

**UNIVERZITA PARDUBICE**

**Fakulta chemicko-technologická**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**UNIVERZITA PARDUBICE**

**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**Testování antimikrobiální aktivity strukturních analogů purinů, pyrimidinů a  
kyseliny boronové na vybrané mikroorganismy**

Disertační práce

2018

**Autor: Mgr. Eva Slehová**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**

**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**

**Antimicrobial activity of the structure derivates of purines, pyrimidines and  
boronic acid against selected microorganisms**

Doctoral thesis

2018

**Author: Mgr. Eva Slehova**

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

V Pardubicích, dne 29. dubna 2018

Mgr. Eva Slehová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala Doc. MVDr. Jaroslavě Mazurové, CSc. a prof. Ing. Karlovi Venturovi, CSc. za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytovali během celého postgraduálního studia.

Rovněž bych chtěla poděkovat Odboru biologické ochrany Těchonín, kde mi bylo umožněno testování provádět, zastoupeného Mgr. Otou Pavlišem, Ph.D. Dále bych ráda poděkovala panu Ing. Zlatku Janebovi, Ph.D. z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, za poskytnutí testovaných sloučenin.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu a trpělivost v průběhu celého postgraduálního studia.

## SEZNAM ZKRATEK

A.	<i>Acinetobacter</i>
ATB	antibiotikum
B.	<i>Bordetella</i>
Bac.	<i>Bacillus</i>
C.	<i>Candida</i>
CNS	centrální nervová soustava
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. Deoxyribonucleic Acid)
DMSO	dimethylsulfoxid
E.	<i>Escherichia</i>
ESBL	širokospektré beta-laktamasy (z angl. extended spectrum beta-lactamase)
F.	<i>Francisella</i>
G <sup>+</sup>	gram-pozitivní bakterie
G <sup>-</sup>	gram-negativní bakterie
KA	krevní agar
L.	<i>Listeria</i>
m-RNA	mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. Messenger Ribonucleic Acid)
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MH bujón	Mueller-Hintonův bujón
MIC	minimální inhibiční koncentrace
OBO	Odbor biologické ochrany, Těchonín

PBPs	penicilin vázající proteiny (z angl. Penicillin-Binding Proteins)
<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PABA	kyselina para-aminobenzoová (z angl. Para-Aminobenzoic acid)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. Ribonucleic Acid)
<i>Sal.</i>	<i>Salmonella</i>
<i>St.</i>	<i>Staphylococcus</i>
ÚOChB	Ústav organické chemie a biochemie

## SOUHRN

Disertační práce byla zaměřena na stanovení antimikrobiálních účinků strukturních analogů purinů, pyrimidinů a derivátů kyseliny boronové na vybrané referenční kmeny bakterií a kvasinek. Do testování byl dále zahrnut kmen EHEC O104:H4, který byl izolován od pacienta (importovaná nákaza z Německa) v roce 2011 a byl poskytnut pracovníky Státního zdravotního ústavu v Praze. Jednotlivé strukturní analogy pocházely z Ústavu organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky. Testování probíhalo v laboratořích úrovně BSL-3 Odboru biologické ochrany v Těchoníně.

Při zjišťování antimikrobiálních účinků strukturních analogů byla nejprve ověřována jejich schopnost inhibovat růst testovaných mikroorganismů. Následně byla pro jednotlivé účinné sloučeniny stanovena mikrodiluční metodou jejich minimální inhibiční koncentrace. Vzhledem k unikátní povaze a původu testovaných sloučenin byly inhibiční účinky zjišťovány i pro zavedená antibiotika a léčiva ze skupiny pyrimidinových sloučenin, pro možnost srovnání účinnosti strukturních analogů. Na základě výsledků byly vyhodnoceny potenciální kandidátní sloučeniny s antimikrobiální aktivitou.

Růst testovaných mikroorganismů nejlépe inhibovaly strukturní analogy kyseliny boronové. Naopak nejmenší spektrum účinnosti bylo zaznamenáno u analogů purinových sloučenin, které inhibovaly růst pouze *Bordetella pertussis* a *Francisella tularensis*. V žádné z uvedených skupin nebyla zjištěna sloučenina s antimikrobiálním účinkem na všechny testované druhy bakterií a kvasinek. Nejnižší inhibiční účinky použitých strukturních analogů byly detekovány na druhy *Acinetobacter baumannii* a *Bacillus subtilis*. Žádná z testovaných sloučenin neinhibovala růst *Pseudomonas aeruginosa* a EHEC O104:H4.

Z testovaných sloučenin bylo nejširší spektrum antimikrobiálního působení zaznamenáno pro látky s označením 2/F7 a 3/B2, přičemž zejména u první jmenované byla prokázána účinnost na celé spektrum G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakterie včetně kvasinek. Pro tyto sloučeniny byly zaznamenány signifikantní antimikrobiální účinky a mohou tak být vhodné pro další výzkum zabývající se problematikou léčby vybraných infekčních onemocnění člověka i zvířat.



## SUMMARY

The doctoral thesis was focused on determination of antimicrobial effects of structural analogs of purines, pyrimidines and boronic acid derivatives on selected reference bacteria and yeasts. One strain of EHEC O104: H4 was also included in the antimicrobial testing. It was isolated from the patient in 2011 (imported infection from Germany) and was provided to the staff of the State Health Institute in Prague. The individual structural analogues come from the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic. Testing was carried out at BSL-3 laboratories at the Biological Protection Center in Techonin.

In detecting the antimicrobial effects of structural analogs, we first verified their ability to inhibit the growth of test microorganisms. Subsequently, we determined the minimum inhibitory concentration for each active substance by the microdilution method. Due to the unique nature and origin of test compounds, we have investigated the inhibitory effects of antibiotics introduced to compare the efficacy of structural analogs. Based on the results, we evaluated potential candidate substances with antimicrobial activity.

The growth of test organisms best inhibited boronic acid structural analogs. On the other hand, the smallest spectrum of efficacy was observed for analogs of purine compounds that inhibited growth only in the *Bordetella pertussis* and *Francisella tularensis* strains. No compound with antimicrobial activity was found in any of these groups for all tested bacteria and yeast species. The lowest inhibitory effects of structural analogs against tested microorganisms were detected for *Acinetobacter baumannii* and *Bacillus subtilis*. None of the tested compounds inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and EHEC O104:H4.

Of the tested compounds, the broadest spectrum of antimicrobial activity was recorded for substances designated 2/F7 and 3/B2, and in particular the first one was shown to be efficacious on the entire spectrum of G<sup>+</sup> and G<sup>-</sup> bacteria, including yeasts. Significant antimicrobial effects have been reported for these compounds and may therefore be useful for further research into the treatment of selected infectious diseases in humans and animals.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	13
<b>2. ANTIBIOTIKA</b> .....	14
<b>2.1 MECHANISMUS PŮSOBNÍ ANTIBIOTIK NA MIKROORGANISMY</b> .....	14
2.1.1 INHIBICE SYNTÉZY BUNĚČNÉ STĚNY .....	14
2.1.2 PORUŠENÍ CYTOPLAZMATICKÉ MEMBRÁNY .....	16
2.1.3 INHIBICE SYNTÉZY PROTEINŮ .....	16
2.1.4 INHIBICE SYNTÉZY NUKLEOVÝCH KYSELIN .....	17
2.1.5 INHIBICE METABOLISMU KYSELINY LISTOVÉ.....	17
<b>2.2 CHEMICKÁ STRUKTURA ANTIBIOTIK</b> .....	18
2.2.1 BETA-LAKTAMOVÁ ANTIBIOTIKA .....	18
2.2.2 PEPTIDOVÁ ANTIBIOTIKA .....	19
2.2.3 CHINOLOVÁ A FLUROCHINOLOVÁ ANTIBIOTIKA .....	19
2.2.4 AMINOGLYKOSIDOVÁ ANTIBIOTIKA .....	20
2.2.5 GLYKOPEPTIDOVÁ ANTIBIOTIKA .....	21
2.2.6 TETRACYKLINOVÁ ANTIBIOTIKA.....	21
2.2.7 AMFENIKOLOVÁ ANTIBIOTIKA .....	22
2.2.8 MAKROLIDOVÁ ANTIBIOTIKA .....	23
2.2.9 LINKOSAMIDY .....	23
2.2.10 SULFONAMIDY .....	24
2.2.11 ANSAMYCINOVÁ ANTIBIOTIKA.....	24
2.2.12 ANTIMYKOTIKA .....	25
<b>2.3 LÁTKY TESTOVANÉ PRO ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY</b> .....	26
2.3.1 KYSELINA BORONOVÁ A JEJÍ DERIVÁTY .....	26
2.3.2 PURINOVÉ A PYRIMIDINOVÉ BÁZE A JEJICH ANALOGY.....	27
<b>3. REZISTENCE MIKROORGANISMŮ NA ANTIBIOTIKA</b> .....	28
<b>3.1 PRIMÁRNÍ REZISTENCE</b> .....	28
<b>3.2 ZÍSKANÁ REZISTENCE</b> .....	28
<b>3.3 MECHANISMY REZISTENCE</b> .....	29
3.3.1 ZMĚNA CÍLOVÉ STRUKTURY.....	29
3.3.2 ZMĚNA PRŮCHODNOSTI BUNĚČNÝCH OBALŮ .....	30
3.3.3 AKTIVNÍ VYPUZOVÁNÍ ANTIBIOTIKA .....	30
3.3.4 ZMĚNA METABOLISMU .....	30

3.3.5 PRODUKCE BAKTERIÁLNÍCH ENZYMŮ .....	30
<b>4. TESTOVANÉ MIKROORGANISMY .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 ACINETOBACTER BAUMANNII .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2 BACILLUS SUBTILIS .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3 BORDETELLA PERTUSSIS .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4 CANDIDA ALBICANS.....</b>	<b>33</b>
<b>4.5 ESCHERICHIA COLI A EHEC O104:H4 .....</b>	<b>34</b>
<b>4.6 FRANCISELLA TULARENSIS LVS .....</b>	<b>35</b>
<b>4.7 LISTERIA MONOCYTOGENES .....</b>	<b>36</b>
<b>4.8 PSEUDOMONAS AERUGINOSA .....</b>	<b>37</b>
<b>4.9 SALMONELLA ENTERITIDIS .....</b>	<b>38</b>
<b>4.10 STAPHYLOCOCCUS AUREUS .....</b>	<b>38</b>
<b>5. METODY STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY .....</b>	<b>39</b>
<b>5.1 KVALITATIVNÍ METODY .....</b>	<b>39</b>
<b>5.2 KVANTITATIVNÍ METODY .....</b>	<b>40</b>
<b>6. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>41</b>
<b>7. MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>42</b>
<b>7.1 TESTOVANÉ KMENY BAKTERIÍ A KVASINEK .....</b>	<b>42</b>
<b>7.2 CHEMIKÁLIE A REAGENCIE .....</b>	<b>43</b>
7.2.1 TESTOVANÉ SLOUČENINY A ANTIBIOTIKA .....	43
7.2.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA .....	44
<b>7.3 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....</b>	<b>45</b>
7.3.1 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE .....	45
7.3.2 LABORATORNÍ POMŮCKY .....	45
<b>7.4 STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY TESTOVANÝCH LÁTEK .....</b>	<b>46</b>
7.4.1 PŘÍPRAVA PRACOVNÍCH ROZTOKŮ TESTOVANÝCH SLOUČENIN .....	46
7.4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKU TESTOVANÝCH ANTIBIOTIK .....	46
7.4.3 PŘÍPRAVA MIKROBIÁLNÍ SUSPENZE .....	46
7.4.4 TESTOVÁNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY LÁTEK .....	46
7.4.5 MIKRODILUČNÍ METODA .....	48
<b>8. VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>51</b>
<b>8.1 HODNOCENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY TESTOVANÝCH LÁTEK .....</b>	<b>52</b>
<b>8.2 STANOVENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE TESTOVANÝCH LÁTEK ..</b>	<b>63</b>

<b>9. ZÁVĚR</b> .....	73
<b>10. LITERÁRNÍ ZDROJE</b> .....	74

# 1. ÚVOD

Aplikace antibiotik (ATB), případně antimykotik, je nedílnou součástí terapie bakteriálních či kvasinkových infekcí. Od objevu penicilinu v roce 1928 byla postupně vyvinuta a zavedena řada dalších antimikrobiálních přípravků a s nimi se objevila i naděje, že se s jejich pomocí podaří jednou infekční onemocnění zcela vymýtit. Přesto i v současnosti zůstává terapie infekčních chorob závažným celosvětovým problémem. Důvodem je vzrůstající rezistence mikroorganismů k antimikrobiálním látkám.

Vzhledem k uvedené skutečnosti je nutné věnovat pozornost výskytu rezistentních bakterií komplexně, a to jak v humánní, tak i veterinární, potravinářské a environmentální praxi. Šíření rezistentních kmenů je v současnosti globálním problémem, vyžadujícím společnou strategii na celosvětové úrovni. Řešení problémů spojených s narůstající rezistencí k antimikrobiálním látkám je koordinováno zavedením speciálních programů tzv. surveillance, kdy dochází ke stanovení epidemiologické analýzy rezistence a spotřeby ATB.

Vedle mikroorganismů odolných k různým ATB současně, tzv. multirezistentních kmenů se také setkáváme s mikroorganismy tzv. panrezistentními, které nereagují na léčbu z žádných v současnosti dostupných ATB. Řada výzkumných pracovišť po celém světě se proto intenzivně věnuje vývoji nových látek s antimikrobiální aktivitou, které by mohly nahradit stávající neúčinná léčiva a zabránit tak šíření, případně úplně eliminovat výskyt rezistentních kmenů.

Jednou z možností nalezení nových efektivních antimikrobiálních přípravků, je uplatnění již v praxi zavedených sloučenin, respektive jejich strukturních analogů. Cílem disertační práce bylo provést testování antimikrobiální účinků sloučenin odvozených od strukturních základů purinu, pyrimidinu a kyseliny boronové na vybrané mikroorganismy.

## **2. ANTIBIOTIKA**

ATB jsou látky, které potlačují růst a množení mikroorganismů nebo je přímo usmrcují. Tyto sloučeniny s antimikrobiálními účinky, mohou produkovat mikroorganismy, rostliny nebo živočichové. Mnohé z nich jsou připravovány polosynteticky nebo i synteticky.

Cílem antimikrobiální terapie je toxicky působit na mikrobiální buňky, ale nepoškozovat buňky hostitele (makroorganismu). Jedná se o tzv. selektivní toxicitu. Toxické účinky ATB jsou zaměřeny převážně na struktury, které postrádají eukaryotické buňky.

Na základě svého působení na bakterie jsou ATB rozdělena na tzv. bakteriostatická a baktericidní. Bakteriostatická ATB zastavují růst a množení mikroorganismů. Jejich nejnižší koncentrace, která viditelně inhibuje růst, se označuje jako minimální inhibiční koncentrace (MIC). Mezi tato ATB patří například tetracykliny, chloramfenikol, makrolidy, linkosamidy, trimetoprim nebo sulfonamidy.

Baktericidní ATB mikroorganismus usmrcují. Míra jejich účinku se hodnotí nejnižší koncentrací potřebnou k usmrcení mikroba za určitou dobu, tzv. minimální baktericidní koncentrací (MBC). Mezi nejznámější patří beta-laktamová, dále glykopeptidová, aminoglykosidová a polypeptidová ATB, také nitroimidazoly a fluorochinolony (Zaman a kol., 2017).

Vzhledem k velkému počtu ATB jsou tyto látky z praktického hlediska rozlišovány podle různých aspektů, jako je například mechanismus jejich působení na mikrobiální buňku nebo chemická struktura.

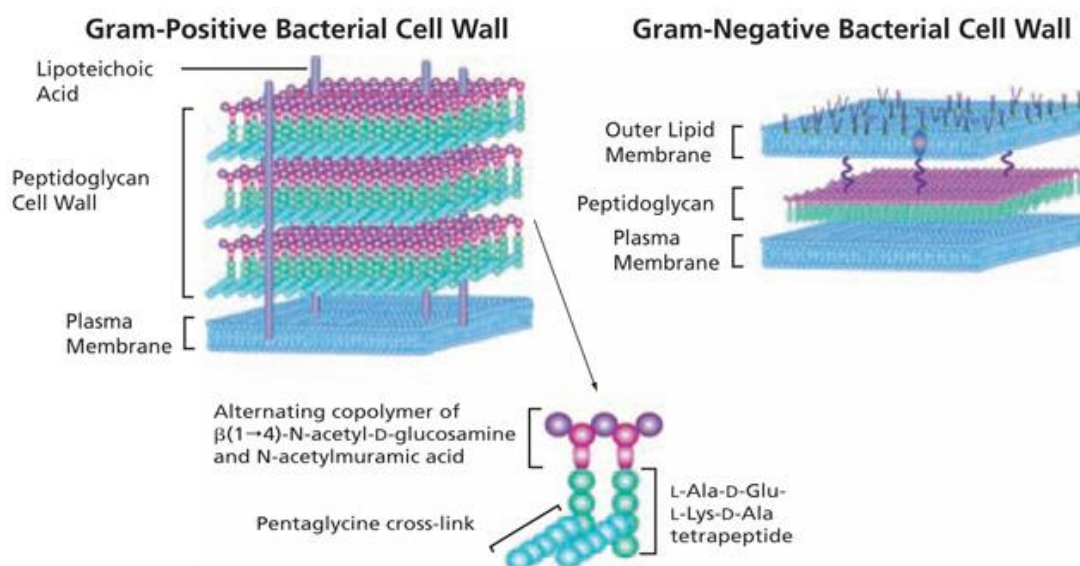
### **2.1 MECHANISMUS PŮSOBENÍ ANTIBIOTIK NA MIKROORGANISMY**

#### **2.1.1 INHIBICE SYNTÉZY BUNĚČNÉ STĚNY**

Na rozdíl od eukaryotických buněk mají prokaryotické bakterie cytoplasmatickou membránu krytou buněčnou stěnou. Její stavba, síla i složení jsou odlišné, nejen mezi druhy, ale i kmeny jednotlivých mikrobů. Prekursory pro stavbu buněčné stěny

(peptidoglyany) jsou syntetizovány v cytoplasmě a cytoplasmatické membráně. V závěrečné fázi syntézy působí proteiny-enzymy, na které se mohou ATB vázat a potlačit jejich enzymatickou aktivitu. Dochází tím k narušení syntézy buněčné stěny a následně až k lýze buňky.

Buněčnou stěnu gram-pozitivních ( $G^+$ ) bakterií tvoří silná vrstva peptidoglykanu, jehož základními stavebními prvky jsou aminosacharidy,  $\beta$ -vázaný N-acetylglukosamin a N-acetylmuramová kyselina, které jsou navzájem propojeny peptidovými řetězci. Ve stěně gram-negativních ( $G^-$ ) bakterií je pouze slabá vrstva peptidoglykanu, uložená pod vnější membránou, která obsahuje fosfolipidy a lipopolysacharidy, znesnadňující průnik ATB do bakteriální buňky. Struktura buněčných stěn  $G^+$  a  $G^-$  bakterií je znázorněna na obrázku č. 1.



**Obrázek č. 1: Struktura buněčné stěny  $G^+$  a  $G^-$  bakterií (1)**

Syntéza peptidoglykanu probíhá ve třech fázích, do nichž mohou ATB negativně zasahovat. Syntéza bakteriální buněčné stěny je dokončena vytvořením příčného spojení mezi peptidovými řetězci. Tento proces katalyzuje transpeptidáza, na jejíž aktivní místo se mohou ATB vázat a způsobit inhibici enzymu. Například cefalosporiny vazbou na proteiny tzv. penicilin-vazebné proteiny (PBPs), inhibují syntézu peptidoglykanu. ATB mohou také blokovat enzymy uplatňující se při propojování peptidoglykanů v buněčné stěně. V důsledku zvyšujícího se osmotického tlaku následně dochází k lýze buňky. Dále mohou

bránit zesíťování peptidů a mukosacharidových řetězců, čímž dochází k nesprávné syntéze buněčné stěny (Ozturk a kol., 2015).

Inhibici syntézy buněčné stěny způsobují např. beta-laktamová ATB (peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy), glykopeptidy (vankomycin a teikoplanin), bacitracin či cykloserin.

### 2.1.2 PORUŠENÍ CYTOPLAZMATICKÉ MEMBRÁNY

Cytoplazmatická membrána je semipermeabilní vrstva ovlivňující transport iontů a různých substrátů do buňky. Tím zajišťuje osmotické poměry v buňce a současně zastává významnou funkci při jejím dělení. Porušení struktury má za následek zvýšení permeability membrány a následný únik endogenních látek a narušení iontové rovnováhy, což vede k lýze buňky (Erand a kol., 2016).

Membránu mohou narušit antimikrobiální látky kationické povahy, například polymyxiny B a E (kolistin), kdy kovalentní vazbou k membráně reagují s jejími fosfolipidy. Způsobují tím depolarizaci membrány díky změně zastoupení  $Ca^{2+}$  a  $Mg^{2+}$  na povrchu a následně i zánik bakteriální buňky (Gupta a kol., 2009).

### 2.1.3 INHIBICE SYNTÉZY PROTEINŮ

Syntéza proteinů probíhá na ribozomálních podjednotkách 30S a 50S, kde dochází k prodlužování peptidového řetězce. ATB zasahují do procesu proteosyntézy v jejích různých fázích (např. tlumení iniciace, zabránění vestavby aminokyseliny do bílkovin, atd.). Následkem je porušení schopnosti tvorby peptidických sekvencí. Vznikají tak pouze labilní komplexy peptidů nebo bílkovin se změněnou strukturou, což může vést ke smrti mikrobiální buňky, příp. k zastavení jejího růstu a množení (Yoneyama a Katsumata, 2014).

Mezi ATB inhibující tvorbu bílkovin patří tetracykliny vážící se na 30S podjednotku ribozomu, čímž brání spojení aminoacyl-tRNA s vazebným místem na ribozomální podjednotce. Tím blokuje prodlužování polypeptidového řetězce. Například chloramfenikol, působí na peptidyltransferázu na 50S ribosomální podjednotce, která



spojuje aminokyseliny v peptidový řetězec. Na tuto podjednotku působí také makrolidová ATB, linkosamidy nebo diterpeny (Wilson, 2014).

#### 2.1.4 INHIBICE SYNTÉZY NUKLEOVÝCH KYSELIN

Syntéza nukleových kyselin může být ovlivněna v různých fázích. ATB mohou inhibovat DNA nebo RNA-polymerázu, účastníci se replikace nukleových kyselin. Případně blokují purinové a pyrimidinové nukleotidy, které tvoří základní stavební jednotky nukleových kyselin. Nebo mohou negativně ovlivnit přepis genetické informace z DNA do m-RNA. Například chinolony, fluorochinolony, aminoglykosidy a novobiocin ovlivňují činnost DNA-gyrázy, tj. enzymu, umožňujícího „zavíjení a rozvíjení“ DNA v průběhu replikace (Collin a kol., 2011).

Jiným mechanismem působí rifampicin, který inhibuje dependentní RNA polymerázu. Tím blokuje transkripci (přepis) genetické informace uložené v DNA do struktury m-RNA v bakteriální buňce (Floss, 2005).

#### 2.1.5 INHIBICE METABOLISMU KYSELINY LISTOVÉ

Podstatou působení těchto léčiv je porušení (blokáda) enzymatické reakce, v důsledku obsazení aktivního centra enzymu léčivem-strukturálním analogem specifického metabolitu. Pokud je tento antimetabolit v převaze, vytěsňuje specifický metabolit z biochemické reakce. Jedná se o tzv. kompetitivní inhibici (Yoneyama a Katsumata, 2014).

Kyselina listová je základní sloučenina nezbytná pro stavbu purinů. Je syntetizována z kyseliny para-aminobenzoové (PABA). Její syntézu ovlivňují např. sulfonamidy, které mají podobnou strukturu (jsou analogy) jako PABA, z níž bakterie syntetizuje kyselinu listovou. Po vniknutí do bakterie soutěží sulfonamidy s PABA o vazbu na enzym dihydrofolátreduktázu, čímž kompetitivně inhibují syntézu tetrahydrofolátů, které jsou nezbytné pro syntézu purinových nukleotidů. Sulfonamidy, stejně jako trimethoprim, působí bakteriostaticky. Jejich vzájemnou kombinací lze dosáhnout baktericidního účinku (Minato a kol., 2018).

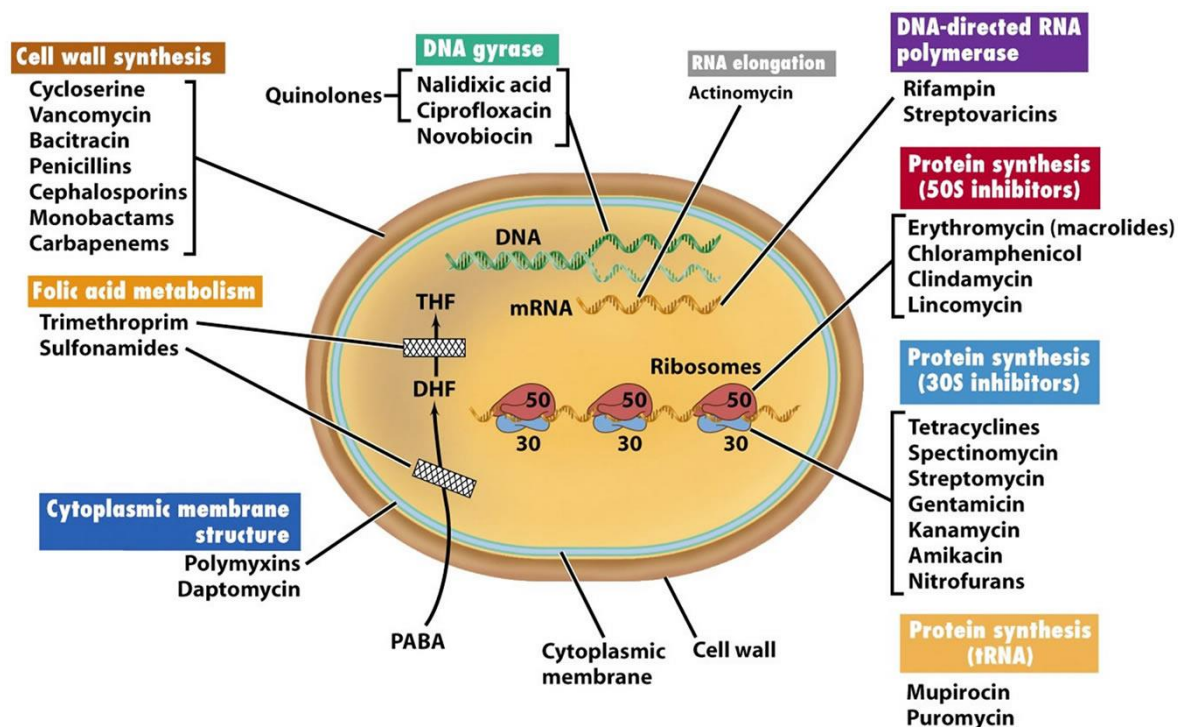


Figure 20-14 Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

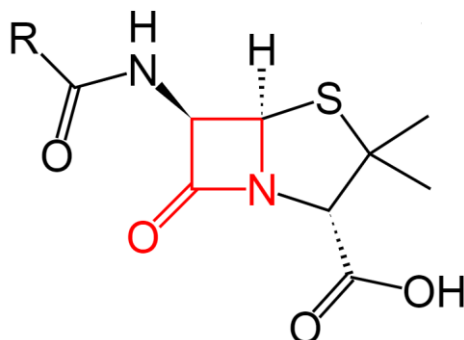
## Obrázek č. 2: Mechanismy působení různých ATB na bakteriální buňku (2)

### 2.2 CHEMICKÁ STRUKTURA ANTIBIOTIK

#### 2.2.1 BETA-LAKTAMOVÁ ANTIBIOTIKA

Charakteristickým znakem beta-laktamových ATB je přítomnost beta-laktamového kruhu (obrázek č. 3). Tyto sloučeniny inhibují syntézu buněčné stěny vazbou na proteiny enzymů (PBPs), které se podílejí na syntéze buněčné stěny. Aktivují buněčné hydrolázy, tím dochází k urychlení degradaci stávajícího peptidoglykanu. Beta-laktamy patří mezi skupinu ATB s baktericidním účinkem (Konaklieva, 2014). Mezi beta-laktamová ATB jsou řazeny základní peniciliny (benzylpenicilin), které jsou účinné proti  $G^+$  bakteriím neprodukujícím beta-laktamázu, semisyntetické peniciliny (oxacilin, methicilin) odolné proti stafylokokové penicilináze, a aminopeniciliny s rozšířeným spektrem účinku (ampicilin, amoxicilin) proti  $G^-$  bakteriím. Do uvedené skupiny dále patří cefalosporiny, cefamyciny, karbapenemy a monobaktamy. Významnou skupinou jsou tzv. inhibitory beta-laktamáz (kyselina klavulanová, tazobactam, či sulbactam). Mají schopnost

ireverzibilní vazby na aktivní centrum bakteriálních beta-laktamáz a tím je inaktivovat (Penwell a kol., 2015).



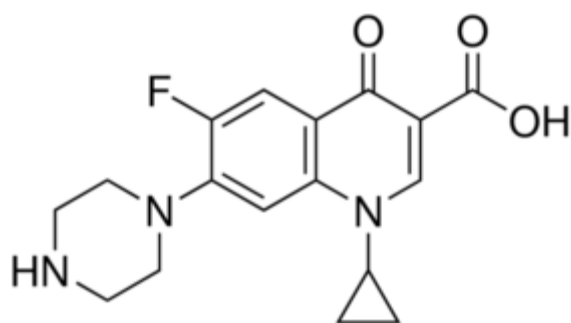
**Obrázek č. 3: Chemická struktura penicilinu s vyznačeným beta-laktamovým kruhem (3 )**

### 2.2.2 PEPTIDOVÁ ANTIBIOTIKA

Tato ATB obsahují aminokyseliny, jež tvoří cyklické nebo lineární oligopeptidy. Vedle aminokyselin mají ve své struktuře i imino nebo mastné kyseliny. Peptidová ATB jsou baktericidní, působí na G- bakterie včetně multirezistentních kmenů. Širšímu užití brání jejich vyšší nefrotoxicita a neurotoxicita. Významnými ATB z této skupiny jsou polymyxiny a bacitracin (Zavascki a kol., 2007).

### 2.2.3 CHINOLOVÁ A FLUOROCHINOLOVÁ ANTIBIOTIKA

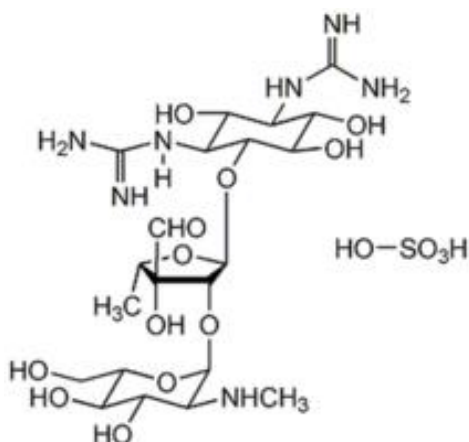
Chinolony jsou látky primárně působící baktericidně, jejichž mechanismem je inhibice bakteriální gyrázy, enzymu zodpovědného za správné splétání a rozplétání řetězců bakteriálních nukleových kyselin. Fluorochinolony jsou syntetické sloučeniny odvozené od kyseliny nalidixové, jež inhibují syntézu DNA vazbou na DNA-gyrázu a topoizomerázu IV. Uplatňují se v léčbě infekcí vyvolaných G- i G+ bakteriemi, chlamydiemi, mykoplazmaty či anaerobními patogeny. K významným fluorochinolonom patří norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, pefloxacin a levofloxacin, jež jsou využívány zejména u pneumokokových nebo nosokomiálních infekcí (Alfred a kol., 2014).



Obrázek č. 4: Chemická struktura ciprofloxacinu (4)

#### 2.2.4 AMINOGLYKOSIDOVÁ ANTIBIOTIKA

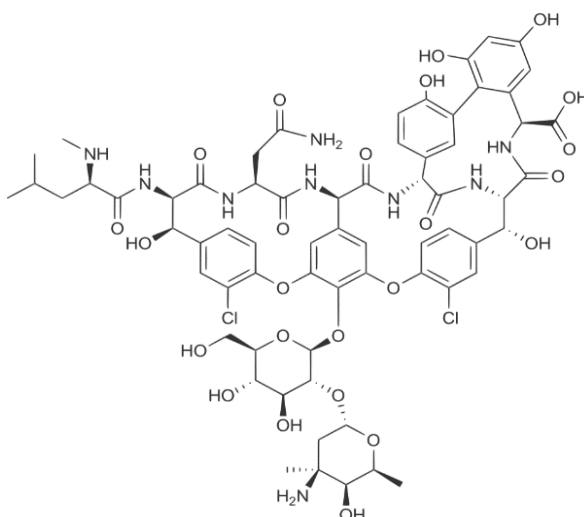
Aminoglykosidy jsou z hlediska struktury hydrofilní polární sloučeniny, skládající se z charakteristického aminocyklitolového kruhu upoutaného glykosidovými vazbami k aminocukrům. Mechanismus antibakteriálního účinku uvedených sloučenin je založen na inhibici syntézy proteinů v důsledku ireverzibilní vazby aminoglykosidů na 30S podjednotku ribosomu. Bylo zjištěno, že primárním místem působení aminoglykosidů je vnější bakteriální membrána. Působením kationických ATB dochází k tvorbě pórů v buněčné stěně a následnému úniku intracelulárního obsahu (Nayak-Rao, 2010; Toth a kol., 2010; Taber a kol., 1987). Aminoglykosidy působí baktericidně na většinu G-bakterií. Uplatňují se zejména u infekcí vyvolaných rody *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, a *Shigella*. Nejčastěji používanými aminoglykosidovými ATB jsou streptomycin, gentamicin, tobramycin, amikacin nebo kanamycin (Mingeot-Leclercq a kol., 1999).



Obrázek č. 5: Chemická struktura streptomycin sulfátu (5)

## 2.2.5 GLYKOPEPTIDOVÁ ANTIBIOTIKA

Jejich struktura je tvořena peptidy, které jsou substituované cukry. Na základě povahy aminokyselin (alifatické, aromatické) jsou rozlišovány čtyři třídy glykopeptidů. Dalším kritériem je struktura a umístění sacharidové složky. Antibakteriální účinek glykopeptidových ATB je zaměřen na inhibici syntézy buněčné stěny. Glykopeptidová ATB jsou používána zejména při infekcích vyvolaných  $G^+$  bakteriemi jako např. *Staphylococcus (St.) aureus* rezistentní k methicilinu (MRSA) nebo *Enterococcus faecalis* (Malabarba a Goldstein, 2005). Do této skupiny ATB patří vankomycin, teicoplanin, daptomycin, televancin, dalbavancin a oritavancin. V České republice jsou k dispozici pouze vankomycin a teicoplanin (Kwun a Hong, 2014).

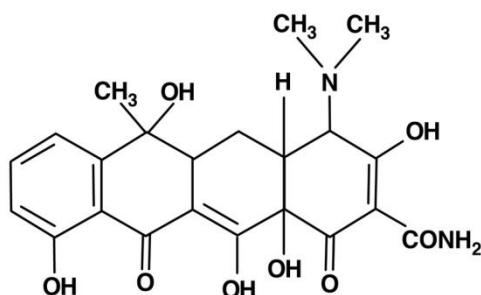


**Obrázek č. 6: Chemická struktura vankomycinu (6)**

## 2.2.6 TETRACYKLINOVÁ ANTIBIOTIKA

Tetracyklinová ATB jsou tvořena čtyřmi lineárně spojenými šestičlennými cykly, na které jsou napojeny různé funkční skupiny, jakými jsou např. dimethylaminy, hydroxy nebo methylové substituenty. Působí bakteriostaticky, inhibicí syntézy proteinů v bakteriích prostřednictvím vazby na 30S podjednotky ribosomů. Z důvodu výskytu toxicity i narůstající rezistence jsou nyní nahrazována širokospektrálními beta-laktamovými ATB. Tetracykliny jsou charakteristické pro svůj širokospektrální účinek - působí jak na  $G^+$ , tak i  $G^-$  bakterie. Nejvýznamnějšími jsou doxycyklin, tetracyklin a

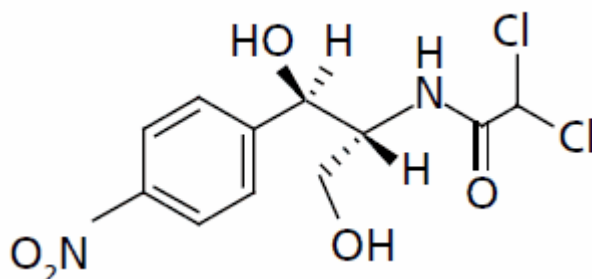
oxytetracyklin. Doxycyklin je lékem volby u infekcí způsobených mykoplasmaty, rickettsiemi a chlamydiemi (Chopra a kol., 2001).



**Obrázek č. 7: Chemická struktura tetracyklinu** (Kwiatkowska a kol., 2013)

### 2.2.7 AMFENIKOLOVÁ ANTIBIOTIKA

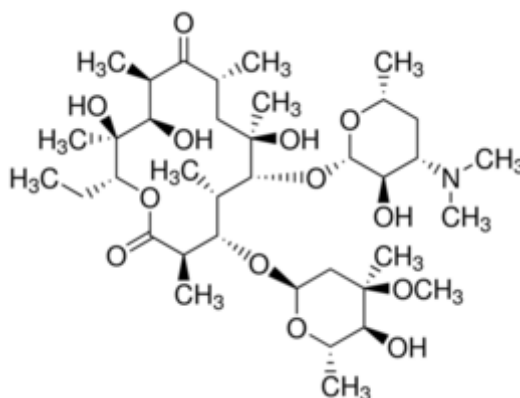
Amfenikoly představují skupinu ATB strukturně odvozenou od fenylypropanoidů. Mechanismus jejich účinku je založen na inhibici syntézy proteinů, kdy blokují peptidyltransferázovou aktivitu v ribosomu. Tím dochází k blokaci prodlužování řetězce nově vznikajícího proteinu (Drainas a kol., 1987). Spektrum jejich účinku je poměrně široké, zahrnuje anaerobní bakterie, spirochety, rickettsie, mykoplasmata a některé druhy mykobakterií. Antimikrobiální účinek byl prokázán rovněž u některých kmenů, jež jsou rezistentní k penicilinům, např. *Streptococcus pneumoniae* či *St. aureus*. Závažným nežádoucím účinkem je hepatotoxicita (Chen a kol., 2014). Do skupiny amfenikolových ATB patří chloramfenikol, thiamfenikol a florfenikol.



**Obrázek č. 8: Chemická struktura chloramfenikolu (7)**

## 2.2.8 MAKROLIDOVÁ ANTIBIOTIKA

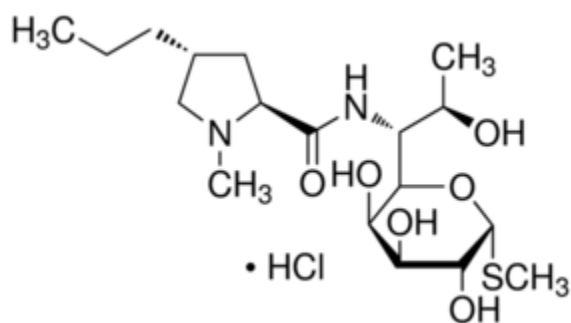
Makrolidová ATB jsou početnou skupinou látek obsahující ve své struktuře 14-ti, 15-ti nebo 16ti-členný laktonový kruh. Specificky se váží na 50S podjednotku ribozomu, čímž způsobují inhibici syntézy proteinů v bakteriální buňce. Patří mezi ATB se středně širokým spektrem účinnosti. Působí především na G<sup>+</sup> bakterie (streptokoky, stafylokoky), mykoplasmata, mykobakterie a anaeroby. Rezistentní jsou vůči jejich působení zástupci z čeledi *Enterobacteriaceae* a pseudomonády (Mazzei a kol., 1993; Kanoh a Rubin, 2010). Do skupiny makrolidových ATB patří např. azithromycin, klarithromycin, erythromycin a roxithromycin (Havlik J., 2009).



**Obrázek č. 9: Chemická struktura erythromycinu (8)**

## 2.2.9 LINKOSAMIDY

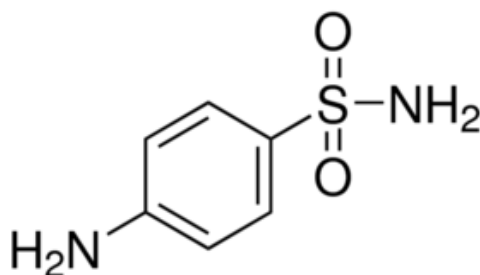
Linkosamidy jsou další významnou skupinou antimikrobiálních látek s bakteriostatickým účinkem (Leclercq, 2005). Blokují syntézu proteinů vazbou na 50S rRNA ribozomální podjednotky. Působí převážně na G<sup>+</sup> bakterie, a proti vybraným G-anaerobním bakteriím. Nejvýznamnějšími ATB z uvedené skupiny jsou linkomycin a klindamycin (Morar a kol., 2009).



**Obrázek č. 10: Chemická struktura linkomycinu (9)**

#### 2.2.10 SULFONAMIDY

Sulfonamidy jsou strukturními analogy kyseliny para-aminobenzoové (PABA), prekursoru pro syntézu kyseliny listové. Jejich hlavní funkcí je schopnost kompetice s PABA a tím inhibují syntézu kyseliny listové, která je potřebná především pro biosyntézu DNA, RNA a proteinů. Zástupci z této třídy ATB jsou trimethoprim, sulfamethoxazol, sulfathiazol nebo sulfadiazin. Spojením trimetoprimu a sulfomethoxazolu vzniká baktericidní kotrimoxazol. Tato kombinace se používá k léčbě infekcí vyvolaných *Escherichia (E.) coli* a *Klebsiella pneumoniae* (Tacič a kol., 2017; Capasso a Supuran, 2014). Jejich účinek je namířen hlavně proti  $G^+$  bakteriím, ale i na vybrané druhy  $G^-$  bakterií nebo na protozoa (Campbell, 2008).



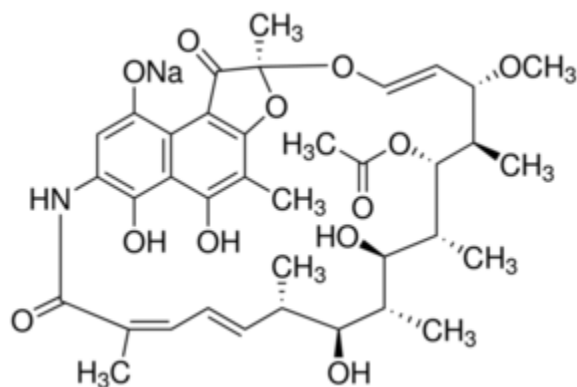
**Obrázek č. 11: Chemická struktura sulfonamidu (10)**

#### 2.2.11 ANSAMYCINOVÁ ANTIBIOTIKA

Ansamycinová ATB jsou lipofilní makrocyclické sloučeniny, které inhibují syntézu RNA vazbou na bakteriální RNA-polymerázu. Vyznačují se širokým spektrem účinku proti  $G^+$  a  $G^-$  bakteriím, i anaerobům. Významným ATB z této skupiny je rifampicin, který



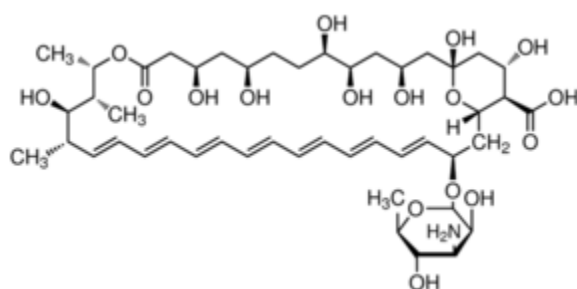
je užíván jako účinné antituberkulotikum. Rifamycin, další ze skupiny ansamycinů, je účinný i na streptokoky, stafylokoky, neisserie, hemofily, legionely a chlamydie (Evans, 2014).



**Obrázek č. 12: Chemická struktura rifamycinu (11)**

#### 2.2.12 ANTIMYKOTIKA

Jedná se o skupinu léčiv používaných k léčbě houbových infekcí. Na základě chemického složení se rozdělují na polyeny, azoly, alylaminy, echinokandiny a další (Rozsypal, 2008). Mechanismus jejich účinku se odvíjí od struktury jednotlivých antimykotik. Polyeny (amfotericin B) nebo azoly (flukonazol) poškozují integritu buněčné membrány kvasinek interakcí s ergosterolem. Echinokandiny a pneumokandiny inhibují syntézu glukanu buněčné stěny kvasinek.



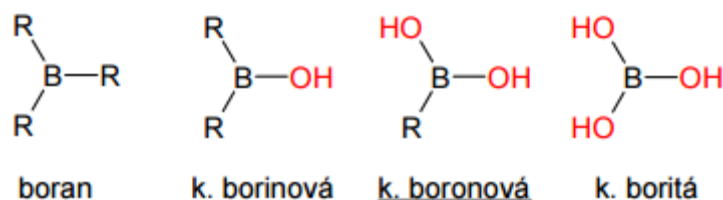
**Obrázek č. 13: Chemická struktura amfotericinu B (12)**

## 2.3 LÁTKY TESTOVANÉ PRO ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY

### 2.3.1 KYSELINA BORONOVÁ A JEJÍ DERIVÁTY

Kyselina boronová je derivátem kyseliny borité, který vznikl náhradou hydroxylové skupiny alkylovým nebo arylovým zbytkem. Obecně patří boronové kyseliny do skupiny organoboranů. Tyto sloučeniny vykazují silnou afinitu k Lewisovým bazím, např. dikarboxylovým kyselinám, či k aniontům  $F^-$ ,  $CN^-$ . Jejich významnou vlastností je schopnost vytvářet reverzibilní kovalentní komplexy s cukry, aminokyselinami, hydroxamovými kyselinami a dalšími látkami. Strukturní vzorec kyseliny boronové je uveden na obrázku č. 14 (Hall, 2005).

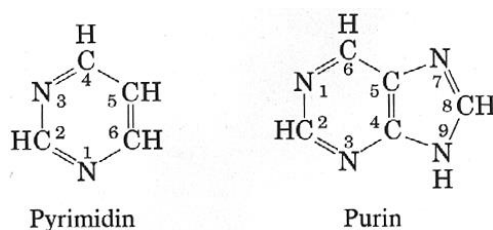
Unikátní vlastnosti boronové kyseliny a jejích derivátů řadí tyto sloučeniny mezi využitelné v biomedicínských aplikacích. Jedná se zejména o jejich stabilitu a reaktivitu, kdy se borony uplatňují jako inhibitory enzymů, v katalytických procesech, aj. Aktuálně je intenzivně studováno i jejich potenciální terapeutické využití jako antimikrobiální léčiva (Cambre a Sumerlin, 2011, Baker a kol., 2006). Eidam a kol. (2010) se zabývali syntézou a studiem antimikrobiálních účinků sulfonamidů kyseliny boronové. Zjistili, že samotné sloučeniny neměly vliv na růst *Klebsiella pneumoniae*. Nicméně v kombinaci s beta-laktamovými ATB byly schopné potencovat jejich účinek. Autoři později prokázali schopnost těchto sloučenin inhibovat třídu A a C beta-laktamáz. Tuto schopnost derivátů kyseliny boronové potvrdili i Rojas a kol. (2016), kteří označují tyto sloučeniny za reversibilní kompetitivní beta-laktamázové inhibitory. Gozhina a kol. (2014) prokázali antimikrobiální aktivitu alfa-aminoboronových kyselin s navázanými di nebo tripeptidy na kmeny *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas (Ps.) aeruginosa*, *St. aureus* a *Candida (C.) albicans*. Přesto se autorům nepodařilo objasnit mechanismus antimikrobiálního působení.



**Obrázek č. 14 : Strukturní vzorce boranu, kyseliny borinové, boronové a borité (Konhefr, 2015)**

### 2.3.2 PURINOVÉ A PYRIMIDINOVÉ BÁZE A JEJICH ANALOGY

Puriny a pyrimidiny (obrázek č. 15) jsou organické heterocyklické sloučeniny, obsahující ve své struktuře atomy dusíku. Obě sloučeniny a jejich deriváty jsou základními stavebními kameny nukleových kyselin, vitamínu B<sub>1</sub> (thiamin) a NADP. Právě přítomnost purinových a pyrimidinových sloučenin v biologicky aktivních látkách představuje velký potenciál pro jejich terapeutické uplatnění, pro něž jsou v současné době intenzivně studovány.



**Obrázek č. 15: Chemická struktura pyrimidinu a purinu (13)**

Sacharidová jednotka s navázanou dusíkatou bází se označuje jako nukleosid. Nukleosidy a jejich deriváty jsou jednou ze skupin, které jsou neustále studovány pro možné využití z hlediska medicíny, pro jejich antivirové či antitumorové vlastnosti. Určité deriváty vykazují dobrou antibakteriální aktivitu i vůči specifickým bakteriálním kmenům. Winn a kol. (2010) uvádějí, že komplex nukleosidů vykazuje antibakteriální aktivitu mechanismem specifické inhibice biosyntézy peptidoglykanu buněčné stěny, zásahem do funkce některých bakteriálních enzymů, jakými jsou purinové nukleosidové fosforylázy či DNA ligáza (Bzowska a kol., 2000).

Kim a kol. (2009) popsali mechanismus antibakteriálního účinku purinových analogů guaninu u G<sup>+</sup> bakterií. Tyto deriváty ovlivňují činnost tzv. riboswitch elementů (nebo-li ribosomálních přepínačů), které regulují genovou expresi a tím ovlivňují základní metabolické dráhy mikroorganismů. Yan a kol. (2018) prokázali inhibiční účinky purinových analogů na *Clostridium difficile*. Aluru a kol. (2015) zjišťovali hodnoty inhibičních koncentrací pro analogy pyrimidinů vlastní syntézy na vybrané kmeny bakterií a plísní. Antibakteriální a antifungální aktivitu srovnávali vůči ciprofloxacinu a flukonazolu. Autoři zaznamenali silný inhibiční účinek na kmeny *St. aureus*, *Vibrio cholerae* a *Aspergillus niger*.

### 3. REZISTENCE MIKROORGANISMŮ NA ANTIBIOTIKA

Vznik rezistence je následkem přirozeného evolučního vývoje a je tedy nevyhnutelný. V průběhu života bakterií docházelo k různým vnějším i vnitřním změnám, pro jejichž přežití tak bylo nutné vytvářet nové obranné mechanismy, které vedly k získání odolnosti k některým ATB (Wright, 2005). Tyto mechanismy mohly získat přirozeně (primárně), nebo je získaly během své evoluce (sekundárně). Určitý význam a vliv na rozvoj rezistence je dán i lokálními a geografickými podmínkami (Wright, 2005). Příkladem je významný nárůst multirezistentních kmenů *St. aureus*, kdy se uvádí, že až 40 % klinických kmenů bakterie *St. aureus* je rezistentních vůči penicilinu. Aktuálně je nepochybně velkým problémem výskyt multirezistentních kmenů *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae* nebo *Ps. aeruginosa*, s nimiž se setkáme po celém světě (Ventola, 2015; Kolář, 2007).

#### 3.1 PRIMÁRNÍ REZISTENCE

Primární neboli přirozená rezistence je dána absencí cílových struktur pro působení antibakteriálních látek v mikrobiálních buňkách. Výskyt tohoto typu rezistence je poměrně ojedinělý a závisí na druhu bakterie a jejích vlastnostech. Příkladem jsou např. zástupci třídy *Mollicutes*, kteří jsou přirozeně rezistentní k beta-laktamovým ATB. Tyto bakterie nemají buněčnou stěnu, ale pouze třívrstevnou membránu, která neobsahuje peptidoglykan, jehož syntézu tato ATB inhibují. Přirozeně rezistentně se jeví také některé G<sup>-</sup> bakterie vůči působení penicilinu, ve srovnání s G<sup>+</sup> bakteriemi. Hlavní důvodem je rozdíl ve složení buněčné stěny bakteriálních buněk. Dalším příkladem přirozené rezistence může být tvorba biofilmu, např. u kmenů *Ps. aeruginosa*, *Acinetobacter (A.) baumannii*, *Listeria (L.) monocytogenes* či *St. aureus* (Munita a Arias, 2016; Kolář, 2007).

#### 3.2 ZÍSKANÁ REZISTENCE

Získaná neboli sekundární rezistence vzniká v průběhu evoluce mikroorganismů. Kmeny původně citlivé vůči ATB se postupně stávají rezistentní. Může to být výsledkem spontánních mutací, kdy obvykle dochází ke změně cílových struktur pro ATB, hovoříme pak o chromozomální rezistenci. V případě extrachromozomální rezistence dochází

k přenosu genů kódujících rezistenci, a to plasmidy, transpozony nebo pohybem genových kazet.

Chromozomální rezistence představuje výsledek jedné nebo více spontánních mutací v bakteriálním chromozomu, čímž většinou dochází ke změně cílových struktur pro ATB. K přenosu genetické informace na potomstvo dochází v průběhu replikace buňky. Extrachromozomální rezistence je dána přítomností extrachromozomálně uložených částic obsahujících DNA. Může být uskutečněna například R-plasmidy, což jsou malé cirkulární molekuly DNA schopné samostatné replikace. Tyto geny bakterii zvýhodní v určitých situacích, např. o geny kódující rezistenci na ATB, desinfekční prostředky, těžké kovy, ale také geny kódující různé faktory virulence.

Intracelulární přenos genetické informace zajišťují transpozony – krátké úseky DNA schopné vmezeřit se do různých úseků v rámci bakteriálního genomu. Interbakteriální výměna genetické informace, plasmidů i transpozonů mohou být uskutečňovány konjugací (jednosměrný přenos genetické informace mezi bakteriemi), transformací (holá DNA přenášená z jedné buňky určitého druhu do další - mění se tím genotyp, posléze i fenotyp), transdukcí (prostřednictvím fágů) či transpozicí (vsunutí krátkých úseků DNA transpozonů do plazmidu, chromozomu či profága uvnitř bakteriální buňky) (Frieri a kol., 2017; Davies a Davies, 2010).

### **3.3 MECHANISMY REZISTENCE**

Jednotlivé mikroorganismy disponují různými mechanismy, jimiž mohou navodit odolnost vůči ATB. Je známo pět základních typů těchto mechanismů. U některých mikrobů se mohou jednotlivé mechanismy vzájemně kombinovat (Munita a Arias, 2016).

#### **3.3.1 ZMĚNA CÍLOVÉ STRUKTURY**

Dochází ke změně místa působení daného ATB. Příkladem mohou být vazebné bílkoviny pro penicilin. Změna v jejich struktuře vede ke změnám vazebné afinity k těmto ATB (Lambert, 2005).

### 3.3.2 ZMĚNA PRŮCHODNOSTI BUNĚČNÝCH OBALŮ

Rozdílný průnik látek je dán odlišnostmi ve složení buněčné stěny  $G^+$  a  $G^-$  bakterií. Buněčná stěna  $G^+$  bakterií je poměrně silná, ale pro většinu ATB průchodná.  $G^-$  bakterie mají buněčnou stěnu tenčí, za to však složitější.  $G^-$  bakterie jsou obecně k působení ATB odolnější. Většina ATB jsou hydrofilního charakteru. Do buněk  $G^-$  bakterií pak procházejí prostřednictvím transportních kanálků, přítomných v bakteriální membráně, tzv. poriny. Pak tedy záleží na množství těchto porinů, jež přímo ovlivňují rezistenci na hydrofilní ATB u  $G^-$  bakterií (Kumar a Schweizer, 2005).

### 3.3.3 AKTIVNÍ VYPUZOVÁNÍ ATB

Aktivní transport ATB z buňky je zprostředkován tzv. efluxním mechanismem, který je zajištěn řadou bílkovin vnitřní buněčné membrány. Příkladem jsou Tet proteiny, které exportují tetracykliny ven z buňky (Krulwich a kol., 2001).

### 3.3.4 ZMĚNA METABOLISMU

Produkce náhradního enzymu je řízena R-plasmidy, které katalyzují příslušnou biochemickou reakci. Rezistentní bakteriální buňka pak obsahuje dva enzymy pro stejnou biochemickou reakci. Původní enzym kódovaný chromosomálně a druhý enzym kódovaný R-plasmidem, který je léčivem nezasazitelný. Na tomto principu vzniká například rezistence na sulfonamidy či trimethoprim. Tato ATB působí jako falešné substráty při syntéze kyseliny listové. Rezistentní mikroorganismy pak dokáží využít jiné metabolické dráhy, aby zablokovaný krok při tvorbě kyseliny listové obešly (Kumar a Schweizer, 2005).

### 3.3.5 PRODUKCE BAKTERIÁLNÍCH ENZYMŮ

Při produkci bakteriálních enzymů dochází k degradaci pro mikroorganismy toxických látek, jakými jsou ATB. Mezi nejznámější patří enzymy tzv. beta-laktamázy, které se vážou na ATB vazebnými místy obsahujícími aminokyselinu serin a tím otevrou beta-laktamový kruh. ATB ztrácí antimikrobiální aktivitu a stává se neúčinným.

V dnešní době je věnována velká pozornost širokospektrým beta-laktamázám tzv. ESBL, produkovaných zejména některými G<sup>-</sup> bakteriemi. Tyto enzymy jsou schopny hydrolyzovat cefalosporiny s rozšířeným spektrem účinku, jako jsou cefotaxim, ceftazidim, nebo také monobaktamy (Thomson, 2010; Kumar a Schweizer, 2005). K dalším významným enzymům ovlivňující strukturu léčiv patří cefalosporinázy, karbapenemázy.

## 4. TESTOVANÉ MIKROORGANISMY

### 4.1 ACINETOBACTER BAUMANNII

*A. baumannii* je G<sup>-</sup> tyčinka. Netvoří oxidázu, je metabolicky málo aktivní. Z klinického i epidemiologického hlediska patří mezi nejvýznamnější druhy rodu *Acinetobacter*. Jedná se o nenáročnou bakterii, která nevyžaduje speciální požadavky ke kultivaci, je schopna růst a množit se při různých teplotách i vyšších hodnotách pH (Garcia-Garmendia a kol., 1999).

Některé kmeny *A. baumannii* mohou v nemocničním prostředí dlouhodobě přežívat a vyvolávat závažné infekce. Uvedený druh patří mezi významné původce nosokomiálních nákaz, především u imunokompromitovaných pacientů, u nichž až z 80 % osidluje respirační trakt, následně močový a gastrointestinální. Nemocniční kmeny jsou často rezistentní k většině používaných ATB a představují závažný léčebný a epidemiologický problém ve zdravotnických zařízeních (Almasaudi, 2018; Bergogne-Bérézin a Towner, 1996).

Lékem volby infekcí způsobených *A. baumannii* byl donedávna imipenem (karbapenem), k němuž se však stává pomalu rezistentní. Stále častější výskyt multirezistentních kmenů *A. baumannii* je celosvětovým problémem, zejména v posledních letech. Tomuto trendu se nevyhnula ani Česká republika. Již před téměř 25 lety byla pozorována narůstající rezistence této bakterie k běžně používaným ATB, jako např. aminopenicilinům, ureidopenicilinům, první a druhé generaci cefalosporinů, většině aminoglykosidů, chloramfenikolu a tetracyklinům. Jedním z mechanismů rezistence je aktivní eflux, hlavní příčinou je však produkce beta-laktamázy s karbapenemázovou aktivitou (Coyne a kol., 2011; Fishbain a Peleg, 2010; Nemeč a kol., 2004).

## 4.2 *BACILLUS SUBTILIS*

*Bacillus (Bac.) subtilis* je G<sup>+</sup> tyčinka, která je sporulující, neopouzdrěná, pohyblivá. Je aerobní, příp. fakultativně anaerobní bakterií, vytvářející v preparátu charakteristické dlouhé tyčinky. *Bac. subtilis* je ubikvitárně vyskytující se bakterie, běžně přítomná ve vodách, nebo a v rozkládajících se zbytcích rostlin. Uplatnění tato bakterie našla v kosmetickém průmyslu, kde je součástí plet'ových krémů, stejně tak jako se nachází v hnojivech či krmivech pro zvířata. Některé sérovary *Bac. subtilis* jsou průmyslově využívány jako probiotika (Harwood, 2008).

*Bac. subtilis* má schopnost tvořit tzv. endospory, které jí umožňují přežívat v nepříznivých až extrémních podmínkách. Vyznačuje se rovněž širokou produkcí proteolytických a jiných enzymů, které mají schopnost degradovat různé přírodní substráty. Hlavním extracelulárním enzymem je subtilisin, a i přesto, že jeho toxicita je nízká, může u některých jedinců vyvolat alergickou reakci. Subtilisin spolu s některými jeho dalšími enzymy jsou hojně využívány jako přídatné látky např. v pracích prostředcích. U člověka jsou pak známy případy alergické či hypersenzitivní reakce, dermatitidy a respirační potíže. Riziko tato bakterie představuje také především pro skot. U krav má schopnost vyvolat zánět vemene (Sellami-Kamoun a kol., 2008).

Byly nalezeny geny kódující rezistenci *Bac. subtilis* k erythromycinu, kanamycinu, tetracyklinu a spectinomycinu. K působení gentamicinu a ciprofloxacinu je *Bac. subtilis* citlivý, zatímco k cefotaximu a ampicilinu naopak vykazuje rezistenci (Hong a kol., 2008; Williams, 2007).

## 4.3 *BORDETELLA PERTUSSIS*

*Bordetella (B.) pertussis* je krátká, G<sup>-</sup>, nepohyblivá, nesporulující tyčinka. Některé kmeny mohou tvořit pouzdro. Je striktně aerobní, náročná na kultivační podmínky. Jedná se o původce černého kašle – pertuse, který byl do doby zavedení očkování jedním z nejobávanějších infekčních onemocnění zejména kojenců a dětí. V současné době je však incidence pertuse opět na vzestupu (Bouchez a kol., 2016; Zepp a kol., 2011)

Bakterie se přenáší aerogenní cestou. Osídluje řasinky epitelu dýchacích cest. K přilnutí na povrch řasinek napomáhají vláknitý hemagglutinin a fimbrie, které stimulují tvorbu protilátek. V patogenezi onemocnění se významně uplatňuje rovněž antigenní



pertusový toxin, dále dermonekrotický toxin a endotoxin buněčné stěny (Cherry a kol., 2014).

Podáváním ATB dochází k zastavení růstu a množení bakteriálních buněk i následné redukci produkce toxinu. K léčbě jsou používána makrolidová ATB, tetracykliny, ampicilin, erythromycin, kotrimoxazol příp. chloramphenicol. Guillot a kol. (2012) zaznamenali výskyt *B. pertussis*, která byla rezistentní vůči makrolidovým ATB. Shahcheraghi a kol. (2014) zaznamenali výskyt *B. pertussis* rezistentní k erythromycinu.

Plošná vakcinace proti pertusi byla v ČR zahájena v roce 1958. K očkování byla užívána celobuněčná vakcína, připravená z purifikované suspenze usmrcených bakterií částečně detoxikovaných chemicky. Nevýhodou této očkovací látky jsou četné vedlejší reakce (horečky, křeče, vzácně neurologické komplikace). Proto byla očkovací látka postupně nahrazována nebuněčnou vakcínou, obsahující subjednotkové antigeny bordetel – pertusový anatoxin, pertaktin, vláknitý hemaglutinin a fimbriální antigeny *B. pertussis*. U těchto vakcín se vyskytuje podstatně méně vedlejších reakcí. Imunita navozená vakcínami však s postupem let klesá a lidé imunizovaní v dětském věku mohou přesto v dospělosti onemocnět. (Sheridan a kol., 2014; Bettiol a kol., 2010).

#### **4.4 CANDIDA ALBICANS.**

Rod *Candida* zahrnuje klinicky významnou skupinu mikroorganismů, vyvolávajících nejčastěji povrchové a endogenní mykózy u lidí po celém světě. V současné době jsou onemocnění vyvolaná kandidami považována za oportunní infekce s vysokou morbiditou a mortalitou zejména u pacientů s oslabenou imunitou (Meiller a kol., 2009). Nejčastějším původcem těchto infekcí je *C. albicans*. Nicméně v posledních letech narůstá počet případů onemocnění vyvolaných i ostatními druhy kandid jako například *C. krusei* nebo *C. glabrata*. Zástupci rodu *Candida* se do roku 1995 vyskytovali jako čtvrtý nejčastější původce nosokomiálních infekcí krevního řečiště, s mortalitou přibližně 39% (Khan a kol., 2017)

V antimikrobiální terapii infekcí vyvolaných kandidami jsou využívány zejména azoly (fukonazol), inhibující syntézu ergosterolu inhibicí potřebných enzymů. Jinou skupinou látek jsou polyeny (amfotericin B) s fungicidním účinkem, jež reagují s ergosterolem v membráně kvasinky a vytváří v ní póry, jimiž následně uniká

intracelulární obsah. Další možností je užití flucytosinu. Tento nukleosidový analog je po vniknutí do buňky kvasinek začleněn do RNA molekul a ovlivňuje syntézu proteinů uvnitř kvasinky (Silva a kol., 2011, Silva a kol., 2012). Vzdávající rezistence kandid na antifungální látky je aktuálně největším problémem vyžadujícím do budoucna změnu terapeutických a profylaktických strategií. V posledních letech narůstá počet hlášení o výskytu kandid odolných k působení flukonazolů. Tato rezistence může mít několik příčin. U některých kvasinek byl popsán efluxní mechanismus, vypuzující antimikrobiální látku mimo buňku kvasinky (Prasad a kol., 2016). Druhým je snížená citlivost cílového enzymu cytochromu-P450-sterol-14-demethylázy (Marichal a kol., 1999).

#### **4.5 *ESCHERICHIA COLI A EHEC O104:H4***

*E. coli* je  $G^-$  tyčinkovitá, fakultativně anaerobní bakterie, vyskytující se jako oportunní patogen. Je jedním z neznámějších mikroorganismů, který je běžnou součástí střevní mikroflóry u zdravých lidí a zvířat. Pro svoji produkci různých látek a vitamínů (např. vitamín K) je člověku prospěšná, přesto je významným původcem oportunních infekcí, především gastrointestinálního traktu a močových cest (Blount, 2015).

Patogenní kmeny *E. coli* jsou obvykle rozdělovány do šesti skupin, a to na enteropatogenní, enterotoxigenní, enteroinvazivní, difúzně adherentní, enteroagregativní a shigatoxigenní. Shigatoxigenní *E. coli* (STEC) nebo také verotoxigenní, které se vyznačují produkcí Shiga toxinu 1 a/nebo 2, který je velice podobný Shiga toxinu kmenů *Shigella dysenteriae*. Část těchto kmenů může u člověka vyvolat hemoragickou kolitidu (krvácivý průjem) a hemolyticko-uremický syndrom, který posléze způsobuje systémové selhání. Tato život ohrožující onemocnění vyvolávají kmeny EHEC, které jsou podskupinou STEC. Kromě schopnosti produkce Shiga - toxinu jsou uvedené kmeny vybaveny dalšími faktory virulence, jimiž poškozují svého hostitele, jakými jsou adhezenční faktor intimin, EHEC-hemolyzin a v neposlední řadě endotoxin. V současné době se o EHEC píše nejvíce v souvislosti s výskytem sérotypu O104:H4, který způsobil v květnu roku 2011 rozsáhlou epidemii přesahující hranice Německa (Buchholz a kol., 2011). Tento sérotyp je vzácný, nikoliv však nový. Od běžných EHEC kmenů se liší nepřítomností genů kódujících adhezenční faktory intimin a EHEC-hemolyzin, tedy hlavní faktory virulence (Karch a kol., 2005; Bialešwska a kol., 2013).

*E. coli* je primárně citlivá na většinu ATB, ovšem především nemocniční kmeny se vyznačují získanou rezistencí vůči běžně antimikrobiálním léčivům. Na základě mnoha studií bylo zjištěno, že streptomycin, tetracyklin, ampicilin a sulfonamidy jsou ATB, k nimž je vysoké procento patogenních i nepatogenních kmenů *E. coli* izolovaných v souvislosti s infekcemi u člověka rezistentní (Chirila a kol., 2017; Blaettler a kol., 2009).

#### 4.6 *FRANCISELLA TULARENSIS LVS*

*Francisella (F.) tularensis* je G<sup>-</sup> kokovitá tyčinka, která je nepohyblivá, opouzdřená, pleomorfní. Jedná se o striktně aerobní, nesporulující bakterii. *F. tularensis* je neobyčejně náročná na kultivační podmínky, kdy je zapotřebí zvláštních kultivačních půd obohacených o cystein, glutamin a histidin. Je původcem tzv. tularémie, neboli zaječí nemoci. Tularémie patří mezi významné zoonózy, jsou známy dva poddruhy, vysoce virulentní *F. tularensis subsp. tularensis* a méně virulentní *F. tularensis subsp. holarctica*. Tularémie je nákaza vyskytující se s přírodní ohniskovostí, postihující zejména hlodavce, volně žijící i domácí zvířata. Onemocnění je přenosné i na člověka, u kterého se manifestuje různými klinickými příznaky. Zdrojem nákazy mohou být infikovaní hlodavci, přenašeči pak krev sající členovci (komáři, klíšřata, mouchy, blechy). Člověk se nakazí nejčastěji přímým kontaktem s nemocným nebo uhynulým zvířetem, požitím vody kontaminované výkaly infikovaných zvířat. *F. tularensis* je řazena mezi nejvirulentnější bakterie s velmi nízkou infekční dávkou, pouhých 10-50 bakterií postačí k vyvolání infekce u člověka či zvířete. Proto je také *F. tularensis* zařazena mezi bakterie, které je možné zneužít jako potencionální biologickou zbraň (Johnson, 2018).

*F. tularensis* patří mezi fakultativně intracelulární patogeny, aktivně proniká do makrofágů, kde inhibuje fúzi fagozomu s lysozymem. Ve fagozomech pak přežívá a množí se. Je schopna invadovat i do nefagocytujících buněk, jako jsou hepatocyty, a množit se v nich. Bakterie neprodukuje žádné exotoxiny, její virulence je však vázaná na bakteriální pouzdro. Významným faktorem virulence je také endotoxin či tzv. ostrov patogenity označovaný jako FPI (Cuthbert a kol., 2017)

*F. tularensis* jako intracelulární parazit velmi ztěžuje antibiotickou léčbu. Ne všechna ATB jsou schopná pronikat do buněk. Dokáže však přežít i mimo buňky hostitele za velmi nepříznivých podmínek. Jelikož francisely produkují tzv. beta-lakamázy, je léčba

beta-laktamovými ATB nevhodná. Jako lék volby je používán streptomycin či gentamycin, samostatně nebo v kombinaci. Účinné jsou také fluorochinolony a tetracykliny.

V prevenci tularémie je k dispozici živá očkovací vakcína, tvořená atenuovaným kmenem *F. tularensis* LVS (like vaccine strain). Tato očkovací látka však nenavozuje dostatečnou ochranu. Pro nedostatek informací však není možné tento kmen používat celoplošně, pouze u vybraných skupin lidí (laboratorní pracovníci, vojáci apod.). Jsou známy další typy vakcín, a to celobuněčná - usmrcená a subjednotková vakcína, u nichž stále probíhá výzkum (Titball a kol., 2003; McLendon a kol., 2007).

#### **4.7 LISTERIA MONOCYTOGENES**

*L. monocytogenes* je G<sup>+</sup> fakultativně intracelulární tyčinka s charakteristickým pohybem, která je neopouzdřená a nesporeující. Jedná se o nenáročnou bakterii, která dobře roste na běžných kultivačních půdách v širokém teplotním rozmezí (4-39 °C). Listerie jsou rovněž velmi odolné k podmínkám vnějšího prostředí, snášejí i vyšší koncentrace solí. Této nenáročnosti listerie využívají k dlouhodobému přežití i mimo hostitelský organismus (Buchanan a kol., 2017)

*L. monocytogenes* vyvolává infekční onemocnění zvané listerióza, jež může probíhat pod rozmanitým klinickým obrazem. Vyznačuje se poměrně vysokou afinitou k centrální nervové soustavě a generalizované formy listeriózy se pak projevují jako meningoencephalitis a septikémie. Infekce novorozenců jsou příčinou vysoké smrtelnosti. Velmi nebezpečná je listerie pro těhotné ženy, u nichž může vyvolat spontánní potrat, případně poškodit plod. Z toho důvodu by se gravidní ženy měly vyvarovat konzumace mléčných výrobků, jakými jsou sýry, nepasterované mléko apod. K hlavním faktorům virulence patří listeriolysin O, sfingomyelináza C, faktor Ei a MPA faktor. Pouze *L. monocytogenes* je patogenní pro člověka (Pal a kol., 2017)

*In vitro* je *L. monocytogenes* citlivá k účinku penicilinu G, ampicilinu, erytromycinu a chloramfenikolu. Obecně je doporučovaná kombinovaná terapie ampicilinem a gentamicinem, u pacientů alergických na penicilin potom léčba sulfametoxazolem-trimetoprimem. Naopak, byla prokázána rezistence k tetracyklinu a erythromycinu, stejně tak k některým desinfekčním přípravkům (Aureli a kol., 2003; Conter a kol., 2009). Vela a kol. (2001) prokázali rezistenci *L. monocytogenes* k tetracyklinům. Roberts a kol. (1995) získali kmen z potravin, který byl rezistentní

k erytromycinu. Granier a kol. (2011) prováděli testování citlivosti na získaný kmen z potravin ve Francii, který byl rezistentní vůči co-trimoxazolu.

#### **4.8 PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

*Ps. aeruginosa* je G<sup>-</sup> tyčinkovitá bakterie s jedním polárně umístěným bičíkem. Nevytváří pouzdro, ovšem může produkovat velké množství exolátky podobné pouzdru, tzv. alginátu. Má významnou schopnost tvořit pigmenty, např. pyocyanin, pyorubin, pyomelanin a pyoverdin, které mají cytotoxické účinky. Vzhledem k vysoké odolnosti vůči podmínkám vnějšího prostředí, řadě ATB i desinfekčním prostředkům, je považována za nebezpečného nosokomiálního patogena. Uvádí se, že 10-15 % všech nosokomiálních infekcí je vyvoláno právě *Ps. aeruginosa* (Blanc a kol., 1998). *Ps. aeruginosa* je původcem řady závažných infekcí, především u kriticky nemocných v intenzivní péči a různě alterovaných pacientů. Velmi ohroženou skupinou jsou pacienti s cystickou fibrózou, respiračním onemocněním, popáleninami či zavedeným močovým katetrem. Tato bakterie je původcem obtížně léčitelných zánětů plic, sepsí, infekcí ran, močových infekcí apod. Pseudomonády mohou také snadno kontaminovat oční čočky a touto cestou vyvolat nebezpečnou keratitidu (Alnour a kol., 2017).

K významným faktorům virulence se řadí adhezivní faktory, lipopolysacharid buněčné stěny - endotoxin, neuraminidáza, enterotoxiny a další. Extracelulární polysacharid alginát, který tvoří tzv. mukoidní kmeny, obsahuje mikrokolonie (shluky) bakteriálních buněk, které chrání před imunitním systémem i účinky ATB. Je často přítomen právě u kmenů infikujících pacienty s cystickou fibrózou.

*Ps. aeruginosa* reprezentuje fenomén antibiotické rezistence a disponuje prakticky všemi známými enzymatickými nebo mutačními mechanismy bakteriální rezistence (Kohler a kol, 1999; Dantas a kol., 2014). Často mohou tyto mechanismy existovat simultánně, tím je dána odolnost převážné většiny kmenů (McGowan, 2006) K „protipseudomonádovým“ beta-laktamovým ATB patří ticarcilin, ticarcilin/sulbactam, piperacilin, mezlocilin. K léčbě jsou doporučovány ceftazidim, imipenem a ciprofloxacin. Významným popsáním mechanismem rezistence u pseudomonád je efflux, aktivní vypuzování ATB i desinfekčních roztoků z buňky (Bogaerts a kol., 2007; El’Garch a kol., 2007).

#### 4.9 *SALMONELLA ENTERITIDIS*

*Salmonella (Sal.) Enteritidis* je G<sup>-</sup> tyčinka z rodu *Salmonella*, čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o pohyblivou, fakultativně anaerobní bakterii, nenáročnou na životní podmínky. Salmonely se mohou množit i mimo makroorganismus, především v potravinách živočišného původu. Jsou obvyklým komenzálem a příležitostným parazitem ve střevním traktu různých obratlovců. Salmonely nejčastěji vyvolávají enterokolitidy charakteru otravy z potravin, zvané salmonelózy. *Sal. Enteritidis* se stala dominujícím etiologickým agens, tvořící bezmála 96 % všech bakteriologicky prokázaných salmonelóz. *Sal. Enteritidis* patří do skupiny netyfových kmenů salmonel a v současné době je tato skupina salmonel druhou nejčastější příčinou bakteriálních gastroenteritid v zemích Evropské unie. Vehikulem jsou téměř ve všech případech nedostatečně tepelně upravené potraviny živočišného původu, kontaminované salmonelami při výrobě, zpracování, skladování či distribuci (EFSA, 2015; ECDC, 2015; Zweifel a Stephan, 2012)

K prokázaným faktorům virulence patří postranní řetězec O-antigenu, který blokuje fagocytózu a brání aktivaci komplementu alternativní cestou. Průnik bakterie do eukaryotických buněk pak umožňují povrchové proteiny. Dalším významným faktorem virulence je lipopolysacharid buněčné stěny neboli endotoxin, a schopnost tvorby enterotoxinu.

Dřívější primární citlivost na chloramfenikol v dnešní době vzhledem k narůstající rezistenci ustupuje. U kmenů salmonel, izolovaných od potravinových zvířat, byly prokázány geny rezistence ke všem ATB používaným v humánní medicíně včetně plazmidy šířené rezistence k fluorochinolonům, cefalosporinům vyšších generací a karbapenemům. Z těchto důvodů je nutné sledovat stav a trendy antibiotické rezistence k ATB doporučeným k léčbě salmonelových infekcí, zejména k cefalosporinům vyšších generací a fluorochinolonům (Galanis a kol., 2006).

#### 4.10 *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

*St. aureus* je G<sup>+</sup> bakterie kokovitého tvaru. Jedná se o nepohyblivý, nesporulující mikroorganismus. Patří mezi tzv. pyogenní koky, které způsobují především hnisavé, mnohdy život ohrožující, infekce u lidí a zvířat. Může se přechodně vyskytovat na kůži, sliznicích respiračního, zažívacího i urogenitálního traktu. Je poměrně odolný

k podmínkám zevního prostředí, snáší zahřátí na 55 °C a vyšší koncentraci (až 10 %) chloridu sodného, což mu umožňuje přežít mimo organismus hostitele. Je považován za původce nosokomiálních infekcí. Schopnost *St. aureus* vyvolat infekční onemocnění spočívá v přítomnosti řady faktorů virulence jako například peptidoglykan, protein A nebo pouzdro. Může však produkovat celou řadu toxinů, z nich nejznámější jsou enterotoxiny (alimentární infekce), toxin syndromu toxického šoku, exfoliatin (syndrom opařené kůže). Dalšími významnými faktory jsou hemoliziny, hyaluronidáza, plasmakoaguláza a další (Tong a kol., 2015)

Většina kmenů *St. aureus* je odolná k penicilinu (až 90 %) a k ostatním beta-laktamovým ATB (až 60 %). Zavedením polosyntetických penicilinů – methicilinu a oxacilinu dočasně snížilo výskyt rezistentních kmenů. V současnosti se však stále častěji objevují kmeny rezistentní k uvedeným ATB, označované jako MRSA kmeny (methicilin rezistentní stafylokoky) (Juhász-Kaszanyitzky a kol., 2007; Burton a kol., 2008; Soavi a kol., 2010; Strommenger a kol., 2003; Chambers a kol., 2009)

## **5. METODY STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY**

Metody testování citlivosti na ATB lze rozdělit na kvalitativní a kvantitativní. Pokud není jinak uvedeno, testování citlivosti se provádí v Mueller-Hintonově bujónu (MHB) nebo na Mueller-Hintonově agaru (MHA), které splňují ideální podmínky pro růst většiny testovaných mikroorganismů.

### **5.1 KVALITATIVNÍ METODY**

Mezi nejčastěji používané kvalitativní metody testování citlivosti patří tzv. diskový difúzní test. Tato poměrně nenáročná metoda je založena na difúzi antimikrobiální látky z disku do agarové pudy. Dochází ke vzniku koncentračního gradientu látky inhibující růst mikroorganismů. Je nutné zhotovit bakteriální suspenzi o vhodné koncentraci bakteriálních buněk, kterou naočkujeme na agarovou plotnu. Následně se přiloží testovací disky s účinnou koncentrací látky a miska se nechá inkubovat, většinou po dobu 24 hodin při 37 °C. Během inkubace dochází ke vzniku tzv. zóny inhibice růstu, jejíž průměr se odečítá a srovnává s hodnotami zjištěnými pro citlivé kmeny.

## 5.2 KVANTITATIVNÍ METODY

Ke kvantitativním metodám průkazu citlivosti patří agarová diluční metoda a diluční metody v tekutém bujónovém médiu. Tyto metody nám umožní zjistit hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (MIC) a minimálních baktericidních koncentrací (MBC). V praxi je nejčastěji využívaná metoda diluční mikrometoda.

U agarové diluční metody se hodnota MIC se zjišťuje na agarovém médiu obsahujícím zvolenou koncentraci ATB. Nejčastěji se připravuje 12 až 15 koncentrací jednoho ATB a opět se inokuluje bakteriální suspenze o odpovídající hustotě bakteriálních buněk dle McFarlandovy zákalové stupnice. Po proběhlé inkubaci se vyhodnotí nejnižší koncentrace ATB, která inhibovala růst testovaného kmene. Agarová diluční metoda je považována za referenční metodu. Její výhodou je možnost vyšetřit velké množství bakterií za stejných podmínek a snadno odhalit kontaminaci suspenze. Je poměrně pracná a ekonomicky náročná a z tohoto hlediska se od jejího použití v běžné praxi upouští.

Z kvantitativních technik se nejčastěji používá mikrodiluční metoda, která se provádí v mikrotitrační destičce obsahující MHB. V každé jamce je daná koncentrace ATB a inokulum o odpovídající hustotě bakteriálních buněk dle McFarlanda se nanáší jehlovým inokulátorem, případně multikanálovou pipetou. Po inkubaci se vyhodnocuje hodnota MIC, což je nejnižší koncentrace ATB, která inhibuje růst mikroorganismu. Inhibice růstu se projeví tím, že v jamce nedojde ke vzniku zákalu nebo sedimentu (Urbášková, 1998).



## **6. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE**

1. Ověření inhibičních účinků analogů purinových a pyrimidinových bází, a derivátů kyseliny boronové na růst vybraných kmenů bakterií a kvasinek.
2. Stanovení minimálních inhibičních koncentrací u sloučenin s prokázanými inhibičními účinky na bakterie anebo kvasinky mikrodiluční metodou.
3. Stanovení minimálních inhibičních koncentrací vybraných ATB pro vybrané kmeny bakterií a kvasinek.
4. Vyhodnocení výsledků a možností jejich využití v praxi.

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 7. MATERIÁL A METODIKA

### 7.1 TESTOVANÉ KMENY BAKTERIÍ A KVASINEK

Antimikrobiální aktivita testovaných sloučenin byla testována na referenčních kmenech vybraných druhů bakterií a kvasinek z České sbírky mikroorganismů v Brně (CCM), případně z Americké sbírky mikroorganismů (ATCC). Současně byl do testování zařazen i kmen EHEC O104:H4, který byl izolován od pacienta (importovaná nákaza z Německa) v roce 2011 a byl poskytnut pracovníky Státního zdravotního ústavu v Praze.

**Tabulka č. 1: Přehled mikroorganismů použitých k testování antimikrobiální aktivity syntetizovaných sloučenin**

Mikroorganismus	Označení kmene	Původ kmene
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCM 7031, CNCTC 5558	Česká sbírka mikroorganismů, Brno
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051	Americká sbírka mikroorganismů
<i>Bordetella pertussis</i>	ATCC 9797	Americká sbírka mikroorganismů
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028	Americká sbírka mikroorganismů
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	Americká sbírka mikroorganismů
EHEC O104:H4	vzorek z klinického materiálu	Importovaný pacient z Německa
<i>Francisella tularensis</i> LVS	ATCC 29884	Americká sbírka mikroorganismů -
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111, CNCTC Li 14/57	Americká sbírka mikroorganismů
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Americká sbírka mikroorganismů
<i>Salmonella</i> Enteritidis	ATCC 49222	Americká sbírka mikroorganismů
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 10832	Americká sbírka mikroorganismů

## 7.2 CHEMIKÁLIE A REAGENCIE

### 7.2.1 TESTOVANÉ SLOUČENINY A ANTIBIOTIKA

Sloučeniny, u nichž byla ověřována jejich antimikrobiální aktivita, pocházely z Ústavu organické chemie a biochemie, Akademie věd ČR v Praze. Jednalo se o látky ze skupiny strukturních analogů purinových a pyrimidinových bází a derivátů kyseliny boronové. Na počátku studie byly tyto látky označeny krycím názvem. Chemické složení testovaných sloučenin bylo poskytnuto pracovníky ÚOChB po potvrzení jejich antimikrobiálních účinků.

Pro srovnání inhibičních účinků testovaných sloučenin byla testována antimikrobiální aktivita i u vybraných ATB a v klinické praxi zavedených sloučenin ze skupiny strukturních analogů, které rovněž pocházely z ÚOChB. Seznam použitých ATB je uveden v tabulce č. 2.

**Tabulka č. 2: Přehled kontrolních ATB, antimykotik a zavedených analogů**

<b>Mw</b>	<b>Název ATB</b>	<b>Označení látky</b>
290,32	<b>TRIMETHOPRIM</b>	1/H11
235,28	<b>SULFAMETHOXAZOL</b>	2/G9
331,34	<b>CIPROFLOXACIN</b>	3/E9
268,23	<b>FORMYCIN B</b>	3/F1
130,08	<b>5-FLUOROURACIL</b>	3/F10
246,19	<b>5-FLUORO-2'-DEOXYURIDIN</b>	3/G3
171,15	<b>METRONIDAZOL</b>	4/G3
123,11	<b>PYRAZINAMID</b>	5/F12
281,35	<b>CYKLOHEXIMID</b>	5/G1
545,65	<b>D-STREPTAMIN</b>	5/G2
182,02	<b>FOSFOMYCIN</b>	5/G4
822,94	<b>RIFAMYCIN</b>	6/B8
137,14	<b>ISONIAZID</b>	6/B9
924,08	<b>AMFOTERICIN B</b>	6/B10
232,24	<b>KYSELINA NALIDIXOVÁ</b>	9/E9

**Legenda :** Mw (z angl.. Molecular weight – molární hmotnost)

## 7.2.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA

Kmeny bakterií a kvasinek byly uchovávány a dále pomnožovány na krevním agaru, McLeodově půdě, Sabouradově agaru a Bordet-Gengou agaru. Uvedená média byla připravena do Petriho misek o průměru 90 mm přímo firmou LabMedia servis a dodávána každý týden (LabMedia servis, s.r.o., Jaroměř).

**Tabulka č. 3: Přehled kultivačních médií a jejich složení**

KULTIVAČNÍ PŮDA	SLOŽENÍ	POUŽITÍ PRO KMENY
<b>Columbia krevní agar</b>	obs. 5 % defibrinované beraní krve	<i>A. baumannii</i> , <i>Bac. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , EHEC O104:H4, <i>L. monocytogenes</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Sal. Enteritidis</i> , <i>St. aureus</i>
<b>Sabouradův agar</b>	pepton, glukóza, cykloheximid, chloramfenikol	<i>C. albicans</i>
<b>Bordet-Gengou agar</b>	chlorid sodný, glycerol, beraní defibrinovaná krev	<i>B. pertussis</i>
<b>McLeodův agar s tetracyklinem</b>	GC agarová báze, Bacto agar, hovězí hemoglobinu	<i>F. tularensis</i> LVS
<b>Mueller-Hintonův bujón</b> Speciálně pro toto medium je upravována hladina iontů vápenatých a hořečnatých	hovězí extrakt, kyselý kaseinový hydrolyzát, škrob	<i>A. baumannii</i> , <i>Bac. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , EHEC O104:H4, <i>L. monocytogenes</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Sal. Enteritidis</i> , <i>St. aureus</i>
<b>Obohacený Mueller- Hintonův bujón</b>	navíc glukóza a cystein	<i>F. tularensis</i> LVS
<b>Stainer-Scholte medium</b>	glutamát sodný, L-prolin, chlorid sodný, dihydrogen fosforečnan draselný, chlorid draselný, chlorid hořečnatý, Tris base, HCl, destilovaná voda, 1%chlorid vápenatý	<i>B. pertussis</i>

Pro zjišťování antimikrobiální aktivity testovaných sloučenin byl dle kultivačních nároků jednotlivých mikroorganismů používán Mueller-Hintonův bujón, Stainer-Scholte medium anebo obohacený Mueller-Hintonův bujón od stejné firmy. Složení jednotlivých živných pūd je uvedeno v tabulce č. 3 ([www.labmediaservis.cz](http://www.labmediaservis.cz)). Všechna použitá kultivační média byla skladována při chladničkové teplotě (4°C) maximálně po dobu 14 dní.

## **7.3 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POMŮCKY**

### **7.3.1 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE**

Během studie bylo využíváno následující laboratorní vybavení: vortex IKA MS 3 basic (IKA; Německo), termostat – Termofisher - parní sterilizátory Sterilab a PS20A (BMT; Česká republika), horkovzdušný sterilizátor Sterimat 5104.2 (BMT; Česká republika), PCR box (Bioscan; USA), laminární box MSC 12 a MSC 9 (JOUAN; Francie), chladnička (Whirlpool Combi, Česká republika), densilometr – Laboserv (Biosan, USA), předvážky Kern 440-63 (KERN & Sohn GmbH, Německo), analytické váhy KERN ABJ (KERN & Sohn GmbH, Německo), optický mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonsko).

### **7.3.2 LABORATORNÍ POMŮCKY**

Pro experimenty byly používány skleněné Erlenmayerovy baňky (DURAN; Německo), skleněné odměrné baňky a válce (Fisherbrand, Česká republika), mikropipety Eppendorf o objemu 0,5-10  $\mu$ l, 10-100  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l, 500-5000  $\mu$ l (Eppendorf; Německo), vícekanálová mikropipeta Biohit 20-200  $\mu$ l (Biohit, Finsko), mikrozkušavky o objemu 1,5 ml (Eppendorf; Německo), jednorázové očkovací kličky (Dispolab; Česká republika), sterilní plastové Petriho misky o průměru 90 mm (Gamedium; Česká republika), mikrotitrační destičky (Gamedium, Česká republika), stojany na zkumavky (Fisher Scientific; Česká republika), plynový kahan Bunsenův (Nedform s r.o.; Česká republika), silikonové zátky (Deutsch & Neumann GmbH; Německo), špičky do mikropipet (Eppendorf; Německo), skleněné zkumavky (Vitrum Česká republika), mikrotitrační destičky (Gamedium; Česká republika), plynový kahan Bunsenův (Nedform s r.o., Česká republika).

## **7.4 METODY STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY TESTOVANÝCH LÁTEK**

### **7.4.1 PŘÍPRAVA PRACOVNÍCH ROZTOKŮ TESTOVANÝCH SLOUČENIN**

Jednotlivé testované sloučeniny dodané z ÚOChB byly rozpuštěny v 1% DMSO (dimethylsulfoxidu). Tyto roztoky obsahující různé koncentrace účinné látky byly následně ředěny PBS puftrem v poměru 1:10, a takto získány tzv. pracovní roztoky, neboli 1. ředění účinné koncentrace, s nimiž bylo dále prováděno testování.

### **7.4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ TESTOVANÝCH ANTIBIOTIK**

Roztoky vybraných antimikrobiálních látek rozpuštěné v 1% roztoku DMSO byly dodány z ÚOChB. Obdobně jako u testovaných sloučenin byly i tyto roztoky následně ředěny PBS puftrem v poměru 1:10 a byla tak získána výchozí koncentrace pracovních roztoků pro stanovení inhibičních účinků.

### **7.4.3 PŘÍPRAVA MIKROBIÁLNÍ SUSPENZE**

Suspence testovaných mikroorganismů byla připravena z 24, příp. 72 hodinové kultury jednotlivých kmenů narostlých na živných půdách. Bakteriologickou kličkou byl odebrán potřebný počet kolonií a suspendován v tekutém Mueller Hintonově médiu, příp. dalším tekutém mediu vhodném pro konkrétní mikroorganismus (viz tabulka č. 3).

Zákal suspenzí byl měřen nefelometrem a jejich hustota upravována tak, aby odpovídala 0,5 stupni McFarlandovy zákalové stupnice, což je přibližně  $1,5 \times 10^8$  bakteriálních buněk v 1 ml. Připravené inokulum bylo použito v časovém horizontu cca 30 minut, aby se předešlo možnému poklesu počtu vitálních mikrobiálních buněk.

### **7.4.4 TESTOVÁNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY LÁTEK**

U testovaných sloučenin byla nejprve ověřována jejich schopnost inhibovat růst testovaných mikroorganismů ve výchozích koncentracích. Do každé jamky v mikrotitrační

destičce bylo pipetováno 180  $\mu$ l Mueller Hintonova bujónu. Poté bylo přidáno po 20  $\mu$ l výchozí koncentrace testované sloučeniny. Všechny látky byly testovány v tripletech, tzn. ve 3 jamkách destičky. Poslední tři jamky řádku G (G10-G12) sloužily jako kontrola růstu testovaného mikroorganismu bez přítomnosti inhibičních látek. Jamky řady H (sloupce 1-6) obsahovaly gentamicin nebo amphotericin B (pro kvasinky) a po inokulaci sloužily jako pozitivní kontrola. Součástí každého testování byla i kontrola sterility, v kultivačním médiu bez obsahu inhibičních látek a mikrobiální suspenze. Schéma rozdělení testovaných sloučenin v mikrotitrační destičce je znázorněno na obrázku č. 16.

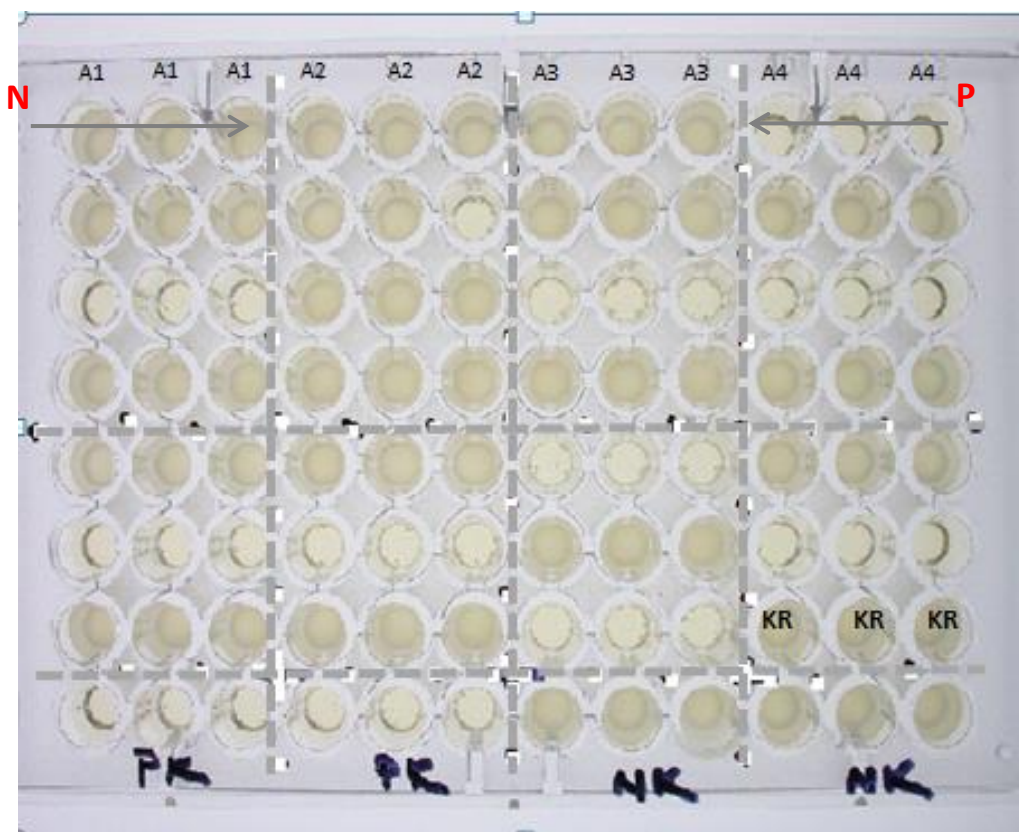
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1	A1	A1	A2	A2	A2	A3	A3	A3	A4	A4	A4
B	A5	A5	A5	A6	A6	A6	A7	A7	A7	A8	A8	A8
C	A9	A9	A9	A10	A10	A10	A11	A11	A11	A12	A12	A12
D	B1	B1	B1	B2	B2	B2	B3	B3	B3	B4	B4	B4
E	B5	B5	B5	B6	B6	B6	B7	B7	B7	B8	B8	B8
F	B9	B9	B9	B10	B10	B10	B11	B11	B11	B12	B12	B12
G	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C3	C3	C3	KR	KR	KR
H	PK	PK	PK	PK	PK	PK	NK	NK	NK	NK	NK	NK

**Legenda:** **PK** - pozitivní kontrola ATB (gentamicin, příp. amphotericin B); **NK** - negativní kontrola DMSO; **KR** - kontrola růstu; **A1-C3** - testované látky v tripletu

#### **Obrázek č. 16: Schéma mikrotitrační destičky pro testování antimikrobiální aktivity**

Do jamek obsahujících jednotlivé testované sloučeniny, včetně kontroly růstu a pozitivní kontroly bylo následně inokulačním ježkem přeneseno 5  $\mu$ l suspenze mikroorganismu. Destička byla poté přikryta sterilním víčkem a vložena do fólie pro

zamezení vyschnutí. Takto připravené destičky byly inkubovány při 37°C, příp. 30°C (*C. albicans*), po dobu 24, 48 a 72 hodin. Inkubační doba u kmenů *B. pertussis* a *F. tularensis* byla prodloužena na pět dní. Hodnocení antimikrobiální aktivity sloučenin bylo prováděno odečtem nárůstu testovaných mikroorganismů v jednotlivých jamkách, který se projevil zákalem nebo tvorbou sedimentu. Obsahy jamek bez zjevného růstu byly vyočkovány na vhodnou živnou půdu pro ověření inhibice růstu. Hodnocení účinnosti jednotlivých sloučenin znázorňuje obrázek č. 17.



**Legenda:** PK - pozitivní kontrola; NK - negativní kontrola; KR - kontrola růstu, A1-C3 – testované látky; P - inhibice růstu mikroorganismu, N - růst mikroorganismu

**Obrázek č. 17: Hodnocení antimikrobiální aktivity testovaných sloučenin (foto: Slehová Eva)**

#### 7.4.5 MIKRODILUČNÍ METODA

Sloučeniny s prokázanou inhibiční aktivitou (viz 7.4.4) byly následně testovány mikrodiluční metodou s cílem stanovení hodnoty minimální inhibiční koncentrace.



Do všech jamek mikrotitrační destičky ve sloupcích 1 - 12 bylo pipetováno 100  $\mu$ l tekutého média. Následně bylo do jamek řady A přidáno 100  $\mu$ l roztoku testované sloučeniny s prokázanou antimikrobiální aktivitou. Poté bylo vícekanálovou pipetou přeneseno 100  $\mu$ l z první řady do druhé, opětovným nasátím a vypouštěním byl roztok promíchán a celý postup opakován až do předposlední řady. Z jamek řady G bylo nakonec 100  $\mu$ l roztoku přeneseno do desinfekce. V jamkách řady H bylo ponecháno čisté médium, které po inokulaci sloužilo ke kontrole nárůstu testovaného mikroorganismu. Tímto postupem bylo provedeno ředění roztoků sloučenin dvojkovou řadou (ředění 2x-128x). Jelikož byla výchozí koncentrace testovaných sloučenin rozdílná, proto bylo koncentrační rozmezí pro každou látku jiné.

Následně bylo inokulačním ježkem do destičky přidáno 5  $\mu$ l inokula testovaného mikroorganismu (viz. 7.4.3). Destička byla poté zpracována podobně jako v bodě 7.4.4, tzn. přikryta sterilním víčkem a vložena do fólie pro zamezení vyschnutí. Připravené destičky byly inkubovány při 37°C (většina mikroorganismů), příp. 30°C (*C. albicans*), po dobu 24, 48 a 72 hodin. Kmeny *B. pertussis* a *F. tularensis* byly inkubovány pět dní.

Po inkubaci byl hodnocen růst mikroorganismů v jednotlivých jamkách a zjišťována nejnižší účinnou koncentraci (MIC) jako nejnižší účinnou koncentraci testované sloučeniny, jež viditelně inhibovala růstu mikroorganismu. Stanovení hodnot MIC je znázorněno na obrázku č. 18.



**Legenda:** KR - kontrola růstu, MIC - minimální inhibiční koncentrace testované látky

**Obrázek č. 18:** Stanovení MIC mikrodiluční metodou (foto: Slehová Eva)

## 8. VÝSLEDKY A DISKUZE

Narůstající rezistence mikroorganismů k antimikrobiálním léčivům je závažným celosvětovým problémem, který ztěžuje léčbu infekčních onemocnění a do budoucna představuje významné riziko nedostatku účinných léčiv. Dopad zvyšujícího se výskytu multirezistentních mikrobů na současnou medicínu lze spatřovat v mnoha oblastech. Tyto kmeny jsou častou příčinou selhání antibiotické léčby s následnou vyšší mortalitou. Současně se uvedené mikroorganismy uplatňují jako původci nosokomiálních infekcí. V neposlední řadě se pak zvyšují finanční náklady na antimikrobiální léčbu, vzhledem k nutnosti používat účinnější a často také dražší přípravky. V posledních letech se proto řada výzkumných pracovišť po celém světě zabývá hledáním nových účinných sloučenin s antimikrobiálními účinky.

Výzkum a vývoj nových antimikrobiálních přípravků je velmi zdoluhavý a nákladný proces, vyžadující komplexní spolupráci nejen mikrobiologů, ale i toxikologů a dalších oborů. Jednou z možností přípravy nových terapeuticky užitečných látek je využití syntézy strukturních analogů sloučenin s již dříve prokázanými terapeutickými účinky.

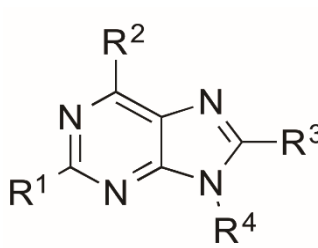
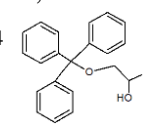
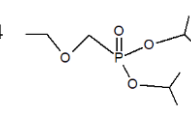
Tato disertační práce vznikla v rámci společného projektu ÚOChB a OBO Těchonín. Jejím cílem bylo otestovat antimikrobiální aktivitu a stanovit účinné koncentrace u sloučenin, odvozených od purinu, pyrimidinu a kyseliny boronové na vybrané klinicky významné druhy bakterií a kvasinek. Tyto látky již dříve našly uplatnění v humánní medicíně při terapii některých maligních či autoimunitních chorob, přičemž u některých sloučenin byly pozorovány i antimikrobiální účinky.

Vzhledem k unikátní povaze testovaných sloučenin, nebylo možné získat v dostupné literatuře recentní informace o antimikrobiálních vlastnostech a hodnotách MIC ke stejným sloučeninám jako v této práci. Pro potřeby porovnání a diskuze uvedených parametrů byla proto studie rozšířena o panel ATB zavedených v klinické praxi a současně byly použity publikované údaje ke strukturně podobným sloučeninám.

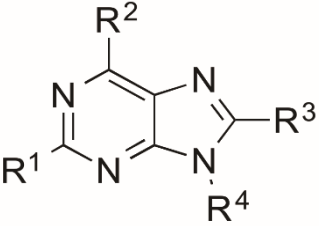
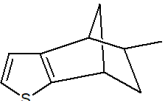

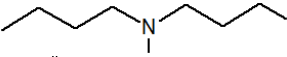
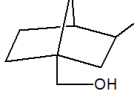
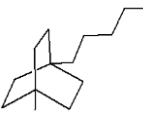

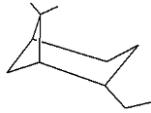
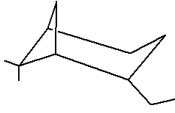
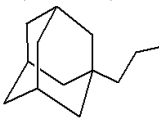
## 8.1 HODNOCENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY TESTOVANÝCH SLOUČENIN

Do testování antimikrobiálních účinků na vybrané druhy bakterií a kvasinek bylo zahrnuto celkově 658 sloučenin. Z uvedeného počtu byla inhibiční aktivita prokázána u 135 (20,5 %) sloučenin, které byly rozděleny do skupin dle chemického složení. První skupinu tvořily analogy purinových bází (18), druhou analogy pyrimidinových bází (19) a do třetí skupiny byly zařazeny deriváty kyseliny boronové (46). Ostatní účinné sloučeniny (52) nebylo možné strukturně zařadit do žádné z uvedených skupin a nebyly proto pro potřeby této disertační práce zpracovány. Přehled účinných sloučenin z jednotlivých skupin, včetně jejich struktury je uveden v tabulkách č. 4, 5 a 6.

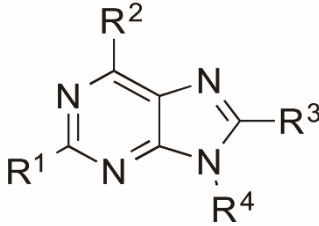


**Tabulka č. 4: Chemická struktura a označení testovaných strukturních analogů purinu**

Strukturní vzorec purinu	Substituenty	Označení látky
	R <sup>1</sup> Cl, R <sup>2</sup> Cl, R <sup>3</sup> H, R <sup>4</sup> benzyl	<b>1/C6</b>
	R <sup>1</sup> Cl, R <sup>2</sup> Cl, R <sup>3</sup> H, R <sup>4</sup> H	<b>2/A12</b>
	R <sup>1</sup> Cl, R <sup>2</sup> Cl, R <sup>3</sup> H, R <sup>4</sup> benzyl	<b>2/B4</b>
	R <sup>1</sup> NH <sub>2</sub> , R <sup>2</sup> Cl, R <sup>3</sup> H, R <sup>4</sup> 3,4 dichlorfuran-2(5H)-1	<b>2/H10</b>
	R <sup>1</sup> H, R <sup>2</sup> NH <sub>2</sub> , R <sup>3</sup> H, R <sup>4</sup> 	<b>4/D6</b>
	R <sup>1</sup> F, R <sup>2</sup> Cl, R <sup>3</sup> H, R <sup>4</sup> H	<b>5/H12</b>
	R <sup>1</sup> Cl, R <sup>2</sup> Cl, R <sup>3</sup> H, R <sup>4</sup> 	<b>6/A12</b>
	R <sup>1</sup> Cl, R <sup>2</sup> Cl, R <sup>3</sup> H, R <sup>4</sup> H	<b>6/D1</b>

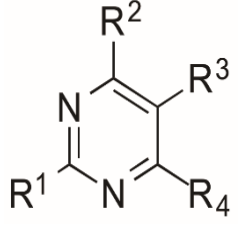
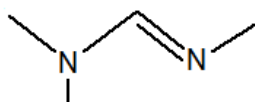
Tabulka č. 4: Chemická struktura a označení testovaných strukturních analogů purinu (pokračování)

Strukturní vzorec purinu	Substituenty	Označení látky
	$R^1$ H, $R^2$ Cl, $R^3$ H, $R^4$ 	<b>8/D7</b>
	$R^1$ H, $R^2$ Cl, $R^3$ H, $R^4$ 	<b>8/D9</b>
	$R^1$ H, $R^2$  $R^3$ H, $R^4$ 	<b>8/E5</b>
	$R^1$ H, $R^2$ Cl, $R^3$ H, $R^4$ 	<b>8/E7</b>
	$R^1$ NH <sub>2</sub> , $R^2$ Cl, $R^3$ H, $R^4$ 	<b>8/F1</b>
	$R^1$ Cl, $R^2$ Cl, $R^3$ H, $R^4$ 	<b>8/G1</b>
	$R^1$ H, $R^2$ Cl, $R^3$ H, $R^4$ 	<b>8/G2</b>
	$R^1$ Cl, $R^2$ Cl, $R^3$ H, $R^4$ 	<b>8/G4</b>

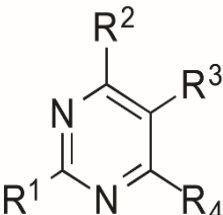
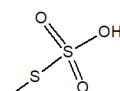
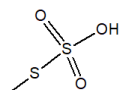
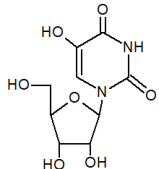

Tabulka č. 4: Chemická struktura a označení testovaných strukturních analogů purinu (pokračování)

Strukturní vzorec purinu	Substituenty	Označení látky
	$R^1$ Cl, $R^2$ I, $R^3$ H, $R^4$ 	<b>8/G9</b>
	$R^1$ H, $R^2$ Cl, $R^3$ N(Me) H, $R^4$ 	<b>8/G10</b>

Tabulka č. 5: Chemická struktura a označení testovaných strukturních analogů pyrimidinu

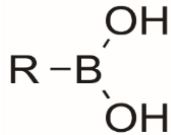

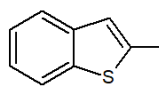
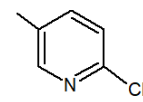
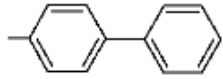
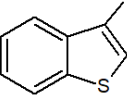

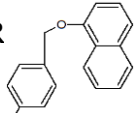
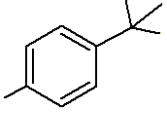
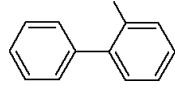
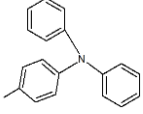
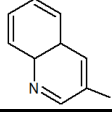
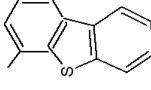
Strukturní vzorec pyrimidinu	Substituenty	Označení látky
	$R^1$ NH <sub>2</sub> , $R^2$ NH <sub>2</sub> , $R^3$ butyl, $R^4$ Cl	<b>1/A4</b>
	$R^1$ NH <sub>2</sub> , $R^2$ Cl, $R^3$ see-butyl, $R^4$ Cl	<b>1/B6</b>
	$R^1$ formamide, $R^2$ Cl, $R^3$ butyl, $R^4$ Cl	<b>1/D3</b>
	$R^1$ NH <sub>2</sub> , $R^2$ OH, $R^3$ SCN, $R^4$ NH <sub>2</sub>	<b>1/E8</b>
	$R^1$ SCN, $R^2$ methyl, $R^3$ H, $R^4$ methyl	<b>1/F2</b>
	$R^1$ SCN, $R^2$ methyl, $R^3$ H, $R^4$ phenyl	<b>1/F4</b>
	$R^1$  $R^2$ Cl, $R^3$ hexyl, $R^4$ Cl	<b>1/G12</b>

Tabulka č. 5: Chemická struktura a označení testovaných strukturních analogů pyrimidinu (pokračování)

Strukturní vzorec pyrimidinu	Substituenty	Označení látky
	R <sup>1</sup> formamid, R <sup>2</sup> Cl, R <sup>3</sup> hexyl, R <sup>4</sup> Cl	<b>2/B5</b>
	R <sup>1</sup> NH <sub>2</sub> , R <sup>2</sup> NH <sub>2</sub> , R <sup>3</sup> SCN, R <sup>4</sup> Cl	<b>2/B11</b>
	R <sup>1</sup> formamid, R <sup>2</sup> Cl, R <sup>3</sup> F, R <sup>4</sup> Cl	<b>2/H7</b>
	R <sup>1</sup> NH <sub>2</sub> , R <sup>2</sup> N-(3,5-dichlorfenyl)amin, R <sup>3</sup> H, R <sup>4</sup> NH <sub>2</sub>	<b>2/H8</b>
	R <sup>1</sup> N-bis(3,4-dimethoxybenzyl)amin R <sup>2</sup> N-bis(3,4-dimethoxybenzyl)amin R <sup>3</sup> NO, R <sup>4</sup> N-cyklohexylamin	<b>2/H11</b>
	R <sup>1</sup> NH <sub>2</sub> , R <sup>2</sup> NH <sub>2</sub> , R <sup>3</sup> R <sup>4</sup> Cl	 <b>3/E5</b>
	R <sup>1</sup> R <sup>2</sup> methyl, R <sup>3</sup> H, R <sup>4</sup> methyl	 <b>3/E8</b>
	* 	<b>3/G6</b>
	R <sup>1</sup> NH <sub>2</sub> , R <sup>2</sup> Cl, R <sup>3</sup> H, R <sup>4</sup> Cl	<b>5/F7</b>
	R <sup>1</sup> oxo, R <sup>2</sup> oxo, R <sup>3</sup> oxo, R <sup>4</sup> oxo	<b>5/F9</b>
R <sup>1</sup> NH <sub>2</sub> , R <sup>2</sup> R <sup>3</sup> NH <sub>2</sub> , R <sup>4</sup> Cl	 <b>8/E9</b>	
R <sup>1</sup> oxo, R <sup>2</sup> oxo, R <sup>3</sup> hexyl, R <sup>4</sup> Cl	<b>8/H8</b>	

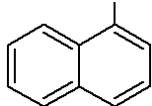
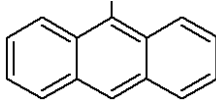
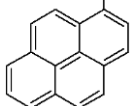
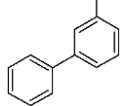
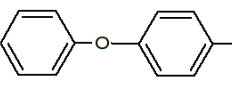
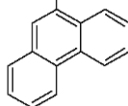
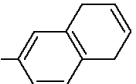
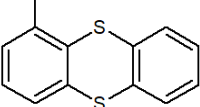
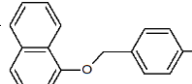

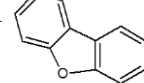
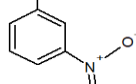
\* uveden celý strukturní vzorec

**Tabulka č. 6: Chemická struktura a označení testovaných strukturních analogů kyseliny boronové**

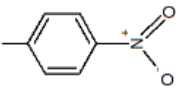
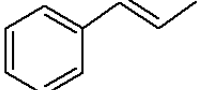
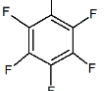
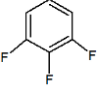
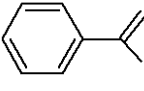
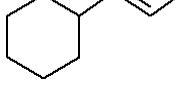
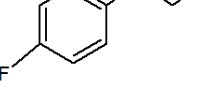


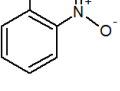
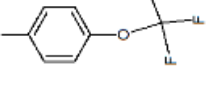
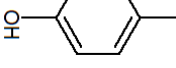
Strukturní vzorec kyseliny boronové	Substituenty	Označení látky
	R 	2/C4
	R 	2/C6
	R 	2/C12
	R 	2/D6
	R 	2/D7
	R 	2/D9
	R 	2/E4
	R 	2/E7
	R 	2/E8
	R 	2/E9
	R 	2/E11
R 	2/E12	



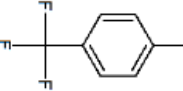
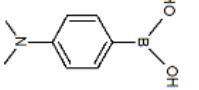

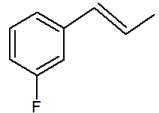
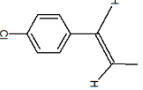
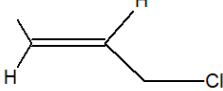
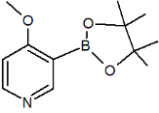
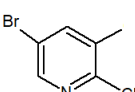
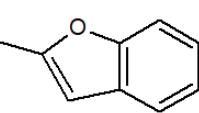
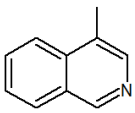
Tabulka č. 6: Chemická struktura a označení testovaných strukturních analogů kyseliny boronové (pokračování)

Strukturní vzorec kyseliny boronové	Substituenty	Označení látky
$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{R}-\text{B} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	R 	2/F2
	R 	2/F3
	R 	2/F4
	R 	2/F5
	R 	2/F6
	R 	2/F7
	R 	2/F9
	R 	2/F11
	R 	2/F12
	R 	2/G4
	R 	2/G5
	R 	3/A2

Tabulka č. 6: Chemická struktura a označení testovaných strukturních analogů kyseliny boronové (pokračování)

Strukturní vzorec kyseliny boronové	Substituenty	Označení látky
$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{R}-\text{B} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	R 	3/A3
	R 	3/A6
	R 	3/A7
	R 	3/A10
	R 	3/A11
	R 	3/B1
	R 	3/B2
	R 	3/B3
	R 	3/B6
	R 	3/B7
	R 	3/B8
	R 	3/B9

Tabulka č. 6: Chemická struktura a označení testovaných strukturních analogů kyseliny boronové (pokračování)

Strukturní vzorec kyseliny boronové	Substituenty	Označení látky
$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{R}-\text{B} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	R 	3/B10
	R 	3/D4
	R 	4/A11
	R 	4/A12
	R 	4/B3
	R 	4/B4
	R 	4/B8
	R 	4/H6
	R 	5/B8
	R 	5/F11

Z hlediska účinnosti na testované mikroorganismy bylo nejširší spektrum antimikrobiální aktivity zaznamenáno ve skupině strukturních derivátů kyseliny boronové. Naopak nejužší spektrum účinnosti vykazovaly analogy purinových sloučenin, které inhibovaly růst pouze *B. pertussis* a *F. tularensis*. V žádné z uvedených skupin nebyla

zjištěna sloučenina s antimikrobiálním účinkem na všechny testované druhy bakterií a kvasinek. V tabulce č. 7 je uveden přehled testovaných mikroorganismů a počet sloučenin s prokázanou antimikrobiální aktivitou.

**Tabulka č. 7: Antimikrobiální aktivita testovaných sloučenin na jednotlivé druhy mikroorganismů**

DRUH	PURINY	PYRIMIDINY	K. BORONOVÁ
<i>A. baumannii</i>	-	1	-
<i>Bac. subtilis</i>	-	2	1
<i>B. pertussis</i>	18	16	41
<i>C. albicans</i>	-	4	4
<i>E. coli</i>	-	1	3
EHEC O104:H4	-	-	-
<i>F. tularensis</i>	6	4	24
<i>L. monocytogenes</i>	-	2	2
<i>Ps. aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Sal. Enteritidis</i>	-	-	1
<i>St. aureus</i>	-	-	2

Ze zvolených testovaných mikroorganismů vykazovaly nejvyšší citlivost vůči zkoumaným sloučeninám kmeny *B. pertussis* a *F. tularensis*. U těchto bakteriálních druhů byla prokázána účinnost sloučenin z každé skupiny testovaných látek. Naproti tomu žádná ze sloučenin použitých v této studii neinhibovala růst *Ps. aeruginosa* a EHEC O104:H4. Nízký inhibiční účinek testovaných látek byl dále zaznamenán pro *A. baumannii*, *Bac. subtilis*, *E. coli*, *Sal. Enteritidis* a *L. monocytogenes*.

Z pohledu účinnosti testovaných sloučenin na jednotlivé mikrobiální druhy byla inhibiční aktivita ve skupině purinových analogů zaznamenána pouze na kmeny *B. pertussis* a *F. tularensis*. Tento výsledek se liší od závěru studie autorů Krajewski a kol. (2017), kteří popisují antimikrobiální aktivitu 6-*N*-hydroxylaminopurinů na *L. monocytogenes*. Tato bakterie byla zařazena do testování i v této disertační práci, nicméně použité sloučeniny její růst neinhibovaly. Podobný jev byl pozorován i pro *E. coli*, *St. aureus* a *Bac. subtilis*, na něž byly analogy purinů v minulosti testovány

s antimikrobiálním účinkem (Kim a kol., 2009). Jako mechanismus působení uvedených sloučenin na bakterie je v těchto studiích uvedena schopnost purinů inhibovat mikrobiální metabolismus prostřednictvím „riboswitch“ elementů. Kinali-Demirci a kol (2012) syntetizovali nové amino a thiotetrazolové purinové deriváty. Bujonovou diluční metodou následně zjišťovali jejich antimikrobiální aktivitu na kmeny *St. aureus*, *Bac. subtilis*, *Ps. aeruginosa*, *E. coli* a *C. albicans*. Autoři prokázali, že sloučeniny s obsahem tetrazolového kruhu ve struktuře vykazují silnější antimikrobiální účinky. Studie prováděná Amerem a kol. (2013) se zabývala novými komplexy purinů a zjišťovala jejich antimikrobiální aktivitu namířenou proti bakteriím *E. coli*, *St. aureus* a kvasince *C. albicans*. Autoři uvádějí, že všechny jimi testované sloučeniny vyjma L1 (empirický vzorec C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>8</sub>) vykazují střední antibakteriální aktivitu na oba testované bakteriální druhy ve srovnání s tetracyklinem. Antifungální efekt pozorovali autoři pouze u dvou sloučenin. Hu a kol. (2010) se zabývali syntézou 6-substituovaných derivátů purinu a studiem jejich biologických vlastností. Diskovou difúzní metodou ověřovali antimikrobiální účinky získaných sloučenin na *Bac. subtilis*, *Aspergillus niger* a *C. tropicalis*. Celkově otestovali 17 strukturních analogů. Nejsilnější inhibiční aktivitu na výše uvedené kmeny prokázali pro látku č. 7 (6N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-9H-purin-2,6-diamin), 8 (6N-[4-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenyl]-9H-purin-2,6-diamin), 11 (2-hydroxyl-fluoropurin), 13 (2-fluoro-6-trifluoromethylpurin), 15 (2-amino-6-trifluoroethylpurin), 16 (2-fluoro-6-trifluoroethylpurin), 17 (2-hydroxyl-6-trifluoroethylpurin). Inhibiční zóna byla ve všech uvedených případech větší než 30 mm, podobně jako u kontrolního fukonazolu.

Ve skupině derivátů odvozených od pyrimidinu byla detekována inhibiční aktivita celkově 16 sloučenin vůči *B. pertussis*. Dalšími bakteriálními kmeny, u nichž byl zaznamenán antimikrobiální účinek uvedených derivátů byly *A. baumannii* (1), *Bac. subtilis* (2), *F. tularensis* (4), *L. monocytogenes* (2) a *E. coli* (1). Oproti předchozí skupině purinových sloučenin byl pozorován inhibiční účinek i na *C. albicans* (4). V dostupné literatuře byla nalezena studie autorů Abunada a kol. (2008), kteří testovali pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin na vybrané druhy bakterií, hub a kvasinek. Diskovou difuzní metodou zjistili ve srovnání s tetracyklinem slabou inhibiční aktivitu na *E. coli* a *St. aureus*. Autoři rovněž zaznamenali středně silný inhibiční účinek na *C. albicans* v porovnání s amfotericinem B. Agarovou difuzní metodu použili k průkazu antimikrobiální aktivity pyrimidinových analogů Ghorab a kol. (2004). Výsledky

srovnávali s chloramfenikolem pro bakterie a terbinafinem pro kvasinky a plísně. V koncentraci 2,5 mg/ml prokázali autoři inhibiční účinky na *Ps. aeruginosa*, *St. aureus*, *E. coli* a *C. albicans*. V dostupných publikacích nebyla nalezena studie zabývající se mechanismem antimikrobiálního účinku pyrimidinů a jejich derivátů. Sharma a kol. (2012) syntetizovali ve své práci několik strukturních analogů pyrimidinů, resp. pyrimidin-2,4-dionů, jejichž schopností je reversibilně inhibovat thymidin fosforylázu. Autoři rovněž testovali působení těchto analogů proti vybraným virům, tumorům, či jejich působení jako antimalarika nebo jako antikoagulancia. Antibakteriální aktivitu ověřovali proti  $G^+$  bakterii *Bac. subtilis* a  $G^-$  bakterii *E. coli* diskovou difúzní metodou. Disky obsahovaly testované sloučeniny v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$ , případně 100  $\mu\text{g/ml}$ . Významnou inhibici růstu působením těchto nově syntetizovaných sloučenin zaznamenali autoři pro *Bac. subtilis* i *E. coli*. Látka s označením OBP-07 (molárním vzorcem  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ ) tvořila v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  zónu inhibice u *Bac. subtilis* 17 mm, u *E. coli* pak 16 mm. Látka OBP-10 (molárním vzorcem  $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ ) tvořila v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  inhibiční zónu u kmene *Bac. subtilis* 18 mm, zatímco u *E. coli* pak 15 mm. Agarovou difúzní metodou ověřovali Kaur a kol. (2012) antimikrobiální aktivitu syntetizovaných derivátů pyrimidinů v koncentraci 10, 50, 100, 250, 500 a 750  $\mu\text{g/ml}$  na *Bac. subtilis* a *Ps. aeruginosa*. Jako referenční ATB pro srovnání účinnosti uvedených sloučenin použili ciprofloxacin v koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ . Autoři prokázali střední inhibiční aktivitu na *Bac. subtilis* u sloučenin s označením 3b, 3i, 3j, které v koncentraci 250  $\mu\text{g/ml}$  vytvářely zóny inhibice 3-6 mm pro uvedený bakteriální druh. Kontrolní ATB vytvářelo pro stejný druh inhibiční zóny o průměru 22 mm. U *Ps. aeruginosa* prokázali autoři nejsilnější antimikrobiální účinek u sloučeniny s označením 3i, která způsobila při stejné koncentraci (250  $\mu\text{g/ml}$ ) zónu inhibice 2 mm. Zóna inhibice ciprofloxacinu pro stejného mikroba pak činila 30 mm.

Strukturní deriváty odvozené od kyseliny boronové vykazovaly v provedeném testování nejširší spektrum účinnosti na zvolené mikrobiální druhy. Mezi nejvíce citlivé druhy vůči uvedeným sloučeninám patřily *B. pertussis* (41) a *F. tularensis* (24). Oproti předchozím skupinám sloučenin byla prokázána inhibiční aktivita vůči *Sal. Enteritidis* (1) a *St. aureus* (2). Analogy kyseliny boronové testoval proti vybraným mikroorganismům (*E. coli*, *St. aureus*) kolektiv autorů Adamczyk-Woźniak (2012). Antimikrobiální aktivitu ověřovali diskovou difúzní a diluční metodou, a to u 12ti nových analogů kyseliny boronové. Inhibiční aktivitu zaznamenali u kmene *St. aureus* pro 10 testovaných látek, zatímco u kmene *E. coli* byla prokázána u 6 látek. V dostupné literatuře se nepodařilo

dohledat ověřené informace o přímém mechanismu antibakteriálního působení derivátů kyseliny boronové. Řada studií nicméně prokázala schopnost těchto sloučenin inhibovat skupinu serinových beta-laktamáz třídy A a C. Autoři Santucci a kol. (2017) dokonce navrhuji využít analogy benzo-[b]-thiophene-2-boronové kyseliny jako diagnostického nástroje pro rozlišení serinových beta-laktamáz od metalo-beta-laktamáz.

## 8.2 STANOVENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE TESTOVANÝCH LÁTEK

Mikrodiluční metodou byly stanoveny hodnoty MIC pro jednotlivé sloučeniny, u nichž byla prokázána inhibiční aktivita při předchozím testování. Jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulkách č. 8, 9, 10 pro každou skupinu sloučenin zvlášť. Současně byla pro potřeby srovnání inhibiční aktivity jednotlivých látek stanovena citlivost testovaných kmenů k již zavedeným ATB a již zavedeným cytostatikům odvozených od pyrimidinu. Přehled hodnot MIC pro tyto kontrolní sloučeniny je uveden v tabulce č. 11.

**Tabulka č. 8: Minimální inhibiční koncentrace strukturních analogů purinu**

Označení látky	Druh	MIC (µg/ml)	µM
1/C6	<i>B. pertussis</i>	17,45	62,50
2/A12	<i>B. pertussis</i>	7,88	41,66
2/B4	<i>B. pertussis</i>	2,19	7,84
	<i>F. tularensis</i>	4,37	15,67
2/H10	<i>B. pertussis</i>	20,03	62,50
4/D6	<i>B. pertussis</i>	112,64	249,46
5/H12	<i>B. pertussis</i>	10,80	62,59
6/A12	<i>B. pertussis</i>	12,85	31,25
6/D1	<i>B. pertussis</i>	5,89	31,19
	<i>F. tularensis</i>	23,88	124,80
8/D7	<i>B. pertussis</i>	75,73	250,11
8/D9	<i>B. pertussis</i>	0,64	12,91
	<i>F. tularensis</i>	0,82	3,30

**Tabulka č. 8: Minimální inhibiční koncentrace strukturních analogů purinu (pokračování)**

Označení látky	Druh	MIC (µg/ml)	µM
8/E5	<i>B. pertussis</i>	0,16	0,40
8/E7	<i>B. pertussis</i>	79,75	239,58
8/F1	<i>B. pertussis</i>	14,62	55,86
	<i>F. tularensis</i>	7,30	27,90
8/G1	<i>B. pertussis</i>	81,33	250,00
8/G2	<i>B. pertussis</i>	2,28	7,82
5/H12	<i>F. tularensis</i>	1,14	3,91
8/G4	<i>B. pertussis</i>	0,87	2,48
8/G9	<i>B. pertussis</i>	2,93	7,83
	<i>F. tularensis</i>	5,87	15,67
8/G10	<i>B. pertussis</i>	5,90	15,63

Sloučeniny ze skupiny analogů purinových bází inhibovaly růst *B. pertussis* v koncentračním rozmezí 0,16 – 112,64 µg/ml a 0,82 – 23,88 µg/ml pro *F. tularensis*. Mezi nejúčinnější sloučeniny proti *B. pertussis* se zařadily látky s označením 8/E5 (0,16 µg/ml), dále 8/D9 (0,64 µg/ml) a 8/G4 (0,87 µg/ml). Sloučenina 8/D9 vykazovala rovněž silný antimikrobiální účinek i na *F. tularensis* (0,82 µg/ml). Hodnoty stanovených inhibičních koncentrací byly dále srovnány s výsledky získanými pro kontrolní ATB. Sloučeniny 8/E5, 8/D9 a 8/G4 vykazovaly pro *B. pertussis* silnější inhibiční aktivitu oproti kyselině nalidixové (7,28 µg/ml) nebo isoniazidu (4,28 µg/ml). Oproti tomu ciprofloxacin a rifamycin inhibovaly růst testovaného kmene bordetely při nižší koncentraci 0,13 µg/ml, respektive 0,016 µg/ml. Sloučenina 8/D9 vykazovala nejsilnější inhibiční účinek na *F. tularensis* z testovaných purinových analogů. Její účinek byl srovnatelný s rifamycinem, který působil v podobné koncentraci 0,79 µg/ml. Nicméně byl nižší v porovnání s ciprofloxacinem (0,3 µg/ml) a streptaminem (0,016 µg/ml).

Jelikož unikátní povaha a původ sloučenin, zařazených do této studie, neumožňuje nalézt v dostupné literatuře hodnoty MIC pro identické látky, jsou získané výsledky srovnávány pro strukturně nejbližší sloučeniny. Testováním antibakteriální aktivity



strukturních analogů adenosinu na referenční kmeny *St. aureus* (RN 4200), *St. epidermidis* (ATCC 35984), *Str. pneumoniae* (ATCC 9619), *E. coli* (ATCC 25922) a *Ps. aeruginosa* (ATCC 27853) se zabývali Vitali a kol. (2012). Autoři zaznamenali, že přítomnost halogenu nebo lipofilního alkynylového řetězce na pozici 2-substituovaného purinového skeletu, vede k inaktivaci antimikrobiální aktivity testovaných sloučenin. Uvedené zjištění nebylo během testování v této práci pozorováno, kdy byla zaznamenána inhibiční aktivita i pro sloučeniny s halogelem ve stejné pozici na testované kmeny *B. pertussis* nebo *F. tularensis*. Autoři současně zaznamenali, že žádná z testovaných sloučenin neinhibovala růst kmenů *E. coli* nebo *Ps. aeruginosa*, podobně jako v našem sledování.

**Tabulka č. 9: Minimální inhibiční koncentrace strukturních analogů pyrimidinu**

Označení látky	Druh	MIC (µg/ml)	µM
1/A4	<i>B. pertussis</i>	8,36	41,67
1/B6	<i>B. pertussis</i>	6,88	31,25
1/D3	<i>B. pertussis</i>	15,51	125,00
	<i>F. tularensis</i>	7,75	31,25
1/E8	<i>B. pertussis</i>	5,72	31,25
	<i>F. tularensis</i>	15,63	2,86
1/F2	<i>C. albicans</i>	20,65	125,00
1/F4	<i>B. pertussis</i>	7,58	33,33
1/G12	<i>Bac. subtilis</i>	9,48	31,25
	<i>B. pertussis</i>	0,24	0,78
2/B5	<i>B. pertussis</i>	30,77	125,00
2/B11	<i>A. baumannii</i>	12,60	62,50
	<i>B. pertussis</i>	3,15	15,63
	<i>E. coli</i>	12,60	62,50
2/H7	<i>B. pertussis</i>	8,75	41,67
	<i>C. albicans</i>	52,50	250,00

**Tabulka č. 9: Minimální inhibiční koncentrace strukturálních analogů pyrimidinu (pokračování)**

Označení látky	Druh	MIC (µg/ml)	µM
<b>2/H8</b>	<i>B. pertussis</i>	0,34	1,25
	<i>F. tularensis</i>	0,84	3,13
	<i>L. monocytogenes</i>	8,44	31,25
<b>2/H11</b>	<i>B. pertussis</i>	1,15	2,15
<b>3/E5</b>	<i>B. pertussis</i>	11,63	41,74
<b>3/E8</b>	<i>C. albicans</i>	5,06	20,88
<b>3/G6</b>	<i>B. pertussis</i>	10,83	41,64
<b>5/F7</b>	<i>C. albicans</i>	1,04	7,69
<b>5/F9</b>	<i>B. pertussis</i>	19,88	124,19
<b>8/E9</b>	<i>Bac. subtilis</i>	3,99	15,75
	<i>B. pertussis</i>	3,99	15,75
	<i>F. tularensis</i>	3,99	15,75
	<i>L. monocytogenes</i>	15,98	62,99
<b>8/H8</b>	<i>B. pertussis</i>	14,45	62,64

Pro strukturální deriváty odvozené od pyrimidinu, působící inhibičně na růst *B. pertussis*, byla stanovena účinná koncentrace v rozmezí 0,24 - 30,77 µg/ml. Ve srovnání s kontrolními sloučeninami vykazovala na uvedený druh nejsilnější inhibiční účinek látka s označením 1/G12, jež působila při nižší koncentraci (0,24 µg/ml) oproti kyselině nalidixové (7,28 µg/ml), isoniazidu (4,28 µg/ml) a formycinu B (4,19 µg/ml). Přesto byl její inhibiční účinek na uvedený bakteriální druh nižší v porovnání s ciprofloxacinem (0,13 µg/ml) a rifamycinem (0,016 µg/ml). Pro sloučeniny inhibující růst *F. tularensis* se hodnota MIC pohybovala v rozmezí 0,84 – 15,63 µg/ml. Ve skupině strukturálních analogů pyrimidinu byla dále identifikována jediná sloučenina inhibující *A. baumannii* (12,6 µg/ml) a *E. coli* (12,6 µg/ml) v této studii. Jednalo se o látku s označením 2/B11, která současně potlačovala růst i *B. pertussis* (3,15 µg/ml). Sloučeniny 1/G12 a 8/E9 jako jediné z celé skupiny inhibovaly růst *Bac. subtilis*. Nicméně ve srovnání

s účinnými kontrolními látkami byl zaznamenán jejich nižší antimikrobiální účinek. Dva pyrimidinové strukturní analogy (2/H8 a 8/E9) pak potlačovaly růst *L. monocytogenes*. U celkově čtyř sloučenin pak bylo prokázáno antifungální působení na *C. albicans*, z nichž nejsilnější účinek byl zaznamenán pro látku 5/F7 v koncentraci 1,04 µg/ml. Pro kontrolní amfotericin B byla přesto zjištěna nižší inhibiční koncentrace 0,04 µg/ml.

Narwal a kol. (2017) se zabývali syntézou nových pyrimidin-2-ol/thiol/amin derivátů, u nichž následně zkoumali jejich antimikrobiální vlastnosti. Bujonovu diluční metodou stanovili hodnoty MIC pro *St. aureus* (MTCC 3160), *Bac. subtilis* (MTCC 441), *E. coli* (MTCC 443), *Ps. aeruginosa* (MTCC 3542), *Sal. Enterica* (MTCC 1165) a *C. albicans* (MTCC 227). Antibakteriální aktivitu srovnávali vůči cefadroxylylu a antifungální účinky vůči flukonazolu. Autoři prokázali antimikrobiální potenciál pro všechny testované sloučeniny. Mezi látky s nejsilnější inhibiční aktivitou se zařadily sloučeniny č.2 (4-(2-chlorophenyl)-6-(4-nitrophenyl)pyrimidin-2-thiol), 5 (4-(4-chlorophenyl)-6-(4-nitrophenyl)pyrimidin-2-amin) a 12 (4-(2,4-dichlorophenyl)-6-(4-nitrophenyl)pyrimidin-2-amin), které potlačovaly růst všech testovaných mikroorganismů s nejnižší MIC oproti ostatním testovaným sloučeninám.

Sreenivas a kol. (2012) syntetizovali strukturní analogy pyrimidinů, u nichž následně zkoumali jejich antimikrobiální aktivitu proti vybraným mikroorganismům, mezi nimiž byly *E. coli*, *Bac. subtilis*, *Kl. pneumoniae* a *C. albicans*. Inhibiční aktivitu zjišťovali diskovou difúzní a bujonovou diluční metodou. Celkově otestovali 8 různých strukturních derivátů pyrimidinu, mezi nimiž byla i sloučenina 2-amino-4,6-dichloro-pyrimidin, která se pod označením 5/F7 vyskytuje mezi testovanými sloučeninami v této disertační práci. Autoři studie zaznamenali pro uvedenou substanci inhibiční aktivitu na *C. albicans* v koncentraci 50 µg/ml, dále proti *Bac. subtilis* a *E. coli* při 200 µg/ml. V provedeném testování v rámci disertační práce inhibovala uvedená látka růst pouze *C. albicans*, a to při nižší koncentraci (1,04 µg/ml) oproti citované studii. Současně nebyla u sloučeniny 5/F7 prokázána inhibiční aktivita na testované kmeny *E. coli* a *Bac. subtilis*, které byly rovněž zařazené do této disertační práce. Mezi nejúčinnější sloučeniny se v uvedené studii zařadil 4-chloro-5-karboxy-pyrimidin, u něhož autoři prokázali antimikrobiální aktivitu vůči *Bac. subtilis* v koncentraci 200 µg/ml a *E. coli* 500 µg/ml. Tato sloučenina dále inhibovala růst *C. albicans* při hodnotě MIC 10 µg/ml.

**Tabulka č. 10: Minimální inhibiční koncentrace strukturních analogů kyseliny boronové**

Označení látky	Druh	MIC (µg/ml)	µM
2/C4	<i>B. pertussis</i>	2,00	15,63
2/C6	<i>B. pertussis</i>	2,78	15,63
	<i>C. albicans</i>	22,25	125,00
	<i>F. tularensis</i>	11,13	62,50
2/C12	<i>Sal. Enteritidis</i>	19,64	124,79
2/D6	<i>B. pertussis</i>	24,71	124,79
	<i>F. tularensis</i>	6,18	31,20
2/D7	<i>B. pertussis</i>	0,70	3,91
	<i>E. coli</i>	44,50	250,00
	<i>F. tularensis</i>	11,13	62,50
2/D9	<i>B. pertussis</i>	1,11	7,81
	<i>F. tularensis</i>	35,50	250,00
2/E4	<i>B. pertussis</i>	2,17	7,81
2/E7	<i>B. pertussis</i>	11,13	62,50
2/E8	<i>F. tularensis</i>	49,51	250,00
2/E9	<i>B. pertussis</i>	18,07	62,50
	<i>F. tularensis</i>	0,56	1,95
2/E11	<i>F. tularensis</i>	21,62	125,00
2/E12	<i>B. pertussis</i>	1,78	7,82
	<i>C. albicans</i>	3,57	15,65
2/F2	<i>B. pertussis</i>	21,50	125,00
	<i>F. tularensis</i>	43,00	250,00
2/F3	<i>B. pertussis</i>	6,94	31,25
2/F4	<i>B. pertussis</i>	0,19	0,78
	<i>F. tularensis</i>	0,48	1,95
2/F5	<i>B. pertussis</i>	6,16	31,12
	<i>F. tularensis</i>	12,33	62,25

**Tabulka č. 10: Minimální inhibiční koncentrace strukturálních analogů kyseliny boronové (pokračování)**

Označení látky	Druh	MIC (µg/ml)	µM
<b>2/F6</b>	<i>B. pertussis</i>	26,75	125,00
	<i>F. tularensis</i>	1,67	7,81
<b>2/F7</b>	<i>Bac. subtilis</i>	6,94	31,25
	<i>B. pertussis</i>	3,47	15,63
	<i>C. albicans</i>	3,47	15,63
	<i>E. coli</i>	55,51	250,00
	<i>L. monocytogenes</i>	1,73	7,81
<b>2/F9</b>	<i>B. pertussis</i>	43,00	250,00
<b>2/F11</b>	<i>B. pertussis</i>	2,03	7,81
<b>2/F12</b>	<i>B. pertussis</i>	2,17	7,81
	<i>F. tularensis</i>	8,69	31,25
<b>2/G4</b>	<i>B. pertussis</i>	6,19	31,25
<b>2/G5</b>	<i>B. pertussis</i>	6,63	31,25
	<i>C. albicans</i>	13,25	62,50
<b>3/A2</b>	<i>B. pertussis</i>	13,91	83,33
	<i>F. tularensis</i>	41,73	250,00
<b>3/A3</b>	<i>B. pertussis</i>	2,62	15,71
	<i>F. tularensis</i>	20,98	125,71
<b>3/A6</b>	<i>B. pertussis</i>	2,31	15,61
	<i>F. tularensis</i>	18,47	124,85
<b>3/A7</b>	<i>B. pertussis</i>	26,49	125,00
<b>3/A10</b>	<i>B. pertussis</i>	10,99	62,50
	<i>E. coli</i>	43,98	250,00
	<i>F. tularensis</i>	21,99	125,00
<b>3/A11</b>	<i>B. pertussis</i>	18,47	124,84
<b>3/B1</b>	<i>B. pertussis</i>	2,43	15,78
	<i>F. tularensis</i>	38,89	252,49

**Tabulka č. 10: Minimální inhibiční koncentrace strukturálních analogů kyseliny boronové (pokračování)**

Označení látky	Druh	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\mu\text{M}$
<b>3/B2</b>	<i>B. pertussis</i>	0,26	1,55
	<i>F. tularensis</i>	2,60	15,50
	<i>L. monocytogenes</i>	20,58	123,99
	<i>St. aureus</i>	20,56	123,90
<b>3/B3</b>	<i>B. pertussis</i>	2,75	15,63
<b>3/B6</b>	<i>B. pertussis</i>	15,19	124,59
<b>3/B7</b>	<i>B. pertussis</i>	41,78	250,28
<b>3/B8</b>	<i>B. pertussis</i>	12,85	62,39
<b>3/B9</b>	<i>B. pertussis</i>	4,30	31,19
	<i>F. tularensis</i>	4,30	31,19
	<i>St. aureus</i>	4,30	31,19
<b>3/B10</b>	<i>B. pertussis</i>	11,87	62,50
<b>3/D4</b>	<i>F. tularensis</i>	20,59	124,80
<b>4/A11</b>	<i>B. pertussis</i>	3,57	31,31
<b>4/A12</b>	<i>B. pertussis</i>	1,29	7,78
	<i>F. tularensis</i>	10,33	62,26
<b>4/B3</b>	<i>B. pertussis</i>	1,14	6,25
	<i>F. tularensis</i>	11,40	62,50
<b>4/B4</b>	<i>B. pertussis</i>	30,15	250,51
	<i>F. tularensis</i>	15,07	125,26
<b>4/B8</b>	<i>B. pertussis</i>	14,69	62,50
<b>4/H6</b>	<i>B. pertussis</i>	29,56	125,14
<b>5/B8</b>	<i>B. pertussis</i>	2,05	15,52
<b>5/F11</b>	<i>F. tularensis</i>	10,82	62,52

Inhibiční aktivita strukturálních analogů kyseliny boronové vůči *B. pertussis* byla zaznamenána celkově u 41 sloučenin, a to v koncentračním rozmezí 0,19 – 43 µg/ml. Nejúčinnější sloučeninou vůči uvedené bakterii s MIC 0,19 µg/ml byla látka 2/F4, která současně inhibovala růst *F. tularensis* s nejnižší MIC 0,48 µg/ml. Ve skupině sloučenin odvozených od kyseliny boronové byly dále zaznamenány jediné sloučeniny z celého testovaného souboru látek, působící inhibičně na *St. aureus* a *Sal. Enteritidis*. Jednalo se konkrétně o sloučeniny 3/B2 a 3/B9, které inhibovaly růst *St. aureus* v koncentraci 20,56 a 4,3 µg/ml. Látka 2/C12 pak jako jediná inhibovala růst *Sal. Enteritidis* se stanovenou hodnotou MIC 19,64 µg/ml. U látek 2/F7 a 3/B2 byly dále sledovány inhibiční účinky na růst *L. monocytogenes*, kdy nejvyšší účinnost v koncentraci 1,73 µg/ml byla prokázána pro strukturální analog 2/F7. Antifungální aktivita byla potvrzena pro celkově 4 sloučeniny v koncentračním rozmezí 3,47 – 22,25 µg/ml. Žádná ze sloučenin působících antimikrobiálně na kvasinky nevykazovala vyšší účinnost ve srovnání s kontrolním amfotericinem B. Ve skupině strukturálních analogů kyseliny boronové byly v provedeném testování nalezeny sloučeniny s nejširším spektrem antimikrobiálního účinku, jednalo se o látky s označením 2/F7 a 3/B2. Sloučenina 2/F7 pak vykazovala jako jediná v celé disertační práci antimikrobiální působení vůči G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakteriím včetně kvasinek.

V dostupné literatuře se podařilo získat výsledky testování antimikrobiálních účinků kyseliny boronové, kterým se zabýval Yilmaz (2012). Hodnoty MIC stanovil bujonovou diluční metodou. Pro referenční kmeny *St. aureus* (ATCC 25923) a *Acinetobacter septicus* (DSM 19415) autor uvádí hodnotu MIC 3,8 mg/ml, zatímco pro *E. coli* (ATCC 35218) a *Ps. aeruginosa* (ATCC 27853) získal 7,6 mg/ml. Během testování provedeném v této disertační práci nebyla žádná sloučenina ze skupiny strukturálních analogů kyseliny boronové účinná na kmen *Ps. aeruginosa* nebo použitý kmen *A. baumannii*. V případě *E. coli* a *St. aureus* však byla pozorována výrazně vyšší inhibiční aktivita u látek použitých v této práci, kdy v případě stafylokoka byla u účinných sloučenin detekována hodnota MIC 4,3 a 20,56 µg/ml. Pro *E. coli* pak v koncentračním rozmezí 43,98 - 55,51 µg/ml.

Tabulka č. 11: Hodnoty minimálních účinných koncentrací kontrolních sloučenin pro kmeny bakterií a kvasinek zjištěné mikrodiluční metodou

SLOUČENINA	Mw	MIC (µg/ml)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
TRIMETHOPRIM	290,31	18,14	N	N	N	18,4	N	N	N	N	0,28	N
SULFAMETHOXAZOL	235,27	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CIPROFLOXACIN	331,34	0,52	0,13	0,13	N	0,013	0,3	N	0,26	0,06	0,004	N
FORMYCIN B	268,22	N	N	4,19	N	N	N	N	N	N	N	N
5-FLUOROURACIL	130,07	N	N	N	N	N	N	N	N	N	32,54	N
5-FLUORO-2'-DEOXYURIDIN	246,19	N	1,92	N	N	N	0,005	N	0,19	N	N	3,85
METRONIDAZOL	171,15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
PYRAZINAMID	123,11	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CYKLOHEXIMID	281,34	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
D-STREPTAMIN	545,64	N	0,14	0,28	N	0,57	0,016	0,06	0,113	0,14	0,28	0,14
FOSFOMYCIN	182,02	N	N	N	N	2,83	N	N	N	N	0,18	N
RIFAMYCIN	822,94	0,4	3,2	0,016	N	3,2	0,798	N	6,4	6,4	3,2	0,4
ISONIAZID	137,13	N	N	4,28	N	N	N	N	N	N	N	N
AMPHOTERICIN B	924,07	N	N	N	0,04	N	N	N	N	N	N	N
KYSELINA NALIDIXOVÁ	232,23	N	N	7,28	N	7,28	14,56	N	N	N	N	N

Legenda: 1 – *A. baumannii*, 2 – *Bac. subtilis*, 3 – *B. pertussis*, 4 – *C. albicans*, 5 – *E. coli*, 6 - *F. tularensis* LVS, 7 - EHEC O104:H4, 8 – *L. monocytogenes*, 9 – *Ps. aeruginosa*, 10 – *Sal. Enteritidis*, 11 – *St. aureus*, N - neinhobován



## 9. ZÁVĚR

Vzhledem k nebezpečnému nárůstu rezistence mikroorganismů na antimikrobiální přípravky je v současné době nezbytný výzkum a vývoj nových účinných léčiv. Jednou z možností, jak tento zdlouhavý a náročný proces urychlit, je využití strukturních analogů již existujících a v praxi zavedených sloučenin.

V této disertační práci byla zkoumána antimikrobiální aktivita sloučenin strukturně odvozených od purinů, pyrimidinů a kyseliny boronové. Tyto látky jsou již v současné klinické praxi hojně využívány zejména pro jejich protinádorovou aktivitu. Nedávná pozorování však prokázala i potenciální schopnost uvedených sloučenin v oblasti antimikrobiální terapie.

V předložené disertační práci byla prokázána schopnost testovaných sloučenin inhibovat růst vybraných klinicky významných mikroorganismů. Největší antimikrobiální účinek na široké spektrum mikroorganismů byl zjištěn především pro sloučeniny ze skupiny strukturních derivátů odvozených od kyseliny boronové. Předkládané výsledky potvrzují možné uplatnění některých sloučenin testovaných v této práci jako potenciální antimikrobiální léčiva. Pro jejich úspěšné zavedení je však potřeba objasnit a popsat mechanismy jejich účinků na cílové struktury bakteriálních buněk. Doposud byl tento mechanismus uspokojivě vysvětlen pouze pro skupinu purinových analogů. Pro potvrzení získaných výsledků by bylo vhodné doplnit a rozšířit tuto skupinu o kmeny izolované z klinického materiálu, včetně kmenů s již prokázanou rezistencí. Vzhledem ke schopnosti některých derivátů kyseliny boronové inhibovat účinnost bakteriálních beta-laktamáz, by bylo velmi zajímavé ověřit tuto schopnost i na sloučeninách, použitých v této práci. U účinných sloučenin by bylo rovněž vhodné provést jejich testování v kombinaci. Produkce beta-laktamáz je závažným a velmi častým mechanismem rezistence u bakterií. Výzkum a případné zavedení těchto sloučenin do praxe by mohlo tuto nepříznivou situaci zvrátit.

Získané výsledky potvrzují vysoký potenciál testovaných sloučenin inhibovat růst klinicky významných patogenů. Práce současně otevřela spoustu nových zajímavých podnětů, které je nezbytné pro jejich budoucí uplatnění v budoucnosti objasnit.

## 10. LITERÁRNÍ ZDROJE

Abunada NM, Hassaneen HM, Kandile NG, Miqdad OA. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New Pyrazole, Fused Pyrazolo[3,4-d]-pyrimidine and Pyrazolo[4,3-e][1,2,4]-triazolo[1,5-c]pyrimidine Derivatives. *Molecules*. 2008, 13(7), 1501-17.

Almasaudi SB. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saud J Biol Sci*. 2018. 25(3): 586-96.

Adamczyk-Woźniak A, Komarowska-Porokhnyavets O, Misterkiewicz B, Novikov VP, Sporzynski A. Biological activity of selected boronic acids and their derivatives. *Appl Organomet Chem*. 2012, 26(7): 390-3.

Alfred K, Kerns R, Osheroff N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*. 2014, 53(10): 1565–74.

Alnour TMS, Ahmed-Abakur EH. Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Medical Impact, Pathogenicity, Resistance Mechanisms and Epidemiology. *JSM Microbiology*. 2017, 5(3): 1046.

Aluru S, Aryal S, Chakravarthi Pv, Payani S, Bhaskar M. Synthesis and Spectral characterization of Pyrimidine analogues: An antimicrobial activity against clinically isolated microbes. *Int J Microb Allied Scie*. 2015, 1(3):5-11.

Amer S, El-Wakiel N, El-Ghamry H. Synthesis, spectral, antitumor and antimicrobial studies on Cu(II) complexes of purine and triazole Schiff base derivatives. *J Mol Struct*. 2013, 1049: 326-35.

Aureli P, Ferrini AM, Mannoni V, Hodzic S, Wedell-Weergaard C, Oliva B. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. *Int J Food Microbiol*. 2003, 83:325–30.

Avent ML, Rogers BA, Cheng AC, Paterson DL. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. *Intern Med J.* 2011, 41(6):441-9.

Baker SJ, Zhang YK, Akama T, Lau A, Zhou H, Hernandez V, Mao W, Alley MRK, Sanders V, Plattner JJ. Discovery of a new boron-containing antifungal agent, 5-fluoro-1,3-dihydro-1-hydroxy-2,1-benzoxaborole (AN2690), for the potential treatment of onychomycosis. *J Med Chem.* 2006, 49 (15): 4447–50.

Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev.* 1996, 9(2):148-65.

Bettiol S, Thompson MJ, Roberts NW, et al. Symptomatic treatment of the cough in whooping cough. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010, (1):CD003257.

Bielaszewska M, Mellmann A, Bletz S, Zhang W, Kock R, Kossow A, Prager R, Fruth A, Orth-Holler D, Marejkova M et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H: a new virulent clone emerges in Europe. *Clin Infect Dis.* 2013, 56: 1373 – 81.

Blaettler L, Mertz D, Frei R, Elzi L, Widmer AF, Battegay M, et al. Secular trend and risk factors for antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates in Switzerland 1997–2007. *Infect.* 2009, 37:534–9.

Blanc DS, Petignat C, Janin B, Bille J, Francioli P.. Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin Microbiol Infect.* 1998, 4: 242–7.

Blount ZD. The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife.* 2015; 4: e05826.

Bogaerts P, Bauraing C, Deplano A, Glupczynski Y. Emergence and dissemination of BEL-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, 51: 1584–5.

Bouchez V, Guglielmini J, Dazas M, Landier A, Toubiana J, Guillot S, Criscuolo A, Brisse S. Genomic Sequencing of *Bordetella pertussis* for Epidemiology and Global Surveillance of Whooping Cough. ECDC report. 2018, 24(6). Dostupné na [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/6/17-1464\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/6/17-1464_article)).

Brett ME, Respicio-Kingry LB, Yendell S, Ratard R, Hand J, Balsamo G, Scott-Waldron C, O'Neal C, Kidwell D, Yockey B, Singh P, Carpenter J, Hill V, Petersen JM. Outbreak of *Francisella novicida* bacteremia among inmates at a louisiana correctional facility. *Mead P Clin Infect Dis*. 2014, 59(6):826-33.

Buchanan RL, Gorris LGM, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*. 2017, 75:1-13.

Buchholz U, Bernard H, Werber D, Bohmer MM, Remschmidt C, Wilking H, Delere Y, an der Heiden M, Adlhoch C, Dreesman J, Ehlers J, Ethelberg S, Faber M, Frank C, Fricke G, Greiner M, Hohle M, Ivarsson S, Jark U, Kirchner M, Koch J, Krause G, Lubert P, Rosner B, Stark K, Kuhne M. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N Engl J Med*. 2011, 365:1763–70.

Burton S, Reid-Smith R, McClure JT, Weese JS. *Staphylococcus aureus* colonization in healthy horses in Atlantic Canada. *Can Vet J*. 2008, 49: 797–9.

Bzowska A, Kulikowska E, Shugar D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacol Ther*. 2000, 88(3):349-425.

Cambre, JN, Sumerlin BS. Biomedical applications of boronic acid polymers. *Polymer* 52(21): 4631–3.

Campbell CW. History of the discovery of sulfaquinoxaline as a coccidiostat. *J. Parasitol.* 94(4), 2008, 934–45.

Capasso C, Supuran CT. Sulfa and trimethoprim-like drugs - antimetabolites acting as carbonic anhydrase, dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2014, 29(3):379-87.

CDC - Centers for disease control and prevention summary of notifiable infectious diseases and conditions -United States, 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2015;62:1–119.

Collin F, Karkare S, Maxwell A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011, 92(3): 479–97.

Conter M, Paludi D, Zanardi E, Ghidini S, Vergara A, Ianieri A. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol*. 2009, 128:497–500.

Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011, 55(3):947-53.

Chen H, Rao H, He P, Qiao Y, Wang F, Liu H, Cai M, Yao J. Potential toxicity of amphenicol antibiotic: binding of chloramphenicol to human serum albumin. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2014, 21(19):11340-8.

Cuthbert BJ, Ross W, Rohlfing AE, Dove SL, Gourse RL, Brennan RG, Schumacher MA. Dissection of the molecular circuitry controlling virulence in *Francisella tularensis*. *Genes Dev*. 2017, 31:1549–60.

Dantas RC, Ferreira ML, Gontijo-Filho PP et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome. *J Med Microbiol*. 2014, 63: 1679–87.

Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010, 74(3): 417–33.

Drainas D, Kalpaxis DL, Coutsogeorgopoulos C. Inhibition of ribosomal peptidyltransferase by chloramphenicol. Kinetic studies. *Eur J Biochem*. 1987,164(1):53-8.

EFSA (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* 2015;13:3991.

Eidam O, Romagnoli C, Caselli E, Babaoglu K, Pohlhaus DT, Karpiak J, Bonnet R, Shoichet BK, Prati F. Design, synthesis, crystal structures, and antimicrobial activity of sulfonamide boronic acids as  $\beta$ -lactamase inhibitors. *J Med Chem.* 2010, 53(21): 7852–63.

El'Garch F, Jeannot K, Hocquet D, Llanes-Barakat C, Plesiat P. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007, 51: 1016–21.

Epanand RM, Walker C, Epanand RF, Magarvey NA. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochim Biophys Acta.* 2016, 1858(5):980-7.

Evans SE, Goult BT, Fairall L, Jamieson AG, Ko Ferrigno P, Ford R, Schwabe JWR, Wagner SD. The ansamycin antibiotic, rifamycin SV, inhibits BCL6 transcriptional repression and forms a complex with the BCL6-BTB/POZ domain. *PLoS ONE.* 2014, 9(3): e90889.

Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis.* 2010, 51(1):79-84.

Floss GH, Yu TW. Rifamycin – Mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chem Rev.* 2005, 105 (2), 621–32.

Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health.* 2017, 10(4): 369-78.

Galanis E, Lo Fo W, Patrick DM, Binsztein ME, Cieslik N, Chalermchikit T, Aidara-Kane A, Ellis A, Angulo EF, Wegener HC Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerg Infect Dis.* 2006, 12: 381-8.

Garcia-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jiménez-Jiménez FJ, Monterrubio-Villar J, Gili-Miner M. Mortality and the increase in length of stay attributable to the acquisition of *Acinetobacter* in critically ill patients. *Crit Care Med.* 1999, 27(9):1794-9.

Ghorab MM, Ismail ZH, Abdel-Gawad SM, Aziem AA. Antimicrobial activity of amino acid, imidazole, and sulfonamide derivatives of pyrazolo[3,4-d]pyrimidine. *Heteroatom Chem.* 2004, 15 (1): 57-62.

Gozhina OV, Svendsen JS, Lejon T. Synthesis and antimicrobial activity of  $\alpha$ -aminoboronic-containing peptidomimetics. *J Pept Sci.* 2014, 20(1):20-4.

Granier SA, Moubareck C, Colaneri C, Lemire A, Roussel S, Dao TT, Courvalin P, Brisabois A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77:2788–90.

Guillot S, Descours G, Gillet Y, Etienne J, Floret D, Guiso N. Macrolide-resistant *Bordetella pertussis* infection in newborn girl. France. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 966-8.

Gupta S, Govil D, Kakar PN, Prakash O, Arora D, Das S, Govil P, Malhotra A. Colistin and polymyxin B: A re-emergence. *Indian J Crit Care Med.* 2009, 13(2): 49–53.

Hall DG. Structure, properties, and preparation of boronic acid derivatives in boronic acids: Preparation and applications in organic synthesis. *Med and Mater.* 2005, 2, Second Edition, 1-133.

Harwood CR, Cranenburgh R. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol.* 2008;16:73–9.

Havlik J. Makrolidová antibiotika v pediatrické praxi. *Pediatric pro praxi.* 2009, 10(2):76-9.

Hong HA, Huang JM, Khaneja R, Hiep LV, Urdaci MC, et al. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *J Appl Microbiol.* 2008, 105(2): 510-20.

Hu Y, Liu X, Lu M. Synthesis and biological activity of novel 6-Substituted purine derivatives. *J Mex Chem Soc.* 2010, 54(2): 74-8.

Chambers HF, DeLeo, FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol.* 2009, 7: 629–41.

Cherry JD, Paddock CD. Pathogenesis and histopathology of pertussis: implications for immunization. *Expert Rev Vaccines.* 2014; 13:1115–23.

Chirila F, Tabaran A, Fit N, Nadas G, Mihaiu M, Tabaran F, Cătoi C, Reget OL, Dan SD. Concerning Increase in Antimicrobial Resistance in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Young Animals during 1980-2016. *Microbes Environ.* 2017, 32(3):252-9.

Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001, 65(2):232-60.

Johnson DI. *Francisella* spp. *Bact Pathogen Virul Fact.* 2017, 241-7.

Juhasz-Kaszanyitzky E, Janosi S, Somogyi P, Dan A, van der Graaf-van Bloois L, van Duijkeren E, Wagenaar JA. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg Infect Dis.* 2007, 13: 630–2.

Kanoh S, Rubin BK. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin Microbiol Rev.* 2010, 23(3):590-615. doi: 10.1128/CMR.00078-09.

Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol.* 2005, 295: 405–18.

Kaur N, Aggarwal AK, Sharma N, Choudhary B. Synthesis and In-vitro Antimicrobial Activity of Pyrimidine Derivatives. *Int J Pharm Sci and Drug Res.* 2012, 4(3): 199-204.

Khan HA, Baig FK, Mehboob R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pac J Tropic Biomed.* 2017, 7(5), 478-82.



Kim JN, Blount KF, Puskarz I, Lim J, Link KH, Breaker RR. Design and antimicrobial action of purine analogues that bind guanine riboswitches. *ACS Chem Biol*. 2009, 4(11):915-27.

Kinali-Demirci S, Idil O, Disli A. Synthesis of some novel purine derivatives incorporating tetrazole ring and investigation of their antimicrobial activity and DNA interactions. *Med Chem Res*. 2015, 24:1218–25.

Köhler T, Pechere JC, Plésiat P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. *Cell Mol Life Sci*. 1999, 7: 771–8.

Kolář M. Vývoj bakteriální rezistence a nová antimikrobiální léčiva. *Interní Med*. 2007, 5: 213–16.

Konaklieva MI. Molecular targets of  $\beta$ -lactam-based antimicrobials: Beyond the usual suspects. *Antibiotics (Basel)*. 2014, 3(2): 128–42.

Krajewski SS, Isoz I, Johansson J. Antibacterial and antivirulence effect of 6-N-hydroxylaminopurine in *Listeria monocytogenes*. *Nucleic Acids Res*. 2017, 45(4): 1914–24.

Konhefr M. Syntéza a elektrochemické vlastnosti derivátů kyseliny fenylborité a ferocenu. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Ústav Biochemie, Brno 2015.

Krulwich TA, Jin J, Guffanti AA, Bechhofer H. Functions of tetracycline efflux proteins that do not involve tetracycline. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2001, 3(2):237-46.

Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005, 57(10):1486-513.

Kwiatkowska B, Maslinska M, Przygodzka M, Dmowska-Chalaba J, Dabrowska J, Sikorska-Siudek K. Immune system as a new therapeutic target for antibiotics. *Adv Biosc Biotech*, 2013, 4, 91-101.

Kwun MJ, Hong HJ. The activity of glycopeptide antibiotics against resistant bacteria correlates with their ability to induce the resistance system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014, 58(10):6306-10.

Lambert PA. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005. 57(10):1471-85.

Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis.* 2002, 34(4):482-92.

Malabarba A., Goldstein BP. Origin, structure, and activity in vitro and in vivo of dalbavancin. *J Antimicrob Chemother.* 2005, 55:S2, ii15–ii20.

Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, Borgers M, Ramaekers FC, Odds FC, and Bossche HV. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 $\alpha$  demethylase (Erg 11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology.* 1999, 145: 2701-13.

Mazzei T, Mini E, Novelli A, Periti P. Chemistry and mode of action of macrolides. *J Antimicrob Chemother.* 1993, 31 Suppl C:1-9.

McGowan, JE. Resistance in nonfermenting gramnegative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control.* 2006, 34: S29–S37.

McLendon MK, Apicella MA, Allen LA. *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annu Rev Microbiol.* 2006, 60:167-85.

Meiller TF, Hube B, Schild L, Shirliff ME, Scheper MA, Winkler R, Ton A, Jabra-Rizk MA. A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide,” *PLoS One.* 2009, 4(4): e5039, 2009.

Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999, 43(4): 727–37.

Minato Y, Dawadi S, Kordus SL, Sivanandam A, Aldrich CC, Baughn AD. Mutual potentiation drives synergy between trimethoprim and sulfamethoxazole. *Nat Commun.* 2018, 9(1):1003. doi: 10.1038/s41467-018-03447-x.

Morar M, Bhullar K, Hughes DW, Junop M, Wright GD. Structure and mechanism of the lincosamide antibiotic adenylyltransferase LinB. *Structure.* 2009, 17(12): 1649 – 59.

Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.* 2016, 4(2): 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

Nayak-Rao S. Aminoglycoside use in renal failure. *Indian J Nephrol.* 2010; 20(3): 121–24.

Narwal S, Kumar S, Verma PK. Design, synthesis and antimicrobial evaluation of pyrimidin-2-ol/thiol/amine analogues. *Chem Cent J.* 2017, 11: 52.

Nemec A, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J Med Microbiol.* 2004, 53:147-53.

Öztürk H, Ozkirimli E, Özgür A. Classification of beta-lactamases and penicillin binding proteins using ligand-centric network models. *PLoS One.* 2015; 10(2): e0117874.

Pal M, Mulu S, Zenebe N, Girmay G, Savalia CV, Gobu B. *Listeria Monocytogenes* as an emerging Global Food-borne Zoonotic Bacterial Pathogen. *Beverage& Food World.* 2017, 44(3):19-32.

Penwell WF, Shapiro AB, Giacobbe RA, Gu RF, Gao N, Thresher J, McLaughlin RE, Huband MD, DeJonge BL, Ehmann DE, Miller AA. Molecular mechanisms of sulbactam antibacterial activity and resistance determinants in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015, 59(3):1680-9.

Prasad R, Shah AH, Rawal MK. Antifungals: Mechanism of action and drug resistance in yeast membrane transporter advances in experimental medicine and biology. Cham: Springer International Publishing. 2016, 327-49.

Roberts MC. Distribution of tetracycline and macrolides-lincosamides-streptogramin B (MLS) genes in anaerobic bacteria. Clin Infect Dis. 1995, 20:S367–S369.

Rojas LJ, Taracila MA, Papp-Wallace KM, Bethel CR, Caselli E, Romagnoli C, Winkler ML, Spellberg B, Prati F, Bonomo RA. Boronic Acid Transition State Inhibitors Active against KPC and Other Class A  $\beta$ -Lactamases: Structure-Activity Relationships as a Guide to Inhibitor Design. Antimicrob Agents Chemother. 2016, 60(3):1751-9.

Rozsypal H. Systémová antimykotika. Klin Farmakol Farm. 2008, 22(1): 40-4.

Santucci M, Spyraakis F, Cross S, Quotadamo A, Farina D, Tondi D, De Luca F, Docquier JD, Prieto AI, Ibacache C, Blázquez J, Venturelli A, Cruciani G, Costi MP. Computational and biological profile of boronic acids for the detection of bacterial serine- and metallo- $\beta$ -lactamases. Sci Rep. 2017, 7(1):17716.

Sellami-Kamoun A, Haddar A, Ali Nel-H, Ghorbel-Frikha B, Kanoun S, Nasri M. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. Microbiol Res. 2008,163: 299–306.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012, 36: 288–305.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. Trends Microbiol. 2011, 19: 241–7.

Shahcheraghi F, Nakhost Lotfi M, Nikbin VS et al. The first macrolide-resistant *Bordetella pertussis* strains isolated from Iranian patients Jundishapur. J Microbiol. 2014, 7: e10880.

Sharma OP, Singla RK, Shrivastava B, Bhat V, Shenoy GG, Jayashree BS, Sreenivasan KK. Synthesis, Spectral Characterization & Antimicrobial Evaluation of Some Novel Pyrimidine-2,4(1H,3H)-diones. *Indo Glob J Pharm Sci.* 2012, 2(1): 70-5.

Sheridan SL, Frith K, Snelling TL, Grimwood K, McIntyre PB, Lambert SB. Waning vaccine immunity in teenagers primed with whole cell and acellular pertussis vaccine: recent epidemiology. *Expert Rev Vaccines* 2014, 13:1081–106.

Soavi L, Stellini R, Signorini L, Antonini B, Pedroni P, Zanetti L, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2010, 16:346–8.

Sreenivas B, Akhila M, Mohammed B. Synthesis and biological evaluation of pyrimidin analogs as potential antimicrobial agents. *Inter J Pharm Pharmaceut Sci.* 2012, 4(2): 306-10.

Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2003, 41: 4089–94.

Taber HW, Mueller JP, Miller PF, Arrow AS. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev.* 1987, 51(4): 439–57.

Tačić A, Nikolić V, Nikolić L, Savić I. Antimicrobial sulfonamide drugs. *Adv technol.* 2017, 6(1): 58-71.

Thomson KS. Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. *J Clin Microbiol.* 2010, 48(4):1019-25.

Titball RW, Johansson A, Forsman M. Will the enigma of *Francisella tularensis* virulence soon be solved? *Trends Microbiol.* 2003, 11: 118–23.

Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev. 2015, 28(3):603-61.

Toth M, Frase H, Antunes NT, Smith CA, Vakulenko SB. Crystal structure and kinetic mechanism of aminoglycoside phosphotransferase-2"-IVa. Protein Sci. 2010, 19(8):1565-76.

Yan LH, Le Roux A, Boyapelly K, Lamontagne AM, Archambault MA, Picard-Jean F, Lalonde-Seguin D, St-Pierre E, Najmanovich RJ, Fortier LC, Lafontaine D, Marsault É. Purine analogs targeting the guanine riboswitch as potential antibiotics against Clostridioides difficile. Eur J Med Chem. 2018, 143:755-68.

Yoneyama H, Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. Bios Biotech and Biochem. 2014, 70:5, 1060-75, DOI: 10.1271/bbb.70.1060.

Yilmaz MT. Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. Turk J Med Sci. 2012; 42 (2): 1423-9.

Urbášková P. Rezistence bakterií k antibiotikum-vybrané metody. Praha : Trios, 1998.

Vela AI, Fernandez-Garayzabal JF, Latre MV, Rodriguez AA, Dominguez L, Moreno MA. Antimicrobial susceptibility of Listeria monocytogenes isolated from meningoencephalitis in sheep. Int J Antimicrob Agents. 2001, 17, 215–20.

Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis. P T. 2015, 40(4): 277–83.

Vitali LA, Petrelli D, Lambertucci C, Prenna M, Volpini R, Cristalli G. In vitro antibacterial activity of different adenosine analogues. J Med Microbiol. 2012, 61(4):525-8.

Williams P. Bacillus subtilis: A Shocking Message from a Probiotic. Cell Host & Microbe. 2007, 1(4): 248-9.

Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2014,12(1):35-48.

Winn M, Goss RJ, Kimura K, Bugg TD. Antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall assembly: recent advances in structure-function studies and nucleoside biosynthesis. *Nat Prod Rep.* 2010, 27(2):279-304.

Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005, 57(10):1451-70.

Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. A review on antibiotic resistance: Alarm bells are ringing. *Cureus.* 2017;9(6):e1403.

Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother.* 2007, 60(6):1206-15.

Zepp F, Heininger U, Mertsola J, Bernatowska E, Guiso N, Roord J, Tozzi AE, Van Damme P. Rationale for pertussis booster vaccination throughout life in Europe. *Lancet Infect Dis.* 2011, 11:557–70.

Zweifel C, Stephan R. Spices and herbs as source of Salmonella related foodborne diseases. *Food Res Int.* 2012, 45:765–9.

## INTERNETOVÉ ODKAZY K POUŽITÝM OBRÁZKŮM

### 1. Obrázek č. 1: Struktura buněčné stěny G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakterií

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/how-antibiotics-work.html>

[převzato 20. 5. 2018]

### 2. Obrázek č. 2: Mechanismus působení antibiotik na bakteriální buňku

<https://www.quora.com/Why-do-antibiotics-kill-only-bacterial-cells-but-not-human-cells> [převzato 20.

5. 2018]

### 3. Obrázek č. 3: Chemická struktura penicilinu s vyznačeným beta-laktamovým kruhem

<https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/physical-sciences-practice/physical-sciences-practice-tut/e/the-chemical-structure-consequences-of-beta-lactams> [převzato 20. 5. 2018]

### 4. Obrázek č. 4: Chemická struktura ciprofloxacinu

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/17850?lang=en&region=CZ> [převzato 20. 5. 2018]

### 5. Obrázek č. 5: Chemická struktura streptomycin sulfátu

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/5711?lang=en&region=CZ> [převzato 20. 5. 2018]

### 6. Obrázek č. 6: Chemická struktura vankomycinu

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/vancomycinhydrochloride144925freebasebasis140493911?lang=en&region=CZ> [převzato 20. 5. 2018]

### 7. Obrázek č. 8: Chemická struktura chloramfenikolu

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-eu/method-validation.html>

[převzato 20. 5. 2018]

### 8. Obrázek č. 9: Chemická struktura erythromycinu

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/erythromycin7339311407811?lang=en&region=CZ>

[převzato 20. 5. 2018]

### 9. Obrázek č. 10: Chemická struktura linkomycinu

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l6004?lang=en&region=CZ> [převzato 20. 5. 2018]



**10. Obrázek č. 11: Chemická struktura sulfonamidu**

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/s9251?lang=en&region=CZ> [převzato 20. 5. 2018]

**11. Obrázek č. 12: Chemická struktura rifamycinu**

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r8626?lang=en&region=CZ> [převzato 20. 5. 2018]

**12. Obrázek č. 13: Chemická struktura amfoterycinu B**

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a4888?lang=en&region=CZ> [převzato 20. 5. 2018]

**13. Obrázek č. 15: Chemická struktura pyrimidinu a purinu**

(<https://prezi.com/mkdacbwjldon/nukleinsahren/>) [převzato 20. 5. 2018]