi, Ph.D., RNDr. Pavlíně Vávrové a PharmDr. Katarině Tripské, Ph.D. Mé poděkování patří také laborantkám mikrobiologické skupiny Katedry biologických a lékařských věd FAF UK, jmenovitě Ing. Janě Vackové a paní Idě Dufkové, za neúnavnou asistenci během vypracování všech experimentů. Dále bych ráda vyjádřila vděčnost za možnost spolupráce s vědeckými skupinami Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy a Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky FAF UK, které práci poskytly substrát v podobě přípravy studovaných látek. Děkuji též kolegům z Katedry biofyziky a fyzikální chemie FAF UK za vypracování toxikologických studií a Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. a PharmDr. Barboře Voxové za poskytnuté bakteriální kmeny izolované ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Za finanční podporu děkuji zainteresovaným grantovým agenturám a projektům. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za oporu a trpělivost.

S láskou věnováno mým nejdražším prarodičům.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Doktorský studijní program: Xenobiochemie a patobiochemie

Kandidát: Mgr. Adéla Diepoltová

Školitel: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Konzultantka: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Název disertační práce: Charakterizace antibakteriálního potenciálu nově syntetizovaných látek a bakteriálních společenství

Úvod předložené disertační práce je zasvěcen problematice antimikrobní rezistence, která představuje jednu z největších současných hrozeb celosvětového zdravotnictví. Ke kritické úrovni této situace přispívá celá řada faktorů. Kromě nepopíratelného lidského přičinění stojí za tak závažným stavem samotné mikroby, například bakterie skupiny ESKAPE, jež disponují celou řadou rezistenčních mechanismů. Jedním z významných mechanismů rezistence je, mimo jiné, schopnost tvorby mikrobiálních biofilmů.

Pro co největší přínos studia anti-biofilmové aktivity nových antimikrobních látek je nezbytné využívat relevantních a reprodukovatelných metod pro tvorbu biofilmů *in vitro*, tj. robustních biofilmových biomas s charakteristikami, které reprezentují mechanismy adaptivní rezistence (přítomnost extracelulární polymerní matrice, typická architektura maturovaného biofilmu atd.). Vlastnosti požadovaného biofilmu jsou silně ovlivněny kultivačními podmínkami (použité kultivační médium, mód třepání, modifikace povrchu pro usnadnění adheze buněk atd.). Studium vlivu vybraných kultivačních podmínek při tvorbě stafylokokových biofilmů se zabývá první úsek experimentální části této práce. Výsledky studie přinesly zjištění, že k tvorbě biofilmů bakteriemi *Staphylococcus aureus*, meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis* je ze všech testovaných médií nejvýhodnější trypton-sójový bujón suplementovaný lidskou krevní plazmou a zároveň kultivace za mírného třepání. Dalším zásadním zjištěním této části studie je, že tvorbu biofilmů bakterie *Staphylococcus epidermidis* na plastových kolíčkách

významně pozitivně ovlivňuje modifikace povrchu lidskou plazmou a fetálním bovinním sérem.

Akutní stav antimikrobní rezistence je reflektován ve výzkumu nových látek s antimikrobním účinkem. S cílem dosažení efektivních terapeutických přístupů jsou navrhovány některé alternativní strategie, které mají též potenciál zpomalit překotný vývoj rezistence. Slibných výsledků dosahují například postupy kombinační terapie s adjuvantními látkami. Druhý úsek experimentální části práce je proto věnován popisu vybraných (mikro)biologických aktivit nově syntetizovaného derivátu 2-chlor-N-(oxazol-2-yl)isonikotinamidu, AB15. Látka AB15 vykázala velice slibnou aktivitu vůči Gram-negativním bakteriím, zejména vůči *Acinetobacter baumannii*. Bylo též zjištěno, že studovaná látka zasahuje do buněčného procesu proteosyntézy, na bakteriální buňku působí cidním efektem a nevykazuje významnou toxicitu *in vitro* ani *in vivo*. Možnost uplatnění AB15 jako adjuvantní látky potvrdily výsledky Checkerboard studií, v nichž byl odhalen synergický efekt v kombinaci s antibiotikem kolistinem vůči bakterii *Acinetobacter baumannii* izolované z klinického vzorku. Kombinace kolistinu a AB15 vykázala též anti-biofilmovou aktivitu vůči biofilmovému společenství tvořenému stejnou bakterií. Získanými výsledky je potvrzena hypotéza, že je AB15 perspektivním kandidátem k využití ve formě adjuvantní látky k vybraným antibiotikům v rámci antiinfekční terapie.

Další efektivní terapeutickou strategií v boji proti antimikrobní rezistenci je využití antimikrobních látek připravených ze struktur přírodního původu. Ve třetím úseku experimentální části práce proto byly studovány některé (mikro)biologické vlastnosti polosyntetických derivátů montaninového typu odvozených od alkaloidů rostlinné čeledi *Amaryllidaceae*. Látky značené NMA5 a NMA12 projevily slibnou účinnost zejména vůči stafylokokům. Látka NMA12 navíc nepůsobila toxickým efektem *in vivo* s použitím zvířecího modelu a vykázala synergický efekt s některými klinicky relevantními antibiotiky vůči bakterii meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*. Využití látek NMA5 a NMA12 v dalším výzkumu antimikrobní aktivity však omezuje jejich rozpustnost.

Předloženou práci je nabídnuta součinnost v globálním úsilí zvýšit aktivitu v procesu výzkumu a vývoje nových antiinfektiv s cílem objevit nové efektivní přístupy terapie infekčních onemocnění a zpomalit rozvoj antimikrobní rezistence.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Mgr. Adéla Diepoltová

Supervisor: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Consultant: RNDr. Klára Konečná, PhD.

Title of Doctoral Thesis: Characterization of the antibacterial potential of recently synthesized compounds and bacterial communities

The theoretical part of this dissertation thesis describes the issue of antimicrobial resistance, which represents one of the greatest current challenges to global health. Many different factors contribute to the criticality of this situation. In addition to undeniable human involvement, microbes themselves, such as bacteria from the ESKAPE group, are responsible for this serious problem. Microbes exhibit a variety of resistance mechanisms. The ability to form microbial biofilms is one of them. As a matter of fact, cells present in biofilm are up to 1000 × more resistant compared to their planktonic form.

To reveal the most relevant data regarding the process of biofilm formation *in vitro*, it is essential to use reproducible methods in order to obtain robust biofilms with all their key attributes that represent the adaptive resistance (presence of an extracellular polymeric matrix, the architecture of a matured biofilm, etc.). These attributes are strongly influenced by cultivation conditions (cultivation media, substrate modification, etc.). Results of the first part of the experimental work show that a trypton soy broth medium supplemented with human plasma and mild shaking during the cultivation period are the most favourable conditions among all tested parameters in the formation of *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Another important finding is that the formation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on plastic pegs is considerably positively affected by surface modification with human plasma and foetal bovine serum.

The alarming state of antimicrobial resistance is also reflected in the research of new antimicrobial substances. The combination therapy with adjuvant compounds generates promising results. Therefore, the second part of the experimental work is devoted to the characterization of selected (micro)biological properties of a newly synthesized derivative of 2-aminooxazole labelled AB15. This compound shows promising antibacterial activity against the Gram-negative bacteria, especially *Acinetobacter baumannii*. In the target cell, AB15 affects protein synthesis and reveals bactericidal effect. Compound AB15 does not exhibit toxicity effect *in vitro* or *in vivo*. Checkerboard studies confirmed the potential of AB15 as an adjuvant compound – synergistic effect was revealed in AB15 and colistin combination. AB15 + colistin combination also shows an anti-biofilm activity against biofilm formed by *Acinetobacter baumannii*. In this part of the study, it can be concluded that the newly synthesized compound, AB15, can be considered a suitable adjuvant molecule to clinically relevant antibiotics in antimicrobial drug research.

Another effective therapeutic strategy to fight antimicrobial resistance is an employment of antimicrobial compounds obtained from naturally occurring molecules. In the third part of this experimental work, selected (micro)biological properties of semi-synthetic montanine-type derivatives obtained from alkaloids of the *Amaryllidaceae* family are characterized. Compounds labelled NMA5 and NMA12 show promising activity especially against staphylococci. In addition, NMA12 is non-/low-toxic using an animal model and shows synergistic effect with clinically relevant antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. However, the use of compounds NMA5 and NMA12 in further antimicrobial research is limited due to their solubility issues.

The conclusion of this thesis highlights the importance of conducting extensive study of alternative strategies for antimicrobial drug research and development. This work contributes to the global effort to discover new therapeutic approaches and mitigate antimicrobial resistance.

KLÍČOVÁ SLOVA

Acinetobacter baumannii, adjuvantní látka, antiinfektiva, anti-biofilmová aktivita, antibiotická rezistence, bakteriální biofilm, bakterie skupiny ESKAPE, Checkerboard studie, kolistin, kombinační terapie, meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, minimální biofilm-eradikační koncentrace, minimální biofilm-inhibiční koncentrace, minimální inhibiční koncentrace, *Staphylococcus aureus*, studie synergického účinku látek.

OBSAH

1.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	12
2.	CÍLE PRÁCE	16
3.	TEORETICKÁ ČÁST	17
3.1.	ANTIMIKROBNÍ REZISTENCE	17
3.2.	ALTERNATIVNÍ STRATEGIE VÝZKUMU ANTIINFEKTIV	18
3.2.1.	Kombinační terapie a využití adjuvančních látek	18
3.2.2.	Využití látek přírodního původu.....	19
3.2.3.	Další alternativní strategie antimikrobní terapie	20
3.2.4.	Mechanismy rezistence jako cíl terapie	21
3.3.	PATOGENY SKUPINY ESKAPE.....	23
3.3.1.	Vankomycin-rezistentní enterokoky	24
3.3.2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	24
3.3.3.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
3.3.4.	Kritická hrozba – <i>Acinetobacter baumannii</i>	25
3.3.5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
3.3.6.	Rod <i>Enterobacter</i>	27
3.3.7.	Další mikroorganismy s vysokou mírou antimikrobní rezistence.....	27
3.4.	MIKROBIÁLNÍ BIOFILMY	29
3.4.1.	Biofilm jako adaptivní mechanismus rezistence.....	31
3.5.	HODNOCENÍ ANTIMIKROBNÍ AKTIVITY KANDIDÁTNÍCH LÁTEK.....	33
3.5.1.	Stanovení minimální inhibiční koncentrace.....	33
3.5.2.	Komplexní popis biologických vlastností kandidátní látky.....	34
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	45
4.1.	SEZNAM POUŽITÝCH METOD	45
4.2.	CÍL A.....	47
4.2.1.	Úvod	47

4.2.2.	Pracovní hypotéza	48
4.2.3.	Metodika (Cíl A)	48
4.2.4.	Výsledky a diskuze	54
4.2.5.	Shrnutí pracovního Cíle A.....	65
4.3.	CÍL B	66
4.3.1.	Úvod	66
4.3.2.	Pracovní hypotéza	67
4.3.3.	Metodika (Cíl B).....	68
4.3.4.	Výsledky a diskuze	83
4.3.5.	Shrnutí pracovního Cíle B.....	115
4.4.	CÍL C	117
4.4.1.	Úvod	117
4.4.2.	Pracovní hypotéza	118
4.4.3.	Metodika (Cíl C).....	119
4.4.4.	Výsledky a diskuze	127
4.4.5.	Shrnutí pracovního Cíle C.....	149
5.	SOUHRNNÁ DISKUZE	151
6.	ZÁVĚR	154
7.	SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A SCHÉMAT	156
8.	PŘÍLOHA	158
9.	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ	164
10.	PŘEDNÁŠKY A PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ.....	165
11.	REFERENCE	167

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- **AA** alkaloidy rostlinné čeledi *Amaryllidaceae*
- **ACBA** *Acinetobacter baumannii*
- **AML** antimikrobní látka
- **AMR** antimikrobní rezistence
- **ATCC** Americká sbírka kultur (z angl. American Type Culture Collection)
- **ATB** antibiotikum
- **BCCM/ITM** Belgické koordinované kolekce mikroorganismů (z angl. Belgian Coordinated Collection of Microorganisms/Institute of Tropical Medicine)
- **BPC** biofilm prevenční koncentrace (z angl. Biofilm Prevention Concentration)
- **C** citlivost
- **C/R** intermediární citlivost
- **CAMHB** kationtově upravený Mueller-Hinton bujón (z angl. Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth)
- **CCM** Česká sbírka mikroorganismů (z angl. Czech Collection of Microorganisms)
- **CDC** Střediska pro kontrolu a prevenci nemocí (z angl. Centers for Disease Control and Prevention)
- **CFU** kolonie tvořící jednotka (z angl. Colony Forming Unit)
- **CHL** chloramfenikol
- **CHX** chlorhexidin
- **CIP** ciprofloxacin
- **CoNS** koaguláza negativní stafylokoky (z angl. Coagulase-Negative *Staphylococci*)
- **ConA** konkavalin A (z angl. Concavalin A)
- **cpm** impulsy za minutu (z angl. Counts Per Minute)
- **CST** kolistin
- **CV** krystalová violet (z angl. Crystal Violet)
- **DAP** daptomycin

- **DMSO** dimethylsulfoxid
- **DSMZ** Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur (z něm. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)
- **EC** *Escherichia coli*
- **eDNA** extracelulární DNA
- **EF** *Enterococcus faecalis*
- **EPM** extracelulární polymerní matrice
- **ESBL** β -laktamázy s rozšířeným spektrem účinku (z angl. extended-spectrum β -laktamases)
- **ESKAPE** skupina multirezistentních bakterií (*Enterococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.)
- **EUCAST** Evropský výbor pro testování antimikrobní citlivosti (z angl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
- **FAF UK** Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova
- **FBS** fetální bovinní sérum
- **FIC** frakční inhibiční koncentrace (z angl. Fractional Inhibitory Concentration)
- **FICI** index frakční inhibiční koncentrace (z angl. Fractional Inhibitory Concentration Index)
- **FITC** fluorescein-5-isothiokyanát
- **GEN** gentamicin
- **GHS** Globálně harmonizovaný systém kategorizace toxicity (z angl. Globally Harmonized System)
- **HEPES** *N*-2-hydroxyethylpiperazin-*N'*-2-ethansulfonová kyselina
- **HK-2** buněčná linie lidských epiteliálních buněk ledvin (z angl. proximal tubular cell line from Human Kidney)
- **HP** lidská krevní plazma (z angl. Human Plasma)
- **IC₅₀** koncentrace vedoucí k 50% inhibici (z angl. half Inhibition Concentration)
- **ID č.** laboratorní identifikační číslo
- **KP** *Klebsiella pneumoniae*

- **LD₅₀** dávka způsobující smrt 50 % modelových zvířat (z angl. median Lethal Dose)
- **Leu** leucin
- **LIN** linezolid
- **LINR** linezolid-rezistentní kmen
- **MALDI-TOF** matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s detektorem doby letu (z angl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight)
- **MBC** minimální baktericidní koncentrace (z angl. Minimum Bactericidal Concentration)
- **MBEC** minimální biofilm-eradikační koncentrace (z angl. Minimum Biofilm Eradication Concentration)
- **MBIC** minimální biofilm-inhibiční koncentrace (z angl. Minimum Biofilm Inhibitory Concentration)
- **MHA** Mueller-Hinton agar
- **MIC** minimální inhibiční koncentrace (z angl. Minimum Inhibitory Concentration)
- **MOPS** 3-(*N*-morfolino)-propansulfonová kyselina
- **MR** multirezistentní
- **MRSA** meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*
- **MÚ** mechanismus účinku
- **NC** negativní kontrola (z angl. Negative Control)
- **ND** neurčeno (z angl. Not determined)
- **NS** bez statistické významnosti (z angl. statistically Not Significant)
- **OADC** růstový suplement – kyselina olejová, albumin, dextróza, kataláza (z angl. Oleic acid, Albumin, Dextrose, Catalase)
- **OD** optická denzita (z angl. Optical Density)
- **OD_c** optická denzita negativní kontroly (z angl. Optical Density of the Control)
- **OD_{cv}** optická denzita eluované krystalové violeti (z angl. Optical Density of eluted Crystal Violet)
- **PA** *Pseudomonas aeruginosa*
- **PAE** postantibiotický efekt (z angl. Postantibiotic Effect)

- **PAE-SME** postantibiotický sub-inhibiční efekt (z angl. Postantibiotic Subminimum inhibitory concentration Effect)
- **PBS** fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffered Saline)
- **PLL** poly-L-lysin
- **R** rezistence
- **RIF** rifampicin
- **RPMI** Rosewell Park Memorial Institute bujón
- **SA** *Staphylococcus aureus*
- **SE** *Staphylococcus epidermidis*
- **SI** index selektivity (z angl. Selectivity Index)
- **SXT** Trimetoprim/sulfamethoxazol
- **SZÚ** Státní zdravotní ústav
- **TCA** kyselina trichloroctová (z angl. TriChloroacetic Acid)
- **TGC** tigecyklin
- **TSA** trypton-sójový agar (z angl. Trypton Soy Agar)
- **TSB** trypton-sójový bujón (z angl. Trypton Soy Broth)
- **ÚKM FNHK** Ústav klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové
- **VAN** vankomycin
- **VRE** vankomycin-rezistentní enterokoky (z angl. Vancomycin-Resistant *Enterococci*)
- **VRSA** vankomycin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (z angl. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*)
- **WHO** Světová zdravotnická organizace (z angl. The World Health Organization)
- **XTT** 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

2. CÍLE PRÁCE

- A) Zavedení relevantního a validního přístupu pro tvorbu stafylokokových biofilmů *in vitro* využitelných ke stanovení anti-biofilmového potenciálu kandidátních látek.
- B) Charakterizace (mikro)biologických vlastností nově syntetizovaného chlorovaného derivátu 2-aminooxazolu.
- C) Charakterizace (mikro)biologických vlastností polosyntetických derivátů montaninového typu získaných z alkaloidů rostlinné čeledi *Amaryllidaceae*.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. ANTIMIKROBNÍ REZISTENCE

„Pokud se současný stav antimikrobní rezistence výrazně nezmění, do roku 2050 bude v příčinné souvislosti s infekcemi způsobenými rezistentními patogeny umírat 10 milionů lidí ročně a ekonomické dopady budou devastující.“ Tímto alarmujícím prohlášením uvedla Světová zdravotnická organizace (World Health Organization, WHO) svůj apel na vědeckou společnost již v roce 2019 [1]. Ani po pěti letech úsilí získat nad antimikrobní rezistencí (AMR) kontrolu se situace nestabilizovala a zůstává jednou z hlavních zdravotnických výzev pro celý svět. AMR postihuje populace žijící ve všech regionech na planetě, na každé úrovni finančního příjmu a výrazně zpomaluje a komplikuje pokrok moderní medicíny i řady průmyslových odvětví. WHO důrazně a dlouhodobě vybízí odborníky ke zvýšené aktivitě v oblasti výzkumu a vývoje nových antiinfektiv či nových terapeutických postupů. I přes to svět i nadále čelí zcela nedostatečnému přístupu k funkční antiinfekční terapii [2].

AMR je definována jako adaptace mikroorganismů na přítomnost antimikrobní látky (AML), tedy jako schopnost mikrobů přežít dobu expozice těmito látkami, a následně znovu růst a dělit se [3]. Taková schopnost může být pro mikroby přirozená a je pak vlastní všem členům stejného druhu. Tato vrozená odolnost mikroorganismů vůči AML je dána například absencí struktury, na kterou AML cílí, úrovní permeability buněčné membrány či schopností cizorodé látky z buňky vypudit [4, 5]. Vzhledem k přítomnosti vnější membrány jsou tedy přirozeně více rezistentní Gram-negativní bakterie [6]. Rezistenci však mohou mikroby také nově získat, a to mutacemi ve vlastní DNA či horizontálním přenosem (transformací, transdukci či nejčastěji konjugací pomocí plazmidů). Tato sekundární odolnost je pak vlastností konkrétních kmenů daného mikroorganismu a může být dočasná či trvalá [5].

Sekundární rezistence mikrobů k AML je bezesporu úzce spojena též s lidským chováním. Iracionální a nadměrná preskripce antiinfektiv, nadbytečné užívání AML v zemědělství, nedodržování správných terapeutických režimů pacienty či nedostatečný odborný dohled nad aktuálním stavem AMR

v nemocnicích a jiných zdravotnických zařízeních vedou k podpoře selekčního tlaku, a tedy ke vzniku rezistence původně citlivých mikroorganismů [2, 7]. Důsledkem je pak rozvoj infekcí s velice omezenými možnostmi terapie či, paradoxně, potřeba dlouhodobé hospitalizace takto nemocných pacientů. Takový stav zanechává ve společnosti hlubokou jizvu v podobě zvýšené mortality v důsledku infekčních onemocnění a závažných ekonomických dopadů [8].

Proto, i v roce 2023, WHO stále označuje problém AMR za znepokojivou hrozbu celosvětového zdravotnictví a znovu nabádá ke snaze o dosažení lepší dostupnosti a zkvalitnění systémů prevence, diagnostiky a léčby infekčních onemocnění [2]. Ústředním bodem výzvy setrvává snaha zvýšit aktivitu ve výzkumu a vývoji nových antiinfektiv, a to i prostřednictvím přístupů alternativních k chemické syntéze, například v podobě studia efektu kombinované terapie či návratu k využití látek přírodního původu.

3.2. ALTERNATIVNÍ STRATEGIE VÝZKUMU ANTIINFEKTIV

3.2.1. Kombinační terapie a využití adjuvantních látek

V boji proti AMR se nabízí několik strategií v rámci výzkumu nových potenciálních antiinfektiv. Praxí ověřenou variantou je využití kombinace dvou či více AML s výraznou samostatnou antimikrobní aktivitou. Typicky jsou režimy kombinované terapie používány při léčbě tuberkulózy [9, 10]. Další možností je užití kombinace účinné AML spolu s inhibitorem neutralizujícím mikrobem produkováný enzym, který by byl jinak schopen AML degradovat. Jedním z nejúspěšnějších příkladů takové terapie je kombinace β -laktamového antibiotika (ATB) – amoxicilinu a inhibitoru β -laktamáz – klavulanové kyseliny [11]. Kombinace stávajících antiinfektiv jsou však omezené a výzkum a vývoj nových samostatně fungujících molekul je obvykle extrémně časově i ekonomicky náročný.

Proto, v rámci snahy o urychlení celého procesu, nemohou zůstat opomenuty takové struktury, které i přes svou méně významnou antimikrobní aktivitu vykazují slibný potenciál spočívající v nízké toxicitě a výhodných aditivních účincích s komerčně dostupnými léčivy. Takové molekuly jsou řazeny mezi látky adjuvantní.

Adjuvans představují molekuly s téměř nulovou či relativně nízkou antimikrobní aktivitou, které působí synergicky s konvenčními antiinfektivy, a udržují či obnovují tak jejich aktivitu, čímž v přeneseném významu též zabraňují i šíření AMR. Takový efekt je mimořádně žádaný zejména u rezervních ATB, mezi které je například řazen tigecyklin (TGC), kolistin (CST), daptomycin (DAP), vankomycin (VAN) či linezolid (LIN). Při použití ATB o nižší koncentraci ve vhodné kombinaci s adjuvantní molekulou je dosaženo stejné aktivity ve srovnání s jeho samostatným působením, čímž je snížen potenciál toxického vlivu takové látky a výskyt nežádoucích účinků [12].

3.2.2. Využití látek přírodního původu

Rigidita struktur syntetických molekul s antimikrobním účinkem a jejich krátká „životnost“ v boji s AMR pomalu obrací výzkumné trendy zpět ve prospěch přírodních produktů, jejichž účinek v léčbě infekčních onemocnění je lidmi ověřován již po staletí. Za všechny je možno uvést blahodárné účinky rostliny *Allium sativum*. A konečně, nebýt objevu antibakteriální aktivity sloučenin produkovaných plísněmi rodu *Penicillium*, vypadal by dnešní svět pravděpodobně zcela jinak.

Příroda je zdrojem nepřehledného množství sloučenin s antimikrobním účinkem, které mohou být izolovány a uplatněny jako samostatná antiinfektiva nebo mohou být chemicky modifikovány za účelem zesílení jejich požadovaných biologických vlastností [13]. Takovými látkami jsou např. rostlinné alkaloidy – heterocyklické látky s obrovskou strukturální diverzitou. Antibakteriální vlastnosti vykazují například indolové, pyridinové či isochinolinové alkaloidy, hojně zastoupené v rostlinné čeledi *Amaryllidaceae*, tedy amarylkovité. Kromě toho vykazují rostlinné alkaloidy celou řadou dalších významných biologických aktivit. Jsou mezi ně řazeny účinky protinádorové, protizánětlivé, antidepressivní či stimulační [14-19].

Předpokládá se, že za pozorovaným antimikrobním charakterem molekul odvozených od přírodních produktů stojí tisíce let trvající vývoj sekundárních metabolitů, které rostlině přináší konkurenční dominanci v ochraně proti mikrobům. Přírodní sloučeniny mají často schopnost pronikat buněčnými membránami

mikroorganismů a interagovat tak s receptory vyvolávajícími inhibici mnoha životně důležitých enzymatických procesů mikrobiální buňky. Objev antimikrobních vlastností molekul přírodního původu proto nemůže být překvapením. K terapii jsou využívány například sloučeniny ze skupiny β -laktamových ATB (peniciliny, ...), aminoglykosidů (streptomycin), makrolidových ATB (erytromycin) či peptidových ATB (CST) [20, 21].

Opodstatněné je rovněž využití přírodních sloučenin v kombinacích. Vždyť ani mikroorganismy či rostliny nevyužívají ve svém konkurenčním boji monoterapií, ale široký arsenál účinných molekul. Například *Streptomyces clavuligerus* produkuje již zmiňovanou výhodnou kombinaci β -laktamového ATB a klavulanové kyseliny. Schopnost produkce obou látek je dokonce kódovaná v sousedních genových lokusech bakterie a je tedy pravděpodobně horizontálně přenášena najednou [11].

3.2.3. Další alternativní strategie antimikrobní terapie

Specifickým způsobem boje proti postupu AMR je **fotodynamická terapie**, při níž je užito látek, které jsou označovány jako fotosensitizéry. Tyto látky, díky absorpci energie fotonů, produkují cytotoxický singletový kyslík a volné radikály, které mají destruktivní účinek na makromolekuly buněk mikrobů, čímž vyvolají buněčnou smrt. Nespornou výhodou tohoto postupu je fakt, že nevede k selektivnímu přežívání rezistentních jedinců. Fotodynamická terapie navíc cílí na široké spektrum mikroorganismů a doprovází ji méně závažné nežádoucí účinky. Limitace fotodynamické terapie však spočívá v širší možnosti jejího využití. Aplikovatelná je pouze v boji vůči lokalizovaným infekcím, například kůže či ran [22].

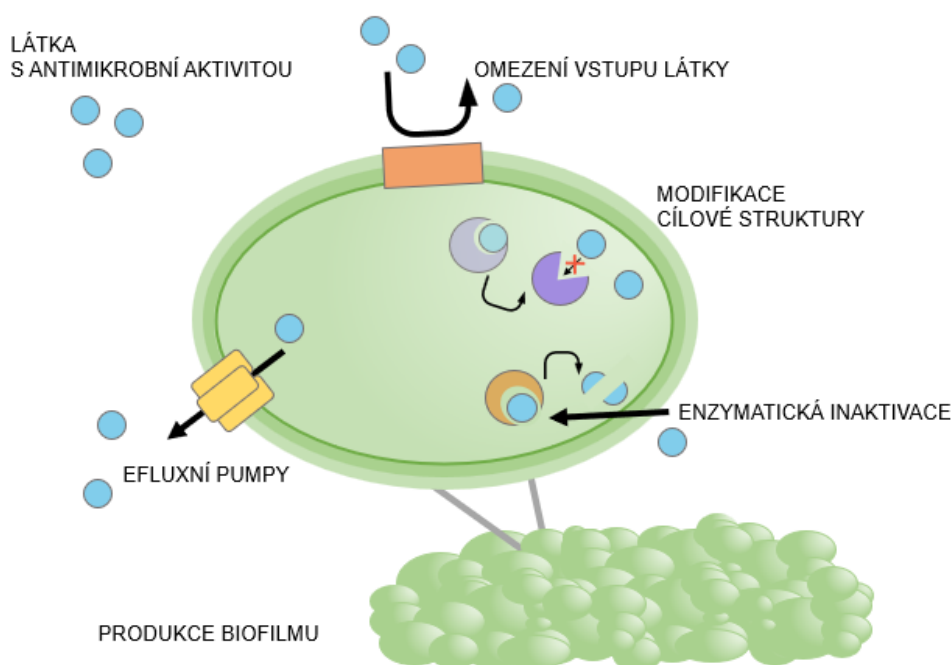
Dalším alternativním přístupem léčby infekčních onemocnění je **bakteriofágová terapie**. Bakteriofágy jsou viry schopné lýzy specifických bakteriálních buněk, čímž je zajištěna minimalizace nežádoucích účinků například ve formě změn v rovnováze přirozené mikroflóry pacienta. Rezistence bakterií vůči fágům sice vzniká, ti jsou na ni však schopni reagovat vlastními přirozenými procesy. Cílové bakterie navíc zůstávají citlivé vůči jiným klonům fágů. I když se ani

bakteriofágová terapie neobejde bez jistých limitací, zdá se být velice slibným přístupem k řešení současné krize [23].

Mezi moderní postupy reagující na problematiku AMR může být dále řazeno využití **nanomateriálů** k prevenci či terapii infekčních onemocnění, nebo tzv. „**ATB repurpose**“, tedy hledání nového využití schválených či studovaných AML mimo rámec jejich původní indikace [24, 25].

3.2.4. Mechanismy rezistence jako cíl terapie

Pro zpomalení procesu rozvoje AMR je rovněž nezbytné, aby se vývoj nových antiinfektiv opíral o studium mechanismu účinku kandidátních látek a využíval tak principů terapie cílené vůči specifickým strukturám patogenů. Mimo již zmíněnou přirozenou odolnost vůči AML řadíme mezi rezistenční mechanismy například omezení vstupu antimikrobní látky do buňky, enzymatickou inaktivaci působící látky, modifikaci cílových struktur či indukovanou tvorbu efluxních pump (Obrázek 1).



Obrázek 1. Vybrané mechanismy antimikrobní rezistence (Diepoltová, 2024).

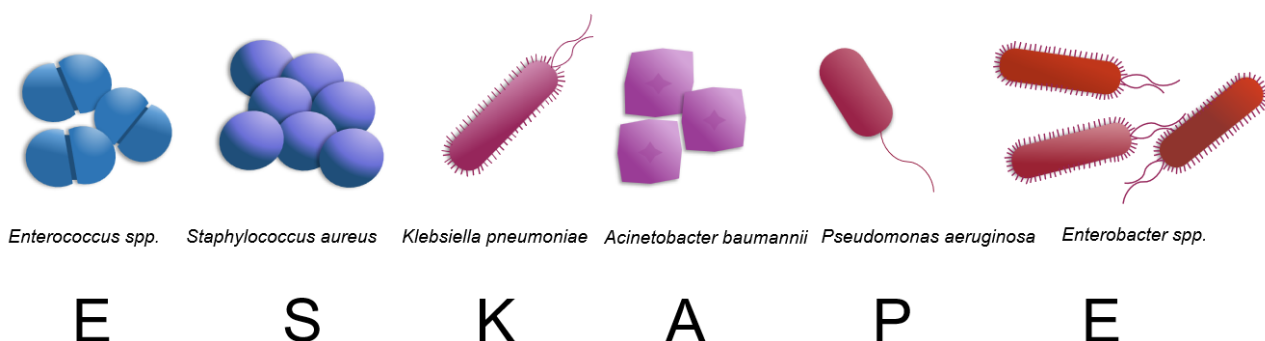
Právě efluxní pumpy ve stěnách bakterií se tak mohou stát vhodným cílem terapie. Jedná se o transmembránové systémy odčerpávající cizorodé látky ven z prostoru buňky skrze vnější membránu. Tento proces vede ke zvýšení minimální inhibiční koncentrace (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) AML či k úplné ztrátě její aktivity. Pro zvýšení antimikrobního účinku by se tedy nabízelo řešení ve formě snížení exprese genů pro efluxní pumpy, syntéza aktivních látek se strukturou neodpovídající substrátu pump, blokace či zničení struktury pump či omezení jejich energetického mechanismu [26].

K rezistenci mikroorganismů taktéž přispívá produkce enzymů deaktivujících AML. Typickým a velmi dobře známým případem jsou β -laktamázy schopné hydrolýzy většiny β -laktamových ATB. Strategie, jak účinkům těchto enzymů čelit, jsou v základu dvě. První možností je navrhovat ATB, která hydrolýze lépe odolávají. Druhou variantou je výzkum a vývoj nových inhibitorů β -laktamáz [12].

Rezistenčním (a též virulenčním) faktorem mikroorganismů je dále schopnost tvořit biofilmy. Léčiva cílená vůči těmto komplexním společenstvím jsou proto velice slibnou a žádanou zbraní antimikrobní terapie (více v kapitole 3.4.).

3.3. PATOGENY SKUPINY ESKAPE

S ohledem na jejich mimořádnou klinickou významnost a alarmující úroveň rezistence se pozornost mikrobiologů, epidemiologů, hygieniků i specialistů mnohých dalších vědeckých odvětví soustřeďuje na skupinu bakterií označovanou jako ESKAPE (Obrázek 2). Bakterie, které tento akronym zahrnuje, tedy *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* spp., se zároveň objevují na seznamu WHO publikovaném v roce 2017. Seznam rozděluje bakterie do 3 úrovní na základě priority, kterou je třeba se řídit při výzkumu a vývoji na ně cílených ATB. Všechny bakterie skupiny ESKAPE jsou dle WHO zařazeny do kategorií s vysokou klinickou významností a značnou mírou rezistence [27].



Obrázek 2. Multirezistentní bakterie řazené do skupiny ESKAPE (Diepoltová, 2024).

Bakterie řazené do skupiny ESKAPE spojuje vysoká míra AMR vůči většině běžných skupin ATB, včetně β -laktamů, makrolidů, oxazolidinonů, chinolonů, tetracyklinů, a dokonce i vůči již zmíněným rezervním ATB, tedy glykopeptidům či polymyxinům [28]. Tyto multirezistentní (= rezistentní vůči jednomu a více ATB z alespoň tří antibiotických skupin, MR) oportunně patogenní mikroorganismy jsou řazené mezi významné původce nozokomiálních (= s nemocničním prostředím spjatých) infekcí s omezenými možnostmi terapie a vysokou mortalitou [29].

3.3.1. Vankomycin-rezistentní enterokoky

Skupinou významných původců smrtelných infekcí spojených s nemocničním prostředím jsou vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE), v akronymu ESKAPE uváděné na prvním místě. Kromě přirozené rezistence vůči aminoglykosidům, cefalosporinům či linkosamidům se u těchto bakterií objevuje také získaná ztráta citlivosti právě vůči glykopeptidům, penicilinům, fluorochinolonům, DAP a dalším ATB, včetně rezervního LIN [5, 30, 31]. Rezistence k VAN je v případě VRE dána alterací cílové struktury glykopeptidového ATB. Enterokoky ale využívají i dalších mechanismů rezistence jako například efluxních pump, syntézy β -laktamáz či formace biofilmových konsorcií. VRE jsou častými původci infekcí cévního řečiště spojených se zavedeným katetrem, infekcí močového ústrojí, břišních a pánevních orgánů a také infekcí vznikajících v místě chirurgického výkonu [32].

3.3.2. *Staphylococcus aureus*

Dalším členem skupiny ESKAPE je *Staphylococcus aureus* (SA). Přestože je tento oportunní patogen přítomen na povrchu kůže a sliznic až u 30 % lidské populace, stále budí oprávněné obavy, zejména v nemocničním prostředí, kde je schopen perzistence i na neživých suchých površích zdravotnického vybavení. Nechvalně proslulé meticilin-rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* (MRSA) a vankomycin-rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* (VRSA), na seznamu WHO uvedené s vysokou prioritou, jsou zodpovědné za širokou škálu obtížně léčitelných onemocnění, jako jsou infekce kůže, ran a krevního řečiště či osteomyelitida a endokarditida [27]. Stafylokoky též typicky kontaminují protetické pomůcky a náhrady, čímž výrazně prodlužují dobu terapie i následné rekonvalescence pacientů. Kromě toho dnes u SA není neobvyklá ani rezistence na DAP či LIN [33]. Mechanismy rezistence SA zahrnují enzymatickou inaktivaci ATB, eflux či alteraci cílové struktury, například penicilin-vázajících proteinů, jako je tomu v případě kmenů MRSA. Silnou zbraní stafylokoků je rovněž schopnost tvořit biofilmy [34].

Pouze krátce po objevení meticilinu jakožto alternativy k léčbě penicilin-rezistentních kmenů, se stal MRSA nejčastěji se vyskytujícím rezistentním

patogenem napříč kontinenty. Na rozdíl od původních variant se nové klony kmenů MRSA běžně objevují nejen ve zdravotnických zařízeních, ale vyskytují se i u pacientů bez jakýchkoliv predispozic [35]. Tento fakt a dlouhodobý stav rezistence SA by měly vést k hlubšímu zájmu o výzkum nových anti-stafylokokových terapeutických možností.

3.3.3. *Klebsiella pneumoniae*

Gram-negativní bakterie *Klebsiella pneumoniae* je běžnou součástí střevního mikrobiomu člověka. Za specifických okolností jsou však tyto oportunní patogeny schopny vyvolat nozokomiální infekce, které dosahují vysoké úrovně mortality (až 40 %). Původci takto nebezpečných onemocnění jsou klebsiely produkující širokospektré β -laktamázy (ESBL, β -laktamázy s rozšířeným spektrem účinku) [28]. Mimo to využívají tyto enterobakterie též mechanismů efluxu, změny cílové struktury i produkce biofilmové biomasy. Možnosti terapie klebsielami vyvolaných infekcí jsou tak extrémně omezené a často se spoléhá pouze na rezervní ATB s vysokou mírou toxicity, a tedy i s mnohými nežádoucími účinky, jako je například TGC. Variantou zůstává také terapie kombinací rezervních ATB s odlišnými mechanismy účinku [36].

3.3.4. Kritická hrozba – *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii (ACBA), bakterie s přiděleným označením „kritická hrozba“, kraluje znepokojivému žebříčku WHO, jenž čítá bakterie s nejvyšším stupněm rezistence. ACBA je hlavní příčinou život ohrožujících nozokomiálních infekcí, jako jsou pneumonie a infekce krevního řečiště, zejména u imunokompromitovaných pacientů hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče vyžadujících mechanický plicní ventilátor či jiné zdravotnické pomůcky a přístroje [37]. Tato Gram-negativní bakterie syntetizuje enzymy inaktivující ATB ze skupiny aminoglykosidů a β -laktamů a využívá zvýšené exprese efluxních pump vůči fluorochinolonom, tetracyklinům či rifampicinu (RIF) a dokáže obměnit struktury, na které cílí sulbaktam či polymyxiny [38-43]. Ač byly první případy rezistence ACBA

vůči rezervnímu polymyxinu E, CST, zaznamenány již těsně na hranici nového milénia, a to dokonce v České republice, bylo toto ATB stále s úspěchem využíváno [44, 45]. V současnosti se již případy ztráty citlivosti vůči této jedné z posledních možností léčby MR ACBA objevují po celém světě. K léčbě ACBA infekcí jsou proto nyní potřeba specifické režimy kombinační terapie [46, 47].

V řadě studií bylo prokázáno, že bakterie ACBA hojně tvoří biofilmy. V práci publikované autory Krzysciak *et al.*, 2017 byla tato schopnost potvrzena u naprosté většiny (98,3 %) ze 116 testovaných kmenů ACBA, přičemž více než polovina těchto kmenů spadala do kategorie středních či silných producentů těchto společenství [48]. V práci Zeighami *et al.*, 2019 byla prokázána tvorba biofilmů dokonce u všech ze sta pozorovaných kmenů MR ACBA. Nadpoloviční většinu z nich tvořili silní producenti [49]. Je tedy zřejmé, že biofilm hraje významnou roli v patogenezi chronických infekcí způsobených ACBA. Biofilmy totiž snadno setrvávají na živých i neživých površích, a zajišťují tak přítomným buňkám ochranu proti nepříznivým vlivům okolí. Produkce biofilmu výrazně přispívá k odolnosti ACBA a extrémně komplikuje léčbu jimi vyvolaných onemocnění [50, 51].

3.3.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Také Gram-negativní tyčinka *Pseudomonas aeruginosa* (PA) je součástí běžné mikroflóry lidského těla. U imunokompromitovaných jedinců s chronickou obstrukční plicní nemocí, cystickou fibrózou, diabetem, rakovinou či popáleninami nebo u pacientů, kteří k terapii vyžadují plicní ventilaci, však bývá původcem akutních či chronických infekcí [52]. Pseudomonády nejčastěji využívají mechanismu syntézy enzymů hydrolyzujících ATB, snížené propustnosti membrány a efluxních pump vůči karbapenemům a fluorochinolonům. K odolnosti a patogenitě pseudomonád rovněž přispívá tvorba biofilmu, jež výrazně zvyšuje mortalitu takto postižených pacientů [53].

3.3.6. Rod *Enterobacter*

Poslední člen skupiny ESKAPE je v literatuře uváděn s určitou mírou variability. Některé publikace řadí na konec akronymu komenzální bakterii *Escherichia coli* (EC) produkující ESBL [54]. Jiné zdroje sem zahrnují dokonce celou čeleď *Enterobacteriaceae* [55]. Nejčastěji je však toto místo obsazováno bakteriemi rodu *Enterobacter*, přirozeně rezistentními vůči ampicilinu, amoxicilinu, 1. generaci cefalosporinů a cefoxitinu. Zástupci rodu *Enterobacter* rovněž produkují β -laktamázy, včetně karbapenemáz. Stejně jako ostatní bakterie ze skupiny ESKAPE, jsou i tyto bakterie původci oportunních infekcí přenášených v nemocničním prostředí [56].

3.3.7. Další mikroorganismy s vysokou mírou antimikrobní rezistence

Kromě členů ESKAPE vykazuje multirezistenci mnoho dalších bakteriálních rodů a druhů. Jsou jimi klaritromycin-rezistentní *Helicobacter pylori*, vůči fluorochinolonům odolný *Campylobacter* spp., *Neisseria gonorrhoeae* nereagující na léčbu cefalosporiny a fluorochinolony, fluorochinolon-rezistentní *Salmonella enterica* a *Shigella* spp., ampicilin-rezistentní *Haemophilus influenzae* či *Streptococcus pneumoniae* necitlivý na penicilin [27].

Z důvodu vysokého počtu zemřelých v souvislosti s tuberkulózou (po onemocnění COVID-19 2. nejčastější příčina úmrtí mezi infekčními chorobami) nesmějí zůstat opomenuty také rezistentní kmeny bakterie *Mycobacterium tuberculosis* odolné vůči léčivům první linie, zejména isoniazidu a RIF. WHO označuje stav spojený s rezistencí *Mycobacterium tuberculosis* za přetrvávající krizi a upozorňuje, že k léčbě tuberkulózy mají na světě stále přístup pouze dva lidé z pěti [9, 57].

Závažná onemocnění s mnohdy fatálním koncem mohou být způsobena též rezistentními mykotickými agens, jejichž počet nebezpečně narůstá. Mezi nejodolnější se řadí zástupci rodu *Aspergillus* a *Candida*. Velice omezené spektrum

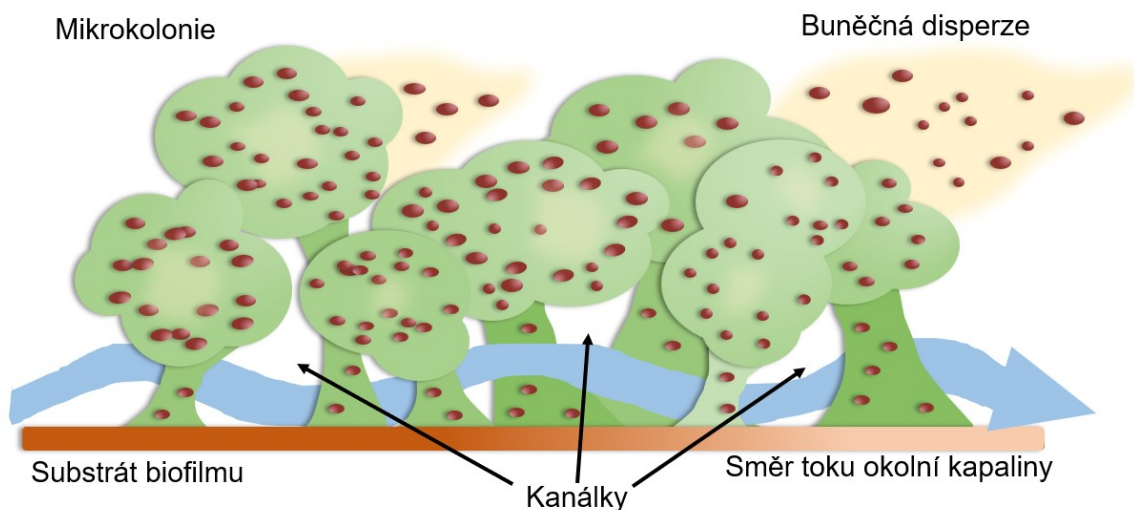
funkčních a dostupných antimykotik a mnohdy nekontrolovatelné systémové mykózy jsou rovněž výzvou k akci pro současné odborníky v oboru výzkumu a vývoje nových léčiv [58].

3.4. MIKROBIÁLNÍ BIOFILMY

Biofilmy představují konsorcia mikroorganismů (bakterií, kvasinek, plísní či prvoků) upoutaná k živému či neživému podkladu. Mikroby v biofilmu tvoří hříbovitě mikrokolonie, které obklopuje extracelulární polymerní matrice (EPM), jež obsahuje zejména produkty účastnících se buněk, tedy polysacharidy, proteiny, extracelulární DNA (eDNA) a lipidy, a dále materiály, jejichž složení koresponduje s podkladem biofilmu [59, 60]. Tato odolná společenství znesnadňují procesy mnoha průmyslových oborů (potravinářství, vodohospodářství, lodní průmysl atp.), znehodnocují vybavení či komplikují technologické postupy například v důsledku kontaminace, opotřebení materiálu atd. Největší problémy však působí tvorba biofilmů na živých tkáních hostitelů v rámci patogeneze infekčních onemocnění [59].

Životní cyklus biofilmu spočívá ve třech navzájem se překrývajících fázích. První z nich, adheze planktonických buněk k substrátu, je pro další vývoj společenství stěžejní. Uplatnění zde nachází adheziny exprimované na povrchu mikrobů. Tyto molekuly proteinové či polysacharidové povahy se váží na struktury kolonizovaného podkladu. Typickým příkladem takové molekuly je tzv. „clumping factor“ koagulóza-pozitivních stafylokoků, který vazbou na fibrinogen sráží krevní plazmu. Výhodou v procesu kolonizace povrchů jsou také případné bičíky, fimbrie mikrobů a okolní proudící kapalina, která vhodně modifikuje cílový substrát. Hrubé porézní povrchy, jakými jsou třeba polystyren, polyethylen či teflon, jsou k adhezi mikrobů vhodnější. Hladký povrch kovu či skla naopak kolonizaci nepodporuje. Při adhezi jsou totiž uplatňovány zejména hydrofobní interakce a elektrostatické síly [59, 61].

Druhá fáze je označována jako maturační. Dochází při ní k agregaci zúčastněných mikrobů, produkci EPM a tvorbě typické hříbovitě architektury (Obrázek 3). Výslednou tloušťku maturovaného biofilmu ovlivňuje mnoho faktorů, jako je například spektrum přítomných mikrobů. Jednodruhová společenství bývají tenká jen několik jednotek až stovek mikrometrů. Komplexní vícedruhové biofilmy jsou naopak robustnější. Biofilmy tvořící zubní plak, kontaminující rány či kolonizující vodovodní potrubí dosahují velikostí viditelných pouhým okem. Vliv na tloušťku biofilmu má také jeho stáří a přísun živin [62, 63].



Obrázek 3. *Architektura biofilmu (Diepoltová, 2024).*

Třetím krokem je fáze disperze. Tento proces postupného odtrhávání částí biofilmu i samostatných buněk je extrémně klinicky významný. Dochází díky němu k osídlování nových stanovišť, což v rámci patogeneze onemocnění znamená rozšiřování infekce v organismu pacienta [64].

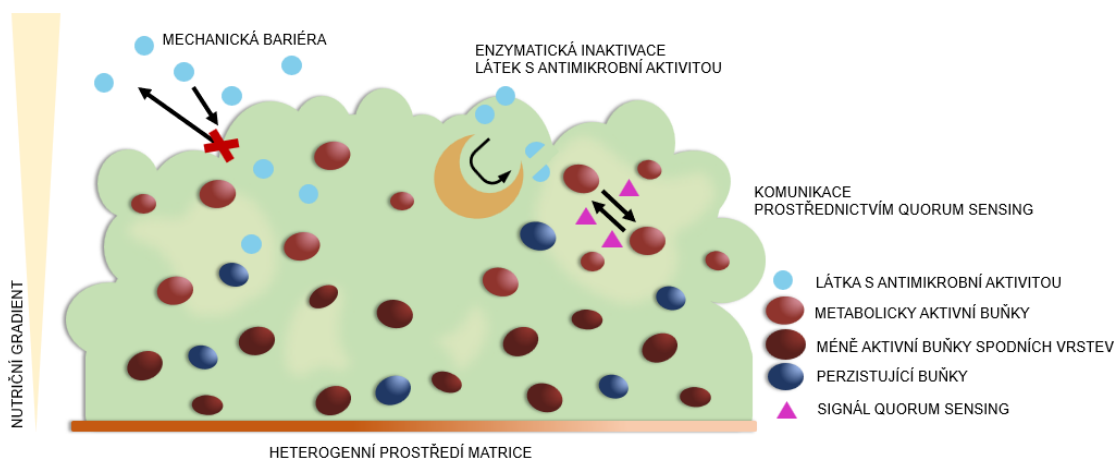
Mikroorganismy volně plovoucí v suspenzi lze nalézt v přírodě jen stěží. Přisedlá forma je pro ně naopak zcela přirozená [65]. Tato skutečnost má logické opodstatnění. Uspořádání v biofilmu totiž přináší mikrobům nemalé výhody. Specifická architektura biofilmu a přítomnost EPM zajišťují stabilní prostředí a zabezpečují mezibuněčný kontakt a také koordinaci přítomných buněk prostřednictvím mechanismu „quorum sensing“ (QS), který monitoruje růst populace v konsorciu a poskytuje informace o dosažení neúnosné hustoty osídlení. Nejdůležitějším benefitem života v biofilmu je však ochrana před nástrahami okolního prostředí – suchu, toxinům, záření, ale zejména proti působení látek s antimikrobní aktivitou [66-68].

3.4.1. Biofilm jako adaptivní mechanismus rezistence

Vliv přítomnosti biofilmu na rezistenci mikrobů je nezpochybnitelný. Není proto překvapením, že schopnost jeho tvorby je vlastností preferenčně předávanou v horizontálním genovém přenosu, typicky konjugací s využitím plazmidů. Tyto konjugační F-pili mohou navíc v procesu sloužit jako faktory adheze [69]. Studie autorů Metzger *et al.*, 2022 navíc potvrdila hypotézu, že biofilmy fungují jako ochranné rezervoáry plazmidů nesoucích informaci o multirezistenci [70]. Buňky biofilmu ale vykazují celé spektrum dalších fenotypových rozdílů, mezi které je řazena změna motility a metabolismu, již zmíněná produkce extracelulárních polysacharidů a látek zvyšujících odolnost společenstva. V rezistenci buněk biofilmu hraje opět podstatnou roli QS mechanismus – podílí se na koordinaci buněk v rámci adaptace na změny prostředí a kontroluje expresi genů podmiňujících mechanismy rezistence [71-74].

Slizovitá struktura EPM přináší buňkám ukotveným v biofilmu mechanickou ochranu a koncentruje složky s funkcí neutralizace antimikrobních látek, které případně do společenství pronikly. Mezi takové složky patří již zmíněné enzymy β -laktamázy, ale také proteázy či sacharázy [75].

K houževnatosti bakteriálních biofilmů velkou mírou přispívají i méně než jednoprocenní subpopulace perzistujících buněk, které tolerují expozici ATB. Tyto dormantní buňky v hlubších vrstvách biofilmu se nedělí a jejich metabolická aktivita je významně snížena. Tolerance perzistujících bakterií není podložena žádnou genetickou mutací, pouze obměnou fenotypových charakteristik. Poté, co nebezpečí pomine a tyto buňky obnoví svůj růst, nabydou opět vlastností jejich původní aktivní formy [76]. Mechanismy rezistence podmíněné přítomností biofilmu shrnuje Obrázek 4.



Obrázek 4. Mechanismy rezistence biofilmu (Diepoltová, 2024).

Cílenou eradikaci biofilmů komplikuje i jejich velká heterogenita. V přírodě, průmyslu nebo například při kolonizaci ran mohou být v biofilmech zastoupeny mikroorganismy odlišných taxonomických skupin. Výjimkou nejsou ani biofilmy tvořené bakteriemi spolu s kvasinkami. Biofilm tvořící zubní plak obsahuje dokonce na 500 různých druhů mikroorganismů [77, 78].

Přítomnost biofilmu komplikuje práci jak vědcům na úrovni výzkumu a vývoje nových antiinfektiv, tak klinikům v boji proti infekčním chorobám. Tvorba biofilmových společenství je často sdružena s infekcemi kůže, ran, dýchacích a močových cest a patofyziologií osteomyelitidy či endokarditidy. Terapeutickou volbou bývají v těchto situacích vysoké dávky ATB, kombinace ATB s různými mechanismy účinku či chirurgický zákrok spočívající, mimo jiné, v mechanickém odstranění ke tkáni adhezaného biofilmu. Někdy je třeba odstranit celou poškozenou tkáň, například endokarditidou poškozené srdeční chlopně. Biofilmy rovněž kolonizují zdravotnické pomůcky, jako jsou krevní i močové katétry, implantáty či náhrady kloubů. V takovém případě bývá k uzdravení pacienta nutná výměna dané pomůcky. Tvorba biofilmu v rámci patogeneze infekcí vede k výrazně komplikované léčbě, k prodloužení nutné hospitalizace pacienta a samozřejmě má také ekonomické dopady [79].

Jak již bylo uvedeno, schopností tvorby biofilmů často disponují zástupci mikroorganismů s vysokou úrovní AMR, tedy též bakterie skupiny ESKAPE. I z tohoto důvodu je naprosto nezbytné, aby výzkumné skupiny směřovaly svůj zájem také na studium aktivity kandidátních látek s potenciálním anti-biofilmovým efektem.

3.5. HODNOCENÍ ANTIMIKROBNÍ AKTIVITY KANDIDÁTNÍCH LÁTEK

3.5.1. Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Jak již bylo zmíněno, k indukci a rozvoji AMR přispívá mimo jiné užívání antimikrobních léčiv v nesprávných dávkách. Prevencí takového stavu je detailní studium efektivní koncentrace antiinfektiv. MIC definuje úroveň citlivosti či rezistence *in vitro* konkrétního mikrobiálního kmene vůči použité látce. Správné hodnocení citlivosti v klinické praxi významně ovlivňuje volbu terapeutické strategie a také její výsledek. Proto by, kdykoliv je to možné, měla nad empirickou preskripcí antiinfektiv převažovat racionální terapie, tedy laboratorní identifikace původce onemocnění doprovázená sestavením antibiogramu či antimykogramu, aby byla doporučená terapie s co největší pravděpodobností efektivní též v *in vivo* podmínkách.

V rutinních laboratořích je k hodnocení citlivosti převážně využíváno difúzních metod, tedy kvalitativního diskového difúzního testu či kvantitativního hodnocení citlivosti pomocí E-testů. Výsledky se následně interpretují na základě porovnání s hraničními hodnotami zveřejňovanými například Evropským výborem pro testování antimikrobní citlivosti (EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Rychlé provedení testů má v rutinních režimech opodstatnění. Na překotně se vyvíjející stav AMR však EUCAST reaguje úpravou hraničních hodnot a harmonizací postupů, které užívání těchto metod hodnocení citlivosti k některým ATB omezují [80].

V režimu výzkumu aktivity nových struktur s potenciálním antimikrobním účinkem je správně provedený screening MIC premisou pro zařazení kandidátní látky do pokročilejšího testování, jež detailněji charakterizuje její antimikrobní potenciál. Ke stanovení MIC jsou nejčastěji voleny mikrodiluční testy. Výsledky z difúzních metod se zde mohou využít ke komparaci výsledků a ověření správnosti měření. Pro interpretaci výsledků a potvrzení správnosti provedení metody je nezbytné využít standardy a referenční kmeny mikroorganismů. Tedy ATB či antimykotika, jejichž MIC, stanovovaná v rámci téže eseje, by měla odpovídat

hodnotám publikovaným výborem EUCAST pro dané sbírkové mikrobiální agens, jehož citlivost je vůči standardnímu léčivu taktéž přesně stanovena.

Vzhledem ke stavu AMR je v rámci základního screeningu MIC kandidátních látek nezbytné charakterizovat antiinfekční potenciál testované látky vůči širšímu spektru mikrobiálních agens (bakteriím, mykobakteriím i mykotickým agens). Záchyt slibné aktivity v takto „velkoformátovém“ screeningu je pak odrazovým můstkem pro sérii navazujících experimentů prováděných s cílem potvrdit a rozšířit získaná data.

Po odhalení slibné antimikrobní aktivity u kandidátní látky či látek v režimu výzkumu je dalším logickým krokem ověření této účinnosti s využitím bakteriálních izolátů z klinických vzorků, tedy mikrobů izolovaných z klinického materiálu v mikrobiologických laboratořích (dále jako „klinické izoláty“). V klinických laboratořích probíhá též vyhodnocení antibiogramu či antimykogramu daného klinického izolátu. Známý profil citlivosti/rezistence dovoluje zařadit konkrétní izoláty do následných studií na základě epidemiologické situace, čímž je zajištěna klinická relevance výzkumu. Dále je u zvolených klinických izolátů vhodné charakterizovat jejich schopnost tvorby biofilmu, která případně umožní zařazení těchto kmenů do experimentů sledujících též anti-biofilmovou aktivitu kandidátních látek.

3.5.2. Komplexní popis biologických vlastností kandidátní látky

Kandidátní látky, které vykazovaly slibnou aktivitu vůči vybraným klinickým izolátům, mohou být dále zařazeny k pokročilejšímu testování jejich antimikrobního potenciálu s využitím dalších relevantních metod. Limitací pro zařazení některých látek do takového testování však mohou být jejich fyzikálně-chemické vlastnosti či toxicita.

3.5.2.1. Popis efektu kandidátní látky na mikroorganismy

Základní kategorizace rozděluje AML v určitých koncentracích na bakteriostatické a baktericidní, respektive fungistatické a fungicidní, a to na základě efektu, který vyvolávají u cílových buněk. Látky se statickou aktivitou zastavují dělení mikrobů. Cidní látky je zabíjejí. K rozlišení statického a cidního efektu je

užívána veličina minimální baktericidní koncentrace (MBC, Minimum Bactericidal Concentration), tedy nejnižší koncentrace AML, která usmrtí > 99,9 % původního mikrobiálního inokula. Za cidní aktivitu je označován stav, kdy $MBC \leq 4 \times MIC$.

Striktní kategorizace u zavedených antimikrobních léčiv je v klinické praxi rozporována, stejně jako dogma, že cidii vyvolávající látky jsou v terapii efektivnější. Ve fázi výzkumu látek *in vitro* ale tyto charakteristiky přináší vítaná data [81, 82].

Určitým předběžným vodítkem pro určení efektu studované látky může být sledování posunu aktivity látky v čase. V prvotním screeningu se obvykle MIC odečítá po 24 a 48 h. Výrazný rozdíl mezi těmito hodnotami indikuje statické působení látky. Drobný či žádný posun v hodnotách MIC stanovených po 24 a následně 48 h naopak naznačuje efekt cidní. K potvrzení takové premisy lze využít například výsevových metod.

Informaci o efektu testované látky poskytují také tzv. „**time-kill**“ eseje, jež jsou spolehlivým nástrojem k popisu dynamické interakce mezi látkou a mikroblem. Time-kill eseje hodnotí vliv koncentrace studované látky na životaschopnost mikroorganismů v rámci časového úseku [82, 83].

Postantibiotický efekt (PAE) je dalším parametrem popisujícím antimikrobní aktivitu kandidátní látky. PAE označuje časový úsek, během kterého dochází k inhibici růstu mikroorganismů po kompletním odstranění AML. Přítomnost a dobu trvání takového efektu ovlivňují vlastnosti ATB, rod a druh použité bakterie, doba expozice či volba kombinace ATB. Čas trvání PAE může být rozhodovacím faktorem při volbě vhodného ATB. Význam má rovněž hodnocení efektu sub-inhibiční MIC (PAE-SME) popisující vliv sub-inhibiční koncentrace ATB na životaschopnost do testu zařazených mikroorganismů. Popis případného PAE a PAE-SME ATB je důležitý například pro následný design dávkovacího režimu, který může nést rovněž podíl na vzniku či vývoji AMR [84, 85].

3.5.2.2. Hodnocení mechanismu účinku kandidátní látky

Studium mechanismu účinku (MÚ) kandidátních molekul v rámci výzkumu nových antiinfektiv není pro zařazení látky do klinických studií podmínkou. Neporozumění MÚ však může být vedle nedostatečné aktivity a toxicity důvodem k vyřazení látek z těchto nákladných a extrémně časově náročných procesů. Informace o MÚ mohou být nezbytné například pro strategickou volbu partnerských molekul v rámci studia kombinační terapie. [86].

3.5.2.3. Studium toxicity kandidátní látky

Jak již bylo výše uvedeno, potenciální toxicita kandidátní struktury může vést k vyřazení látky z pokročilejších studií výzkumu a vývoje nových léčiv. Pro odhalení nežádoucích efektů kandidátních látek vůči lidským buňkám se využívá stanovení *in vitro* toxicity, nejčastěji pomocí kolorimetrického měření s využitím panelu vybraných linií lidských nádorových i nenádorových buněk. Cytotoxicita kandidátní látky je zde porovnávána s toxickým efektem kontroly (látky se známým toxickým účinkem). Získaná data jsou následně vyjádřena pomocí standardního toxikologického parametru, IC_{50} . Tato veličina představuje koncentraci testované látky, která vyvolá cytotoxický efekt u 50 % buněk ve srovnání s kontrolou. Hodnotu IC_{50} lze dále využít také k vyjádření parametru známého jako index selektivity (SI), který je vypočten jako poměr IC_{50} a MIC. Sloučeniny s hodnotou SI vyšší než 10 jsou považovány za vhodné kandidáty na léčiva, protože vykazují dostatečnou účinnost a bezpečnost.

Přidanou hodnotou v rámci charakterizace AML může být rovněž hodnocení toxicity této látky *in vivo* s využitím zvířecího modelu. Ve studiích patogeneze a toxicity jsou v současné době s úspěchem využívány zástupci bezobratlých. Například larva zavíječe voskového, *Galleria mellonella*, v tomto úkolu plně nahrazuje myši či potkany. Navíc tento model zcela naplňuje podmínky 3R („Replacement, Reduction, Refinement“), tedy zásady, které vedou k etičtějšimu zacházení se zvířaty využívanými ve vědě [87-89]. Larvy jsou chovány za přísně definovaných a dodržovaných podmínek. Testovanou látku je možné podávat tomuto modelovému zvířeti několika způsoby – perorálně či injekčně do hemocoelu skrze poslední levou panožku larvy. Druhý zmíněný způsob podání nejpřesněji

napodobuje intravenózní podání u savců a nejlépe odráží systémovou toxicitu kandidátní látky. Hodnocení stavu exponovaných larev v čase se poté provádí na základě pozorování životaschopnosti a dalších znaků, jako je schopnost pohybu larev, tvorba kokonů či melanizace [90].

Cytotoxický účinek kandidátní látky na cytoplazmatickou membránu lidských buněk lze též hodnotit *ex vivo*. Například je možné využít hemolytické eseje se zapojením lidských či zvířecích erytrocytů, které jsou v rámci této metody exponovány kandidátní látkou v určitém časovém úseku. Po expozici probíhá spektrofotometrické stanovení množství hemoglobinu uvolněného z poškozených erytrocytů. Díky tomuto stanovení lze testovat biokompatibilitu kandidátní látky v dané koncentraci s membránou eukaryotních buněk a předvídat případné toxické účinky látky ve formě hemolytických poškození organismu pacienta. Hemolytická aktivita by pochopitelně zamezovala možnost intravenózního podání tohoto kandidátního léčiva.

3.5.2.4. Studium vlivu kombinace vybraných léčiv a kandidátních látek na antimikrobní aktivitu – Checkerboard studie

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.2.1., studium nových látek uplatnitelných v kombinační terapii je jedním z pilířů výzvy WHO. Cílem výzkumu v oblasti kombinační terapie je potencování antimikrobní účinnosti látek spolupůsobících na mikroorganismy. Jejich společná antimikrobní aktivita je pak vyšší v porovnání se samostatným účinkem těchto látek. Při takto synergické interakci je navozen stav, při němž je pro dosažení inhibičního či cidního efektu vůči mikroorganismům využito nižších koncentrací obou látek, což pak ideálně vede ke snížení toxicity a zmírnění jejich případných nežádoucích účinků.

Ke studiu antimikrobní aktivity dvou či více látek v kombinaci je možno využít tzv. Checkerboard studií (v případě hodnocení kombinací více než dvou látek tzv. 3D-checkerbord studií). Základem bývá mikrodiluční bujónová metoda, při níž jsou do jedné mikrotitrační destičky pipetovány různé koncentrační poměry hodnocených antiinfektiv, které společně interagují s mikrobiálním agens v tzv. šachovnicovém uspořádání. K interpretaci výsledků Checkerboard studií slouží

veličina frakční inhibiční koncentrace (FIC, Fractional Inhibitory Concentration), která je vypočtena jako poměr MIC látky působící v kombinaci a MIC látky působící samostatně. Součtem FIC obou zúčastněných je vyjádřen index frakční inhibiční koncentrace (FICI, Fractional Inhibitory Concentration Index), na základě kterého je možné zařadit interakci koncentračního poměru dvou látek do jedné ze 4 kategorií. Synergický efekt nastává, když $FICI \leq 0,5$, aditivní efekt, když $0,5 < FICI \leq 1$, indiferentní efekt, když $1 < FICI \leq 4$ a antagonistický efekt, když $FICI > 4$. Odhalení antagonistického účinku testovaných látek použitím takové kombinace pro antimikrobní terapii vylučuje. V metodě Checkerboard je, v rámci jedné eseje, zařazeno též stanovení MIC samostatných látek a pozitivní (mikroby bez expozice AML) a negativní (použité látky bez mikrobu) kontrola.

V rámci metodiky lze využít kombinace ověřených účinků komerčně dostupného antiinfektiva. Tato varianta se nabízí i z důvodu potenciální ochrany tohoto léčiva před rozvojem AMR. Je nezbytné, aby byl výběr antiinfektiva založen na klinické relevanci s použitým mikrobiologickým agens. Žádanou přidanou hodnotou je též volba AML s odlišnými MÚ, jež zasahují více buněčných cílů mikroorganismu. Do Checkerboard studií lze s opodstatněním zahrnout i látky s nevýraznou antimikrobní aktivitou, u nichž je možné sledovat jejich přínos ve formě adjuvantního účinku a dále též přírodní či polosyntetické produkty. Relevanci a přínos zvolené kombinace lze dále ověřovat v pokročilých studiích. Vliv kombinace lze studovat například v rámci hodnocení toxicity, PAE či anti-biofilmové aktivity.

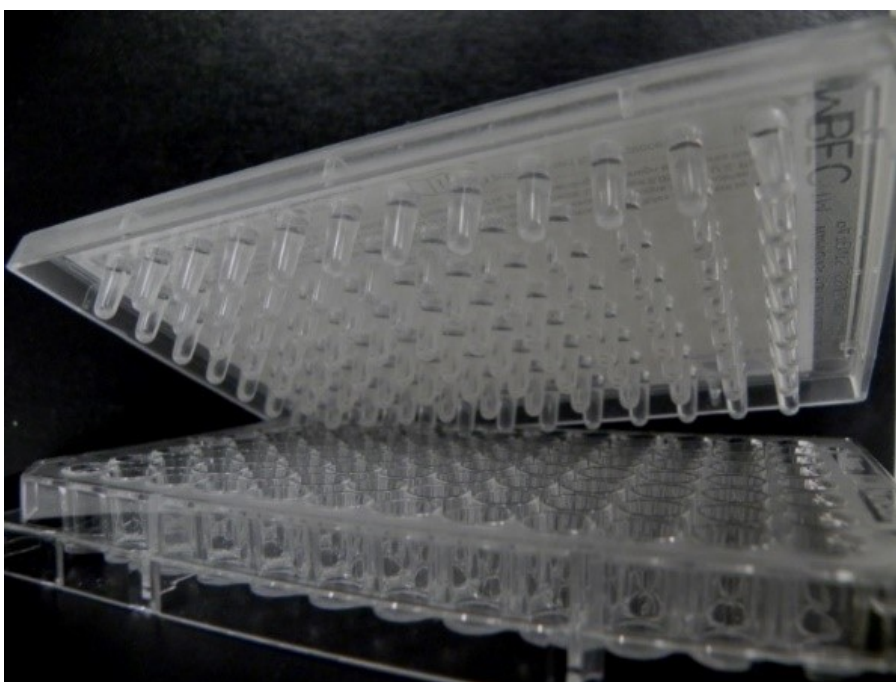
3.5.2.5. Studium tvorby mikrobiálních biofilmů *in vitro*

Buňky přítomné v mikrobiálních společenstvích jsou 10–1000 × odolnější než ve své planktonní formě, a je tedy za potřebí adekvátně vyšší MIC AML k vyvolání inhibičního či cidního efektu. S ohledem na fyzikálně-chemické vlastnosti kandidátní látky ve vyšších koncentracích (například nedostatečnou rozpustnost) či případnou (cyto-)toxicitu je tento fakt možnou příčinou vyřazení látky z výzkumu anti-biofilmové aktivity *in vitro*. Při přičtení faktorů ovlivňujících aktivitu léčiv *in vivo* se tak terapie s biofilmem asociovaných infekcí stává skutečnou klinickou výzvou [91, 92].

Biofilmy jsou hlavní formou života mikroorganismů a studium jejich morfologie a fyziologie je naprosto kritické, zejména ve snaze kontrolovat růst biofilmů v průmyslových či zdravotnických prostředích a na lidských tkáních [65]. Při studiu těchto společenství je třeba brát v potaz, že biofilm není charakterizován pouze přisednutím buněk k podloží. Maturovaný biofilm definuje celá řada charakteristických rysů, zejména jeho specifická architektura či přítomnost EPM. Prostředí biofilmu je nehomogenní a jeho vlastnosti se značně liší v závislosti na četných faktorech, například na přístupu kyslíku a živin v jednotlivých vrstvách. Tím je změněn fenotyp přítomných buněk, což ovlivňuje aktivitu AML působících na biofilm.

Při podrobném studiu procesu tvorby, architektury a fyziologie mikrobiálních konsorcií se uplatňují různé *in vitro* biofilmové modely. Práce s nimi přináší výhodu snadnější manipulace a aplikovatelnosti zejména ve screeningovém měření. Biofilmové modely je možno kategorizovat do čtyř základních skupin [93].

a) **Uzavřené biofilmové modely** jsou limitovány obsahem nutrientů. Jsou však zcela adekvátní pro studium struktury a složení biofilmu. Výhodou je poměrně snadná vizualizace a kvantifikace vytvořených biomas. Mezi uzavřené modely biofilmu je řazena například metoda tvorby biofilmu na agaru, v jamkách či na kolíčcích mikrotitrační destičky. Komerčně dostupným uzavřeným modelem pro tvorbu biofilmu *in vitro* je například MBEC Assay® Kit (dříve The Calgary Biofilm Device) (Obrázek 5). Biofilmy jsou zde tvořeny na jednotlivých kolíčcích zapadajících do individuálních jamek destičky, které zabezpečují specifické a stálé prostředí a udržují zvolené podmínky jejich tvorby. Povrch polystyrenových kolíčků může být modifikován rozličnými materiály pro usnadnění (například hydroxyapatit, celulóza) nebo naopak zabránění (například oxid titaničitý) adheze mikroorganismů. Nevýhodou těchto kitů je jejich vysoká cena. Systém je však velice efektivní v rámci testování anti-biofilmové aktivity kandidátních látek [94].



Obrázek 5. Innovatech MBEC Assay® Kit, uzavřený model biofilmu *in vitro* (Innovatech).

b) **Otevřené biofilmové modely** jsou fluidní dynamické systémy fungující na principu chemostatu. Umožňují tedy kontinuální doplňování nutrientů a odvádění nežádoucích produktů metabolismu. Příkladem otevřeného modelu je CDC reaktor® (Střediska pro kontrolu a prevenci nemocí, Centers for Disease Control and Prevention, USA), který je sestaven z osmi patron zanořených do nádoby s médiem. Každá z patron obsahuje disky pro tvorbu biofilmové masy. S disky lze individuálně manipulovat [95].

c) **Biofilmové mikrokosmy** jsou speciální velice sofistikované *ex vivo* modely, které přesně reflektují komplexní prostředí *in vivo*. Mikrokosmy k tvorbě biofilmu využívají biologických materiálů, tkání a tělesných tekutin přirozených pro výskyt studovaných mikroorganismů. Například ke studiu patogeneze periodontitidy se využívá sublingvální plak nemocných pacientů [96].

d) K tvorbě **biofilmů *in vivo*** jsou využívány zvířecí modelové organismy [93].

3.5.2.6. Vizualizace a kvantifikace mikrobiálních biofilmů

Pro podrobné studium klíčových rysů biofilmových společenství je nezbytná implementace vizualizačních a kvantifikačních metod. Na základě náležitých rysů, tedy přítomnosti EPM, heterogenní 3D struktury a pevně adherovaných buněk, lze definovat odolný maturovaný biofilm.

a) Vizualizace a kvantifikace celkové biomasy

Barvivo **krystalová violeť (CV)** se váže na negativně nabitý povrch buněk a na polysacharidy přítomné v EPM. Celková biofilmová masa je tímto barvivem vizualizována a následně též semi-quantifikována za pomoci spektrofotometrického hodnocení. Míra absorpance extrahované CV odpovídá množství formované biomasy. Výčet limitací této standardně užívané metody zahrnuje četné promývací kroky, při kterých může dojít ke ztrátě buněk či části biomasy a dále nepříliš vysokou opakovatelnost [97, 98].

b) Vizualizace buněk biofilmového společenství

Syto 9 je fluorescenční sonda schopna vazby na nukleové kyseliny živých i neživých buněk a též na eDNA přítomnou v EPM. V kombinaci Syto 9 s **propidium jodidem** lze rozlišit živé a mrtvé buňky biofilmu. Propidium jodid totiž difunduje pouze skrze narušené buněčné membrány. Takto značené poškozené či mrtvé buňky potom emitují červenou fluorescenci kontrastující se zeleně fluoreskujícími buňkami značenými Syto 9. Kombinace Syto 9 a propidium jodidu je komerčně dostupná jako LIVE/DEAD™ BacLight™. K vizualizaci buněk lze využít i dalších fluorescenčních sond vázajících DNA, například **bisbenzimididy** emitující modré fluorescenční záření (Hoechst) [98].

c) Vizualizace biofilmové matrice

Matrici lze vizualizovat pomocí značení jejich jednotlivých komponent. K cukernatým složkám se váží lektiny, například **konkavalin A (ConA)**, konjugovaný s **fluorescein-5-isothiokyanátem (FITC)**. Fluorescein emituje po excitaci zelené světlo. Při mikroskopickém pozorování se pak EPM jeví jako nazelená nejasně ohraničená hmota. K zobrazení EPM je možno využít též **kalkofluorové běloby**, polysacharidové složky EPM pak emitují modré světlo.

Sondy je primárně využíváno při zobrazování cukernatých složek buněčné stěny kvasinek. Ke kvantifikaci klíčových složek EPM, tedy polysacharidů, proteinů a eDNA, lze užít komerčně dodávaných kitů nebo například Ramanovy spektroskopie [99].

d) Rozlišení metabolicky aktivních a neaktivních buněk

Živé a mrtvé buňky lze dále rozlišit s využitím **resazurinu (AlamarBlue)**. Tento původně modrý indikátor je redukován na růžový resofurin aktivním metabolismem živých buněk. Metabolická aktivita může být rovněž hodnocena tzv. **XTT esejí**. Metoda spočívá v redukcí XTT barviva (tetrazoliová sůl, 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid) na rozpustný fialový formazan právě činností metabolicky aktivních buněk.

3.5.2.7. Studium anti-biofilmové aktivity kandidátních látek

Řada publikovaných metodických přístupů pro tvorbu biofilmů *in vitro* vykazuje podstatné rozdíly, které mohou být reflektovány v dosažených výsledcích. Pro screeningové hodnocení anti-biofilmové aktivity kandidátních látek je proto zcela zásadní využití relevantního biofilmového modelu a optimalizace kultivačních podmínek. Je zapotřebí definovat jednoduché standardizované pokyny pro optimální proces tvorby biofilmů *in vitro* s cílem dosažení produkce reprodukovatelné biofilmové masy se všemi jejími klíčovými znaky, které se pojí se zvýšeným výskytem AMR.

Účinnost kandidátní látky vůči mikrobům v biofilmovém společenství lze vyjádřit prostřednictvím několika parametrů. Přes významnou klinickou relevanci však nebyly veličiny popisující anti-biofilmovou aktivitu dosud žádnou z oficiálních společností (například EUCAST) přesně definovány a v pracích publikovaných vědeckou komunitou se mnohdy značně odlišují. Obecně lze aktivitu vůči biofilmům hodnotit ze dvou úhlů pohledu. Účinkům testované látky je možno vystavit již formovaný biofilm nebo lze studovat tzv. **biofilm prevenční koncentraci** (BPC, Biofilm Prevention Concentration) tedy koncentraci, při níž dochází k zabránění adheze planktonních buněk tak, aby bylo předcházeno vzniku biofilmu.

Účinnost vůči mikrobům přítomným v již vytvořených biofilmech je možno charakterizovat veličinou **minimální biofilm-inhibiční koncentrace** (MBIC, Minimum Biofilm Inhibitory Concentration). MBIC bývá definována například jako koncentrace AML vedoucí k 95-100% snížení metabolické aktivity planktonních buněk uvolněných z biofilmového společenství. Tento pokles metabolické aktivity buněk mikroorganismů je mimo jiné spjat se sníženou schopností uvolňovat buňky z biofilmu, čímž je reflektován možný stav šíření patogenů z infekčních depozit při patogenezi infekčních onemocnění [100]. Nutno podotknout, že veličina MBIC je v některých publikacích interpretována odlišně a hodnoty BPC a MBIC bývají zaměňovány [101].

Parametr **minimální biofilm-eradikační koncentrace** (MBEC, Minimum Biofilm Eradication Concentration) reprezentuje koncentraci vedoucí k 95-100% poklesu metabolické aktivity mikrobiálních buněk přítomných v biofilmovém společenství. Interpretace veličiny se však opět v různých publikacích rozcházejí [102].

Vyšetření anti-biofilmové aktivity se provádí s využitím mikrodiluční metody v mikrotitračních destičkách. První fází při vyhodnocování MBIC a MBEC je tvorba biofilmu *in vitro*. Ve druhé fázi jsou tvořené biofilmy exponovány kandidátní látkou. Hodnocení probíhá vizuálně, spektrofotometricky, s užitím výsevové metody, nebo lze využít fluorimetrického měření s použitím metabolického indikátoru AlamarBlue.

Mezi molekuly s prokázanou anti-biofilmovou aktivitou jsou řazeny látky rozmanitých chemických struktur, nicméně převažují ty přírodního původu. **Z látek izolovaných z rostlin** jsou to alkaloidy, fenoly, esenciální oleje a další struktury využívající mechanismu interference s QS signalizací, inhibice efluxních pump, snižování produkce exopolysacharidů či anti-adhezivních mechanismů. Anti-biofilmově aktivními produkty mikroorganismů jsou například **biosurfaktanty**, povrchově aktivní látky ovlivňující adhezi a permeabilitu membrán. Lze jich využít například k modifikaci povrchu katetrů či kloubních náhrad za účelem prevence tvorby biofilmů [103]. Slibným zdrojem látek s anti-biofilmovou aktivitou jsou antimikrobní peptidy. Například lidský peptid katelicidin, ač nevykazuje příliš zajímavou MIC vůči planktonním bakteriím, je schopen eradikace biofilmů

urologických klinických izolátů SA a EC. Antimikrobní peptidy interagují s QS mechanismem či ovlivňují membrány mikroorganismů [104, 105].

Též syntetické analogy rostlinných alkaloidů, strukturálně rozmanité heterocykly, pyrazoly, indoly, syntetické furanony nebo oxazolidinony jsou látkami s prokázanou anti-biofilmovou účinností. Vykazují inhibiční aktivitu vůči QS nebo ovlivňují buněčnou adhezi [106].

Mikrobiální biofilmy představují skutečnou výzvu na klinické i výzkumné úrovni a ne nadarmo jsou považovány za jednu z největších zdravotnických hrozeb současnosti.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. SEZNAM POUŽITÝCH METOD

- Využité bakteriální kmeny a kultivační média
 - Cíl A: kapitola 4.2.3.1. a 4.2.3.2.
 - Cíl B: kapitola 4.3.3.2.
 - Cíl C: kapitola 4.4.3.2.
- Tvorba biofilmů *in vitro*
 - Cíl A: kapitola 4.2.3.3.-4.2.3.6
- Modifikace povrchů kolíčků
 - Cíl A: kapitola 4.2.3.7.
- Barvení a vizualizace biofilmu
 - Cíl A: kapitola 4.2.3.8.
- Mikrodiluční bujónová metoda
 - Screening antimikrobní aktivity
 - Cíl B: kapitola 4.3.3.3.
 - Cíl C: kapitola 4.4.3.3.
 - Hodnocení antibakteriální aktivity vůči klinickým izolátům
 - Cíl B: kapitola 4.3.3.4.
 - Cíl C: kapitola 4.4.3.4.
 - Rozlišení baktericidního vs. bakteriostatického účinku
 - Cíl B: kapitola 4.3.3.5.
- Makromolekulární biosyntetická esej
 - Cíl B: kapitola 4.3.3.6.
- Membránová depolarizační esej
 - Cíl B: kapitola 4.3.3.7.
- Hodnocení toxicity kandidátních látek
 - Hodnocení cytotoxicity *in vitro* s využitím buněčné linie HK-2
 - Cíl B: kapitola 4.3.3.8.
 - Cíl C: kapitola 4.4.3.5
 - *In vivo* hodnocení toxicity s využitím zvířecího modelového organismu *Galleria mellonella*
 - Cíl B: kapitola 4.3.3.9.

- Cíl C: kapitola 4.4.3.6.
 - Hodnocení cytotoxicity *ex vivo* vůči lidským erytrocytům
 - Cíl B: kapitola 4.3.3.12.
- Studium vlivu kombinace vybraných léčiv a kandidátních látek na antimikrobní aktivitu – Checkerboard studie
 - Cíl B: kapitola 4.3.3.10.
 - Cíl C: kapitola 4.4.3.7.
- Screening anti-biofilmové aktivity
 - Cíl B: kapitola 4.3.3.11
- Statistická analýza
 - Cíl A: kapitola 4.2.3.9.
 - Cíl B: kapitola 4.3.3.13.
 - Cíl C: kapitola 4.4.3.8.

4.2. CÍL A

ZAVEDENÍ RELEVANTNÍHO A VALIDNÍHO PŘÍSTUPU PRO TVORBU STAFYLOKOKOVÝCH BIOFILMŮ *IN VITRO* VYUŽITELNÝCH KE STANOVENÍ ANTI-BIOFILMOVÉHO POTENCIÁLU KANDIDÁTNÍCH LÁTEK

4.2.1. Úvod

Jak bylo zmíněno výše, valná většina chronických infekčních onemocnění je provázena tvorbou biofilmových společenství a mikroby v nich přítomné vykazují až 1000 × větší rezistenci v porovnání se svou planktonní formou, což představuje značnou klinickou výzvu. Tento stav vysoké úrovně odolnosti je mimo jiné zapříčiněn přítomností EPM, která zde vystupuje jako ochranný štít ovlivňující difuzi a aktivitu působících léčiv.

Stafylokoky jsou typickými komenzály lidské kůže a sliznic, což z nich činí jedny z nejpravděpodobnějších původců infekcí ran či míst vstupu invazivních zákroků porušujících tyto bariéry [107, 108]. SA, MRSA a *Staphylococcus epidermidis* (SE) jsou častými producenty biofilmů, a tedy původci mnohých s biofilmem sdružených infekcí, jako je endokarditida, osteomyelitida, infekce krevního řečiště související se zavedením katetru atd. [33, 109, 110].

Jednou z možných strategií boje proti mikrobiálním biofilmům je použití léčiv s anti-biofilmovou aktivitou. Pro účely výzkumu léčiv s takovým potenciálem je nutné využívat standardizovaného a reprodukovatelného postupu tvorby biofilmu *in vitro*, jehož výsledkem budou robustní mikrobiální společenství se všemi náležitými rysy, včetně EPM. V průběhu posledních let bylo pro *in vitro* screening aktivity léčiv vůči stafylokokovým biofilmům navrženo několik protokolů. Metodiky však vykazují značné diskrepance zejména v kultivačních podmínkách.

4.2.2. Pracovní hypotéza

Tato studie publikovaná mikrobiologickou skupinou Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy (FAF UK) (Diepoltová *et al.*, 2021) [111] byla založena na hypotéze, že zvolené podmínky *in vitro* tvorby stafylokokových biofilmových společenství ovlivňují výsledky, tedy robustnost cíleného biofilmu a přítomnost jeho klíčových rysů, které mají význam při adaptivní rezistenci. Záměrem studie byla optimalizace *in vitro* podmínek vedoucích k produkci robustní biomasy stafylokokových biofilmů na kolíčkách uzavřeného modelu analogického k MBEC Assay® kit. Dalším cílem studie bylo potvrzení hypotézy, že modifikace povrchu kolíčků různými materiály má vliv na tvorbu stafylokokového biofilmu. Volba kultivačních podmínek vycházela z pilotních studií zařazených též do diplomové práce s názvem Optimalizace metody vedoucí k hodnocení citlivosti biofilm-tvořících stafylokoků vůči kandidátním antimikrobním látkám (Diepoltová, 2019).

4.2.3. Metodika (Cíl A)

4.2.3.1. Využité bakteriální kmeny

Do studie byly zařazeny tři referenční kmeny rodu *Staphylococcus* spp. pořízené z České sbírky mikroorganismů (CCM). Kmeny jsou rovněž dostupné z American Type Culture Collection (ATCC). Konkrétně jimi byly:

- *Staphylococcus aureus* (SA, CCM 4223, ATCC 29213)
- meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA, CCM 4750, ATCC 43300)
- *Staphylococcus epidermidis* (SE, CCM 7844, ATCC 35983)

Před každým experimentem byly kryoprezervované bakteriální kmeny naočkovány na Trypton-sójový agar (TSA, Himedia, Indie) a inkubovány při 37 °C po dobu 16 h v tmavém humidním prostředí.

4.2.3.2. Kultivační média pro tvorbu stafylokokových biofilmů

V rámci studie bylo využito tří kultivačních médií:

- Soyabean Casein Digest bujónu (trypton-sójový bujón, TSB, pH 7,3±0,2,)
- TSB suplementovaného 10 % (v/v) tepelně inaktivovaného fetálního bovinního séra (FBS)
- TSB suplementovaného 10 % (v/v) tepelně inaktivované lidské krevní plazmy (HP)

(TSB – Himedia, Indie, suplementy – Merck, USA).

4.2.3.3. Studované kultivační podmínky

V každém ze tří kultivačních médií byly připraveny bakteriální suspenze o třech různých počátečních optických denzitách (OD, 565 ± 15 nm, denzitometr DEN-1, Biosan, Lotyšsko):

- OD = 0,1 McFarlandových jednotek (dále jako „McFarland“)
- OD = 0,5 McFarland
- OD = 1,0 McFarland

(+ následné ředění příslušným kultivačním médiem v poměru 1:30)

Do jednotlivých jamek sterilních polystyrenových 96-jamkových destiček s plochým dnem (Gamedium, Česká republika) bylo pipetováno po 150 µl homogenní bakteriální suspenze v oktaplikátech. Každá destička obsahovala též jamky s negativními kontrolami se sterilním kultivačním médiem. Do studie bylo zahrnuto jak hodnocení tvorby biofilmů na plastovém povrchu stěn a dna mikrotitračních destiček (s plochými víčky bez kolíčků), tak na povrchu polypropylenových kolíčků zabudovaných do víčka separátní série mikrotitračních destiček (esej analogická k MBEC Assay®, Bio-Rad, USA).

Destičky byly inkubovány při 37 °C v humidním prostředí po dobu 48 h, a to buď v režimu třepání (Mini Rocker Shaker MR-1, BioSan, Lotyšsko) nebo v režimu statické kultivace. Sledované kultivační podmínky shrnuje Schéma 1.

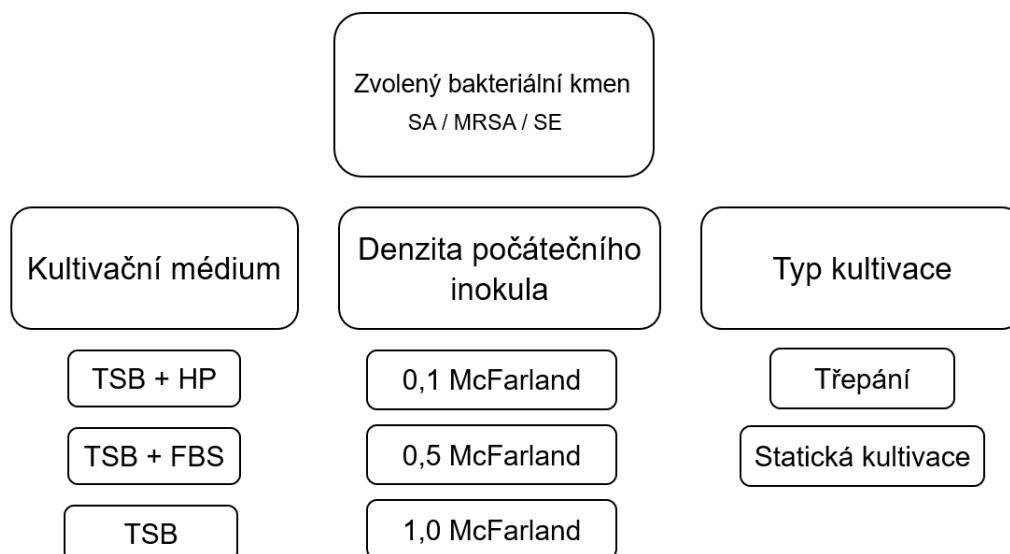


Schéma 1. Studované kultivační podmínky.

SA – *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), MRSA – *meticilin-rezistentní Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), SE – *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35983), TSB – *trypton-sójový bujón*, HP – *lidská plazma*, FBS – *fetální hovězí sérum*.

4.2.3.4. Semi-kvantifikace stafylokokového biofilmu pomocí CV

Pro účely hodnocení celkové biomasy vytvořeného biofilmu a kategorizace fenotypu použitých bakteriálních kmenů na základě schopnosti produkce biofilmu byla zvolena semi-kvantitativní esej popsaná dle autorů Christensen *et al.*, 1985 [112]. Po 48 h kultivace byly biofilmy tvořené na stěnách a dnu jamek (Gamedium, Česká republika) a kolíčkách víček (hodnocení analogické k MBEC Assay®, Bio-Rad, USA) třikrát opláchnuty sterilním fyziologickým roztokem a poté vysušeny a fixovány ledovým metanolem po dobu 15 min při 4 °C. Následně bylo přidáno 150 µl čerstvě přefiltrovaného roztoku 0,05% (w/v) CV, a to jak do jamek destičky s fixovanými biofilmy, tak do prázdných sterilních 96-jamkových destiček, do kterých byla později umístěna víčka s kolíčky s biofilmy formovanými na jejich povrchu. Po 20 min inkubace při laboratorní teplotě bylo přebytečné barvivo z jamek a kolíčků vymyto sterilní deionizovanou vodou. Vymývání bylo 3 × opakováno. Následně byla fixovaná CV z biofilmů vymývána směsí etanolu a acetonu (80:20) po dobu 15 min při laboratorní teplotě. Nakonec proběhlo měření OD vymyté CV při 630 nm pomocí multidetekčního readeru (Synergy HTX Multi-mode reader, BioTek, USA).

4.2.3.5. Kategorizace vybraných bakteriálních kmenů do fenotypových skupin dle schopnosti tvorby biofilmu

V návaznosti na tvorbu biofilmů za různých studovaných podmínek byly vybrané kmeny stafylokoků zařazeny do jedné ze 4 kategorií podle naměřené OD vymyté CV (OD_{cv}) na základě porovnání s optickou densitou negativní kontroly (OD_c). Kritéria kategorizace byla stanovena dle Stepanovic *et al.*, 2007 [113] takto:

- $OD_{cv} \leq OD_c$ – kmen netvoří za daných podmínek biofilm (-)
- $OD_c < OD_{cv} \leq (2 \times OD_c)$ – slabý producent biofilmu (+)
- $(2 \times OD_c) < OD_{cv} \leq (4 \times OD_c)$ – střední producent biofilmu (++)
- $(4 \times OD_c) < OD_{cv}$ – silný producent biofilmu (+++)

4.2.3.6. Studium vlivu modifikace povrchu kolíčků na formaci biofilmu

Polypropylenové kolíčky sterilních víček destiček (Bio-Rad, USA) byly vloženy do sterilních 96-jamkových destiček s plochým dnem (Gamedium, Česká republika), do kterých bylo předem napipetováno po 160 μ l jednoho z volených modifikačních roztoků:

- FBS
- HP
- poly-L-lysin (PLL, 0,01 % roztok w/v ve sterilní vodě, Merck USA)

Víčka s kolíčky byla vložena do připravených destiček a povrchy kolíčků byly vystaveny působení FBS a HP po dobu 24 h při 37 °C. Modifikace pomocí PLL byla kratší, probíhala 1 h při 37 °C. Kolíčky byly následně opláchnuty sterilním fyziologickým roztokem a ponechány na vzduchu k vysušení.

4.2.3.7. Tvorba stafylokokových biofilmů na kolíčcích s modifikovaným povrchem

Homogenní bakteriální suspenze SA, MRSA a SE o $OD = 0,1$ McFarland (565 ± 15 nm) byly připraveny v médiu TSB + HP (OD i médium voleno na základě

předchozích výsledků). 150 μ l každé z těchto suspenzí bylo pipetováno do jednotlivých jamek sterilní 96-jamkové polystyrenové mikrotitrační destičky s plochým dnem (Gamedium, Česká republika). Následně byly do jamek s připravenou suspenzí vloženy kolíčky (Bio-Rad, USA) s modifikovanými povrchy. Negativní kontroly sestávaly z jamek se sterilním kultivačním médiem. Navíc byla do eseje zahrnuta kontrola ve formě víček s neupravenými kolíčky. Takto připravené mikrotitrační destičky s víčky byly následně inkubovány 48 h při 37 °C na stolní třepačce (25 rpm).

4.2.3.8. Zobrazení stafylokokových biofilmů technikami epifluorescenční mikroskopie

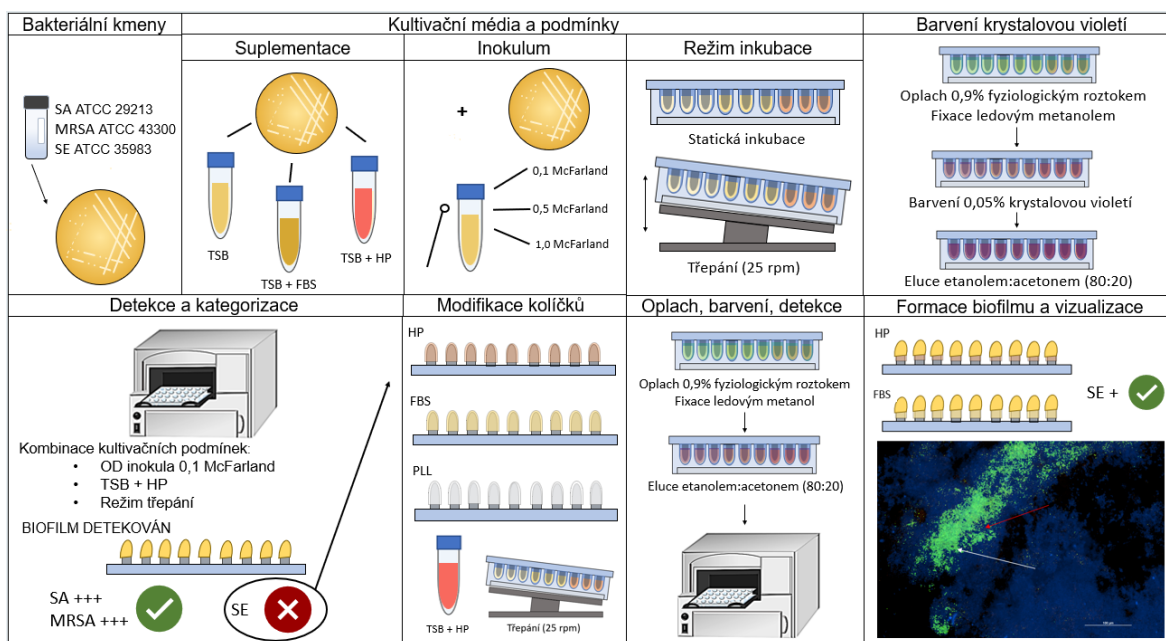
Biofilmy tvořené na kolíčcích (Bio-Rad, USA) byly nejprve třikrát opláchnuty sterilní deionizovanou vodou. EPM biofilmu byla vizualizována s využitím směsi fluorescenčních sond, ConA konjugovaného s FITC (FITC-Con A, Invitrogen, USA) o výsledné koncentraci 50 μ g/ml a Hoechst 33342 (výsledná koncentrace 2,5 μ g/ml, Invitrogen, USA). Barvení probíhalo po dobu 40 min ve tmě při laboratorní teplotě za mírného třepání.

Životaschopnost bakterií tvořících biofilm byla pozorována po označení biofilmů fluorescenční sondou SYTO 9 (výsledná koncentrace 3,34 μ M, detekce živých buněk) a propidium jodidem (PI, výsledná koncentrace 5 μ g/ml, detekce mrtvých buněk, Invitrogen, USA). Značení probíhalo po dobu 25 min ve tmě při laboratorní teplotě za mírného třepání. Poté byly biofilmy z kolíčků seškrábnuty a přeneseny na podložní sklíčko. Pro vizualizaci EPM byly následně k biofilmu na sklíčko přidány dvě kapky Calcofluor White (Merck, USA) a vzorek byl zakryt krycím sklem.

Obarvené biofilmy byly pozorovány epifluorescenčním mikroskopem Olympus Provis (Olympus, Japonsko) opatřeného kamerou (DS-Fi3, Nikon, Japonsko). Snímky byly upravovány pomocí softwaru NIS-Elements, verze 5.00 (Laboratory Imaging, Česká republika).

4.2.3.9. Statistická analýza

Pro vyhodnocení vlivu modifikace povrchu kolíčků bylo do každého ze tří nezávislých experimentů zahrnuto dvanáct opakování. Od veškerých hodnot OD_{cv} byly odečteny hodnoty příslušných negativních kontrol. Naměřená data byla podrobena statistické analýze s využitím softwaru GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., USA). Pro porovnání statistického významu jednotlivých kultivačních podmínek byla provedena jednosměrná analýza rozptylu (ANOVA) a hodnota $p < 0,05$ byla přijata jako statisticky významná. Data byla prezentována jako průměr \pm standardní chyba průměru (SEM). Celý metodický postup je shrnut na Obrázku 6.



Obrázek 6. Metodický postup pracovního cíle A (Diepoltová, 2024).

SA – *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), MRSA – *meticilin-rezistentní Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), SE – *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35983), TSB – trypton-sójový bujón, FBS – fetální hovězí sérum, HP – lidská plazma.

4.2.4. Výsledky a diskuze

4.2.4.1. Hodnocení vlivu kultivačních podmínek na produkci stafylokokového biofilmu v uzavřeném modelu *in vitro*

Bakterie rodu *Staphylococcus* spp. jsou dlouhodobě řazeny mezi mikroorganismy s největší mírou rezistence vůči ATB, k čemuž využívají celého spektra mechanismů. Jedním z nich je tvorba biofilmu. Z tohoto důvodu je zcela zásadní, aby u kandidátních látek, které jsou středem zájmu výzkumu nových anti-stafylokokových léčiv, bylo řazeno taktéž studium anti-biofilmové aktivity *in vitro*. V metodikách četných publikací zaměřených na tuto problematiku se však objevují výrazné diskrepance, a to zejména ve volbě podmínek pro kultivaci stafylokokových biofilmů. Nejednotnost lze pozorovat například v délce kultivace, ve zvolené OD počátečního bakteriálního inokula a v režimu kultivace (statický režim vs. třepání). Odlišnosti jsou i ve voleném substrátu pro počáteční adhezi bakterií nebo v používaných kultivačních médiích [114-116]. Pro tvorbu stafylokokových biofilmů bývají nejčastěji volena média, jako jsou kationtově upravený Mueller-Hinton bujón (CAMHB) [117], mozkosrdcový bujón [118] a základní růstová média jako TSB [119, 120], obvykle obohacována o různé suplementy (glukózu, NaCl, HP, citrát atd.) [121-123].

Rozhodujícím faktorem pro získání reprodukovatelných a validních výsledků ze screeningu anti-biofilmové aktivity kandidátních látek je navození podmínek pro tvorbu biofilmu *in vitro* tak, aby cílený biofilm disponoval klíčovými rysy přispívajícími k adaptivní rezistenci. [124, 125].

Vliv různých kultivačních podmínek na produkci stafylokokových biofilmů v jamkách mikrotitrační destičky byl hodnocen s využitím metody barvení celkové biofilmové masy CV s následnou kategorizací referenčních stafylokokových kmenů do skupin dle schopnosti tvořit biofilm. Výsledky semi-kvantitativního hodnocení celkových biofilmových mas tvořených za různých podmínek jsou shrnuty v Tabulce 1.

Jako médium nejvhodnější pro tvorbu stafylokokových biofilmů v jamkách bylo na základě výsledků zvoleno médium TSB + HP. Všechny kmeny vykazovaly v tomto mediu fenotyp středního či silného producenta biofilmů nezávisle na dalších

podmínkách kultivace. Výjimku tvořil kmen SA s počátečním inokulem odpovídajícím OD = 0,1 McFarland kultivovaného staticky (+) a kmen SE s počátečním inokulem odpovídajícím OD = 0,5 McFarland kultivovaného rovněž za statických podmínek (+). Volba suplementace plazmou byla inspirována zejména studii autorů Chen *et al.*, 2012 [114] a Cardile *et al.*, 2014 [126], jimiž získaná data jsou v souladu s výsledky této práce. Suplementace kultivačního média HP má logické opodstatnění, jelikož může alespoň částečně přiblížit podmínky pro vznik biofilmů v situaci *in vivo*. V rámci kultivace v TSB + HP byl jako vhodnější model inkubace zvolen režim s třepáním. Všechny referenční kmeny kultivované za těchto podmínek byly označeny za středně silné či silné producenty biofilmu (++) či (+++).

Po kultivaci v médiu TSB + FBS dosáhl fenotypové kategorie „střední producent biofilmu“ (++) pouze SA, a to s použitím počátečního inokula odpovídajícímu OD = 0,1 McFarland v režimu třepání. Žádná další z kombinací podmínek kultivace v tomto médiu nevedla k dosažení vyšší kategorie než „slabý producent“ (+). Suplementace FBS v peptonovém médiu s dextrózou byla využita k indukci produkce vícedruhového biofilmu tvořeného stafylokoky a kvasinkou *Candida* spp. v práci Leonhard *et al.*, 2018 [127]. Autoři práce upozorňují, že pro tvorbu biofilmu *in vitro* je nezbytná úprava podmínek dle konkrétně volených mikroorganismů.

Zdá se, že v rámci studovaných podmínek je médium TSB bez suplementace médiem vhodným výhradně k tvorbě biofilmu referenčního kmene SE. Pouze volba počátečního inokula s OD 1,0 McFarland v kombinaci s třepacím režimem nebyla výhodnou, jelikož SE zde tvořil biofilm jen jako slabý producent (+). Pro tvorbu biofilmu kmeny SA a MRSA bylo médium TSB vhodné méně. Kategorie „střední producent“ (++) zde dosáhl pouze SA, a to s OD počátečního inokula = 1,0.

Tabulka 1. Semi-kvantitativní hodnocení celkové biomasy stafylokokových biofilmů tvořených v jamkách mikrotitrační destičky: Studie vlivu kultivačního média, počáteční optické denzity bakteriální suspenze a režimu kultivace. Kategorizace fenotypu kmenů tvořících biofilm: (-) bez produkce biofilmu, (+) slabý producent biofilmu, (++) střední producent biofilmu, (+++) silný producent biofilmu.

Médium	TSB						TSB + FBS						TSB + HP					
	Třepání			Statická			Třepání			Statická			Třepání			Statická		
OD inokula	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
SA	+	-	-	+	+	++	++	+	-	+	+	+	++	++	++	+	++	+++
MRSA	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	++	+++	++	++	++	+++
SE	+++	++	+	+++	+++	+++	+	-	-	+	-	-	+++	+++	++	++	+	+++

Bakteriální kmeny kategorizovány dle kritérií převzatých z Stepanovic et al., 2007. Data pro kategorizaci měřena v oktaplikátech. Negativní kontrola odečtena. OD – optická denzita (McFarland), SA – Staphylococcus aureus (ATCC 29213), MRSA – meticilin-rezistentní Staphylococcus aureus (ATCC 43300), SE – Staphylococcus epidermidis (ATCC 35983), TSB – trypton-sójový bujón, FBS – fetální hovězí sérum, HP – lidská plazma.

4.2.4.2. Screening vlivu modifikace povrchu kolíčků na produkci stafylokokových biofilmů

Výhody použití kolíčků v rámci metody tvorby biofilmu *in vitro* spočívají zejména v usnadněném přístupu k jednotlivým společenstvím a jednodušší manipulaci s nimi. Systém analogický k MBEC Assay® kitu rovněž není finančně nákladný. Tyto faktory byly motivací pro zařazení kolíčků jakožto substrátu pro tvorbu biofilmu do této studie.

Jak je zřejmé z Tabulky 2, kultivační médium TSB + HP je v porovnání se samostatným TSB a TSB + FBS pro tvorbu biofilmu na kolíčcích nejvhodnější. Po kultivaci v TSB + HP s třepáním byl fenotyp silného producenta biofilmu (+++) zaregistrován u kmenů bakterií SA a MRSA, a to při všech volených OD počátečního inokula. Kategorie středně silného producenta biofilmu (++) byla vyhodnocena ve statickém režimu kultivace kmene SA (všechny OD počátečního inokula) a MRSA (OD počátečního inokula = 0,1 McFarland).

Suplementace TSB + FBS nevedla v žádné kombinaci podmínek k odhalení středně silného či silného producenta biofilmu. Po kultivaci stafylokokových kmenů v TSB byl fenotyp silného producenta biofilmu rozpoznán pouze v režimu třepání, a to u kmene SE (OD = 0,5) a SA (OD = 0,5).

Vzhledem k faktu, že jsou stafylokoky popisovány jako nepohyblivé bakterie, režim třepání by mohl významně podpořit zásadní první krok tvorby biofilmu, tedy adhezi bakterií k povrchu kolíčku. Podle výsledků experimentů však nelze vliv režimu třepání označit obecně za výhodný v kombinaci se všemi dalšími podmínkami kultivace. Na druhou stranu, v případě kultivace s režimem třepání v TSB + HP (SA a MRSA) nebo v TSB bez suplementace (SA, SE) referenční kmeny dosáhly nejvyšší kategorie, tedy kategorie silného producenta biofilmů (+++).

Překvapivým zjištěním byl fakt, že schopnost tvorby biofilmu bakterií SE na kolíčcích byla výrazně nižší než za shodných podmínek v jamkách mikrotitrační destičky, přestože je tento referenční kmen deklarovaným producentem biofilmu. Vysvětlení je pravděpodobně skryto ve snížené schopnosti iniciální adheze této bakterie ke kolíčku. Neuspokojivá tvorba biofilmu SE na kolíčcích byla ale motivací ke studiu modifikace povrchu kolíčků různými látkami a vedla k hypotéze, že modifikace povrchu tvorbu biofilmů podpoří.

Tabulka 2. Semi-kvantitativní hodnocení celkové biomasy stafylokokových biofilmů tvořených na kolíčkách mikrotitrační destičky: Studie vlivu kultivačního média, počáteční optické denzity bakteriální suspenze a režimu kultivace. Kategorizace fenotypu kmenů tvořících biofilm: (-) bez produkce biofilmu, (+) slabý producent biofilmu, (++) střední producent biofilmu, (+++) silný producent biofilmu.

Médium	TSB						TSB + FBS						TSB + HP					
	Třepání			Statická			Třepání			Statická			Třepání			Statická		
OD inokula	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
SA	+	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	++	++	++
MRSA	+	++	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+++	+++	+++	++	+	+
SE	+	+++	++	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+

Bakteriální kmeny kategorizovány dle kritérií převzatých z Stepanovic et al., 2007. Data pro kategorizaci měřena v oktaplikátech. Negativní kontrola odečtena. OD – optická denzita (McFarland), SA – Staphylococcus aureus (ATCC 29213), MRSA – meticilin-rezistentní Staphylococcus aureus (ATCC 43300), SE – Staphylococcus epidermidis (ATCC 35983), TSB – trypton-sójový bujón, FBS – fetální hovězí sérum, HP – lidská plazma.

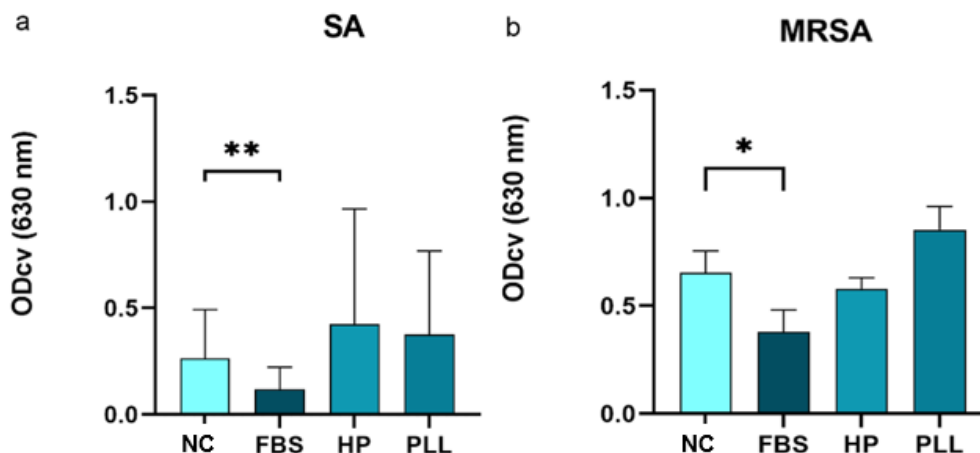
4.2.4.3. Hodnocení vlivu modifikace povrchu kolíčků na celkovou tvorbu biomasy stafylokokových biofilmů

Pevná adheze bakteriálních buněk k živým i neživým povrchům je klíčovou iniciační fází tvorby biofilmu, jelikož předurčuje úspěšnou kolonizaci a maturaci [128]. Odolné ukotvení k povrchu je žádané i v *in vitro* podmínkách. Biofilmy zde čelí několika sériím oplachování (například při vymývání planktonních buněk či oplachu po expozici léčivem) a případné narušení či úplné odstranění biofilmu vede k značné variabilitě v robustnosti cílové biomasy mezi jednotlivými jamkami a tím k nepřesným výsledkům [116]. Modifikace povrchů je cestou k eliminaci takových komplikací.

Modifikace povrchu je využívána k rozličným účelům – ať už k podpoře či potlačení tvorby mikrobiálních biofilmů. Dobře prostudované jsou vlivy trimethylsilanu, polymerů na bázi polyethylenglykolu či polylysinových derivátů, které tvorbě biofilmu brání [129-131]. Na druhou stranu, PLL je v některých studiích volen i k podpoře adheze bakterií [132]. Pozitivní vliv na tvorbu biofilmů naopak vykazuje modifikace pomocí HP či syntetických kationtových polymerů [126, 133].

Na základě výsledků předchozích experimentů byla pro tvorbu biofilmů na kolíčcích zvolena následující kombinace podmínek: kultivační médium TSB + HP, OD počátečního inokula 0,1 McFarland a kultivace za mírného třepání. S využitím statistické analýzy lze konstatovat, že u kmenů SA a MRSA nedochází ke statisticky významné změně v produkci biofilmu podmíněné modifikací povrchu kolíčků s využitím HP či PLL (Obrázek 7). Výsledek je v rozporu s publikací autorů Zapotoczna *et al.*, 2015 [134], v níž byla provedena modifikace povrchu pomocí HP za účelem dosažení optimální produkce biofilmu SA. Modifikovány však byly stěny jamek destičky.

Dále byla v této studii odhalena statisticky významná inhibice tvorby biofilmu SA a MRSA po modifikaci povrchu kolíčků FBS (Obrázek 7). Podobný vliv modifikace FBS byl odhalen v práci publikované autory Kipanga *et al.*, 2017 [135]. Kvasinkové biofilmy však byly i v tomto experimentu tvořeny v jamkách mikrotitrační destičky.



Obrázek 7. Statistická analýza vlivu modifikace povrchu kolíčků na celkovou produkci biofilmů dvou referenčních kmenů **a.** SA: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) a **b.** MRSA: meticilin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300). Hodnoty představují průměr \pm standardní chyba průměru (SEM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Data analyzována pomocí testu ANOVA v programu GraphPad Prism 9.0. (GraphPad Software, Inc., USA). OD_{cv} – optická denzita eluované krystalové violeti (negativní kontrola odečtena), NC – negativní kontrola modifikace kolíčků (kolíčky bez modifikace povrchu), FBS – fetální bovinní sérum, HP – lidská krevní plazma, PLL – poly-L-lysin.

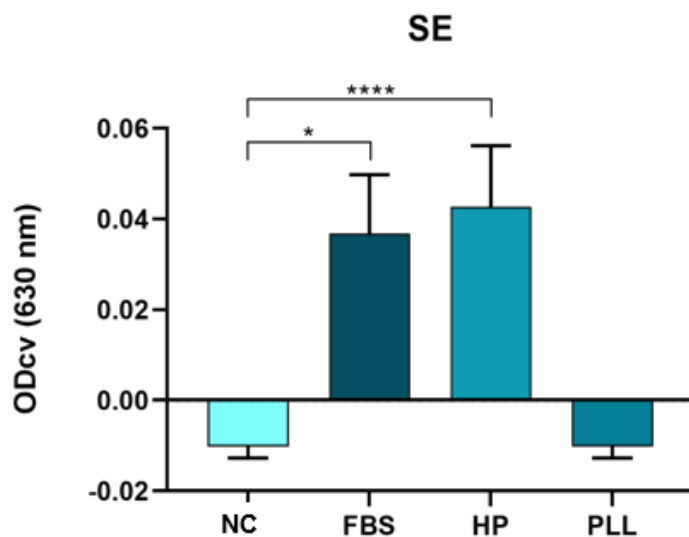
Výsledky hodnocení vlivu modifikace kolíčků na tvorbu biofilmů stafylokoky s využitím barvení CV shrnuje Tabulka 3. Z tabulky je zřejmé, že modifikace kolíčků pomocí FBS vedla ke snížení produkce biofilmu u referenčního kmene bakterie SA, jak bylo též dříve vyhodnoceno statistickou analýzou (Obrázek 7a). Statisticky významná inhibice tvorby biofilmů referenčního kmene bakterie MRSA (Obrázek 7b) ve fenotypové klasifikaci stafylokokových kmenů reflektována nebyla (Tabulka 3). Kmen MRSA je tedy i za těchto podmínek (modifikace povrchu kolíčků FBS) řazen do kategorie silných producentů biofilmu (+++).

Tabulka 3. Semi-kvantitativní hodnocení vlivu modifikace povrchu kolíčků. Kategorizace fenotypu kmenů tvořících biofilm: (-) bez produkce biofilmu, (+) slabý producent biofilmu, (++) střední producent biofilmu, (+++) silný producent biofilmu.

	SA	MRSA	SE
HP	+++	+++	+
FBS	++	+++	+
PLL	+++	+++	-
NC	+++	+++	-

Bakteriální kmeny kategorizovány dle kritérií převzatých z Stepanovic et al., 2007. Data pro kategorizaci měřena v oktaplikátech. Negativní kontrola odečtena. HP – lidská krevní plazma, FBS – fetální hovězí sérum, PLL – poly-L-lysin, NC – negativní kontrola modifikace kolíčků (kolíčky bez modifikace povrchu), SA – Staphylococcus aureus (ATCC 29213), MRSA – meticilin-rezistentní Staphylococcus aureus (ATCC 43300), SE – Staphylococcus epidermidis (ATCC 35983).

Zcela odlišné výsledky byly naměřeny s využitím referenčního kmene bakterie SE. Z Obrázku 8 je zjevný statisticky významný dopad modifikace povrchu kolíčků pomocí FBS a HP. Na základě klasifikace fenotypů stafylokokových kmenů dle schopnosti produkce biofilmů byl tento kmen kultivovaný za daných podmínek přeřazen z kategorie „bez produkce biofilmu“ do kategorie „slabý producent biofilmu“ (Tabulka 2 a 3).



Obrázek 8. Statistická analýza vlivu modifikace povrchu kolíčků na celkovou produkci biofilmů referenčního kmene *Staphylococcus epidermidis* (SE, ATCC 35983). Hodnoty představují průměr \pm SEM. Data jsou prezentována jako průměr \pm standardní chyba průměru (SEM). * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$. Data analyzována pomocí testu ANOVA v programu GraphPad Prism 9.0. (GraphPad Software, Inc., USA). OD_{cv} – optická denzita eluované krystalové violeti (negativní kontrola odečtena), NC – negativní kontrola modifikace kolíčků (kolíčky bez modifikace povrchu), FBS – fetální bovinní sérum, HP – lidská krevní plazma, PLL – poly-L-lysin.

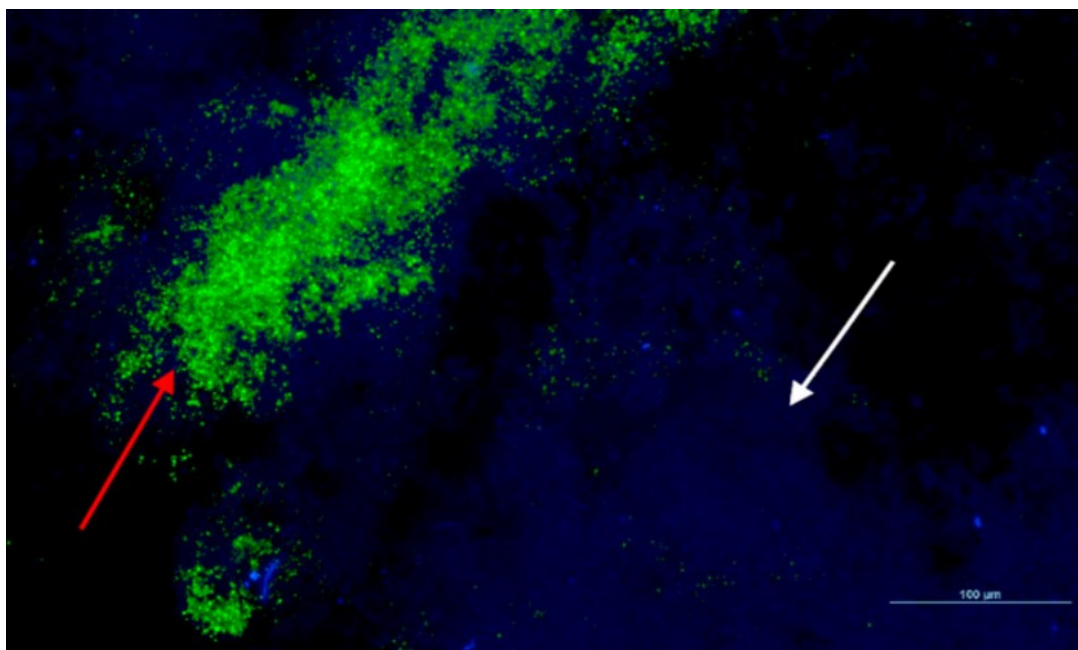
4.2.4.4. Vizualizace buněk bakterií produkujících biofilm, EPM a biomasy stafylokokových biofilmů

Robustní a pevně ukotvená biomasa stafylokokových biofilmů tvořených na povrchu kolíčků byla pozorovatelná i pouhým okem (Obrázek 9).

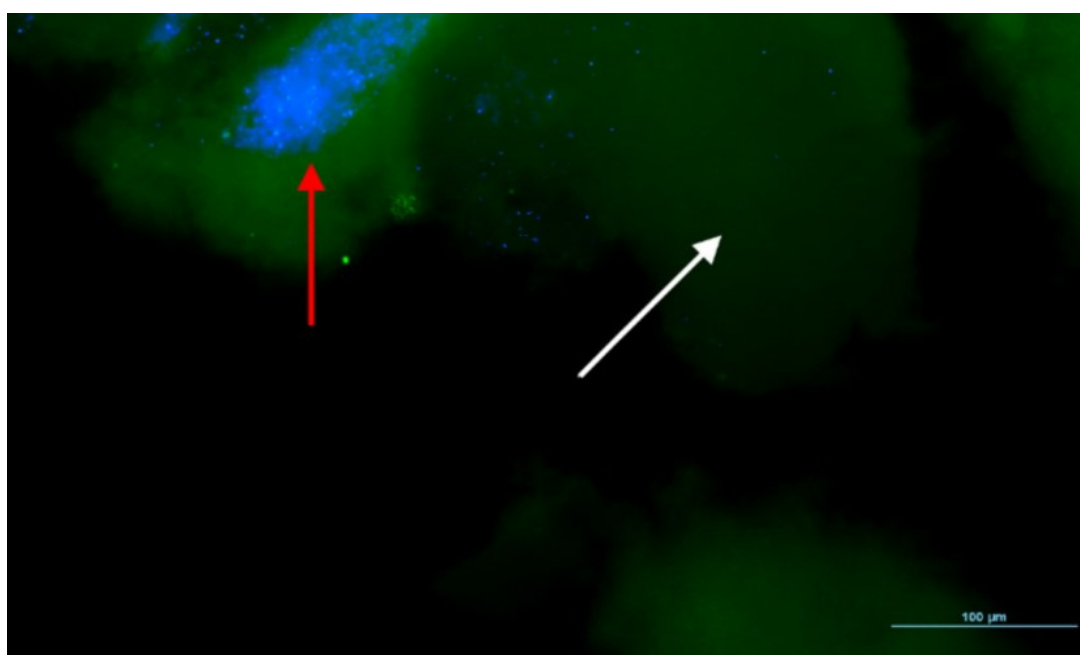


Obrázek 9. Fotografie biofilmu bakterie *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) vytvořeného na kolíčcích upravených pomocí lidské krevní plazmy. Optická denzita počátečního inokula = 0,1 McFarland, inkubace za mírného třepání v trypton-sójeovém bujónu suplementovaném lidskou krevní plazmou při 37 °C v humidním prostředí po dobu 48 h (Diepoltová, 2021).

K potvrzení přítomnosti EPM a buněk produkujících biofilm bylo využito epifluorescenční mikroskopie (Obrázky 10 a 11). Ke značení byla využita kombinace fluorescenčních sond SYTO 9 + propidium jodidu a kalkofluorové běloby primárně využívané ke značení mykologických agens (v EPM biofilmu stafylokoků se nespecificky váže na polysacharidové složky EPM). V následujícím barvicím režimu byla zvolena kombinace Hoechst 33342 k barvení buněk a FITC-ConA k barvení EPM.



Obrázek 10. Vizualizace biofilm-produkujících buněk stafylokoků a extracelulární polymerní matrice s využitím epifluorescenční mikroskopie. Buňky značeny fluorescenčními sondami SYTO 9 a propidium jodid. Zelené tečky (červená šipka) jsou živé stafylokoky. Mrtvé buňky nebyly detekovány. Extracelulární polymerní matrice značena kalkofluorovou bělobou (modrá struktura, bílá šipka). Měřítko odpovídá 100 μm (Diepoltová, 2021).



Obrázek 11. Vizualizace biofilm-produkujících buněk stafylokoků a extracelulární polymerní matrice s využitím epifluorescenční mikroskopie. Buňky značeny fluorescenční sondou Hoechst 33342 (modré tečky, červená šipka). Extracelulární polymerní matrice barvena konjugátem FITC-ConA (zelená struktura, bílá šipka) Měřítko odpovídá 100 μm (Diepoltová, 2021).

4.2.5. Shrnutí pracovního Cíle A

V publikovaných metodikách, které se zabývaly tvorbou stafylokokových biofilmů *in vitro*, panuje výrazná nejednoznačnost. Přítomnost klíčových rysů biofilmu, tedy EPM a typické architektury těchto společenství, může být výrazně ovlivněna kultivačními podmínkami. Tato studie publikovaná v *Journal of Medical Microbiology* v roce 2021 [111] prokázala, že TSB médium suplementované HP a třepání během inkubace vede ke zvýšené produkci stafylokokových biofilmů. Modifikace povrchu kolíčků neměla statisticky významný pozitivní dopad na produkci biofilmu SA a MRSA. Modifikace povrchu kolíčků s použitím FBS tvorbu biofilmů SA a MRSA dokonce inhibovala. Naopak statisticky významný pozitivní vliv na objem celkové biofilmové masy produkované voleným kmenem bakterie SE měla modifikace pomocí FBS a HP. Tyto výsledky zcela potvrzují navrhovanou hypotézu, že podmínky kultivace mají nezanedbatelný vliv na tvorbu celkové biomasy stafylokokových biofilmů. Zároveň může být konstatováno, že pro zajištění reprodukovatelného výsledku (robustnosti biofilmové masy) je nutné optimalizovat volbu kultivačních podmínek v souladu s konkrétními kmeny použitých mikroorganismů. V této práci byly využity kmeny bakteriální dostupné ve sbírkách. S využitím shodných kmenů proto mohou případné navazující studie vycházet právě z těchto poznatků.

Metodika vedoucí k tvorbě robustního biofilmu *in vitro* na kolíčcích uzavřeného biofilmového modelu s využitím výše popsaných bakteriálních kmenů byla optimalizována. Stafylokokové biofilmy vytvořené s využitím tohoto postupu jsou viditelné pouhým okem, jejich definující rysy lze vizualizovat epifluorescenční mikroskopií a jsou potenciálně využitelné v pokročilých studiích aktivity kandidátních látek cílených vůči stafylokokovým biofilmům. Výše popsaná metodika byla inspirací pro část práce autorů Vávrová *et al.*, 2024 odeslané do *npj Biofilms and Microbiomes* a pro diplomovou práci Mgr. Martiny Noskové „Hodnocení efektivity vybraných metodických přístupů za účelem disagregace stafylokokové biofilmové biomasy“ z roku 2022.

4.3. CÍL B

CHARAKTERIZACE (MIKRO)BIOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ NOVĚ SYNTETIZOVANÉHO CHLOROVANÉHO DERIVÁTU 2-AMINOOXAZOLU

4.3.1. Úvod

Zdroje potenciálních antimikrobních látek postupně vysychají, rozvoj AMR však nezpomaluje. Odborníci několika vědních oborů se vytrvale potýkají s nezastavitelným šířením „superbakterií“, MR mikroorganismů, které WHO považuje za globální problém ohrožující lidské zdraví. Výzkum a vývoj nových ATB je v současnosti namířen zejména proti bakteriím skupiny ESKAPE. Z nich byla nejvyšší priorita přidělena bakterii ACBA. Tento oportunní patogen uplatňuje celou škálu rezistenčních mechanismů v čele s produkcí odolných biofilmů a v posledních letech začíná projevovat svou odolnost též vůči rezervním ATB. Mezi taková se řadí i polymyxin E neboli CST. CST je ATB s úzkým spektrem účinku a baktericidním efektem cíleným na lipopolysacharidy ve vnější membráně Gram-negativních bakterií [136]. Tento "zázračný" lék však vykazuje poměrně vysokou toxicitu. V 80. letech 20. století proto zájem o něj poklesl ve prospěch méně toxických širokospektrých ATB [137]. V 90. letech 20. století však vedl prudký rozvoj AMR ke vzkříšení tohoto opomíjeného a nepříliš dobře popsáno léčiva v naději na uplatnění v boji proti MR Gram-negativním bakteriím [138, 139]. A bohužel, v současnosti jsou již zaznamenávány případy rozvoje AMR i vůči tomuto ATB poslední instance. Úspěšnost terapie s použitím CST je tedy v posledních letech podepřena kombinacími režimy a pozornost je upínána k vývoji nových „zázračných“ molekul [140-143].

Jak bylo zmíněno v kapitole 3.2.1. teoretické části této disertační práce, v rámci nových terapeutických přístupů mohou mít nemalý přínos adjuvantní látky. V kombinaci s vhodnou aktivní molekulou mohou zvýšit celkovou aktivitu, omezit případnou toxicitu, minimalizovat negativní účinky léčby, a dokonce minimalizovat

či zabránit vzniku AMR. Postupy kombinační terapie jsou dnes běžně využívány i v klinické praxi, zejména vůči MR bakteriím. Adjuvans je v takovém případě schopno ochránit či obnovit aktivitu antiinfekčních léčiv pomalu ztrácejících účinnost, což je výhodné zvláště u rezervních ATB, jako je právě CST, karbapenemy či TGC [144].

Cesta kandidátní látky ve výzkumu nových ATB je mnohdy přerušena již v počátečních fázích, a to z důvodu její nedostatečné stability nebo aktivity, vysoké toxicity, nízké rozpustnosti v hydrofilních rozpouštědlech či pro její nespecifickou reaktivitu. Výsadní postavení mezi strukturami s antimikrobním účinkem mají pětičetné heterocykly, thiazoly, specificky 2-aminothiazoly. Ale i ty, přes své široké uplatnění, mnohdy vykazují nepředvídatelné interakce [145-147]. Tyto nežádoucí reakce 2-aminothiazolů lze částečně optimalizovat výměnou heteroatomu síry za kyslík za vzniku 2-aminoxazolu. Recentní studie vyzdvihují, že podobnou reakcí se stabilizují fyzikálně-chemické vlastnosti těchto látek, jejich antimikrobní aktivita je však zachována, což bylo s využitím mykobakteriálních referenčních kmenů potvrzeno v práci Juhás *et al.* 2022, [148], která je pro tuto studii pilotní.

Pozornost této disertační práce, která na zmíněnou pilotní studii navazuje, je soustředěna na chlorovaný derivát 2-aminoxazolu (2-chlor-*N*-(oxazol-2-yl)isonikotinamid), značený AB15, který v úvodní studii patřil mezi látky s příznivými fyzikálně-chemickými a biologickými vlastnostmi a slibnou aktivitou vůči mykobakteriím. Na základě této skutečnosti a povzbudivých výsledků úvodního antibakteriálního screeningu bylo rozhodnuto podrobit antibakteriální a vybrané biologické vlastnosti látky AB15 podrobnějšímu studiu s cílem jejího využití ve formě samostatně stojícího antiinfektiva či jako adjuvantní látky v rámci kombinované terapie.

4.3.2. Pracovní hypotéza

Chlorovaný derivát 2-aminoxazolu 2-chlor-*N*-(oxazol-2-yl)isonikotinamid, AB15, projevilo příhodné fyzikálně-chemické i některé biologické vlastnosti, jako je nízká toxicita či slibná antimikrobní aktivita již ve výzkumu popsaném v publikaci Juhás *et al.* 2022 [148]. Záměrem této práce je proto potvrzení, že derivát AB15 může být uplatněn jako kandidátní AML na základě jeho biologických a specificky

antimikrobních vlastností, jakými jsou například aktivita vůči bakteriálním klinickým izolátům, adjuvantní účinek ke komerčním ATB či anti-biofilmová aktivita.

4.3.3. Metodika (Cíl B)

4.3.3.1. Příprava látky AB15

Postup syntézy derivátu 2-aminooxazolu, AB15, je popsán v publikaci Juhás *et al.*, 2022 [148]. Čistota látky byla ověřena pomocí nukleární magnetické rezonance, infračervené spektroskopie, hmotnostní spektroskopie s vysokým rozlišením a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Sloučenina dosahuje čistoty > 95 %.

4.3.3.2. Využití mikrobiální kmeny a kultivační média

Bakteriální kmeny

V rámci screeningu antimikrobní účinnosti AB15 bylo využito 8 referenčních bakteriálních kmenů pořízených z CCM nebo z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ). Jsou jimi:

- *Staphylococcus aureus* (SA, CCM 4223, ATCC 29213)
- meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA, CCM 4750, ATCC 43300)
- *Staphylococcus epidermidis* (SE, CCM 4418, ATCC 12228)
- *Enterococcus faecalis* (EF, CCM 4224, ATCC 29212)
- *Escherichia coli* (EC, CCM 3954, ATCC 25922)
- *Klebsiella pneumoniae* (KP, CCM 4415, ATCC 10031)
- *Acinetobacter baumannii* (ACBA, DSMZ 30007, ATCC 19606)
- *Pseudomonas aeruginosa* (PA, CCM 3955 ATCC 27853).

Před zahájením experimentu byly kryoprezervované bakteriální suspenze naočkovány na TSA (Himedia, Indie) a inkubovány při 37 °C po dobu 16 h v tmavém humidním prostředí.

Mykobakteriální kmeny

Do screeningu antimykobakteriální aktivity látky AB15 byly zařazeny referenční kmeny z DSMZ či z Belgické koordinované kolekce mikroorganismů (BCCM/ITM, Belgie) kultivované na kultivačním agaru a v bujónu Middlebrook 7H9 obohacném glycerolem a OADC suplementem (kyselina olejová, albumin, dextróza, kataláza, Himedia, Indie). Jmenovitě:

- Rychle rostoucí kmeny:
 - *Mycolicibacterium smegmatis* (DSMZ 43465, ATCC 607)
 - *Mycolicibacterium aurum* (DSMZ 43999, ATCC 23366)
- Atypické kmeny:
 - *Mycobacterium avium* (DSMZ 44156, ATCC 25291)
 - *Mycobacterium kansasii* (DSMZ 44162, ATCC 12478)
- Avirulentní kmen:
 - *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ITM M006710, ATCC 9431).

Fungální kmeny

Do screeningu antimikrobní aktivity bylo rovněž zařazeno 8 fungálních referenčních kmenů pořízených z CCM či ATCC, konkrétně:

- *Candida albicans* (CCM 8320, ATCC 24443)
- *Candida krusei* (CCM 8271, ATCC 6258)
- *Candida parapsilosis* (CCM 8260, ATCC 22019)
- *Candida tropicalis* (CCM 8264, ATCC 750)
- *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305)
- *Aspergillus flavus* (CCM 8363)
- *Lichtheimia corymbifera* (CCM 8077)
- *Trichophyton interdigitale* (CCM 8377, ATCC 9533).

Za účelem potvrzení antibakteriálního potenciálu látky AB15 byly do pokročilé studie dále zahrnuty klinické izoláty bakterií poskytnuté Ústavem klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové (ÚKM FNHK). Všechny tyto kmeny byly taxonomicky klasifikovány na základě biochemických testů a přístrojového vybavení MALDI-TOF (Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s detektorem doby letu, Microflex LH/SH MALDI-TOF, Bruker Biotyper 3.0 SW, Bruker Daltonic GmbH, Německo). Antibiogramy Gram-negativních bakteriálních kmenů byly zhotoveny na základě výsledků diskové difúzní metody či mikrodilučního testu v souladu s doporučeními EUCAST (Tabulka 4) [149, 150]. Kultivace bakterií byla prováděna v CAMHB (Merck, USA) při teplotě 35 ± 2 °C. Na základě výsledků screeningu antimikrobní aktivity látky AB15 bylo do studie zařazeno 12 klinických izolátů Gram-negativních bakterií.

Tabulka 4. Antibiogram vybraných klinických izolátů Gram-negativních bakterií.

Bakteriální kmen (ID č.)	Profil citlivosti/rezistence
<i>Proteus mirabilis</i> (12/21)	R: nitrofurantoin, trimetoprim, trimetoprim-sulfonamid, cefuroxim (axetil) orální, cefuroxim iv, mecilinam orální, ampicilin, cefotaxim, cefepim, ciprofloxacin, gentamicin, kolistin, tigecyklin; C/R: imipenem; C: amoxicilin-klavulanát, cefoxitin, ceftazidim, amikacin, piperacilin-tazobaktam, meropenem, ceftolozan-tazobaktam, ceftazidim-avibaktam, temocilin
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (14/21)	R: ampicilin, cefotaxim, amoxicilin, ceftazidim, cefepim, trimetoprim-sulfonamid, ciprofloxacin, piperacilin-tazobaktam; C: cefoxitin, gentamicin, amikacin, kolistin, imipenem, meropenem, ceftolozan-tazobaktam, ceftazidim-avibaktam, temocilin
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (15/21)	R: ampicilin, cefotaxim, amoxicilin-klavulanát, ceftazidim, cefepim, trimetoprim-sulfonamid, ciprofloxacin, piperacilin-tazobaktam; C: cefoxitin, gentamicin, amikacin, kolistin, imipenem, meropenem, ceftolozan-tazobaktam, ceftazidim-avibaktam, temocilin
<i>Enterobacter cloacae</i> (16/21)	R: trimetoprim, trimetoprim-sulfonamid, mecilinam, amoxicilin-klavulanát, ampicilin, cefoxitin, cefotaxim, ceftazidim, cefepim, ciprofloxacin, gentamicin, kolistin; C: amikacin, piperacilin-tazobaktam, imipenem, meropenem, ceftolozan-tazobaktam, ceftazidim-avibaktam, temocilin
<i>Acinetobacter baumannii</i> (59/16)	R: ampicilin, cefotaxim, amoxicilin-klavulanát, ertapenem; C: ciprofloxacin, imipenem, trimetoprim-sulfonamid, gentamicin, meropenem, amikacin
<i>Escherichia coli</i> (27/21)	R: ampicilin, cefotaxim, amoxicilin-klavulanát, cefepim, trimetoprim-sulfonamid, ciprofloxacin, piperacilin-tazobaktam; C/R: ceftazidim; C: cefoxitin, gentamicin, amikacin, kolistin, imipenem, meropenem, ceftolozan-tazobaktam, ceftazidim-avibaktam, imipenem-relebactam
<i>Acinetobacter baumannii</i> (20/21)	R: trimetoprim, cefuroxim iv, amoxicilin-klavulanát, ampicilin, cefuroxim-axetil, fosfomycin, cefotaxim, mecilinam; C/R: ciprofloxacin; C: amikacin, imipenem, meropenem, trimetoprim-sulfonamid, gentamicin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (21/21)	R: piperacilin-tazobaktam, imipenem, ciprofloxacin, ceftazidim, meropenem, levofloxacin, cefepim; C: amikacin, ceftolozan-tazobaktam, ceftazidim-avibaktam
<i>Enterobacter cloacae</i> (23/21)	R: trimetoprim, amoxicilin-klavulanát, ciprofloxacin, piperacilin-tazobaktam, trimetoprim-sulfonamid, ampicilin, ceftazidim, gentamicin, cefotaxim, cefepim; C: ceftolozan-tazobaktam, imipenem, ceftazidim-avibaktam, mecilinam, amikacin, meropenem, imipenem-relebactam
<i>Escherichia coli</i> (24/21)	R: trimetoprim, trimetoprim-sulfonamid, cefuroxim-axetil orální, cefuroxim iv, ampicilin, cefotaxim, ceftazidim, cefepim; C: nitrofurantoin, mecilinam, fosfomycin, amoxicilin-klavulanát, cefoxitin, ciprofloxacin, gentamicin, amikacin, piperacilin-tazobaktam, kolistin, imipenem, meropenem, ceftazidim-avibaktam, imipenem
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (26/21)	R: piperacilin-tazobaktam, ceftazidim, cefepim, imipenem, meropenem, amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, levofloxacin, ceftazidim-avibaktam; C: kolistin, aztreonam, fosfomycin
<i>Acinetobacter baumannii</i> (1/23)	R: ampicilin, cefotaxim, amoxicilin-klavulanát, ciprofloxacin, gentamicin, amikacin, imipenem, meropenem, fosfomycin; C: trimetoprim-sulfonamid, kolistin

ID č. – laboratorní identifikační číslo, R – rezistence, C/R – intermediární citlivost, C – citlivost.

4.3.3.3. Screening antimikrobní aktivity látky AB15

Screening antibakteriální aktivity

Ke studiu antibakteriální aktivity AB15 vůči referenčním kmenům bakterií byla využita mikrodiluční bujónová metoda odpovídající instrukcím EUCAST [149]. Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním studované látky v dimethylsulfoxidu (DMSO, Merck, USA). Cílová koncentrace DMSO v kultivačním médiu nepřesáhla 1 % (v/v) celkového složení roztoku a neovlivnila tak růst bakterií. Do esejí byly zapojeny jak pozitivní (výhradně bakterie v médiu), tak negativní (kultivační médium a DMSO) kontroly a vnitřní kontrola kvality, ATB ciprofloxacin (CIP, Merck, USA). Antibakteriální aktivita vyjádřená jako MIC v $\mu\text{g/ml}$ a μM byla hodnocena po 24, respektive 48 h statické inkubace v tmavém humidním prostředí při teplotě 35 ± 2 °C. MIC byla vyhodnocena vizuálně a prostřednictvím spektrofotometrického měření (530 nm, Synergy HTX Multi-Mode Microplate reader, BioTek, USA). Experimenty byly prováděny v duplikátu.

Screening antimykobakteriální aktivity

Vyhodnocení antimykobakteriální aktivity AB15 probíhalo rovněž s využitím mikrodiluční bujónové metody v 96-jamkové mikrotitrační destičce dle instrukcí EUCAST [151]. Mykobakterie byly kultivovány v bujónu Middlebrook 7H9 (Merck, USA) suplementovaném 0,4 % (v/v) glycerolu (Merck, USA) a 10 % (v/v) Middlebrook OADC růstového suplementu (Himedia, India). Suspenze počátečního inokula odpovídala hodnotě $\text{OD} = 1,0$ McFarland. Tato suspenze byla následně ředěna bujónem v poměru 1:20 (pro rychlerostoucí kmeny) nebo 1:10 (pro zbytek mykobakterií).

Studovaná látka byla rozpuštěna v DMSO, následně byl přidán Middlebrook 7H9 bujón (výsledná koncentrace média odpovídala $2000 \mu\text{g/ml}$). Do esejí byla zapojena vnitřní kontrola kvality CIP. Výsledná koncentrace DMSO v bujónu nepřesáhla 2,5 % (v/v) a neovlivnila tak růst mykobakterií. Pozitivní kontrola (bujón, DMSO a mykobakterie) a negativní kontrola (bujón a DMSO) byly zahrnuty v rámci eseje. Destičky byly zabezpečeny lepící fólií a staticky inkubovány v tmavém humidním prostředí při 35 ± 2 °C. Po 48 h v případě *Mycolicibacterium smegmatis*, 72 h u *Mycolicibacterium aurum*, 96 h u *Mycobacterium avium a kansasii* a 120 h

v případě *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra byl do jamek přidán 0,01% (v/v) roztok metabolického indikátoru AlamarBlue. Poté byly destičky dále kultivovány další 2,5 h v případě *Mycobacterium smegmatis*, 4 h v případě *Mycobacterium aurum*, 5-6 h v případě *Mycobacterium avium* a *kansasii* a 18 h v případě *Mycobacterium tuberculosis*. Antimykobakteriální aktivita byla následně hodnocena vizuálně a fluorimetricky s využitím metabolického indikátoru AlamarBlue (Thermo Fisher Scientific, USA, $\lambda_{\text{Ex}} = 528 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{Em}} = 585 \text{ nm}$).

Screening antifungální aktivity

Také screening antifungální aktivity derivátu AB15 probíhal v mikrodilučním uspořádání dle instrukcí EUCAST [152, 153]. Studovaná látka byla rozpuštěna v DMSO (Merck, USA) a ředěna dvojkovou ředící řadou v bujónu Rosewell Park Memorial Institute (RPMI-1640) s L-glutaminem suplementovaném 2 % glukózy (w/v) a upraveném na pH = 7,0 pomocí MOPS (3-(N-morfolino)-propansulfonová kyselina, Merck, USA). Výsledná koncentrace DMSO nepřesáhla 1 % celkového složení roztoku. Destičky byly kultivovány po dobu 24 a 48 h (72 a 120 h v případě dermatofyta *Trichophyton interdigitale*) při teplotě $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Do eseje byla zahrnuta pozitivní kontrola (pouze kvasinka/plíseň v médiu), negativní kontrola (pouze médium a DMSO) i vnitřní kontrola kvality (amfotericin B, vorikonazol). Výsledky screeningu byly hodnoceny vizuálně a prostřednictvím spektrofotometrického měření (530 nm, Synergy HTX Multi-Mode Microplate reader, BioTek, USA) a následně vyjádřeny jako MIC (μM). Experimenty byly prováděny v duplikátu.

4.3.3.4. Hodnocení aktivity látky AB15 vůči bakteriálním klinickým izolátům

Ke studiu antibakteriální aktivity látky AB15 vůči klinickým izolátům bakterií poskytnutých ÚKM FNHK s popsányými antibiogramy (Tabulka 4) byla využita mikrodiluční bujónová metoda odpovídající instrukcím EUCAST [149]. Zásobní roztok kandidátní látky AB15 byl připraven rozpuštěním látky v DMSO (Merck, USA). Výsledná koncentrace DMSO nepřesáhla 1 % (v/v) celkového složení roztoku v jamce a neovlivnila tak růst bakterií. V rámci eseje byly zařazeny jak pozitivní (bakterie v médiu), tak negativní kontroly (DMSO, médium) a též vnitřní kontrola kvality – ATB CIP (Merck, USA). Antibakteriální aktivita vyjádřená jako MIC (μM)

byla hodnocena po 24 hodinách statické inkubace v tmavém humidním prostředí při teplotě 35 ± 2 °C. K vyhodnocení MIC byla použita vizuální kontrola, spektrofotometrické měření (530 nm, Synergy HTX Multi-Mode Microplate reader, BioTek, USA) a fluorimetrické měření pomocí metabolického indikátoru AlamarBlue (Thermo Fisher Scientific, USA, $\lambda_{Ex} = 528$ nm a $\lambda_{Em} = 585$ nm).

4.3.3.5. Rozlišení baktericidního a bakteriostatického efektu látky AB15

K podrobnějšímu popisu aktivity AB15 byl využit klinický izolát bakterie ACBA značený 20/21. Ke stanovení MIC vůči tomuto kmeni byla nejprve využita mikrodiluční metoda s uspořádáním v 96-jamkové destičce. OD počátečního inokula odpovídala hodnotě 0,5 McFarland. Postup hodnocení MIC odpovídal metodice popsané v kapitole 4.3.3.3. K výpočtu jednotek tvořících kolonie (CFU) byla následně v experimentu využita metoda výsevu. Po 24hodinové inkubaci při teplotě 35 ± 2 °C byla odečtena MIC a z jamek, v nichž byla pozorována inhibice růstu, bylo odebráno 100 μ l objemu. Tyto vzorky byly následně ředěny pomocí desítkové ředící řady a znovu kultivovány na Mueller-Hinton agaru (MHA, Merck, USA) po dobu 24 h v humidním prostředí při teplotě 35 ± 2 °C. Obdobně byla též zpracována suspenze s počátečním inokulem odpovídajícím hodnotě OD = 0,5 McFarland. Po inkubaci byla vypočtena hodnota CFU/ml a vyhodnocena MBC AB15 (nejnižší koncentrace AB15, která vedla ke snížení CFU počátečního inokula o $\geq 99,9$ %). Látka s antibakteriální aktivitou se obvykle považuje za baktericidní, když platí: $MBC \leq 4 \times MIC$.

4.3.3.6. Určení makromolekulárního cíle AB15 s využitím makromolekulární biosyntetické eseje

V experimentu odhalujícím pravděpodobný buněčný cíl účinku látky AB15 byl využit referenční bakteriální kmen MRSA (ATCC 43300) kultivovaný na TSA (Merck, USA). Pracovní suspenze MRSA byla připravena v TSB (Himedia, Indie) a kultivována přes noc při 35 ± 2 °C. Pro přípravu kultury MRSA v logaritmické fázi růstu ($\approx 2 \times 10^7$ CFU/ml) bylo využito kompletně chemicky definovaného média pro sledování cesty syntézy proteinů s leucinem (Leu) připraveného dle studie Nowakowska *et al.*, 2013 [154]. Suspenze TSB byla těmito médii naředěna

v poměru 1 : 100 a kultivována dalších 5 h při 35 ± 2 °C. 900 μ l této suspenze bylo dále přeneseno do predehřátých skleněných zkumavek, do kterých byly též přidány všechny použité AML v koncentraci odpovídající čtyřnásobku MIC (vše Merck, USA). Jmenovitě:

- VAN = 8 μ g/ml
- RIF = 0,064 μ g/ml
- CIP = 1 μ g/ml
- Chloramfenikol (CHL) = 64 μ g/ml
- Chlorhexidin (CHX) = 4 μ g/ml
- AB15 = 56 μ g/mL

V experimentu byly zahrnuty též kontroly neexponované AML, do nichž byl přidán odpovídající objem DMSO (Merck, USA). Do příslušných zkumavek byly ihned přidány prekurzory značené [3 H] (vše Hartmann Analytics, Německo) a následovala další inkubace 2 h při 35 ± 2 °C. Konkrétní použité prekurzory:

- *N*-acetylglukosamin = 0,100 μ Ci/ml
- uridin = 1 μ Ci/ml
- thymidin = 1 μ Ci/ml
- Leu = 3 μ Ci/ml

Alikvoty o objemu 0,5 ml byly následně přeneseny do 2ml centrifugačních zkumavek s 1 ml ledové 10% kyseliny trichloroctové (TCA, Merck, USA). Zkumavky byly důkladně promíchány a přes noc uchovány na ledě pro usnadnění precipitace. Druhý den byly sraženiny promyty 0,5 ml 5% (v/v) TCA a 1,5M NaCl. Promývací krok byl následně zopakován s použitím 5% (v/v) TCA za účelem odstranění nenavázaných prekurzorů. Poté byly vzorky rozpuštěny v 0,5 ml roztoku 0,1% dodecylsíranu sodného a 0,1M NaOH vortexováním při laboratorní teplotě. Rozpuštěný obsah zkumavek byl následně přenesen do scintilační lahvičky a důkladně promíchán s 2 ml scintilačního koktejlu (Merck, USA). Radioaktivita inkorporovaných prekurzorů byla měřena v počtu impulsů za minutu (cpm) pomocí kapalinového scintilačního analyzátoru (TRI-CARB 2900TR, Perkin Elmer, USA) a výsledky byly vyjádřeny procenty vůči neexponované kontrole. Data byla analyzována pomocí testu ANOVA v softwaru GraphPrism 9.0 (GraphPad Software, Inc., USA).

4.3.3.7. Hodnocení schopnosti AB15 depolarizovat membránu bakterií

Při fluorimetrickém měření membránového potenciálu bylo využito potenciometrické fluorescenční sondy DiSC₃(5) za účelem detekce potenciálního depolarizačního efektu látky AB15 na cytoplazmatickou membránu referenční bakterie MRSA (ATCC 43300). Pro přípravu kultury MRSA v logaritmické fázi bylo využito médium CAMHB (Merck, USA). Po desetiminutové centrifugaci při 24 °C (10000 × g) a promývacích krocích byl referenční kmen resuspendován v 5 μM pufru N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonové kyselině (HEPES) s 5 μM glukózy (pH 7,2) a naředěn na OD = 0,5 McFarland. Následně byla přidána potenciometrická fluorescenční sonda DiSC₃(5) (výsledná koncentrace 0,5 μM) a proběhla inkubace po dobu 15 min, po níž byla suspenze přenesena do polystyrenové 96-jamkové destičky v objemu 200 μl na jamku. V úvodu měření bylo po dobu 10 min sledováno zhášení fluorescence ($\lambda_{\text{Ex}} = 620$, $\lambda_{\text{Em}} = 680$, Synergy HTX Multi-Mode Microplate reader, BioTek, USA), dokud nebylo dosaženo stabilní základní linie. Měření bylo provedeno v hexaplikátech. Jako pozitivní kontrola byl zvolen CHX o koncentraci 4 × MIC (Merck, USA). Negativní kontrola byla tvořena suspenzí bakterií v HEPES. Fluorescence byla průběžně hodnocena každou 1 min po dobu následujících 45 min.

4.3.3.8. Hodnocení *in vitro* cytotoxicity derivátu AB15 s využitím buněčné linie HK-2

Hodnocení *in vitro* cytotoxicity látky AB15 probíhalo pomocí kolorimetrického stanovení na Katedře biofyziky a fyzikální chemie FAF UK. V rámci experimentu bylo využito linie lidských epiteliálních buněk ledvin (HK-2, ATCC, USA) kultivovaných v Dulbecco's Modified Eagle's – high glucose médiu (Merck, USA) suplementovaném 10 % (v/v) FBS (Merck, USA) a 1 % (v/v) roztoku L-glutaminu (Merck, USA) při 37 °C v humidním prostředí v atmosféře s 5% obsahem CO₂.

24 h před zahájením experimentu byly buňky nasazeny do 96-jamkové mikrotitrační destičky v hustotě 10⁴ buněk na jamku. Další den byly buňky exponovány testovanou látkou AB15 v koncentraci 1-1000 μM. Do experimentu byly zařazeny kontroly tvořené 100 % životaschopných buněk, 0 % životaschopných

buněk (vystaveny působení 10% DMSO, Merck USA), médiem bez obsahu buněk a rozpouštědlem. V rámci eseje byly připraveny dvě analogické destičky s testovanou látkou AB15. Jedna destička byla inkubovaná po dobu 24 h a druhá 72 h při 37 °C v humidním prostředí v atmosféře s 5% obsahem CO₂. Po 24 h / 72 h bylo do destiček přidáno činidlo z komerčně dostupného kitu CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (CellTiter 96; PROMEGA, USA) a inkubace pokračovala další 2 h. Poté byla měřena absorbance vzorků při vlnové délce 490 nm (TECAN, Infinita M200, Rakousko). Standardní toxikologický parametr IC₅₀ byl následně vypočten s užitím programu GraphPad Prism verze 9.0 (GraphPad Software, Inc., USA).

4.3.3.9. Screening *in vivo* toxicity látky AB15 s využitím bezobratlého zvířecího modelu

Larvy bezobratlého zvířecího modelu, zavíječe voskového, *Galleria mellonella*, byly chovány přímo v mikrobiologické laboratoři Katedry biologických a lékařských věd FAF UK. Modelová zvířata byla krmena umělou stravou podle Haydak *et al.*, 1936 [155] a chována ve tmě při teplotě 29 °C. K podání látky AB15 byly vybrány pouze plně vitální krémově zbarvené larvy s hmotností v rozmezí 280 až 320 mg. Látka AB15 byla rozpuštěna v DMSO zředěném fosfátovým pufrůvacím roztokem (PBS) o pH 7,4 (oboje Merck, USA) na požadovanou pracovní koncentraci (výsledná koncentrace DMSO odpovídala 30 % v/v). Dávky podávané zvířatům dle příslušnosti ke skupině odpovídaly 500; 250; 50 a 5 mg/kg tělesné váhy larvy. Dávky AB15 byly podávány do hemocoelu vpichem Hamiltonovou stříkačkou do poslední levé panožky zvířete v celkovém objemu 10 µl na jednu larvu. Pro perorální způsob podání byly larvy imobilizovány chladem a testované roztoky jim byly podány do úst též Hamiltonovou stříkačkou. V každém experimentu byly zahrnuty dvě kontrolní skupiny, tedy kontrolní skupina bez expozice AB15 a kontrolní skupina s 30 % DMSO (v/v) v PBS. Larvy z exponovaných i kontrolních skupin byly poté inkubovány v Petriho miskách při 37 °C. Životaschopnost a zdravotní stav larev byly sledovány a zaznamenávány po dobu 24 h, 48 h, 72 h, 96 h a 120 h po podání látky AB15. Smrt byla definována jako úplná ztráta pohyblivosti, a to i po fyzické stimulaci plastovou pipetou. Mortalita byla vypočtena pro každou dávku v závislosti na čase.

S využitím programu GraphPad (GraphPad Prism verze 9.0 (GraphPad Software, Inc., USA) byly též sestaveny Kaplan-Meierovy křivky přežití.

4.3.3.10. Studium vlivu kombinace vybraných ATB a látky AB15 na antimikrobní aktivitu – Checkerboard studie

K hodnocení typu interakce mezi dvěma sloučeninami s antibakteriální aktivitou, tedy látkou AB15 a komerčně dostupnými ATB, byla využita tzv. Checkerboard studie. Experimenty byly prováděny v destičkách Honeycomb s uspořádáním 10 × 10 jamek (Oy Growth Curves, Finsko). Do kombinace s AB15 byla zvolena tato klinicky relevantní ATB:

- CIP (Merck, USA)
- Gentamicin (GEN, PanReac, AppliChem, USA)
- TGC (Acros Organics, Belgie)
- Trimetoprim/sulfamethoxazol (SXT, Merck, USA)
- CST (Cayman Chemical, USA)
- CHL (MP Biomedicals, USA)

Pro hodnocení antibakteriální aktivity sloučenin v kombinaci byl zvolen referenční kmen EC (ATCC 25922). Látka AB15 a ATB byly rozpuštěny v DMSO (Merck, USA) a následně ředěny v CAMHB (Merck, USA) dvojkovou ředící řadou na požadované koncentrace, tedy:

- | | |
|---------------------------|-----------------------|
| • AB15: 112-1,750 µg/ml | • SXT: 32-0,063 µg/ml |
| • CIP: 2,048-0,0004 µg/ml | • CST: 32-0,063 µg/ml |
| • GEN: 16-0,031 µg/ml | • CHL: 32-0,063 µg/ml |
| • TGC: 32-0,063 µg/ml | |

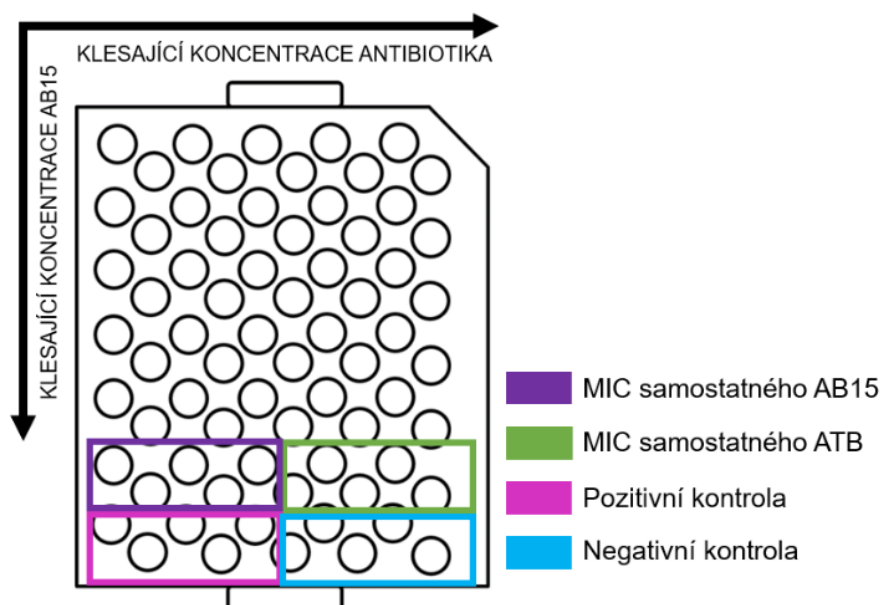
Výsledná koncentrace DMSO v kultivačním médiu nepřesáhla 1 % (v/v) a neovlivnila tak růst referenčního bakteriálního kmene. Dalším krokem byl přesun ředěných látek do Honeycomb destičky vždy v objemovém poměru 100 µl : 100 µl, (AB15 : ATB_{CIP/GEN/TGC/SXT/CST/CHL}). Roztoky AB15 o klesající koncentraci byly do destiček přenášeny ve vertikálním směru, vybraná ATB potom horizontálně (Obrázek 12). Každá jamka s finálním objemem 200 µl byla následně inokulována

10 µl suspenze referenčního bakteriálního kmene EC (ATCC 25922) o finální koncentraci počátečního inokula $\approx 5 \times 10^5$ CFU/ml. Každá destička též obsahovala pozitivní (pouze EC v médiu) a negativní (pouze CAMHB a DMSO) kontrolu (Obrázek 12). Inkubace Honeycomb destiček probíhala v přístroji Bioscreen C (Oy Growth Curves, Finsko) po dobu 20 h při 36,8 °C za kontinuálního měření OD při 580 nm každých 15 min. Poté byla vypočtena procentuální inhibice růstu bakterií ve srovnání s pozitivní kontrolou. Od všech naměřených hodnot byla odečtena OD pozadí. Pro hodnocení MIC byla též využita vizuální kontrola a metabolický indikátor AlamarBlue (Thermo Fisher Scientific, USA). K interpretaci výsledků studie byl využit FICI, vypočítaný dle vzorce: $FICI = FIC_{AB15} + FIC_{ATB}$, kde byly hodnoty FIC_{AB15} a FIC_{ATB} vyjádřeny jako:

$$FIC_{AB15} \text{ (nebo } FIC_{ATB}) = \frac{\text{MIC}_{AB15} \text{ (nebo } \text{MIC}_{ATB}) \text{ v kombinaci}}{\text{MIC}_{AB15} \text{ (nebo } \text{MIC}_{ATB}) \text{ samostatné látky}}$$

Výsledky FICI pak byly definovány následovně:

- $FICI \leq 0,5$ – synergický efekt
- $0,5 < FICI \leq 1$ – aditivní efekt
- $1 < FICI \leq 4$ – indiferentní efekt
- $FICI > 4$ – antagonistický efekt



Obrázek 12. Uspořádání Honeycomb destičky pro Checkerboard studii.

4.3.3.11. Screening aktivity AB15 vůči biofilmům tvořeným bakterií *Acinetobacter baumannii*

K hodnocení anti-biofilmové aktivity AB15, CST (Cayman Chemical, USA) a kombinace obou těchto sloučenin vůči klinickému izolátu ACBA (20/21) byla využita mikrodiluční biofilmová metoda. V médiu CAMHB (Merck, USA) suplementovaném 1 % glukózy (w/v) byla připravena suspenze ACBA (20/21) o koncentraci 10^8 CFU/ml. 200 μ l této suspenze bylo následně pipetováno do jamek polystyrenové mikrotitrační destičky s plochým dnem. Po 24 h statické inkubace ve tmě a humidním prostředí při teplotě 35 ± 2 °C byl supernatant z jamek odpipetován. Vytvořené biofilmy byly 3 \times promyty sterilním fyziologickým roztokem a ponechány na vzduchu k vysušení při laboratorní teplotě.

Zásobní roztoky kandidátní látky AB15 a CST byly připraveny v DMSO (Merck, USA) a následně ředěny CAMHB s výslednou koncentrací 1 % DMSO (v/v). Tyto roztoky, tedy látka AB15 v koncentračním rozmezí od 3,900 μ M do 2000 μ M a CST v koncentračním rozmezí od 0,054 μ M do 27,694 μ M, byly poté přidány v objemu 200 μ l na jamku k biofilmům předem vytvořeným v jamkách destičky (hodnocení anti-biofilmové aktivity samostatně působících látek).

Pro stanovení anti-biofilmové aktivity kombinace CST + AB15 byly k připraveným biofilmům pipetovány látky v koncentracích 7,815 μ M (AB15) + 0,108 μ M (CST) v rozmezí odpovídajícímu 1-128 \times násobku MIC této kombinace vůči planktonnímu klinickému izolátu bakterie ACBA (20/21) v objemu 100 + 100 μ l na jamku (poměr látek vyhodnocen v Checkerboard studii jako aditivní). Všechny vzorky byly připraveny v oktaplikátech. Do eseje byla též zařazena pozitivní kontrola odpovídající jamkám s biofilmy pouze s 200 μ l CAMHB, tedy bez expozice AML. Negativní kontrola obsahovala pouze CAMHB a DMSO. Takto připravené destičky byly poté inkubovány po dobu 24 h v tmavém humidním prostředí při teplotě 35 ± 2 °C.

Po uplynutí inkubační doby bylo 190 μ l supernatantu z destiček přemístěno do destiček čistých. Do každé z jamek byl poté pipetován indikátor metabolické aktivity AlamarBlue (Thermo Fisher Scientific, USA). Po 30 minutách inkubace při teplotě 35 ± 2 °C s pomalým třepáním byly destičky hodnoceny vizuálně a následně prostřednictvím fluorescenčního měření při $\lambda_{Ex} = 528$ nm a $\lambda_{Em} = 585$ nm v

destičkovém readeru (Synergy HTX Multi-mode reader, BioTek, USA). S využitím takto získaných dat byla stanovena MBIC, tedy minimální koncentrace testované látky či kombinace látek, při níž nebyly pozorovány známky metabolické aktivity planktonních bakterií uvolněných z biofilmu.

V rámci stanovení MBEC byly exponované biofilmy ACBA (20/21) 4 × promyty sterilním fyziologickým roztokem. Dále bylo do každé jamky k biofilmu pipetováno 200 µl média CAMHB a destičky byly vystaveny dvěma cyklům pětiminutové sonikace střídané intenzivním třepáním. Po těchto krocích byl i k vytvořeným biofilmům přidán indikátor metabolické aktivity AlamarBlue a následovala 1 h inkubace při 35 ± 2 °C. Poté byla opět hodnocena metabolická aktivita bakterií tvořících biofilm, a to jak vizuálním odečtem, tak měřením fluorescence při $\lambda_{Ex} = 528$ nm a $\lambda_{Em} = 585$ nm v multidetekčním readeru (Synergy HTX Multi-mode reader, BioTek, USA). MBEC byla definována jako minimální koncentrace testované látky či kombinace látek, která způsobila metabolickou inaktivaci buněk přítomných v biofilmu.

4.3.3.12. Hodnocení cytotoxicity *ex vivo* vůči lidským erytrocytům

Vzorky krve získané od dobrovolných dárců byly zcentrifugovány (1000 × g, 10 min), supernatanty byly poté dekantovány a buněčné pelety 3 × promyty Hartmannovým roztokem. Promyté pelety byly následně zředěny 1:7 (v/v) Hartmannovým roztokem a 500 µl této suspenze bylo inkubováno s CST (Cayman Chemical, USA) a CST + AB15 ve výsledných koncentracích odpovídajících nejvyšší naměřené MBIC (MBIC samostatného CST a MBIC kombinace CST + AB15) po dobu 1 h při 35 ± 2 °C. Po hodině inkubace proběhla centrifugace suspenzí buněk, supernatant byl opatrně odpipetován a poté byla měřena absorbance uvolněného hemoglobinu při 405 nm pomocí spektrofotometru (Synergy HTX Multi-mode reader, BioTek, USA). Negativní kontrolu tvořil samotný Hartmannův roztok a pozitivní kontrolu zastupoval supernatant získaný po lyzi erytrocytů ultrasonickou jehlou Ultrasonic Processor UP100H (Hielscher Ultrasonic, Germany) po dobu 1 min.

4.3.3.13. Statistická analýza

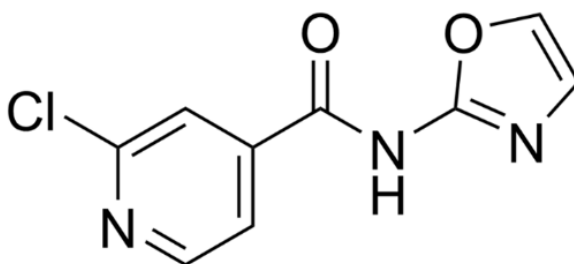
Statistická analýza dat získaných v této studii byla vypracována s využitím programu GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., USA). Data z makromolekulární biosyntetické eseje, měření membránového potenciálu a hodnocení anti-biofilmové aktivity byla analyzována testem ANOVA. Za statisticky významnou byla přijata hodnota $p < 0,05$. Výsledky jsou uvedeny jako průměry naměřených dat \pm standardní chyba průměru (SEM).

Screening *in vivo* toxicity zahrnoval 78 jedinců modelových zvířat. Ke způsobu podání do hemocoelu bylo využito 48 zvířat ($n=8$). Pro perorální podání bylo vybráno 30 jedinců ($n=5$). Data byla analyzována pomocí log-rank Mantel-Cox testu a Mantel-Haenszel párového srovnávacího testu. Za statisticky významnou byla přijata hodnota $p < 0,05$.

4.3.4. Výsledky a diskuze

4.3.4.1. Relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti chlorovaného derivátu AB15

V nedávno publikované studii vypracované kolektivem autorů, Juhás *et al.*, 2022 [148], byly zkoumány fyzikálně-chemické a některé biologické vlastnosti řady substituovaných *N*-oxazolyl a *N*-thiazolylkarboxamidů. Výsledky práce vedly k závěru, že sloučeniny obsahující oxazolový heterocykl mají v tomto směru příznivější potenciál odpovídající vlastnostem kandidátní AML, tedy dostatečnou rozpustnost, stabilitu, nízkou cytotoxicitu a slibnou antibakteriální aktivitu hodnocenou předběžným screeningem. Pro tyto důvody byl ze skupiny hodnocených derivátů vybrán zástupce AB15, 2-chlor-*N*-(oxazol-2-yl)isonikotinamid, (Obrázek 13) pro další studium.



Obrázek 13. Chemická struktura derivátu 2-chlor-*N*-(oxazol-2-yl)isonikotinamidu (AB15).

V rámci hodnocení všech zvolených fyzikálně-chemických a farmakokinetických parametrů bylo prokázáno, že derivát AB15 splňuje kritéria kandidátní AML [148]. Literární rešerší byla navíc prověřena antimikrobní aktivita strukturně podobných sloučenin [156-160]. Žádná ze strukturně analogických látek však prozatím nebyla podrobně studována z hlediska specificky anti-biofilmové aktivity.

4.3.4.2. Screening antimikrobní aktivity AB15 s využitím sbírkových referenčních kmenů

Na základě screeningu antimikrobní aktivity kandidátní látky AB15 publikovaného též v práci Juhás *et al.*, 2022 [148] byl s využitím 4 Gram-pozitivních a 4 Gram-negativních referenčních kmenů prokázán slibný antibakteriální potenciál AB15 vůči MRSA (ATCC 43300; MIC = 62,500 μ M), SE (ATCC1228; MIC = 62,500 μ M), EC (ATCC 25922; MIC = 62,500 μ M) a ACBA (ATCC 19606; MIC = 62,500 μ M) (Tabulka 5).

AB15 též vykazuje antimykobakteriální aktivitu v koncentračním rozmezí MIC = 13,951-27,902 μ M vůči celé řadě mykobakterií (*Mycolicibacterium smegmatis* (ATCC 607), *Mycolicibacterium aurum* (ATCC 23366), *Mycobacterium avium* (ATCC 25291), *Mycobacterium kansasii* (ATCC 12478), *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ATCC 9431), *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) (Tabulka 6). Hodnocení antimykobakteriální aktivity bylo provedeno ve spolupráci s PharmDr. Ondřejem Jandourkem, Ph.D.

Nejvyšší antifungální aktivitu vykazuje v rámci testovaného koncentračního rozmezí kandidátní látka AB15 vůči referenční kvasince *Candida albicans* (ATCC 2443), odpovídající MIC = 31,250 μ M a vláknité houbě *Lichtheimia corymbifera* (CCM 8077), odpovídající MIC = 62,500 μ M (Tabulka 7).

Slibné výsledky screeningu antimikrobního potenciálu derivátu AB15 byly premisou širšího spektra účinku AB15 a vedly k jeho zapojení do navazujícího výzkumu dalších antimikrobních vlastností.

Tabulka 5. Přehled antibakteriální aktivity látky AB15 vůči vybraným sbírkovým kmenům Gram-positivních a Gram-negativních bakterií. V eseji bylo užito mikrodiluční bujónové metody dle doporučení EUCAST [149]. MIC byla hodnocena vizuální inspekcí a spektrofotometricky při vlnové délce 530 nm po 24 h a 48 h inkubace při teplotě 35 ± 2 °C. Data publikována v práci *Juhás et al.*, 2022 [148].

Bakteriální kmen (sbírkové číslo dle ATCC)	MIC AB15 (μM)	MIC CIP (μM)
	24 h / 48 h	24 h
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	250 / 250	0,768
<i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA (ATCC 43300)	62,500 / 62,500	0,384
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	62,500 / 250	0,768
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	500 / 500	3,072
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	62,500 / 250	0,024
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	125 / 250	0,192
<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC 19606)	62,500 / 125	1,536
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	> 500 / > 500	1,536

ATCC – Americká sbírka kultur, MIC – minimální inhibiční koncentrace, CIP – ciprofloxacin, MRSA – meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*.

Tabulka 6. Přehled antibakteriální aktivity látky AB15 vůči vybraným kmenům mykobakterií. V eseji bylo užito mikrodiluční bujónové metody dle doporučení EUCAST [151]. MIC byla hodnocena vizuální inspekcí a fluorimetricky s využitím metabolického indikátoru AlamarBlue ($\lambda_{Ex} = 528 \text{ nm}$ a $\lambda_{Em} = 585 \text{ nm}$) po 48 h až 120 h (dle použitého kmene) při teplotě $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Data publikována v práci *Juhás et al.*, 2022 [148].

Bakteriální kmen (sbírkové číslo dle ATCC)	MIC AB15 (μM)	MIC CIP (μM)
	48 h - 120 h	48 h - 120 h
<i>Mycolicibacterium smegmatis</i> (ATCC 607)	27,902	0,384
<i>Mycolicibacterium aurum</i> (ATCC 23366)	13,951	0,048
<i>Mycobacterium avium</i> (ATCC 25291)	13,951	0,768-1,536
<i>Mycobacterium kansasii</i> (ATCC 12478)	13,951	0,768
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra (ATCC 9431)	13,951	0,768
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (ATCC 27294)	27,902	0,768

ATCC – Americká sbírka kultur, MIC – minimální inhibiční koncentrace, CIP – ciprofloxacin.

Tabulka 7. Přehled antifungální aktivity látky AB15 vůči vybraným mykotickým sbírkovým kmenům. V eseji bylo užito mikrodiluční bujónové metody dle doporučení EUCAST [152, 153]. MIC byla hodnocena vizuální inspekci a spektrofotometricky při vlnové délce 530 nm po 24 h a 48 h inkubaci (72 h a 120 h v případě *Trichophyton interdigitale*) při teplotě 35 ± 2 °C. Data publikována v práci Juhás et al., 2022 [148].

Mykotický kmen (sbírkové číslo dle ATCC)	MIC AB15 (µM)	MIC	MIC
	24 h / 48 h (72 h / 120 h)	AMFOTERICIN B (µM) 24 h / 48 h (72 h / 120 h)	VORIKONAZOL (µM) 24 h / 48 h (72 h / 120 h)
<i>Candida albicans</i> (ATCC 2443)	31,250 / 62,500	1,082	> 45,806
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6258)	250 / 500	1,082	> 45,806
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	250 / 250	0,541	> 45,806
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 750)	500 / 500	1,082	> 45,806
<i>Aspergillus fumigatus</i> (ATCC 204305)	125 / 125	4,329	2,863
<i>Aspergillus flavus</i> (CCM 8363)	500 / 500	4,329	> 45,806
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (CCM 8077)	62,500 / 125	1,082	> 45,806
<i>Trichophyton interdigitale</i> (ATCC 953)	125 / 125	1,082	> 45,806

ATCC – Americká sbírka kultur, MIC – minimální inhibiční koncentrace, CCM – Česká sbírka mikroorganismů.

4.3.4.3. Aktivita látky AB15 vůči bakteriálním klinickým izolátům

Na základě výše uvedených výsledků screeningu antibakteriální aktivity látky AB15 byly do navazující studie zařazeny 4 kmeny Gram-pozitivních a 12 kmenů Gram-negativních klinicky významných bakterií izolovaných z klinického materiálu na ÚKM FNHK.

Aktivita AB15 vůči 4 vybraným Gram-pozitivním kokům, včetně těch s vankomycin-rezistentním profilem, kolísala od 62,500 do 250 μM a je shrnuta v Tabulce 8.

Do studie antibakteriálního účinku vůči Gram-negativním bakteriím byly preferenčně voleny MR kmeny řazené do skupiny patogenů ESKAPE. Antibiogramy zařazených kmenů jsou rozepsány v Tabulce 4. MIC AB15 vůči těmto kmenům se pohybovala v širokém rozmezí od 15,625 do $> 500 \mu\text{M}$. Nejnižší MIC AB15 však byla prokázána vůči kmenu ACBA (20/21) izolovanému ze vzorku moči. Výsledky aktivity AB15 vůči ACBA i dalším Gram-negativním klinickým izolátům jsou shrnuty v Tabulce 9.

Bakterie ACBA je řazena na první místo seznamu prioritních MR patogenů, proto byl postup další práce motivován právě výše zmíněným výsledkem. Na základě získaných dat bylo rozhodnuto pokračovat v komplexnějším popisu dalších antibakteriálních vlastností derivátu AB15, ve snaze ověřit jeho charakter jakožto potenciální adjuvantní látky a zhodnotit jeho možné uplatnění v kombinační terapii. Rozhodnutí potvrdila též rešerše v literatuře. Například autoři Trush *et al.*, 2020 odhalili aktivitu oxazolů vůči MR ACBA ve své nedávno publikované práci [161].

Tabulka 8. Antibakteriální aktivita látky AB15 vůči klinickým izolátům Gram-pozitivních bakterií. Do eseje byla rovněž zahrnuta vnitřní kontrola kvality ve formě referenční bakterie *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) a standard ciprofloxacin. Antibakteriální aktivita byla hodnocena mikrodiluční bujónovou metodou v souladu s instrukcemi EUCAST [149]. MIC byla hodnocena vizuálně, spektrofotometricky při vlnové délce 530 nm a fluorimetricky s využitím metabolického indikátoru AlamarBlue ($\lambda_{Ex} = 528 \text{ nm}$ a $\lambda_{Em} = 585 \text{ nm}$) po 24 h inkubace při teplotě $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Bakteriální kmen (ATCC/ID č.)	Klinický původ	MIC AB15 (μM)	MIC CIP (μM)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	Referenční kmen	125-250	0,768
Meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (131/16)	Stěr z krku	250	> 6,181
Vankomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (SZÚ)	ND	125-250	0,768
<i>Staphylococcus capitis</i> (9/21)	ND	62,500-125	0,768
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (11/21)	ND	250	> 6,181

ATCC – Americká sbírka kultur, ID č. – laboratorní identifikační číslo, MIC – minimální inhibiční koncentrace, CIP – ciprofloxacin, ND – neurčeno, SZÚ – Státní zdravotní ústav.

Tabulka 9. Antibakteriální aktivita látky AB15 vůči klinickým izolátům Gram-negativních bakterií. Do eseje byla rovněž zahrnuta vnitřní kontrola kvality ve formě referenční bakterie *Escherichia coli* (ATCC 25922) a standard ciprofloxacin. Antibakteriální aktivita byla hodnocena mikrodiluční bujónovou metodou v souladu s instrukcemi EUCAST [149]. MIC byla hodnocena vizuálně, spektrofotometricky při vlnové délce 530 nm a fluorimetricky s využitím metabolického indikátoru ($\lambda_{Ex} = 528$ nm a $\lambda_{Em} = 585$ nm) a po 24 h inkubace při teplotě 35 ± 2 °C.

Bakteriální kmen (ATCC / ID č.)	Klinický původ	MIC AB15 (μ M)	MIC CIP (μ M)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Referenční kmen	31,250-125	0,012
<i>Proteus mirabilis</i> (12/21)	Moč	31,250-125	> 6,181
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (14/21)	Rektum	31,250-125	3,091
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (15/21)	Rektum	31,250-125	3,091
<i>Enterobacter cloacae</i> (16/21)	Moč	31,250-125	> 6,181
<i>Acinetobacter baumannii</i> (59/16)	Tracheální aspirát	31,250-62,500	0,193
<i>Escherichia coli</i> (27/21)	Stolice	31,250-62,500	> 6,181
<i>Acinetobacter baumannii</i> (20/21)	Moč	15,625-62,500	0,386
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (21/21)	Rektum	500	> 6,181
<i>Enterobacter cloacae</i> (23/21)	Moč	31,250-62,500	6,181
<i>Escherichia coli</i> (24/21)	Močový katétr	31,250-62,500	0,048
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (26/21)	Hrtan	> 500	> 6,181
<i>Acinetobacter baumannii</i> (1/23)	Tracheální aspirát	31,250	> 6,181

ATCC – Americká sbírka kultur, ID č. – laboratorní identifikační číslo, MIC – minimální inhibiční koncentrace, CIP – ciprofloxacin.

4.3.4.4. Baktericidní účinek látky AB15

Cílem další fáze výzkumu antibakteriální aktivity látky AB15 bylo charakterizovat její účinek na buňky mikroobů v závislosti na koncentraci. Ten lze částečně odvodit z výsledků screeningu antibakteriální aktivity AB15. ATB, která působí na bakterii cidně, tedy buňku usmrtí, totiž vykazují jen mírný posun své aktivity v čase. Jak je zjevné z Tabulky 5, MIC referenčního kmene ACBA (ATCC 19609) se po 48 h inkubace, v porovnání s výsledky po 24 h, změnila pouze o rozdíl právě jedné jamky.

Předpoklad byl potvrzen navazujícím experimentem s využitím MR klinického izolátu ACBA (20/21), v němž byla použita mikrodiluční bujónová metoda s následným výsevem na kultivační půdu. Pokles CFU/ml klinického izolátu ACBA (20/21) po expozici látkou AB15 o koncentraci $4 \times \text{MIC}$ odpovídal procentuální redukci inokula o 99,983-99,984 % ve srovnání s CFU/ml počátečního inokula. Na základně platného kritéria $\text{MBC} \leq 4 \times \text{MIC}$ lze tedy AB15 označit za látku s baktericidním antibakteriálním účinkem. Cidní účinek thiazolové sloučeniny vůči MR Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím byl v nedávné době odhalen též autory Haroun *et al.*, 2021 [162]. Zdá se však, že tento efekt nebyl doposud studován u derivátů oxazolu. Dle studie Azzali *et al.*, 2020 [145] lze však předpokládat, že aktivita 2-aminooxazolů si zachová obdobný účinek ve srovnání s adekvátními 2-aminothiazolovými protiklady.

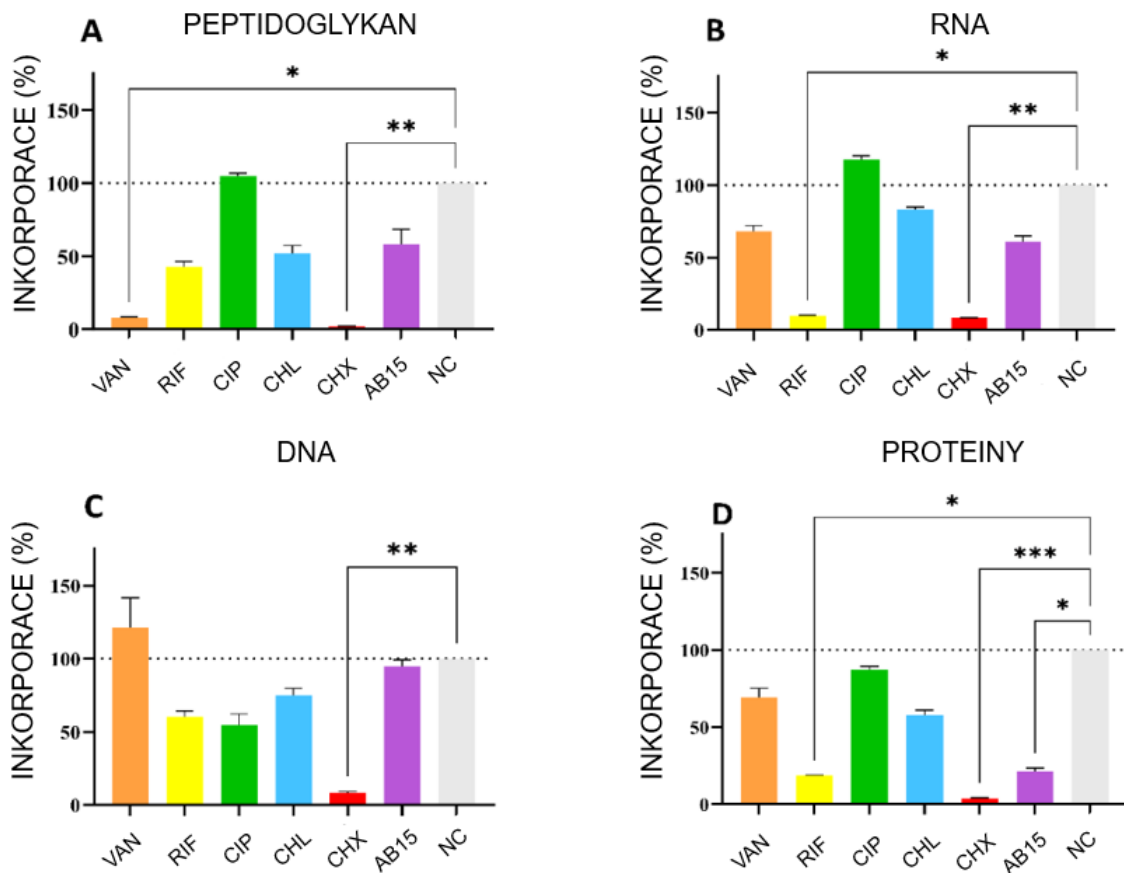
4.3.4.5. Určení mechanismu účinku látky AB15

Dalším logickým krokem v procesu charakterizace účinků látky AB15 je určení jejího pravděpodobného buněčného cíle. Jak již bylo zmíněno, v kombinační terapii je s výhodou užíváno látek s odlišnými mechanismy účinku. Působení více AML ve zvolené kombinaci tak, aby každá z nich cílila na více buněčných struktur, může vést ke snížení účinné koncentrace látek v kombinaci v porovnání s jejich samostatnou MIC.

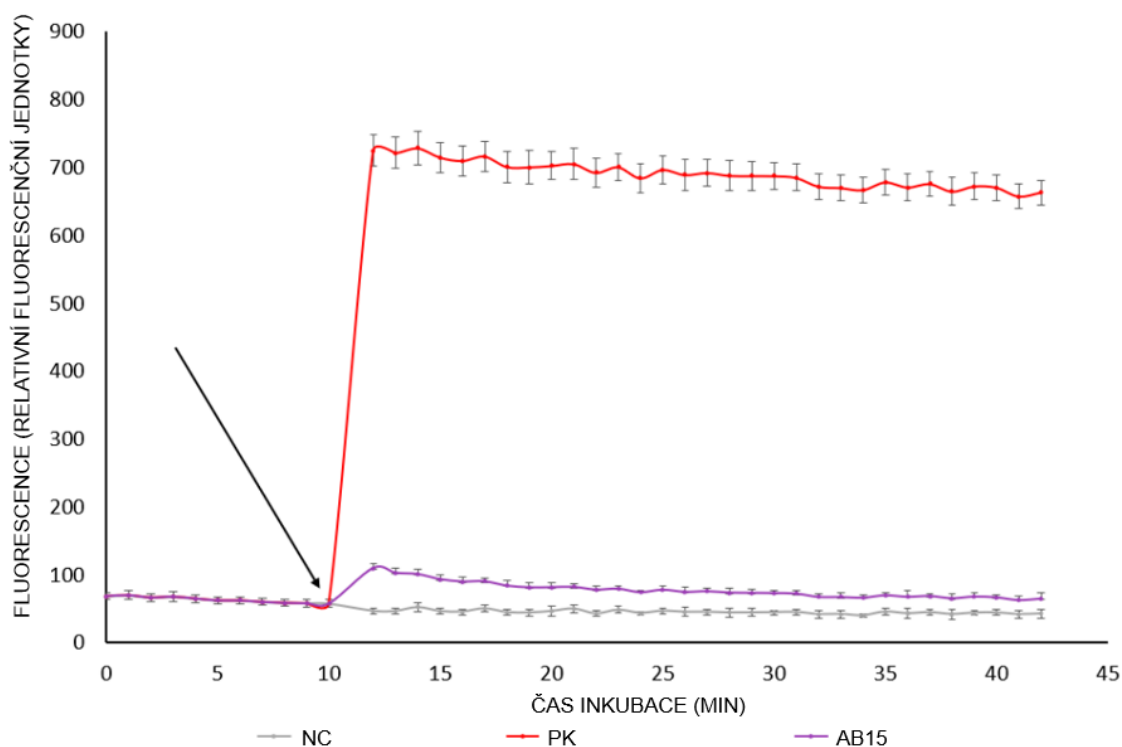
Ke zjištění buněčného cíle látky AB15 byla využita makromolekulární biosyntetická esej, jež byla provedena dle postupu popsaného například v práci Nowakowska *et al.*, 2013 [154] s drobnými úpravami. Pravděpodobný

mechanismus účinku byl studován prostřednictvím metody založené na expozici bakteriálních buněk látkou AB15 a na následném odečtu procentuálního zastoupení radioaktivně značených prekurzorů inkorporovaných do nově syntetizovaných biomolekul. V experimentu byl využit referenční kmen MRSA (ATCC 43300) a 4 makromolekuly zapojené do čtyř různých biosyntetických drah, tedy potenciálních cílů účinku látky AB15. Konkrétně jimi byly *N*-acetylglukosamin zapojený v syntéze peptidoglykanu, uridin pro syntézu RNA, thymidin pro tvorbu DNA a Leu jakožto součást biosyntézy proteinů. Do experimentu bylo rovněž zahrnuto 5 standardů se známým mechanismem účinku, jmenovitě VAN (syntéza peptidoglykanu), RIF (syntéza RNA), CIP (syntéza DNA), CHL (syntéza proteinů) a též CHX jako pozitivní kontrola. Výsledky (Obrázek 14) byly odečítány na základě radioaktivity měřené jako cpm pomocí kapalinového scintilačního detektoru TRI-CARB 2900TR (Perkin Elmer, USA) a následně porovnávány s negativní kontrolou (MRSA bez antibakteriální látky).

K vyhodnocení cytoplazmatické membrány, jakožto potenciálního cíle účinku látky AB15, bylo využito membránové depolarizační eseje (Obrázek 15). Stanovení proběhlo s pomocí potenciometrické fluorescenční sondy DiSC₃(5) a pozitivní kontroly CHX. Metoda byla vyhodnocena fluorimetricky. Charakterizace makromolekulárního cíle účinku látky AB15 probíhala ve spolupráci s RNDr. Klárou Konečnou, Ph.D. a PharmDr. Ondřejem Jandourkem, Ph.D.



Obrázek 14. Výsledky makromolekulární biosyntetické eseje. Inhibice biosyntetické dráhy kmene *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC 43300) je dána nižší mírou inkorporace radioaktivně značených prekurzorů. **A.** [^3H] N-acetylglukosaminu, **B.** [^3H] uridinu, **C.** [^3H] thymidinu a **D.** [^3H] leucinu. Bakteriální kmen byl exponován $4 \times \text{MIC}$ VAN, RIF, CIP, CHL, CHX a AB15 po dobu 2 h. Výsledky jsou vyjádřeny jako procentuální snížení inkorporace radioaktivně značených prekurzorů do nových makromolekul v porovnání s pozitivní kontrolou (bez expozice antimikrobní látkou). Uvedené hodnoty jsou průměry dvou nezávislých měření \pm SEM. Hodnota p značí statisticky významnou redukci v biosyntéze v porovnání s kontrolou. Experiment hodnocen testem ANOVA (Kruskal-Wallisův test. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$. VAN – vankomycin, RIF – rifampicin, CIP – ciprofloxacin, CHL – chloramfenikol, CHX – chlorhexidin, NC – negativní kontrola.



Obrázek 15. Výsledky membránové depolarizační eseje. Membránový potenciál byl monitorován s využitím potenciometrické fluorescenční sondy DiSC₃(5) ($\lambda_{Ex} = 620$, $\lambda_{Em} = 680$). Do eseje byl zapojen referenční kmen meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*. Po 10 minutách měření (černá šipka) byly přidány sloučeniny AB15 a pozitivní kontrola (chlorhexidin) v koncentracích odpovídajících $4 \times MIC$. Graf zahrnuje průměr dat v hexaplikátech $\pm SEM$. NC – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola.

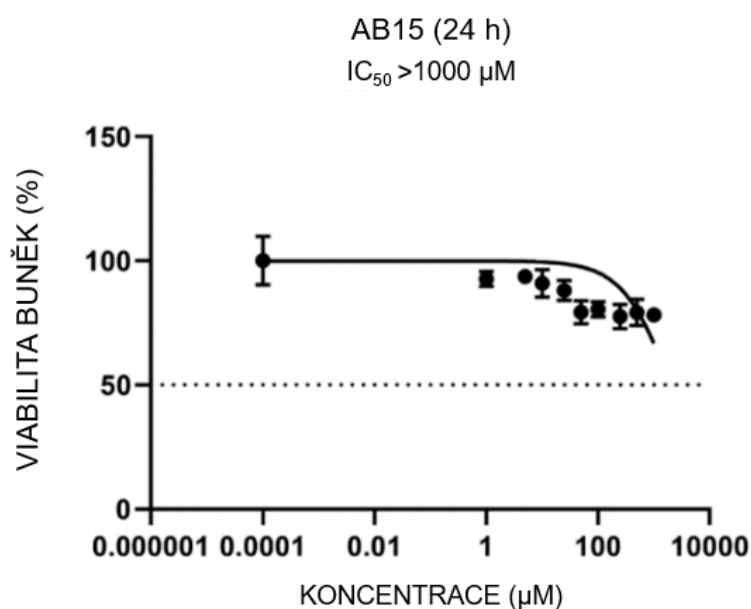
Na základě výsledků výše popsanych experimentů lze jako pravděpodobný mechanismus účinku derivátu AB15 navrhnout inhibici proteosyntézy. Působení derivátu AB15 vedlo totiž ke statisticky signifikantnímu poklesu inkorporace radioaktivně značeného prekurzoru právě biosyntézy proteinů (Obrázek 14D). Zjednodušeně řečeno, v případě působení derivátu AB15 na buňku bakterie je ovlivňována obdobná biosyntetická cesta, jako je tomu v případě použití ATB ze skupin aminoglykosidů, makrolidů či oxazolidinonů. Obrázek 15 též demonstruje, že v porovnání s negativní kontrolou došlo působením látky AB15 jen k drobné membránové depolarizaci. Náboj membrány bakterií, a tedy její propustnost, naopak ovlivňují ATB ze skupiny polymyxinů [163]. Na základě předpokladu, že je v antimikrobní kombinační terapii prioritně využíváno společného efektu látek s rozdílným mechanismem účinku, nabízí se AB15 jako kandidátní látka aplikovatelná v kombinaci, mimo jiné, právě s polymyxiny, například s CST.

V případě, že bude samotná látka AB15 vykazovat nízký cytotoxický potenciál, nabízí se též hypotéza, že by volba kombinace s polymyxiny zmírnila jejich nežádoucí účinky způsobené interakcí s lipoproteiny v membránách eukaryotních buněk (tzv. „teorie detergentu“) [164].

4.3.4.6. Toxicita látky AB15

Jak již bylo zmíněno, sloučenina může být definována jako kandidátní AML či adjuvans pouze za předpokladu nízké toxicity vůči eukaryotním buňkám. V práci Juhás *et al.*, 2022 [148] byl popsán zanedbatelný cytotoxický efekt derivátu AB15 vůči buněčné linii hepatocelulárního karcinomu, tedy HepG2 buňkám. Toxikologický parametr, IC_{50} , odpovídal hodnotě 664,100 μM . S cílem potvrdit nízkou toxicitu kandidátní látky bylo do této studie zahrnuto rovněž *in vitro* hodnocení cytotoxicity AB15 vůči nenádorové buněčné linii lidských ledvin (HK-2) a *in vivo* toxicity s využitím bezobratlého zvířecího modelového organismu, larvy *Galleria mellonella*.

Jak je zřejmé z Obrázku 16, parametr IC_{50} přesahuje hodnotu 1000 μM . Výsledkem hodnocení tedy je, že látka AB15 nevykazuje vůči buněčné linii HK-2 cytotoxický efekt.



Obrázek 16. Hodnocení cytotoxicity látky AB15 *in vitro* vůči buněčné linii HK-2. Cytotoxický efekt je vyjádřen jako IC_{50} , tedy jako koncentrace AB15, která vyvolala cytotoxický efekt u 50 % buněk. Parametr IC_{50} byl vypočten s využitím programu GraphPad Prism verze 9.0 (GraphPad Software, Inc., USA).

K hodnocení bezpečnosti látky může sloužit i výše zmíněná veličina SI. SI je vypočten jako poměr IC_{50} a MIC. Látky s $SI > 10$ jsou považovány za vhodné kandidáty pro zařazení mezi léčivé látky, jelikož jsou účinné a zároveň bezpečné. Hodnocením cytotoxicity s využitím HK-2 buněk dosáhla kandidátní látka rozmezí SI od > 64 do > 16 (MIC vůči ACBA (20/21)). Hodnocení cytotoxicity bylo provedeno na Katedře biofyziky a fyzikální chemie FAF UK.

K posouzení *in vivo* toxicity derivátu AB15 bylo využito alternativního modelového organismu, larvy *Galleria mellonella*. Použití tohoto bezobratlého modelu je zcela adekvátním alternativním přístupem v rámci studia toxikologických i farmakologických vlastností kandidátních látek, a navíc splňuje podmínky 3R (více v kapitole 3.5.2.3. teoretické části) [87-89].

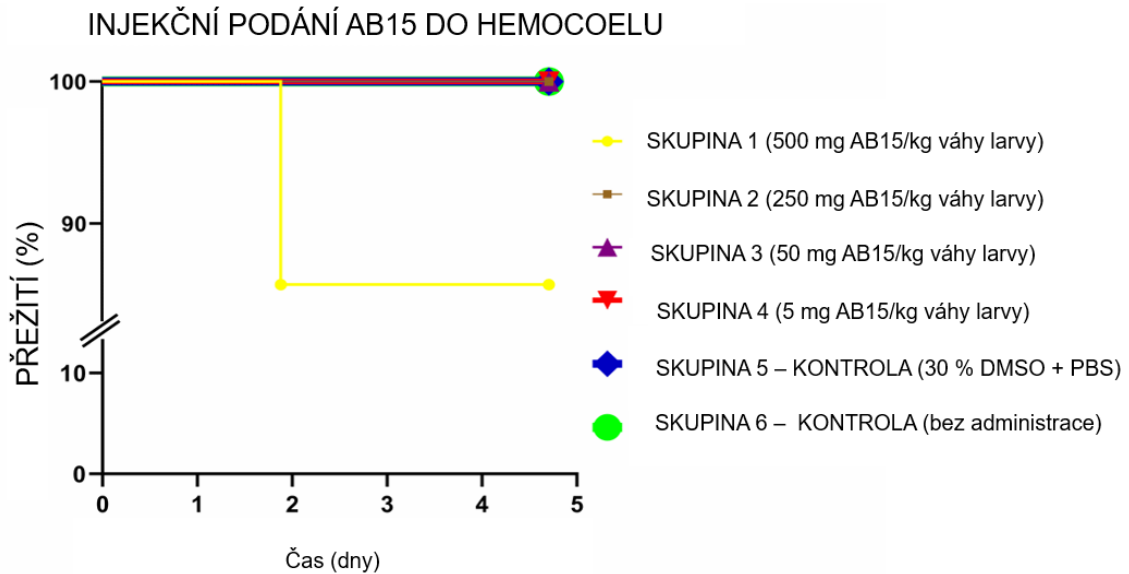
Larvy byly rozděleny do skupin dle hmotnosti podávané látky na kg hmotnosti zvířete (5-500 mg AB15/kg). Kandidátní látka byla podávána dvěma způsoby, tedy injekčně skrze poslední levou panožku do hemocoelu a perorálně. Do eseje byla rovněž zahrnuta kontrolní skupina (30 % DMSO + PBS) a kontrolní skupina (bez jakéhokoliv podání).

Obrázek 17 a Tabulka 10 shrnují výsledky po injekčním podání látky AB15 do hemocoelu. Střední letální dávka (LD_{50}), neboli dávka způsobující smrt 50 % modelových zvířat, nebyla dosažena po podání žádné z dávek AB15. Toxická dávka AB15 *in vivo* po injekčním podání do hemocoelu je proto > 500 mg AB15/kg. Nejvyšší mortalita (12,500 %) byla zaznamenána v 1. skupině zvířat (po podání 500 mg AB15/kg tělesné hmotnosti). V žádné další skupině se případ úmrtí zvířete neobjevil.

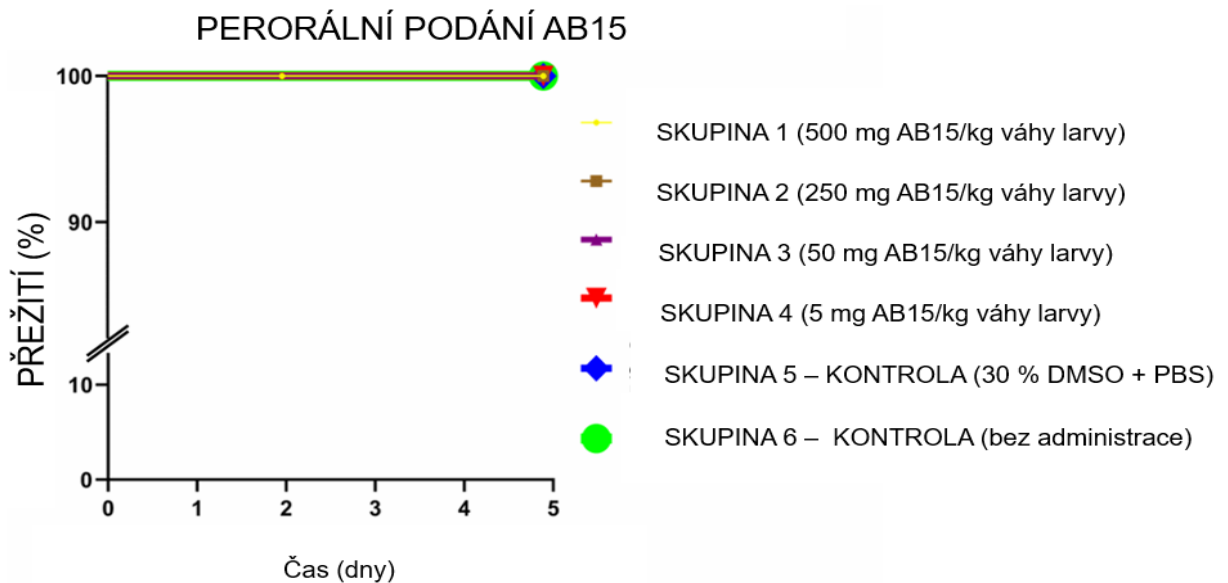
Po podání látky AB15 *per os* rovněž nebylo dosaženo LD_{50} (Obrázek 18 a Tabulka 11). Zároveň nebylo zaznamenáno žádné úmrtí larev v žádné ze skupin, v žádném čase. Toxická dávka AB15 *in vivo* po perorálním podání tedy rovněž odpovídá > 500 mg AB15/kg.

Ani po jednom ze zvolených způsobů podání nebyl při párovém porovnávacím testu všech skupin (Log-rank Mantel-Cox křivky) zaznamenán statisticky významný vliv na přežívání larev (Tabulka P1 a P2, Příloha). Hodnocení toxicity *in vivo* probíhalo ve spolupráci s RNDr. Klárou Konečnou, Ph.D.

Na základě výsledků lze látku AB15 zařadit dle Globálně harmonizovaného systému toxických látek (GSH) do poslední kategorie IV, tedy mezi netoxické až mírně toxické látky [89]. AB15 tedy opět vykazuje silné předpoklady k uplatnění v podobě adjuvantní látky v antibakteriální terapii.



Obrázek 17. Kaplan-Meierova křivka přežití zvířecího modelu *Galleria mellonella* po injekčním podání látky AB15 do hemocoelu. Larvy byly inkubovány při teplotě 37 °C a jejich stav byl hodnocen po 24, 48, 72, 96 a 120 h po podání.



Obrázek 18. Kaplan-Meierova křivka přežití zvířecího modelu *Galleria mellonella* po perorálním podání látky AB15. Larvy byly inkubovány při teplotě 37 °C a jejich stav byl hodnocen po 24, 48, 72, 96 a 120 h po podání.

Tabulka 10. Hodnocení *in vivo* toxicity látky AB15 s využitím zvířecího modelu *Galleria mellonella*. Výsledky po injekčním podání AB15 do hemocoelu larvy. Vizuální inspekce larev inkubovaných při teplotě 37 °C probíhala 24, 48, 72, 96 a 120 h po podání.

Podaná dávka dle skupiny (mg/kg tělesné hmotnosti)	mg/kg tělesné hmotnosti larvy								Kontrolní skupina (10 ml PBS + 30 % (v/v) DMSO)	Kontrolní skupina (bez podání)
	500		250		50		5			
Hodiny (Vizuální inspekce)	Počet přeživších larev	Mortalita (%)*	Počet přeživších larev	Mortalita (%)*	Počet přeživších larev	Mortalita (%)*	Počet přeživších larev	Mortalita (%)*	Počet přeživších larev	Mortalita (%)*
0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0
24	7	12,50	8	0	8	0	8	0	8	0
48	7	12,50	8	0	8	0	8	0	8	0
72	7	12,50	8	0	8	0	8	0	8	0
96	7	12,50	8	0	8	0	8	0	8	0
120	7	12,50	8	0	8	0	8	0	8	0

(%)* – procentuální vyjádření mortality způsobené kandidátní látkou AB15.

Tabulka 11. Hodnocení *in vivo* toxicity derivátu AB15 s využitím zvířecího modelu *Galleria mellonella*. Výsledky po perorálním podání AB15. Vizuální inspekce larev inkubovaných při teplotě 37 °C probíhala 24, 48, 72, 96 a 120 h po podání.

Podaná dávka dle skupiny (mg/kg tělesné hmotnosti)	mg/kg tělesné hmotnost larvy								Kontrolní skupina (10 ml PBS + 30 % (v/v) DMSO)	Kontrolní skupina (bez podání)
	500		250		50		5			
Hodiny (Vizuální inspekce)	Počet přeživších larev	Mortalita (%)*	Počet přeživších larev	Mortalita (%)*	Počet přeživších larev	Mortalita (%)*	Počet přeživších larev	Mortalita (%)*	Počet přeživších larev	Mortalita (%)*
0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0
24	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0
48	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0
72	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0
96	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0
120	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0

(%)* – procentuální vyjádření mortality způsobené kandidátní látkou AB15.

4.3.4.7. Studium vlivu kombinace vybraných ATB a látky AB15 na antimikrobní aktivitu – Checkerboard studie

Kandidátní látka AB15 vykazuje slibnou aktivitu vůči Gram-negativním bakteriím, včetně těch s MR profilem, a navíc je netoxická. Nabízí se proto další kroky výzkumu, které by potvrdily kompatibilitu kandidátní látky s dostupnými ATB. Ideálním stavem v rámci kombinační terapie je situace, kdy je MIC každého z léčiv nižší právě při použití v kombinaci než MIC látek působících samostatně. Žádaným bonusem je pak snížení toxicity a s tím související zmírnění nežádoucích účinků AML. Při vhodně zvolené kombinaci léčiv lze též snížit riziko vzniku a šíření rezistence, čehož je s výhodou užíváno jako jedné ze strategií v rámci boje s AMR.

K posouzení vzájemné interakce s látkou AB15 bylo do Checkerboard studie zahrnuto 6 klinicky relevantních, komerčně dostupných ATB s různými mechanismy účinku. Konkrétně jimi byla ATB: CIP (inhibice syntézy DNA), GEN a TGC (vazba na 30S podjednotku ribozomu při syntéze proteinů), SXT (inhibice syntézy kyseliny listové), CST (elektrostatická interakce s buněčnou membránou, změna permeability) a CHL (vazba na 50S podjednotku při proteosyntéze). V experimentu byl využit referenční kmen EC (ATCC 25922).

Díky této studii byla odhalena zajímavá data (Tabulka 12). Aditivní efekt AB15 byl zjištěn v kombinaci hned s polovinou vybraných ATB. Jmenovitě s GEN (Tabulka 12b) a CST (Tabulka 12e) a CHL (Tabulka 12f). V případě kombinace s GEN se vypočtená hodnota FICI v některých koncentračních poměrech úzce přibližovala kritériu pro hodnocení synergické interakce (například $FICI = 0,516$, synergický efekt je definován při $FICI \leq 0,500$). Důležitým zjištěním je i fakt, že kombinace AB15 ani s jedním z vybraných ATB nevedla k antagonistickému efektu. Účinek ani jednoho z volených ATB tedy nebyl ovlivněn negativně. Látka AB15 tedy může být charakterizována jako platný kandidát pro kombinační terapii, v níž může být uplatněna jako adjuvantní látka, jež netlumí aktivitu zvolených ATB.

Tabulka 12. Indexy frakčních inhibičních koncentrací (FICI) vypočtené na základě výsledků Checkerboard studie s využitím kombinací **a.** ciprofloxacinu (CIP) + AB15, **b.** gentamicinu (GEN) + AB15, **c.** tigecyklinu (TGC) + AB15, **d.** trimetoprim/sulfametoxazolu (SXT) + AB15, **e.** kolistinu (CST) + AB15 a **f.** chloramfenikolu (CHL) + AB15 vůči referenčnímu kmenu *Escherichia coli* (ATCC 52922). Minimální inhibiční koncentrace (MIC) samostatně působících látek odpovídaly:

- a.** MIC_{CIP} = 0,024 μM, MIC_{AB15} = 62,500 μM
- b.** MIC_{GEN} = 2,094 μM, MIC_{AB15} = 125 μM
- c.** MIC_{TGC} = 0,107 μM, MIC_{AB15} = 62,500 μM
- d.** MIC_{SXT} = 3,679 μM, MIC_{AB15} = 62,500 μM
- e.** MIC_{CST} = 0,108 μM, MIC_{AB15} = 125 μM
- f.** MIC_{CHL} = 49,516 μM, MIC_{AB15} = 125 μM.

12a. KOMBINACE CIPROFLOXACIN + AB15					
Koncentrační poměr CIP : AB15 (μM)	Koncentrační poměr CIP : AB15 (μg/ml)	FIC _{CIP}	FIC _{AB15}	FICI	Efekt
0,006 : 62,500	0,002 : 14,000	0,250	1,000	1,250	Indiference
0,012 : 62,500	0,004 : 14,000	0,500	1,000	1,500	Indiference
0,024 : 62,500	0,008 : 14,000	1,000	1,000	2,000	Indiference
0,048 : 31,250	0,016 : 7,000	2,000	0,500	2,500	Indiference
0,048 : 15,625	0,016 : 3,500	2,000	0,250	2,250	Indiference
0,048 : 7,813	0,016 : 1,750	2,000	0,125	2,125	Indiference
0,024 : 7,813	0,008 : 1,750	1,000	0,125	1,125	Indiference
0,024 : 3,906	0,008 : 0,875	1,000	0,063	1,063	Indiference
0,024 : 1,953	0,008 : 0,438	1,000	0,031	1,031	Indiference

12b. KOMBINACE GENTAMICIN + AB15

Koncentrační poměr	Koncentrační poměr	FIC _{GEN}	FIC _{AB15}	FICI	Efekt
GEN : AB15 (μ M)	GEN : AB15 (μ g/ml)				
0,033 : 62,500	0,016 : 14,000	0,016	0,500	0,516	Aditivita
0,066 : 62,500	0,031 : 14,000	0,031	0,500	0,531	Aditivita
0,132 : 62,500	0,063 : 14,000	0,063	0,500	0,563	Aditivita
0,264 : 62,500	0,125 : 14,000	0,125	0,500	0,625	Aditivita
0,528 : 62,500	0,250 : 14,000	0,250	0,500	0,750	Aditivita
1,056 : 62,500	0,500 : 14,000	0,500	0,500	1,000	Aditivita
2,112 : 62,500	1,000 : 14,000	1,000	0,500	1,500	Indiference
2,112 : 31,250	1,000 : 7,000	1,000	0,250	1,250	Indiference
2,112 : 15,625	1,000 : 3,500	1,000	0,125	1,125	Indiference
2,112 : 7,913	1,000 : 1,750	1,000	0,063	1,063	Indiference
2,112 : 3,906	1,000 : 0,875	1,000	0,031	1,031	Indiference
2,112 : 1,953	1,000 : 0,438	1,000	0,016	1,016	Indiference

12c. KOMBINACE TIGECYKLIN + AB15

Koncentrační poměr	Koncentrační poměr	FIC _{TGC}	FIC _{AB15}	FICI	Efekt
TGC : AB15 (μ M)	TGC : AB15 (μ g/ml)				
0,002 : 62,500	0,001 : 14,000	0,016	1,000	1,016	Indiference
0,003 : 62,500	0,002 : 14,000	0,031	1,000	1,031	Indiference
0,007 : 62,500	0,004 : 14,000	0,063	1,000	1,063	Indiference
0,013 : 62,500	0,008 : 14,000	0,125	1,000	1,125	Indiference
0,027 : 62,500	0,016 : 14,000	0,250	1,000	1,250	Indiference
0,053 : 62,500	0,031 : 14,000	0,500	1,000	1,500	Indiference
0,107 : 62,500	0,063 : 14,000	1,000	1,000	2,000	Indiference
0,107 : 31,250	0,063 : 7,000	1,000	0,500	1,500	Indiference
0,107 : 15,625	0,063 : 3,500	1,000	0,250	1,250	Indiference
0,107 : 7,813	0,063 : 1,750	1,000	0,125	1,125	Indiference
0,107 : 3,906	0,063 : 0,875	1,000	0,063	1,063	Indiference
0,107 : 1,953	0,063 : 0,438	1,000	0,031	1,031	Indiference

12d. KOMBINACE TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL + AB15

Koncentrační poměr	Koncentrační poměr	FIC _{SXT}	FIC _{AB15}	FICI	Efekt
SXT : AB15 (μ M)	SXT : AB15 (μ g/ml)				
0,057 : 62,500	0,031 : 14,000	0,016	1,000	1,016	Indiference
0,115 : 62,500	0,062 : 14,000	0,031	1,000	1,031	Indiference
0,230 : 62,500	0,125 : 14,000	0,063	1,000	1,063	Indiference
0,460 : 62,500	0,250 : 14,000	0,125	1,000	1,125	Indiference
0,920 : 62,500	0,500 : 14,000	0,250	1,000	1,250	Indiference
1,839 : 62,500	1,000 : 14,000	0,500	1,000	1,500	Indiference
3,679 : 62,500	2,000 : 14,000	1,000	1,000	2,000	Indiference
7,358 : 31,250	4,000 : 7,000	2,000	0,500	2,500	Indiference
7,358 : 15,625	4,000 : 3,500	2,000	0,250	2,250	Indiference
7,358 : 7,813	4,000 : 1,750	2,000	0,125	2,125	Indiference
7,358 : 3,906	4,000 : 0,875	2,000	0,063	2,063	Indiference
7,358 : 1,953	4,000 : 0,438	2,000	0,031	2,031	Indiference

12e. KOMBINACE KOLISTIN + AB15

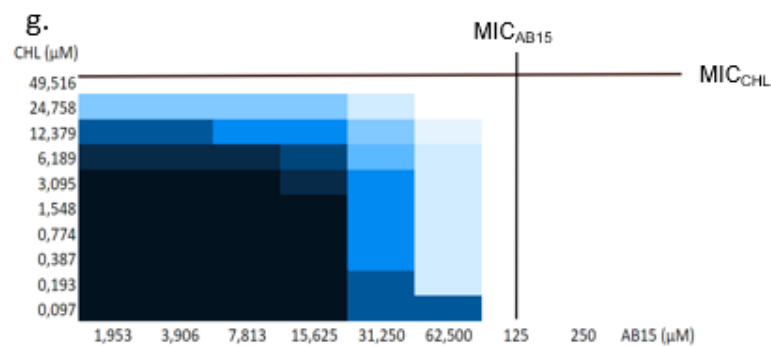
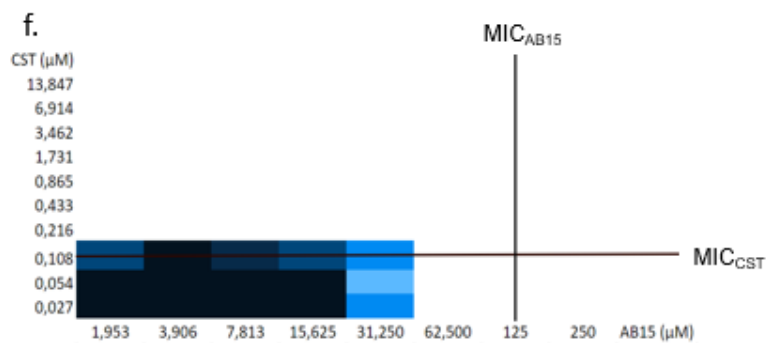
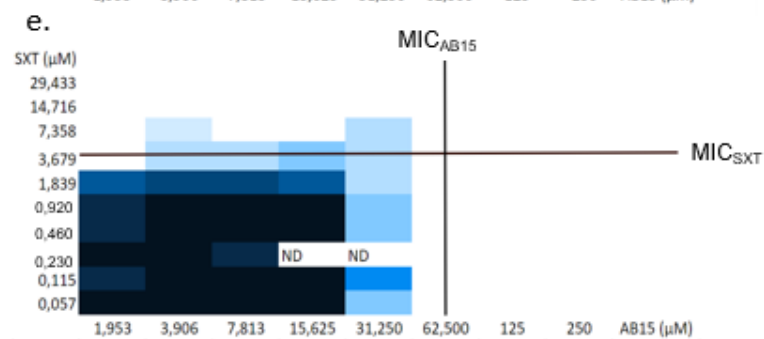
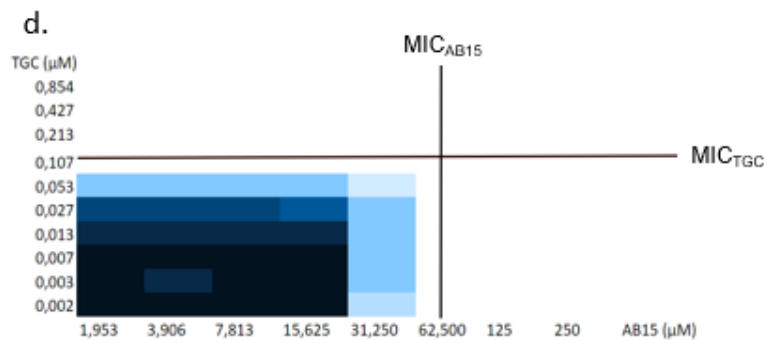
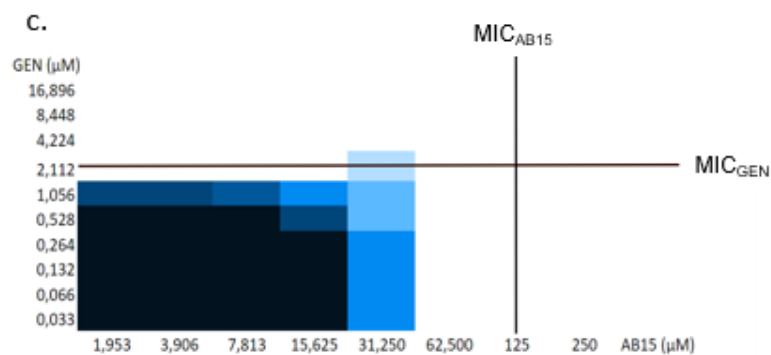
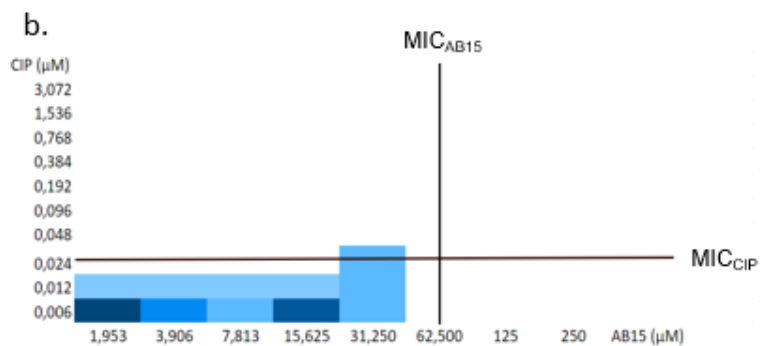
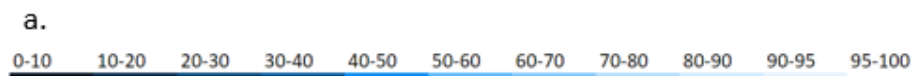
Koncentrační poměr	Koncentrační poměr	FIC _{CST}	FIC _{AB15}	FICI	Efekt
CST : AB15 (μ M)	CST : AB15 (μ g/ml)				
0,027 : 62,500	0,031 : 14,000	0,250	0,500	0,750	Aditivita
0,054 : 62,500	0,063 : 14,000	0,500	0,500	1,000	Aditivita
0,108 : 62,500	0,125 : 14,000	1,000	0,500	1,500	Indiference
0,216 : 31,250	0,250 : 7,000	2,000	0,250	2,250	Indiference
0,216 : 15,625	0,250 : 3,500	2,000	0,125	2,125	Indiference
0,216 : 7,813	0,250 : 1,750	2,000	0,063	2,063	Indiference
0,216 : 3,906	0,250 : 0,875	2,000	0,031	2,031	Indiference
0,216 : 1,953	0,250 : 0,438	2,000	0,016	2,016	Indiference

12f. KOMBINACE CHLORAMFENIKOL + AB15

Koncentrační poměr CHL : AB15 (μ M)	Koncentrační poměr CHL : AB15 (μ g/ml)	FIC _{CHL}	FIC _{AB15}	FICI	Efekt
0,097 : 125,000	0,031 : 28,000	0,002	1,000	1,002	Indiference
0,193 : 125,000	0,063 : 28,000	0,004	1,000	1,004	Indiference
0,387 : 125,000	0,125 : 28,000	0,008	1,000	1,008	Indiference
0,774 : 125,000	0,250 : 28,000	0,016	1,000	1,016	Indiference
1,547 : 125,000	0,500 : 28,000	0,031	1,000	1,031	Indiference
3,095 : 62,500	1,000 : 14,000	0,063	0,500	0,563	Aditivita
6,189 : 125,000	2,000 : 28,000	0,125	1,000	1,125	Indiference
12,379 : 62,500	4,000 : 14,000	0,250	0,500	0,750	Aditivita
24,758 : 62,500	8,000 : 14,000	0,500	0,500	1,000	Aditivita
49,516 : 31,250	16,000 : 7,000	1,000	0,250	1,250	Indiference
49,516 : 15,625	16,000 : 3,500	1,000	0,125	1,125	Indiference
49,516 : 7,813	16,000 : 1,750	1,000	0,063	1,063	Indiference
49,516 : 3,906	16,000 : 0,875	1,000	0,031	1,031	Indiference
49,516 : 1,953	16,000 : 0,438	1,000	0,016	1,016	Indiference

FIC – frakční inhibiční koncentrace, FICI – index frakčních inhibičních koncentrací, FIC_{CIP, GEN, TGC, SXT, CST, CHL, AB15} = MIC daného antibiotika či látky AB15 v kombinaci / MIC daného antibiotika či látky AB15 působící samostatně, FICI = FIC_{CIP, GEN, TGC, SXT, CST, CHL} + FIC_{AB15}. Efekt je interpretován dle kritéria: synergický efekt – FICI \leq 0,5, aditivní efekt – 0,5 < FICI \leq 1, indiferentní efekt – 1 < FICI \leq 4, antagonistický efekt – FICI > 4.

Výsledky Checkerboard studií lze demonstrovat též formou tzv. tepelných map (Obrázek 19). Přidanou hodnotou tohoto grafického znázornění je možnost ilustrace procentuální inhibice růstu referenčního kmene EC po expozici AB15 v kombinaci s vybranými ATB. Jak je zjevné z Obrázku 19b a 19g, v kombinacích CIP + AB15 a CHL + AB15 nebyl ve společné aktivitě zjištěn výraznější příspěvek AB15. Nicméně, kombinace AB15 + GEN a AB15 + CST vedly ke zvýšení aktivity AB15 (Obrázky 19c a 19f). Naopak kombinace AB15 + SXT se při některých koncentračních poměrech zdá ne zcela vhodnou (Obrázek 19e).



Obrázek 19. Tepelné mapy výsledků Checkerboard studií. Procentuální inhibice růstu (v porovnání s pozitivní kontrolou) bakteriálního kmene *Escherichia coli* (ATCC 25922) po 20 h expozice AB15 v kombinaci s vybranými antibiotiky při 37 °C. **a.** barevné spektrum procentuální inhibice růstu bakterií, **b.** AB15 v kombinaci s ciprofloxacinem (CIP), **c.** gentamicinem (GEN), **d.** tigecyklinem (TGC), **e.** trimetoprim-sulfametoxazolem (SXT), **f.** kolistinem (CST) a **g.** chloramfenikolem (CHL). Minimální inhibiční koncentrace (MIC) samotných látek (vyjádřena čarou) odpovídá:

b. $MIC_{CIP} = 0,024 \mu M$, $MIC_{AB15} = 62,500 \mu M$

c. $MIC_{GEN} = 2,094 \mu M$, $MIC_{AB15} = 125 \mu M$

d. $MIC_{TGC} = 0,107 \mu M$, $MIC_{AB15} = 62,500 \mu M$

e. $MIC_{SXT} = 3,679 \mu M$, $MIC_{AB15} = 62,500 \mu M$

f. $MIC_{CST} = 0,108 \mu M$, $MIC_{AB15} = 125 \mu M$

g. $MIC_{CHL} = 49,516 \mu M$, $MIC_{AB15} = 125 \mu M$.

Aditivní interakce a odlišný mechanismus účinku látek CST a AB15 byl motivací pro hlubší prozkoumání této zajímavé kombinace, tentokrát s využitím zástupce obávané bakterie ACBA, konkrétně klinického izolátu ACBA (20/21).

Opodstatněním této strategie na klinické úrovni je vysoká míra AMR a omezené možnosti léčby infekcí vyvolaných patogenem ACBA. CST se navíc, jak bylo zmíněno v úvodu této části práce, řadí mezi rezervní ATB vyhrazená pro léčbu závažných infekcí způsobených MR kmeny Gram-negativních bakterií (ACBA, PA, KP a dalších rodů z čeledi *Enterobacteriaceae*). I přes to se však nezdá začínají objevovat případy rezistence i vůči tomuto rezervnímu léčivu [140-142].

Terapeutické režimy užívající CST k léčbě nozokomiálních infekcí způsobených ACBA nejsou vždy jednotné. Lékaři často volí kombinaci polymyxinů s jinými ATB. Nicméně, význam pouze některých z těchto strategií lze doložit publikovanými studiemi. Některé práce totiž poukazují na to, že účinnost monoterapie CST je v léčbě infekcí vyvolaných ACBA srovnatelná s úspěšností kombinační terapie. Například autoři práce Khalil *et al.*, 2019 [143] však ve své práci prokázali synergický efekt kombinace CST + SXT *in vitro* vůči karbapenem-rezistentnímu kmenu bakterie ACBA. Výhodu užití této strategie dále potvrdili

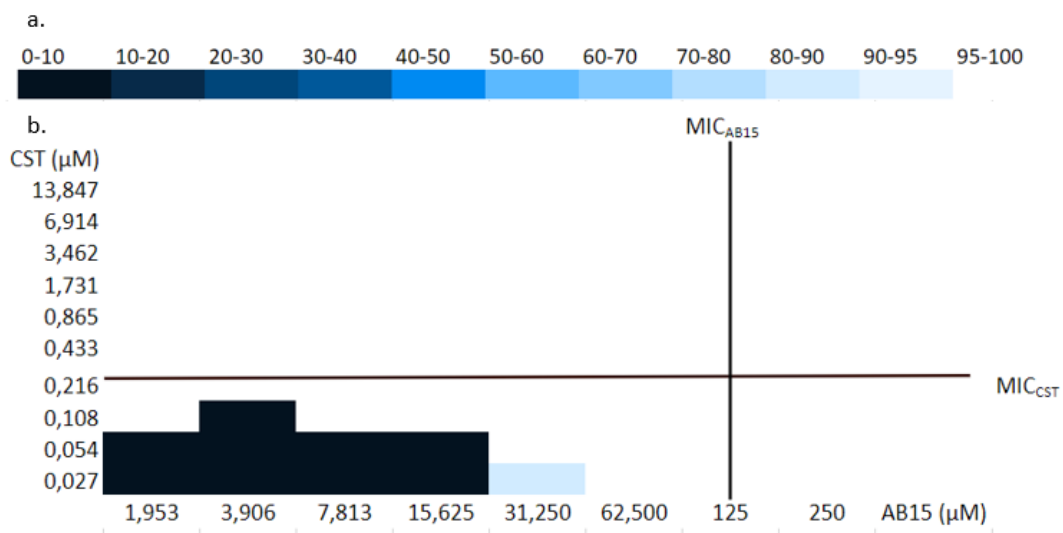
v rámci toxikologické studie *in vivo* s bezobratlým zvířecím modelem, kde se kombinace CST + SXT prokázala jako méně toxická ve srovnání s užitím těchto ATB samostatně. Limitací monoterapie CST je totiž jeho nepopíratelná neurotoxicita [165] a nefrotoxicita [166]. Racionální kombinační terapie tedy může být jednou z úspěšných strategií vedoucích ke snížení nežádoucích účinků.

S cílem potvrdit aditivní efekt kombinace CST a AB15 vůči referenčnímu kmeni ACBA bylo proto do studie zařazeno hodnocení této kombinace, tentokrát vůči klinickému izolátu ACBA 20/21. Jak demonstruje Tabulka 13, kombinace CST a AB15 působí na ACBA 20/21 v koncentračním poměru 0,054 μM CST + 31,250 μM dokonce synergicky. Koncentrační poměr 0,108 μM CST + 7,813 μM AB15 byl velmi blízko splnění kritéria FICI pro klasifikaci interakce jako synergické (FICI = 0,563). Aditivní efekt byl zjištěn u čtyř dalších poměrů koncentrací. Kromě toho nebyla opět zaznamenána žádná antagonistická interakce. Tepelná mapa (Obrázek 20) dokládá, že antibakteriální účinek CST je potencován přítomností AB15 a současně je účinnost AB15 potencována CST.

Tabulka 13. Indexy frakčních inhibičních koncentrací (FICI) vypočtených na základě výsledků Checkerboard studie s využitím kombinace kolistinu (CST) + AB15 vůči kmeni bakterie *Acinetobacter baumannii* (20/21). Minimální inhibiční koncentrace (MIC) samostatně působících látek odpovídaly $MIC_{CST} = 0,216 \mu M$, $MIC_{AB15} = 125 \mu M$.

KOMBINACE KOLISTIN + AB15 vs <i>Acinetobacter baumannii</i> (20/21)					
Koncentrační poměr CST : AB15 (μM)	Koncentrační poměr CST : AB15 ($\mu g/ml$)	FIC_{CST}	FIC_{AB15}	FICI	Efekt
0,027 : 62,500	0,031 : 14,000	0,125	0,500	0,625	Aditivita
0,054 : 31,250	0,063 : 7,000	0,250	0,250	0,500	Synergie
0,108 : 31,250	0,125 : 7,000	0,500	0,250	0,750	Aditivita
0,108 : 15,625	0,125 : 3,500	0,500	0,125	0,625	Aditivita
0,108 : 7,813	0,125 : 1,750	0,500	0,063	0,563	Aditivita
0,216 : 3,906	0,250 : 0,875	1,000	0,031	1,031	Indiference
0,216 : 1,953	0,250 : 0,438	1,000	0,016	1,016	Indiference

FIC – frakční inhibiční koncentrace, *FICI* – index frakčních inhibičních koncentrací, FIC_{CST} , FIC_{AB15} = MIC kolistinu či látky AB15 v kombinaci / MIC kolistinu či látky AB15 působící samostatně, $FICI = FIC_{CST} + FIC_{AB15}$. Efekt je interpretován dle kritérií: synergický efekt – $FICI \leq 0,5$, aditivní efekt – $0,5 < FICI \leq 1$, indiferentní efekt – $1 < FICI \leq 4$, antagonistický efekt – $FICI > 4$.



Obrázek 20. Tepelná mapa výsledku Checkerboard studie. Procentuální inhibice růstu (v porovnání s pozitivní kontrolou) bakteriálního kmene *Acinetobacter baumannii* (20/21) po 20 h expozice AB15 v kombinaci s kolistinem (CST) při 37 °C. **a.** barevné spektrum procentuální inhibice růstu bakterií, **b.** AB15 v kombinaci s kolistinem (CST). Minimální inhibiční koncentrace samotných látek (MIC) odpovídá: $MIC_{CST} = 0,216 \mu M$, $MIC_{AB15} = 125 \mu M$.

4.3.4.8. Screening vlivu kombinace CST a látky AB15 na antimikrobní aktivitu vůči biofilmu vytvořenému klinickým izolátem bakterie ACBA

V práci již bylo uvedeno, že bakterie ACBA patří mezi významné původce nozokomiálních nákaz a je také schopna tvorby biofilmů, což významně přispívá k širokému spektru mechanismů rezistence této bakterie. Tvorba biofilmu hraje též klíčovou roli v patogenezi infekcí vyvolaných kmeny ACBA, jako jsou například meningitida, infekce močových cest či pneumonie, jejichž léčba je extrémně složitá [50, 51, 167].

Vzhledem k této skutečnosti bylo zcela na místě zaměřit dále pozornost této studie na potenciální anti-biofilmové účinky AB15 jakožto možné adjuvantní látky. Taková aktivita byla, na základě předchozích výsledků, hodnocena u kombinace AB15 + CST ve výhodném koncentračním poměru 0,108 μM CST + 7,813 μM AB15.

Klinický izolát bakterie ACBA (20/21) byl nejprve, dle kategorizace navržené v publikaci Stepanovic *et al.*, 2007 [113] a v souladu s předpoklady, charakterizován jako silný producent biofilmu. Biofilmy tohoto kmene byly následně vytvořeny *in vitro* a vystaveny působení látek AB15, CST a jejich kombinací v koncentračním poměru 7,815 μM (AB15) + 0,108 μM (CST) odpovídající 1-128 \times násobku MIC této kombinace vůči klinickému izolátu bakterie ACBA (20/21). Pro popis anti-biofilmové aktivity byla dále stanovena hodnota MBIC a MBEC.

Dle Tabulky 14 lze soudit, že AB15 vykazuje v porovnání s CST větší vnitřní anti-biofilmovou aktivitu. Respektive, že k zaznamenání biofilmové aktivity je třeba nižšího násobku MIC_{AB15} , než je tomu při použití násobků MIC_{CST} . Hodnota $\text{MBIC}_{\text{AB15}}$ odpovídala pouze 2-4 \times MIC_{AB15} , tedy koncentraci, která představuje nejnižší koncentraci vedoucí k inhibici růstu buněk ACBA v planktonní fázi. V případě CST odpovídala MBIC_{CST} 64-256 \times MIC_{CST} . Ve snaze dosáhnout hodnoty druhého parametru, tedy $\text{MBEC}_{\text{AB15}}$, bylo opět potřeba 2-4 \times MIC v případě AB15. Hodnota MBEC_{CST} odpovídala 16-64 \times násobku MIC_{CST} . Co se týče efektu kombinace obou látek v koncentračním poměru 7,815 μM (AB15) + 0,108 μM (CST), k dosažení MBIC i MBEC stačil šestnáctinásobek MIC této kombinace. Na základě těchto výsledků lze tedy konstatovat, že AB15 vykazuje velice příznivé vlastnosti látky partnerské k CST v boji proti ACBA (20/21) biofilmu. Ve vhodném

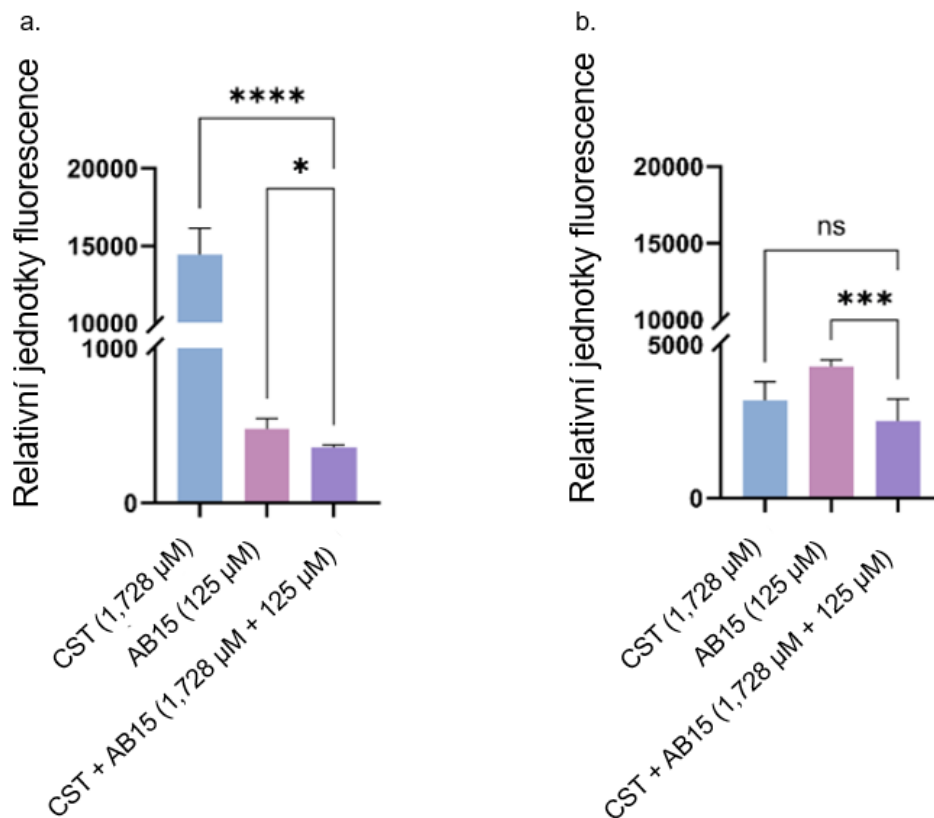
poměru s AB15 lze totiž snížit koncentraci tohoto toxického léčiva z 27,695 μM (CST působícího samostatně) na 1,728 μM (CST v kombinaci s AB15).

Tabulka 14. Minimální biofilm-inhibiční a eradikační koncentrace kolistinu (CST), látky AB15 a kombinace CST + AB15 vůči biofilmu tvořenému klinickým izolátem bakterie *Acinetobacter baumannii* (20/21).

	MIC (μM)	MBIC (μM)	MBEC (μM)	Multiplicita MIC vs. MBIC	Multiplicita MIC vs. MBEC
CST	0,108-0,216	13,847-27,695	3,462-6,924	64-256	16-64
AB15	31,250-62,500	125	125	2-4	2-4
*CST + AB15	0,108 + 7,813	1,728 + 125	1,728 + 125	16	16

**Poměr koncentrací kolistinu (CST) a AB15 s prokázaným aditivním účinkem. MIC – minimální koncentrace látky (látek) vedoucí k 95-100% snížení metabolické aktivity bakterií v planktonní formě ve srovnání s pozitivní kontrolou růstu (bakterie neexponované testované látky (látkám), MBIC – minimální koncentrace látky (látek) vedoucí k 95-100% snížení metabolické aktivity planktonních bakterií uvolněných z biofilmového konsorcia, MBEC – minimální koncentrace látky (látek) vedoucí k 95-100% snížení metabolické aktivity bakterií přítomných v biofilmovém společenství.*

Podíl účinku látky AB15 a CST na anti-biofilmovou aktivitu lze charakterizovat pomocí srovnávací analýzy (Obrázek 21). Obrázek 21a demonstruje, že aktivita látek CST a AB15 působících samostatně v koncentracích odpovídajících hodnotě $\text{MBIC}_{\text{CST+AB15}}$ je odlišná. Kombinace látek CST + AB15 vede v porovnání s aktivitami obou látek působících samostatně ke statisticky významně většímu účinku vůči buňkám uvolněným z biofilmu. Obrázek 21b znázorňuje efekt CST, AB15 a kombinace obou látek vůči buňkám přítomným v biofilmu (MBEC). Signifikantní benefit kombinace CST + AB15 zde byl odhalen pouze v porovnání s účinkem samostatně působící látky AB15. Je však třeba připomenout fakt, že buňky zralého biofilmu podléhají neustálé disperzi, tedy postupnému odtrhávání z konsorcia za účelem osidlování nových míst v organismu. Zjištění, že je kombinace CST + AB15 schopna významně omezit takové rozšiřování infekce, je proto velice hodnotné, ať už v případě působení samostatných AML či účinku AML v kombinaci.



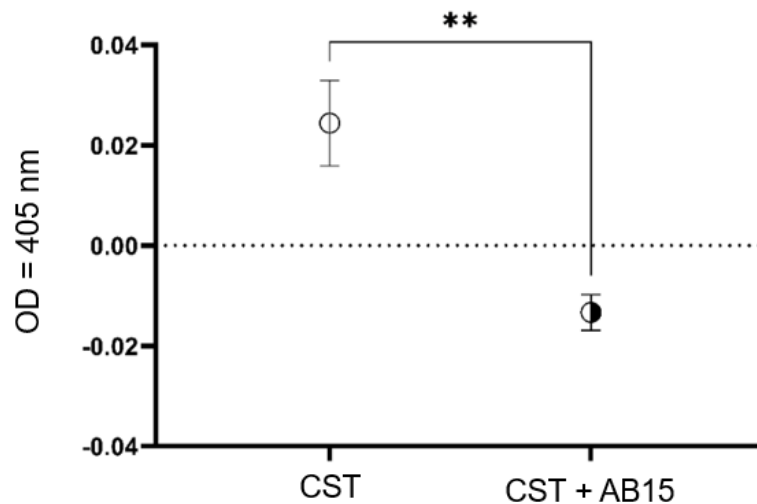
Obrázek 21. Srovnání **a.** inhibičního efektu a **b.** eradikačního efektu vůči buňkám biofilmového společenství s využitím kolistinu (CST, 1,728 μM), látky AB15 (125 μM) a kombinace obou látek v koncentračním poměru 1,728 μM CST + 125 μM AB15. Biofilm tvořený klinickým izolátem bakterie *Acinetobacter baumannii* (20/21) byl vystaven působení látek po dobu 24 h při teplotě 37 °C. K vyhodnocení anti-biofilmové aktivity bylo užito fluorimetrického měření s pomocí metabolického indikátoru AlamarBlue ($\lambda_{Ex} = 528 \text{ nm}$ a $\lambda_{Em} = 585 \text{ nm}$). Údaje jsou prezentovány jako průměr \pm standardní chyba průměru (SEM). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Data zpracována pomocí testu ANOVA v programu GraphPad Prism verze 9.0. (GraphPad Software, Inc., USA). NS – bez statistické významnosti.

4.3.4.9. Cytotoxicita kombinace CST + AB15 vůči lidským erytrocytům

CST vykazuje detergentní aktivitu a váže se na lipopolysacharidy vnější membrány bakterií, čímž dochází ke změně v její propustnosti. Toto rezervní ATB se využívá k léčbě infekcí vyvolaných MR bakteriemi, avšak, jak už bylo zmíněno, vykazuje řadu nežádoucích účinků. Působí například neurotoxicky a nefrotoxicky. Rozsah těchto poškození je většinou závislý na dávce [165, 166].

CST je u kriticky nemocných pacientů podáván intravenózně. Ve studii autorů Westenfelder *et al.*, 2022 je popsána příčinná souvislost rozvoje akutního selhání ledvin se zvýšeným množstvím volného hemoglobinu v oběhu pacientů [168]. Zvýšená hemolýza způsobená testovanými látkami je tedy nežádoucím efektem. Proto byla v rámci studie hodnocena také hemolytická aktivita CST a též kombinace CST + AB15.

K hodnocení hemolytického potenciálu CST a kombinace CST + AB15 bylo využito hemolytické eseje *ex vivo* s lidskými červenými krvinkami. Erytrocyty byly vystaveny CST a kombinaci CST + AB15 v koncentracích odpovídajících hodnotám příslušných MBIC (kapitola 4.3.4.8.). Po inkubaci buněčných pelet s testovanými látkami a centrifugačních krocích byl volný hemoglobin stanovován měřením OD (405 nm). Obrázek 22 shrnuje výsledky této eseje. Jak je z obrázku zřejmé, hemolytický efekt kombinace CST + AB15 vůči lidským erytrocytům je v porovnání s efektem samostatného CST statisticky významně nižší. Může tedy být shrnuto, že v případě použití kombinace CST + AB15 ve vhodném koncentračním poměru, může dojít k úpravě dávkovacího režimu CST a tím též ke snížení potenciálního rizika nefrotoxicity vyvolané samotným CST. Hodnocení cytotoxicity *ex vivo* vůči lidským erytrocytům bylo provedeno ve spolupráci s prof. MUDr. Janem Österreicherem, Ph.D.



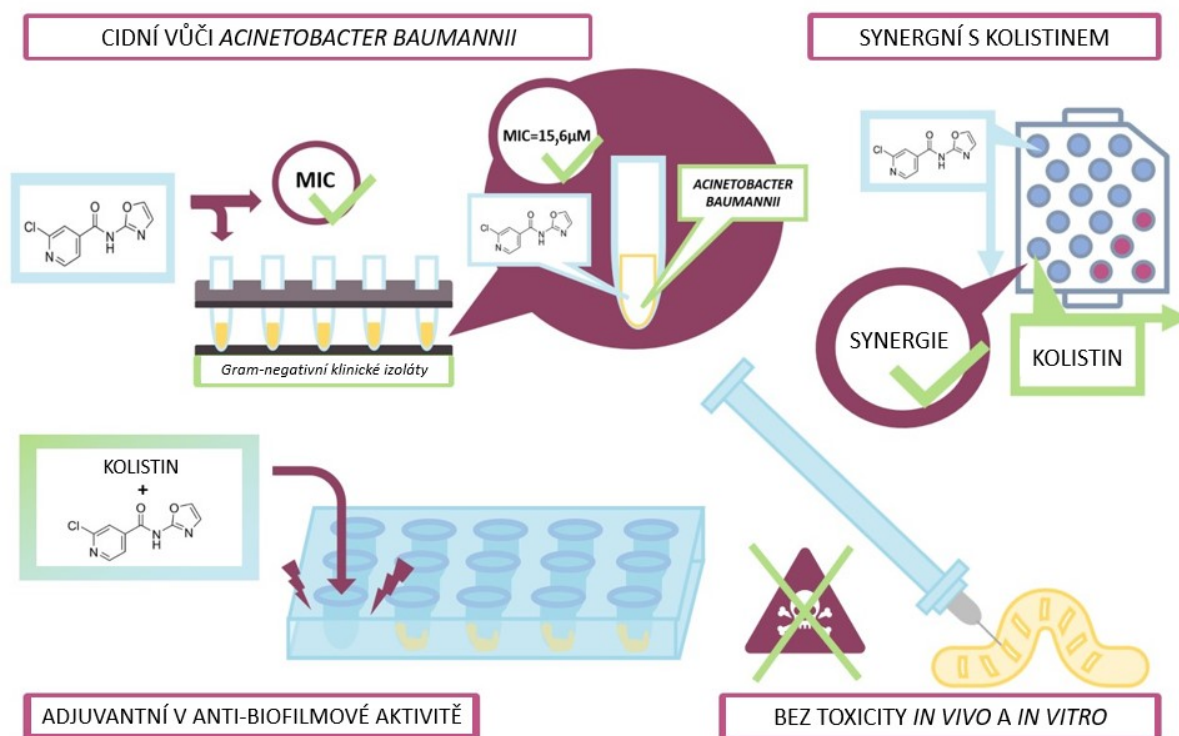
Obrázek 22. Výsledky hemolytické eseje *ex vivo* s využitím lidských erytrocytů hodnotící aktivitu samostatně působícího kolistinu (CST) a kombinace kolistinu s AB15 (CST + AB15) v koncentracích odpovídajících příslušné minimální biofilm-inhibiční koncentraci. Množství uvolněného hemoglobinu bylo měřeno spektrofotometricky při 405 nm. Data vyjádřena jako průměr hexaplikátů \pm standardní chyba průměru (SEM). Hodnota $p < 0,05$ byla přijata jako statisticky významná. $**p < 0,01$. Data zpracována pomocí testu ANOVA v programu GraphPad Prism verze 9.0. (GraphPad Software, Inc., USA).

4.3.5. Shrnutí pracovního Cíle B

V závěru pracovního Cíle B nelze znovu nepřipomenout alarmující stav AMR – jedné z nejzávažnějších výzev moderní medicíny, jež představuje globální hrozbu s tragickými důsledky. Vědecká komunita po celém světě je proto vyzývána k intenzivnímu studiu a výzkumným aktivitám vedoucím k odvrácení či alespoň zpomalení této závažné situace. Jednou z alternativních strategií je studium racionální kombinační terapie.

Výsledkem této části disertační práce je komplexní popis antimikrobní aktivity a vybraných biologických vlastností nově syntetizovaného 2-aminooxazolového derivátu AB15. Derivát byl k rozsáhlejšímu studiu vybrán na základě slibných dat získaných screeningem antimikrobního účinku a vhodných fyzikálně-chemických a biologických vlastností, jako jsou rozpustnost, stabilita a nízká cytotoxicita. Soubor získaných dat se v průběhu studie rozšířil o výsledky přesvědčivé antimikrobní aktivity vůči Gram-negativním bakteriím, zejména ACBA, která je řazena k nejčastěji připomínaným patogenům v souvislosti s AMR. V práci je též blíže popsán mechanismus účinku látky AB15. Na bakterie působí cidním efektem a v bakteriální buňce cílí na biosyntézu proteinů. Možnost uplatnění AB15 jako kandidátní léčivé látky potvrzuje i nízká cytotoxicita ověřená *in vitro* s pomocí buněčné linie HK-2 (SI od > 16 do > 8) a *in vivo* pomocí bezobratlého zvířecího modelu ($LD_{50} > 500$ mg/kg), což kategorizuje tento derivát mezi netoxické/slabě toxické látky dle systému GHS (skupina IV). Významným zjištěním byl průkaz aditivní aktivity AB15 vůči bakterii EC v kombinaci s některými komerčně dostupnými ATB (GEN, CST, CHL). S žádným ze šesti zařazených ATB nevyvolávala látka AB15 antagonistický efekt. AB15 byla vyhodnocena jako velice vhodná partnerská adjuvantní látka v kombinaci s rezervním ATB – CST. Tato kombinace působila synergickým efektem vůči klinickému izolátu ACBA v planktonní fázi a též vedla k redukci biofilmu *in vitro* tvořeného právě touto MR bakterií.

Na základě zjištěných (mikro)biologických vlastností lze studovaný chlorovaný 2-aminooxazolový derivát (AB15) považovat za vhodnou kandidátní látku s adjuvantním účinkem k vybraným ATB. Hlavní výsledky této studie shrnuje Obrázek 23.



Obrázek 23. Zásadní výsledky studie (Cíl B) (Diepoltová, 2024).

Kandidátní látka AB15 vykázala slibnou aktivitu vůči klinickým izolátům Gram-negativních bakterií, zejména vůči kmenu ACBA (20/21) bakterie *Acinetobacter baumannii*. Látka AB15 prokázala v určitých koncentračních poměrech synergický efekt s antibiotikem kolistinem a adjuvantní aktivitu ve společném působení (kolistin + AB15) vůči bakteriálnímu klinickému izolátu ACBA (20/21) tvořícímu biofilm. V rámci *in vitro* i *in vivo* hodnocení se látka AB15 prokázala jako netoxická. MIC – minimální inhibiční koncentrace.

4.4. CÍL C

CHARAKTERIZACE (MIKRO)BIOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ POLOSYNTETICKÝCH DERIVÁTŮ MONTANINOVÉHO TYPU ZÍSKANÝCH Z ALKALOIDŮ ROSTLINNÉ ČELEDI *AMARYLLIDACEAE*

4.4.1. Úvod

Zatímco většina rezistentních kmenů zveřejněných na varovném seznamu WHO je reprezentována Gram-negativními druhy, Gram-pozitivní bakterie stále zasluhují velký zájem, a to zejména z důvodu nozokomiálního výskytu, šíří spektra AMR a schopnosti dlouhodobé perzistence na rozličných površích [27]. Zvláště bakteriální kmeny SA a MRSA, vedené v kategorii s vysokou prioritou, jsou dlouhotrvající klinickou výzvou. Způsobují totiž chronické a perzistentní infekce kůže, ran a další závažná onemocnění, jakými jsou endokarditida či osteomyelitida, zejména u imunokompromitovaných pacientů. Nové kmeny MRSA se navíc objevují nejen ve zdravotnických prostředích, ale postihují i lidskou populaci bez jakýchkoliv predispozic [35, 169].

Jednou z preferovaných strategií výzkumu nových AML je chemická úprava látek přírodního původu. [13, 21]. Biologicky značně aktivní skupinou jsou isochinolonové alkaloidy, strukturálně heterogenní sekundární metabolity rostlin, které produkují například zástupci čeledi *Papaveraceae*, *Berberidaceae* či *Amaryllidaceae* [14, 170]. Alkaloidy produkované poslední zmíněnou rostlinnou čeledí (alkaloidy rostlinné čeledi *Amaryllidaceae*, AA) nabízí celou škálu možného klinického využití. Vykazují například protinádorové účinky, aktivitu v léčbě neurodegenerativních chorob a také antimikrobní efekt [18, 19]. Silnou antimikrobní aktivitu vykazují třeba AA montaninového typu, a to zejména vůči bakteriím SA, SE, EC či PA [171].

Jádro montaninového typu lze získat i přesmykem široce dostupného AA – hemantaminu [172-174]. Série 50 takto připravených polosyntetických derivátů byla poskytnuta kolegy z výzkumné skupiny ADINACO Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky FAF UK. Deriváty byly podrobeny screeningu antimikrobního potenciálu, na základě kterého byly dva z nich (značené NMA5 a NMA12) vyhodnoceny jako vhodné kandidátní látky, zejména pro svou slibnou anti-stafylokokovou aktivitu, v důsledku čehož byly zařazeny do pokročilých mikrobiologických studií.

Jak již bylo v této práci popsáno, kromě konvenčního užití kandidátních látek ve formě samostatně působících antiinfektiv lze struktury se slibným účinkem uplatnit též jako látky adjuvantní, což do výzkumu nových AML přináší celou řadu výhod. Látky přírodního či polosyntetického původu nejsou výjimkou. Naopak, v kombinační terapii nachází široké spektrum využití (kapitoly 3.2.1. a 3.2.2).

4.4.2. Pracovní hypotéza

Kandidátní látky zahrnuté v této studii, NMA5 a NMA12, vykazovaly slibnou aktivitu vůči referenčním bakteriím, zejména stafylokokům. Z tohoto důvodu byl navržen předpoklad, že by tyto vybrané deriváty montaninového typu mohly vykazovat aktivitu též v pokročilých studiích (mikro)biologických aktivit, případně by mohly splňovat aspekty kandidátní adjuvantní látky v rámci kombinované terapie a uplatnit se tedy jako látky partnerské ke komerčně dostupným ATB.

4.4.3. Metodika (Cíl C)

4.4.3.1. Příprava derivátů montaninového typu

Na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky FAF UK byla připravena série 50 derivátů montaninového typu. Výchozí látka 3-O-methylpankracin byla získána z cibulek rostliny *Narcissus pseudonarcissus* odrůdy Dutch Master dle postupu publikovaného ve studiích Boyd *et al.*, 2021 a Maafi *et al.*, 2021 [144, 175]. Reakce byla několikrát opakována pro zajištění dostatečného množství 3-O-methylpankracinu. Estery vybraných derivátů byly připraveny dle postupu popsaného v literatuře [176, 177]. Následně byly vybrané deriváty převedeny na odpovídající hydrochloridy. Do následného (mikro)biologického hodnocení byly na základě vhodných fyzikálně-chemických vlastností zařazeny dva deriváty montaninového typu – látky NMA5 a NMA12.

4.4.3.2. Využité mikrobiální kmeny a kultivační média

Bakteriální kmeny

Pro screening antibakteriální aktivity látek NMA5 a NMA12 byla využita řada 8 sbírkových referenčních kmenů, která skladbou odpovídala kmenům zařazeným v Cíli B (kapitola 4.3.3.2.), tedy SA (ATCC 29213); MRSA (ATCC 43300); SE (ATCC 12228); EF (ATCC 29212); EC (ATCC 25922); KP (ATCC 10031); ACBA (ATCC 19606) a PA (ATCC 27853). Před zahájením experimentu byly kryoprezervované bakteriální suspenze vyočkovány na TSA (Merck, USA) a inkubovány při 37 °C po dobu 16 h v tmavém humidním prostředí.

Mykobakteriální kmeny

Aktivita látek NMA5 a NMA12 byla rovněž hodnocena vůči mykobakteriím. Do této studie byly zařazeny mykobakteriální referenční kmeny z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ, Německo), respektive z Belgické koordinované kolekce mikroorganismů (BCCM/ITM, Belgie) kultivované na agaru Middlebrook 7H9.

Mykobakteriální kmeny:

- Rychle rostoucí kmeny:
 - *Mycolicibacterium smegmatis* (DSMZ 43465, ATCC 607)
 - *Mycolicibacterium aurum* (DSMZ 43999, ATCC 23366)
- Avirulentní kmen:
 - *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ITM M006710, ATCC 9431)

Fungální kmeny

Do screeningu antimikrobní aktivity látek NMA5 a NMA12 bylo rovněž zařazeno 8 fungálních referenčních kmenů. Tyto kmeny se opět shodovaly s fungálními kmeny užitými v Cíli B. Jsou jimi *Candida albicans* (ATCC 24443, CCM 8320); *Candida krusei* (ATCC 6258, CCM 8271); *Candida parapsilosis* (ATCC 22019, CCM 8260); *Candida tropicalis* (ATCC 750, CCM 8264); *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305); *Aspergillus flavus* (CCM 8363); *Lichtheimia corymbifera* (CCM 8077); *Trichophyton interdigitale* (ATCC 9533, CCM 8377).

Za účelem potvrzení antibakteriálního potenciálu látek NMA5 a NMA12 byly do pokročilé studie zahrnuty kmeny bakterií izolované z klinického materiálu na ÚKM FNHK (dále jako „klinické izoláty“). Všechny tyto klinické izoláty byly taxonomicky klasifikovány na základě biochemických testů a pomocí přístrojového vybavení MALDI-TOF (Microflex LH/SH MALDI-TOF, Bruker Biotyper 3.0 SW, Bruker Daltonic GmbH, Německo). Antibiogramy klinických izolátů byly zhotoveny na základě výsledků diskové difúzní metody či mikrodilučního testu v souladu s doporučením EUCAST [149, 150] a jsou shrnuty v Tabulkách 15 a 16. Kultivace bakterií byla prováděna v CAMHB (Merck, USA) při teplotě 35 ± 2 °C. Na základě výsledků screeningu antimikrobní aktivity látek NMA5 a NMA12 bylo do následné studie zařazeno 19 Gram-pozitivních a 3 Gram-negativní kmeny.

Tabulka 15. Antibiogram vybraných klinických izolátů Gram-pozitivních bakterií.

Gram-pozitivní bakteriální kmen (ID č.)	Profil citlivosti/rezistence
<i>Staphylococcus capitis</i> (ID č. 74/16)	ND
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (ID č. 111/16)	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> , MRSA (ID č. 131/16)	R: cefoxitin, klindamycin, erytromycin; C: nitrofurantoin, trimetoprim-sulfametoxazol, tetracyklin
<i>Staphylococcus aureus</i> (ID č. 136/16)	R: erytromycin; C: cefoxitin, klindamycin, nitrofurantoin, trimetoprim-sulfametoxazol, tetracyklin
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> , MRSA (ID č. 138/16)	R: cefoxitin, erytromycin; C: klindamycin, nitrofurantoin, trimetoprim-sulfametoxazol, tetracyklin
<i>Staphylococcus aureus</i> (ID č. 141/16)	C: cefoxitin, klindamycin, erytromycin, nitrofurantoin, trimetoprim-sulfametoxazol, tetracyklin
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> , MRSA (ID č. 153/16)	R: ciprofloxacin; C: gentamicin, linezolid, rifampicin, tigecyklin, vankomycin.
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> , MRSA (ID č. 154/16)	R: cefoxitin, klindamycin, erytromycin; C: nitrofurantoin, tetracyklin, trimetoprim-sulfametoxazol
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ID č. 196/16)	ND
<i>Enterococcus faecium</i> , VRE (ID č. 198/16)	R: ampicilin, gentamicin, teikoplanin, tigecyklin, vankomycin; C: linezolid
<i>Staphylococcus aureus</i> , VRSA (ID č. 206/16)	ND
<i>Staphylococcus hominis</i> (ID č. 109/18)	R: erytromycin, cefoxitin, trimetoprim-sulfametoxazol; C: tetracyklin
<i>Staphylococcus aureus</i> , VRSA (ID č. 203/19)	ND
Vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus faecalis</i> , VRE (ID č. 2/21)	ND
Vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus faecalis</i> , VRE (ID č. 7/21)	ND
Vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus faecalis</i> , VRE (ID č. 8/21)	ND
<i>Enterococcus faecium</i> , VRE (ID č. 17/21)	R: ampicilin, nitrofurantoin, vankomycin, fosfomycin, teikoplanin; C/R: trimetoprim-sulfametoxazol; C: linezolid
<i>Enterococcus faecium</i> VRE, LINR (ID č. 18/21)	R: ampicilin, nitrofurantoin, trimetoprim-sulfametoxazol, vankomycin, linezolid, fosfomycin; C: daptomycin

ID č. – laboratorní identifikační číslo, ND – neurčeno, MRSA – meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, R – rezistence, C – citlivost, VRE – vankomycin-rezistentní enterokoky, VRSA – vankomycin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, C/R – intermediární citlivost, LINR – linezolid-rezistentní kmen.

Tabulka 16. Antibiogram vybraných klinických izolátů Gram-negativních bakterií.

Gram-negativní bakteriální kmen (ID č.)	Profil citlivosti/rezistence
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ID č. 13/21)	R: trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol, cefuroxim-axetil po, cefuroxim iv, ampicilin, cefotaxim, amoxicilin klavulanát, ceftazidim, cefepim, ciprofloxacín, gentamicin, piperacilin-tazobaktam, kolistin; C: mecilinam po, cefoxitin, amikacin, imipenem, meropenem, ceftolozan-tazobaktam, ceftazidim-avibaktam, temocilin.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ID č. 14/21)	R: ampicilin, cefotaxim, amoxicilin klavulanát, ceftazidim, cefepim, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacín, piperacilin-tazobaktam; C: cefoxitin, gentamicin, amikacin, kolistin, imipenem, meropenem, ceftolozan-tazobaktam, ceftazidim-avibaktam, temocilin.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ID č. 15/21)	R: ampicilin, cefotaxim, amoxicilin klavulanát, ceftazidim, cefepim, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacín, piperacilin-tazobaktam; C: cefoxitin, gentamicin, amikacin, kolistin, imipenem, meropenem, ceftolozan-tazobaktam, ceftazidim-avibaktam, temocilin.

ID č. – laboratorní identifikační číslo, R – rezistence, C – citlivost.

4.4.3.3. Screening antimikrobní aktivity látek NMA5 a NMA12

Screening antibakteriální aktivity

Ke studiu antibakteriální aktivity látek NMA5 a NMA12 vůči referenčním kmenům a bakteriálním klinickým izolátům byla využita mikrodiluční bujónová metoda uspořádaná do 96-jamkové mikrotitrační destičky odpovídající instrukcím EUCAST [149]. Postup hodnocení se shoduje s metodikou uvedenou v kapitole 4.3.3.3. Cíle B. Lišily se pouze studované látky. MIC byla vyhodnocena vizuálně a prostřednictvím spektrofotometrického měření (530 nm, Synergy HTX Multi-Mode Microplate reader, BioTek, USA). Experimenty byly prováděny v duplikátu.

Screening antimykobakteriální aktivity

Vyhodnocení antibakteriální aktivity látek NMA5 a NMA12 vůči referenčním kmenům mykobakterií probíhalo rovněž s využitím mikrodiluční bujónové metody v mikrotitrační destičce. Kultivace mykobakterií a příprava roztoků studovaných látek probíhaly obdobně jako v kapitole 4.3.3.3 a podle EUCAST [151]. Odlišoval se pouze typ studovaných derivátů a skladba zařazených referenčních kmenů. Zde *Mycolicibacterium smegmatis* (DSMZ 43465, ATCC 607), *Mycolicibacterium aurum* (DSMZ 43999, ATCC 23366) a *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ITM-M006710 (ATCC 9431). MIC byla hodnocena vizuálně a fluorimetricky s využitím metabolického indikátoru AlamarBlue (Thermo Fisher Scientific, USA, $\lambda_{\text{Ex}} = 528 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{Em}} = 585 \text{ nm}$) po 48 h až 120 h inkubace (dle použitého kmene). Experimenty byly prováděny v duplikátu.

Antifungální aktivita

Také screening aktivity látek NMA5 a NMA12 vůči kvasinkám a plísním probíhal v mikrodilučním uspořádání dle instrukcí EUCAST [152, 153]. Příprava studovaných látek i kultivace fungálních kmenů probíhala obdobně jako v kapitole 4.3.3.3. Cíle B, zde s deriváty montaninového typu. Výsledky screeningu byly vyhodnoceny vizuálně a pomocí spektrofotometrického měření (530 nm, Synergy HTX Multi-Mode Microplate reader, BioTek, USA). Experimenty byly prováděny v duplikátu.

4.4.3.4. Stanovení aktivity látek NMA5 a NMA12 vůči bakteriálním klinickým izolátům

K hodnocení antibakteriální aktivity látek NMA5 a NMA12 bylo využito 19 Gram-pozitivních a 3 Gram-negativní bakteriální klinické izoláty. Kmeny byly izolovány z klinického materiálu a identifikovány na ÚKM FNHK. V experimentu bylo využito mikrodiluční bujónové metody ve formátu 96-jamkové destičky dle stanov EUCAST [149] a postup práce se shodoval s postupem uvedeným v kapitole 4.3.3.4. K hodnocení výsledné MIC byla rovněž využita vizuální kontrola, spektrofotometrické měření (530 nm, Synergy HTX Multi-Mode Microplate reader, BioTek, USA) a fluorimetrické měření pomocí metabolického indikátoru AlamarBlue (Thermo Fisher Scientific, USA, $\lambda_{Ex} = 528 \text{ nm}$ a $\lambda_{Em} = 585 \text{ nm}$)

4.4.3.5. Hodnocení *in vitro* cytotoxicity látky NMA12 s využitím buněčné linie HK-2

Screening cytotoxicity látky NMA12 probíhal na Katedře biofyziky a fyzikální chemie FAF UK. V rámci metodiky byla opět využita esej CellTiter 96 (Promega, USA), jež kolorimetricky hodnotí redukci tetrazoliového barviva v živých buňkách. Postup eseje je blíže popsán v kapitole 4.3.3.8. Látka NMA12 byla připravena ve finálních koncentracích 0,0001, 1, 5, 10, 25, 50 a 100 μM . Vyšší hodnoty koncentrací byly vyřazeny z důvodu nedostatečné rozpustnosti látky. Výsledky experimentu jsou vyjádřeny prostřednictvím hodnoty IC_{50} vyhodnocené v softwaru GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., USA).

4.4.3.6. Screening *in vivo* toxicity látky NMA12 s využitím bezobratlého zvířecího modelu

Larvy modelového organismu (*Galleria mellonella*) byly odchovány v mikrobiologické laboratoři Katedry biologických a lékařských věd FAF UK dle postupů publikovaných v práci Haydak *et al.*, 1936 [155]. Do studie byly zahrnuty pouze plně vitální krémově zbarvené larvy o hmotnosti 300-320 mg. Příprava látky NMA12 odpovídala postupu popsanému v kapitole 4.3.3.9. Lišily se podávané dávky (zde 43,640 mg/kg tělesné váhy; 148,400 mg/kg tělesné váhy; 237,93 mg/kg a 475,600 mg/kg tělesné váhy). Roztoky látky NMA12 byly larvám podány injekčně do hemocoelu přes poslední levou panožku pomocí Hamiltonovy stříkačky v objemu 10 μ l. Inkubace poté probíhala obdobně, tedy v Petriho miskách při 37 °C. Stav larev byl taktéž monitorován v 5 intervalech v průběhu 120 h od podání a smrt byla definována jako úplná ztráta pohyblivosti i po fyzické stimulaci zvířete. K vyhodnocení LD₅₀ bylo využito programu GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., USA), v němž byla vypočtena mortalita v rámci každé závislosti dávky a času pomocí Kaplan-Meierových křivek.

4.4.3.7. Studium vlivu kombinace vybraných ATB a látky NMA12 na antimikrobní aktivitu – Checkerboard studie

Ke screeningu interakce mezi látkou NMA12 a komerčně dostupnými ATB bylo využito metody popsané v kapitole 4.3.3.10., tedy mikrodiluční bujónové Checkerboard studie uspořádané do Honeycomb destičky (Oy Growth Curves, Finsko). Na základě klinické relevance byla tentokrát do experimentu zařazena níže uvedená ATB rozpuštěná v DMSO (vše Merck, USA) a následně ředěná dvojkovou ředící řadou na požadované koncentrace, tedy:

- NMA12: 256,970-1,844 μ g/ml
- CIP: 2,048-0,0004 μ g/ml
- VAN: 32-0,063 μ g/ml
- LIN: 64-0,125 μ g/ml
- RIF: 0,080-0,00016 μ g/ml
- SXT: 32-0,063 μ g/ml
- TGC: 187,400-0,336 μ g/ml

Takto připravené látky byly následně pipetovány do Honeycomb destičky dle schématu na Obrázku 12 po 100 a 100 μ l, tedy v poměru 1 : 1 (NMA12 – vertikálně a ATB – horizontálně). Dalším krokem byla inokulace jamek 10 μ l suspenze referenčního kmene bakterie MRSA (ATCC 43300) připravené v CAMHB (Merck, USA) o finální koncentraci počátečního inokula $\approx 5 \times 10^5$ CFU/ml. Každá destička obsahovala pozitivní kontrolu (referenční kmen bakterie MRSA v médiu CAMHB) a negativní kontrolu (médiu CAMBH a DMSO). Měření probíhalo kontinuálně každých 15 minut během inkubace destiček v přístroji Bioscreen C (Oy Growth Curves, Finsko) při 36,8 °C po dobu 20 h. OD byla zaznamenávána při 580 nm. Po inkubaci bylo vypočtena procentuální inhibice růstu bakterií v porovnání s pozitivní kontrolou. Hodnoty pozadí byly odečteny. Po uplynutí 20 h byly destičky též vyhodnoceny vizuálně a s využitím metabolického indikátoru AlamarBlue (Thermo Fisher Scientific, USA). K interpretaci výsledků byla opět využita veličina FICI vyjádřená jako $FICI = FIC_{NMA12} + FIC_{ATB}$. FIC_{NMA12} a FIC_{ATB} hodnoty byly vypočteny následovně: FIC_{NMA12} nebo $FIC_{ATB} = MIC_{NMA12}$ (nebo MIC_{ATB}) v kombinaci / MIC_{NMA12} (nebo MIC_{ATB}) samostatné látky. Výsledky FICI byly definovány následovně: $FICI \leq 0,5$ – synergický efekt; $0,5 < FICI \leq 1$ – aditivní efekt; $1 < FICI \leq 4$ – indiferentní efekt; a $FICI > 4$ – antagonistický efekt.

4.4.3.8. Statistická analýza

Screening *in vivo* toxicity zahrnoval 84 jedinců ($n = 7$). Všechny výstupní údaje byly analyzovány pomocí softwaru GraphPad Prism verze 9.0 (GraphPad Software, Inc., USA). Data z experimentů byla podrobena log-rank Mantel-Coxovu testu (porovnání křivek). Výsledky byly ve všech analýzách definovány jako významné při hodnotě $p < 0,05$.

4.4.4. Výsledky a diskuze

Derivatizace látek přírodního původu je jednou ze strategií výzkumu nových AML. Strukturně obměňované AA jsou často předmětem zájmu pro své široké spektrum biologických aktivit. U některých byl prokázán též antimikrobní potenciál. Analogy lykorinu v práci Tan *et al.*, 2011 vykazovaly antibakteriální aktivitu vůči klinickým izolátům bakterie *Flavobacterium columnare* [178]. Antimykobakteriální účinnost vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra pro změnu ukázali autoři Maafi *et al.*, 2021 u svých synteticky upravených AA [179].

Série strukturně podobných derivátů montaninu byla podrobena základnímu screeningu antimikrobní aktivity též na Katedře biologických a lékařských věd FAF UK. Dva deriváty projevíly v této pilotní studii slibnou účinnost vůči některým referenčním bakteriím a byly označeny za kandidáty pro podrobnější zkoumání. Tyto kandidátní sloučeniny odpovídají vzorcům 2-O-(3,5-dimethoxybenzoyl)-3-O-methylpankracin a 2-O-(3-methoxybenzoyl)-3-O-methylpankracin a jsou označeny pracovními kódy NMA5 a NMA12. Příprava derivátů probíhala na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky FAF UK.

4.4.4.1. Screening antimikrobní aktivity látek NMA5 a NMA12

Pro pilotní hodnocení antimikrobního potenciálu kandidátních montaninových derivátů bylo využito 8 sbírkových bakteriálních kmenů, 4 Gram-pozitivní a 4 Gram-negativní. Nejnižší MIC byly odhaleny vůči referenčním kmenům stafylokoků. Látka NMA5 vykazovala nejvyšší aktivitu vůči kmenu SA (ATCC 29213; 7,813-31,250 μM) a vůči kmenu MRSA (ATCC 4300; 7,813-31,250 μM). Též vůči bakterii SE (ATCC 12228) obstála látka NMA5 s povzbudivou aktivitou 15,625-31,250 μM . Látka NMA12 odhalila velice slibnou aktivitu vůči kmenu SA (ATCC 29213; 3,906-15,625 μM). Aktivity minimálně 15,625 μM vykazovala látka NMA12 též vůči referenčním kmenům MRSA (ATCC 43300) a SE (ATCC 12228). Zajímavým výsledkem jsou rovněž hodnoty MIC obou derivátů ($\text{MIC}_{\text{NMA5}} = 31,250\text{-}125 \mu\text{M}$ a $\text{MIC}_{\text{NMA12}} = 31,250\text{-}62,500 \mu\text{M}$) naměřené vůči sbírkovému kmenu EF (ATCC 29212).

Ze skupiny referenčních Gram-negativních bakterií byl látkami NMA5 a NMA12 nejvíce ovlivněn sbírkový kmen KP ($MIC_{NMA5} = 31,250-62,500 \mu M$; $MIC_{NMA12} = 15,625-62,500 \mu M$). Kompletní výsledky úvodního screeningu aktivity látek NMA5 a NMA12 vůči osmi referenčním kmenům bakterií jsou uvedeny v Tabulce 17.

Do screeningu antibakteriální aktivity byly též zařazeny sbírkové kmeny mykobakterií. Látky NMA5 i NMA12 vykázaly v tomto experimentu vůči referenčním zástupcům aktivity v rozsahu od $7,374 \mu M$ do $14,748 \mu M$. Konkrétní data jsou uvedena v Tabulce 18. Hodnocení antimykobakteriální aktivity bylo provedeno ve spolupráci s PharmDr. Ondřejem Jandourkem, Ph.D.

Měření antifungální aktivity látek NMA5 i NMA12 naopak výraznější aktivitu neodhalilo. MIC_{NMA12} vůči všem osmi referenčním fungálním kmenům odpovídala hodnotě $> 125 \mu M$. Nejnižší MIC_{NMA5} , tedy $250 \mu M$, byla odhalena vůči kvasince *Candida krusei* a vláknité houbě *Trichophyton interdigitale* (data v Tabulce 19).

Na základě screeningu antimikrobního potenciálu látek NMA5 a NMA12 je možno oba montaninové deriváty označit jako slibné kandidáty pro další zkoumání v oblasti antibakteriální aktivity. Zejména jejich účinnost vůči stafylokokům a EF a KP, jež se řadí mezi bakterie skupiny ESKAPE, je nezanedbatelná. Z tohoto důvodu byly tyto dva deriváty vybrány pro pokročilá hodnocení. Základní screening přinesl poznatek, že antimikrobní aktivita studovaných látek je cílena výhradně na bakterie.

Tabulka 17. Přehled antibakteriální aktivity látek NMA5 a NMA12 vůči vybraným sbírkovým kmenům Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií. V eseji bylo užito mikrodiluční bujónové metody dle doporučení EUCAST [149]. MIC byla hodnocena vizuální inspekcí a spektrofotometricky při vlnové délce 530 nm po 24 h inkubace při teplotě 35 ± 2 °C.

Bakteriální kmen (sbírkové číslo dle ATCC)	MIC NMA5 (µM) 24 h	MIC NMA12 (µM) 24 h	MIC CIP (µM) 24 h
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	7,813-31,250	3,906-15,625	0,0384-1,536
<i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA (ATCC 43300)	7,813-31,250	15,625-62,500	0,0768-1,536
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	15,625-31,250	15,625-31,250	0,768
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	31,250-125	31,250-62,500	3,072
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	> 125	> 125	1,536-3,072
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	31,250-62,500	15,625-62,500	1,536
<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC 19606)	> 125	> 125	3,027
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	> 125	> 125	0,768

ATCC – Americká sbírka kultur, MIC – minimální inhibiční koncentrace, CIP – ciprofloxacin, MRSA – meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*.

Tabulka 18. Přehled antibakteriální aktivity látek NMA5 a NMA12 vůči vybraným kmenům mykobakterií. V eseji bylo užito mikrodiluční bujónové metody dle doporučení EUCAST [151]. MIC byla hodnocena vizuální inspekci a fluorimetricky s využitím metabolického indikátoru AlamarBlue ($\lambda_{Ex} = 528 \text{ nm}$ a $\lambda_{Em} = 585 \text{ nm}$) po 48 h až 120 h (dle použitého kmene) při teplotě $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Bakteriální kmen (sbírkové číslo dle ATCC)	MIC NMA5 (μM)	MIC NMA12 (μM)	MIC CIP (μM)
	48 h - 120 h	48 h - 120 h	45 h – 120 h
<i>Mycolicibacterium smegmatis</i> (ATCC 607)	7,374	7,374	0,384
<i>Mycolicibacterium aurum</i> (ATCC 23366)	7,374	14,748	0,048
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra (ATCC 9431)	7,374	14,748	0,768

ATCC – Americká sbírka kultur, MIC – minimální inhibiční koncentrace, CIP – ciprofloxacin.

Tabulka 19. Přehled antifungální aktivity látek NMA5 a NMA12 vůči vybraným mykotickým sbírkovým kmenům. V eseji bylo užito mikrodiluční bujónové metody dle doporučení EUCAST [152, 153]. MIC byla hodnocena vizuální inspekcí a spektrofotometricky při vlnové délce 530 nm po 24 h a 48 h (v případě *Trichophyton interdigitale* 72 h a 120 h) při teplotě 35 ± 2 °C.

Mykotický kmen (sbírkové číslo dle ATCC)	MIC NMA5 (µM) 24 h / 48 h (72 h / 120 h)	MIC NMA12 (µM) 24 h / 48 h (72 h / 120 h)	MIC AMFOTERICIN B (µM) 24 h	MIC VORIKONAZOL (µM) 24 h
<i>Candida albicans</i> (ATCC 2443)	> 500 / >500	> 125 / > 125	1,082	> 45,806
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6258)	250 / 500	> 125 / > 125	1,082	> 45,806
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019)	500 / >500	> 125 / > 125	0,541	> 45,806
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 750)	>500 / > 500	> 125 / > 125	1,082	> 45,806
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305)	>500 / > 500	> 125 / > 125	4,329	2,863
<i>Aspergillus flavus</i> (CCM 8363)	>500 / > 500	> 125 / > 125	4,329	> 45,806
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (CCM 8077)	> 500 / > 500	> 125 / > 125	1,082	> 45,806
<i>Trichophyton interdigitale</i> (ATCC 953)	250 / 500	> 125 / > 125	1,082	> 45,806

ATCC – Americká sbírka kultur, MIC – minimální inhibiční koncentrace, CCM – Česká sbírka mikroorganismů.

4.4.4.2. Aktivita látek NMA5 a NMA12 vůči bakteriálním klinickým izolátům

Výběr Gram-pozitivních a Gram-negativních klinických izolátů v rámci pokročilé studie bakteriální aktivity dvou vybraných derivátů montaninového typu byl odvozen dle výsledků úvodního screeningu. Do navazujícího experimentu bylo proto vybráno hned 13 klinických izolátů bakterie rodu *Staphylococcus* (z toho 4 koaguláza-negativní druhy, CoNS). Zbytek Gram-pozitivních bakterií byl tvořen enterokoky. Na základě poměrně nízkých MIC kandidátních derivátů naměřených vůči této bakterii byly do studie zařazeny též 3 Gram-negativní bakterie rodu *Klebsiella*. Bakteriální kmeny byly izolovány a taxonomicky zařazeny na ÚKM FNHK. Vypracované antibiogramy některých takto využitých izolátů jsou uvedeny v Tabulkách 15 a 16.

Hodnocení antibakteriální aktivity vůči bakteriálním klinickým izolátům probíhalo s využitím mikrodiluční bujónové metody, v níž byla zcela potvrzena anti-stafylokoková aktivita obou látek. Nejnižší MIC_{NMA5}, konkrétně 15,625 μM , byla naměřena vůči kmenu *Staphylococcus haemolyticus* (111/16) izolovaného z močového katetru. MIC_{NMA5} = 31,250 μM byla zjištěna vůči kmenům SA (141/16, stěr z oka) a dvou kmenů MRSA (153/16 a 154/16) izolovaných z hrtanu a bronchoalveolární laváže.

I látka NMA12 vykazovala nejvyšší aktivitu vůči stafylokokům. MIC_{NMA12} vůči SA (141/16) odpovídá hodnotě 7,813 μM . Nízká hodnota MIC_{NMA12} (15,625 μM) byla též naměřena vůči kmeni MRSA (153/16).

Na druhou stranu, aktivita látky NMA5 ani NMA12 nebyla potvrzena vůči enterokokům (Tabulka 20). Stejně tak nebyl potvrzen slibný potenciál vůči dalšímu zástupci skupiny ESKAPE, klebsielám, (Tabulka 21), což mohlo být způsobeno například širokým profilem rezistence těchto tří použitých kmenů Gram-negativních bakterií (Tabulka 16). O to více však výsledky antibakteriální aktivity poukazují na význam zařazení MR klinických izolátů ve výzkumu kandidátních anti-infektiv. Data získaná z předběžného screeningu jsou příslibem antimikrobní aktivity kandidátních látek. Vždy je však za potřebí výsledky confirmovat navazující studií aktivity vůči klinickým izolátům bakterií zvolených tak, aby výsledná data korelovala s aktuální

epidemiologickou situací a stavem AMR. Kompletní výsledky hodnocení antibakteriální aktivity NMA5 a NMA12 jsou zahrnuty v Tabulkách 20 a 21.

Tabulka 20. Antibakteriální aktivita látek NMA5 a NMA12 vůči klinickým izolátům Gram-positivních bakterií. Do eseje byla rovněž zahrnuta vnitřní kontrola kvality ve formě referenční bakterie *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) a standard ciprofloxacin. Antibakteriální aktivita byla hodnocena mikrodiluční bujónovou metodou v souladu s instrukcemi EUCAST [149]. MIC byla hodnocena vizuálně, spektrofotometricky při vlnové délce 530 nm a fluorimetricky s využitím metabolického indikátoru AlamarBlue (λ_{Ex} = 528 nm a λ_{Em} = 585 nm) po 24 h inkubace při teplotě $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Bakteriální kmen (ATCC/ID č.)	Klinický původ	MIC NMA5 (μM)	MIC NMA12 (μM)	MIC CIP (μM)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	Sbírkový kmen	7,813-31,250	3,906-15,625	0,384-1,536
<i>Staphylococcus capitis</i> (74/16)	Periferní žilní katétr	62,500	31,250	3,072
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (111/16)	Močový katétr	15,625	62,500	3,072
<i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA (131/16)	Výtěr z hrtanu	62,500	31,250	6,144
<i>Staphylococcus aureus</i> (136/16)	Výtěr z hrtanu	62,500	62,500	0,768
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> , MRSA (138/16)	Sputum	62,500	62,500	> 6,144
<i>Staphylococcus aureus</i> (141/16)	Stěr oka	31,250-62,500	7,813	1,536
<i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA (153/16)	Výtěr z hrtanu	31,250	15,625	> 6,144
<i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA (154/16)	Bronchoalveolární laváž	31,250	31,250-62,500	> 6,144
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (196/16)	Drén	500	62,500	> 6,144
Vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus faecium</i> (198/16)	Močový katétr	>500	> 500	3,072
Vankomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> , VRSA (206/16)	ND	62,500	62,500	0,384
<i>Staphylococcus hominis</i> (109/18)	Centrální žilní katétr	62,500	62,500	6,144
Vankomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (SZÚ)	SZÚ	62,500	62,500	0,768
Vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus faecalis</i> , VRE (2/21)	ND	> 250	> 250 (62,500)	1,536
Vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus faecalis</i> , VRE (7/21)	ND	> 250	> 250 (15,625)	ND
Vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus faecalis</i> , VRE (8/21)	ND	> 250	> 250	6,144
Vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus faecium</i> , VRE (17/21)	Moč	> 250	> 250	> 250
Vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus faecium</i> , VRE, LINR (18/21)	Moč	> 250	> 250	> 250

ATCC – Americká sbírka kultur, ID č. – laboratorní identifikační číslo, MIC – minimální inhibiční koncentrace, CIP – ciprofloxacin, MRSA – meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, VRSA – vankomycin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, ND – neurčeno, SZÚ – Státní zdravotní ústav, VRE – vankomycin-rezistentní enterokoky, LINR – linezolid-rezistentní kmen.

Tabulka 21. Antibakteriální aktivita NMA5 a NMA12 vůči klinickým izolátům Gram-negativních bakterií. Do eseje byla rovněž zahrnuta vnitřní kontrola kvality ve formě referenční bakterie *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) a standard ciprofloxacin. Antibakteriální aktivita byla hodnocena mikrodiluční bujónovou metodou v souladu s instrukcemi EUCAST [149]. MIC byla hodnocena vizuálně, spektrofotometricky při vlnové délce 530 nm a fluorimetricky s využitím metabolického indikátoru AlamarBlue ($\lambda_{Ex} = 528$ nm a $\lambda_{Em} = 585$ nm) po 24 h inkubace při teplotě $35 \pm ^\circ\text{C}$.

Bakteriální kmen (ATCC/ID č.)	Klinický původ	MIC NMA5 (μM)	MIC NMA12 (μM)	MIC CIP (μM)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	Sbírkový kmen	31,250-62,500	31,250-62,500	1,536-3,072
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ID č. 13/21)	Moč	> 500	> 500	> 6,144
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ID č. 14/21)	Rektální stěr	> 500	> 500	6,144
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ID č. 15/21)	Rektální stěr	> 500	> 500	6,144

ATCC – Americká sbírka kultur, MIC – minimální inhibiční koncentrace, ID č. – laboratorní identifikační číslo, CIP – ciprofloxacin.

Látky NMA5 a NMA12 zjevně cílí na užší spektrum bakterií. A ač je větší počet současných studií zaměřen na výzkum AML aktivních vůči Gram-negativním bakteriím, anti-stafylokokový účinek NMA5 a NMA12 je povzbudivý. Nízké až středně nízké MIC těchto látek mohou být premisou jejich možného uplatnění ve formě adjuvans v anti-stafylokokové terapii. Kmeny MRSA a VRSA jsou řazeny mezi bakterie, jejichž záchyt byl zvýšen v souvislosti s nárůstem počtu hospitalizovaných pacientů v průběhu pandemie COVID-19. Právě na suchých neživých površích v nemocničních zařízeních jsou tyto bakterie schopny perzistovat bez problémů i několik měsíců. Tato úklidem mnohdy přehlížená místa (typicky kliky dveří, vypínače světel či elektronika) pak mohou být, kromě nemocných pacientů či personálu, zdrojem nozokomiálních infekcí. Onemocnění vyvolaná nozokomiálními kmeny doprovází zvýšená mortalita a extrémně závažné ekonomické dopady spojené například s prodlouženou dobou hospitalizace a rekonvalescence pacientů nebo se zvýšenou indikací chirurgických zákroků [180, 181].

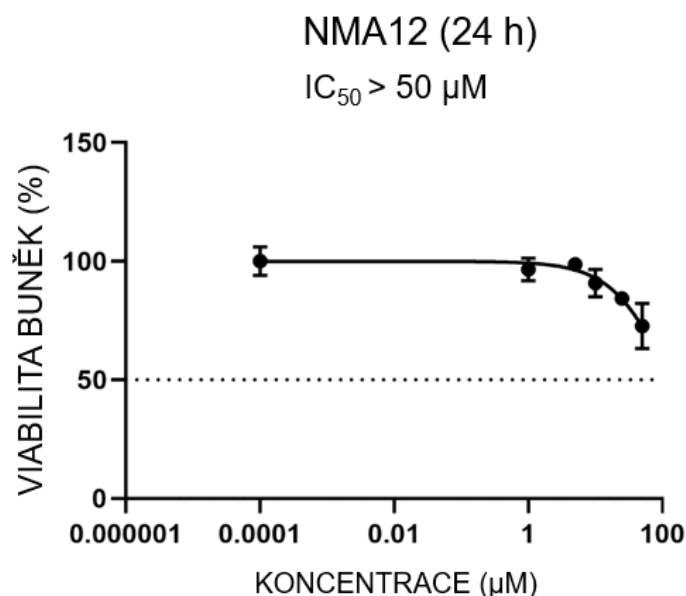
Za zmínku též stojí aktivita obou derivátů vůči zařazeným kmenům CoNS (*Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus hominis*). Význam jimi vyvolaných infekcí je často přehlížen, ač se také řadí mezi časté původce nozokomiálních nákaz. Celosvětový stav AMR se výrazně projevil i v této heterogenní skupině stafylokoků. Například autoři práce Rocchetti *et al.*, 2018 odhalili rezistenci vůči penicilinovému ATB oxacilinu u 82,5 % z 286 klinických izolátů CoNS [182]. Výjimkou není ani rezistence CoNS vůči ATB dalších skupin, například VAN či SXT [183, 184]. Jako ATB účinná vůči CoNS se zatím jeví například TGC či LIN. Je proto nezbytné dosavadní aktivitu těchto rezervních ATB chránit [185].

Jak již bylo zmíněno, rozpustnost kandidátních látek ve vodném prostředí je významným parametrem pro předpoklad zařazení látky do výzkumu nových léčiv. Vysoká rozpustnost v hydrofilních rozpouštědlech navíc eliminuje nutnost užití potenciálně škodlivých rozpouštědel i během *in vitro* hodnocení [186]. Omezená rozpustnost látek NMA5 a NMA12 však byla pozorována při koncentracích < 500 μ M. Vzhledem ke slibným výsledkům hodnocení MIC_{NMA5} i MIC_{NMA12} vůči klinickým izolátům byly v rámci této studie navrženy různé optimalizační postupy ve snaze zvýšit rozpustnost látek ve vodných kultivačních médiích, včetně úpravy struktury látek do formy hydrochloridových solí, zvýšení poměru rozpouštědla

DMSO při hodnocení MIC či zařazení sonikačních kroků při rozpouštění látek ve vodném prostředí. Na základě relativně příznivější anti-stafylokokové aktivity a rozpustnosti ve vodném prostředí bylo nakonec rozhodnuto, že do následujících hodnocení bude zařazen pouze derivát montaninového typu značený NMA12. Molekuly vybraných derivátů budou na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky dále modifikovány s cílem zvýšit jejich biologickou dostupnost.

4.4.4.3. Toxicita látky NMA12

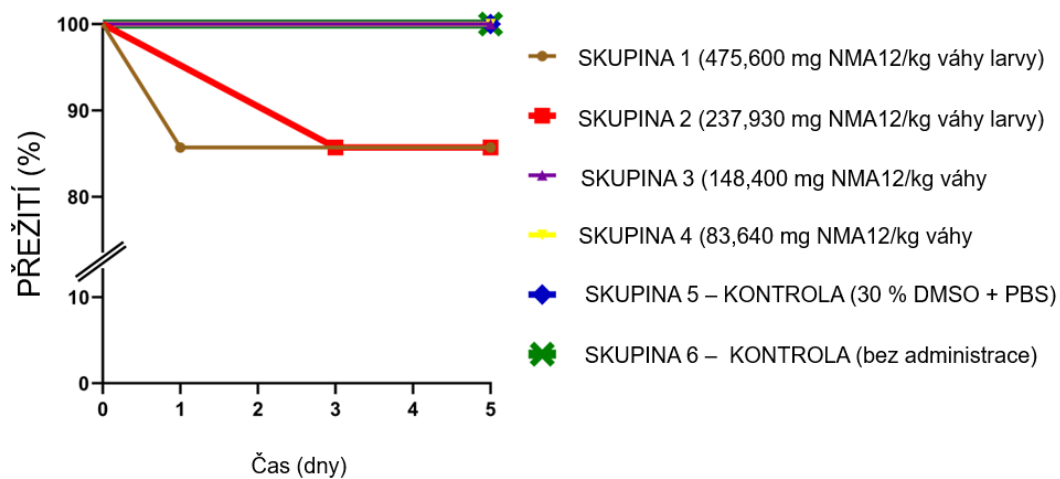
Jedním z dalších hodnocených aspektů kandidátních antimikrobních léčiv je toxicita. Derivát NMA12 byl podroben hodnocení cytotoxicity v režimu *in vitro* vůči buněčné linii HK-2, k čemuž byla zvolena metoda založená na principu kolorimetrického hodnocení redukce tetrazoliového barviva v životaschopných buňkách po expozici látkou NMA12. Obrázek 24 demonstruje výsledky měření. Je zjevné, že hodnota toxikologického parametru IC_{50} je větší než 50 μ M. Cytotoxicitu při vyšších koncentracích látky však nebylo možno vyhodnotit z důvodu nedostatečné rozpustnosti derivátu NMA12 v Dulbecco's Modified Eagle's – high glucose médiu (Merck, USA). Hodnocení cytotoxicity bylo provedeno na Katedře biofyziky a fyzikální chemie FAF UK.



Obrázek 24. Hodnocení cytotoxicity látky NMA12 *in vitro* vůči buněčné linii HK-2. Cytotoxický efekt byl vyjádřen jako IC₅₀, tedy koncentrace látky NMA12, která vyvolala cytotoxický efekt u 50 % buněk. Parametr IC₅₀ byl vypočten s využitím programu GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., USA).

In vivo toxicita látky NMA12 byla posuzována s využitím bezobratlého zvířecího modelu, *Galleria mellonella*. Larvy byly rozděleny do skupin dle hmotnosti podané látky na kg hmotnosti zvířete. Dávky byly připraveny dle rozpustnosti derivátu NMA12 (83,640-475,600 mg NMA12/kg tělesné hmotnosti) a podávány injekčně přímo do hemocoelu skrze poslední levou panožku. Jak je prezentováno na Obrázku 25 a v Tabulce 22, smrt byla zaznamenána po 24 h v první a po 72 h druhé skupině a v obou případech bylo dosaženo mortality 14,290 %. Kaplan-Meierova křivka na Obrázku 25 též prezentuje, že LD₅₀, tedy dávka, při níž došlo ke smrti 50 % zvířat, nebyla dosažena v žádné ze skupin. LD₅₀ tedy odpovídá hodnotě > 475,600 mg/kg látky NMA12. Dle kategorizace publikované například v práci Ignasiak *et al.*, 2017 [89] lze proto NMA12 zařadit do skupiny látek s nízkým toxickým rizikem (GHS skupina IV). Data z hodnocení toxicity *in vivo* byla též analyzována statisticky pomocí párového Log-rank Mantel-Coxova testu (Tabulka P3, Příloha). Po injekčním podání derivátu NMA12 nebyl zpozorován žádný statisticky významný jev v přežívání všech zařazených skupin. Hodnocení *in vivo* toxicity látky NMA12 probíhalo ve spolupráci s RNDr. Klárou Konečnou, Ph.D.

INJEKČNÍ PODÁNÍ NMA12 DO HEMOCOELU



Obrázek 25. Kaplan-Meierova křivka přežití zvířecího modelu *Galleria mellonella* po injekčním podání látky NMA12 do hemocoelu. Larvy inkubovány při teplotě 37 °C a jejich stav byl hodnocen 24, 48, 72, 96 a 120 h po podání.

Tabulka 22. Hodnocení *in vivo* toxicity látky NMA12 s využitím zvířecího modelu *Galleria mellonella*. Výsledky po injekčním podání látky NMA12 do hemocoelu larvy. Vizuální inspekce larev inkubovaných při teplotě 37 °C probíhala 24, 48, 72, 96 a 120 h po podání.

Podaná dávka dle skupiny (mg/kg tělesné váhy)	mg/kg tělesné hmotnosti larev								Kontrolní skupina (10 ml PBS + 30% (v/v) DMSO)	Kontrolní skupina (bez podání)
	475,600		237,930		148,400		83,640			
Hodiny (Vizuální inspekce)	Počet přeživších larev	Mortalita (%)*	Počet přeživších larev	Mortalita (%)*	Počet přeživších larev	Mortalita (%)*	Počet přeživších larev	Mortalita (%)*	Počet přeživších larev	Mortalita (%)*
0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0
24	6	14,290	7	0	7	0	7	0	7	0
48	6	14,290	7	0	7	0	7	0	7	0
72	6	14,290	6	14,290	7	0	7	0	7	0
96	6	14,290	6	14,290	7	0	7	0	7	0
120	6	14,290	6	14,290	7	0	7	0	7	0

(%)* – procentuální vyjádření mortality způsobené kandidátní látkou.

4.4.4.4. Studium vlivu kombinace vybraných ATB a látky NMA12 na antimikrobní aktivitu – Checkerboard studie

U polosyntetického derivátu montaninového typu, NMA12, byla v průběhu série experimentů prokázána velice slibná aktivita vůči stafylokokům a také nízká toxicita. V případě kombinační terapie se s výhodou užívá nižších koncentrací dvou či více AML, které při společném působení vedou ke stejné či dokonce vyšší inhibiční aktivitě vůči buňkám mikrobů. Synergický efekt *in vitro* s komerčně dostupným ATB by byl prospěšný vzhledem k ne zcela optimální rozpustnosti látky NMA12 ve vyšších koncentracích. Díky této kombinaci navíc může být ochráněna či znovuobnovena aktivita zvoleného ATB. V živém systému mohou být též omezeny jeho případné nežádoucí účinky.

Ke studiu vzájemných interakcí s látkou NMA12 bylo do mikrodiluční Checkerboard eseje zařazeno 6 komerčně dostupných klinicky relevantních ATB, preferenčně s odlišným mechanismem účinku. Jmenovitě byla k tomuto účelu zvolena ATB CIP (inhibice syntézy DNA), VAN (inhibice syntézy buněčné stěny), LIN (inhibice proteosyntézy – vazba na ribozomovou podjednotku 50S), RIF (inhibice DNA-dependentní RNA polymerasy), TGC (inhibice proteosyntézy – vazba na 30S podjednotku ribozomu), SXT (inhibice syntézy kyseliny listové). Jako referenční kmen byl do experimentu zařazen kmen MRSA (ATCC 43300).

Výsledky Checkerboard studie jsou uvedeny v Tabulce 23. Ve dvou kombinacích látek (LIN + NMA12 a TGC + NMA12) byla s využitím výpočtu FICI prokázána nejvýhodnější společná interakce, tedy synergický efekt, a to například v koncentračním poměru 0,741 μM LIN : 15,625 μM NMA12 (Tabulka 23c) či v poměru 0,016 μM TGC : 31,250 μM NMA12 (Tabulka 23f). Všechny další studované kombinace byly navíc v určitých koncentračních poměrech vyhodnoceny jako aditivní a v žádném ze zvolených koncentračních poměrů nebyl pozorován antagonistický efekt.

Tabulka 23. Indexy frakčních inhibičních koncentrací (FICI) vypočtené na základě výsledků Checkerboard studie s využitím kombinací **a.** ciprofloxacinu (CIP) + NMA12, **b.** vankomycinu (VAN) + NMA12, **c.** linezolidu (LIN) + NMA12, **d.** rifampicinu (RIF) + NMA12, **e.** trimetoprim-sulfametoxazolu (SXT) + NMA12, **f.** tigecyklinu (TGC) + NMA12 vůči referenčnímu kmeni bakterie MRSA (ATCC 43300). Minimální inhibiční koncentrace (MIC) samostatně působících látek odpovídaly:

- a.** MIC_{CIP} = 0,755 μM, MIC_{NMA12} = 125 μM
- b.** MIC_{VAN} = 0,345 μM, MIC_{NMA12} = 125 μM
- c.** MIC_{LIN} = 2,964 μM, MIC_{NMA12} = 125 μM
- d.** MIC_{RIF} = 0,006 μM, MIC_{NMA12} = 125 μM
- e.** MIC_{SXT} = 7,358 μM, MIC_{NMA12} = 125 μM
- f.** MIC_{TGC} = 0,132 μM, MIC_{NMA12} = 125 μM.

23a. KOMBINACE CIPROFLOXACIN + NMA12					
Koncentrační poměr CIP : NMA12 (μM)	Koncentrační poměr CIP : NMA12 (μg/ml)	FIC _{CIP}	FIC _{NMA12}	FICI	Efekt
0,006 : 62,500	0,002 : 29,496	0,008	0,500	0,508	Aditivita
0,012 : 62,500	0,004 : 29,496	0,016	0,500	0,516	Aditivita
0,024 : 62,500	0,008 : 29,496	0,032	0,500	0,532	Aditivita
0,047 : 62,500	0,016 : 29,496	0,064	0,500	0,564	Aditivita
0,094 : 62,500	0,032 : 29,496	0,128	0,500	0,628	Aditivita
0,189 : 62,500	0,064 : 29,496	0,256	0,500	0,756	Aditivita
0,377 : 62,500	0,128 : 29,496	0,512	0,500	1,012	Indiference
0,755 : 31,250	0,256 : 14,748	1,024	0,250	1,274	Indiference
0,755 : 15,625	0,256 : 7,374	1,024	0,125	1,149	Indiference
0,755 : 7,813	0,256 : 3,687	1,024	0,0625	1,087	Indiference
0,755 : 3,906	0,256 : 1,843	1,024	0,0312	1,055	Indiference
0,755 : 1,953	0,256 : 0,922	1,024	0,0156	1,040	Indiference

23b. KOMBINACE VANKOMYCIN + NMA12

Koncentrační poměr VAN : NMA12 (μ M)	Koncentrační poměr VAN : NMA12 (μ g/ml)	FIC _{VAN}	FIC _{NMA12}	FICI	Efekt
0,011 : 62,500	0,0156 : 29,496	0,031	0,500	0,531	Aditivita
0,022 : 62,500	0,0313 : 29,496	0,063	0,500	0,563	Aditivita
0,043 : 62,500	0,063 : 29,496	0,125	0,500	0,625	Aditivita
0,086 : 62,500	0,125 : 29,496	0,250	0,500	0,750	Aditivita
0,172 : 31,250	0,250 : 14,748	0,500	0,250	0,750	Aditivita
0,345 : 15,625	0,500 : 7,374	1,000	0,125	1,125	Indiference
0,345 : 7,813	0,500 : 3,687	1,000	0,063	1,063	Indiference
0,345 : 3,906	0,500 : 1,844	1,000	0,031	1,031	Indiference
0,345 : 1,953	0,500 : 0,922	1,000	0,016	1,016	Indiference
0,345 : 0,977	0,500 : 0,461	1,000	0,008	1,008	Indiference

23c. KOMBINACE LINEZOLID + NMA12

Koncentrační poměr LIN : NMA12 (μ M)	Koncentrační poměr LIN : NMA12 (μ g/ml)	FIC _{LIN}	FIC _{NMA12}	FICI	Efekt
0,185 : 62,500	0,063 : 29,496	0,063	0,500	0,563	Aditivita
0,371 : 62,500	0,125 : 29,496	0,125	0,500	0,625	Aditivita
0,741 : 62,500	0,250 : 29,496	0,250	0,500	0,750	Aditivita
1,482 : 31,250	0,500 : 14,748	0,500	0,250	0,750	Aditivita
1,482 : 15,625	0,250 : 7,362	0,500	0,125	0,625	Aditivita
0,741 : 15,625	0,500 : 7,362	0,250	0,125	0,375	Synergie
1,482 : 7,813	0,500 : 3,681	0,500	0,623	0,563	Aditivita
1,482 : 3,906	0,500 : 1,841	0,500	0,031	0,531	Aditivita
1,482 : 1,953	0,500 : 0,897	0,500	0,015	0,515	Aditivita

23d. KOMBINACE RIFAMPICIN + NMA12

Koncentrační poměr RIF : NMA12 (μ M)	Koncentrační poměr RIF : NMA12 (μ g/ml)	FIC _{RIF}	FIC _{NMA12}	FICI	Efekt
0,0001 : 62,500	0,00008 : 29,496	0,0156	0,500	0,516	Aditivita
0,0002 : 62,500	0,0002 : 29,496	0,0313	0,500	0,531	Aditivita
0,0004 : 62,500	0,0003 : 29,496	0,0625	0,500	0,563	Aditivita
0,001 : 62,500	0,0006 : 29,496	0,125	0,500	0,625	Aditivita
0,002 : 62,500	0,001 : 29,496	0,250	0,500	0,750	Aditivita
0,003 : 31,250	0,003 : 14,748	0,500	0,250	0,750	Aditivita
0,003 : 15,625	0,003 : 7,362	0,500	0,125	0,625	Aditivita
0,003 : 7,813	0,003 : 3,681	0,500	0,062	0,562	Aditivita
0,003 : 3,906	0,003 : 1,844	0,500	0,031	0,531	Aditivita
0,003 : 1,953	0,003 : 0,922	0,500	0,016	0,516	Aditivita

23e. KOMBINACE TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL + NMA12

Koncentrační poměr SXT : NMA12 (μ M)	Koncentrační poměr SXT : NMA12 (μ g/ml)	FIC _{SXT}	FIC _{NMA12}	FICI	Efekt
0,057 : 62,500	0,031 : 29,496	0,008	0,500	0,508	Aditivita
0,115 : 62,500	0,062 : 29,496	0,016	0,500	0,516	Aditivita
0,230 : 62,500	0,125 : 29,496	0,031	0,500	0,531	Aditivita
0,460 : 62,500	0,250 : 29,496	0,063	0,500	0,563	Aditivita
0,920 : 62,500	0,500 : 29,496	0,125	0,500	0,625	Aditivita
1,840 : 62,500	1 : 29,496	0,250	0,500	0,750	Aditivita
3,679 : 62,500	2 : 29,496	0,500	0,500	1,000	Aditivita
7,358 : 62,500	4 : 29,496	2,000	0,500	1,500	Indiference
14,717 : 62,500	8 : 29,496	2,000	0,500	2,500	Indiference
14,717 : 31,250	8 : 14,748	2,000	0,250	2,250	Indiference
14,717 : 15,625	8 : 7,374	2,000	0,125	2,125	Indiference
14,717 : 7,813	8 : 3,689	2,000	0,063	2,063	Indiference
14,717 : 3,906	8 : 1,844	2,000	0,031	2,031	Indiference
14,717 : 1,953	8 : 0,920	2,000	0,016	2,016	Indiference

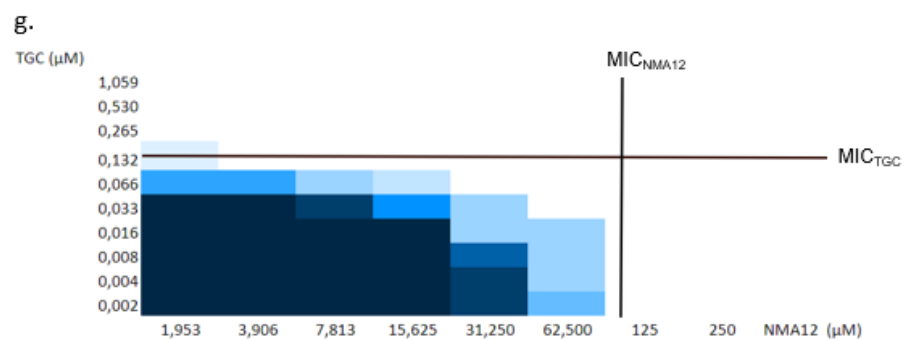
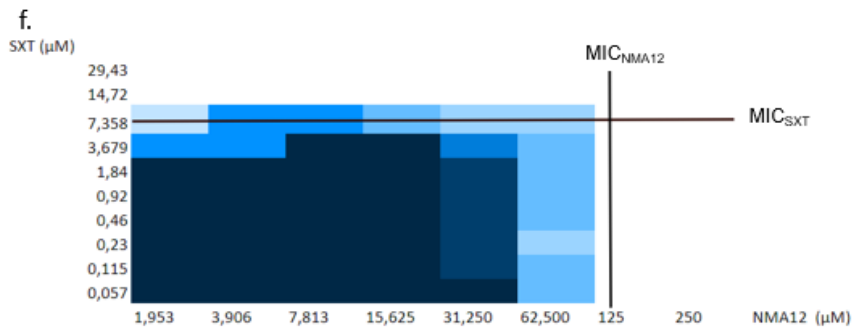
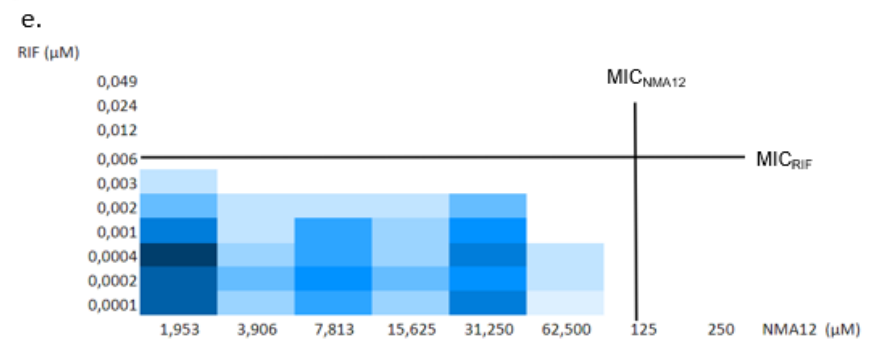
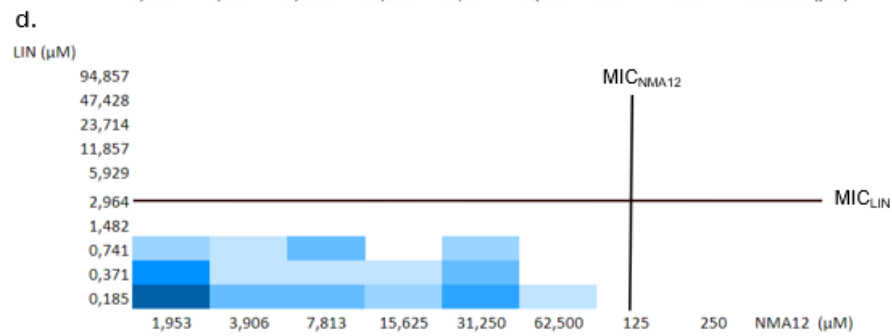
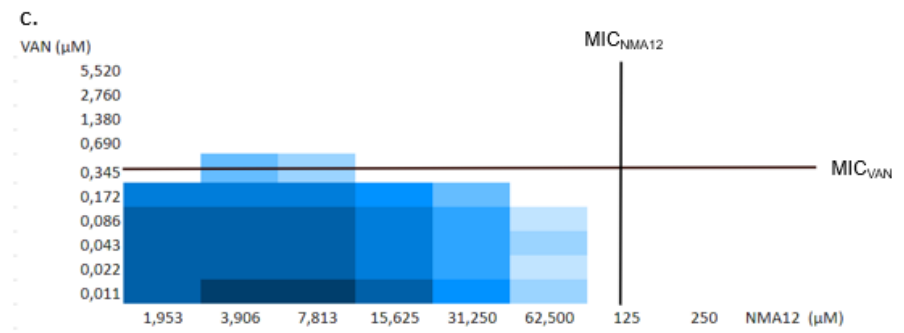
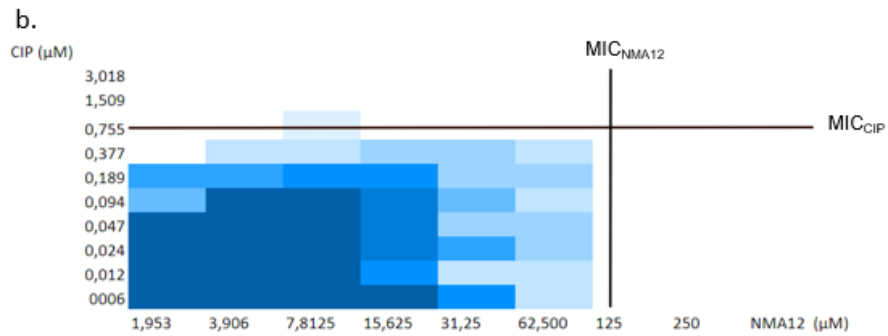
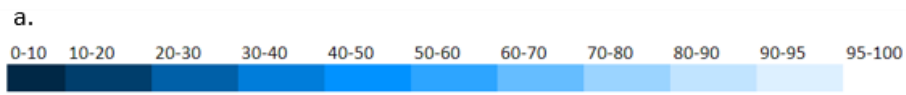
23f. KOMBINACE TIGECYKLIN + NMA12

Koncentrační poměr		Koncentrační poměr		FIC _{TGC}	FIC _{NMA12}	FICI	Efekt
TGC : NMA12 (μ M)	TGC : NMA12 (μ g/ml)						
0,002 : 62,500	0,001 : 29,496	0,016	0,500	0,516	Aditivita		
0,004 : 62,500	0,002 : 29,496	0,031	0,500	0,531	Aditivita		
0,008 : 62,500	0,004 : 29,496	0,063	0,500	0,563	Aditivita		
0,016 : 31,250	0,008 : 14,748	0,125	0,250	0,375	Synergie		
0,033 : 31,250	0,016 : 14,748	0,250	0,250	0,500	Synergie		
0,066 : 15,625	0,031 : 7,374	0,500	0,125	0,625	Aditivita		
0,132 : 7,813	0,063 : 3,687	0,500	0,063	0,563	Aditivita		
0,265 : 7,813	0,125 : 3,687	1,000	0,063	1,063	Indiference		
0,265 : 3,906	0,125 : 1,844	1,000	0,031	1,031	Indiference		
0,265 : 1,953	0,125 : 0,922	1,000	0,016	1,016	Indiference		

FIC – frakční inhibiční koncentrace, FICI – index frakčních inhibičních koncentrací, FIC_{CIP, VAN, LIN, RIF, SXT, TGC, NMA12} = MIC daného antibiotika či látky NMA12 v kombinaci / MIC daného antibiotika či látky NMA12 působící samostatně, FICI = FIC_{CIP, VAN, LIN, RIF, SXT, TGC} + FIC_{NMA12}. Efekt je interpretován dle kritéria: synergický efekt – FICI ≤ 0,5, aditivní efekt – 0,5 < FICI ≤ 1, indiferentní efekt – 1 < FICI ≤ 4, antagonistický efekt – FICI > 4.

Výsledky byly opět zpracovány také do grafické formy tzv. tepelných map (Obrázek 26). Lze z nich vyhodnotit, že NMA12 v případě kombinace s ATB LIN (26d) či RIF (26e) způsobuje výraznou inhibici sbírkového kmene bakterie MRSA (43300) i v sub-inhibičních koncentracích. Lze tedy předpokládat, že látka NMA12 potencuje účinek ATB LIN a RIF.

Z výsledků Checkerboard studií lze konstatovat, že NMA12, z hlediska antimikrobní aktivity, splňuje vybrané vlastnosti kandidátní látky s adjuvantním efektem využitelné v kombinační terapii stafylokokových infekcí.



Obrázek 26. Tepelné mapy výsledků Checkerboard studií. Procentuální inhibice růstu (v porovnání s pozitivní kontrolou) bakteriálního kmene meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) po 20 h expozice NMA12 při 37 °C v kombinaci s vybranými antibiotiky. **a.** barevné spektrum procentuální inhibice, **b.** Látka NMA12 v kombinaci s ciprofloxacinem (CIP), **c.** vankomycinem (VAN), **d.** linezolidem (LIN), **e.** rifampicinem (RIF) **f.** trimetoprim-sulfametoxazolem (SXT) a **g.** tigecyklinem (TGC). Minimální inhibiční koncentrace (MIC) samotných sloučenin (vyjádřena čarou) odpovídá:

b. $MIC_{CIP} = 0,755 \mu M$, $MIC_{NMA12} = 125 \mu M$

c. $MIC_{VAN} = 0,345 \mu M$, $MIC_{NMA12} = 125 \mu M$

d. $MIC_{LIN} = 2,964 \mu M$, $MIC_{NMA12} = 125 \mu M$

e. $MIC_{RIF} = 0,006 \mu M$, $MIC_{NMA12} = 125 \mu M$

f. $MIC_{SXT} = 7,358 \mu M$, $MIC_{NMA12} = 125 \mu M$

g. $MIC_{TGC} = 0,132 \mu M$, $MIC_{NMA12} = 125 \mu M$.

V práci již bylo zmíněno, že přírodní materiály jsou zdrojem zajímavých molekul s vlastními (mikro)biologickými vlastnostmi a mohou se tedy stát základem pro přípravu derivátů s cílem využití či navýšení jejich aktivity v rámci kombinační terapie. Mechanismy účinku rostlinných alkaloidů jsou velice variabilní. Mohou ovlivňovat syntézu DNA a proteinů, cílit na buněčné membrány či inhibovat syntézu efluxních pump [14].

Při společném působení NMA12 a LIN či TGC byla v určitých koncentračních poměrech odhalena synergická aktivita. Obě tato ATB jsou řazena mezi rezervní AML. LIN je oxazolidinonové ATB indikované k léčbě infekcí vyvolaných VRE či MRSA. Nicméně, pro léčbu některých závažných infekcí přestává být běžné dávkování LIN dostačující. Vyšší dávky LIN však mohou vést ke zvýšení výskytu nežádoucích účinků, jako jsou trombocytopenie či neuropatie. Jako řešení tohoto problému navrhují některé studie kombinační režimy léčby. Například kombinace LIN + RIF k léčbě pneumonie způsobené MRSA, či LIN + DAP k terapii infekcí spjatých s výskytem biofilmů. Takové postupy však nebývají plně standardizovány nebo jsou stále ve fázi výzkumu [187, 188].

TGC je glycylycyklinové ATB navržené speciálně pro terapii závažných infekcí vyvolaných MR Gram-negativními i Gram-positivními patogeny. Po selhání TGC monoterapie je taktéž navrhována kombinační léčba. Efektivní se zdá být využití TGC + CST. Synergické jsou také kombinace TGC + karbapenemy či TGC + RIF. Možnost aplikace efektivní a bezpečné kombinační terapie v klinické praxi však stále vyžaduje hlubší studium a optimalizaci [189, 190].

Mezi vlastnosti některých rostlinných alkaloidů se řadí též aktivita vůči biofilmům. Vzhledem k nízké rozpustnosti látky NMA12 ve volených hydrofilních kultivačních médiích však nemohl být experiment hodnotící její anti-biofilmovou aktivitu proveden. Buňky biofilmu dosahují extrémní odolnosti, kdy je k potlačení růstu či eliminaci biofilm-tvořících agens vyžadováno až 10-1000 × vyšší koncentrace AML [14].

4.4.5. Shrnutí pracovního Cíle C

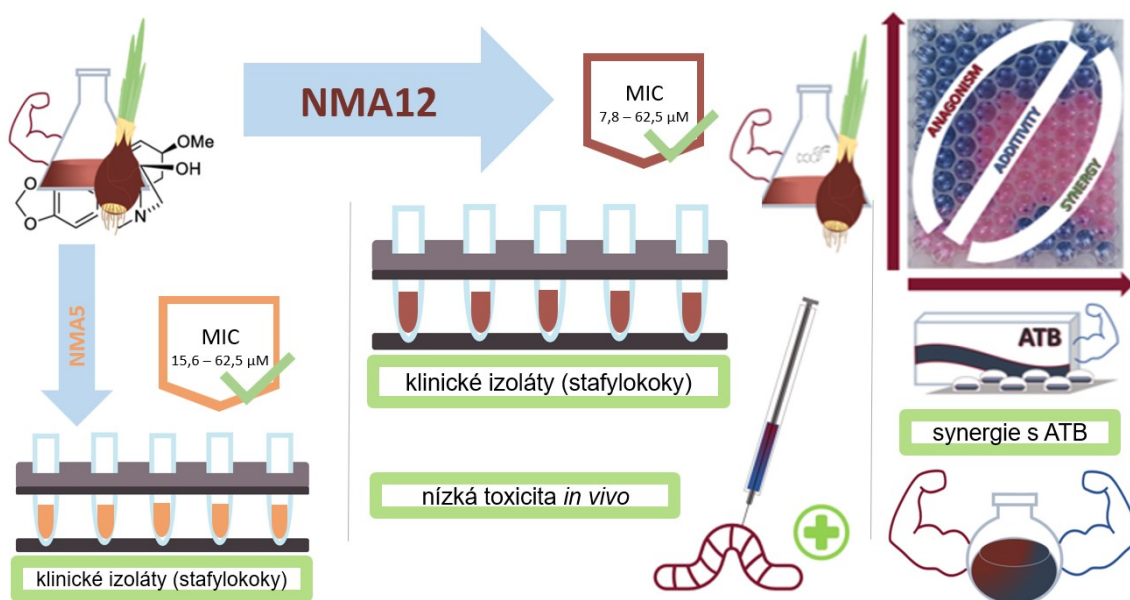
Látky přírodního původu jsou pro své biologické účinky studovány po staletí a jejich antimikrobní aktivita zachránila miliony životů po celém světě. A ač mnohé syntetické sloučeniny prokázaly v průběhu let významný účinek, v době antibiotické krize je možná na čase ohlédnout se zpět a pátrat po aktivních molekulách také v nepřeberné sbírce rostlinné říše. Celé spektrum biologických aktivit, včetně těch antimikrobních, vykazují například AA, které je též možno velice snadno chemicky modifikovat. Vhodně upravené struktury pak působí jako samostatné antiinfektivum nebo jsou aplikovatelné jako adjuvantní látky v kombinační terapii.

V předběžném screeningu antimikrobní aktivity byly deriváty NMA5 a NMA12 vyhodnoceny jako slibné kandidátní látky pro podrobnější studium antibakteriálního účinku. Aktivita látek NMA5 a NMA12 byla potvrzena na základě hodnocení antibakteriální aktivity s využitím klinických izolátů. Nejvýznamnější účinek látky NMA5 byl odhalen vůči klinickému izolátu bakterie *Staphylococcus haemolyticus* (111/16) patřící do skupin CoNS. Tato velice různorodá skupina bývá mnohdy neoprávněně přehlížena. Dopad infekcí vyvolaných CoNS, zejména v nemocničním prostředí, je však nezměrný. Nejvyšší aktivita látky NMA12 byla zaznamenána vůči kmenům SA (141/16) a MRSA (153/16), a to 7,813 μM , respektive 15,625 μM . Rezistence v rámci tohoto druhu je intenzivně studována mnoho let, i přes to jsou však tyto bakterie stále řazeny mezi jedny z nejobávanějších. Z těchto důvodů má objev látek s antistafylokokovým efektem velký význam.

Proto, aby mohly být nové látky podrobeny hlubšímu zkoumání v oblasti antimikrobní aktivity, musí být zohledněna celá řada dalších kritérií. Jedním z nich je rozpustnost – vlastnost, která se ukázala být v této studii zásadní limitací. Právě na základě nedostatečné rozpustnosti byla totiž z následného výzkumu vyřazena látka s označením NMA5. Přísně studovaným parametrem nových AML je též toxicita. Cytotoxicita derivátu NMA12 byla studována v režimu *in vitro* s využitím buněčné linie HK-2 a parametr IC_{50} byl vyhodnocen jako $\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{M}$. Toxicita NMA12 měřená s využitím modelového organismu *Galleria mellonella* byla vyhodnocena jako nízká. Žádané výsledky přinesla též studie společné aktivity NMA12 s klinicky relevantními ATB. Ve všech šesti studovaných kombinacích bylo dosaženo aditivního účinku. V určitých koncentračních poměrech kombinací LIN +

NMA12 a TGC + NMA12 byl dokonce zaregistrován synergický efekt, tedy vzájemně výhodná interakce. Dle sestrojených tepelných map je také možné určit, že se na této synergické aktivitě podílí právě NMA12.

Pracovní hypotéza tedy byla naplněna i v rámci Cíle C. U obou studovaných derivátů montaninového typu byla potvrzena aktivita vůči stafylokokům. U látky NMA12 byla též prokázána nízká toxicita a významnost při použití v kombinaci s komerčně dostupnými ATB. Kritéria pro zařazení mezi kandidátní adjuvantní látky tedy NMA12 částečně splňuje. Limitací dalšího výzkumu této látky je však její omezená rozpustnost v použitých hydrofilních rozpouštědlech. Zásadní poznatky o (mikro)biologické aktivitě látek NMA5 a NMA12 shrnuje Obrázek 27.



Obrázek 27. Zásadní výsledky studie (Cíl C) (Diepoltová, 2024).

Kandidátní látky NMA5 a NMA12 vykázaly slibnou aktivitu zejména vůči klinickým izolátům stafylokoků. Látka NMA12 prokázala v určitých koncentračních poměrech synergický efekt s antibiotiky linezolid a tigeicylin. Látka NMA12 vykazuje nízkou toxicitu *in vivo*. MIC – minimální inhibiční koncentrace, ATB – antibiotika.

5. SOUHRNNÁ DISKUZE

Planetu již několik desetiletí sužuje „tichá pandemie“ AMR. Za tímto závažným stavem ale nestojí nový dosud nepopsaný patogen, nýbrž celá řada různorodých příčin. A část viny nese i sám člověk. Přes svoji komplexnost, dobu trvání a globální charakter byla tato situace širokou veřejností dlouho přehlížena. Nyní je ale čas urgentně pracovat na systematickém řešení, než se dopady AMR stanou neúnosnými.

Tato práce reflektuje globální výzvu ke zvýšené aktivitě v procesu výzkumu a vývoje nových antimikrobních léčiv. Zdravotnickými organizacemi jsou navrhovány rozmanité strategie k odvrácení či alespoň zpomalení krize spojené s AMR. Studie popsané v této práci se dotýkají několika z nich. Zásadní je například podrobný výzkum mechanismů rezistence. První část této práce je proto věnována bakteriálním biofilmům, které k odolnosti bakterií mnohonásobně přispívají. Druhá část je zasvěcena studiu antimikrobních účinků nově syntetizovaných molekul a jejich možného využití ve strategii kombinační terapie a třetí část charakterizuje antimikrobní potenciál látek odvozených od struktur přírodního původu. Celou práci dále propojuje myšlenka snahy o ochranu účinku rezervních ATB.

Komplexnost bakteriálních biofilmů vybízí k porovnání s mnohobuněčným organismem. Tato konsorcia definuje striktně daná architektura, integrita, stálost vnitřního prostředí a účelná komunikace mezi zúčastněnými buňkami. Maturované mikrobiální biofilmy jsou kompaktní a silně odolné struktury. Pro bakterie je taková forma života mimořádně výhodná a také naprosto přirozená. Studium klíčových vlastností těchto společenstev je proto zcela stěžejní pro pochopení principů s biofilmem spojené AMR. Řádnému hodnocení anti-biofilmové aktivity kandidátních látek *in vitro* pochopitelně předchází tvorba biofilmu samotného. V literatuře se ale navrhované postupy práce s uzavřenými biofilmovými modely v mikrotitračních destičkách významně odlišují zejména v nastavených kultivačních podmínkách, což vede k neporovnatelným výsledkům. V první části práce je proto hodnocen vliv kultivačních podmínek a modifikace materiálu povrchu na kvalitu a kvantitu výsledného stafylokokového biofilmu potenciálně využitelného k hodnocení anti-biofilmového účinku. Stafylokoky jsou ochotnými producenty biofilmů a jejich

využití v tomto experimentu má tak vysokou klinickou relevanci. Je ale třeba dodat, že volba vhodných podmínek pro tvorbu biofilmu je krajně závislá právě na rodu, druhu, i kmeni zvolené bakterie, což je skutečnost, jež byla též ověřena v první části práce.

Mezi zásadní výsledky Cíle A lze zařadit následující zjištění. Z hodnocených kultivačních podmínek pro tvorbu stafylokokových biofilmů *in vitro* v jamkách mikrotitrační destičky mělo nejvýraznější pozitivní vliv na robustnost vzniklého biofilmu kultivační médium TSB suplementované HP a třepání během inkubace. Ke vzniku biofilmů tvořených bakteriemi kmene SE na plastových kolíčkách statisticky významně přispěla modifikace povrchu pomocí FBS a HP. Takto připravené biofilmy disponovaly důležitými rysy (heterogenní architekturou, přítomností EPM). Tyto rysy se mohou podílet na rezistenci spojené právě s výskytem biofilmu. Buňky přítomné v biofilmu i zmíněné klíčové rysy lze vizualizovat pomocí epifluorescenční mikroskopie. Takto připravené stafylokokové biofilmy je možné využít ve studiích hodnotících anti-biofilmovou aktivitu kandidátních AML. Optimální podmínky pro tvorbu stafylokokových biofilmů *in vitro* se však významně liší dle použitých bakteriálních kmenů.

Druhá část práce se opírá o možnost využití nově syntetizovaných AML v kombinační terapii, která představuje jednu z možných alternativních strategií výzkumu potenciálních léčiv. Látka na bázi 2-aminooxazolu zde byla navržena k pokročilemu výzkumu na základě slibných výsledků screeningu antibakteriální aktivity zejména vůči Gram-negativním bakteriím a nízké toxicitě *in vitro*.

Výsledky série pokročilých studií vedly k závěru, že jsou naplněny všechny parametry, které charakterizují kandidátní sloučeninu AB15 jako potenciální adjuvantní látku, tedy látku partnerskou v kombinační terapii. Látka AB15 vykazovala povzbudivou aktivitu vůči Gram-negativním bakteriím, například vůči klinickému izolátu bakterie ACBA (20/21), konkrétně MIC = 15,625-62,500 μM . Tato účinnost je zajímavá zejména z důvodu vysoké míry AMR a klinické relevance této bakterie. Látka AB15 byla charakterizována jako baktericidní a v cílové buňce inhibovala syntézu proteinů. Na základě výsledků hodnocení toxicity *in vitro* i *in vivo* lze shrnout, že látka AB15 může být řazena do skupiny netoxických či mírně toxických látek. Checkerboard studie odhalila aditivní efekt látky AB15 například

v kombinaci AB15 + CST působící vůči referenčnímu kmeni ACBA (ATCC 19606). Následně byl zjištěn dokonce synergický efekt při ověření této kombinace AML vůči MR klinickému izolátu ACBA (20/21). Látka AB15 rovněž potencovala anti-biofilmovou aktivitu při působení ve vhodném koncentračním poměru s CST.

Ve třetí části práce byl zkoumán antimikrobní potenciál látek získaných ze struktur rostlinného původu, respektive chemicky modifikovaných molekul AA. Zjištěná antimikrobní aktivita studovaných derivátů montaninového typu, tedy látek NMA5 a NMA12, zejména vůči Gram-pozitivním bakteriím, byla potvrzením, že jsou takto připravené látky slibnými kandidáty pro výzkum nových antiinfektiv. Zároveň však bylo registrováno úskalí výzkumu v podobě omezené rozpustnosti. Nicméně, u látky NMA12 byla potvrzena antimikrobní aktivita s použitím klinických izolátů Gram-pozitivních bakterií a odhalena synergická účinnost s ATB LIN a TGC vůči referenčnímu kmeni MRSA (ATCC 43300) a nízká toxicita *in vivo*.

6. ZÁVĚR

Předložená disertační práce se ve své teoretické části věnuje zejména problematice AMR a předkládá vybrané alternativní strategie výzkumu nových AML, jmenovitě kombinační terapii, využití adjuvantních látek či možnost uplatnění modifikovaných struktur přírodního původu. V teoretické části práce jsou dále stručně představeny patogeny řazené do skupiny ESKAPE, jež je charakteristická vysokou mírou AMR. Mezi mechanismy rezistence mikrobů se kromě jiného řadí i schopnost tvorby mikrobiálního biofilmu. Právě tomu se věnují další kapitoly této práce. Poslední segment teoretické části shrnuje základní i pokročilé metody hodnocení (mikro)biologické aktivity kandidátní AML.

Experimentální část této práce se sestává ze tří celků – Cílů A, B a C. Jednotlivé Cíle odpovídají samostatným studiím, které jsou provázány společným záměrem reagovat na apel zdravotnických organizací ke zvýšené aktivitě v procesu výzkumu a vývoje nových AML za účelem zpomalení překotného vývoje antibiotické krize.

Cíl A se věnuje hodnocení vlivu kultivačních podmínek a vybraných způsobů modifikace povrchů na tvorbu stafylokokových biofilmů *in vitro*. Metoda tvorby robustního stafylokokového biofilmu *in vitro* na kolíčcích uzavřeného biofilmového modelu byla za daných podmínek optimalizována a z postupu lze dále vycházet v navazujících studiích.

V Cíli B byla charakterizována (mikro)biologická aktivita nově syntetizovaného derivátu 2-chlor-*N*-(oxazol-2-yl)isonikotinamidu (AB15). Na základě sledovaných (mikro)biologických parametrů lze tuto látku označit za slibné kandidátní adjuvans podporující účinek vybraných klinicky relevantních ATB v kombinační terapii.

V Cíli C je předložen popis (mikro)biologických účinků derivátů montaninu (NMA5 a NMA12) získaných modifikací struktur přírodního původu, konkrétně alkaloidů rostlinné čeledi *Amaryllidaceae*. Látku NMA12 lze charakterizovat jako potenciálně využitelnou v rámci kombinační terapie, a to jako látku adjuvantní k vybraným ATB.

Závěrem lze konstatovat, že všechny vytyčené cíle této disertační práce byly naplněny. Metodika tvorby stafylokokových biofilmu *in vitro* na kolíčcích uzavřeného biofilmového modelu byla zavedena a nadále bude využívána jako výchozí pro navazující studium biofilmů na pracovišti mikrobiologické skupiny Katedry biologických a lékařských věd FAF UK. Tato práce dále přináší zásadní (mikro)biologické poznatky o dvou potenciálních antiinfektivech, která mohou být případně uplatněna v dalších fázích výzkumu a vývoje nových léčiv. Využitím těchto molekul, jakožto látek adjuvantních k vybraným komerčně dostupným ATB, může být dosaženo efektivnější terapie infekčních onemocnění vyvolaných MR bakteriemi. Volbou vhodné kombinací terapie je obecně možno mírnit nežádoucí účinky léčby ATB a zároveň uchovat antimikrobní aktivitu některých ATB. Tato práce nepřináší jednoznačné a rychlé řešení globálního problému spojeného s vývojem AMR. Nabízí však výhled na jednu z možných cest, kterou se lze vydat ve snaze zpomalit vývoj této kritické situace.

7. SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A SCHÉMÁT

Obrázek 1. Vybrané mechanismy antimikrobní rezistence	21
Obrázek 2. Multirezistentní bakterie řazené do skupiny ESKAPE.....	23
Obrázek 3. Architektura biofilmu	30
Obrázek 4. Mechanismy rezistence biofilmu	32
Obrázek 5. Innovatech MBEC Assay® Kit.....	40
Obrázek 6. Metodický postup pracovního Cíle A	53
Obrázek 7. Vliv modifikace povrchu kolíčků (SA, MRSA).....	60
Obrázek 8. Vliv modifikace povrchu kolíčků (SE)	62
Obrázek 9. Fotografie biofilmu bakterie SA	63
Obrázek 10. Vizualizace biofilmu SYTO 9 + kalkofluorová běloba	64
Obrázek 11. Vizualizace biofilmu Hoechst 33342 + FITC-ConA.....	64
Obrázek 12. Uspořádání Honeycomb destičky pro Checkerboard studii.....	79
Obrázek 13. Chemická struktura derivátu AB15	83
Obrázek 14. Výsledky makromolekulární biosyntetické eseje (AB15).....	93
Obrázek 15. Výsledky membránové depolarizační eseje.	94
Obrázek 16. Hodnocení cytotoxicity AB15 <i>in vitro</i> vůči buněčné linii HK-2.....	95
Obrázek 17. Hodnocení toxicity AB15 <i>in vivo</i> (podání do hemocoelu)	97
Obrázek 18. Hodnocení toxicity AB15 <i>in vivo</i> (perorální podání).....	97
Obrázek 19. Tepelné mapy výsledků Checkerboard studií (AB15 + ATB).....	105
Obrázek 20. Tepelná mapa výsledku Checkerboard studie (AB15 + CST)	109
Obrázek 21. MBIC a MBEC CST (CST, AB15 a CST + AB15)	112
Obrázek 22. Výsledky hemolytické eseje <i>ex vivo</i>	114
Obrázek 23. Zásadní výsledky studie (Cíl B).....	116
Obrázek 24. Hodnocení cytotoxicity NMA12 <i>in vitro</i> vůči buněčné linii HK-2.	138
Obrázek 25. Hodnocení toxicity NMA12 <i>in vivo</i> (podání do hemocoelu).....	139
Obrázek 26. Tepelné mapy výsledků Checkerboard studií (NMA12 + ATB).....	146
Obrázek 27. Zásadní výsledky studie (Cíl C).....	150

Tabulka 1. Studie vlivu kultivačních podmínek na tvorbu biofilmu v jamkách.....	56
Tabulka 2. Studie vlivu kultivačních podmínek na tvorbu biofilmu na kolíčcích. ...	58
Tabulka 3. Semi-kvantitativní hodnocení vlivu modifikace povrchu kolíčků	61
Tabulka 4. Antibiogram vybraných klinických izolátů Gram-negativních bakterií. .	71
Tabulka 5. Přehled antibakteriální aktivity látky AB15	85
Tabulka 6. Přehled antimykobakteriální aktivity látky AB15	86
Tabulka 7. Přehled antifungální aktivity látky AB15	87
Tabulka 8. Antibakteriální aktivita látky AB15 vůči G+ klinickým izolátům	89
Tabulka 9. Antibakteriální aktivita látky AB15 vůči G- klinickým izolátům	90
Tabulka 10. Hodnocení <i>in vivo</i> toxicity látky AB15 (podání do hemocoelu)	98
Tabulka 11. Hodnocení <i>in vivo</i> toxicity derivátu AB15 (perorální podání).....	99
Tabulka 12. Indexy frakčních inhibičních koncentrací (AB15 + ATB).....	101-4
Tabulka 13. Indexy frakčních inhibičních koncentrací (AB15 + CST)	108
Tabulka 14. MBIC a MBEC (CST, AB15 a CST + AB15)	111
Tabulka 15. Antibiogram klinických izolátů Gram-pozitivních bakterií.....	121
Tabulka 16. Antibiogram klinických izolátů Gram-negativních bakterií.	122
Tabulka 17. Přehled antibakteriální aktivity látek NMA5 a NMA12	129
Tabulka 18. Přehled antimykobakteriální aktivity látek NMA5 a NMA12.....	130
Tabulka 19. Přehled antifungální aktivity látek NMA5 a NMA12.....	131
Tabulka 20. Antibakteriální aktivita látek NMA5 a NMA12 vůči G+ k. izolátům...	134
Tabulka 21. Antibakteriální aktivita NMA5 a NMA12 vůči G- k. izolátům	135
Tabulka 22. Hodnocení <i>in vivo</i> toxicity látky NMA12 (podání do hemocoelu)....	140
Tabulka 23. Indexy frakčních inhibičních koncentrací (NMA12 + ATB).....	142-5
Schéma 1. Studované kultivační podmínky.	50

8. PŘÍLOHA

Tabulka P1. Analýza přežití modelového organismu *Galleria mellonella* po injekčním podání látky AB15 do hemocoelu. Hodnoty představují data párového porovnávacího Log-rank Mantel-Cox testu a Mantel-Haenszel testu poměru rizik (CI 95%).

AB15 (mg/kg tělesné váhy)				
0 (A)	500 (B)	250 (C)	50 (D)	5 (E)
kontrolní skupina – 30% DMSO + PBS	$\chi^2(1) = 1,0000$ $p = 0,3173$ A/B = 0,1353 (0,0027-6,8210) B/A = 7,3890 (0,1466-372,4000)	NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ A/C = Nedefinováno C/A = Nedefinováno	NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ A/D = Nedefinováno D/A = Nedefinováno	NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ A/E = Nedefinováno E/A = Nedefinováno
500 (B)		NS $\chi^2(1) = 1,0000$ $p = 0,3173$ B/C = 0,1353 (0,0027-6,8210) C/B = 7,389 (0,1466-372,4000)	NS $\chi^2(1) = 1,0000$ $p = 0,3173$ B/D = 0,1353 (0,0027-6,8210) D/B = 7,389 (0,1466-372,4000)	NS $\chi^2(1) = 1,0000$ $p = 0,3173$ B/E = 0,1353 (0,0027-6,8210)

				E/B = 7,3890 (0,1466-372,4000)
250 (C)			NS $\chi^2(1) = 1,0000$ $p > 0,9999$ C/D = Nedefinováno D/C = Nedefinováno	NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ C/E = Nedefinováno E/C = Nedefinováno
50 (D)				NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ D/E = Nedefinováno E/D = Nedefinováno

NS – bez statistické významnosti.

Tabulka P2. Analýza přežití modelového organismu *Galleria mellonella* po perorálním podání látky AB15. Hodnoty představují data párového porovnávacího Log-rank Mantel-Cox testu a Mantel-Haenszel testu poměru rizik (CI 95%).

AB15 (mg/kg of body weight)				
0 (A)	500 (B)	250 (C)	50 (D)	5 (E)
kontrolní skupina – 30% DMSO + PBS	NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ A/B = Nedefinováno B/A = Nedefinováno	NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ A/C = Nedefinováno C/A = Nedefinováno	NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ A/D = Nedefinováno D/A = Nedefinováno	NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ A/E = Nedefinováno E/A = Nedefinováno
500 (B)		NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ B/C = Nedefinováno C/B = Nedefinováno	NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ B/D = Nedefinováno D/B = Nedefinováno	NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ B/E = Nedefinováno E/B = Nedefinováno
250 (C)			NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$	NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$

			C/D = Nedefinováno D/C = Nedefinováno	C/E = Nedefinováno E/C = Nedefinováno
50 (D)				NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ D/E = Nedefinováno E/D = Nedefinováno

NS – bez statistické významnosti.

Tabulka P3. Analýza přežití modelového organismu *Galleria mellonella* po injekčním podání derivátu NMA12 do hemocoelu. Hodnoty představují data párového porovnávacího Log-rank Mantel-Cox testu a Mantel-Haenszel testu poměru rizik (CI 95%).

NMA12 (mg/kg tělesné hmotnosti)				
0 (A)	83,6400 (B)	148,400 (C)	237,9300 (D)	475,6000 (E)
kontrolní skupina 30% DMSO + PBS	NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ A/B = neurčeno B/A = neurčeno	NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ A/C = neurčeno C/A = neurčeno	NS $\chi^2(1) = 1,0000$ $p = 0,3173$ A/D = 0,1353 (0,0027-6,8210) D/A = 7,3890 (0,1466-372,4000)	NS $\chi^2(1) = 1,0000$ $p = 0,3173$ A/E = 0,1353 (0,0027-6,8210) E/A = 7,389 (0,1466-372,4000)
83,6400 (B)		NS $\chi^2(1) = 0,0000$ $p > 0,9999$ B/C = neurčeno C/B = neurčeno	NS $\chi^2(1) = 1,0000$ $p = 0,3173$ B/D = 0,1353 (0,002685-6,8210) D/B = 7,389 (0,1466-372,4000)	NS $\chi^2(1) = 1,0000$ $p = 0,3178$ B/E = 0,1353 (0,0027-6,8210) E/B = 7,389 (0,1466-372,4000)
148,400			NS	NS

(C)			$\chi^2 (1) = 1,0000$ $p = 0,3173$ C/D = 0,1353 (0,0027-6,8210) D/C = 7,389 (0,1466-372,4000)	$\chi^2 (1) = 1,0000$ $p = 0,3173$ C/E = 0,1353 (0,0027-6,8210) E/C = 7,389 (0,1466-372,4000)
237,9300 (D)				NS $\chi^2 (1) = 0,0030$ $p = 0,9566$ D/E = 0,9257 (0,0577-14,8600) E/D = 1,080 (0,0673-17,3400)

NS – bez statistické významnosti

9. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Kratky M., Konecna K., Jandourek O., **Diepoltova A.**, Vavrova P., Voxova B., Vejsova M., Barta P., Bosze S. Insight into the Antibacterial Action of Iodinated Imine, an Analogue of Rafoxanide: a Comprehensive Study of Its Antistaphylococcal Activity. *Microbiol Spectr.* **2023**;11(3):e0306422. IF = 3,7 (Q2). AIS = 1,439 (Q1).

Konecna K., **Diepoltova A.**, Holmanova P., Jandourek O., Vejsova M., Voxova B., Barta P., Maixnerova J., Trejtnar F., Kučerová-Chlupáčová M. Comprehensive insight into anti-staphylococcal and anti-enterococcal action of brominated and chlorinated pyrazine-based chalcones. *Front Microbiol.* **2022**;13:912467. IF = 5,2 (Q2). AIS = 1,159 (Q2).

Juhas M., Bachtikova A., Nawrot D. E., Hatokova P., Pallabothula V. S. K., **Diepoltova A.**, Jandourek O., Barta P., Konecna K., Paterova P., Sestak V., Zitko J. Improving Antimicrobial Activity and Physico-Chemical Properties by Isosteric Replacement of 2-Aminothiazole with 2-Aminooxazole. *Pharmaceuticals (Basel).* **2022**;15(5). IF = 4,6 (Q2). AIS = 0,772 (Q2).

Maafi N., Mamun A. A., Jandourek O., Marikova J., Breiterova K., **Diepoltova A.**, Konecna K., Hostalkova A., Hulcova D., Kunes K., Kohelova E., Koutova D., Safratova M., Novakova L., Cahlikova L. Semisynthetic Derivatives of Selected *Amaryllidaceae* Alkaloids as a New Class of Antimycobacterial Agents. *Molecules.* **2021**;26(19). IF = 4,927 (Q2). AIS = 0,671 (Q2).

Diepoltova A., Konecna K., Jandourek O., Nachtigal P. Study of the impact of cultivation conditions and peg surface modification on the *in vitro* biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in a system analogous to the Calgary biofilm device. *J Med Microbiol.* **2021**;70(5). IF = 3,196 (Q3). AIS = 0,645 (Q3).

Konecna K., Nemeckova I., **Diepoltova A.**, Vejsova M., Jandourek O. The Impact of Cultivation Media on the *In Vitro* Biofilm Biomass Production of *Candida spp.* *Curr Microbiol.* **2021**;78(5):2104-11. IF = 2,343 (Q4). AIS = 0,392 (Q4).

10. PŘEDNÁŠKY A PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ

Diepoltova A., Nawrot D., Jandourek O., Juhas M., Barta P., Vavrova P., Pallabothula V. S. K., Hatokova P., Vejsova M., Voxova B., Nachtigal P., Zitko J., Konecna K. A promising support for last-resort antibiotics – A new 2-aminooxazole derivative enhances the anti-biofilm effect of colistin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology Society Annual Microbiology Conference*. **2024**. POSTER.

Diepoltova A., Maafi N., Jandourek O., Vavrova P., Konecna K., Cahlikova L. 3-O-methylpancracine derivatives: Potential Adjuvans In Anti-Staphylococcal Therapy. *14th Postgraduate and Postdoc Conference, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove*. **2024**. SHORT LECTURE.

Diepoltova A., Nawrot D., Jandourek O., Juhas M., Barta P., Vavrova P., Pallabothula V. S. K., Hatokova P., Vejsova M., Voxova B., Nachtigal P., Zitko J., Konecna K. A promising support for last-resort antibiotics – A new 2-aminooxazole derivative enhances the anti-biofilm effect of colistin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Tomáškovy dny mladých mikrobiologů 2023*. **2023**. SHORT LECTURE.

Diepoltova A. Microbiological Analysis of Clinical Isolates. *START PROJECT Seminar, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové*. **2023**. SEMINAR.

Diepoltova A., Konecna K., Duggan K., Maillard J.Y., Juhas M., Pallabothula V. S. K., Nawrot D. E., Hatokova P., Zitko J. Comparing Different Approaches To Eradicate *Staphylococcal* Biofilms Formed On Pig Skin Model. *13th Postgraduate and Postdoc Conference, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove*. **2023**. SHORT LECTURE.

Diepoltova A., Konecna K., Maafi N., Cahlikova L. Evaluation of anti-bacterial activity of semi-synthetic alkaloid derivatives from medicinal plants of the *Amaryllidaceae* family. *Recent Progress in Pharmacognosy and Phytochemistry FAF UK*. **2022**. POSTER.

Diepoltova A., Konecna K., Juhas M., Pallabothula V. S. K., Nawrot D. E., Hatokova P., Zitko. Antibacterial Effects of Oxazole Derivatives. *12th Postgraduate and Postdoc Conference, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove*. **2022**. SHORT LECTURE.

Diepoltova A., Konecna K., Jandourek O. Antimicrobial Synergy Study – Checkerboard Analysis. *Conference Synthesis and Analysis of Drugs Hradec Kralove*. **2021**. SHORT LECTURE.

Diepoltova A., Konecna K., Jandourek O., Nachtigal P. Evaluation of Drug Activity Against Staphylococcal Biofilms – Settings of Conditions Leading to Reproducible and Robust Biofilm Formation *in vitro*. *Microbiology Society Annual Microbiology Conference*. **2021**. POSTER.

Diepoltova A., Konecna K., O. J. Towards to *in vitro* antibiofilm activity screening – Introduction of Appropriate Methodical Approach for *Staphylococcal* Biofilm Formation. *11th Postgraduate and Postdoc Conference, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove*. **2021**. SHORT LECTURE.

11. REFERENCE

1. WHO. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis. <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>. Accessed 6-2-2023.
2. WHO. Antimicrobial Resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. Accessed 3-2-2023.
3. CDC. Antibiotic Resistance: A Global Threat. <https://www.cdc.gov/drugresistance/solutions-initiative/stories/ar-global-threat.html>. Accessed 3-2-2023.
4. Martínez J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol.* **2014**;11:33-9.
5. Reygaert W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* **2018**;4(3):482-501.
6. Uruen C., Chopo-Escuin G., Tommassen J., Mainar-Jaime R. C., Arenas J. Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. *Antibiotics (Basel).* **2020**;10(1).
7. Llor C., Bjerrum L. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther Adv Drug Saf.* **2014**;5(6):229-41.
8. Serra-Burriel M., Keys M., Campillo-Artero C., Agodi A., Barchitta M., *et al.* Impact of multi-drug resistant bacteria on economic and clinical outcomes of healthcare-associated infections in adults: Systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* **2020**;15(1):e0227139.
9. Jand'ourek O. Deriváty pyrazinu jako potenciální antituberkulotika (příprava a studium biologických vlastností). **2017**(188988):223.
10. WHO. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: Module 4 treatment: Drug-susceptible tuberculosis treatment. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240048126>. Accessed 10-3-2023.
11. Fischbach M. A. Combination therapies for combating antimicrobial resistance. *Curr Opin Microbiol.* **2011**;14(5):519-23.
12. Annunziato G. Strategies to Overcome Antimicrobial Resistance (AMR) Making Use of Non-Essential Target Inhibitors: A Review. *Int J Mol Sci.* **2019**;20(23).
13. Cushnie T. P., Cushnie B., Lamb A. J. Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int J Antimicrob Agents.* **2014**;44(5):377-86.
14. Yan Y., Li X., Zhang C., Lv L., Gao B., *et al.* Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review. *Antibiotics (Basel).* **2021**;10(3).
15. Thawabteh A., Juma S., Bader M., Karaman D., Scrano L., *et al.* The Biological Activity of Natural Alkaloids against Herbivores, Cancerous Cells and Pathogens. *Toxins (Basel).* **2019**;11(11).
16. Berkov S., Osorio E., Viladomat F., Bastida J. Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Alkaloids Chem Biol.* **2020**;83:113-85.
17. Kornienko A., Evidente A. Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chem Rev.* **2008**;108(6):1982-2014.

18. Ding Y., Qu D., Zhang K. M., Cang X. X., Kou Z. N., *et al.* Phytochemical and biological investigations of *Amaryllidaceae* alkaloids: a review. *J Asian Nat Prod Res.* **2017**;19(1):53-100.
19. Nair J. J., Wilhelm A., Bonnet S. L., van Staden J. Antibacterial constituents of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorg Med Chem Lett.* **2017**;27(22):4943-51.
20. Butler M. S., Buss A. D. Natural products--the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochem Pharmacol.* **2006**;71(7):919-29.
21. Brown P., Dawson M. J. A perspective on the next generation of antibacterial agents derived by manipulation of natural products. *Prog Med Chem.* **2015**;54:135-84.
22. Ghorbani J., Rahban D., Aghamiri S., Teymouri A., Bahador A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. *Laser Ther.* 2018;27(4):293-302.
23. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J. G., Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**;45(3):649-59.
24. Wang L., Hu C., Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine.* **2017**;12:1227-49.
25. Talat A., Bashir Y., Khan A. U. Repurposing of Antibiotics: Sense or Non-sense. *Front Pharmacol.* **2022**;13:833005.
26. Sharma A., Gupta V. K., Pathania R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian J Med Res.* **2019**;149(2):129-45.
27. WHO. Who publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Accessed 6-2-2023.
28. De Oliveira D. M. P., Forde B. M., Kidd T. J., Harris P. N. A., Schembri M. A., *et al.* Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* **2020**;33(3).
29. Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* **2012**;18(3):268-81.
30. Arias C. A., Murray B. E. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **2008**;6(5):637-55.
31. Miller W. R., Munita J. M., Arias C. A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **2014**;12(10):1221-36.
32. Levitus M., Rewane A., Perera T. B. *StatPearls*. Treasure Island (FL); **2024**.
33. Tong S. Y., Davis J. S., Eichenberger E., Holland T. L., Fowler V. G., Jr. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* **2015**;28(3):603-61.
34. Pantosti A., Sanchini A., Monaco M. Mechanisms of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. *Future Microbiol.* **2007**;2(3):323-34.
35. Lakhundi S., Zhang K. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4).
36. Li Y., Kumar S., Zhang L., Wu H., Wu H. Characteristics of antibiotic resistance mechanisms and genes of Klebsiella pneumoniae. *Open Med (Wars).* **2023**;18(1):20230707.
37. Vazquez-Lopez R., Solano-Galvez S. G., Juarez Vignon-Whaley J. J., Abello Vaamonde J. A., Padro Alonzo L. A., *et al.* Acinetobacter baumannii Resistance: A Real Challenge for Clinicians. *Antibiotics (Basel).* **2020**;9(4).

38. Akers K. S., Chaney C., Barsoumian A., Beckius M., Zera W., *et al.* Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus complex. *J Clin Microbiol.* **2010**;48(4):1132-8.
39. Adams-Haduch J. M., Paterson D. L., Sidjabat H. E., Pasculle A. W., Potoski B. A., *et al.* Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother.* **2008**;52(11):3837-43.
40. Hujer K. M., Hamza N. S., Hujer A. M., Perez F., Helfand M. S., *et al.* Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**;49(7):2941-8.
41. Coyne S., Rosenfeld N., Lambert T., Courvalin P., Perichon B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**;54(10):4389-93.
42. Giannouli M., Di Popolo A., Durante-Mangoni E., Bernardo M., Cuccurullo S., *et al.* Molecular epidemiology and mechanisms of rifampicin resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates from Italy. *Int J Antimicrob Agents.* **2012**;39(1):58-63.
43. Beceiro A., Llobet E., Aranda J., Bengoechea J. A., Doumith M., *et al.* Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother.* **2011**;55(7):3370-9.
44. Cai Y., Chai D., Wang R., Liang B., Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother.* **2012**;67(7):1607-15.
45. Hejnar P., Kolar M., Hajek V. Characteristics of *Acinetobacter* strains (phenotype classification, antibiotic susceptibility and production of beta-lactamases) isolated from haemocultures from patients at the Teaching Hospital in Olomouc. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med.* **1999**;142:73-7.
46. Novovic K., Jovicic B. Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Molecular Mechanisms and Epidemiology. *Antibiotics (Basel).* **2023**;12(3).
47. Huang C., Chen I., Tang T. Colistin Monotherapy versus Colistin plus Meropenem Combination Therapy for the Treatment of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection: A Meta-Analysis. *J Clin Med.* **2022**;11(11).
48. Krzysciak P., Chmielarczyk A., Pobiega M., Romaniszyn D., Wojkowska-Mach J. *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital-acquired infection: biofilm production and drug susceptibility. *APMIS.* **2017**;125(11):1017-26.
49. Zeighami H., Valadkhani F., Shapouri R., Samadi E., Haghi F. Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. *BMC Infect Dis.* **2019**;19(1):629.
50. Gedefie A., Demsis W., Ashagrie M., Kassa Y., Tesfaye M., *et al.* *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: A Review. *Infect Drug Resist.* **2021**;14:3711-9.
51. Eze E. C., Chenia H. Y., El Zowalaty M. E. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infect Drug Resist.* **2018**;11:2277-99.

52. Qin S., Xiao W., Zhou C., Pu Q., Deng X., *et al.* Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* **2022**;7(1):199.
53. Santajit S., Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int.* **2016**;2016:2475067.
54. Zhen X., Lundborg C. S., Sun X., Hu X., Dong H. Economic burden of antibiotic resistance in ESKAPE organisms: a systematic review. *Antimicrob Resist Infect Control.* **2019**;8:137.
55. Mouanga-Ndzime Y., Onanga R., Longo-Pendy N. M., Bignoumba M., Bisseye C. Epidemiology of community origin of major multidrug-resistant ESKAPE uropathogens in a paediatric population in South-East Gabon. *Antimicrob Resist Infect Control.* **2023**;12(1):47.
56. Davin-Regli A., Pages J. M. Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol.* **2015**;6:392.
57. WHO. Tuberculosis response recovering from pandemic but accelerated efforts needed to meet new targets. <https://www.who.int/news/item/07-11-2023-tuberculosis-response-recovering-from-pandemic-but--accelerated-efforts-needed-to-meet-new-targets>. Accessed 24-2-2023.
58. Vitiello A., Ferrara F., Boccellino M., Ponzio A., Cimmino C., *et al.* Antifungal Drug Resistance: An Emergent Health Threat. *Biomedicines.* **2023**;11(4).
59. Donlan R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* **2002**;8(9):881-90.
60. Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* **1995**;49:711-45.
61. Paharik A. E., Horswill A. R. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiol Spectr.* **2016**;4(2).
62. Percival S. L., Vuotto C., Donelli G., Lipsky B. A. Biofilms and Wounds: An Identification Algorithm and Potential Treatment Options. *Adv Wound Care (New Rochelle).* **2015**;4(7):389-97.
63. Suarez C., Piculell M., Modin O., Langenheder S., Persson F., *et al.* Thickness determines microbial community structure and function in nitrifying biofilms via deterministic assembly. *Sci Rep.* **2019**;9(1):5110.
64. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* **2008**;322:207-28.
65. Penesyan A., Paulsen I. T., Kjelleberg S., Gillings M. R. Three faces of biofilms: a microbial lifestyle, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. *NPJ Biofilms Microbiomes.* **2021**;7(1):80.
66. Santos A., Galdino A. C. M., Mello T. P., Ramos L. S., Branquinho M. H., *et al.* What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **2018**;113(9):e180212.
67. Podbielski A., Kreikemeyer B. Cell density--dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int J Infect Dis.* **2004**;8(2):81-95.
68. Yarwood J. M., Schlievert P. M. Quorum sensing in Staphylococcus infections. *J Clin Invest.* **2003**;112(11):1620-5.

69. Gama J. A., Fredheim E. G. A., Cleon F., Reis A. M., Zilhao R., *et al.* Dominance Between Plasmids Determines the Extent of Biofilm Formation. *Front Microbiol.* **2020**;11:2070.
70. Metzger G. A., Ridenhour B. J., France M., Gliniewicz K., Millstein J., *et al.* Biofilms preserve the transmissibility of a multi-drug resistance plasmid. *NPJ Biofilms Microbiomes.* **2022**;8(1):95.
71. Sharma D., Misba L., Khan A. U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control.* **2019**;8:76.
72. Tuon F. F., Dantas L. R., Suss P. H., Tasca Ribeiro V. S. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens.* **2022**;11(3).
73. Malviya J., Alameri A. A., Al-Janabi S. S., Fawzi O. F., Azzawi A. L., *et al.* Metabolomic profiling of bacterial biofilm: trends, challenges, and an emerging antibiofilm target. *World J Microbiol Biotechnol.* **2023**;39(8):212.
74. Zhao X., Yu Z., Ding T. Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Microorganisms.* **2020**;8(3).
75. Gilbert P., Allison D. G., McBain A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J Appl Microbiol.* **2002**;92 Suppl:98S-110S.
76. Lebeaux D., Ghigo J. M., Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2014**;78(3):510-43.
77. Harriott M. M., Noverr M. C. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol.* **2011**;19(11):557-63.
78. Nance W. C., Dowd S. E., Samarian D., Chludzinski J., Delli J., *et al.* A high-throughput microfluidic dental plaque biofilm system to visualize and quantify the effect of antimicrobials. *J Antimicrob Chemother.* **2013**;68(11):2550-60.
79. Wu H., Moser C., Wang H. Z., Hoiby N., Song Z. J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci.* **2015**;7(1):1-7.
80. Kowalska-Krochmal B., Dudek-Wicher R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens.* **2021**;10(2).
81. Wald-Dickler N., Holtom P., Spellberg B. Busting the Myth of "Static vs Cidal": A Systemic Literature Review. *Clin Infect Dis.* **2018**;66(9):1470-4.
82. Pankey G. A., Sabath L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis.* **2004**;38(6):864-70.
83. Balouiri M., Sadiki M., Ibensouda S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* **2016**;6(2):71-9.
84. Prama F. H., Shourav M. K., Choi J. Post-Antibiotic Effect of Ampicillin and Levofloxacin to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Based on Microscopic Imaging Analysis. *Antibiotics (Basel).* **2020**;9(8).
85. Saravolatz L. D., Pawlak J., Martin H., Saravolatz S., Johnson L., *et al.* Postantibiotic effect and postantibiotic sub-MIC effect of LTX-109 and mupirocin on *Staphylococcus aureus* blood isolates. *Lett Appl Microbiol.* **2017**;65(5):410-3.
86. Hudson M. A., Lockless S. W. Elucidating the Mechanisms of Action of Antimicrobial Agents. *mBio.* **2022**;13(3):e0224021.
87. Junqueira J. C. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence.* **2012**;3(6):474-6.

88. Borman A. M. Of mice and men and larvae: *Galleria mellonella* to model the early host-pathogen interactions after fungal infection. *Virulence*. **2018**;9(1):9-12.
89. Ignasiak K., Maxwell A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC Res Notes*. **2017**;10(1):428.
90. Tsai C. J., Loh J. M., Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. **2016**;7(3):214-29.
91. Mah T. F. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology*. **2012**;7(9):1061-72.
92. Percival S. L., Hill K. E., Malic S., Thomas D. W., Williams D. W. Antimicrobial tolerance and the significance of persister cells in recalcitrant chronic wound biofilms. *Wound Repair Regen*. **2011**;19(1):1-9.
93. Lebeaux D., Chauhan A., Rendueles O., Beloin C. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens*. **2013**;2(2):288-356.
94. Innovatech®. <https://innovotech.ca/biofilm-products/mbec-assay-kit/>.
95. Corporation B. T. CDC Biofilm Reactor® (CBR) Operator's Manual. **2022**.
96. Cieplik F., Zaura E., Brandt B. W., Buijs M. J., Buchalla W., *et al.* Microcosm biofilms cultured from different oral niches in periodontitis patients. *J Oral Microbiol*. **2019**;11(1):1551596.
97. Kamimura R., Kanematsu H., Ogawa A., Kogo T., Miura H., *et al.* Quantitative Analyses of Biofilm by Using Crystal Violet Staining and Optical Reflection. *Materials (Basel)*. **2022**;15(19).
98. Peeters E., Nelis H. J., Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. **2008**;72(2):157-65.
99. Sandt C., Smith-Palmer T., Pink J., Brennan L., Pink D. Confocal Raman microspectroscopy as a tool for studying the chemical heterogeneities of biofilms in situ. *J Appl Microbiol*. **2007**;103(5):1808-20.
100. Kratky M., Konecna K., Jandourek O., Diepoltova A., Vavrova P., *et al.* Insight into the Antibacterial Action of Iodinated Imine, an Analogue of Rafoxanide: a Comprehensive Study of Its Antistaphylococcal Activity. *Microbiol Spectr*. **2023**;11(3):e0306422.
101. Adukwu E. C., Allen S. C., Phillips C. A. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol*. **2012**;113(5):1217-27.
102. Thieme L., Hartung A., Tramm K., Klingler-Strobel M., Jandt K. D., *et al.* MBEC Versus MBIC: the Lack of Differentiation between Biofilm Reducing and Inhibitory Effects as a Current Problem in Biofilm Methodology. *Biol Proced Online*. **2019**;21:18.
103. Sharahi J. Y., Azimi T., Shariati A., Safari H., Tehrani M. K., *et al.* Advanced strategies for combating bacterial biofilms. *J Cell Physiol*. **2019**;234(9):14689-708.
104. Pletzer D., Coleman S. R., Hancock R. E. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr Opin Microbiol*. **2016**;33:35-40.
105. Mishra R., Panda A. K., De Mandal S., Shakeel M., Bisht S. S., *et al.* Natural Anti-biofilm Agents: Strategies to Control Biofilm-Forming Pathogens. *Front Microbiol*. **2020**;11:566325.

106. Parrino B., Schillaci D., Carnevale I., Giovannetti E., Diana P., *et al.* Synthetic small molecules as anti-biofilm agents in the struggle against antibiotic resistance. *Eur J Med Chem.* **2019**;161:154-78.
107. Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Microbiol Spectr.* **2018**;6(4).
108. Zimmerli W., Trampuz A., Ochsner P. E. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* **2004**;351(16):1645-54.
109. Archer N. K., Mazaitis M. J., Costerton J. W., Leid J. G., Powers M. E., *et al.* Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence.* **2011**;2(5):445-59.
110. Raad I. Intravascular-catheter-related infections. *Lancet.* **1998**;351(9106):893-8.
111. Diepoltova A., Konecna K., Jandourek O., Nachtigal P. Study of the impact of cultivation conditions and peg surface modification on the in vitro biofilm formation of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis in a system analogous to the Calgary biofilm device. *J Med Microbiol.* **2021**;70(5).
112. Christensen G. D., Simpson W. A., Younger J. J., Baddour L. M., Barrett F. F., *et al.* Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue-Culture Plates - a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *J Clin Microbiol.* **1985**;22(6):996-1006.
113. Stepanovic S., Vukovic D., Hola V., Di Bonaventura G., Djukic S., *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* **2007**;115(8):891-9.
114. Chen P., Abercrombie J. J., Jeffrey N. R., Leung K. P. An improved medium for growing biofilm. *J Microbiol Meth.* **2012**;90(2):115-8.
115. Chen X. F., Thomsen T. R., Winkler H., Xu Y. J. Influence of biofilm growth age, media, antibiotic concentration and exposure time on and biofilm removal in vitro. *Bmc Microbiol.* **2020**;20(1).
116. Allkja J., Bjarnsholt T., Coenye T., Cos P., Fallarero A., *et al.* Minimum information guideline for spectrophotometric and fluorometric methods to assess biofilm formation in microplates. *Biofilm.* **2020**;2.
117. Pettit R. K., Weber C. A., Kean M. J., Hoffmann H., Pettit G. R., *et al.* Microplate alamar blue assay for biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Ch.* **2005**;49(7):2612-7.
118. Singh A. K., Prakash P., Achra A., Singh G. P., Das A., *et al.* Standardization and Classification of Biofilm Formation by Clinical Isolates of Staphylococcus aureus. *Journal of Global Infectious Diseases.* **2017**;9(3):93-+.
119. Kwasny S. M., Opperman T. J. Static biofilm cultures of Gram-positive pathogens grown in a microtiter format used for anti-biofilm drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol.* **2010**;Chapter 13:Unit 13A 8.
120. Hong Q., Dong X. Q., Chen M., Sun H. M., Hong L., *et al.* An in vitro and in vivo study of plasma treatment effects on oral biofilms. *J Oral Microbiol.* **2019**;11(1).
121. Cassat J. E., Lee C. Y., Smeltzer M. S. Investigation of biofilm formation in clinical isolates of Staphylococcus aureus. *Methods Mol Biol.* **2007**;391:127-44.
122. Beenken K. E., Blevins J. S., Smeltzer M. S. Mutation of sarA in Staphylococcus aureus limits biofilm formation. *Infect Immun.* **2003**;71(7):4206-11.
123. Shanks R. M. Q., Meehl M. A., Brothers K. M., Martinez R. M., Donegan N. P., *et al.* Genetic evidence for an alternative citrate-dependent biofilm formation pathway

- in that is dependent on fibronectin binding proteins and the GraRS two-component regulatory system. *Infect Immun.* **2008**;76(6):2469-77.
124. Kucharikova S., Vande Velde G., Himmelreich U., Van Dijck P. Biofilm Development on Medically-relevant Foreign Bodies in a Mouse Subcutaneous Model Followed by Bioluminescence Imaging. *Jove-J Vis Exp.* **2015**(95).
 125. Jefferson K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett.* **2004**;236(2):163-73.
 126. Cardile A. P., Sanchez C. J., Jr., Samberg M. E., Romano D. R., Hardy S. K., *et al.* Human plasma enhances the expression of Staphylococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules promoting biofilm formation and increases antimicrobial tolerance In Vitro. *BMC Res Notes.* **2014**;7:457.
 127. Leonhard M., Zatorska B., Moser D., Tan Y., Schneider-Stickler B. Evaluation of combined growth media for in vitro cultivation of oropharyngeal biofilms on prosthetic silicone. *J Mater Sci-Mater M.* **2018**;29(4).
 128. Petrova O. E., Sauer K. Sticky Situations: Key Components That Control Bacterial Surface Attachment. *J Bacteriol.* **2012**;194(10):2413-25.
 129. Harris L. G., Tosatti S., Wieland M., Textor M., Richards R. G. Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials.* **2004**;25(18):4135-48.
 130. Vidal L., Thuault V., Mangas A., Covenas R., Thienpont A., *et al.* Lauryl-poly-L-lysine: A New Antimicrobial Agent? *J Amino Acids.* 2014;**2014**:672367.
 131. Ma Y., Chen M., Jones J. E., Ritts A. C., Yu Q., *et al.* Inhibition of Staphylococcus epidermidis biofilm by trimethylsilane plasma coating. *Antimicrob Agents Chemother.* **2012**;56(11):5923-37.
 132. Jablonski E. H. C.: Iris International Inc; **2014**.
 133. Colville K., Tompkins N., Rutenberg A. D., Jericho M. H. Effects of Poly(L-lysine) Substrates on Attached Bacteria. *Langmuir.* **2010**;26(4):2639-44.
 134. Zapotoczna M., McCarthy H., Rudkin J. K., O'Gara J. P., O'Neill E. An Essential Role for Coagulase in Biofilm Development Reveals New Therapeutic Possibilities for Device-Related Infections. *J Infect Dis.* **2015**;212(12):1883-93.
 135. Kipanga P. N., Luyten W. Influence of serum and polystyrene plate type on stability of biofilms. *J Microbiol Meth.* **2017**;139:8-11.
 136. Lim L. M., Ly N., Anderson D., Yang J. C., Macander L., *et al.* Resurgence of Colistin: A Review of Resistance, Toxicity, Pharmacodynamics, and Dosing. *Pharmacotherapy.* **2010**;30(12):1279-91.
 137. Hamel M., Rolain J. M., Baron S. A. The History of Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria: Progress and Challenges. *Microorganisms.* **2021**;9(2).
 138. Olaitan A. O., Morand S., Rolain J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* **2014**;5:643.
 139. El-Sayed Ahmed M. A. E., Zhong L. L., Shen C., Yang Y., Doi Y., *et al.* Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerg Microbes Infect.* **2020**;9(1):868-85.
 140. Uzairue L. I., Rabaan A. A., Adewumi F. A., Okolie O. J., Folorunso J. B., *et al.* Global Prevalence of Colistin Resistance in Klebsiella pneumoniae from Bloodstream Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens.* **2022**;11(10).

141. Narimisa N., Goodarzi F., Bavari S. Prevalence of colistin resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolates in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* **2022**;21(1):29.
142. Liu X., Wu Y., Zhu Y., Jia P., Li X., *et al.* Emergence of colistin-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (CoR-HvKp) in China. *Emerg Microbes Infect.* **2022**;11(1):648-61.
143. Khalil M. A. F., Moawad S. S., Hefzy E. M. In vivo activity of co-trimoxazole combined with colistin against *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in a *Galleria mellonella* model. *J Med Microbiol.* **2019**;68(1):52-9.
144. Boyd N. K., Teng C. W., Frei C. R. Brief Overview of Approaches and Challenges in New Antibiotic Development: A Focus On Drug Repurposing. *Front Cell Infect Mi.* **2021**;11.
145. Azzali E., Girardini M., Annunziato G., Pavone M., Vacondio F., *et al.* 2-Aminooxazole as a Novel Privileged Scaffold in Antitubercular Medicinal Chemistry. *ACS Med Chem Lett.* **2020**;11(7):1435-41.
146. Lv P. C., Wang K. R., Yang Y., Mao W. J., Chen J., *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel thiazole derivatives as potent FabH inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* **2009**;19(23):6750-4.
147. Jaladanki C. K., Khatun S., Gohlke H., Bharatam P. V. Reactive Metabolites from Thiazole-Containing Drugs: Quantum Chemical Insights into Biotransformation and Toxicity. *Chem Res Toxicol.* **2021**;34(6):1503-17.
148. Juhas M., Bachtikova A., Nawrot D. E., Hatokova P., Pallabothula V. S. K., *et al.* Improving Antimicrobial Activity and Physico-Chemical Properties by Isosteric Replacement of 2-Aminothiazole with 2-Aminooxazole. *Pharmaceuticals (Basel).* **2022**;15(5).
149. EUCAST. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin Microbiol Infec.* **2003**;9:9-15.
150. Matuschek E., Brown D. F., Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* **2014**;20(4):O255-66.
151. EUCAST. The EUCAST reference method for the *Mycobacterium tuberculosis* complex is broth microdilution in Middlebrook 7H9. **2019**.
152. EUCAST. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3.1. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. **2023**.
153. EUCAST. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3.1. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. **2022**.
154. Nowakowska J., Griesser H. J., Textor M., Landmann R., Khanna N. Antimicrobial properties of 8-hydroxyserrulat-14-en-19-oic acid for treatment of implant-associated infections. *Antimicrob Agents Chemother.* **2013**;57(1):333-42.
155. Haydak M. H. Value of Foods Other Than Pollen in Nutrition of the Honeybee. *Journal of Economic Entomology.* **1936**;29(5):870-7.
156. Hu W., Lv F., Tang, Y., Chen, C., Wei, J., Dong, S., Quian, Y.; **2017**.

157. Kim B. J., Kim J., Kim Y. K., Choi S. Y., Choo H. Y. P. Synthesis of Benzoxazole Amides as Novel Antifungal Agents against *Malassezia Furfur*. *B Korean Chem Soc.* **2010**;31(5):1270-4.
158. Li D., Liu C., Jiang X., Lin Y., Zhang J., *et al.* Design, synthesis, and evaluation of substituted 2-acylamide-1,3-benzo[d]zole analogues as agents against MDR- and XDR-MTB. *Eur J Med Chem.* **2021**;209:112898.
159. Day J., Graham, J., McFadden, E.; Ocshner, U.; Sun, X.; Wong, C. . **2019**.
160. Hemdan M. M. Synthesis and Antimicrobial Activities of Some Heterocyclic Systems from 2-Furoyl Isothiocyanate. *Phosphorus Sulfur.* **2010**;185(3):620-7.
161. Trush M. M., Kovalishyn V., Hodyna D., Golovchenko O. V., Chumachenko S., *et al.* In silico and in vitro studies of a number PILs as new antibacterials against MDR clinical isolate *Acinetobacter baumannii*. *Chem Biol Drug Des.* **2020**;95(6):624-30.
162. Haroun M., Tratat C., Petrou A., Geronikaki A., Ivanov M., *et al.* 2-Aryl-3-(6-trifluoromethoxy)benzo[d]thiazole-based thiazolidinone hybrids as potential anti-infective agents: Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies. *Bioorg Med Chem Lett.* **2021**;32:127718.
163. Velkov T., Deris Z. Z., Huang J. X., Azad M. A., Butler M., *et al.* Surface changes and polymyxin interactions with a resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Innate Immun.* **2014**;20(4):350-63.
164. Gai Z., Samodelov S. L., Kullak-Ublick G. A., Visentin M. Molecular Mechanisms of Colistin-Induced Nephrotoxicity. *Molecules.* **2019**;24(3).
165. Nigam A., Kumari A., Jain R., Batra S. Colistin neurotoxicity: revisited. *BMJ Case Rep.* **2015**;2015.
166. Ordooei Javan A., Shokouhi S., Sahraei Z. A review on colistin nephrotoxicity. *Eur J Clin Pharmacol.* **2015**;71(7):801-10.
167. Manchanda V., Sanchaita S., Singh N. Multidrug resistant acinetobacter. *J Glob Infect Dis.* **2010**;2(3):291-304.
168. Westenfelder C., Gooch A. Heme Protein-Induced Acute Kidney Injury Is Caused by Disruption of Mitochondrial Homeostasis in Proximal Tubular Cells. *Kidney360.* **2022**;3(12):2140-2.
169. Humphreys H. *Staphylococcus aureus*: the enduring pathogen in surgery. *Surgeon.* **2012**;10(6):357-60.
170. Jin Z., Yao G. M. Amaryllidaceae and alkaloids. *Nat Prod Rep.* **2019**;36(10):1462-88.
171. Castilhos T. S., Giordani R. B., Henriques A. T., Menezes F. S., Zuanazzi J. Â. S. Avaliação in vitro das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcalóide montanina. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* **2007**;17:209-14.
172. Govindaraju K., Ingels A., Hasan M. N., Sun D. D., Mathieu V., *et al.* Synthetic analogues of the montanine-type alkaloids with activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **2018**;28(4):589-93.
173. Inubushi Y., Fales H. M., Warnhoff E. W., Wildman W. C. Structures of Montanine, Coccinine, and Manthine. *J Org Chem.* **1960**;25(12):2153-64.
174. Cedrón J. C., Estévez-Braun A., Ravelo A. G., Gutiérrez D., Flores N., *et al.* Bioactive Montanine Derivatives from Halide-induced Rearrangements of Haemanthamine-type Alkaloids. Absolute Configuration by VCD. *Org Lett.* **2009**;11(7):1491-4.
175. Maafi N., Pidany F., Mariková J., Korábecny J., Hulcová D., *et al.* Derivatives of montanine-type alkaloids and their implication for the treatment of Alzheimer's

- disease: Synthesis, biological activity and study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2021**;51.
176. Hulcová D., Maríková J., Korábecny J., Hostálková A., Jun D., *et al.* Amaryllidaceae alkaloids from L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*. **2019**;165.
 177. Kohelová E., Perinová R., Maafi N., Korábecny J., Hulcová D., *et al.* Derivatives of the β -Crinane Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine as Multi-Target Directed Ligands for Alzheimer's Disease. *Molecules*. **2019**;24(7).
 178. Tan C.-X., Schrader K. K., Mizuno C. S., Rimando A. M. Activity of lycorine analogues against the fish bacterial pathogen *Flavobacterium columnare*. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2011**;59(11):5977-85.
 179. Maafi N., Mamun A. A., Jandourek O., Marikova J., Breiterova K., *et al.* Semisynthetic Derivatives of Selected Amaryllidaceae Alkaloids as a New Class of Antimycobacterial Agents. *Molecules*. **2021**;26(19).
 180. Jablonska-Trypuc A., Makula M., Wlodarczyk-Makula M., Wolejko E., Wydro U., *et al.* Inanimate Surfaces as a Source of Hospital Infections Caused by Fungi, Bacteria and Viruses with Particular Emphasis on SARS-CoV-2. *Int J Environ Res Public Health*. **2022**;19(13).
 181. Samia N. I., Robicsek A., Heesterbeek H., Peterson L. R. Methicillin-resistant staphylococcus aureus nosocomial infection has a distinct epidemiological position and acts as a marker for overall hospital-acquired infection trends. *Sci Rep*. **2022**;12(1):17007.
 182. Rocchetti T. T., Martins K. B., Martins P. Y. F., Oliveira R. A., Mondelli A. L., *et al.* Detection of the *mecA* gene and identification of *Staphylococcus* directly from blood culture bottles by multiplex polymerase chain reaction. *Braz J Infect Dis*. **2018**;22(2):99-105.
 183. Pereira V. C., Romero L. C., Pinheiro-Hubinger L., Oliveira A., Martins K. B., *et al.* Coagulase-negative staphylococci: a 20-year study on the antimicrobial resistance profile of blood culture isolates from a teaching hospital. *Braz J Infect Dis*. **2020**;24(2):160-9.
 184. Asante J., Hetsa B. A., Amoako D. G., Abia A. L. K., Bester L. A., *et al.* Multidrug-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bloodstream in the uMgungundlovu District of KwaZulu-Natal Province in South Africa: Emerging Pathogens. *Antibiotics (Basel)*. **2021**;10(2).
 185. Shariati A., Dadashi M., Chegini Z., van Belkum A., Mirzaii M., *et al.* The global prevalence of Daptomycin, Tigecycline, Quinupristin/Dalfopristin, and Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci strains: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control*. **2020**;9(1):56.
 186. Dudek B., Bachor U., Drozd-Szczygiel E., Brozyna M., Dabrowski P., *et al.* Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Water-Soluble Isoxazole-Linked 1,3,4-Oxadiazole with Delocalized Charge: In Vitro and In Vivo Results. *Int J Mol Sci*. **2023**;24(22).
 187. Chen H., Du Y., Xia Q., Li Y., Song S., *et al.* Role of linezolid combination therapy for serious infections: review of the current evidence. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **2020**;39(6):1043-52.

188. Hashemian S. M. R., Farhadi T., Ganjparvar M. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Des Devel Ther.* **2018**;12:1759-67.
189. Yaghoubi S., Zekiy A. O., Krutova M., Gholami M., Kouhsari E., *et al.* Tigecycline antibacterial activity, clinical effectiveness, and mechanisms and epidemiology of resistance: narrative review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2022**;41(7):1003-22.
190. Cai Y., Bai N., Liu X., Liang B., Wang J., *et al.* Tigecycline: Alone or in combination? *Infect Dis (Lond).* **2016**;48(7):491-502.