

**Univerzita Palackého v Olomouci**

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie



---

Univerzita  
Palackého

v Olomouci

**Vztah struktury a účinku chemoterapeutik  
na bakteriálních filmech a screeningu dynamiky  
antimikrobiálního účinku**

Disertační práce

Autor práce:

PharmDr. Šárka Mascaretti

Vedoucí práce:

Prof. PharmDr. Josef Jampílek, PhD

Olomouc 2022

## **Abstrakt**

Rezistence mikroorganismů k antimikrobiálním látkám je přetrvávající problém v humánní a veterinární medicíně. Pro bakterie je přirozenou formou přežívání vytváření biofilmů, které je chrání před nepříznivým vlivem prostředí. Vzhledem k tomu, že biofilmy jsou mnohonásobně odolnější vůči antibakteriálním látkám, infekce spojené s biofilmy představují výraznou komplikaci v léčbě. Cílem této práce bylo shrnout poznatky o biofilmech, jejich hodnocení a látkách s potenciálním antibiofilmovým působením. Cílem praktické části práce je studium nových látek s potenciálním antibiofilmovým účinkem.

Byla hodnocena komplexní antimikrobiální aktivita 87 nově připravených sloučenin, které byly podle chemické struktury rozděleny do 6 podskupin. Sloučeniny byly hodnoceny jako inhibitoru růstu grampozitivním patogenů, mykobakterií, kvasinek a vláknitých hub. U aktivních sloučenin byl popsán vztah struktury a aktivity. Řada sloučenin silně inhibovala růst mikroorganismů nebo formaci biofilmu, limitujícím faktorem pro jejich další studium a případné klinické použití byla jejich cytotoxicita. Jako nejslibnější se ukázaly deriváty kyseliny gallové a několik sloučenin ze skupiny cinnamamidů a nitrofenylpiperazinů.

**Klíčová slova:** antibakteriální aktivita, biofilm, time-kill, synergie.

## **Abstract**

Microorganism resistance to antimicrobial drugs is a persistent problem in human and veterinary medicine. Biofilm is the natural way of living for microorganism, because it protects them from the adverse environmental impact. Because of higher resistance of biofilms to antimicrobial drugs, biofilm-associated infections are significant complications in antibacterial treatment. The aim of this work was to sum up knowledge about biofilms, their treatment and new compounds with potential antibiofilm activity. The aim of the experimental part of the work was to study newly synthesized agents with antibiofilm effect.

The complex antimicrobial activity of 87 newly prepared compounds, divided in to 6 groups based on their chemical structures, was evaluated. The compounds were tested as growth inhibitors of Gram-positive pathogens, mycobacteria, yeasts and filamentous fungi. For active compounds the structure-activity relationship was described. Many of tested compounds strongly inhibited the growth of microorganisms or biofilm formation. Their cytotoxicity was a limiting factor for their further study and possible clinical use. Derivatives of gallic acid and several compounds from the group of cinnamamides and nitrophenylpiperazines were the most promising for further investigations.

**Keywords:** antibacterial activity, biofilm, time-kill assay, synergy.

Čestně prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala sama, za použití zdrojů uvedených v seznamu literatury.

V Olomouci dne .....

PharmDr. Šárka Mascaretti.....

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří se podíleli na vzniku této práce. V první řadě mé poděkování patří mým školitelům, a to prof. PharmDr. Josefu Jampilkovi, Ph.D. za odborné vedení práce, a prof. MVDr. Aloisi Čížkovi, CSc. za umožnění využívání laboratoře na Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie Fakulty veterinárního lékařství VFU Brno pro experimentální část práce.

Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům, kteří mi poskytli sloučeniny k testování, jmenovitě PharmDr. Jiřímu Kosovi, Ph.D a Mgr. Tomáši Strhářskemu z RCPRM, doc. PharmDr. Ivanu Malíkovi, Ph.D a PharmDr. Janě Čurillové z katedry Farmaceutické chemie Farmaceutické fakulty UK v Bratislave, PharmDr. Pavlíně Marvanové, Ph.D z Ústavu chemických léčiv Farmaceutické fakulty VFU Brno, Prof. Robertu Musiołowi a jeho kolegům z Chemického ústavu Slezské univerzity v Katowicích (Polsko) a Dr. Zuzaně Hricoviniové z Chemického ústavu Slovenské akademie věd, Bratislava. Děkuji též svým kolegyním z mikrobiologické laboratoře na VFU Brno, zejména PharmDr. Kristýně Bezouškové za testování dibazických karbamátů proti VRE, PharmDr. Janě Kaštánkové za screening antibakteriální aktivity *N*-fenylpiperazinů a mým studentkám Mgr. Sonie Riahiové a Mgr. Andreie Nagyidaiové za příkladnou práci při testování antibakteriální aktivity zadaných sloučenin.

Děkuji také Dr. Ágnes M. Móricz a jejím kolegům z Centra pro zemědělský výzkum Maďarské akademie věd v Budapešti (Maďarsko) za umožnění testování antifungální aktivity a cenné rady v této oblasti, prof. Aidanu Coffeymu z Katedry biologických věd Technologického Institutu v Corku (Irsko) za zaškolení v hodnocení antimykobakteriální aktivity proti *Mycobacterium tuberculosis* a prof. Migueli Prudenciovi a jeho týmu z Ústavu molekulární medicíny Lékařské fakulty Lisabonské univerzity (Portugalsko) za umožnění testování antimalarické aktivity proti *Plasmodium berghei*.

Speciální poděkování patří mé kolegyni a kamarádce PharmDr. Haně Vrbové za spolupráci během celého doktorského studia a zejména mému manželovi Lucovi Mascarettimu za nutnou podporu při psaní disertační práce.

## Obsah

<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>PODĚKOVANÍ.....</b>	<b>5</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>10</b>
<b>1 ÚVOD A CÍL PRÁCE .....</b>	<b>11</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>13</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Bakteriální biofilm .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 Onemocnění spojená s formací biofilmu.....</b>	<b>14</b>
3.2.1 Onemocnění spojená se zavedením cizího tělesa .....	15
3.2.2 Biofilmové infekce bez zavedení cizího tělesa.....	15
3.2.3 Poškození implantátu biofilmem .....	18
<b>3.3 Formace biofilmu .....</b>	<b>19</b>
<b>3.4 Mechanismy rezistence biofilmu k antimikrobiálním látkám .....</b>	<b>19</b>
3.4.1 Snížení penetrace antibiotik .....	19
3.4.2 Rezistence zapříčiněná enzymy .....	20
3.4.3 Efluxní pumpy .....	20
3.4.4 Nutriční limitace a stresová odpověď.....	21
3.4.5 Perzistující buňky .....	22
3.4.6 Extracelulární DNA.....	22
3.4.7 <i>Quorum sensing</i> .....	23
3.4.8 Látky s antibiofilmovým účinkem a jejich mechanismus .....	26
<b>3.5 Metody pro kultivaci biofilmů .....</b>	<b>38</b>
3.5.1 Kultivace biofilmu na mikrotitrační destičce .....	38
3.5.2 Calgary metoda .....	41
3.5.3 Biofilm ring test .....	41
3.5.4 Robbinsovo zařízení .....	41
3.5.5 Drip flow biofilm reaktor .....	42
3.5.6 Rotační biofilmový reaktor .....	42

<b>3.6</b>	<b>Metody pro hodnocení biofilmů .....</b>	<b>43</b>
3.6.1	Mikrobiologické a molekulární metody .....	43
3.6.2	Fyzikální metody .....	43
3.6.3	Chemické metody .....	44
3.6.4	Mikroskopické metody .....	45
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Hodnocené látky .....</b>	<b>46</b>
<b>4.2</b>	<b>Použité mikroorganismy .....</b>	<b>46</b>
<b>4.3</b>	<b>Pomůcky a materiál .....</b>	<b>48</b>
4.3.1	Kultivační média, roztoky a chemikálie .....	48
4.3.2	Roztoky konvenčně užívaných antimikrobiálních látek .....	48
4.3.3	Pomůcky .....	49
4.3.4	Přístroje .....	49
<b>4.4</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>50</b>
4.4.1	Stanovení minimální inhibiční aktivity (MIC) .....	50
4.4.2	Stanovení minimální fungistatické aktivity (MFC) .....	52
4.4.3	Inhibice germinace <i>Bipolaris sorokiniana</i> .....	53
4.4.4	MTT assay .....	54
4.4.5	Hodnocení kombinovaného účinku .....	55
4.4.6	Hodnocení dynamiky baktericidního účinku .....	56
4.4.7	Stanovení inhibiční antibiofilmové aktivity proti <i>S. aureus</i> .....	57
4.4.8	Stanovení eradikační antibiofilmové aktivity proti <i>S. aureus</i> .....	58
4.4.9	Stanovení inhibice růstu kvasinkového biofilmu .....	59
4.4.10	Stanovení inhibice <i>quorum sensing</i> u <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	60
4.4.11	Hodnocení aktivity vybraných sloučenin proti <i>Plasmodium bergei</i> .....	61
4.4.12	Studium ovlivnění permeability cytoplazmatické membrány .....	63
4.4.13	Chelatace železa .....	63
4.4.14	Statistická analýza .....	64
<b>4.5</b>	<b>Proti-invazivní aktivita derivátů cinnamamidů .....</b>	<b>66</b>
4.5.1	Charakteristika hodnocených derivátů cinnamamidů .....	66
4.5.2	Screening antibakteriální aktivity derivátů cinnamamidů .....	67
4.5.3	Screening antimykobakteriální aktivity derivátů cinnamamidů .....	69
4.5.4	Dynamika antibakteriálního účinku vybraných derivátů cinnamamidů proti <i>S. aureus</i> ATCC 29213 .....	70
4.5.5	Antibiofilmová aktivita vybraných derivátů cinnamamidů .....	71
4.5.6	Vliv na <i>quorum sensing</i> u <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	73
4.5.7	Kombinovaný účinek derivátů cinnamamidů .....	74

4.5.8	Antifungální aktivita derivátů cinnamamidů .....	75
4.5.9	Inhibice germinace <i>Bipolaris sorokiniana</i> deriváty cinnamamidů .....	76
4.5.10	Toxicita vůči rostlinným buňkám vybraných derivátů cinnamamidů .....	77
4.5.11	Inhibiční aktivita derivátů cinnamamidů na <i>Plasmodium bergeri</i> .....	79
4.5.12	Inhibice sortasy .....	79
4.5.13	Závěr .....	80
<b>4.6</b>	<b>Protiinvazivní aktivita derivátů thiosemikarbazonů .....</b>	<b>82</b>
4.6.1	Charakteristika hodnocených derivátů thiosemikarbazonů .....	82
4.6.2	Screening antimikrobiální aktivity derivátů thiosemikarbazonů .....	83
4.6.3	Screening antibakteriální aktivity derivátů thiosemikarbazonů .....	84
4.6.4	Screening antimykobakteriální a antifungální aktivity derivátů thiosemikarbazonů .....	86
4.6.5	Antibiofilmová aktivita vybraných derivátů thiosemikarbazonů .....	89
4.6.6	Vliv sorbitolu na antifungální aktivitu vybraných derivátů thiosemikarbazonů .....	91
4.6.7	Chelatační aktivita vybraných derivátů thiosemikarbazonů .....	91
4.6.8	Závěr .....	92
<b>4.7</b>	<b>Protiinvazivní aktivita Schiffových bází odvozených od chinazolinonu a jejich měďnatých komplexů .....</b>	<b>94</b>
4.7.1	Charakteristika hodnocených bází a komplexů .....	94
4.7.2	Screening antibakteriální aktivity hodnocených bází a komplexů .....	95
4.7.3	Screening antimykobakteriální aktivity Schiffových bází a komplexů .....	99
4.7.4	Dynamika antibakteriální aktivity Schiffových bází a komplexů .....	99
4.7.5	Antibiofilmová aktivita Schiffových bází a komplexů .....	100
4.7.6	Závěr .....	102
<b>4.8</b>	<b>Protiinvazivní aktivita gallotaninů .....</b>	<b>104</b>
4.8.1	Charakteristika hodnocených gallotaninů .....	104
4.8.2	Screening antibakteriální a antimykobakteriální aktivity gallotaninů .....	106
4.8.3	Antibiofilmová aktivita hodnocených gallotaninů .....	111
4.8.4	Inhibice systému <i>quorum sensing</i> u <i>Ch. violaceum</i> .....	112
4.8.5	Inhibice sortasy A .....	113
4.8.6	Závěr .....	114
<b>4.9</b>	<b>Protiinvazivní aktivita dibazických karbamátů .....</b>	<b>115</b>
4.9.1	Charakteristika hodnocených dibazických karbamátů .....	115
4.9.2	Screening antibakteriální aktivity dibazických karbamátů .....	116
4.9.3	Screening antimykobakteriální a antifungální aktivity dibazických karbamátů .....	119
4.9.4	Kombinovaný účinek vybraných dibazických karbamátů .....	122
4.9.5	Dynamika antibakteriálního účinku vybraných dibazických karbamátů .....	123
4.9.6	Antibiofilmová aktivita vybraných dibazických karbamátů .....	125
4.9.7	Ovlivnění permeability cytoplazmatické membrány vybranými dibazickými karbamáty ...	127



4.9.8 Závěr .....	128
<b>4.10 Protiinvazivní aktivita substituovaných 3-(piperazin-1-yl)propan-1,2-diolů .....</b>	<b>130</b>
4.10.1 Charakteristika hodnocených substituovaných 3-(piperazin-1-yl)propan-1,2-diolů .....	130
4.10.2 Charakteristika podskupiny B: karbamoylhydroxypiperaziny .....	134
4.10.3 Závěr .....	145
<b>5 ZÁVĚR.....</b>	<b>146</b>
<b>6 SEZNAM PUBLIKACÍ.....</b>	<b>149</b>
<b>7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>151</b>

## Seznam zkratek

Zkratka	Anglický název	Český název
5-FLU	5-flucytosine	5-flucytosin
AHL	Acyllhomoserine lactones	Acyllhomoserinové laktony
AI	Autoinducer	Autoinduktor
AIP	Autoinductive peptide	Autoindukční peptid
AMF-B	Amphotericine B	Amfotericin B
AMP	Ampiciline	Ampicilin
ATCC	American Type Culture Collection	Americká sbírka typových kultur
ATP	Adenosin triphosphate	Adenosin trifosfát
BHI	Brain-Heart Infusion	Brain-Heart bujón
BEN	Benomyl	Benomyl
CaMH	Cation-adjusted Mueller-Hinton broth	Mueller-Hintonův bujón s kationty
CFU	Colony forming unit	Kolonie tvořící jednotka
CPX	Ciprofloxacin	Ciprofloxacin
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethylsulfoxid
DPD	5-dihydroxy-2,3-pentandione	5-dihydroxy-2,3-pentandion
FIC	Fraction inhibition concentration	Frakční inhibiční koncentrace
INH	Isoniazide	Izoniazid
MBC	minimum bactericidal concentration	minimální baktericidní koncentrace
MBEC	Minimum biofilm eradication concentration	Minimální biofilmová eradikační koncentrace
MBIC	Minimum biofilm inhibitory concentration	Minimální biofilmová inhibiční koncentrace
MHA	Mueller-Hinton agar	Mueller-Hintonův agar
MIC	Minimum inhibitory concentration	Minimální inhibiční koncentrace
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> rezistentní k methicilinu
MTAN	5'-methylthioadenosine	5'-methylthioadenosin
PBS	Phosphate buffered saline	Fyziologický roztok s fosfátovým pufrém
PIA	Polysaccharide intracellular adhesine	Polysacharidový mezibuněčný adhezín
QQ	Quorum quenching	Quorum quenching
QS	Quorum sensing	Quorum sensing
ROS	Reactive oxygen species	Reaktivní formy kyslíku
SAM	S-adenosylmethionin	S-adenosylmethionin
SAH	S-adenosylhomocysteine	S-adenosylhomocystein
SAR	Structure-activity relationships	Vztahy mezi strukturou a aktivitou
SZÚ	National Institute of Public Health Prague	Státní zdravotní ústav Praha
TET	Tetracycline	Tetracyklin
TSB	tryptic soya broth	Triptický sojový bujón
VRE	vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i> rezistentní k vankomycinu

## 1 Úvod a cíl práce

Schopnost mikroorganismů přizpůsobovat se okolním podmínkám je přirozená, a proto není divu, že se u nich vyvíjí i rezistence k antimikrobiálním látkám. Tento vývoj je bohužel stále rychlejší než vývoj nových antibakteriálních sloučenin (WHO, 2017). Například mezi lety 2006–2016 bylo vyvinuto pouze 15 nových látek nebo kombinací s antimikrobiálním účinkem určených pro systémové podání, což tvoří jen nepatrnou část nově syntetizovaných léčiv (Součková & Ruzsíková, 2016).

Situace v Evropě se v posledních letech naštěstí obrací mírně k lepšímu. Příkladem může být klesající rezistence stafylokoků k methicilinu a makrolidovým antibiotiům, nebo snižující se incidence tuberkulózy v Evropské unii (URL-1).

Boj s antimikrobiální rezistencí (AMR) je i jedna ze strategických oblastí zahrnutá v „European medicines agencies network strategy to 2025“ (URL-2). V roce 2020 bylo uděleno pozitivní hodnocení od Komise pro léčebné přípravky pro humánní použití (Committee for Medical Product for Human Use, CHMP) celkem 4 novým antibakteriálním látkám. Jednalo se o cefiderocol, lefamulin, pretomanid a tygecyklin. Pro srovnání; v roce 2019 se jednalo pouze o 2 sloučeniny (URL-3).

Kromě vývoje nových antibakteriálních látek je třeba motivovat lékaře i veřejnost ke správnému zacházení s antimikrobiálními léčivy. Jednou z důležitých cest, jak edukovat veřejnost, je Evropský antibiotický den, který pořádá Evropské centrum pro kontrolu nemocí (ECDC). Cílem této celoevropské aktivity je informovat veřejnost o správném používání antibiotik a upozornit na riziko vzniku antibiotické rezistence (URL-4).

Antibakteriální látky jsou vedle humánní medicíny užívané i v medicíně veterinární a jejich spotřeba se v posledních letech naštěstí snižuje. Z ročního přehledu pro „European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC)“ vydaného Evropskou lékovou agenturou v říjnu 2020 vyplývá, že spotřeba antibiotik ve veterinární medicíně se v Evropském hospodářském prostoru nepřetržitě snižuje. Mezi lety 2011–2018 se celkové prodeje antibiotik pro veterinární použití v Evropě snížily o 34 %. Pozitivní je zejména fakt, že se snížilo použití antibiotik, která jsou považována za kritická v humánní medicíně (URL-5).

Klade se důraz i na zodpovědné užívání antibiotik ve veterinární medicíně. Evropská léková agentura v lednu 2020 publikovala aktualizované vědecké doporučení pro kategorizaci antibiotik. Antimikrobiální látky jsou rozděleny do 4 kategorií podle rizika, které vyvolává jejich použití ve veterinární medicíně pro veřejné zdraví vzhledem ke schopnosti vývoje

rezistence, a podle jejich použití pro léčbu zvířat. Tato kategorizace by měla veterinárním lékařům pomoci při rozhodnutí, které antibiotikum použít (URL-6).

V sedmdesátých letech minulého století začal být obecně akceptován fakt, že většina mikroorganismů přežívá ve formě biofilmu a tedy že většina chronických infekcí, jako je například cystická fibróza, chronické kožní defekty, tuberkulóza, ale i zubní kaz je spojena s přítomností biofilmu (Malone et al., 2017). Jelikož jsou biofilmy rezistentnější k antibiotikům než planktonické buňky, je léčba infekcí spojených s biofilmy obtížně léčitelná. Biofilmy dále vykazují celou řadu specifík, jako je například omezený metabolismus nebo přítomnost extracelulární DNA, které jejich eradikaci dále komplikují.

Z výše uvedených informací vyplývá, že ačkoliv společnost v posledních letech podnikla důležité kroky pro zpomalení vývoje antimikrobiální rezistence, je vývoj nových antibakteriálních sloučenin jedním z nejdůležitějších úkolů pro výzkumné týmy celého světa.

## 2 Cíle práce

Cílem teoretické části této práce je shrnout dosavadní poznatky o bakteriálních biofilmech, se zaměřením na mechanismy resistance biofilmů, onemocnění vyvolaná biofilmy, látky s antibiofilmovým efektem a metody studia biofilmů.

Cílem experimentální části práce je zhodnotit komplexní antimikrobiální aktivitu 6 strukturně odlišných skupin potenciálních chemoterapeutik, a sice ze skupin:

- *N*-arylcinammamidů,
- thiosemikarbazonů,
- dibazických karbamátů,
- derivátů kyseliny gallové
- Shiffových bází odvozených od chinazolinu a jejich měďnatých komplexů.
- substituovaných 3-(piperazin-1-yl)propan-1,2-diolů

U všech látek byl nejprve proveden screening jejich antibakteriální a antifungální aktivity proti širokému spektru referenčních a klinických izolátů mikroorganismů. U látek s prokázanou antibakteriální aktivitou byla studována synergie účinku s konvenčně užívanými antibiotiky a schopnost inhibovat a degradovat bakteriální biofilm. U látek s baktericidním účinkem byla studována dynamika tohoto účinku. Pro každou skupinu látek byl stanoven vztah struktury a účinku a na základě chemické struktury vyslovena hypotéza mechanismu účinku, která byla poté různými metodami ověřována.

### 3 Teoretická část

#### 3.1 Bakteriální biofilm

Bakterie mohou existovat v podobě planktonických, volně se pohybujících buněk, nebo v takzvané sesilní formě, kdy jsou přichyceny k povrchu (Pace et al., 2005). Biofilm je organizovaný shluk mikroorganismů pevně přichycený k živému nebo neživému povrchu (Jamal et al., 2018).

Fakt, že bakteriální biofilm je univerzální způsob jejich přežívání byl akceptován až po roce 1970 (Pace et al., 2005). Termín „biofilm“, který se původně používal v technické a enviromentální mikrobiologii, byl poprvé použit v medicíně v roce 1982, kdy Marrie et al. (1982) popsali formaci stafylokokového biofilmu na kardiostimulátoru.

V současné době se předpokládá, že 65 % všech bakteriálních infekcí je spojených s formací biofilmu (Lewis, 2001). Podstatná část biofilmových infekcí je spojena se zavedením cizího tělesa. Nejčastěji zavedené implantáty postižené biofilmovou kolonizací jsou centrální venózní katétry, močové katétry, koronární stenty nebo mechanické srdeční chlopně (Lynch & Robertson, 2008; Jamal et al., 2018). Odhaduje se, že až 40 % mechanických srdečních chlopní, kardiostimulátorů a defibrilátorů může být spojeno s tvorbou biofilmu a vývojem následné infekce (Darouiche, 2004). Počáteční infekce se obvykle objevuje do dvou týdnů od operace a je spojena s kontaminací rány během zákroku. Pokud infekce nastoupí později, probíhá většinou skrytě, což prodlužuje dobu diagnostiky (Edmiston et al., 2016).

Stafylokoky jsou jedny z nejvýznamnějších příčin vzniku infekcí spojených s biofilmem. *Staphylococcus epidermidis* je oportunitní patogen kolonizující zejména pacienty se sníženou imunitou, jako jsou HIV-pozitivní pacienti, uživatelé drog nebo lidé s imunosupresivní terapií. U těchto pacientů mohou vyvolat vznik sepse nebo endokarditidy. Jelikož se *S. epidermidis* vyskytuje běžně na kůži, může kolonizovat zavedené implantáty a tím vyvolat infekci. *Staphylococcus aureus* je součástí běžné mikroflóry. Infekce *S. aureus* související s implantáty jsou obtížně léčitelné antibiotiky (Otto, 2008).

#### 3.2 Onemocnění spojená s formací biofilmu

Jak již bylo zmíněno výše, v současné době se biofilm považuje za převládající formu bakteriálního přežívání. Onemocnění spojená s biofilmy se dají rozdělit do tří kategorií:

- Onemocnění spojená se zavedením cizího tělesa
- Biofilmové infekce bez zavedení cizího tělesa

- Poškození implantátu biofilmem.

### 3.2.1 Onemocnění spojená se zavedením cizího tělesa

Použití různých implantátů je nedílnou součástí moderní medicíny. Ačkoliv tyto zařízení mají obrovská množství benefitů a vedou k výraznému zlepšení života pacientů, mohou být i zdrojem různých komplikací. Infekce spojené se zavedením cizího tělesa mohou být velice závažné až fatální. Častou jsou způsobeny bakteriemi vyskytujícími se běžně v prostředí nebo na kůži lidského těla (Del Pozo, 2018).

Vzácné, avšak obtížně léčitelné jsou infekce spojené s ortopedickými implantáty. Pokud dojde k zavlečení infekce během operace, viditelná tvorba biofilmu se může za klinickými příznaky opožďovat i o několik měsíců. Diagnostická aspirace kloubů bývá často falešně negativní, pravděpodobně proto, že bakterie přežívají pouze ve formě biofilmu na synovii, ale neuvolňují se do tekutiny. Jednou z možností, jak prokázat bakteriální infekci, je použití ultrazvuku k odstranění biofilmu z vyjmutého implantátu, a následná PCR pro detekci přítomných bakterií. Tímto způsobem se detekuje infekční původ obtíží až 20krát častěji než při prosté kultivaci synoviální tekutiny (Fux et al., 2003).

### 3.2.2 Biofilmové infekce bez zavedení cizího tělesa

Biofilmová forma přežívání bakterií je charakteristická pro řadu chronických bakteriálních onemocnění, jako je například cystická fibróza, chronická obstrukční plicní nemoc, tuberkulóza, infekce ran, endokarditida nebo i infekce žlučových cest (Del Pozo, 2018).

- *Cystická fibróza*

Cystická fibróza je nejčastější dědičné fatální onemocnění postihující kavkazskou populaci. Vyskytuje se asi u 1 z 2500 narozených dětí. Průměrná doba přežití v USA je 38 let (Hassett et al., 2010).

Onemocnění je vyvoláno mutací v genu CFTR, což vede k nefunkčnosti chloridového kanálu. V dýchacích cestách, gastrointestinálním traktu a reprodukčních orgánech vede zvýšená koncentrace chloridových iontů k výrazné reabsorpci sodíku. Sodík je poté pasivně následován molekulami vody, což vede k zahuštění hlenu. Viskózní hlen způsobuje většinu klinických projevů onemocnění. Porucha chloridového kanálu dále způsobuje, že periciliální tekutina, která je normálně hypotonická, se stává isotonickou. To narušuje její antibakteriální

působení, což vede k primární bakteriální kolonizaci. Vzniklá infekce stimuluje buňky k další tvorbě hlenu, čímž se zhoršuje obstrukce dýchacích cest (Høiby et al., 2010).

Hlavní příčinou morbidity a mortality u pacientů s cystickou fibrózou je plicní infekce, jejímž nejčastějším původcem je *Pseudomonas aeruginosa*. Uvádí se, že až 80 % dospělých pacientů s cystickou fibrózou je postiženo infekcí *P. aeruginosa*. Mezi další rody bakterií podílejících se na infekčních komplikacích cystické fibrózy patří *S. aureus*, *H. influenzae* a *B. cepacia* (Ciofu et al., 2015).

Tvorba biofilmu je hlavním důvodem, který umožní přežití pseudomonád i při opakované antibiotické léčbě. Zvýšená rezistence biofilmu k antibakteriálním látkám, přítomnost metabolicky neaktivních perzistujících buněk a extracelulární matrix jsou hlavní příčiny, které komplikují výběr vhodného antibiotika. Antibiotika, která působí na aktivně se dělící buňky, jako jsou betalaktamy, fluorochinolony nebo aminoglykosidy, nejsou v případě biofilmů dostatečně účinné. Lepší účinnosti je možné dosáhnout při použití kombinací antibiotik, jako je tobramycin/kolistin nebo kolistin/meropenem. Kombinace zároveň snižuje i riziko vzniku rezistence (Martin et al., 2021).

Další možností, jak zvýšit účinek antibiotik, je usnadnit jejich vstup biofilmovou matrix. Toho lze docílit například kombinací s antimikrobiálními peptidy. Sloučenina 6K-F17 vykazuje slibné výsledky v kombinaci s tobramycinem. Pro vstup antibiotika biofilmem je důležitá jak velikost molekuly, tak její náboj. Enkapsulace antimikrobiální látky do liposomu může usnadnit vstup a tím zvýšit antibakteriální účinek, což bylo potvrzeno například u lipozomálního amikacinu (Martin et al., 2021).

Jinou možností je zacílení terapie přímo na extracelulární matrix. Významnou složku matrix tvoří polysacharid alginát. *In vitro* byl prokázán potenciál enzymu alginát-lyasa na narušení extracelulární matrix. Enzym lze kombinovat s ciprofloxacinem a tím zvýšit dostupnost antibiotika. Kromě alginátů produkují pseudomonády i další dva polysacharidy zvané Psl a Pel, které jsou důležité pro formaci strukturovaného biofilmu. Jako slibné se jeví použití enzymů glykosid-hydrolas, které dokážou tyto polysacharidy degradovat a vystavit poté bakteriální buňky zvýšené míře antimikrobiální látky. (Martin et al., 2021). V neposlední řadě lze tvorbu pseudomonádového biofilmu ovlivnit i přes systém *quorum sensing* (QS), což je podobněji diskutováno v kapitole 3.2.5.7.

- *Chronické infekce ran*

Obtížně hojitelné rány, jako jsou bérkové vředy diabetiků, jsou často postiženy mikrobiální infekcí. V porovnání s akutní ránou se u chronických ran vyskytuje biofilmová



infekce 10krát častěji. Nejčastějšími původci těchto infekcí jsou *S. aureus* a *P. aeruginosa*, které se běžně vyskytují společně (Del Pozo, 2018). Nevhodná a nedostatečná léčba chronických ran u diabetu je častou příčinou amputací; ve Spojených státech podstoupí amputaci 14–24 % diabetických pacientů (Ammons, 2010).

Léčba chronických ran je komplexní a dlouhodobý proces. Základním krokem je pravidelné a časté čištění rány, tzv. debridement. V případě již vytvořeného biofilmu je debridement zásadní pro jeho odstranění a následnou léčbu. V případě, že je třeba odstranit velké množství odumřelé tkáně a čistit ránu do hloubky, mohou vznikat komplikace spojené s krvácením rány. V některých případech se debridement neobejde bez použití anestezie. I přes pečlivé vyčištění rány se v řadě případů biofilm do 24 hodin obnoví.

Pro prevenci vzniku biofilmu v chronických ranách se používají antibiotika v topických lékových formách. Dalším krokem je vhodné krytí rány, ideálně materiálem s antibakteriálními vlastnostmi. (Kim & Steinberg, 2012).

- *Dutina ústní*

Dutina ústní je kolonizována více než 500 různými rody bakterií. Většina z nich se nachází na zubech a na zadní části jazyka. Ostatní měkké tkáně dutiny ústní nejsou z důvodu rychlé obměny epitelálních buněk vhodným prostředím pro usazení bakteriálních plaků. (Seneviratne et al., 2011).

Zubní plak je biofilm tvořený komplexní mikrobiální kulturou. Není možné přesně určit všechny mikroorganismy podílející se na vzniku zubního plaku, předpokládá se ale, že jich může být i více než 19 000. Složení zubního plaku je také velice individuální. Za určitých okolností může změna ve složení zubního plaku vyvolávat různá onemocnění (Seneviratne et al., 2011). Primárními tvůrci biofilmu zubního plaku jsou *Streptococcus oralis*, *S. sanguinis*, *S. mitis* a *Neisseria spp.* Na tuto první vrstvu následně nasedají sekundární kolonizátoři, což jsou zejména gramnegativní bakterie jako *Actinomyces spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* a další. Pokud se zubní plak nechá bez jakéhokoliv narušení po dobu minimálně 7 dní, mohou se objevit tzv. terciální kolonizátoři, což jsou převážně oportunní gramnegativní anaerobní patogeny, jako je *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a *Treponema denticola* (Okahashi et al., 2011; Zijngge et al., 2010). Přítomnost těchto patogenů může následně vést k zánětu dásní (Valm, 2011).

„Zdravý“ dentální plak se skládá z nepatogenních bakterií a brání kolonizaci jinými, patogenními mikroorganismy. Za určitých podmínek ale může dojít k narušení rovnováhy. Například zvýšená konzumace cukru vede k přerůstání *S. mutans* a *Lactobacillus acidophilus*,

zvýšení kyselosti prostředí a tím demineralizaci zubní skloviny. *S. mutans* je také považován za hlavní příčinu vzniku zubního kazu, ačkoliv některé studie uvádí, že je nutná přítomnost i dalších karyogenních mikroorganismů, jako je *S. mitis*, *Lactobacillus* a *Candida* (Seneviratne et al., 2011).

- *Gastrointestinální trakt*

Gastrointestinální trakt je kolonizovaný v celé své délce řadou bakteriálních kmenů. Tvorba bakteriálního biofilmu v distální části jícnu je charakteristická pro tzv. Barrettův jícen. Jedná se o komplikaci refluxu, při které je dlaždicový epitel distálního jícnu přeměněn na cylindrický epitel s pohárkovými buňkami podobný střevnímu. Tento epitel je sice odolnější proti agresivnějšímu prostředí žaludečních šťáv, patří ale mezi prekancerózy. Rakovina jícnu je v současné době sedmé nejčastější smrtelné rakovinné onemocnění ve Velké Británii. U pacientů s Barrettovým jícnem se v porovnání s kontrolní skupinou častěji vyskytují dusík-redukující druhy jako je *Campylobacter* a *Veillonella*. Tyto organismy jsou schopné produkovat nitroso sloučeniny a NO, což může vést k poškození DNA a vzniku rakovinného bujení (Macfarlane, 2018; Spechler et al., 1986).

Bakterie formují biofilm i v tlustém střevě. Biofilmová forma usnadňuje štěpení polysacharidů, kdežto planktonické bakterie jsou efektivnější při štěpení oligosacharidů. Existují důkazy, že komensální mikroflóra tlustého střeva se podílí na vzniku ulcerózní kolitidy. Dysbióza ve střevním osídlení se u pacientů s ulcerózní kolitidou vyskytuje častěji než u zdravých lidí. Dochází ke snížení počtu bifidobakterií až třicetinasobně a zvýšení počtu prozánětlivých druhů jako jsou peptostreptokoky a *E. coli* (Macfarlane, 2008).

- *Urogenitální trakt*

Bakteriální biofilmy jsou jednou z příčin chronické prostatitidy, opakovaných cystitid, pyelonefritidy a bakteriální vaginitidy (Tenke et al., 2012). Infekce močových cest jsou nejčastěji vyvolány *E. coli*. Uropatogenní *E. coli* mají řadu virulentních faktorů, které zvyšují jejich schopnost kolonizovat močový trakt. Až u 25 % žen, které prodělaly akutní močovou infekci, se později rozvine infekce chronická (Soto et al., 2006).

### **3.2.3 Poškození implantátu biofilmem**

Mikroorganismy rostoucí v oblasti zavedeného implantátu mohou vést k degradaci materiálů a poškození funkce implantátu. Klinické projevy poškození implantátu mohou mít velice závažné dopady. Příkladem je dysfunkce intravaskulárních katétrů, vznik krystalů

v urinálních stentech, poškození náhrady kyčelního kloubu nebo prasknutí obalu prsních implantátů. To vede k nutnosti výměny implantátu, zvyšuje riziko mortality pacientů a v neposlední řadě prodlužuje dobu hospitalizace a zvyšuje náklady na léčbu (Del Pozo, 2017).

### **3.3 Formace biofilmu**

Vznik biofilmu je dynamický komplexní proces (Pace et al., 2005). Skládá se ze dvou základních fází (Yarwood et al., 2004). Nejdříve dochází k přichycení planktonických buněk k povrchu, formování mikrokolonií a poté k diferenciaci biofilmu a jeho maturaci (Roy et al., 2018).

Prvotní přichycení bakterií k neživému povrchu je zajištěno nespecifickými interakcemi, jako jsou elektrostatické, hydrofobní a van der Waalsovy síly, zatímco u živého povrchu, jako jsou například tkáně, se uplatňují specifické molekulární mechanismy (Pace et al., 2005; Yarwood et al., 2004).

Po navázání k povrchu dochází k proliferaci bakterií, vytváření extracelulární matrix a vzniku mnohavrstevných biofilmových plátů. Extracelulární matrix se skládá z řady různých materiálů, jako jsou polysacharidy, nukleové kyseliny, proteiny a další látky, a zajišťuje soudržnost biofilmu, jeho přilnavost k povrchu a také ochranu vůči antimikrobiálním látkám. Jakmile jsou bakterie trvale přichyceny k povrchu, dochází k jejich fenotypovým změnám. Tento proces se nazývá maturace biofilmu (Pace et al., 2005).

Pro vývoj biofilmu u řady bakterií je třeba určitá forma mezibuněčné komunikace, nazvána jako *quorum sensing* (Yarwood et al., 2004), viz kapitolu 3.2.5.7.

### **3.4 Mechanismy rezistence biofilmu k antimikrobiálním látkám**

Bakteriální biofilm může být k antimikrobiální látce i stonásobně rezistentnější než planktonické buňky stejného kmene. Po expozici baktericidního antibiotika může malá populace přežít a opětovně kolonizovat daný povrch, a tak se stát odolnější vůči antibiotické léčbě. Pokud se bakteriální buňka z biofilmu uvolní, obvykle se stává opět k antibiotiku citlivou (Pace et al., 2005).

#### **3.4.1 Snížení penetrace antibiotik**

Biofilmová extrapolymerická matrix, též zvaná jako glykokalyx, snižuje průnik antibakteriálních látek do biofilmu. Toto může být zapříčiněno pouhým fyzikálním zpomalením difuze, nebo chemickou reakcí mezi polymerem a antibiotikem. Například

exopolysacharidy působí jako iontoměnič, a inhibují tak aktivitu aminoglykosidů (Pace et al., 2005; Singh et al., 2017). Tento fenomén byl pozorován v případě tobramycinu u biofilmu *P. aeruginosa* (Walters et al., 2003).

V posledních letech se pouhé snížení penetrace již nepovažuje za dostatečné vysvětlení rezistence biofilmu (Hall & Mah, 2017). Řada studií prokázala, že antimikrobiální látky jsou schopné k biofilmovým buňkám proniknout v koncentraci srovnatelné s MIC stanoveným proti planktonickým buňkám, neovlivní však životaschopnost těchto buněk (Hall & Mah, 2017; Anderl et al., 2000). Dunne et al. (1993) hodnotili průnik vankomycinu, rifampicinu a jejich kombinace do biofilmu *S. epidermidis*. Obě antibiotika byla schopna proniknout biofilmem v terapeutické koncentraci. Na druhou stranu, existují i studie popisující opačný trend (Hall & Mah, 2017; Chen et al., 1996). Jefferson et al. (2005) mikroskopicky hodnotili průnik vankomycinu do bakteriálního biofilmu *S. aureus*. Ukázalo se, že antibiotikum se ve vodném prostředí k planktonickým bakteriím dostane za 5 minut, kdežto průnik biofilmem trvá více než jednu hodinu. Buňky biofilmu jsou tedy antibiotiku vystavené v nižší míře, což jim může umožnit transkripční změny a následně vyvolat rezistenci. Vliv snížení penetrace antibiotika není úplně objasněn a záleží na řadě faktorů, jako je druh bakterie, typ antimikrobiální látky a růstový stav biofilmu (Hall & Mah, 2017).

### 3.4.2 Rezistence zapříčiněná enzymy

Bakterie mohou vylučovat enzymy schopné degradovat antimikrobiální látky. Jedná se zejména o betalaktamasy. Biofilm *Klebsiella pneumoniae* produkuje betalaktamasy a tím se stává rezistentní k ampicilinu, *P. aeruginosa* si takto zajišťuje rezistenci k řadě betalaktamových antibiotik včetně ceftazidinu a imipenemu (Hall & Mah, 2017).

### 3.4.3 Efluxní pumpy

Efluxní pumpy umožňují bakteriím přežít v nepříznivém prostředí včetně přítomnosti antibiotik. Odstraňují nežádoucí látky z nitra buňky a jsou důležitou příčinou vzniku bakteriální rezistence (Singh et al., 2017). Existuje 6 základních rodin efluxních pump; u stafylokoků se nejčastěji vyskytuje rodina ABC (ATP-binding cassette), u gramnegativních bakterií zejména RND (resistance-nodulation-division family) (Soto, 2013). Přítomnost antimikrobiální látky v sub-inhibiční koncentraci vede k nadprodukci efluxních pump, přičemž tato nadprodukce může vést ke vzniku multirezistence (Singh et al., 2017).

Předpokládá se, že efluxní pumpy hrají roli i při *quorum sensing* (QS) komunikaci. Chan et al. (2005) potvrdili, že QS kontrolující formaci biofilmu u *Burkholderia pseudomallei*

je podmíněn funkcí efluxní pumpy BpeAB-OprB. *P. aeruginosa* má řadu pump způsobujících multirezistenci (tzv. „multidrug resistance pumps“), které hrají důležitou roli v rezistenci planktonických buněk. Tyto pumpy patří do rodiny RND a je to například MexAB-OmrM, MexCD-OprJ nebo MexXY (Soto, 2013). MexAB-OprM a MexCD-OprJ hrají roli v rezistenci pseudomonádového biofilmu k azitromycinu (Gillis et al, 2005). U stafylokoků je popsáno 6 pump ovlivňujících rezistenci. NorA, NorB a NorC jsou MDR pumpy a podmiňují rezistenci například k chinolonům; Tet38 je specifická pumpa zodpovědná za tetracyklinovou rezistenci (Soto, 2013). Zhang a Mah (2008) popsal pumpu PA1874-1866, jejíž exprese je vyšší v biofilmu než u planktonických buněk, a která zřejmě zodpovídá za rezistenci biofilmu k ciprofloxacinu, gentamicinu a tobramycinu.

#### **3.4.4 Nutriční limitace a stresová odpověď**

Biofilm je heterogenní struktura. Jednotlivé bakteriální buňky se liší svojí genovou expresí, metabolickou aktivitou nebo fenotypem. Tento rozdíl vzrůstá se vzrůstající vzdáleností dané buňky od povrchu biofilmu. Buňky blíže povrchu biofilmu mohou využít větší množství kyslíku a nutričních látek, buňky uloženy hlouběji jsou v tomto směru jistým způsobem deprivované. Tyto buňky mají redukovanou metabolickou aktivitu. Jelikož antibiotika jsou aktivní především na rostoucí bakterie, toto snížení metabolismu může vyústit ve větší toleranci antibiotika. Teorie o hypoxii je podpořena také faktem, že biofilmy kultivované v anaerobních podmínkách byly obecně méně citlivé než kontrolní vzorky kultivované v podmínkách aerobních (Hall & Mah, 2017).

Ne všechny bakterie potřebují pro růst kyslík. *P. aeruginosa* zůstává metabolicky aktivní i v anaerobních podmínkách, jelikož je schopna denitrifikačních reakcí nebo fermentace argininu. Bylo prokázáno, že substitucí maturované biofilmu *P. aeruginosa* dusíkem nebo L-argininem lze zvýšit citlivost bakterie k tobramycinu a ciprofloxacinu (Hall & Mah, 2017; Borriello et al., 2006).

Dalším podstatným rozdílem planktonických buněk a buněk v biofilmu je odpověď na oxidační stres. Je prokázáno, že reaktivní formy kyslíku (ROS) hrají roli v odpovědi bakteriální buňky na působení baktericidního antibiotika. Baktericidní látka vyvolá v buňce zvýšenou respiraci, což přes řadu kroků vede k rozpadu FeS klastrů. Uvolněné dvojmocné železo je oxidované peroxidem vodíku na trojmocné železo, čímž vznikají velice reaktivní hydroxylové radikály. Tyto radikály pak oxidují makromolekuly jako je DNA, a vyvolávají smrt bakterie. Jelikož produkce ROS vyžaduje značný přísun kyslíku, je možné,

že k ní v hypoxických částech biofilmu nemůže docházet (Hall & Mah, 2017). Bakterie mají navíc vyvinuté antioxidační mechanismy sloužící ke snížení oxidativního poškození. Také bylo potvrzeno, že biofilmy tvořené mutanty neprodukujícími katalasu přežívají v přítomnosti tobramycinu a ciprofloxacinu až 30krát kratší dobu než „divoké“ kmeny (Hall & Mah, 2017; Van Acker et al., 2013).

### 3.4.5 Perzistující buňky

V kultuře planktonických buněk se vždy nachází buňky v dormantním stavu, tedy se sníženým metabolismem a nerostoucí, na které použítá antimikrobiální látka neúčinkuje. Tyto perzistující buňky mohou v prostředí antibiotika přežít a následně znovu vyvolat infekci (Olsen, 2015; Hall & Mah, 2017). Perzistentní buňky hrají významnou roli např. v chronických zánětech močových cest nebo u pacientů s cystickou fibrózou (Olsen, 2015).

Běžně je akceptovaná myšlenka, že perzistentní buňka se rovná dormantní buňce, některé nedávné studie však ukazují, že persistence může být mnohem složitější proces a že perzistentní buňky mohou být i metabolicky aktivní a účinku antibiotika se vyhýbat jiným způsobem, například inhibicí ROS systému (Hall & Mah, 2017).

Persistentní buňky se pravděpodobně podílí na toleranci biofilmů k antibiotikům. Ukázalo se, že většina pseudomonádového biofilmu je k antimikrobiálním látkám citlivá stejně jako jsou planktonické buňky; zvýšená tolerance biofilmu je dána zvýšeným množstvím perzistujících buněk v porovnání s planktonickou kulturou (Hall & Mah, 2017; Spoering et al., 2011).

### 3.4.6 Extracelulární DNA

Extracelulární DNA je běžnou součástí biofilmové matrix. Chiang et al. (2013) prokázali, že přidání extracelulární DNA do biofilmu *P. aeruginosa* zvýšilo násobně resistenci k tobramycinu a gentamicinu.

Jeden z mechanismů, jakým extracelulární DNA zvyšuje resistenci biofilmu, je změna extracelulárního prostředí. DNA je makromolekula aniontového charakteru a může chelátovat kationty hořčíku, což vede k poklesu jejich koncentrace v prostředí. To vyvolá ovlivnění genové exprese u *P. aeruginosa*, což má za následek zvýšení rezistence k aminoglykosidovým antibiotikům (Mulcahy et al., 2008).

Dalším možným mechanismem rezistence vyvolaným extracelulární DNA je ovlivnění syntézy spermidinu. Spermidin je polyamin vyskytující se ve vnější membráně *P. aeruginosa*, který snižuje její propustnost pro aminoglykosidová antibiotika. Extracelulární

DNA vede ke zvýšení exprese genů PA4773 a PA4774 zodpovědných za syntézu spermidinu, čímž se zvyšuje resistance k aminoglykosidovým antibiotikům (Johnson et al., 2012).

### 3.4.7 *Quorum sensing*

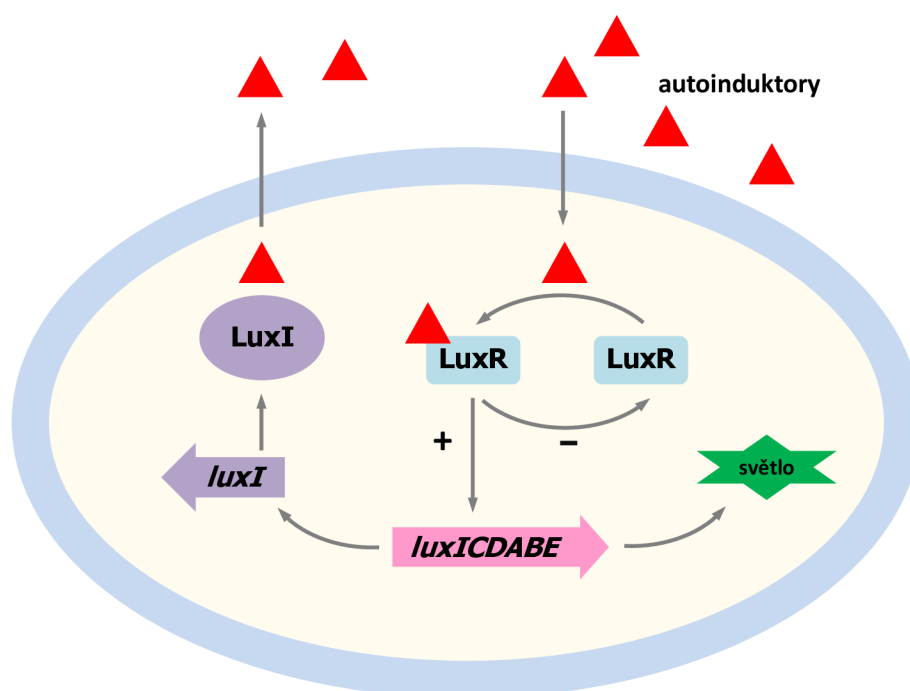
*Quorum sensing* (QS) je proces komunikace mezi bakteriálními buňkami a je definován jako regulace genové exprese v odpovědi na změny hustoty populace mikroorganismu. Bakterie produkují chemické látky zvané autoinduktory, které při překonání určité hranice vedou k ovlivnění genové exprese (Miller & Bassler, 2001; Kalia, 2015; Ziemichód & Skotarczak, 2017).

Tento jev byl poprvé popsán v roce 1970 na mořské bakterii *Vibrio fisheri*, která žije v symbióze s řadou eukaryotických organismů. Bakterie ve vysoké hustotě osídlují jejich specifické orgány vyvinuté za tímto účelem, a produkuje enzym luciferasu, což vede k emisi světla. Vzniklé světlo využívají živočichové pro různé účely, například jako ochranu před predátory (v případě *Eupryma scolopes*), nebo pro přilákání partnera (Miller & Bassler, 2001). Bakterie jsou schopné světlo emitovat pouze v případě, že jsou usídleny uvnitř světelného orgánu. Pokud žijí ve formě jednotlivých buněk v mořské vodě, tuto vlastnost ztrácejí. Je tedy nutné, aby bakterie nějakým způsobem poznaly, zda se nachází v nitru orgánu nebo mimo něj, a zejména aby dokázaly rozpoznat přítomnost dalších bakteriálních buněk kolem nich. Tato schopnost byla posléze vysvětlena pomocí QS (Ziemichód & Skotarczak, 2017).

Později se potvrdilo, že QS je široce rozšířené v celé bakteriální říši. Bakterie používají QS k regulaci řady funkcí, jako je například virulence, motilita, produkce antibiotik, sporulace atd. (Miller & Bassler, 2001). Každý druh bakterií produkuje specifické autoinduktory, obecně lze však říci, že autoinduktory gramnegativních bakterií jsou acylované homoserinové laktony, které se liší délkou acylového řetězce a substitucemi, zatímco grampozitivní bakterie využívají oligopeptidy (Miller & Bassler, 2001; Hawver et al., 2016).

Existuje několik typů QS regulačních systémů. První byl popsán u *V. fisheri*, a je to tzv. Lux-I/Lux-R typ (Miller & Bassler, 2001). Systém obsahuje dva geny, *luxI* a *luxR*, které kódují regulační proteiny LuxI and LuxR. LuxI působí jako synthasa zajišťující syntézu autoinduktorů, LuxR je receptorem pro vzniklé autoinduktory. V případě *V. fisheri* jsou autoinduktory *N*-(3-oxohexanoyl)homoserinové laktony. LuxR se váže na specifickou signální molekulu a vzniká komplex, který indukuje transkripci genů zodpovědných za syntézu enzymu luciferasy (Ziemichód & Skotarczak, 2017; Hawver et al., 2016).

Luciferasa je enzymový komplex kódovaný pěti strukturálními geny *luxCDABE*, které se nachází v operonu *luxICDABE*. Po navázání autoinduktoru na LuxR dojde ke konformačním změnám tohoto proteinu, což umožní jeho navázání na promotor operonu *luxICDABE* a tím se zahájí transkripce genů tohoto operonu. Komplex proteinu LuxR s autoinduktorem zároveň indukuje syntézu proteinu LuxI a působí jako zpětnovazební regulátor pro syntézu LuxR proteinu. Produkce světla u *V. fischeri* je tedy pečlivě řízený proces (Ziemichód & Skotarczak, 2017), viz Obr. 1.



**Obrázek 1:** Schéma systému LuxI/LuxR. (Převzato z Ziemichód & Skotarczak, 2017).

Homologa systému LuxI/LuxR byla popsána u řady gramnegativních bakterií. *P. aeruginosa* je gramnegativní oportunitní patogen a jeden z nejčastějších nozokomiálních patogenů. Infekce touto bakterií je nebezpečná zejména pro pacienty s popáleninami a cystickou fibrózou. Pseudomonáda produkuje různé faktory virulence jako je např elastasa, alkalická proteasa a endotoxin A, a zároveň je bakterie schopna tvořit biofilm. Pro kontrolu virulence užívá tři systémy QS: *Las*, *Rhl* a *Pqs* systém (Kalia, 2015; Ziemichód & Skotarczak, 2017). Tyto systémy jsou vzájemně propojeny a hierarchicky regulovány. *Las* systém aktivuje *Rhl* i *Pqs* systém, zatímco *Rhl* může inhibovat *Pqs* a naopak, *Pqs* aktivuje *Rhl*.

Stafylokoky používají k regulaci tvorby biofilmu agr QS systém kódovaný genem *agr*. *Agr* se skládá ze dvou odlišných operonů řízených promotory P2 a P3. Operon P2 obsahuje



*agrBDCA* a kóduje transkripci RNAII. Operon P3 kóduje transkripci RNAIII, což je efektorová molekula *agr*. Agr systém zodpovídá za extracelulární koncentraci autoindukčního peptidu (AIP), což je z chemického hlediska cyklický peptid složený z různých aminokyselin v závislosti na kmeni, který obsahuje thiolaktonovou strukturu. Jakmile koncentrace AIP překoná určitou hladinu, peptidy se naváží na membránový receptor spřažený s AgrC histidin kinasou, která aktivuje AgrCA dvoukomponentový systém. Tato aktivace vede ke zvýšení koncentrace RNAIII a ovlivnění genové exprese. Tím dojde ke zvýšení sekrece virulentních faktorů a snížení sekrece adhezínů jako je protein A a fibronektin-vázající protein. Bakterie z biofilmu se tak mohou uvolnit a přejít zpět do planktonické formy života (Kalia, 2015; Yarwood et al., 2004).

Z výše uvedeného vyplývá, že na rozdíl od *P. aeruginosa*, kde je QS nutným předpokladem pro vznik robustního biofilmu, je tomu u stafylokoků právě naopak; aktivita QS vznik biofilmu blokuje. Yarwood et al. (2004) prokázali vliv QS na uvolnění bakterií z biofilmu. Bakterie uvolněné z filmu měly vysokou aktivitu *agr*, kdežto planktonické bakterie měly *agr* systém blokováný. Stejně tak se ukázalo, že kmeny deficientní na *agr* formují robustnější biofilm v porovnání s „divokými“ kmeny (Boles & Horswill, 2008).

Boles a Horswill (2008) studovali vliv aktivace *agr* systému na rozpad stafylokokového biofilmu. Prokázali, že tvorba stafylokokového biofilmu je striktně závislá na přítomnosti glukosy v kultivačním médiu. Glukosa působí snížení pH kultivačního média k hodnotě cca. 5,5, což vede k inhibici exprese promotoru P3 a následně efektorové molekuly RNAII. Stejný efekt mají i jiné zdroje uhlíku, jako je například galaktosa. To vysvětluje, že stafylokoky jsou schopny kolonizovat prostředí s nižším pH, jako je kůže nebo vagina, jelikož kyselé prostředí vede k inhibici *agr* systému a vzniku biofilmu. Dále prokázali, že bakterie uvolněné z biofilmu byly opět citlivé k antibiotikům, na něž byl biofilm rezistentní. Dá se říct, že *agr* systém je důležitý regulátor pro „přepínání“ mezi planktonickou a sesilní formou života stafylokoků a může mít vliv na jejich šíření a kolonizaci nových prostor. *agr* systém je tedy vhodné cílové místo pro antibakteriální látky. Yarwood et al. (2004) na základě experimentů s geneticky modifikovanými izoláty stafylokoků prokázali, že exprese *agr* se podílí na vzniku rezistence k některým antibiotikům.

Existuje i třetí QS systém, který používají jak gramnegativní, tak grampozitivní bakterie. Jejich mediátory jsou různé látky, souhrnně nazývané jako AI-2. Klíčovým enzymem v produkci AI-2 je LuxS, který katalyzuje štěpení S-ribosylhomocysteinu

na homocystein a 4,5-dihydroxy-2,3-pentandion (DPD). Z DPD vznikají řadou dalších modifikací AI-2 (Brackman et al., 2012).

### **3.4.8 Látky s antibiofilmovým účinkem a jejich mechanismus**

#### **3.4.8.1 Inhibitory AHL**

*N*-Acylhomoserinové laktony (AHL) jsou signální molekuly QS zejména u gramnegativních bakterií (viz QS). AHL jsou syntetizovány proteiny rodiny LuxI. Parsek et al. (1999) prokázali, že RhII protein u *P. aeruginosa* katalyzují syntézu AHL vznikajícího z *S*-adenosylmethioinu (SAM) a acylovaných derivátů mastných kyselin. Inhibice této syntézy by tedy mohla působit jako inhibitor formace biofilmu *P. aeruginosa*. Mezi látky inhibující AHL syntézu patří *S*-adenosylhomocystein, sinefungin, 5-methylthioadenosin a cykloleucin (Brackman & Coenye, 2015).

Sinefungin je strukturní analog SAM. Inhibuje transmetylační reakce na DNA, RNA a proteinech (Yadav et al., 2014). Parsek et al. (1999) potvrdili inhibiční aktivitu sinefunginu na aktivitu RhII u *Pseudomonas*. Yadav et al. (2014) hodnotili aktivitu proti biofilmu *Streptococcus pneumoniae*. Prokázali koncentračně závislou inhibiční aktivitu na formaci biofilmu a genovou expresi *luxS*, *pfs* a *speE*, které se podílí na syntéze AHL, a snižoval produkci AI-2. Při *in vivo* testování na potkaních sinefungin snižoval kolonizaci pneumokoky ve vnitřním uchu.

Antibiotikum azitromycin interaguje se syntézou C-homoserin laktonu a 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL u *Pseudomonas*, inhibuje produkci alginátu a zvyšuje senzitivitu bakterie na oxidační stres (Brackman & Coenye, 2015; Hoffmann et al., 2007).

Syntéza AHL může být inhibována i na úrovni syntézy mastných kyselin. Cerulein je ireverzibilní inhibitor  $\beta$ -keto-acyl-ACP syntasy I a II, diazoborin blokuje syntézu mastných kyselin reakcí s NADH-dependentní enoyl-CP reduktasou. Jelikož je ale syntéza mastných kyselin životně důležitá pro veškeré vyšší organismy, nelze tyto látky použít *in vivo* (Brackman et al., 2012).

#### **3.4.8.2 Inhibitory syntézy AI-2**

Syntéza AI-2 zahrnuje dva hlavní enzymatické kroky. V prvním kroku je ze *S*-adenosylhomocysteinu (SAH) odstraněn adenin pomocí enzymu 5'-methylthioadenosinu (MTAN). Enzym MTAN je kódován genem *pfs*. Vzniklý *S*-ribosylhomocystein je rozštěpen na DPD a homocystein, který se váže na LuxS. Jelikož jsou MTAN a LuxS přítomny pouze v bakteriích, jsou zajímavým cílem pro účinek antibakteriálních látek (Brackman et al., 2012).

Zhao et al. (2003) popsal několik inhibitorů těchto enzymů. *S*-anhydroribosyl-*L*-homocystein a *S*-homoribosyl-*L*-cystein jsou analogy *S*-ribosylhomocysteinu a fungují jako falešný substrát pro LuxS. Pro vazbu je nutná aminokyselinová část molekuly. V návaznosti na tyto výsledky byly syntetizovány další, aktivnější inhibitory LuxS, které se váží jak na homocysteinové vazebné místo, tak na atom kovu v enzymu (Shen et al., 2006).

Halogenované furanony jsou přírodní látky produkované řasou *Delisea pulchra*. Jsou strukturně podobné AHL, působí vůči nim antagonisticky a řasy je pravděpodobně používají jako obranu vůči bakteriální kolonizaci. Kuehl et al. (2009) zkoumali aktivitu furanonu na formaci stafylokokového biofilmu. U silných producentů biofilmu furanony v sub-MIC koncentraci zvyšovaly tvorbu biofilmu, u slabých biofilmových producentů neměly žádný vliv. Stafylokokový biofilm sestává zejména z polysacharidového mezibuněčného adhezinu (PIA), jehož produkce je kódována v *ica* genech. LuxS funguje jako represor exprese *ica* a tím snižuje biosyntézu PIA. Prokázali, že halogenované furanony působí jakožto inhibitory luxS a tak zvyšují syntézu polysacharidů, což vede k vyšší tvorbě filmu. Žádný vliv na agr systém prokázán nebyl.

### 3.4.8.3 *Qorum quenching*

Již syntetizované signální molekuly je možné rozkládat, čímž se zabrání jejich hromadění a následné aktivaci QS systému. Tento jev se nazývá *quorum quenching* (QQ) a může probíhat enzymaticky, nebo neenzymaticky (Brackman et al., 2012).

- Neenzymatický QQ

Stabilita AHL závisí na podmínkách prostředí. Při pH okolo 2 dochází k hydrolyze *N*-homoserinlaktonového kruhu, kdežto *C*<sub>4</sub>-homoserinlaktonový kruh se otvírá pouze při pH v rozmezí 5–8. Další vliv má teplota, obecně jsou AHL stabilnější při nižších teplotách a délkou postranního řetězce se jejich stabilita při vyšší teplotě zvyšuje (Yates et al., 2002).

- Enzymatický QQ

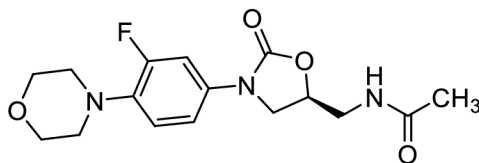
Řada bakterií, jako například *Bacillus* spp., *Acinetobacter* spp. nebo *Bosea* spp. produkují enzymy schopné rozkládat AHL. Tento rozklad může probíhat čtyřmi cestami. AHL laktonasy a AHL acylasy hydrolyzují HSL kruh a amidové vazby, AHL oxidasy a reduktasy molekuly AHL nerozkládají, ale mění jejich aktivitu (Brackman et al., 2012). Výskyt AHL laktonas byl jako první objeven u *Bacillus* spp., později se ukázalo, že jsou široce rozšířené mezi bakteriemi a dokonce se vyskytují u některých eukaryotických

organismů. Některé houby a vyšší rostliny, jako např. *Hordeum vulgare* mohou AHL degradovat, ačkoliv mechanismus je zatím nejasný (Brackman et al., 2012).

#### 3.4.8.4 Klinicky užívané antibakteriální látky s antibiofilmovým efektem

- *Linezolid*

Linezolid (Obr. 2) je jediný klinicky užívaný zástupce skupiny oxazolidinonů. Je aktivní proti řadě gram pozitivních patogenů včetně kmenů *S. aureus* rezistentním k methicilinu (MRSA) a *S. epidermidis*, dobře proniká do tkání a jako jedna z mála látek užívaných proti MRSA se podává perorálně (Kiedrowski & Horswill, 2011). V literatuře se vyskytují rozdílné závěry na aktivitu linezolidu proti bakteriálnímu biofilmu. Dle Kiedrowské linezolid vykazuje aktivitu proti stafylokokovému biofilmu *in vitro* i *in vivo*. Při studiu endokarditidy vyvolané *S. aureus* na králičím modelu došlo k eradikaci biofilmu během pěti dní (Kiedrowski & Horswill, 2011). Raad et al. (2007) neprokázali efekt linezolidu na biofilm tvořený MRSA. Curtin et al. (2003) potvrdili efekt linezolidu na biofilm *S. epidermidis* při délce expozice převyšující 72 hodin, což je v klinické praxi nemožné.

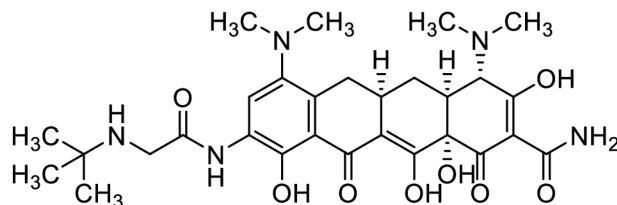


**Obrázek 2:** Strukturní vzorec linezolidu.

- *Tetracykliny a glycylykliny*

Tetracykliny jsou širokospektrá bakteriostatická antibiotika inhibující proteosyntézu na ribozomální podjednotce 30S. Studie ukázaly, že tetracykliny mohou být vhodné v prevenci před biofilmovou kolonizací. Katetry pokryté kombinací minocyclinu a rifampicinu bránily vzniku infekce krevního řečiště; u nechráněných katetrů se vyvinula infekce v 5 % (Raad et al., 1997).

Modifikací tetracyklinu vznikla skupina glycylyklinů. Tigecyklin (Obr. 3) se ukázal jako efektivnější disruptor stafylokokového biofilmu na krysím modelu endokarditidy než vankomycin (Murphy et al., 2000). Kombinace s rifampicinem měla dobrý efekt na léčbu osteomyelitidy vyvolané MRSA na králičím modelu (Yin et al., 2005).



**Obrázek 3:** Strukturální vzorec tigecklinu.

- *Vankomycin*

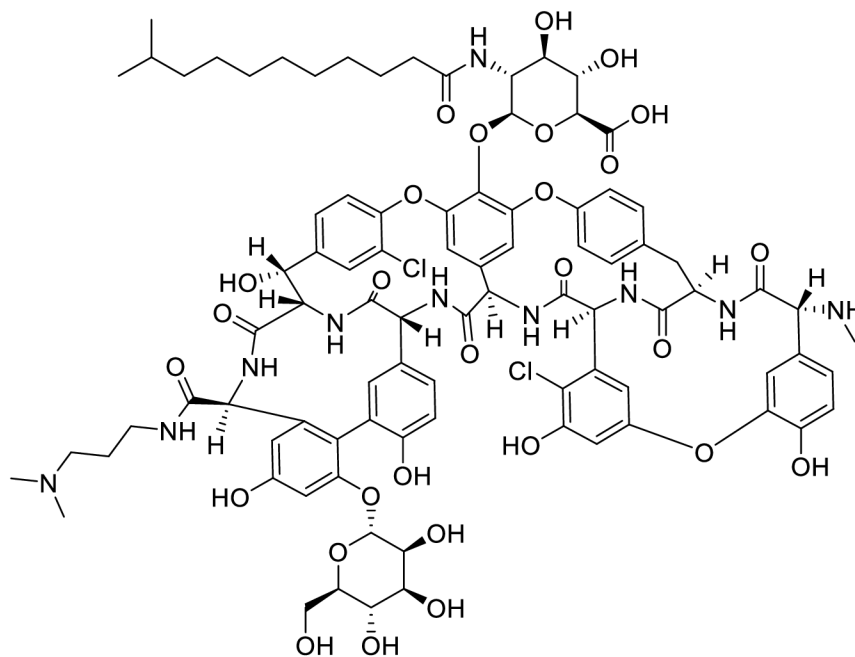
Vankomycin je lék volby pro léčbu invazivních stafylokokových infekcí. Použití vankomycinu v monoterapii k léčbě infekcí vyvolaných biofilmem není vhodné, jelikož MIC proti biofilmu bývá až osminásobné v porovnání s hodnotou MIC proti planktonickým buňkám. Kombinace vankomycinu s dalšími antibiotiky, jako je rifampicin, gentamicin nebo klindamycin, vede ke zlepšení penetrace vankomycinu do biofilmové biomasy a zlepšuje jeho účinek (Kiedrowski & Horswill, 2011).

- *Daptomycin*

Daptomycin je lipopeptidové antibiotikum s baktericidním účinkem proti stafylokokům. Je schopný pronikat i do metabolicky méně aktivní bakteriální masy, jaká se vyskytuje například při bakteriální endokarditidě. Byl schválen FDA pro léčbu bakteriemi vyvolaných MRSA (LaPlante et al., 2007). LaPlante et al. (2007) srovnali účinek daptomycinu a vankomycinu ze tří hledisek: schopnosti inhibovat formaci biofilmu, aktivity na již vzniklý biofilm a *in vitro* efekt pro omezená katérové kolonizace. Daptomycin i vankomycin v koncentraci 5 mg/ml dokázal eradikovat vzniklý biofilm na modelu katétru. Obě látky jsou tedy vhodné k použití infekcí spojených s katetrizací vyvolaných *S. aureus*. Podobných výsledků s daptomycinem dosáhli i Raad et al. (2007).

- *Dalbavancin*

Dalbavancin (Obr. 4) je poměrně nové glykopeptidové antibiotikum, které je díky specifické farmakokinetice (poločas je 9–12 dní) možno podávat jednou týdně. Je dobře účinný na většinu klinicky významných gram pozitivních patogenů. Raaad et al. (2005) provedli randomizovanou multicentrickou studii, kde hodnotili efekt dalbavancinu na léčbu infekcí spojených s katetrizací vyvolaných gram pozitivními bakteriemi. Pacientům byla podána jednorázová dávka 1000 mg dalbavancinu, následována za týden dávkou 500 mg. Kontrolní skupině byl podáván vankomycin 2krát denně po dobu 14 dní. Efekt dalbavancinu výrazně převyšoval léčebný efekt vankomycinu. Nežádoucí účinky byly srovnatelné pro oba typy léčby.



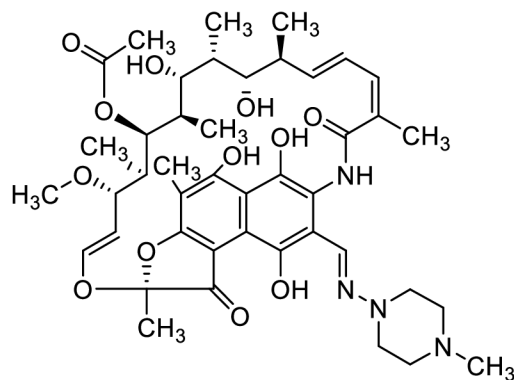
**Obrázek 4:** Strukturní vzorec dalbavancinu.

- *Televancin*

Televancin je lipoglykopeptidové antibiotikum s baktericidním účinkem proti stafylokokům. Díky své kinetice a schopnosti pronikat do bakteriálního biofilmu je vhodným adeptem na léčbu infekcí spojených s biofilmy. Gander et al. (2005) porovnávali aktivitu různých glykopeptidových antibiotik proti biofilmu *S. aureus* a koagulasa-negativním stafylokokům. Ze všech hodnocených glykopeptidů měl televancin nejvyšší aktivitu proti oběma typům stafylokoků.

- *Rifampicin*

Leite et al. (2011) porovnávali aktivitu rifampicinu (Obr. 5), daptomycinu a linezolidu proti biofilmu *S. epidermidis*. Rifampicin byl aktivní proti biofilmu v koncentraci srovnatelné s MIC. Holmberg et al. (2011) prokázali synergický efekt rifampicinu s ciprofloxacinem a linezolidem proti biofilmu *E. faecalis*. Při podání samotného rifampicinu dochází k rychlému vývoji rezistence, proto je vhodné ho podávat pouze v kombinacích.



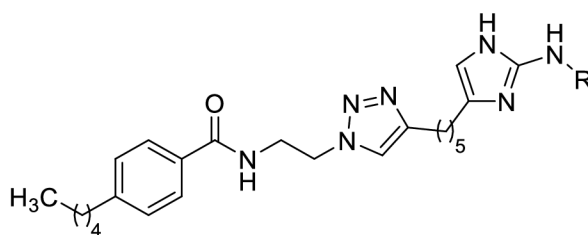
**Obrázek 5:** Strukturální vzorec rifampicinu.

### 3.4.8.5 Přírodní látky a jejich deriváty s antibiofilmovým účinkem

Je známo velké množství přírodních látek inhibujících formaci biofilmu. Následující část je zaměřena na přehled látek působících proti biofilmu *S. aureus*.

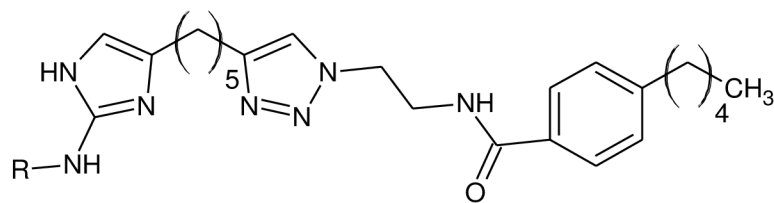
- *Imidazolové deriváty*

Imidazolové deriváty jsou produkovány řadou mořských organismů. 2-aminoimidazolová funkční skupina funguje jako strukturální analog guanidinu (sloučeniny s antibiofilmovým účinkem). Reyes et al. (2011) syntetizovali sérii triazolů (Obr. 6) a hodnotili jejich aktivitu proti MRSA. Některé z derivátů inhibovaly formaci biofilmu až z 94 %.



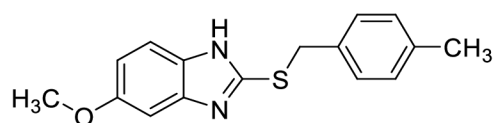
**Obrázek 6:** Obecná struktura imidazolových derivátů s antibiofilmovou aktivitou (Rabin et al., 2015).

Yeagley et al. (2013) připravili sérii substituovaných aminoimidazolů (Obr. 7) s antibiofilmovým účinkem proti MRSA. Prokázali, že deriváty s delším alkylovým řetězcem, případně substituované benzylem, mají větší aktivitu.



**Obrázek 7:** Obecná struktura amidoimidazolových derivátů s antibiofilmovou aktivitou (Rabin et al., 2015).

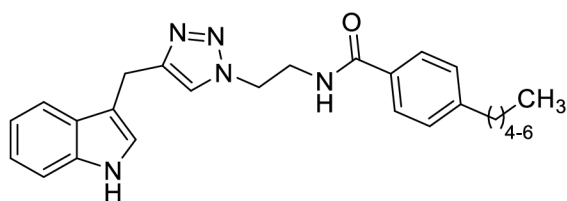
Další modifikací těchto látek jsou benzimidazoly (Obr. 8). Sambanthamoorthy et al. (2011) prokázali schopnost látky ABC-1 inhibovat formaci biofilmu MRSA.



**Obrázek 8:** Látka ABC-1 (Rabin et al., 2015).

- *Indolové deriváty*

Indol funguje jako signální molekula, která u řady bakterií ovlivňuje formaci biofilmu. Například u *E. coli* bylo prokázáno, že koncentrace 500  $\mu\text{M}$  inhibuje formaci biofilmu (Rabin et al., 2015). Minvielle et al. (2013) hodnotili indolo-triazolové deriváty (Obr. 9) z hlediska schopnosti inhibice biofilmu řady grampozitivních a gramnegativních patogenů včetně MRSA. Prokázali, že substituce indolu za benzothiofen výrazně snižuje antibiofilmovou aktivitu a adice bromu do pozice 2 dokonce vede k inverzi účinku.



**Obrázek 9:** Obecná struktura indolo-triazolových derivátů s antibiofilmovým účinkem (Rabin et al., 2015).

- *Cinchonidin a jeho deriváty*

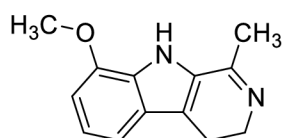
Skogman et al. (2012) hodnotili aktivitu cinchoninu, cinchonidinu a jeho derivátů z hlediska inhibice formace a eradikace biofilmu *S. aureus* ATCC 25923. Cinchonidin sám byl neaktivní, ale jeho derivát 11-trifenylsilyl-10,11-dihydrocinchonidin (11-TPSCD)



inhiboval tvorbu bakteriálního biofilmu a ve vyšší koncentraci působil eradikačně na maturovaný film.

- *Harmalin*

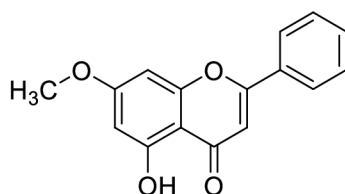
Efekt harmalinu (Obr. 10) byl studován na řadě izolátů *S. aureus*, a sice samostatně nebo v kombinaci s chlorhexidinem. Harmalin působil inhibičně na formaci biofilmů většiny izolátů v koncentracích blízkých MIC. Eradikační aktivita na maturovaný biofilm nebyla zaznamenána. Při kombinaci obou látek byl synergický efekt pozorován u 11 ze 13 hodnocených izolátů (Xing et al., 2012).



**Obrázek 10:** Strukturální vzorec harmalinu.

- *Flavonoidy izolované z Scutellaria oblonga*

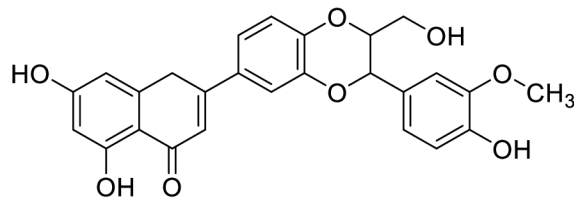
*Scutellaria oblonga* je rostlina používaná v tradiční indické medicíně. Rajendran et al. (2016) extrahovali 9 flavonoidů a hodnotili jejich antimikrobiální aktivitu na řadu bakterií včetně stafylokoků. Tři z těchto sloučenin, jmenovitě techtochrysin (Obr. 11), negletein a quercetin-3 glukosid prokázaly výraznou aktivitu a schopnost inhibovat růst biofilmu.



**Obrázek 11:** Strukturální vzorec techtochrysinu.

- *Flavonoidy hydno-karpinového typu*

Vimberg et al. (2015) připravili sérii semisyntetických flavolignanů hydno-karpinového typu. Tyto látky působily jako inhibitory formace biofilmu *S. aureus*. Hydnocapin D (Obr. 12) byl aktivní v koncentraci 32 µg/ml a působil synergicky v kombinaci s enrofloxacinem.



**Obrázek 12:** Strukturální vzorec hydnokapinu D.

- *Esenciální oleje*

Esenciální oleje jsou těkavé extrakty získávané z řady různých rostlin. Chemicky se jedná o směs látek s různým biosyntetickým původem; většinou se v oleji nachází terpeny, terpenoidy a fenylypropanové látky (Bazargani & Rohloff, 2016). V posledních letech byla publikována řada studií popisujících antimikrobiální efekt esenciálních olejů. Bazargani a Rohloff (2016) studovali efekt extraktů z *Mentha x piperita*, *Coriandrum sativum* a *Pimpinella anisum* na formaci a degradaci biofilmu *S. aureus* a *E. coli*. Nejúčinnější se ukázal extrakt z máty, který inhiboval formaci biofilmu až ze 70% v závislosti na použitém rozpouštědle.

Thymochinon je látka pocházející z rostliny *Nigella sativa*. Vykazuje baktericidní aktivitu zejména na grampozitivní koky a v koncentraci 22 µg/ml inhibuje z 50 % formaci biofilmu *S. aureus* ATTC 25923. Předpokládaným mechanismem účinku je zvýšení oxidačního stresu působícího na buňky a snížení adheze k povrchu (Chaieb et al., 2011).

Adukwu et al. (2012) studovali aktivitu esenciálních olejů získaných z *Cymbopogon flexuosus*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus bergamia*, *Citrus limon* a *Citrus paradisi* proti pěti izolátům *S. aureus*. Nejlepší aktivita proti biofilmům byla zjištěna u citronové trávy, kdy 0,06–0,125% extrakt inhiboval formaci biofilmu všech testovaných izolátů. Vliv na maturovaný biofilm nebyl zaznamenán.

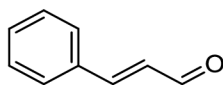
Tea tree olej (TTO) je látka známa pro svoji antimikrobiální a protizánětlivou aktivitu. Obsahuje přibližně 100 různých složek, přičemž antibakteriální aktivita je přisuzována zejména terpinen-4-olu. Přípravky s obsahem tea tree oleje se běžně používají k léčbě kožních potíží, vaginálních infekcí nebo jako dezinfekční látky (Kwiecinski et al., 2009). Je také známo, že přítomnost 5% TTO po dobu 1 hodiny vede k eradikaci biofilmu *S. aureus* (Brady et al., 2006). Kwiecinski et al. (2009) studovali kinetiku a dynamiku tohoto účinku. Prokázali baktericidní efekt TTO na planktonické buňky *S. aureus* v koncentraci 0,5 % a schopnost eradikace bakteriálního biofilmu při koncentraci 1 %.

- *Deriváty kyseliny skořicové*

Skořicový olej je esenciální olej, který je díky svému aromatu často užívaný v potravinářství. Získává se z rostlin čeledi *Lauraceae*. Existuje řada studií prokazující antibakteriální efekt skořicového oleje. Nuryastuti et al. (2009) hodnotili aktivitu skořicového oleje proti *S. epidermidis*. Skořicový olej působil antibakteriálně jak na planktonické buňky, tak na biofilm, přičemž hodnoty MIC proti planktonickým formám a proti biofilmu se lišily pouze dvojnásobně. Filoche et al. (2005) prokázali výborný antibakteriální efekt skořicového oleje na planktonické a biofilmové formy *S. mutans*, který byl synergický s chlorhexidinem.

Hlavní účinnou složkou skořicového oleje je cinnamaldehyd, viz Obr. 13 (Shan et al., 2007). Brackman et al. (2008) studovali aktivitu cinnamaldehydu a jeho derivátů proti biofilmům *Vibrio* spp. Prokázali, že látky interagují s AI-2 QS systémem tak, že snižují schopnost LuxR vázat se na DNA. To vede ke snížení virulence mikroorganismu, snížení formace biofilmu a zvýšení citlivosti k antibiotikům. Jia et al. (2011) studovali efekt cinnamaldehydu na biofilm MRSA. Aktivita byla koncentračně závislá a pro odstranění biofilmu byla nutná koncentrace rovna pětinásobku hodnoty MIC. Dále byla hodnocena exprese genu ovlivňující formaci biofilmu *sarA* v přítomnosti sub-inhibiční koncentrace cinnamaldehydu. Koncentrace rovna polovině MIC vedla ke snížení exprese genu až 140 násobně.

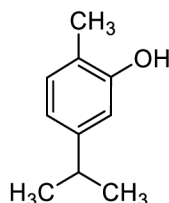
Deriváty kyseliny skořicové mají kromě antibakteriálních aktivit i řadu dalších. Cui et al (2015) studovali aktivitu derivátů cinnamaldehydu jako inhibitoru enzymu tyrosinasy. Tyrosinasa je enzym podílející se na syntéze melaninu a jeho inhibitory se používají v dermatologii a kosmetice. Nejlepší aktivitu vykazovaly látky substituované v pozici alfa.



**Obrázek 13:** Strukturní vzorec cinnamaldehydu.

- *Karvakrol*

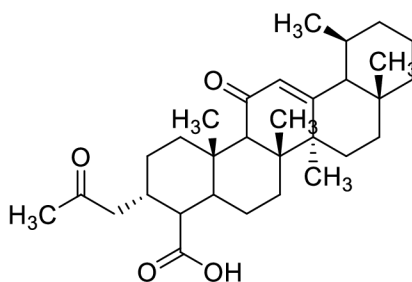
Karvakrol (Obr. 14) je součást oreganového oleje. Existuje řada studií prokazujících jeho antibakteriální aktivitu včetně účinku proti bakteriálnímu biofilmu (Nostro et al., 2007; Soni et al.; 2013; Nostro et al., 2009). Předpokládaným mechanismem účinku je interakce s QS systémem a ovlivnění produkce autoinduktorů (Rabin et al., 2015). Burt et al. (2014) prokázali, že karvakrol inhibuje quorum sensing v *Chromobacterium violaceum* v koncentracích nižších než je MIC.



**Obrázek 14:** Strukturní vzorec karvakrolu.

- *Acetyl-11-keto-β-boswelliová kyselina*

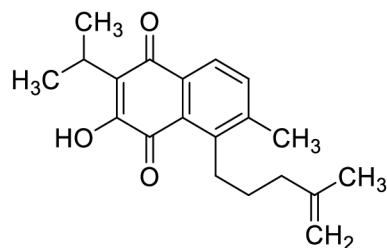
Boswelliové kyseliny jsou pentacyklické triterpeny, které se nacházejí v pryskyřici rostlin rodu *Boswellia*. Raja et al. (2011) zkoumali účinek těchto látek na souboru 112 patogenních bakterií. Jako nejaktivnější se ukázala 11-keto-β-boswelliová kyselina (Obr. 15), u které bylo provedeno podrobnější hodnocení aktivity. Látka byla aktivní v koncentraci 2–8 μg/ml na planktonické buňky a v koncentraci 8× MIC vykazovala baktericidní účinek na kmen *S. aureus* ATCC 29213 a inhibovala formaci stafylokokového biofilmu. Předpokládaným mechanismem účinku je rozrušení cytoplazmatické membrány.



**Obrázek 15:** Strukturní vzorec acetyl-11-keto-β-boswelliové kyseliny.

- *Salvipison*

Salvipison (Obr. 16) je diterpenoid vyskytující se v rostlinách rodu *Salvia*. Rózalski et al. (2007) hodnotili antibakteriální aktivitu diterpenů izolovaných z kořene *S. sclarea* na souboru mikroorganismů. Největší aktivita byla dosažena u salvipisonu, který měl bakteriostatický účinek na *S. aureus* ATCC 29213 při koncentraci 18,75 μg/ml a při stejné koncentraci inhiboval formaci biofilmu. Působil i proti formaci biofilmu *E. faecalis* ATCC 29212. Ostatní terpeny, aethiopin, 1-oxothiopin a ferruginol vykazovaly výrazně nižší a v případě poslední jmenované látky, dokonce nulovou antibakteriální aktivitu. Mechanismus účinku salvipisonu není známý, spekuluje se o povrchové aktivitě nebo o interferenci s QS.



**Obrázek 16:** Strukturální vzorec salvipisonu.

- *Tanin a gallotaniny*

Taniny (třísloviny) jsou sekundární metabolity patřící do skupiny polyfenolických látek. Dělí se na hydrolyzovatelné a kondenzované. Payne et al. (2013) studovali efekt polyfenolu taninu na formaci biofilmu *S. aureus*. Ukázalo se, že *isaA* mutanty nejsou k taninu citlivé, látka tedy působí interakcí s transglykosylasou IsaA.

Gallotaniny jsou hydrolyzovatelné taniny skládající se z glukosy, na níž jsou esterově navázány zbytky kyseliny gallové (Engels et al., 2011). Gallotaniny jsou schopné vytvářet komplexy se železem, které je nutné pro řadu metabolických procesů probíhajících v bakteriálních buňkách. Řada bakterií proto produkuje tzv. siderofory, což jsou nízkomolekulární přenašeče schopné vázat  $Fe^{3+}$  a po řadě redukčních reakcí ho bakterie může využívat (Engels et al., 2011). Engels et al (2010) separovali jednotlivé gallotaniny z *Mangifera indica* a studovali jejich antibakteriální aktivitu. Afinity k železnatým a železitým iontům byla přímo úměrná počtu galloyl substituentů, což je v souladu s teorií, že za chelatační aktivitu látek zodpovídají  $\alpha$ -hydroxyfenylové skupiny. Na druhou stranu, antimikrobiální aktivita nezávisela na stupni gal-substituce. To značí, že chelatace železa má vliv na antibakteriální aktivitu, není ale jediným mechanismem účinku (Engels et al., 2010).

Bag et al. (2013, 2017) publikovali dvě studie zabývající se antimikrobiální aktivitou gallotaninu 1,2,6-tri-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukopyranosy izolovaného z *T. chebula* proti multirezistentní *E. coli*. Sloučenina působila synergicky v kombinaci s gentamicinem a trimethoprimem a aditivně v kombinaci s amoxicilinem, ciprofloxacinem a ceftazidinem (Bag et al., 2013). Látka byla schopna eradikovat preformovaný biofilm *E. coli* a zároveň působit synergickou antibiofilmovou aktivitou v kombinaci s gentamicinem a trimethoprimem (Bag et al., 2017). Xie et al. (2008) studovali aktivitu extraktu z *Galla Chinensis* (*Rhus chinensis*) proti *in vitro* modelu zubního plaku sestávajícího z *S. sanguis*, *S. mutans*, *Actinomyces naeslundii* a *L. rhamnosus*. Tvorba biofilmu po přidání extraktu v koncentraci 4  $\mu$ g/ml a 24 mM sukrosy byla signifikantně nižší než při přidání čisté sukrosy

(Xie et al., 2008). Yin et al. hodnotili aktivitu extraktu z čaje jako inhibitoru *quorum sensing* u *Ch. violaceum* a *P. aeruginosa*. V koncentraci nižší než MIC extrakt inhiboval produkci violaceinu u *Ch. violaceum* a faktory virulence u *P. aeruginosa*. Efekt proti *P. aeruginosa* byl hodnocen i *in vivo*, na modelu infikované kožní rány myši. Extrakt významně snižoval bakteriální kolonizaci rány po 3 a 6 dnech od infekce. (Yin et al., 2015).

### **3.5 Metody pro kultivaci biofilmů**

Neexistuje standardizovaná metodika pro hodnocení formace, inhibice a eradikace biofilmu. V laboratorní praxi se užívá řada technik pro kultivaci biofilmu a jeho následné vyhodnocení, z nichž každá má jiné přednosti a limitace. Následující kapitola shrnuje nejběžnější metody kultivace biofilmu a jeho kvantitativní analýzu. Popisované metody budou zaměřeny především na stafylokoky, jakožto hlavní mikroorganismus použitý v experimentální části práce.

#### **3.5.1 Kultivace biofilmu na mikrotitrační destičce**

Kultivace biofilmu na mikrotitrační destičce je asi nejčastěji používaná metoda. Základními kroky kultivace biofilmu je příprava inokula, inokulace mikrotitrační destičky, kultivace, promývání, fixace, vizualizace biofilmu a jeho vyhodnocení.

Metoda byla vyvinuta v roce 1977 a sloužila pro studium uchycení bakterií v závislosti na čase a teplotě inkubace (Fletcher, 1977). Při této metodě je měřena veškerá bakteriální biomasa přichycená na dně a stěnách jamek. Vzhledem ke způsobu inkubace může ale část bakteriální biomasy vznikat pouhou sedimentací bakteriálních buněk na dno jamky (Azeredo et al., 2017; Ceri et al., 1999). Tento problém lze vyřešit použitím tzv. Calgary metody, která je popsána dále.

Metodika pro kultivaci biofilmu na destičce není standardizovaná a jednotlivé kroky se tam mohou lišit dle autora. Odlišnosti bývají zejména v koncentraci inokula, délce inkubace, technice promývání. Stepanovic et al. (2007) shrnul tyto odlišnosti u stafylokokového biofilmu.

##### **3.5.1.1 Inokulum**

Prvním krokem pro přípravu biofilmu je kultivace inokula, které se použije k zaočkování destičky. Je možné použít pevné nebo tekuté kultivační médium, přičemž častěji se v literatuře setkáváme s médiem tekutým (Stepanović et al., 2007). Obvykle se používá tryptický sójový bujón (*trypticase soy broth*, TSB) nebo Brain Heart bujón (BHI) s přídavkem různých koncentrací jednoduchých cukrů, většinou glukosy v koncentraci 0,25-4 %

(Stepanović et al., 2007; Knobloch et al., 2002). Délka inkubace bývá obvykle přes noc, což odpovídá cca. 18 h (Stepanović et al., 2007; Knobloch et al., 2002) nebo do určité fáze růstového cyklu bakterie (Merrit et al., 2011). Knobloch et al. (2002) srovnali rozdíl v kultivaci bakteriálního biofilmu v TSB a BHI s různými koncentracemi glukosy. Neprojevilo se signifikantní rozdíl při kultivaci v BHI a TSI, tvorba biofilmu byla ale silně stimulována přítomností glukosy nebo sukrosy v koncentraci 2 %.

Připravené inokulum může obsahovat shluky bakterií. Pokud by byla tímto inokulem zaočkována mikrotitrační destička, mohlo by dojít ke vzniku falešně pozitivních výsledků. Inokulum je tedy třeba před použitím řádně homogenizovat. Někteří autoři tento proces nepovažují za dostatečný a doporučují inokulum připravovat v médiu bez přítomnosti cukrů a tím zabránit vzniku těchto shluků. Médium obohacené o cukry se poté použije pouze na inkubaci v destičce (Stepanović et al., 2007).

Je známo, že koncentrace inokula výrazně ovlivňuje sílu vzniklého biofilmu. Stepanović et al. (2007) doporučují koncentraci počátečního inokula asi  $10^8$  CFU/ml, což odpovídá zákalu 0,5 McFarland. Toto inokulum se poté ředí 1:1000, čímž se dosáhne výsledné koncentrace  $10^5$  CFU/ml.

### **3.5.1.2 Kultivace biofilmu**

Připravené inokulum se použije k zaočkování mikrotitrační destičky obsahující vhodné kultivační médium. Jak již bylo uvedeno výše, je nutno dbát na přesnou koncentraci inokula. Jelikož je tvorba biofilmu vysoce citlivá na rozdílné *in vitro* podmínky, pro minimalizaci chyb a zajištění replikovatelných a spolehlivých výsledků je třeba provádět každý test minimálně ve dvou jamkách a toto testování opakovat minimálně ve třech na sobě nezávislých experimentech. Pro negativní kontrolu by mělo být vyhrazeno nejméně 6 jamek destičky (Stepanović et al., 2007).

Doba inkubace je velice důležitá, jelikož se od ní odvíjí denzita vzniklého biofilmu. Nejčastěji se inkubuje 24 hodin, někteří autoři ale upřednostňují inkubaci po dobu 48 hodin (Stepanović et al., 2007; Leitch et al., 1999) i 72 hodin (Tote et al., 2008).

### **3.5.1.3 Promývání**

Po inkubaci je nutno obsah jamek odstranit a jamky promýt fyziologickým roztokem o pokojové teplotě. Správné promytí je velice důležité, neboť musí být beze zbytku odstraněny neadherované buňky, ale zároveň nesmí dojít k poškození vzniklého biofilmu. Kritickými body jsou počet promytí a metoda promytí. Malý počet promytí vede ke vzniku

falešně negativních výsledků a naopak. V literatuře se obvykle provádí promytí 2krát až 4krát. Dle Stepanovice je doporučeno minimálně trojitě promytí (Stepanović et al., 2007).

Promytí je možné provádět promývacím robotem. Tato metoda je velice šetrná, může ale vést ke vzniku falešně pozitivních výsledků. Jiní autoři používají k promývání pipetu, nebo ponoření destičky do nádoby s fyziologickým roztokem obsahující fosfátový pufr (PBS). K vyprázdnění destičky je poté třeba použít prudký pohyb, aby došlo k odstranění veškerého obsahu jamek (Stepanović et al., 2007). Jelikož každá metoda promývání má jiný efekt na vzniklý biofilm, je třeba dodržovat stále stejný postup z důvodu reprodukovatelnosti výsledků (Azeredo et al., 2017).

#### **3.5.1.4 Fixace**

Po promytí se přichycený biofilm fixuje, a to za použití horkého vzduchu, případně methanolu (Stepanović et al., 2007). Někteří autoři fixaci vynechávají (O'Toole, 2011; Merrit et al., 2011).

#### **3.5.1.5 Barvení**

Barvení slouží k vizualizaci a následné kvantifikaci vzniklého biofilmu. Původní metoda byla popsána již v roce 1985 (Christensen et al., 1985). Při této metodě se hodnotí biofilm vzniklý pouze na dně jamky. Modifikovaná metoda (Stepanović et al., 2000) zahrnuje rozpuštění obarveného biofilmu a měří i biofilm vzniklý na stěnách jamek. Běžně se používá druhá metoda.

Délka barvení se opět liší autor od autora, běžně se setkáme s rozpětím 30 sekund až 30 min. Pro dostatečný průnik do biofilmu by měla stačit délka barvení 15 minut (Stepanović et al., 2007). Chemické typy vizualizace biofilmu jsou podrobněji popsány v kapitole 3.6.3.

#### **3.5.1.6 Vyhodnocení biofilmu**

Po obarvení filmu je třeba barvivo pečlivě odstranit a desku opět promýt. Pro odleptání vzniklého filmu se používá ethanol, 33% kyselina octová nebo methanol (Stepanović et al., 2007).

Optická denzita každé jamky se měří pomocí spektrofotometru. Dle Stepanovice je doporučená vlnová délka 570 nm pro krystalovou violet, lze se ale setkat s délkami v rozmezí 550–600 nm (O'Toole, 2011, Merrit et al., 2011.).



### **3.5.2 Calgary metoda**

Jak již bylo uvedeno výše, při klasické kultivaci biofilmu v mikrotitrační destičce je část vzniklé masy způsobena prostou sedimentací, nikoliv formací biofilmu. Ceri et al. v roce 1999 publikovali novou metodu pro kultivaci biofilmu, tzv. Calgary Biofilm Device. Při této metodě se biofilm tvoří na víčku s trny. Tyto trny vyčnívají do jamek obsahujících kultivační médium a bakterie. Tímto je zajištěno, že vzniklá masa buněk je pouze formovaný biofilm a ne sedimentované planktonické buňky (Ceri et al., 1999; Azeredo et al., 2017).

Vzniklý biofilm je poté z trnů uvolněn sonifikací a absorbance je měřena spektrofotometricky při 650 nm. Film vzniklý na jednotlivých trnech je ekvivalentní a tato metoda je tedy vhodná pro testování antibiofilmového účinku potenciálních chemoterapeutik (Ceri et al., 1999).

### **3.5.3 Biofilm ring test**

Tento test je založen na schopnosti bakterií imobilizovat paramagnetické mikrokuličky tvorbou biofilmu na jejich povrchu. Bakteriální suspenze se smísí s paramagnetickými kuličkami a inkubuje v mikrotitrační destičce. Po inkubaci se jamky pokryjí inertním olejem, který umožňuje vyhodnocení destičky na speciálním readeru. Poté se destička umístí na blok sestávajících z magnetů umístěných pod každou jamkou. Kuličky, které nejsou pokryty biofilmem, se vlivem magnetismu hromadí ve středu jamky a vytváří černý kroužek; kuličky pokryté biofilmem zůstávají na svém místě (Azeredo et al., 2017).

Výhodou této metody je možnost vyhodnocení výsledků v různých časových intervalech bez ovlivnění dalšího růstu biofilmu. Není třeba žádného promývání ani barvení a výsledky mohou být hodnoceny v řádu několika hodin. Metoda je vhodná pro hodnocení kinetiky formace biofilmu a možnosti jejího ovlivnění antibakteriálními látkami (Azeredo et al., 2017; Olivares et al., 2015).

### **3.5.4 Robbinsovo zařízení**

Originální Robbinsovo zařízení bylo zkonstruováno Jimmym Robbinsem a Billem McCoyem. Skládá se z trubice s několika závitovými otvory s písty. Písty mohou být jednotlivě vyjmuty a hodnoceny. Toto zařízení bylo používáno pro studium formace biofilmu v zařízeních na pitnou vodu (Azeredo et al., 2017).

Modifikované Robbinsovo zařízení je akrylátová trubice s 25 odběrovými otvory. Trubicí prochází kultura v exponenciální růstové fázi, čímž dojde k inokulaci, a poté prochází

médium. Biofilm vyvíjející se v průběhu času může být odebrán odběrovými otvory. Pohyblivá kapalná fáze způsobuje zpětné uvolnění buněk z vyvíjejícího se biofilmu zpět do média, a tyto buňky mohou být také studovány (Kharazmi, 1999).

Toto zařízení slouží zejména k porovnání vlastností planktonických buněk a buněk vytvářejících biofilm a ke zkoumání odpovědi bakteriálního biofilmu na přítomnost antibakteriálních látek (Kharazmi, 1999).

### **3.5.5 Drip flow biofilm reaktor**

Tento přístroj byl vyvinut na universitě v Montaně. Reaktor se skládá ze čtyř paralelních komor a víček s ventily. Každá komora obsahuje planžetu, kde se formuje biofilm. Růstové médium nebo bakteriální inokulum vstupuje do každé komory jehlou prostupující víčkem. Reaktor je během kultivace biofilmu nakloněn asi o 10°, což umožňuje kultivačnímu médiu procházet přes celou délku planžety. (Azeredo et al., 2017; Schwartz et al., 2010; Goeres et al., 2009). Výhoda tohoto zařízení je zejména malý rozměr, simultánní použití různých povrchů pro kultivaci biofilmu a možnost neinvazivního vyhodnocení. Nevýhody spočívají v limitovaném množství vzorků a zejména heterogenitě výsledků z důvodu hydrodynamických jevů (Azeredo et al., 2017).

### **3.5.6 Rotační biofilmový reaktor**

Existují tři hlavní typy rotačních biofilmových reaktorů, a to je rotační kruhový reaktor, rotační diskový reaktor a koncentrický cylindrický reaktor. Jejich hlavní výhodou je to, že stříhové napětí ovlivňující vznikající biofilm je relativně stabilní a zároveň je možné ho měnit a tím testovat jeho vliv na vznik biofilmu. Další výhodou je nezávislost rychlosti rotace na vstupu růstového média do reaktoru. Vliv rychlosti prostupu média a vliv rotace tak může být hodnocen nezávisle na sobě. Nevýhodou je nemožnost testovat více druhů bakterií současně, protože každá bakterie vyžaduje jiné kultivační podmínky. Vzhledem k tomu, že je zařízení částečně otevřené, může docházet ke kontaminacím (Azeredo et al., 2017).

Rotační kruhový reaktor se skládá ze stacionárního vnějšího válce a rotačního vnitřního válce. Frekvence rotace je řízena motory. Biofilm se vyvíjí na planžetách. Používá se například pro výzkum biofilmů vznikajících v systémech na pitnou vodu a říčních ekosystémech.

Rotační diskový reaktor obsahuje disk, na který lze přichytit několik planžet. Míchání je zajištěno magnetem a magnetických míchadlem. Stříhové napětí na planžetách se

mění v závislosti na vzdálenosti od středu disku. Různým umístěním planžet tak lze testovat vliv různého stříhového napětí na vznik biofilmu. Tento reaktor se používá na testování rezistence a vývoj nových antibiofilmových látek (Azeredo et al., 2017).

Koncentrický válcový reaktor se skládá ze čtyř válců, které mohou rotovat různou rychlostí. Toto uspořádání umožňuje simultánní testování při různých stříhových napětích.

Schwartz et al. (2010) porovnali použití drip flow reaktoru a rotačního diskového reaktoru při kultivaci biofilmu *S. aureus*. Drip flow reaktor se ukázal jako vhodná metoda pro studie, kde je třeba získat větší množství biofilmové masy. Rotační diskový reaktor naopak zajistil vývin mnoha identických biofilmů, a proto je vhodný pro testování antimikrobiálních látek a rezistence.

### **3.6 Metody pro hodnocení biofilmů**

#### **3.6.1 Mikrobiologické a molekulární metody**

Jedna z nejrozšířenějších metod pro stanovení životaschopnosti buněk biofilmu je stanovení CFU na agaru. Jedná se o jednoduchou a levnou metodu, která má ale řadu omezení. Vykultivované buňky nemusí odpovídat počáteční populaci a některé biofilmové subpopulace nemusí být kultivovatelné (Azeredo et al., 2017; Jackson et al., 2014; Trulear & Characklis, 1982).

Z molekulárních metod lze použít metodu polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Problémem může být nadhodnocení výsledků z důvodu extracelulární DNA a DNA uvolněné z mrtvých buněk. Tomuto problému lze předejít přidáním propidium monoazidu. Tato látka se dostává pouze do buněk s poškozenou membránou, váže se na DNA a toto DNA poté není schopná amplifikační reakce při PCR (Azeredo et al., 2017).

#### **3.6.2 Fyzikální metody**

Asi nejjednodušší metodou pro stanovení celkové biofilmové biomasy je prosté zvážení kultivačního zařízení před kultivací a po kultivaci a vysušení. Další možností je fyzické odstranění biofilmu z kultivačního zařízení a jeho zfiltrování a zvážení. Tím ovšem může dojít ke ztrátám z důvodu neúplného odstranění biofilmu nebo ztráty během filtrace (Azeredo et al., 2017).

Elektrochemická impedanční spektroskopie je metoda, kterou lze určit elektrické vlastnosti studovaného systému. Lze ji použít pro nepřímé stanovení biofilmové biomasy.

Princip metody je ve stanovení změn difuzního koeficientu, který závisí na tloušťce biofilmu (Azeredo et al., 2017; Dominguez-Benetton et al., 2012)

Dalšími fyzikálními metodami, které lze použít pro kvantitativní stanovení biofilmového růstu je například ultrazvuk, rentgenové záření nebo nukleární magnetická resonance (Azeredo et al., 2017).

### 3.6.3 Chemické metody

Chemické metody spočívají v použití barviv, které se vážou nebo absorbují na složky biofilmu. Nejčastěji užívaná je metoda s krystalovou violetí, která je popsána níže v kapitole 4.4.7. Krystalová violet' barví živé i mrtvé buňky, proto je vhodná pro stanovení celkové biomasy. Výhodou této metody je zejména její univerzální použití, jelikož ji lze použít na bakteriální biofilmy stejně jako na kvasinkové, a možnost otestovat velké množství vzorků v krátkém čase. Nevýhodou je zejména ztráta biofilmové biomasy při promývání a neexistence standardizovaného postupu, což znesnadňuje srovnání výsledků dosažených různými autory (Azeredo et al., 2017).

Pokud potřebujeme rozlišit životaschopné buňky od buněk neživých, je třeba zvolit jinou metodu barvení. Mezi nejčastěji užívané patří různé tetrazoliové soli. 2,3-bis(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-5-[(fenylamino)karbonyl]-2H-tetrazolium hydroxid neboli XTT se v prostředí živých buněk oxiduje na ve vodě rozpustný formazan. Určení životaschopných buněk se stanoví spektrofotometricky. Metoda se běžně užívá ke stanovení životaschopnosti planktonických kultur (Peeters et al., 2008).

Dalším barvivem používaným pro hodnocení životaschopnosti biofilmu je resazurin neboli Alamar Blue. Tento modrý indikátor se v přítomnosti živých buněk redukuje na růžový fluorescentní resorufin. Výhodou této látky v porovnání s tetrazoliovými solemi je možnost vizuálního hodnocení, bez nutnosti použití spektrofotometru. Resazurin je navíc levnější a není toxický pro eukaryotické buňky (Azeredo et al., 2017).

Životaschopné buňky jsou také schopné přeměňovat bezbarvý fluorescein-diacetát (FDA) na žlutý fluorescentní fluorescein. Tato látka se používá jak pro hodnocení celkové biomasy biofilmů, tak pro stanovení bakterií v půdě (Peeters et al., 2008; Honraet et al., 2006.)

1,9-dimethylový derivát methylenové modře (DMMB) je barvivo užívané pro kvantifikaci sirných polysacharidů, zejména glukosaminoglykanů, v biologických vzorcích, například v moči nebo v nádorech. Hlavním komponentem biofilmové matrix

*S. aureus* je polychasacharidový intracelulární adhezin (PIA), která se skládá z *N*-acetylglukosaminových jednotek spojených vazbou  $\beta$ -1,6. Vzhledem ke strukturní podobnosti PIA a glukosaminoglukanů Tote et al. (2008) předpokládali, že by se tato metoda dala použít k vizualizaci stafylokokového biofilmu. Optimalizovali metodu a prokázali její vhodnost pro studium stafylokokového biofilmu. Vzhledem k tomu, že DMMB se váže pouze na PIA, se jedná o velice specifickou metodu. Další výhodou je časová nenáročnost; vyhodnocení trvá méně než dvě hodiny. Metodu lze díky specifickému mechanismu účinku využít pro testování synergické aktivity potenciálních antibakteriálních látek.

Syto9 je barvivo vázající se na DNA živých i neživých buněk. Jelikož extracelulární matrix biofilmu obsahuje také DNA, stanovení pomocí Syto9 dává informaci o celkové biofilmové biomase. Nevýhodou je vysoká cena (Peeters et al., 2008).

Peeters et al. (2008) také srovnali 6 metod pro hodnocení bakteriálního biofilmu; a sice metodu s krystalovou violetí, resazurinem, XTT, DMMB, FDA a Syto9. Všechny zkoumané metody byly vhodné pro většinu bakteriálních izolátů použitých při testování. Metoda s krystalovou violetí nebyla ideální pro hodnocení biofilmu *P. aeruginosa*, neboť byl pozorován velký rozptyl výsledků.

#### **3.6.4 Mikroskopické metody**

Existuje řada mikroskopických metod využitelných pro hodnocení nárůstu biofilmu. Nejběžnější a nejjednodušší je použití světelného mikroskopu, které umožňuje vizuální identifikaci biofilmu a jeho kvantitativní stanovení. Nevýhodou je omezené rozlišení. Konfokální laserová skenovací mikroskopie umožňuje studovat prostorovou strukturu biofilmu a při použití vhodného barviva, jako je například Syto9 nebo propidium jodid i odlišit životaschopné buňky od mrtvých (Azeredo et al., 2017).

Pro hodnocení antibiofilmové aktivity je nejvhodnější skenovací elektronová mikroskopie (SEM). Tato metoda prakticky umožňuje 3D pozorování vzorku, což se jeví jako užitečné pro porozumění jeho povrchové struktury a přítomnosti exopolysacharidů. Je možné pozorovat vzorky od velikosti 50 nm s 20–30 000 násobným zvětšením. Nevýhodou je velká časová náročnost na přípravu vzorku. Alternativou ke klasické SEM je kryometoda, která ušetří dlouhé zpracování vzorku nutné při SEM (Azeredo et al., 2017).

## 4 Experimentální část

### 4.1 Hodnocené látky

V rámci disertační práce byla hodnocena protiinvazivní aktivita 6 strukturně odlišných skupin sloučenin, jejichž podrobné charakteristiky jsou uvedeny v příslušných oddílech experimentální části.

- *N*-cinnamamidy byly připraveny Dr. Strhárskym a Dr. Kosem na Farmaceutické fakulte UK v Bratislavě
- dibazické karbamáty syntetizované prof. Csölleiem a charakterizované doc. Malíkem z Farmaceutické fakulty UK v Bratislavě
- *N*-fenylpiperaziny připravené Dr. Čurillovou a doc. Malíkem z Farmaceutické fakulty UK v Bratislavě, a Dr. Marvanovou z Farmaceutické fakulty VFU Brno
- deriváty thiosemikarbazonů připravené Dr. Rejmund a prof. Musiolem z Chemického ústavu Slezské univerzity v Katovicích
- Schiffovy baze odvozené od chinazolinonu a jejich měďnaté komplexy připravené Dr. Hricovíniovou z Chemického ústavu Slovenskej akademie vied
- deriváty gallotaninů připravené Dr. Hricovíniovou z Chemického ústavu Slovenskej akademie vied

### 4.2 Použité mikroorganismy

Antimikrobiální aktivita byla stanovena pro grampozitivní bakterie z rodu *Staphylococcus* a *Enterococcus*, 4 druhy mykobakterií, gramnegativní bakterie *E. coli* a *P. aeruginosa*, kvasinky rodu *Candida* a rostlinné patogeny *Bipolaris sorokiniana* a *Fusarium avenaceum*. Jejich podrobnější charakteristika je uvedena v Tabulce 1.

Účinek proti stafylokokům byl hodnocen na referenčním kmeni *S. aureus* ATCC 29213 a třech methicilin rezistentních izolátech MRSA 63718 (Vančatová, 2012), MRSA SA 3202 a MRSA SA 630 (Nübel, 2010).

Izoláty vankomycin-rezistentních *Enterococcus faecalis* nesoucích gen *vanA* byly izolovány z trusu amerických vran (Oravcová et al., 2014). Izoláty byly označeny jako VRE 342 B, VRE 368 a VRE 725 B. Jako referenční kmen citlivý k vankomycinu byl použit kmen *E. faecalis* ATCC 29212.

Jako zástupce rychle rostoucích netuberkulózních mykobakterií byla použita *Mycobacterium smegmatis*, pomalu rostoucí mykobakterie byly zastoupeny *M. kansasii*

a *M. marinum*. Jako modelový organismus pro studium antituberkulózního účinku byl použit *M. tuberculosis* H37Ra.

Pro hodnocení antimalarického účinku vybraných sloučenin byl použit modelový organismus *Plasmodium berghei*.

**Tabulka 1:** Přehled použitých mikroorganismů.

<b>Mikroorganismus</b>	<b>Specifikace</b>	<b>Zdroj</b>	<b>Reference</b>
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	Referenční kmen	www.atcc.org
MRSA	63718	Klinický izolát, VFU Brno	Vančatová, 2012
MRSA	SA 630	Klinický izolát, VFU Brno	–
MRSA	SA 3202	Klinický izolát, VFU Brno	–
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	Referenční kmen	www.atcc.org
VRE	342B	Izolát z prostředí	Oravcová et al., 2014
VRE	368	Izolát z prostředí	Oravcová et al., 2014
VRE	725B	Izolát z prostředí	Oravcová et al., 2014
<i>M. smegmatis</i>	ATCC 700084	Referenční kmen	www.atcc.org
<i>M. kansasii</i>	DSM 44162	Klinický izolát	https://www.dsmz.de
<i>M. marinum</i>	CAMP 5644	Klinický izolát	–
<i>M. tuberculosis</i>	H37Ra	Referenční kmen	www.atcc.org
<i>E. coli</i>	–	Laboratorní izolát, VFU Brno	–
<i>Ch. violaceum</i>	–	Referenční kmen	www.atcc.org
<i>P. aeruginosa</i>	1166	Laboratorní izolát, VFU Brno	–
<i>C. albicans</i>	CCM 8261	Sbírkový izolát, Česká sbírka mikroorganismů	https://www.sci.muni.cz/ccm /
<i>C. krusei</i>	CCM 8271	Sbírkový izolát, Česká sbírka mikroorganismů	https://www.sci.muni.cz/ccm /
<i>C. parapsilosis</i>	CCM 8260	Sbírkový izolát, Česká sbírka mikroorganismů	https://www.sci.muni.cz/ccm /
<i>Bipolaris sorochiana</i>	Sacc. Shoemaker H299	Klinický izolát	NCBI GenBank
<i>Fusarium avenaceum</i>	Sacc. IMI 319947	Klinický izolát	NCBI GenBank
<i>Plasmodium berghei</i>	Luci		Prudencio et al., 2011

## 4.3 Pomůcky a materiál

### 4.3.1 Kultivační média, roztoky a chemikálie

- Mueller-Hinton bujón s kationty - CaMH (Oxoid, Velká Británie)
- Mueller-Hinton agar- MHA (Oxoid, Velká Británie)
- Brain-Heart bujón - BHI (Oxoid, Velká Británie)
- 7H9 Midlebrook bujón s přidavkem OAD (Difco, USA)
- 7H10 Midlebrook agar s přidavkem OADC (Difco, USA)
- Tryptický sojový bujón s přidavkem 2,5 % glukosy – TSB+glu (Oxoid, Velká Británie)
- RMPI-1640 médium (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- YNB médium (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Kyselina [3-(*N*-morfolino)]propansulfonová (Sigma-Aldrich, Velká Británie)
- Sabouradův dextrózový agar (Oxoid)
- LB médium -Lysogeny broth (Microtrade, Maďarsko) s přidavkem 0,5 % kvasnicového extraktu (Scharlau, Španělsko) a 0,1 % NaCl (Reanal, Maďarsko)
- Kryoprotektivní médium (Oxoid, Velká Británie)
- Sterilní destilovaná voda
- Fyziologický roztok (PBS)
- Krystalová violet' (Penta, Česká republika)
- Ledová kyselina octová (Penta, Česká republika)
- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid – MTT (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Alamar Blue (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Luciferasa (Biotium, USA)

Všechna kultivační média a roztoky byla připraveny na základě pokynů výrobce a vysterilizována.

### 4.3.2 Roztoky konvenčně užívaných antimikrobiálních látek

- ampicilin 160 µg/ml (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- ciprofloxacin 5120 µg/ml (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- isoniazid 2560 µg/ml a 1000 µg/ml (Sigma-Aldrich, Velká Británie)
- oxacilin 5120 µg/ml (Sigma-Aldrich, Česká republika)



- pyrazinamid 2560 µg/ml (Sigma-Aldrich, Velká Británie)
- tetracyklin 1024 µg/ml (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- vankomycin 50000 µg/ml (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- gentamicin 40000 µg/ml (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- benomyl 1000 µg/ml (Chinoin, Maďarsko)
- amfotericin B 32 µg/ml (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- 5-flucytosin 1024 µg/ml (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- streptomycin 1 µg/ml (Sigma-Aldrich, Velká Británie)

Antimikrobiální látky byly připraveny rozpuštěním příslušné hmotnosti v deionizované vodě. Pro rozpuštění tetracyklinu byl použit 1 ml ethanolu a následně bylo přidáno 24 ml deionizované vody.

### 4.3.3 Pomůcky

- Multikanálová pipeta Pipetman concept (Gilson, Francie)
- Mikropipety (Gilson, Francie)
- Špičky pro mikropipety (Dispolab, Česká republika)
- Plastové Petriho misky (Dispolab, Česká republika)
- Sterilní vatové tampony, inokulační kličky (Dispolab, Česká republika)
- Denzila zkumavky (Dispolab, Česká republika)
- Multiinokulátory (1–2 µl a 5–10 µl)
- Jednorázové latexové rukavice (Dispolab, Česká republika)
- Plastové zkumavky (Dispolab, Česká republika)
- Sterilní plastové kličky (Dispolab, Česká republika)
- Mikrotitrační destičky typu U s víčky, 96 jamek (Dispolab, Česká republika)
- Mikrotitrační destičky 386 jamek (Sigma-Aldrich, Velká Británie)
- Stojany pro zkumavky (Dispolab, Česká republika)
- Zkumavky typu Eppendorf (Dispolab, Česká republika)
- Běžné laboratorní sklo

### 4.3.4 Přístroje

- Fotometr (Densi-La-Meter, LIAP, Lotyšsko)
- Laboratorní váhy Kern 440 (Ecotech, Česká republika)

- Laminární box II. bezpečnostní třídy Herasafe KS (Thermo Scientific, USA)
- Lednice (Liebherr, Německo), mrazicí box (Gorenje, Slovinsko)
- Sterilizátor parní horizontální OT 18B/23B (Nüve SteamArt, Turecko)
- Termostat Sanyo MIR-153 (Sanyo, Japonsko)
- Třepačka Yellow line OS 5 basic (Biotech, Česká republika)
- Vortex MS 2 Minishaker (IKA-WORKS, USA)
- Spektrofotometr Tecan Infinite200Pro (Tecan, Švýcarsko).

## 4.4 Metodika

### 4.4.1 Stanovení minimální inhibiční aktivity (MIC)

Minimální inhibiční aktivita je nejnižší koncentrace látky, která inhibuje nárůst daného mikroorganismu. Existuje řada metod určených pro hodnocení MIC. Nejběžnější je diluční metoda v mikrotitrační destičce, která byla použita i v této práci.

Hodnocené látky byly rozpuštěny v DMSO na koncentraci 10 mg/ml. V 96 jamkové destičce byly poté látky ředěny v kultivačním médiu tak, že finální koncentrace látek byla v rozsahu 256–2 µg/ml. Pokud bylo třeba dosáhnout nižších koncentrací, pokračovalo se stejným způsobem v další destičce až do koncentrace 0,008 µg/ml.

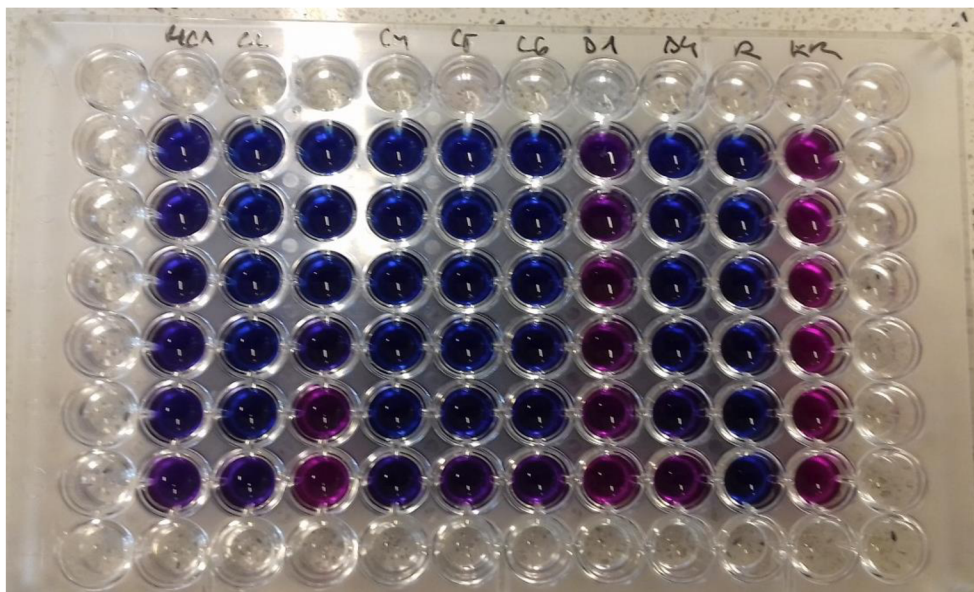
Konkrétní postup závisel na hodnoceném mikroorganismu. Pro rody *Staphylococcus*, *Pseudomonas* a *Escherichia* byl použit CaMH, pro enterokoky BHI, pro mykobakterie Midlebrook 7H9.

Bakteriální inokulum pro zaočkování destičky gram-positivními a gram-negativními bakteriemi bylo připraveno z 24 hodin staré kultury na krevním agaru. Destička byla zaočkována inokulem pomocí multiinokulátoru tak, že finální koncentrace bakteriálních buněk v každé jamce byla  $5 \times 10^5$  CFU/ml. Destička byla poté inkubována v termostatu po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Hodnota MIC byla odečtena jako nejnižší koncentrace látky, která vizuálně inhibovala 100 % růstu daného mikroorganismu. Jako pozitivní kontrola byl použit ciprofloxacin a ampicilin (případně vankomycin), jako negativní kontrola jamka bez přítomnosti antibakteriální látky. Hodnocení bylo provedeno minimálně ve třech na sobě nezávislých opakováních.

Pro všechny použité mykobakterie s výjimkou *Mycobacterium tuberculosis* byla použita stejná metoda inokulace, jako pro gram-positivní bakterie. Mikroorganismy pro přípravu inokula byly inkubovány na agaru 7H110, a to 2 dny při 37 °C pro *M. smegmatis*, týden při 37 °C pro *M. kansasii* a dva týdny při 28 °C pro *M. marinum*.

Po inokulaci byly destičky inkubovány v termostatu po dobu 3 dny, týden a tři týdny dle druhu bakterie. Hodnocení bylo prováděno vizuálně a jako pozitivní kontrola byl použit ciprofloxacin a isoniazid.

*M. tuberculosis* je mykobakterie obtížně rostoucí na pevném médiu, proto byla pro přípravu inokula použita kultura narostlá do exponenciální růstové fáze v bujonu Middlebrook 7H9. Inokulum bylo upraveno na zákal 1 McFarland, což odpovídá asi  $3 \times 10^8$  CFU/ml, a poté ředěno 1:10 v bujonu. Destička byla očkovaná pomocí pipety, a to tak, že do každé jamky bylo k 100  $\mu$ l testované látky ředěné v bujonu přidáno 100  $\mu$ l bakteriálního inokula. Finální koncentrace bakterií v jamce byla  $1,5 \times 10^7$ . Vzhledem k tomu, že přidáním inokula došlo k naředění původního obsahu jamky 1:2, byla nejvyšší hodnocená koncentrace 128  $\mu$ g/ml. Destička byla inkubována po dobu 14 dní při teplotě 37 °C. Jelikož při takto dlouhé inkubaci mohlo docházet k odpařování média a vzhledem k použité metodě hodnocení (viz dále) i zkreslení výsledků, bylo do vnějších jamek destičky pipetováno 250  $\mu$ l sterilní destilované vody jako prevence vysychání. Po inkubaci bylo do každé jamky přidáno 10 % Alamar Blue a destička (Obr. 17) byla inkubována dalších 24 hod. Modrý resazurin je v přítomnosti živých bakterií metabolizován na růžový resorufin. MIC byla stanovena jako minimální koncentrace látky, při které nedošlo k této barevné změně. U většiny látek byla tato hodnota stanovena vizuálně, u barevných látek byla použita spektrofotometrie. Destička byla měřena před inkubací a po ní při vlnové délce 570 a 600 nm. Jako negativní kontrola byl použit sloupec bez přítomnosti antibakteriální látky, jako pozitivní kontrola sloužil isoniazid a ciprofloxacin. Stanovení bylo opakováno minimálně třikrát.



**Obrázek 17:** Vyhodnocení MIC u *M. tuberculosis* pomocí Alamar Blue.

#### 4.4.1.1 Stanovení hodnoty minimální baktericidní koncentrace (MBC)

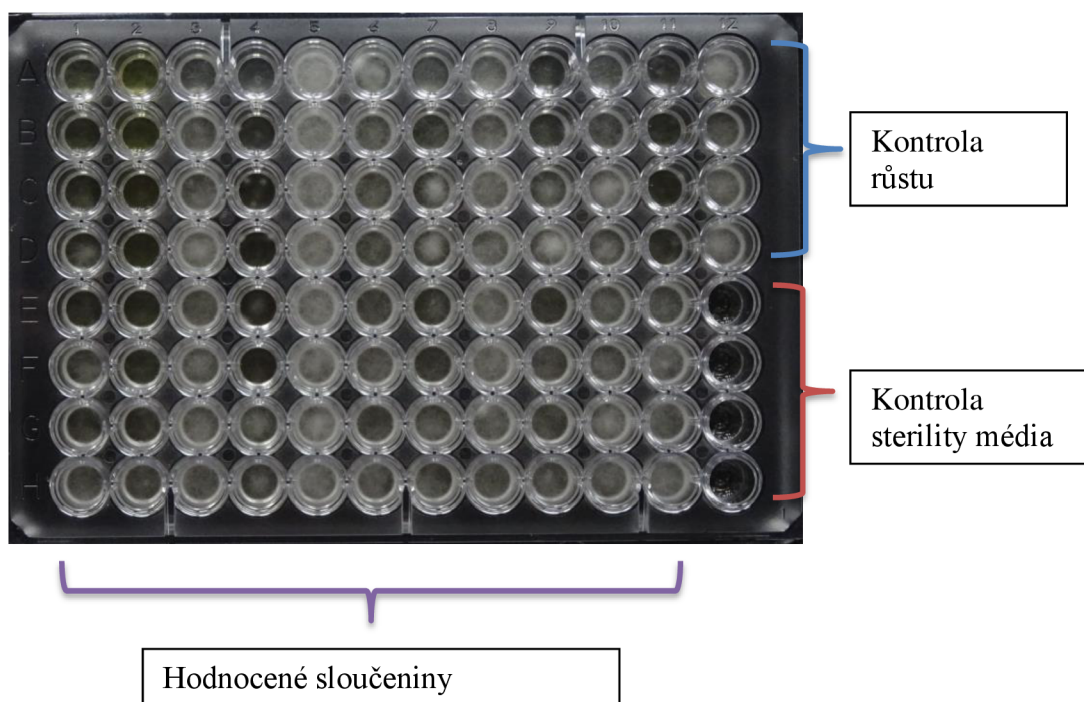
U grampozitivních bakterií byla použita metoda subkultivace alikvotu na agar jakožto pre-test pro výběr baktericidně působících látek pro následné testování dynamiky baktericidního účinku. Po odečtení hodnoty MIC bylo inokulum pomocí multiinokulátoru se silnými trny přeneseno na Mueller-Hinton agar. Misky byly inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 h. Jako MBC poté byla vyhodnocena nejnižší koncentrace testované látky, při které došlo k nárůstu  $\leq 5$  kolonií, což odpovídá poklesu o 99,9 % CFU vzhledem k původnímu inokulu.

#### 4.4.2 Stanovení minimální fungistatické aktivity (MFC)

Pro stanovení minimální fungistatické aktivity proti rodu *Candida* byla použita v principu stejná metodika jako pro testování bakterií. Látky byly ředěny v RPMI médiu na koncentrace 256–2  $\mu\text{g/ml}$ . Inokulum bylo připraveno z 24, resp. 48 hodin (v případě *C. parapsilosis*) staré kultury postupným naředěním v PBS a RPMI tak, že jeho výsledná koncentrace byla  $1 \times 10^3$  (Schwalbe et al., 2007). Destička byla poté očkovaná pipetou stejně jako v případě *M. tuberculosis*. Finální koncentrace kvasinek v jamce byla  $5 \times 10^2$  maximální koncentrace hodnocených látek 128  $\mu\text{g/ml}$ . Jako referenční látky byly použity roztoky amfotericinu B a flucytosinu.

Rostlinné patogeny *Bipolaris sorokiniana* a *Fusarium avenaceum* byly testovány odlišným způsobem. Mikroorganismy byly kultivovány na agarové plotně po dobu 3 dnů při teplotě 22 °C. Inokulum bylo připraveno suspendováním hyf v obohaceném LB médiu.

Hyfy byly rozmixovány na drobné části pomocí sterilního „mixéru“ a inokulum bylo upraveno pomocí LB médiu na hodnotu  $OD_{600} = 0,2$ . Testované látky byly naředěny v mikrotitrační destičce (Obr. 18) v LB médiu stejným způsobem, jako při testování bakterií. Destička byla zaočkována připraveným inokulem pomocí pipety. Ihned po zaočkování byla změřena absorbance při 600 nm a destička byla inkubována staticky při 22 °C. Absorbance byla dále změřena po 24, 48 a 72h od počátku inkubace. Minimální inhibiční koncentrace  $MIC_{80}$  byla stanovena jako koncentrace, která inhibovala nárůst mikroorganismu alespoň z 80 % v porovnání s negativní kontrolou. Tato hodnota byla odečítána v čase, kdy byla absorbance negativní kontroly trojnásobná v porovnání s měřením v čase 0, což obvykle odpovídalo času 48 hodin. Experiment byl proveden ve třech opakováních a výsledky byly zprůměrovány.



**Obrázek 18:** Hodnocení MFC u *Bipolaris sorokiniana*.

#### 4.4.3 Inhibice germinace *Bipolaris sorokiniana*

Inhibiční efekt na klíčení konidií *B. sorokiniana* byl testován podle metodiky De Lucca et al. (1996). Látky byly rozředěny v mikrotitrační destičce v 45  $\mu$ l destilované vody tak, aby jejich finální koncentrace po inokulaci byla 256 a 128  $\mu$ g/ml. Jako negativní kontrola byly použity jamky s 5 % DMSO, jako pozitivní kontrola byl použit benomyl v koncentracích 5  $\mu$ g/ml a 10  $\mu$ g/ml. Suspenze konidií byla připravena ze sporulující kultury narostlé

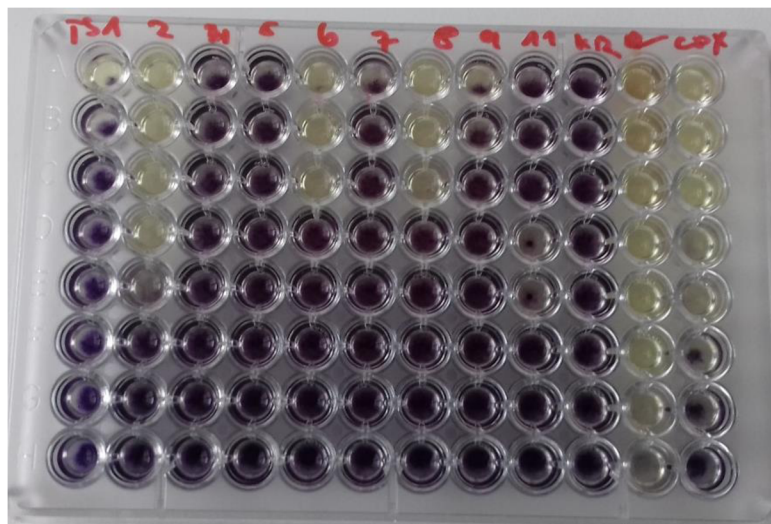
na agarové plotně. Do každé jamky bylo přidáno 5  $\mu$ l inokula naředěného tak, aby koncentrace konidií v každé jamce byla přibližně 3000/ml. Tato koncentrace byla ověřena mikroskopicky. Destička byla inkubována při 22 °C po dobu 48 h. Po inkubaci byl obsah jamky mikroskopicky (400 $\times$ ) hodnocen z hlediska přítomnosti klíčících buněk. Z každé jamky bylo hodnoceno celkem 50 konidií. Germinace byla definována jako vývoj zárodečných hyf jakékoliv velikosti. Inhibiční efekt byl vypočítán jako poměr nenaklíčených konidií vzhledem k negativní kontrole. Experiment byl proveden ve dvou opakováních.

#### 4.4.4 MTT assay

Metoda s tetrazolium bromidem byla použita k otestování metabolické aktivity buněk *M. tuberculosis* a *M. kansasii*. Destičky s hodnocenými látkami a inokula byly připraveny stejným způsobem, jako při stanovení hodnoty MIC, při testování *M. tuberculosis* byly použity jen poloviční objemy, aby byl výsledný objem v jamkách 100  $\mu$ l. Jako negativní kontrola bylo použito 8 jamek obsahujících pouze kultivační médium, jako pozitivní kontrola byl zvolen ciprofloxacin a rifampicin. Destičky byly inkubovány po dobu 7 dní při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubační doby bylo do každé jamky přidáno 10  $\mu$ l MTT (0.5 mg/ml) (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) a destičky byly inkubovány další 4 h při 37 °C ve tmě. Vzniklé krystaly formazanu se rozpustily přidáním 100  $\mu$ l 17% dodecyl-sulfátu rozpuštěného v 40% dimethylformamidu. Destičky (viz Obr. 19) byly měřeny na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm. Životaschopnost buněk byla vyjádřena jako procento životaschopných buněk v porovnání s negativní kontrolou podle rovnice:

$$\% \text{ životaschopnosti} = \frac{OD[570V]}{OD[570K]} \times 100$$

kde  $OD_{570V}$  značí absorbanci testované jamky při 570 nm a  $OD_{570K}$  je hodnota absorbance negativní kontroly. Hodnocení bylo provedeno minimálně ve třech na sobě nezávislých opakováních a výsledky byly zprůměrovány.



**Obrázek 19:** Hodnocení životaschopnosti metodou MTT.

#### 4.4.5 Hodnocení kombinovaného účinku

V práci byl hodnocen kombinovaný účinek potenciálních antimikrobiálních látek v kombinaci s konvenčně používanými antibiotiky. Pro testování byla použita metoda „checkerboard titration technique“ (CHTT) (Schwalbe et al., 2007).

Testování probíhalo v 96 jamkové mikrotitrační destičce. Testovaná látka byla sériově rozředěna v destičce tak, že její nejvyšší koncentrace odpovídala 4 násobku předem stanovené hodnoty MIC. Poté bylo přidáno konvenčně užívané antibiotikum takovým způsobem, že každá jamka obsahovala originální kombinaci koncentrací těchto dvou látek. Řádek H byl využit pro stanovení MIC hodnocené látky, sloupec 12 adekvátně pro stanovení MIC použitého antibiotika. Destička byla zaočkována multiinokulátorem na finální koncentraci  $10^5$  CFU/ml a inkubována 24 h při 37 °C.

Frakční inhibiční koncentrace (FIC) je definována jako poměr hodnoty MIC látky v kombinaci k MIC látky samostatně užití. FIC index je součtem všech FIC testovaných látek. (Schwalbe et al., 2007).

$$\text{FIC látky A} = \frac{\text{MIC látky A v kombinaci}}{\text{MIC látky A samostatně}}$$

$$\text{FIC látky B} = \frac{\text{MIC látky B v kombinaci}}{\text{MIC látky B samostatně}}$$

$$\Sigma\text{FIC} = \text{FIC látky A} + \text{FIC látky B}$$

Interpretace hodnoty FIC indexu se liší v závislosti na použité metodice, v této práci byly použity následující hranice (Stevens et al., 1998; Sopirala et al., 2010; Zusman et al., 2013):

- synergismus =  $\Sigma\text{FIC} \leq 0,5$
- aditivní účinek =  $0,5 < \Sigma\text{FIC} < 1$
- indiference =  $1 \leq \Sigma\text{FIC} \leq 4$
- antagonismus =  $4 < \Sigma\text{FIC}$

Po inkubaci byl vizuálně odečten nárůst na destičce. V řadě H byla vyhodnocena hodnota MIC testované látky, ve sloupci 12 hodnota MIC konvenčně užívaného antibiotika. V každém řádku a sloupci destičky byla zvolena jamka s nejnižší koncentrací postupně řaděné látky, ve které ještě nebyl bakteriální nárůst. Pro každou z těchto jamek byl vypočítán index FIC. Výsledný vliv kombinace látek byl stanoven na základě nejnižší dosažené hodnoty FIC (Bonapace et al., 2002). Měření bylo provedeno 2krát. Pokud se výsledky lišily, byla zvolena vyšší hodnota.

#### **4.4.6 Hodnocené dynamiky baktericidního účinku**

Pro hodnocení dynamiky baktericidního účinku byly vybrány látky, které při primárním screeningu vykazovaly baktericidní účinek, což znamená, že hodnota MBC byla menší nebo rovna čtyřnásobku MIC. Použitá metodika vychází z monografie Schwalbe et al. (2007) a byla otestována v rámci diplomové práce (Pospíšilová, 2015).

Byly připraveny 3 zkumavky obsahující růstové médium a naředěnou antibakteriální látku tak, aby výsledná koncentrace odpovídala hodnotám  $1 \times \text{MIC}$ ,  $2 \times \text{MIC}$  a  $4 \times \text{MIC}$ . Jako kontrola růstu sloužila zkumavka, která místo antibakteriální látky obsahovala rozpouštědlo ve stejné koncentraci. Zkumavky byly zaočkovány bakteriálním inokulem v logaritmické růstové fázi, poté byly pečlivě promíchány na vortexu a z každé byl neprodleně odebráno 100  $\mu\text{l}$  inokula. Tento vzorek byl sériově ředěn v 7 zkumavkách obsahujících 900  $\mu\text{l}$  PBS tak, že koncentrace bakteriálních buněk v každé zkumavce odpovídala 1/10 koncentrace ve zkumavce předchozí. Z každé zkumavky bylo 2krát odebráno 20  $\mu\text{l}$  roztoku a vyočkováno na MH agar. Tento odběr vzorku byl proveden ihned po zaočkování zkumavek, a poté po 4, 6, 8 a 24 h. Mezitím byly zkumavky inkubovány staticky v termostatu při teplotě 37 °C. Agary se vzorky byly inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24 h. Poté byly spočítány kolonie bakterií v ředěních, které dosahovaly nárůstu 5–60 kolonií. Každé měření bylo provedeno 2krát, hodnoty byly zprůměrovány a pro přehlednost převedeny na dekadické logaritmy. Byly



vytvořeny grafy, jež popisují pokles počtu bakteriálních kolonií v závislosti na čase a koncentraci antimikrobiální látky. Látku považujeme za baktericidní, jestliže dochází k poklesu CFU/ml o 3 řády, což znamená, že dojde k usmrcení  $\geq 99,9$  % původního počtu bakteriálních buněk v inokulu.

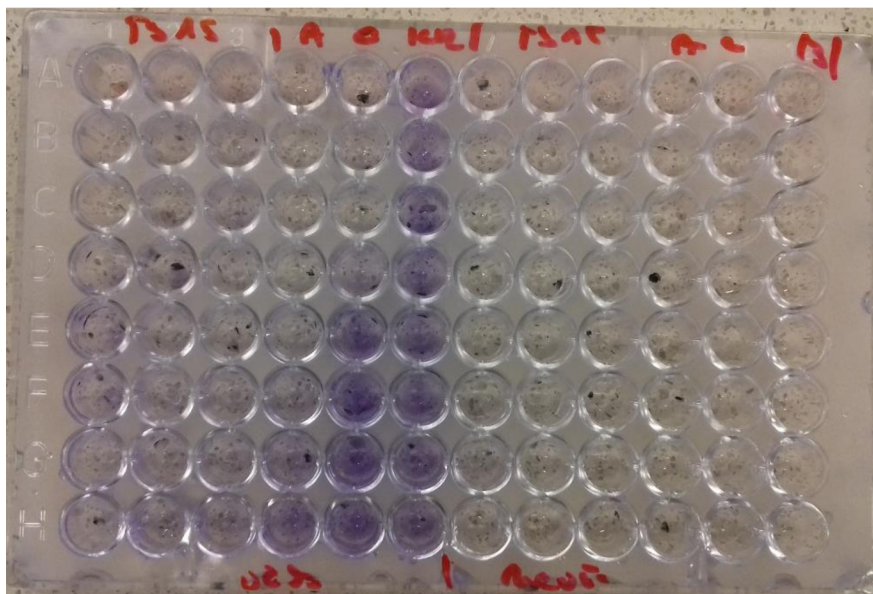
#### 4.4.7 Stanovení inhibiční antibiofilmové aktivity proti *S. aureus*

Látky s výraznou antistafylokokovou aktivitou byly naředěny v TSB obsahujícím 2 % glukosy tak, aby finální koncentrace odpovídala 256–2  $\mu\text{g/ml}$ . *S. aureus* vykultivovaný na krevním agaru byl dále kultivován v TSB + 2 % glukosy do exponenciální růstové fáze. Inokulum bylo upraveno na zákal 1 McFarland a poté naředěno tak, že finální koncentrace bakterií v jamce byla  $10^5$  CFU/ml. Destička byla staticky inkubována 48 h při teplotě 37 °C. Po inkubaci byl obsah jamek odstraněn a destička byla třikrát vymyta PBS. Po vysušení při pokojové teplotě bylo do každé jamky pipetováno 125  $\mu\text{l}$  0,1% krystalové violeti (Obr. 20). Destička se nechala stát po dobu 30 minut, poté bylo barvivo vylito a destička byla vypláchnuta třikrát PBS. Po vysušení se obarvený biofilm odleptal ze stěn a dna jamek přidáním 125  $\mu\text{l}$  33% kyseliny octové. Byla změřena absorbance při 595 nm. Pro zajištění správnosti výsledků byla každá koncentrace látky testována minimálně ve dvou jamkách a pro negativní kontrolu bylo použito 8 jamek. Měření bylo opakováno minimálně třikrát v na sobě nezávislých experimentech.

Schopnost inhibovat růst biofilmu byla vyjádřena procentuálně v porovnání s kontrolou růstu, a to dle rovnice:

$$\% \textit{inhibice} = 100 - \frac{OD[595V]}{OD[595K]} \times 100$$

kde OD[595V] je absorbance testované jamky při 595 nm a OD[595K] je absorbance kontroly růstu při téže vlnové délce.



**Obrázek 20:** Obarvený biofilm *S. aureus* ATCC 29213 vykultivovaný na mikrotitrační destičce.

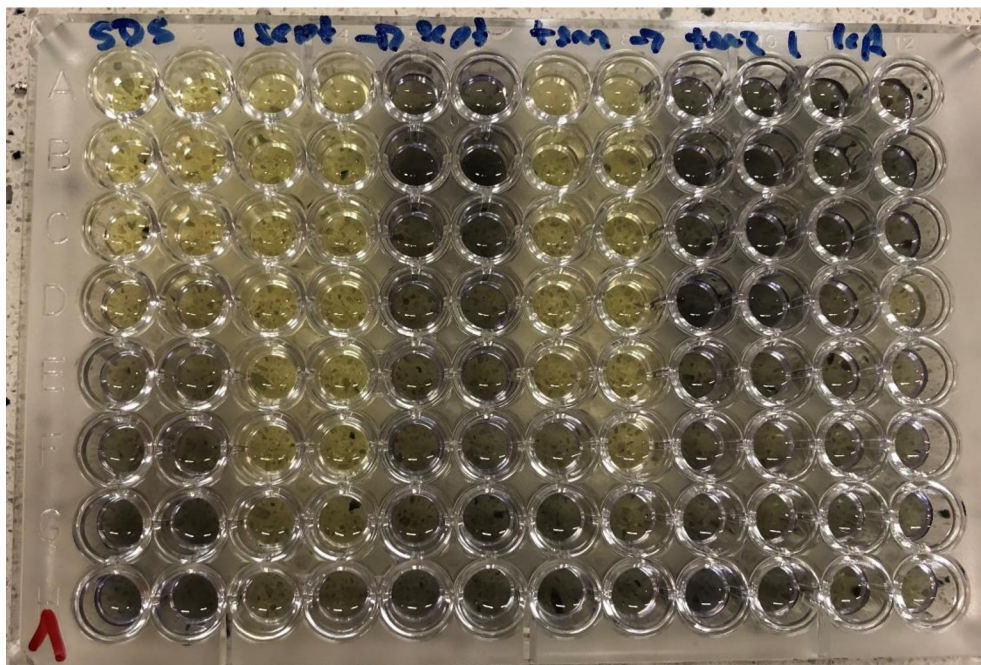
#### 4.4.8 Stanovení eradikační antibiofilmové aktivity proti *S. aureus*

Biofilm *S. aureus* byl připraven stejným způsobem jako při stanovení inhibiční aktivity, nebyly ovšem přidány žádné antimikrobiální látky. Po 48 h inkubace byla destička třikrát vypláchnuta PBS a vysušena při pokojové teplotě. Poté byly v destičce opatrně naředěny antimikrobiální látky tak, že jejich koncentrace byla 256–2 µg/ml. Jako médium bylo použito 100 µl CaMH do každé jamky. Každé ředění bylo provedeno ve třech jamkách. Destička byla poté inkubována 24 h při teplotě 37 °C. Po inkubaci byl obsah destičky opatrně odstraněn a destička byla třikrát vypláchnuta PBS. Po vysušení bylo do každé jamky pipetováno 100 µl MTT o koncentraci 0,5 µg/ml. Destička byla zabalena do alobalu a inkubována při teplotě 37 °C po dobu 1–2 hodiny, než došlo k vytvoření krystalů formazanu. Obsah jamek s neadherovanými krystaly byl odstraněn a destička byla propláchnuta PBS. Krystaly byly poté rozpuštěny roztokem laurylsíranu sodného v 40 % dimethylformamidu. Ihned po rozpuštění byla měřena absorbance při vlnové délce 570 nm (Obr. 21).

Schopnost látek degradovat vzniklý bakteriální biofilm byla dle rovnice:

$$\% \text{ eradikace} = 100 - \frac{OD[570V]}{OD[570K]} \times 100$$

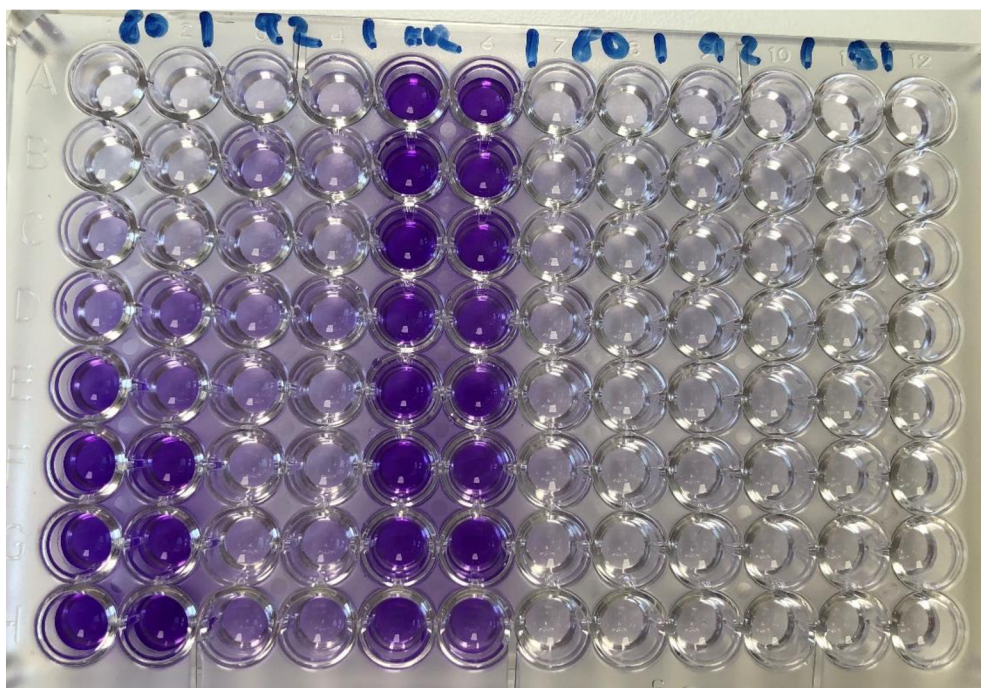
kde OD[570V] je absorbance testované jamky při 570 nm a OD[570K] je absorbance kontroly růstu při téže vlnové délce. Stanovení bylo opakováno nejméně ve třech na sobě nezávislých měřeních.



**Obrázek 21:** Stanovení eradikační aktivity metodou MTT.

#### 4.4.9 Stanovení inhibice růstu kvasinkového biofilmu

Látky s výraznou inhibiční aktivitou proti planktonickým formám rodu *Candida* byly testovány z hlediska schopnosti inhibovat vznik kvasinkového biofilmu. Hodnocené látky byly naředěny v mikrotitrační destičce v YNB na koncentrace 256-2  $\mu\text{g/ml}$ . Celkový objem v jamce činil 50  $\mu\text{l}$ . *C. albicans* byla vykultivována do exponenciální fáze v YNB. Denzita inokula byla upravena na 0,5 McFarland a inokulum bylo dále ředěno v YNB na finální koncentraci  $1 \times 10^3$ . Destička byla zaočkována přenesením 50  $\mu\text{l}$  naředěného inokula do každé jamky. Výsledné koncentrace látek v jamkách tak činili 128-1  $\mu\text{g/ml}$  a výsledná koncentrace bakteriálních buněk v jamce byla  $5 \times 10^2$ . Destička byla staticky inkubována při 28 °C po dobu 48 hodin. Po uplynutí kultivační doby byl vzniklý biofilm hodnocen pomocí krystalové violeti stejným způsobem jako u *S. aureus* (viz oddíl 3.4.7). Stanovení bylo provedeno v duplikátech a opakováno nejméně ve třech na sobě nezávislých měřeních (Obr. 22).

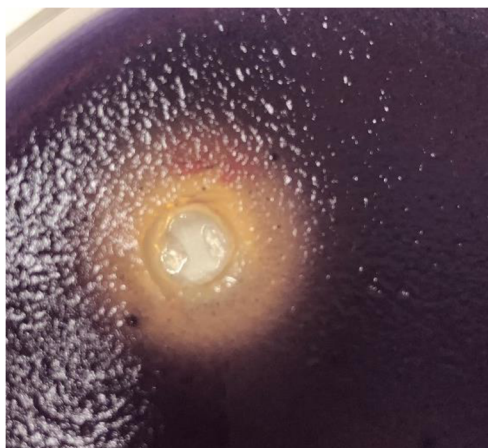


**Obrázek 22:** Hodnocení inhibice formace kvasinkového biofilmu.

#### 4.4.10 Stanovení inhibice *quorum sensing* u *Chromobacterium violaceum*

*Ch. violaceum* byla kultivována na MH agaru při laboratorní teplotě po dobu 48 hodin. Poté bylo několik kolonií suspendováno v LB médiu a kultivováno při laboratorní teplotě přes noc. Následně bylo 50  $\mu$ l této kultury smíšeno s 5 ml řídkého MH agaru (0,1%). Směs byla vylita na předem připravenou Petriho misku s již ztuhlým MH agarem. Po ztuhnutí směsi byly do misky sterilně vytvořeny jamky o průměru 2,5 mm. Jamky byly od sebe a od kraje vzdáleny alespoň 25 mm.

Do každé jamky bylo pipetováno 20  $\mu$ l hodnocené látky o požadované koncentraci připravené ze základního roztoku látky v DMSO (10 mg/ml) ředěním v PBS. Misky byly poté inkubovány po dobu 3 dní při pokojové teplotě, dokud nedošlo k vizuálnímu nárůstu kultury *Ch. violaceum*. V případě, že hodnocená látka inhibovala *quorum sensing*, kultura byla místo fialové barvy bezbarvá až bílá, viz Obr. 23. U takto narostlé kultury byla změřena zóna okolo jamky (včetně jamky samotné), kde došlo k inhibici. Hodnocení bylo opakováno minimálně ve třech na sobě nezávislých experimentech a výsledky byly zprůměrovány. Jako pozitivního kontrola sloužil karvakrol, jako negativní DMSO v koncentracích 100–25 % pro potvrzení nepřítomnosti vlivu DMSO na růst a *quorum sensing* *Ch. violaceum*.



**Obrázek 23:** Inhibice *quorum sensing* u *Ch. violaceum* na agaru.

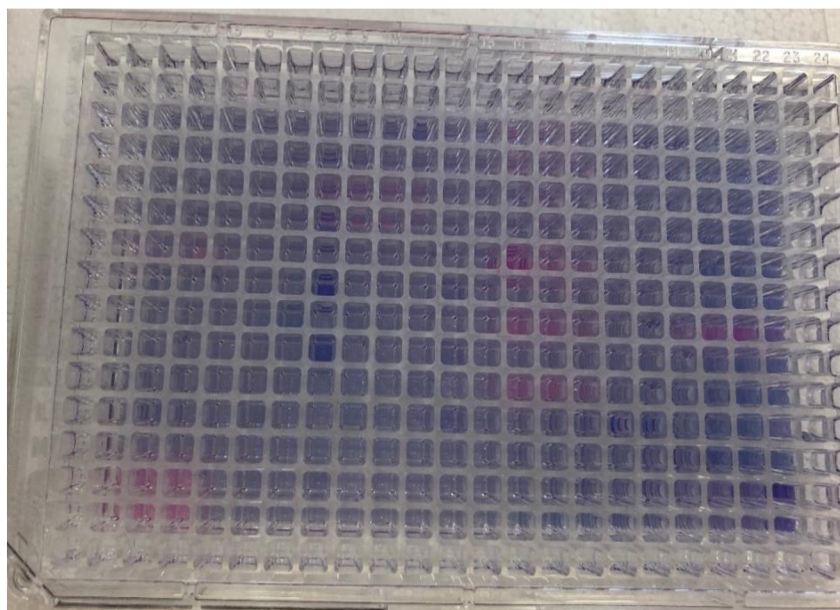
#### **4.4.11 Hodnocení aktivity vybraných sloučenin proti *Plasmodium bergeri***

*Plasmodium bergeri* je modelový organismus používaný pro studium potenciálních antimalarik. Sloučeniny, u nichž byla na základě struktury předpokládána antimalarická aktivita, byly rozpuštěny v DMSO na koncentraci 10 mM a dále v čas potřeby naředěny v RPMI médiu s přidavkem 1 % streptomycinu a penicilinu na koncentrace 10  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ . Primární screening probíhal v mikrotitrační destičce s 386 jamkami. Den před testováním byla destička zaočkována hepatocyty linie Huh7 v koncentraci  $1 \times 10^4$  buněk/jamka a kultivována při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po inkubaci bylo médium odsáto a do jamek se napipetovalo v triplicátech 30  $\mu\text{l}$  hodnocené sloučeniny. Jako negativní kontrola bylo použito 9 jamek obsahujících 0,1% DMSO, což odpovídalo nejvyšší použité koncentraci u hodnocených sloučenin. Destička se inkubovala 1 hodinu při 37 °C. Během této doby byly ze samiček komárů *Anopheles stephensi* (Obr. 24) pod mikroskopem vypreparovány slinné žlázy obsahující sporozoity *Plasmodium bergeri* Luci. Sporozoiti byli přefiltrováni a po mikroskopickém stanovení jejich počtu byli naředěni v médiu na požadovanou koncentraci.



**Obrázek 24:** Samičky komára rodu *Anopheles stephensi* (vlevo), uchování komárů (vpravo).

Destička byla poté zaočkována tak, že každá jamka obsahovala 3000 sporozoitů. Destička se poté centrifugovala 5 minut při 1800 rpm, aby se sporozoti dostali do hepatocytů na dně destičky, a inkubovala se 46 hodin při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubační doby bylo do jamek přidáno barvivo Alamar Blue (1:20), viz Obr. 25, a změřila se fluorescence při hodnotách excitace 530 nm/emise 590 nm. Toto měření sloužilo ke stanovení buněčné konfluence a vyloučení bakteriální kontaminace. Hodnoty byly porovnány s hodnotami negativní kontroly (100 %). V případě, že konfluence byla nižší než 70 %, byly dané látky považovány za toxické a jejich aktivita se dále nehodnotila.



**Obrázek 25:** Mikrotitrační destička obarvená Alamar blue ke stanovení konfluence hepatocytů.

Po změření fluorescenčního spektra byl obsah jamek odsát, jamky byly promyty PBS a buňky byly lyzovány přidáním lyzačního pufru. Po třepání a centrifugaci, které umožnilo průnik lyzačního pufru k buňkám, byl obsah jamek přenesen do bílé 96 jamkové destičky. Do každé jamky byl přidán roztok luciferinu a okamžitě byla změřena luminiscence, a to třikrát po sobě. Pro výpočty bylo následně použito měření s nejvyššími hodnotami luminiscence. Hodnoty konfluence a luminiscence, které odpovídají parazitární infekci, byly graficky zobrazeny a srovnány.

#### 4.4.12 Studium ovlivnění permeability cytoplazmatické membrány

Efekt testovaných sloučenin na propustnost cytoplazmatické membrány byl testován za použití krystalové violeti. Bakteriální kultura byla kultivována do exponenciální fáze růstové křivky ve vhodném kultivačním médiu. Kultura byla poté centrifugována (4500 rpm, 5 minut), dvakrát promyta v PBS a suspendována v PBS do dosažení zákalu 1 McFarland. Ke kultuře byla přidána antimikrobiální látka v požadované koncentraci a byla inkubována 1 h při teplotě 37 °C. Jako pozitivní kontrola byl použit 1% roztok Tweenu 20, který má povrchovou aktivitu. Jako negativní kontrola byl použit ciprofloxacin, který s plazmatickou membránou neinteraguje. Kontrola růstu bez přítomnosti antibakteriální látky a kontrola obsahující DMSO ve stejné koncentraci jako testované látky byla rovněž zahrnuta. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 15 min při 4500 otáčkách, supernatant byl promyt PBS a suspendován v PBS obsahujícím 10 % krystalové violeti. Vzorky byly inkubovány 15 min při 37 °C a poté centrifugovány 15 min při 4500 otáčkách. Absorbance supernatantu byla měřena při vlnové délce 595 nm. Procento vychytávání krystalové violeti bylo spočítáno podle rovnice:

$$\% \text{ vychytávání} = \frac{OD(595) \text{ vzorku}}{OD(595) \text{ roztoku krystalické violeti}} \times 100$$

Experiment byl proveden alespoň ve třech na sobě nezávislých opakováních. Výsledky byly zprůměrovány a rozdíly mezi jednotlivými měřeními byly vyjádřeny pomocí směrodatné odchylky.

#### 4.4.13 Chelatace železa

U látek s předpokládanou schopností chelatovat železo byla tato vlastnost hodnocena na základě metodiky (Mladěnka et al., 2011) s určitými modifikacemi. Hodnocení probíhalo v mikrotitrační destičce. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo pipetováno 150 µl PBS. Do testovacích i kontrolních jamek bylo přidáno 50 µl testovaných látek naředěných v PBS

na požadovanou koncentraci (256–2 µg/ml). Jako negativní kontrola bylo použito 8 jamek bez přítomnosti antimikrobiální látky, místo které bylo přidáno 50 µl PBS. Jako pozitivní kontrola byl použit deferoxamin ve stejných koncentracích jako hodnocené látky. Poté bylo do každé jamky přidáno 50 µl roztoku  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  o koncentraci 250 µM. Destička se nechala 2 minuty třepat a poté se do všech testovacích jamek přidalo 50 µl roztoku ferrozinu o koncentraci 5 mM; do kontrolních jamek bylo pipetováno 50 µl PBS. Absorbance při 562 nm se měřila neprodleně po přidání ferrozinu. Před výpočtem bylo odečteno pozadí, tedy kontrolní jamky obsahující  $\text{FeSO}_4$ , ale neobsahující ferrozín. Chelatační aktivita látek byla spočítána podle rovnice:

$$\% \text{chelatace} = 100 - \frac{OD(562) \text{ vzorku}}{OD(562) \text{ negativní kontrola}} \times 100$$

Měření bylo provedeno v duplikátech minimálně ve třech na sobě nezávislých opakováních. Výsledky byly zprůměrovány a odchylky od jednotlivých měření byly vyjádřeny pomocí směrodatné odchylky.

#### 4.4.13.1 Inhibice sortasy

Vybrané sloučeniny byly testovány jako inhibitory sortasy A. Pro hodnocení byl použit kit SensoLyte® 520 sortase A activity Assay Fluorimetric Kit (AnaSpec Inc., Fremont, CA, USA) a bylo postupováno dle pokynů výrobce. Sloučeniny byly naředěny v DMSO na koncentraci 200 µg/ml. Sortasa byla vystavena působení hodnocených sloučenin. Inhibiční aktivita byla měřena jako hodnota fluorescence, a to kontinuálně v rozmezí 10-70 minut po zahájení experimentu. Jako pozitivní kontrola byl použit výrobcem dodaný inhibitor sortasy kyselina 4-(hydroxymercuri)-benzoová ( $\text{IC}_{50} = 50,6 \text{ nM}$ ).

#### 4.4.14 Statistická analýza

Hodnocení MIC a MBC bylo prováděno minimálně ve dvou opakováních. Pokud se výsledky neshodovaly, bylo provedeno třetí opakování a jako výsledek byla použita střední hodnota.

Hodnocení dynamiky baktericidního účinku bylo provedeno ve dvou opakováních, výsledky byly převedeny na dekadické logaritmy a graficky zpracovány. Odchylky od jednotlivých měření byly vyjádřeny pomocí chybových úseček. Vliv koncentrace látky a času inkubace byl statisticky hodnocen pomocí dvoucestné ANOVY a Tukey testu v programu Origin na hladině významnosti  $P < 0.05$ .



Hodnocení antibiofilmové aktivity bylo provedeno minimálně ve dvou jamkách a ve třech na sobě nezávislých opakováních. Hodnoty byly zprůměrovány a rozdíly v jednotlivých měřeních byly vyjádřeny jako směrodatná odchylka.

Hodnocení „uptake“ violeti bylo provedeno ve třech opakováních, výsledky byly zprůměrovány a byla vypočítána směrodatná odchylka. Výsledky byly graficky znázorněny. Pomocí jednocestné ANOVY bylo staveno, zda jsou hodnoty pro jednotlivé látky odlišné ( $P < 0.05$ ).

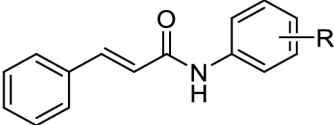
## 4.5 Proti-invazivní aktivita derivátů cinnamamidů

### 4.5.1 Charakteristika hodnocených derivátů cinnamamidů

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, v posledních letech se řada výzkumů antibakteriálních látek soustředí na hodnocení aktivity přírodních extraktů a jejich derivátů. U derivátů kyseliny skořicové byly prokázány jejich antibakteriální, antioxidační, antivirové i antifungální účinky (Sova, 2012).

Substituované deriváty cinnamamidu (**T1**) byly připraveny Dr. Tomášem Strhárským a Dr. Jiřím Kosem z Farmaceutické fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě. Jejich struktury, experimentálně zjištěné hodnoty lipofility  $\log k$  a predikované hodnoty  $\log P/\text{Clog } P$  a elektronové Hammettovy  $\sigma$  parametry, které byly vypočítány pro celý anilidový kruh, jsou uvedeny v Tabulce 3. Experimentální hodnoty lipofilit vyjádřené jako  $\log k$  jsou v souladu s predikovanými hodnotami. Pro stanovení vztahu struktury a účinku (vyjádření závislosti MIC na lipofilitě) byly použity hodnoty  $\log k$ .

**Tabulka 2:** Struktury a fyzikálně-chemické vlastnosti hodnocených derivátů cinnamamidů (<sup>a</sup> vypočítáno pomocí ChemBioDraw Ultra 13.0; <sup>b</sup> vypočítáno ACD/Percepta ver. 2012).

					
Slouč.	R	$\log k$	$\text{Clog } P^a$	$\log P^b$	$\sigma_{\text{Ar}}^b$
<b>T1</b>	H	0.1146	3.6640	3.18	0.60
<b>T2</b>	3-CH <sub>3</sub>	0.2729	4.1630	3.40	0.48
<b>T3</b>	4-CH <sub>3</sub>	0.2640	4.1630	3.40	0.46
<b>T4</b>	2-F	0.1330	3.4646	3.17	1.02
<b>T5</b>	3-F	0.2327	4.0646	3.32	0.82
<b>T6</b>	3-CF <sub>3</sub>	0.4859	4.9978	4.26	0.89
<b>T7</b>	2,5-CH <sub>3</sub>	0.2691	4.0120	3.57	0.59
<b>T8</b>	2,5-Cl	0.5799	4.5878	4.65	1.22
<b>T9</b>	2,6-Cl	0.0632	3.7378	4.56	1.33
<b>T10</b>	3,4-Cl	0.6821	5.3178	4.70	1.19
<b>T11</b>	3,5-Cl	0.8155	5.4378	4.79	1.11
<b>T12</b>	2,6-Br	0.0992	3.9778	4.80	1.33
<b>T13</b>	3,5-CF <sub>3</sub>	0.9814	6.0386	5.68	1.05
<b>T14</b>	2-F-5-Br	0.4875	4.4178	4.07	1.28
<b>T15</b>	2-Br-5-F	0.4588	4.1378	4.12	1.19
<b>T16</b>	2-Cl-5-CF <sub>3</sub>	0.6178	4.9509	4.88	1.19

#### 4.5.2 Screening antibakteriální aktivity derivátů cinnamamidů

Antibakteriální aktivita derivátů cinnamamidů byla hodnocena proti všem izolátům *S. aureus* a *E. faecalis*. Výsledky jsou shrnuty v Tabulkách 3 a 4.

**Tabulka 3:** Antistafylokoková aktivita ([ $\mu\text{g/ml}$ ]/ [ $\mu\text{M}$ ]) hodnocených derivátů cinnamamidů. (SA = *S. aureus* ATCC 29213, MRSA = klinické izoláty methicilin-rezistentních *S. aureus* 63718 a SA 3202). AMP-ampicilin, CPX-ciprofloxacin

Slouč.	R	SA		MRSA 63718		MRSA SA 3202	
		MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]	MBC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]	MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]	MBC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]	MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]	MBC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]
T1	H	>256/ >1146	>256/ >1146	>256/ >1146	>256/ >1146	>256/ >1146	>256/ >1146
T2	3-CH <sub>3</sub>	>256/ >1078	>256/ >1078	>256/ >1078	>256/ >1078	>256/ >1078	>256/ >1078
T3	4-CH <sub>3</sub>	>256/ >1078	>256/ >1078	>256/ >1078	>256/ >1078	>256/ >1078	>256/ >1078
T4	2-F	>256/ >1061	>256/ >1061	>256/ >1061	>256/ >1061	>256/ >1061	>256/ >1061
T5	3-F	>256/ >1061	>256/ >1061	>256/ >1061	>256/ >1061	>256/ >1061	>256/ >1061
T6	3-CF <sub>3</sub>	8/ 27,47	8/ 27,47	8/ 27,47	8/ 27,47	8/ 27,47	8/ 27,47
T7	2,5-CH <sub>3</sub>	>256/ >1018	>256/ >1018	>256/ >1018	>256/ >1018	>256/ >1018	>256/ >1018
T8	2,5-Cl	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876
T9	2,6-Cl	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876
T10	3,4-Cl	128/ 438	128/ 438	256/ 876	256/ 876	128/ 438	128/ 438
T11	3,5-Cl	128/ 438	128/ 438	256/ 876	256/ 876	64/ 109	64/ 109
T12	2,6-Br	>256/ >671	>256/ >671	>256/ >671	>256/ >671	>256/ >671	>256/ >671
T13	3,5-CF <sub>3</sub>	8/ 22,27	32/ 89,08	8/ 22,27	32/ 89,08	8/ 22,27	32/ 89,08
T14	2-F-5-Br	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799
T15	2-Br-5-F	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799
T16	2-Cl-5-CF <sub>3</sub>	>256/ >785	>256/ >785	>256/ >785	>256/ >785	>256/ >785	>256/ >785
AMP	-	2/ 5.7	2/ 5.7	16/45,8	>16/ >45,8	16/ 45,8	> 16/ >45,8
CPX	-	0,5/1,5	0,5/1,5	4/12,1	8/24,2	8/24,2	8/24,2

**Tabulka 4:** Minimální inhibiční a baktericidní aktivita ( $[\mu\text{g/ml}]/[\mu\text{M}]$ ) derivátů cinnamamidů proti enterokokům. (EF = *E. faecalis* ATCC 29213, VRE = klinické izoláty vankomycin-rezistentních *E. faecalis* VRE 342B, VRE 368 a VRE 725B).

Slouč.	R	EF		VRE 342 B		VRE 368		VRE 725 B	
		MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]	MBC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]	MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]	MBC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]	MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]	MBC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]	MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]	MBC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]
<b>T1</b>	H	>256/ >1146	>256/ >1146	>256/ >1146	>256/ >1146	>256/ >1146	>256/ >1146	>256/ >1146	>256/ >1146
<b>T2</b>	3-CH <sub>3</sub>	>256/ >1078	>256 / >1078	>256/ >1078	>256 / >1078	>256/ >1078	>256 / >1078	>256/ >1078	>256 / >1078
<b>T3</b>	4-CH <sub>3</sub>	>256/ >1078	>256/ >1078	>256/ >1078	>256/ >1078	>256/ >1078	>256/ >1078	>256/ >1078	>256/ >1078
<b>T4</b>	2-F	>256/ >1061	>256 />1061	>256/ >1061	>256 />1061	>256/ >1061	>256 />1061	>256/ >1061	>256 />1061
<b>T5</b>	3-F	>256/ >1061	>256/ >1061	>256/ >1061	>256/ >1061	>256/ >1061	>256/ >1061	>256/ >1061	>256/ >1061
<b>T6</b>	3-CF <sub>3</sub>	256 >879	256 >879	256 >879	256 >879	256 >879	256 >879	256 >879	256 >879
<b>T7</b>	2,5-CH <sub>3</sub>	>256/ >1018	>256/ >1018	>256/ >1018	>256/ >1018	>256/ >1018	>256/ >1018	>256/ >1018	>256/ >1018
<b>T8</b>	2,5-Cl	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876
<b>T9</b>	2,6-Cl	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876	>256/ >876
<b>T10</b>	3,4-Cl	>256 >876	>256 >876	>256 >876	>256 >876	>256 >876	>256 >876	>256 >876	>256 >876
<b>T11</b>	3,5-Cl	>256 >876	>256 >876	>256 >876	>256 >876	>256 >876	>256 >876	>256 >876	>256 >876
<b>T12</b>	2,6-Br	>256/ >671	>256/ >671	>256/ >671	>256/ >671	>256/ >671	>256/ >671	>256/ >671	>256/ >671
<b>T13</b>	3,5-CF <sub>3</sub>	>256/ >713	>256/ >713	>256/ >713	>256/ >713	>256/ >713	>256/ >713	>256/ >713	>256/ >713
<b>T14</b>	2-F-5-Br	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799
<b>T15</b>	2-Br-5-F	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799	>256/ >799
<b>T16</b>	2-Cl-5-CF <sub>3</sub>	>256/ >785	>256/ >785	>256/ >785	>256/ >785	>256/ >785	>256/ >785	>256/ >785	>256/ >785
<b>AMP</b>	-	4/11,4	4/11,4	4/11,4	4/11,4	4/11,4	4/11,4	2/5,7	2/5,7
<b>CPX</b>	-	1/3,0	1/3,0	1/3,0	1/3,0	1/3,0	1/3,0	64/193	64/193

Jak je vidět z Tabulky 3, proti stafylokokům byly aktivní pouze deriváty **T6** (R = 3-CF<sub>3</sub>) a **T13** (R = 3,5-CF<sub>3</sub>), které byly substituovány v polohách C<sub>(3)'</sub> a C<sub>(3,5)'</sub> trifluomethylovou skupinou. Rozdíl v aktivitě nebyl ovlivněn přítomností genu *mecA*, u všech isolátů byly hodnoty MIC shodné 8  $\mu\text{g/ml}$ . Jelikož látka **T16** nesoucí skupinu CF<sub>3</sub> v poloze 5 nebyla aktivní, lze říci, že substituce CF<sub>3</sub> v poloze C<sub>(3)'</sub> je klíčová pro antistafylokokovou aktivitu. Slabá aktivita proti stafylokokům byla pozorována u látek **T10** a **T11**, které nesly chlor v pozicích 3,4; resp 3,5 benzenového jádra. Tuto substituci lze považovat za bioisosterickou se substitucí CF<sub>3</sub>.

Žádná aktivita nebyla zaznamenána proti enterokokům (viz Tabulka 4). Oproti stafylokokům se tato grampozitivní bakterie vyznačuje obecně vyšší vnitřní rezistencí k antimikrobiálním látkám.

#### 4.5.3 Screening antimykobakteriální aktivity deriátů cinnamamidů

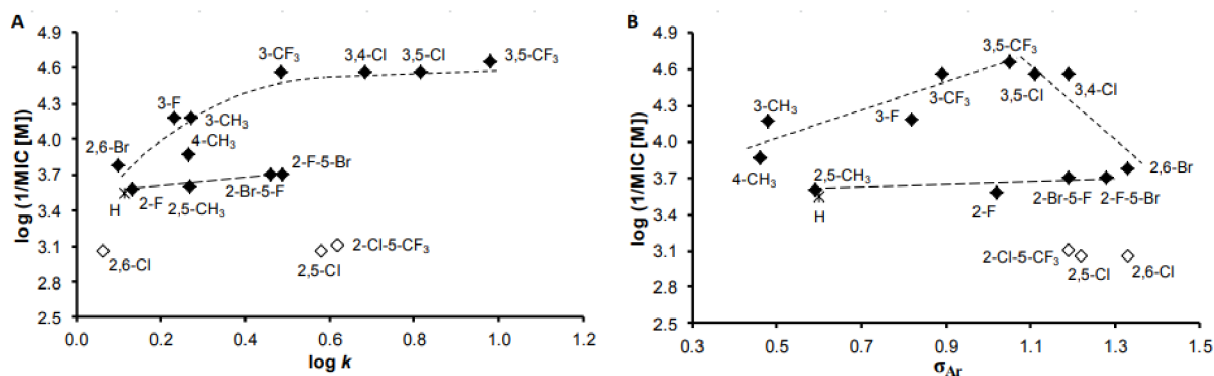
Pro hodnocení inhibiční a baktericidní aktivity vůči netuberkulózním mykobakteriím byla použita *M. smegmatis*. U *M. tuberculosis* byla z důvodu obtížné kultivace hodnocena pouze inhibiční aktivita. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 5.

**Tabulka 5:** Antimykobakteriální aktivita ( $[\mu\text{g/ml}] / [\mu\text{M}]$ ) derivátů cinnamamidů.

Slouč.	R	<i>M. smegmatis</i>		<i>M. tuberculosis</i>
		MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]	MBC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]	MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ] / [ $\mu\text{M}$ ]
T1	H	>256/>1146	>256/>1146	64/286
T2	3-CH <sub>3</sub>	>256/>1078	>256 />1078	16/67,43
T3	4-CH <sub>3</sub>	>256/>1078	>256/>1078	32/134
T4	2-F	>256/>1061	>256 />1061	64/265
T5	3-F	>256/>1061	>256/>1061	16/66,31
T6	3-CF <sub>3</sub>	256/>879	256/>879	8/27,47
T7	2,5-CH <sub>3</sub>	>256/>1018	>256/>1018	64/254
T8	2,5-Cl	>256/>876	>256/>876	256/876
T9	2,6-Cl	>256/>876	>256/>876	256/876
T10	3,4-Cl	>256/>876	>256/>876	8/27,38
T11	3,5-Cl	>256/>876	>256/>876	8/27,38
T12	2,6-Br	>256/>671	>256/>671	64/167
T13	3,5-CF <sub>3</sub>	>256/>713	>256/>713	822,27
T14	2-F-5-Br	>256/>799	>256/>799	64/199
T15	2-Br-5-F	>256/>799	>256/>799	64/199
T16	2-Cl-5-CF <sub>3</sub>	>256/>785	>256/>785	256/785
INH	-	64/467	64/467	5/36,6
CPX	-	0,125/0,4	0,125/0,4	1/3,0

Proti *M. smegmatis* nebyla zaznamenána žádná aktivita. Aktivita vůči *M. tuberculosis* byla v porovnání s antistafylokokovou aktivitou výrazně vyšší. Nejnižší hodnota MIC = 8  $\mu\text{g/ml}$  byla pozorována u sloučenin **T13** (R = 3,5-CF<sub>3</sub>), **T10** (R = 3,4-Cl), **T11** (R = 3,5-Cl), a **T6** (R = 3-CF<sub>3</sub>). Vztah mezi strukturou a aktivitou látek byl vyjádřen jako graf závislosti  $\log(1/\text{MIC} [\text{M}])$  na  $\log k$ . Pokud jsou z grafu závislosti eliminovány látky bez antimykobakteriální aktivity **T8**, **T9** a **T16** (vyjádřeny v grafu prázdnými symboly), lze pozorovat dva druhy závislosti účinku na pozici a typu substituentu. Z grafu uvedeném na Obr. 26A vyplývá, že u látek substituovaných v pozicích C<sub>(3)</sub>', C<sub>(3,4)</sub>', C<sub>(3,5)</sub>', nebo C<sub>(2,6)</sub>' se aktivita zvyšuje se zvyšující se lipofilitou až do hodnoty  $\log k \approx 0,5$ , což odpovídá látce **T6** (R = 3-CF<sub>3</sub>). Další zvýšení lipofility již nemá významný vliv na zvýšení antimykobakteriálního účinku.

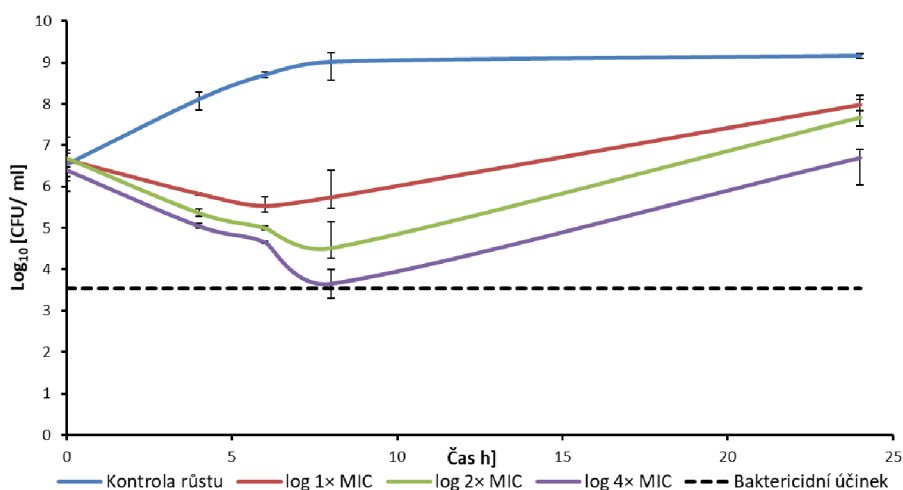
Je důležité poznamenat, že antituberkulózní aktivita diskutovaných cinnamanilidů je také závislá na elektronových  $\sigma$  parametrech, viz Obr. 26B. Lineární nevýznamně rostoucí závislost lze nalézt pro deriváty substituované na anilidu v polohách  $C_{(2)'}$  a  $C_{(2,5)'}$ ; zatímco bilineární závislost aktivity na  $\sigma$  je pozorovatelná pro deriváty substituované v polohách  $C_{(3)'}$ ,  $C_{(3,4)'}$ ,  $C_{(3,5)'}$ , nebo  $C_{(2,6)'}$ . Aktivita se zvyšuje se zvyšujícími se elektron-akceptorovými vlastnostmi ( $r = 0,8803$ ,  $n = 5$ ) na optimální  $\sigma_{Ar} \approx 1$  (sloučenina **T13**,  $R = 3,5\text{-CF}_3$ ) a poté s rostoucími hodnotami  $\sigma$  parametru klesá ( $r = 0,9162$ ,  $n = 4$ ).



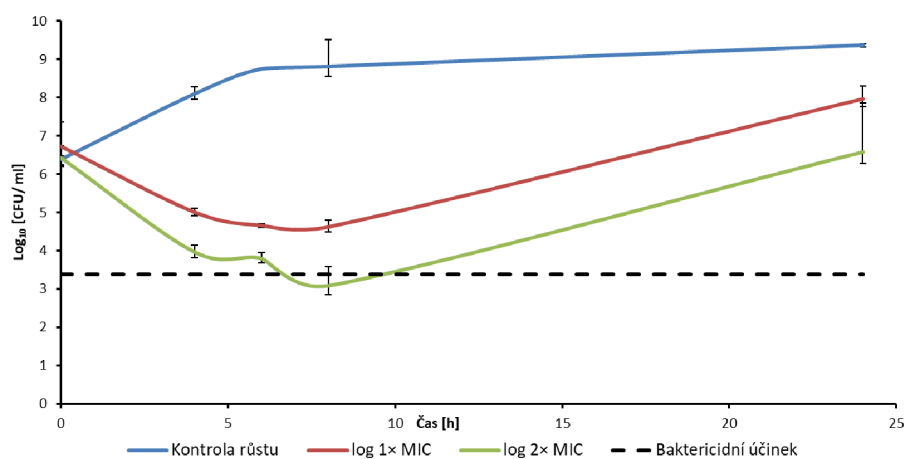
**Obrázek 26:** Vztah mezi antituberkulózní aktivitou proti *M. tuberculosis* vyjádřen jako  $\log(1/\text{MIC})$  a lipofilitou vyjádřenou jako  $\log k$  (obr. A) a vztah mezi aktivitou proti *M. tuberculosis* vyjádřen jako  $\log(1/\text{MIC})$  a elektronovými  $\sigma$  parametry anilidového kruhu. (obr. B). Neaktivní sloučeniny vyloučené z hodnocení SAR jsou zobrazeny prázdnými symboly.

#### 4.5.4 Dynamika antibakteriálního účinku vybraných derivátů cinnamamidů proti *S. aureus* ATCC 29213

Dynamika antibakteriálního účinku byla hodnocena u aktivních sloučenin **T6** a **T13** proti *S. aureus* ATCC 29213 (grafické znázornění výsledků viz Obr. 27 a 28). U sloučeniny **T13** byly hodnoceny koncentrace odpovídající hodnotě MIC a jejímu dvojnásobku, jelikož při koncentraci  $4 \times \text{MIC}$  docházelo pravděpodobně kvůli vysoké lipofilitě látky ke vzniku precipitátů. Sloučenina **T6** měla efekt pouze bakteriostatický, ačkoliv v čase 8 hodin při koncentraci  $4 \times \text{MIC}$  došlo k poklesu  $\log \text{CFU}$  o 2,75, což je na hranici baktericidního působení. Sloučenina **T13** působila baktericidně v koncentraci  $2 \times \text{MIC}$  8 hodin po začátku inkubace.



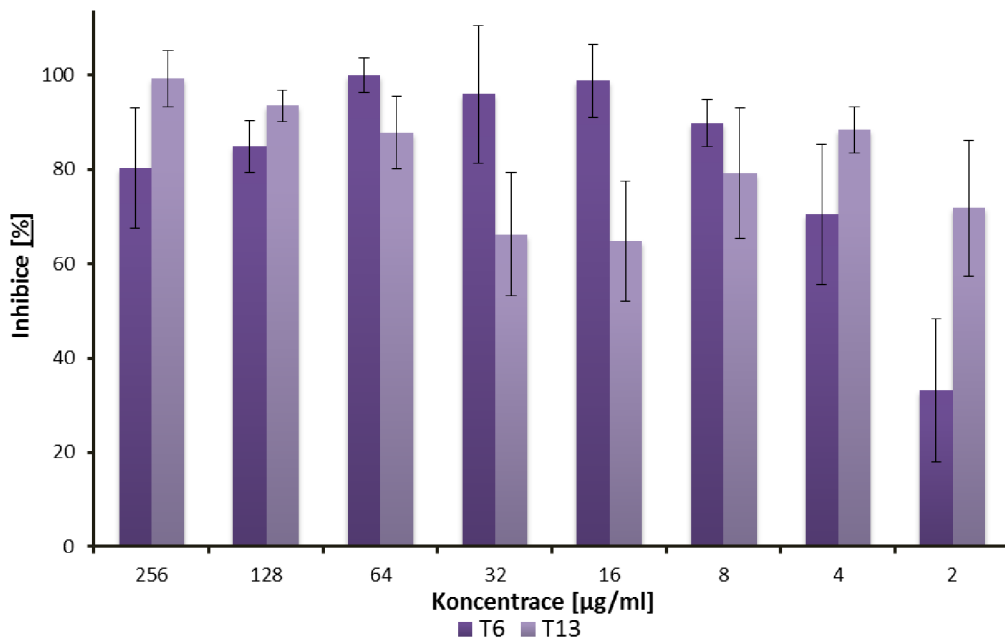
**Obrázek 27:** Dynamika antibakteriálního účinku sloučeniny **T6** proti *S. aureus* ATCC 29123.



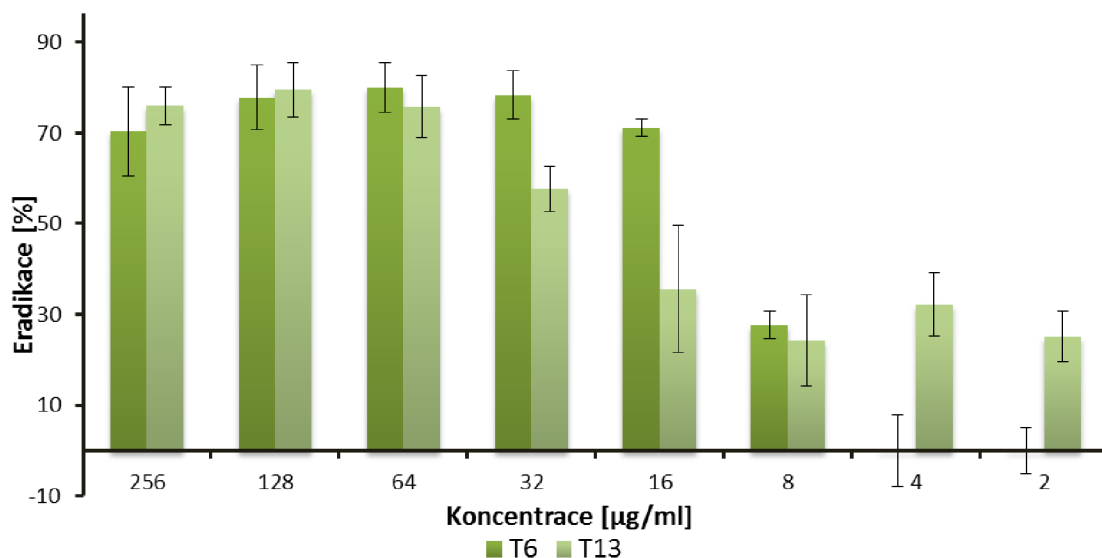
**Obrázek 28:** Dynamika antibakteriálního účinku sloučeniny **T13** proti *S. aureus* ATCC 29123.

#### 4.5.5 Antibiofilmová aktivita vybraných derivátů cinnamamidů

U sloučenin **T6** a **T13** byla hodnocena inhibiční a eradikační aktivita proti biofilmu *S. aureus* ATCC 29213; výsledky jsou zobrazeny na Obr. 29 a 30.



**Obrázek 29:** Inhibice formace biofilmu *S. aureus* ATCC 29213 sloučeninami **T6** a **T13**.



**Obrázek 30:** Eradikace biofilmu *S. aureus* ATCC 29213 sloučeninami **T6** a **T13**.

Sloučenina **T6** měla hodnotu  $MBIC_{(80)} = 8 \mu\text{g/ml}$ , což bylo shodné s hodnotou MIC proti planktonickým buňkám. Při koncentracích nad hodnotou MIC byl inhibiční efekt na formaci biofilmu koncentračně nezávislý, pouze při koncentraci  $256 \mu\text{g/ml}$  byla aktivita nižší než v následujících koncentracích. To mohlo být způsobeno lipofilitou látky a vznikem precipitátů v médiu.

U sloučeniny **T13** byla antibiofilmová aktivita nejnižší při koncentracích blízkých hodnotám MIC ( $32\text{--}16 \mu\text{g/ml}$ ), a poté se zvyšovala v sub-MIC koncentracích. To značí, že aktivita proti biofilmu není daná jen vlastní antibakteriální aktivitou látky, ale také



interakcí s faktory ovlivňujícími formování biofilmu. Eradikační aktivita měla podobný trend jako inhibice formace biofilmu. Eradikace vyšší než 80 % byla dosažena pouze u látky **T6** v koncentraci 64 µg/ml; minimální koncentrace potřebné k eradikaci alespoň 50 % biofilmu byly 8 µg/ml u látky **T6** a 32 µg/ml u látky **T13**. Tyto koncentrace jsou shodné s hodnotami MBC pro planktonické buňky.

Ačkoliv obecně jsou biofilmy násobně rezistentnější než planktonické buňky, v literatuře je možné nalézt mnoho studií zabývajících se deriváty kyseliny skořicové, které působí proti biofilmům i v sub-MIC koncentraci. Budzynska et al. (2011) popsali vysokou antibiofilmovou aktivitu esenciálních olejů v porovnání s aktivitou proti planktonickým buňkám. Výsledky získané Nuryastutim et al. (2009) ukázaly, že skořicový olej inhibuje formaci a eradikuje biofilm *S. epidermidis* v koncentracích rovných MIC. Albano et al. (2011) studovali aktivitu cinnamaldehydu proti *S. epidermidis*. Koncentrace odpovídající 60 % MIC byly schopné redukovat formaci biofilmu *S. epidermidis*. V eradikaci prematurovaného biofilmu byly nutné koncentrace odpovídající 4–8násobku MIC. De Vita et al. (2016) studovali aktivitu derivátů kyseliny skořicové proti kvasinkovému biofilmu. Látky inhibovaly formaci biofilmu v koncentracích 10krát menších než MFC. He et al. (2019) prokázali aktivitu cinnamaldehydu v sub-MIC koncentracích proti biofilmu *S. mutans*. Látka vyvolávala down-regulaci genů *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *gbpB*, *comDE*, *vicR*, *clpH*, *relA* a *ldh*, které se podílí na formaci biofilmu. Námi dosažené výsledky jsou tedy v souladu s publikovanou literaturou.

#### **4.5.6 Vliv na quorum sensing u *Chromobacterium violaceum***

Vzhledem k antibiofilmové aktivitě v sub-MIC koncentracích a na základě aktivity proti *quorum sensing* u strukturně podobných látek byly nejaktivnější látky **T6** a **T13** hodnoceny jako inhibitory *quorum sensing* u *Ch. violaceum*. Žádná ze sloučenin v koncentraci 10 mg/ml neinhibovala růst *Ch. violaceum* ani produkci violaceinu.

Malheiro et al. (2019) hodnotili antibakteriální aktivitu řady derivátů kyseliny skořicové včetně cinnamamidu a cinnamaldehydu. Na rozdíl od cinnamaldehydu nevyhazoval cinnammamid žádnou aktivitu proti *S. aureus* (MIC > 25 mM), ale byl schopný inhibovat QS u *Ch. violaceum* v koncentraci 5 mM. To je přibližně 9krát nižší koncentrace, než námi použitá hodnocená koncentrace u látky **T1** (R = H), která QS neinhibovala. Malheiro ovšem použil bujonovu metodu. V našem případě nebylo možné v těchto koncentracích testovat bujonovou metodou, neboť koncentrace DMSO by inhibovala růst bakterie.

#### 4.5.7 Kombinovaný účinek derivátů cinnamamidů

Sloučeniny **T6** a **T13** byly hodnoceny v kombinaci s tetracyklinem, ciprofloxacinem a vankomycinem proti methicilin-rezistentním stafylokokům. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 6. FIC index je vyjádřen pro všechny hodnocené jamky formou intervalu dosažených hodnot.

**Tabulka 6:** Kombinovaný účinek vybraných derivátů cinnamamidů a klinicky užívaných antibiotik proti methicilin-rezistentním stafylokokům. (TET = tetracyklin, CPX = ciprofloxacin, VAN = vankomycin)

Izolát	Kombinace látek	MIC [µg/ml]	FIC Index	Koncentrace [µg/ml] vyvolávající synergismus	Koncentrace [µg/ml] vyvolávající aditivní efekt
MRSA 63718	T6/TET	8/128	0.625–1.125	–	2/64; 8/32
	T6/CPX	16/16	0.75–1.125	–	8/4; 4/8
	T6/VAN	32/2	1.000–1.250	–	–
MRSA SA 3202	T6/TET	16/64	1.002–1.25	–	–
	T6/CPX	8/8	1.000–1.250	–	–
	T6/VAN	8/1	0.750–1.256	–	4/0.25
	T13/TET	32/64	0.500–1.125	8/16	16/16; 4/32; 2/64
	T13/CPX	32/8	0.375–1.250	8/1	2/4
	T13/VAN	32/1	0.750–1.25	–	16/0.25
MRSA SA 630	T6/CPX	8/256	0.625–1.125	–	4/64; 1/128
	T6/VAN	8/1	0.750–1.250	–	2/0.5
	T13/CPX	8/256	0.375–1.004	2/32; 1/64	4/8
	T13/VAN	4/1	0.562–1.250	–	0.25/0.5

U látky **T6** nebyla zaznamenána žádná interakce při kombinaci s konvenčně používanými antibiotiky. Látka **T13** působila synergicky s ciprofloxacinem a tetracyklinem u kmenu MRSA SA 3202 při použití koncentrací odpovídajících 1/4 MIC zjištěných při kombinovaném testu. Je nutno podotknout, že tento izolát je k ciprofloxacinu asi 8krát citlivější než izolát MRSA SA 630 a je rezistentní k tetracyklinu. U kmene MRSA SA 630, který je k ciprofloxacinu rezistentní, byla synergie pozorována u kombinace **T13**+ciprofloxacin.

Aditivní účinek byl pozorován u kombinace **T6**+ciprofloxacin a **T6**+vankomycin proti MRSA 63718 a u kombinace **T6**+vankomycin proti MRSA SA 3202. U kmene MRSA SA 630 byl alespoň aditivní účinek pozorován u všech hodnocených kombinací.

Mechanismus rezistence MRSA SA 630 k ciprofloxacinu není znám. Jednou z možností je eflux antibiotika efluxními pumpami. Sloučenina **T13** by pak mohla působit jako inhibitor těchto pump a tím zvyšovat účinek ciprofloxacinu. Jedna z nejčastějších efluxních pump u stafylokoků je pumpa NorA patřící do rodiny „major facilitator family“ (MFS) a je zodpovědná za eflux látek jako je ciprofloxacin, norfloxacin nebo ethidium bromid (Michalet et al., 2007). Některé cinnamamidy jsou prokázány inhibitory pumpy

NorA (Radix et al., 2018). Pro ověření tohoto předpokladu by bylo vhodné otestovat aktivitu látky **T13** i proti izolátu *S. aureus*, který má zvýšenou expresi genu *norA*.

#### 4.5.8 Antifungální aktivita derivátů cinnamidů

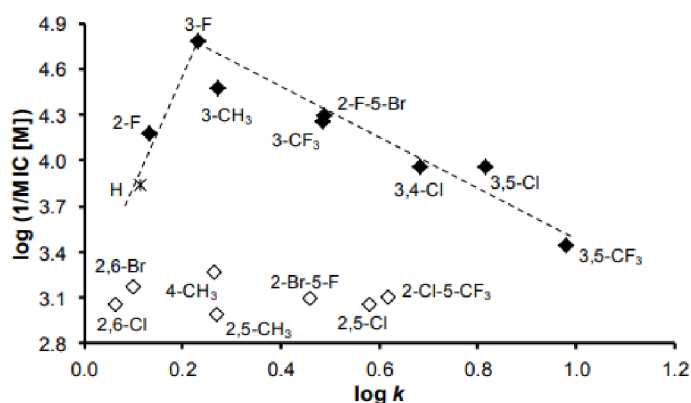
Antifungální aktivita derivátů cinnamidů byla hodnocena proti třem kmenům *Candida* a proti rostlinným patogenům *F. avenaceum* a *B. sorokiniana* (výsledky viz Tabulka 7) U sloučenin byla dále stanovena toxicita vůči buňkám lidské monocytární leukémie THP-1 (provedeno Dr. Kauerovou) a stanovena inhibice fotosyntetického transportu elektronů (PET) v chloroplastech špenátu (provedeno Dr. Kosem).

**Tabulka 7:** Antifungální aktivita (MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ], resp. [ $\mu\text{M}$ ]) derivátů cinnamidů. Toxicita (TOX IC<sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]) vůči buňkám řady THP-1. PET inhibice (IC<sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]) transportu elektronů.

Slouč.	R	MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ]/ [ $\mu\text{M}$ ]					IC <sub>50</sub>	
		<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>B. sorokiniana</i>	TOX	PET
<b>T1</b>	H	>128/ >573	>128/ >573	>128/ >573	256 1146	32 143	-	250
<b>T2</b>	3-CH <sub>3</sub>	>128/ >539	>128/ >539	>128/ >539	64 270	8 33.71	>30	343
<b>T3</b>	4-CH <sub>3</sub>	>128/ >539	>128/ >539	>128/ >539	256/ 1078	128 539	-	320
<b>T4</b>	2-F	>128/ >530	>128/ >530	>128/ >530	256/ 1061	16 66.32	-	233
<b>T5</b>	3-F	>128/ >530	>128/ >530	>128/ >530	128 531	4 16.58	>30	165
<b>T6</b>	3-CF <sub>3</sub>	>128/ >440	>128/ >440	>128/ >440	16/ 54.93	16/ 54.93	22.72 $\pm 1.73$	189
<b>T7</b>	2,5-CH <sub>3</sub>	>128/ >509	>128/ >509	>128/ >509	256 1019	256 1019	-	338
<b>T8</b>	2,5-Cl	>128/ >438	>128/ >438	>128/ >438	256/ 876	256/ 876	-	67.1
<b>T9</b>	2,6-Cl	>128/ >438	>128/ >438	>128/ >438	256/ 876	256/ 876	-	1380
<b>T10</b>	3,4-Cl	>128/ >438	>128/ >438	>128/ >438	64 219	32 110	29.81 $\pm 0.31$	54.9
<b>T11</b>	3,5-Cl	>128/ >438	>128/ >438	>128/ >438	64 219	32 110	29.44 $\pm 1.73$	5.1
<b>T12</b>	2,6-Br	>128/ >336	>128/ >336	>128/ >336	256 671	256 671	-	732
<b>T13</b>	3,5-CF <sub>3</sub>	>128/ >357	>128/ >357	>128/ >357	256 713	128 356	22.59 $\pm 1.88$	111
<b>T14</b>	2-F- 5-Br	>128/ >400	>128/ >400	>128/ >400	256 799	16 49.98	-	188
<b>T15</b>	2-Br- 5-F	>128/ >400	>128/ >400	>128/ >400	256 799	256 799	-	205
<b>T16</b>	2-Cl- 5-CF <sub>3</sub>	>128/ >393	>128/ >393	>128/ >393	256/ 785	256/ 785	-	63.2
<b>AMF</b>	-	0,5/0,54	1/1,1	0,5/0,54	-	-	-	-
<b>5-FLU</b>	-	1/7,7	8/62,0	0,125/1	-	-	-	-
<b>BEN</b>	-	-	-	-	0,5/1,9	5/17,2	-	-

Látky nevykazovaly žádnou aktivitu proti *C. albicans* (MIC >128 ug/ml), stejně jako proti dalším testovaným kmenům, *C. krusei* a *C. parapsilosis*. Oproti tomu některé deriváty měly dobrou aktivitu proti *Bipolaris sorokiniana*, což je houba třídy *Ascomycetes*, napadající rostliny. Nejlepší aktivita byla pozorována u látek **T5** (R = 3-F, MIC= 4 µg/ml; 16,58 mM) a **T2** (R = 3-CH<sub>3</sub>, MIC= 8 µg/ml; 33,71 mM), kdy jsou inhibiční koncentrace srovnatelné se standardem Benomyl. U látek **T4** (R = 2-F), **T6** (R = 3-CF<sub>3</sub>) a **T14** (R = 2-F-5-Br) byla pozorována středně silná aktivita (MIC=16 µg/ml) proti tomuto patogenu. V porovnání s aktivitou proti *B. sorokiniana* byly hodnoty MIC proti *Fusarium avenaceum* výrazně vyšší. Jediná látka vykazující významnou aktivitu (MIC= 16 µg/ml, 54,93 mM) byla **T6** substituovaná trifluormethylem v pozici C<sub>(3)</sub>'.

Vztah struktury a aktivity hodnocených sloučenin proti *B. sorokiniana* je vyjádřen v grafu na Obr. 31. Obecně lze říci, že aktivní sloučeniny byly substituovány v poloze C<sub>(3)</sub>', C<sub>(3,5)</sub>', nebo C<sub>(3,4)</sub>'. Při odstranění neaktivních sloučenin (vyznačených v grafu prázdnými symboly) lze pozorovat bilineární závislost. Aktivita se zvyšuje se zvyšující se lipofilitou od nesubstituovaného derivátu **T1** až k **T5** (R = 3-F), kdy je hodnota lipofility log *k* = 0.23, a pak klesá k látce **T13** (R = 3,5-CF<sub>3</sub>). Toto pozorování je v opozici s výsledky zjištěnými pro *M. tuberculosis*, což může být vysvětleno rozdílnou stavbou mezi mykobakteriální a fungální buněčnou stěnou.



**Obrázek 31:** Vztah mezi *in vitro* aktivitou hodnocených derivátů cinnamamidů vůči *B. sorokiniana* log(1/MIC [M]) a jejich lipofilitou (vyjádřena jako log *k*). Sloučeniny vyřazené z hodnocení jsou znázorněny prázdnými symboly.

#### 4.5.9 Inhibice germinace *Bipolaris sorokiniana* deriváty cinnamamidů

U všech sloučenin byla hodnocena schopnost inhibovat klíčení spor *B. sorokiniana*. Látky byly testovány ve dvou koncentracích (128 and 256 µg/ml) a schopnost inhibice

germinace byla vyjádřena jako procento nenaklíčených spor v porovnání s kontrolou. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 8.

**Tabulka 8:** Inhibice germinace *B. sorokiniana* deriváty cinnamamidů.

Slouč.	Konc. [µg/ml]	Inhibice [%] ve srovnání s neg. kontrolou	Slouč.	Konc. [µg/ml]	Inhibice [%] ve srovnání s neg. kontrolou
<b>T1</b>	256	59,6	<b>T9</b>	256	85,2
	128	74,2		128	76,3
<b>T2</b>	256	64,7	<b>T10</b>	256	84,3
	128	59,1		128	51,3
<b>T3</b>	256	88,7	<b>T11</b>	256	84,8
	128	89,1		128	82,6
<b>T4</b>	256	60,8	<b>T12</b>	256	91,3
	128	58,7		128	82,1
<b>T5</b>	256	93,6	<b>T13</b>	256	76,3
	128	95,4		128	75,5
<b>T6</b>	256	18,4	<b>T14</b>	256	81,8
	128	26,7		128	77,6
<b>T7</b>	256	73,5	<b>T15</b>	256	100
	128	35,1		128	60,9
<b>T8</b>	256	92,7	<b>T16</b>	256	82,6
	128	88,7		128	61,2
<b>BNM</b>	10	100	<b>BNM</b>	10	100
	5	100		5	100

Obecně lze říci, že kromě sloučeniny **T6** a **T7** ( $R = 2,5\text{-CH}_3$ ) všechny látky v obou koncentracích inhibovaly germinaci alespoň 50 % spor. Efekt byl koncentračně závislý u látek **T10** ( $R = 3,4\text{-Cl}$ ), **T15** ( $R = 2\text{-Br-5-F}$ ) a **T16** ( $R = 2\text{-Cl-5-CF}_3$ ). U látky **T7** pouze koncentrace 256 µg/ml byla schopna inhibovat alespoň toto množství, látka **T6** inhibovala pouze 18,4 % spor v koncentraci 256 µg/ml a 26,7 % spor v koncentraci 128 µg/ml. Vyšší aktivita při nižší koncentraci mohla být způsobena vysokou lipofilitou látky a tím pádem horší rozpustností ve vyšší koncentraci. Stejný efekt byl pozorován u látek **T1** a **T3** ( $R = 4\text{-CH}_3$ ). Je zajímavé, že sloučenina **T6**, která výrazně inhibovala růst mycelií obou hodnocených hub, nevykazovala žádný efekt na inhibici germinace.

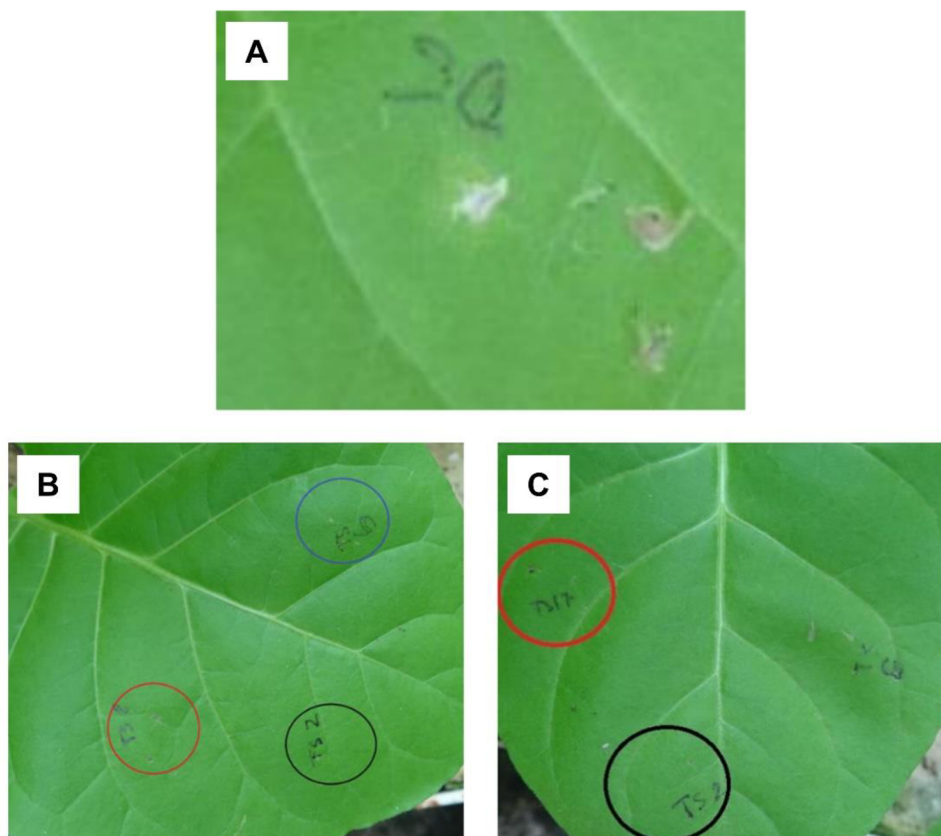
Sloučeniny **T2** ( $R = 3\text{-CH}_3$ ), **T4** ( $R = 2\text{-F}$ ), **T5** ( $R = 3\text{-F}$ ) a **T14** ( $R = 2\text{-F-5-Br}$ ) vykazovaly celkově slibné výsledky v boji proti *B. sorokiniana*, neboť měly dobrý efekt jak na růst mycelia, tak na inhibici germinace. Neaktivnější látka **T5** inhibovala 80 % růstu mycelia při koncentraci  $\text{MIC}(80) = 4 \mu\text{g/ml}/16,56 \mu\text{M}$ .

#### 4.5.10 Toxicita vůči rostlinným buňkám vybraných derivátů cinnamamidů

U látek vykazujících nejvyšší antifungální aktivitu **T2**, **T5**, **T6**, a **T14** byla hodnocena *in vivo* toxicita vůči rostlinným buňkám. Pro tento experiment byla použita rostlina *Nicotiana*

*tabacum* var. Samsun (Szabó et al., 2008) Výsledky po injekční aplikaci sloučenin do listů rostlin jsou viditelné na fotografiích na Obr. 32. Hodnocené sloučeniny stejně jako kontrolní roztok DMSO o stejné koncentraci neměly žádný viditelný toxický efekt na buňky. Oproti tomu kontrolní roztok 5% DMSO vykazoval výrazný toxický efekt, který se projevoval jako ztráta chlorofylu v zasažené oblasti.

Předpoklad o netoxicitě testovaných sloučenin vůči rostlinným buňkám je podpořen i výsledky PET-inhibiční aktivity, provedené Dr. Kosem. V porovnání se standardem Diuronem (DCMU, 3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea), byl inhibiční efekt na transport elektronů u těchto derivátů asi 30–60krát menší. Testované deriváty cinnamamidu, zejména sloučenina **T5**, jsou tedy perspektivními látkami pro další studium na poli rostlinných fungicidů.



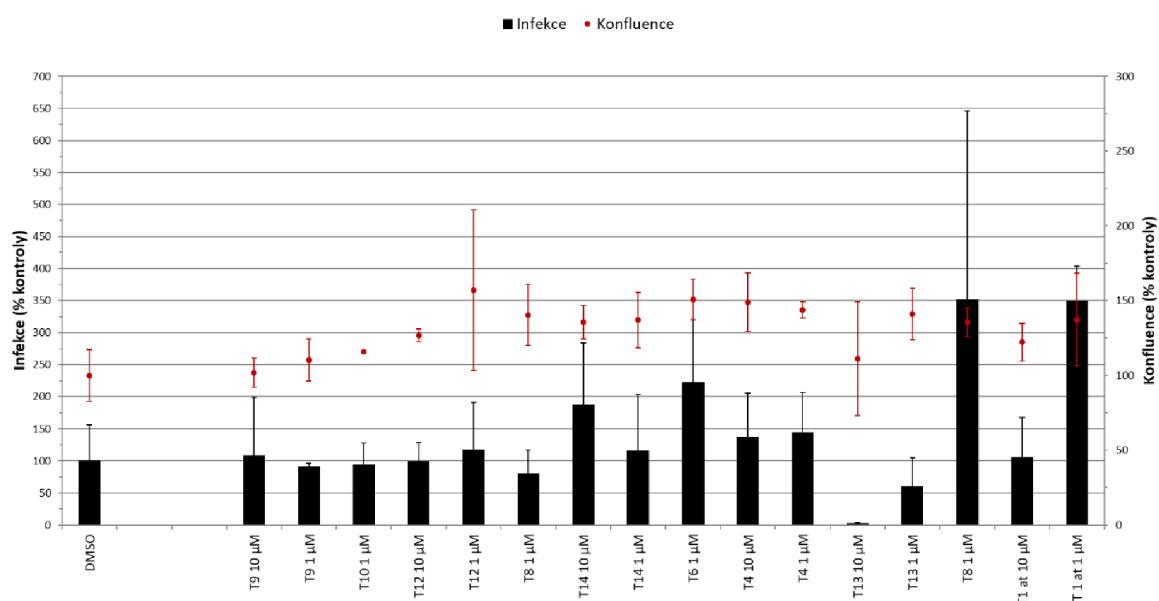
**Obrázek 32:** Toxický efekt 5 % DMSO (A) na list to *Nicotiana tabacum* v porovnání s nextickým efektem sloučeniny **T2** (modrý kruh), **T5** (červený kruh), a **T6** (černý kruh) (B) a netoxickým efektem látky **T6** (černý kruh) a **T14** (červený kruh). (C) Černé tečky v injektované oblasti látky **T5** jsou způsobeny poškozením listu injekční jehlou.

#### 4.5.11 Inhibiční aktivita derivátů cinnamamidů na *Plasmodium berghei*

U vybraných derivátů byla hodnocena inhibiční aktivita proti hepatální fázi růstu parazita *Plasmodium berghei*. Aktivita sloučenin byla hodnocena v koncentracích 1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ . Výsledky jsou zobrazeny v grafu na Obr. 33 jako procenta inhibice růstu parazita a procenta konfluence hepatocytů v porovnání s kontrolou, kterou bylo DMSO ve stejné koncentraci jako ve vzorcích (0.1 %). U sloučenin **T10**, **T8**, **T6** a **T18** došlo při koncentraci 10  $\mu\text{M}$  k bakteriální kontaminaci, která se projevila jako prudké zvýšení buněčné konfluence, a proto byly tyto hodnoty vyřazeny.

Jediná sloučenina s aktivitou proti *P. berghei* byla látka **T13**, která v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  snížila infekci na  $2,14 \pm 1,15$  % a v koncentraci 1  $\mu\text{M}$  na  $60,6 \pm 44,4$  %. Všechny ostatní sloučeniny byly neaktivní.

Aktivita derivátů kyseliny skořicové proti původcům malárie je známa již řadu let. V roce 1992 publikovali Kanaani a Ginsburg (1991) studii zabývající se efektem derivátů kyseliny skořicové na intra-erytrocytální fázi *P. falciparum*. Aktivita sloučenin byla závislá na jejich lipofilitě. Nejvyšší inhibiční efekt sloučeniny **T13** tedy může být vysvětlen její nejvyšší lipofilitou z celého testovaného souboru.



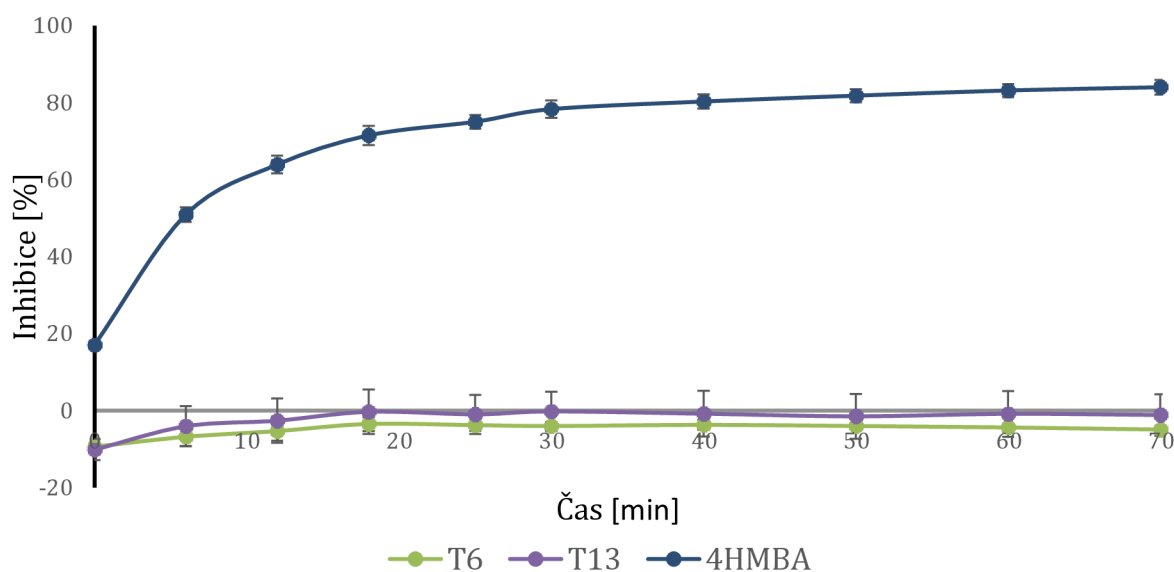
**Obrázek 33:** Inhibiční aktivita vybraných derivátů cinnamamidů proti hepatální fázi *Plasmodium berghei*.

#### 4.5.12 Inhibice sortasy

U sloučenin **T6** a **T13** byla hodnocena schopnost inhibice sortasy. Sortasy jsou skupina membránově vázaných transpeptidas, které se nachází u grampozitivních bakterií.

Sortasa A katalyzuje vznik amidové vazby mezi peptidoglykanovými vrstvami. Pro hodnocení byl použit set SensoLyte 520 Sortase A Assay Kit od firmy Anaspec (viz metodiku). Inhibice byla měřena jako inhibice fluorescence vzhledem k negativní kontrole. Jako pozitivní kontrola byla použita sloučenina 4-(hydroxymercuri)benzoová kyselina, která je prokázaným inhibitorem sortasy s hodnotou  $IC_{50} = 50,6$  nM.

Hodnoty fluorescence Ex/Em 490/520 nm byly měřeny po dobu 60 min. Jak je vidět z Obr. 34, sloučeniny **TS6** ani **TS13** neinhibují sortasu. U referenční sloučeniny byla po uplynutí 60 minut naměřena inhibice  $83,13 \pm 1,7$  %.



**Obrázek 34:** Inhibiční aktivita sloučenin **T6** a **T13** na enzym sortasa A.

#### 4.5.13 Závěr

Bylo otestováno 16 sloučenin odvozených od cinnamamidu. Významná antistafylokoková aktivita byla prokázána pouze u sloučenin **T6** ( $R = 3-CF_3$ ) a **T13** ( $R = 3,5-CF_3$ ). Sloučeniny zvyšovaly aktivitu ciprofloxacinu proti ciprofloxacin-rezistentnímu izolátu MRSA SA 630, což mohlo být ovlivněno interakcí s efluxními pumpami. Tyto látky zároveň inhibovaly a eradikovaly biofilm *S. aureus* v koncentracích rovných MIC a MBC. Na základně dobré antibiofilmové aktivity a strukturní podobnosti s publikovanými inhibitory byly látky hodnoceny také jako inhibitory *quorum sensing* u *Chromobacterium violaceum*, tato aktivita u nich ale prokázána nebyla. Sloučenina **T13** měla také jako jediná aktivitu na hepatální stádium parazita *Plasmodium berghei*.

Sloučenina **T5** ( $R = 3-F$ ) měla nejvyšší aktivitu proti rostlinnému patogenu *Bipolaris sorochiana*, a to jak při hodnocení inhibice mycelia i germinace spor, a zároveň neinhibovala



PET, nepůsobila toxicky na buňky pokožky listů *Nicotiana tabacum* při *in vivo* experimentu a byla nevýznamně toxická i vůči humánním lymfocytům řady THP-1. Díky selektivě je tato sloučenina perspektivní pro další studium jako fungicid při ochraně rostlin.

Závěry lze shrnout do několika bodů:

- Aktivita derivátů cinnamamidů proti stafylokokům nezávisí na přítomnosti genu *mec-A* a je pozitivně ovlivněná substitucí triflumethylovými skupinami
- Sloučeniny **T6** a **T13** inhibovaly a eradikovaly biofilm v koncentracích rovných jejich MIC a MBC proti planktonickým buňkám a neměly vliv na *quorum sensing* u *Ch. violaceum*
- Sloučeniny **T6** a **T13** zvyšovaly aktivitu ciprofloxacinu proti ciprofloxacin-rezistentnímu izolátu MRSA SA 630
- Jediná sloučenina **T13** vykazovala aktivitu proti *Plasmodium berghei*
- Sloučenina **T5** vykazovala silnou inhibiční aktivitu na růst a klíčení *Bipolaris sorokiniana* bez toxického vlivu na listy rostliny *N. tabacum* a procesy fotosyntézy.

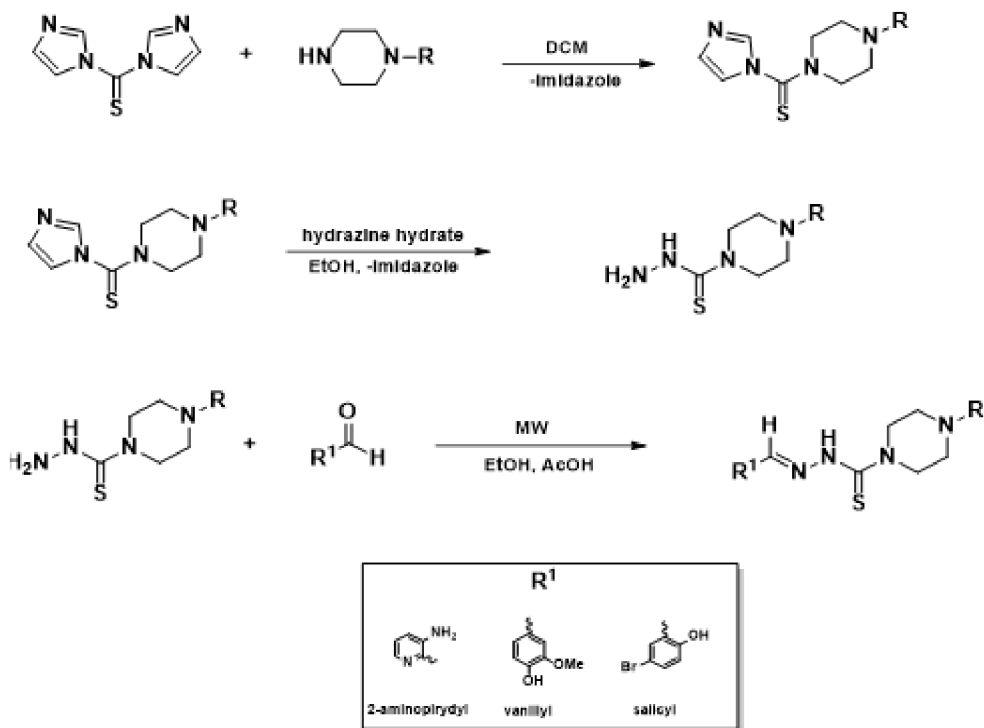
## 4.6 Protiinvazivní aktivita derivátů thiosemikarbazonů

Thiosemikarbazony jsou skupina látek obsahujících dusík a síru, které jsou schopny tvořit komplexy s kovy (Çavuşoğlu et al., 2018). Mezi jejich farmakologické účinky patří efekt antibakteriální (Khan & Yusuf, 2009; Bisceglie et al., 2020, Govender et al., 2019), antivirový (Padmanabhan et al., 2017), cytostatický (Whitnall et al., 2006; Kovacevic et al., 2011; Serda et al., 2014) nebo antifungální (Opletalová et al., 2008). V posledních letech se zkoumá i možnost jejich využití v léčbě Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby. Sloučeniny působí například jako MAO-inhibitory (Mathew et al., 2018).

Přesný mechanismus antibakteriálního a cytotoxického působení thiosemikarbazonů není znám, ale na základě řady studií popisujících interakce s různými buněčnými strukturami lze říci, že látky interagují s celou řadou struktur v prokaryotických i eukaryotických buňkách. Látky například vyvolávají disrupci membránového potenciálu a interagují s plazmatickou membránou (Singh, 2016).

### 4.6.1 Charakteristika hodnocených derivátů thiosemikarbazonů

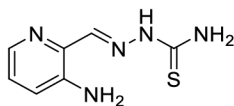
Sloučeniny byly připraveny v týmu prof. Polanského a prof. Musiola ze Slezské univerzity v Katovicích. Syntéza je znázorněna na Obr. 35.



Obrázek 35: Syntéza derivátů thiosemikarbazonů.

#### 4.6.2 Screening antimikrobiální aktivity derivátů thiosemikarbazonů

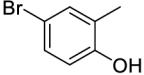

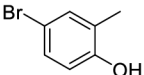
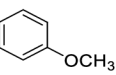
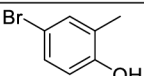
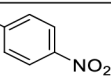
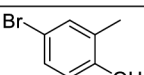
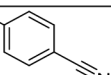
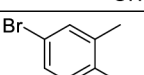

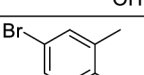
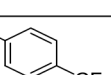
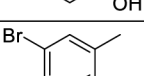
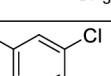
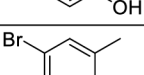

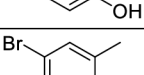
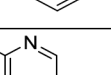
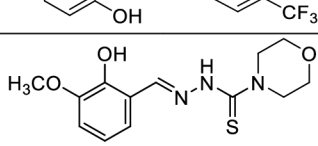
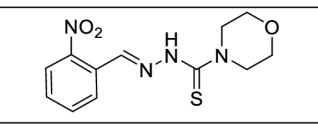
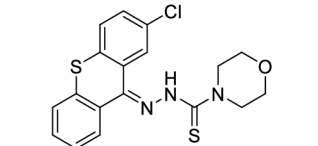
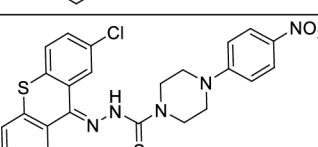
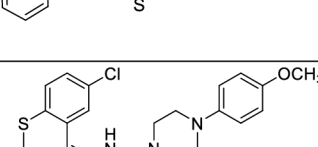
Struktury jednotlivých hodnocených thiosemikarbazonů jsou zobrazeny v Tabulce 9. Inspiraci pro první sérii těchto potenciálně antimikrobních sloučenin byl triapin, zobrazený na Obr. 36.



**Obrázek 36:** Struktura triapinu.

**Tabulka 9:** Struktury hodnocených derivátů thiosemikarbazonů (vyjádřeny pomocí substituentů  $R^1$  a  $R^2$  navázaných na výše uvedené obecné strukturu), hodnoty lipofility vyjádřené jako  $ClogP$  a toxicita vůči fibroblastům linie NHDF a buněčné linii HCT 116 (buňky humánního střevního karcinomu). Cytotoxicita a  $ClogP$  byly stanoveny na Univerzitě v Katovicích.

Slouč.	$R^1$	$R^2$	$ClogP$	HCT 116 [ $\mu M$ ]	NHDF [ $\mu M$ ]
MR169			1,71±0,70	1,450±0,452	>25
MR203			3,56±0,70	0,308±0,022	>25
MR191			2,68±0,65	6,94±2,30	13,52±4,76
MR174			2,57±0,70	0,422±0,113	>25
MR60			2,36±0,67	>25	Nd
MR204			4,71±0,67	22,55±1,36	-
MR101			4,12±0,69	12,10±1,03	>25
MR105			1,64±0,67	>25	Nd
MR38			4,24±0,68	13,16±1,54	21,51±3,02

MR47			3,49±0,69	8,03±1,23	19,93±2,81
MR36			3,30±0,69	7,99±1,72	15,62±0,92
MR39			3,94±0,70	6,57±4,56	17,03±3,76
MR45			3,37±0,74	<b>5,30±1,33</b>	<b>&gt;25</b>
MR92			4,26±0,73	4,58±0,45	18,53±5,2
MR90			4,74±0,72	4,76±0,78	14,48±0,79
MR93			5,05±0,74	<b>5,38±0,63</b>	<b>&gt;25</b>
MR94			2,57±0,70	9,56±1,09	<b>&gt;25</b>
MR91			4,22±0,73	<b>4,00±0,62</b>	<b>&gt;25</b>
MR80			0,81±0,64	>25	-
MR206			1,65±0,67	-	-
MR253			4,88±0,66	-	-
MR63			6,98±0,66	-	-
MR256			6,89±0,67	-	-

#### 4.6.3 Screening antibakteriální aktivity derivátů thiosemikarbazonů

Minimální inhibiční a baktericidní koncentrace derivátů thiosemikarbazonů byla stanovena na 4 izolátech *S. aureus* a na referenčním izolátu *E. faecalis* ATCC 29213. Výsledky jsou zobrazeny v Tabulce 10.

**Tabulka 10:** MIC a MBC ( $[\mu\text{g/ml}]$ , resp.  $[\mu\text{M}]$ ) hodnoty derivátů thiosemikarbazonů proti stafylokokům a *E. faecalis* ATCC 29213. (APM = ampicilin, CPX = ciprofloxacin)

Slouč.	MIC (MBC) $[\mu\text{g/ml}]$ / MIC (MBC) $[\mu\text{M}]$				
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	MRSA 63718	MRSA SA 630	MRSA SA 3202	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
<b>Triapine</b>	64 (128)/ 328 (656)	64 (64)/ 328 (328)	128 (256)/ 656 (1311)	64 (256)/ 328 (1311)	256 (>256)/ 1311 (>1311)
<b>MR169</b>	64 (>256)/ 175 (>701)	256 (>256)/ 701 (>701)	64 (256)/ 175 (701)	32 (>256)/ 87.5 (>701)	32 (>256)/ 87.5 (>701)
<b>MR203</b>	64 (>256)/ 148 (>594)	128 (>256)/ 297 (>594)	64 (>256)/ 148 (>594)	128 (128)/ 297 (297)	32 (>256)/ 74.3 (>594)
<b>MR191</b>	128 (>256)/ 374 (>749)	32 (32)/ 93.7 (93.7)	32 (>256)/ 93.7 (>749)	32 (256)/ 93.7 (749)	>256 (>256)/ 749 (>749)
<b>MR174</b>	32 (>256)/ 78.1 (>625)	>256 (>256)/ 625 (>625)	128 (>256)/ 312 (>625)	32 (>256)/ 78.1 (>625)	64 (>256)/ 156 (>625)
<b>MR60</b>	64 (>256)/ 159 (>639)	128 (256)/ 319 (639)	128 (>256)/ 319 (>639)	64 (>256)/ 159 (>639)	256 (>256)/ 639 (>639)
<b>MR204</b>	>256 (>256)/ >555 (>555)	>256 (>256)/ >555 (>555)	>256 (>255)/ >555 (>555)	>256 (>256)/ >555 (>555)	64 (>256)/ 138 (>555)
<b>MR101</b>	64 (64)/ 146 (146)	256 (256)/ 583 (583)	64 (>256)/ 146 (>583)	128 (128)/ 291 (291)	>256 (>256)/ >583 (>583)
<b>MR105</b>	32 (32)/ 86 (86)	64 (64)/ 172 (172)	256 (>256)/ 689 (>689)	64 (64)/ 172 (172)	>256 (>256)/ >689 (>689)
<b>MR38</b>	128 (>256)/ 301 (>602)	128 (>256)/ 301 (>602)	128 (>256)/ 301 (>602)	64 (128)/ 150 (301)	64 (>256)/ 150 (>602)
<b>MR47</b>	64 (>256)/ 153 (>610)	128 (>256)/ 305 (>610)	128 (>256)/ 305 (>610)	64 (>256)/ 153 (>610)	256 (>256)/ 610 (>610)
<b>MR36</b>	>256 (>256)/ 571 (>571)	>256 (>256)/ 571 (>571)	>256 (>256)/ >571 (>571)	>256 (>256)/ >571 (>571)	256 (>256)/ 571 (>571)
<b>MR39</b>	>256 (>256)/ 551 (>551)	>256 (>256)/ >551 (>551)	128 (>256)/ 275 (>551)	128 (>256)/ 275 (>551)	>256 (>256)/ >551 (>551)
<b>MR45</b>	>256 (>256)/ >576 (>576)	128 (256)/ 288 (576)	128 (>256)/ 288 (>576)	128 (>256)/ 288 (>576)	>256 (>256)/ >576 (>576)
<b>MR92</b>	256 (>256)/ 516 (>516)	>256 (>256)/ >516 (>516)	128 (>256)/ 258 (>516)	256 (>256)/ 516 (>516)	>256 (>256)/ >516 (>516)
<b>MR90</b>	32 (128)/ 65.6 (262)	64 (>256)/ 131 (>525)	64 (>256)/ 131 (>525)	64 (>256)/ 131 (>525)	>256 (>256)/ >525 (>525)
<b>MR93</b>	128 (128)/ 262 (262)	256 (>256)/ 524 (>524)	256 (256)/ 524 (524)	256 (256)/ 524 (524)	>256 (>256)/ >524 (>524)
<b>MR94</b>	16 (>256)/ 38,1 (>609)	64 (>256)/ 152 (>609)	16 (>256)/ 38,1 (>609)	32 (256)/ 76,1 (>609)	>256 (>256)/ >609 (>609)
<b>MR91</b>	64 (>256)/ 131 (>524)	128 (>256)/ 262 (>524)	64 (256)/ 131 (524)	64 (>256)/ 131 (>524)	256 (>256)/ 524 (>524)
<b>MR 80</b>	64 (64) / 198 (198)	128 (128)/ 396 (396)	128 (128)/ 396 (396)	64 (128)/ 198 (396)	>256 (>256)/ >729 (>792)
<b>MR206</b>	64 (>256)/ 218 (>873)	128 (>256)/ 436 (>873)	256 (>256)/ 873 (>873)	128 (128)/ 436 (436)	>256 (>256)/ >873 (>873)
<b>MR253</b>	128 (256)/ 328 (656)	128 (256)/ 328 (656)	128 (>256)/ 328 (>656)	256 (>256)/ 656 (>656)	128 (>256)/ 328 (>656)
<b>MR63</b>	>256 (>256)/ >502 (>502)	>256 (>256)/ >502 (>502)	>256 (>256)/ >502 (>502)	>256 (>256)/ >502 (>502)	>256 (>256)/ >502 (>502)
<b>MR256</b>	64 (64)/ 133 (130)	>256 (>256)/ >517 (>517)	128 (>256)/ 259 (>517)	128 (128)/ 259 (259)	64 (>256)/ 130 (>517)

<b>APM</b>	2 (2)/ 5.7 (5,7)	>16 (>16)/ >45.8 (>45,8)	>16 (>16)/ >45.8 (>45,8)	>16 (>16)/ >45.8 (>45,8)	0,5 (0,5)/ 1 (1)
<b>CPX</b>	1 (1)/ 3 (3)	8 (8)/ 24.1 (24,1)	64 (128)/ 192 (385)	8 (8)/ 24.1 (24,1)	1 (1)/ 3,0 (3,0)

Aktivita hodnocených derivátů thiosemikarbazonů proti grampozitivním patogenům byla celkově nízká. Pouze sloučeniny **MR94**, **MR90**, **MR45**, **MR174**, **MR105** a **MR93** měly vyšší aktivitu vůči *S. aureus* ATCC 29213 než referenční sloučenina triapin. Žádná z látek neměla vyšší aktivitu než referenční antibakteriální látky ciprofloxacín a ampicilín. Pokud vezmeme v potaz cytotoxickou aktivitu jmenovaných látek, MIC proti stafylokokům je vyšší než hodnota IC<sub>50</sub> vůči střevním buňkám. U sloučeniny **MR 105** nelze přesný selektivní index určit, jelikož hodnota IC<sub>50</sub> je vyšší než limit měření 25 μM.

#### 4.6.4 Screening antimykobakteriální a antifungální aktivity derivátů thiosemikarbazonů

Na základě chemické struktury byla u derivátů thiosemikarbazonů předpokládána antimykobakteriální a antifungální aktivita, proto bylo hodnocení provedeno proti všem dostupným izolátům rodu *Mycobacteria* a *Candida*. U *M. smegmatis* byla navíc stanovena minimální baktericidní koncentrace. Výsledky jsou prezentovány v Tabulce 11.

**Tabulka 11:** Antimykobakteriální a antifungální aktivita derivátů thiosemikarbazonů. U *M. smegmatis* byly stanoveny hodnoty MIC i MBC ([μg/ml], resp. [μM]). U ostatních mikroorganismů byly stanoveny pouze hodnoty MIC.

Slouč.	MIC (MBC) [μg/ml] / MIC (MBC) [μM]						
	<i>Mtb</i> H37Ra	<i>M. smegmatis</i> ATCC 700084	<i>M. kansasii</i> DSM 44162	<i>M. marinum</i> CAMP 5644	<i>C. albicans</i> CCM 8361	<i>C. krusei</i> CCM 8271	<i>C. parapsilosis</i> CCM 8260
Triapin	32/164	4 (128)/ 20.5 (328)	32/164	32/164	32/164	32/164	32/164
MR169	32/87.5	64 (64)/ 175 (175)	64/175	64/175	4/10.9	0.5/1.37	4/10.9
MR203	4/9.29	256 (>256)/ 594 (>594)	4/9.29	2/4.65	0.25/0.58	0.25/0.58	0.5/1.16
MR191	128/374	256 (>256)/ 749 (>749)	4/11.71	2/5.86	1/2.93	0.5/1.46	0.5/1.46
MR174	128/312	32 (256)/ 78.1 (625)	4/9.76	2/4.88	1/2.44	0.25/0.61	0.5/1.22
MR60	16/39.9	256 (256)/ 639 (639)	32/79.9	128/319	16/39.9	8/19.9	4/9.99
MR204	64/138	256 (256)/ 555 (555)	>128/>278	>128/>278	2/4.34	4/8.68	4/8.68
MR101	64/146	64 (256)/ 146 (583)	16/36	64/146	2/4.55	8/18.21	1/2.28
MR105	128/345	64 (128)/ 172 (345)	128/345	256/689	64/172	32/86	128/345
MR38	4/9.40	128 (128)/ 301 (301)	16/37.6	32/75.2	4/9.40	8/18.8	32/75.2

<b>MR47</b>	128/305	32 (>256)/ 76 (>610)	256/610	128/305	32/76	<b>1/2.38</b>	64/153
<b>MR36</b>	>128/28 6	128 (128)/ 286 (286)	256/571	256/571	32/71	<b>1/2.23</b>	64/143
<b>MR39</b>	16/34.4	>256 (>256)/ >551 (>551)	>256/>551	>256/>551	<b>0.5/1.08</b>	<b>0.25/0.54</b>	<b>2/4.31</b>
<b>MR45</b>	32/72.0	>256 (>256)/ >576 (>576)	256/576	>256/ >576	<b>0.5/1.13</b>	<b>0.25/0.56</b>	<b>1/2.25</b>
<b>MR92</b>	64/129	32 (64)/ 65 (129)	64/129	128/258	16/32.3	16/32.3	32/65
<b>MR90</b>	32/65.6	64 (128)/ 131 (262)	<b>16/32.8</b>	64/131	<b>4/8.21</b>	<b>0.5/1.03</b>	<b>2/4.10</b>
<b>MR93</b>	32/65.5	64 (128)/ 131 (262)	<b>16/32.7</b>	128/262	<b>2/4.10</b>	<b>0.5/1.02</b>	2/4.10
<b>MR94</b>	8/19.03	128 (128)/ 304 (304)	32/76.1	128/304	<b>4/9.52</b>	<b>0.5/1.19</b>	64/152
<b>MR91</b>	16/32.7	64 (128)/ 131 (262)	<b>16/32.7</b>	128/262	<b>1/2.05</b>	<b>0.5/1.02</b>	8/16.38
<b>MR 80</b>	>128	256 (256)	<b>256</b>	256	<b>64</b>	<b>128</b>	128
<b>MR253</b>	>256/ >656	>256 (>256)/ >656 (>656)	>256/ >656	>256/ >656	>256/ >656	128/ 328	>256/ >656
<b>MR63</b>	<b>&gt;128/ &gt;251</b>	<b>128 (&gt;256)/ 251 (&gt;504)</b>	<b>256/504</b>	<b>&gt;256/&gt;504</b>	<b>32/63</b>	<b>64/126</b>	<b>32/63</b>
<b>CPX</b>	16/48.3	0,125/0,4	1/3.0	0,25/0,75	–	–	–
<b>AMF B</b>	–	–	–	–	1/1.1	2/2.2	2/2.2
<b>5-FLU</b>	–	–	–	–	1/7,7	16/124	0,125/1

Antimykobakteriální a zejména antifungální aktivita hodnocených thiosemikarbazonů byla v porovnání s aktivitou proti grampozitivním bakteriím mnohem vyšší. Pro přehlednost jsou všechny minimální inhibiční koncentrace nižší než 5  $\mu\text{M}$  označeny v Tabulce 11 tučně.

Sloučeniny **MR203**, **MR174**, **MR169** a **MR191** se lišily pouze v substituentu  $\text{R}^2$ ; substituent  $\text{R}^1$  byl u všech 3-aminopyridin-2-yl. Sloučenina **MR203** byla aktivní proti nejširšímu spektru patogenů; s výjimkou *M. smegmatis* byly všechny hodnoty MIC <10  $\mu\text{M}$ . Sloučenina byla proti *M. tuberculosis* aktivnější než všechny referenční antibakteriální látky ciprofloxacin, rifampicin a isoniazid, a proti všem kmenům *Candida* měla nižší hodnoty minimální fungistatické aktivity než flucytosin a amfotericin B. Sloučenina **MR203** měla ovšem nejnižší hodnotu  $\text{IC}_{50}$  vůči střevním buňkám, a tato hodnota byla asi poloviční vzhledem k nejnižší hodnotě MFC. Aktivita této sloučeniny je tedy závislá na jejím nespecifickém cytotoxickém působení. Podobný poměr cytotoxického a antifungálního působení byl pozorován u látky **MR174**, která byla navíc jako jedna z mála aktivní proti *S. aureus* (viz výše).

Sloučenina **MR191** se od **MR174** lišila pouze nepřítomností skupiny  $\text{CF}_3$  na aminopyridinu. Tato změna neovlivňovala antimykobakteriální ani antifungální aktivitu, ale měla výrazný vliv na snížení cytotoxicity. U sloučeniny **MR169** se v poloze  $\text{R}^2$  nacházel

4-kyanofenyl. Tato záměna vedla k výraznému snížení aktivity v porovnání s předchozími sloučeninami.

Další podskupina sloučenin **MR60**, **MR204**, **MR101**, **MR105** byla substituována v R<sup>1</sup> pozici 4-hydroxy-3-methoxyfenylovou skupinou a lišila se substituenty v pozici R<sup>2</sup>. Antifungální aktivita byla násobně vyšší než antimykobakteriální. Zvýšení lipofility substituentu R<sup>2</sup> (**MR101**, **MR204**) vedlo ke zvýšení aktivity, ale i cytotoxického působení, ačkoliv hodnoty IC<sub>50</sub> i index selektivity byly vyšší než v předchozí podskupině. Sloučeninou s nejlepším selektivním indexem proti *C. krusei* byla látka **MR204**. Náhrada substituovaného benzenu (sloučeniny **MR101**, **MR60**) za pyridin (**MR105**) vedla ke snížení toxicity ale bohužel i aktivity.

Třetí podskupinu tvořilo 10 sloučenin nesoucí 5-brom-2-hydroxyfenyl v pozici R<sup>1</sup> a různé substituenty v pozici R<sup>2</sup>. Derivát **MR38** substituovaný v poloze R<sup>2</sup> cyklohexylem vykázal vysokou aktivitu proti *M. tuberculosis* (srovnatelnou s **MR203** a s rifampicinem). Podobně měla vysokou aktivitu i sloučenina **MR94** substituovaná pyridin-2-ylem. Na druhou stranu se ukázala být **MR38** pouze středně účinná na patogeny rodu *Candida* v porovnání s **MR94**. Ve skupině derivátů majících piperazin substituovaný fenylem lze vysledovat určité trendy v rámci vztahů mezi strukturou a antimikrobiální aktivitou. Celkově nejnižší aktivita proti *M. tuberculosis* byla pozorována u **MR47** a **MR36** lišící se od fenylového derivátu **MR47** pouze methoxyskupinou v poloze C<sub>(4)'</sub>. Obě sloučeniny mají rovněž srovnatelnou antifungální aktivitu, toxicitu a nejvyšší lipofilitu. Nesubstituovaný fenyl, resp. přítomnost hydrofilní elektron-donorové methoxyskupiny nemá tedy na aktivitu žádný vliv. Záměna methoxyskupiny v poloze C<sub>(4)'</sub> za nitro (**MR39**), resp. kyano (**MR45**) skupinu vede ke zvýšení antimykobakteriálního i antifungálního účinku přibližně čtyřnásobně. Substituce 4-CN skupinou zároveň vedla ke snížení toxicity v porovnání s **MR39** (4-NO<sub>2</sub>) a **MR36** (4-OCH<sub>3</sub>). Obě skupiny zvyšují lipofilitu sloučenin (ClogP 3,37, resp. 3,94), ale především vykazují výrazný elektron-akceptorový efekt; elektronový  $\sigma$  parametr pro celý substituovaný fenylový fragment vzroste z 0,36 (pro **MR36**), resp. 0,60 (pro **MR47**) na 1,05 (pro **MR45**) a 1,14 (pro **MR39**), která má nejvyšší antituberkulotickou aktivitu. V podskupině halogenovaných derivátů **MR90**, **MR92** a **MR93** lišících se typem halogenové substituce na fenylu se aktivita proti *M. tuberculosis* zvyšuje se zvyšující se lipofilitou v pořadí **MR92** (4-Br) < **MR 90** (4-CF<sub>3</sub>)  $\approx$  **MR 93** (3,4-Cl) a zároveň i se zvyšujícími se elektron-akceptorovými vlastnostmi 0,74 (4-Br)  $\ll$  0,95 (4-CF<sub>3</sub>)  $\approx$  1,19 (3,4-Cl). Blízká aktivita sloučenin **MR90** a **MR93** je pravděpodobně způsobena bioisosterií skupin CF<sub>3</sub> a 3,4-Cl. Podobná zjištění platí i pro antifungální aktivitu, kdy především v závislosti na elektron-

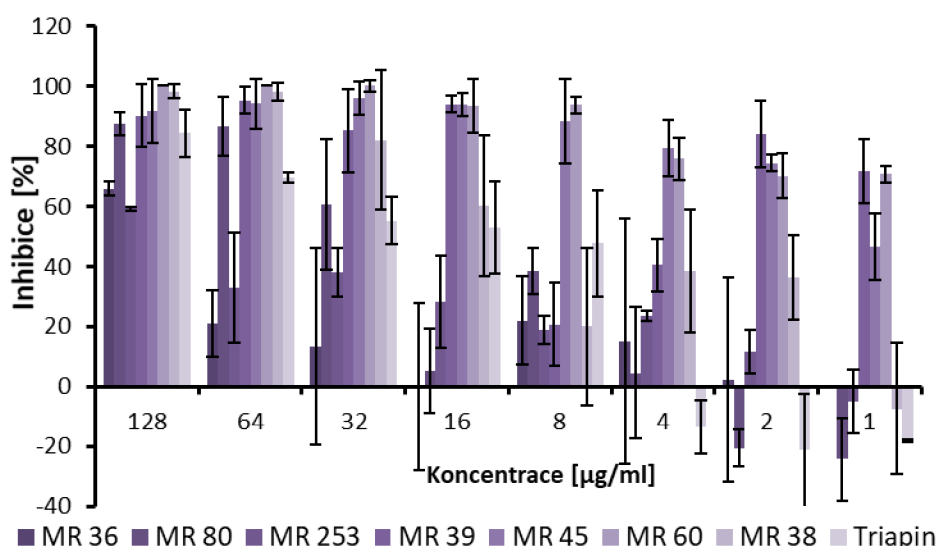


akceptorových vlastnostech substituentů v poloze C<sub>(4)'</sub> benzenového jádra vzrůstá aktivita. Lipofilita není tak klíčový parametr ani pro antifungální aktivitu. K podobným závěrům dospěli např. i Opletalová et al. (2008) při hodnocení antifungální aktivity derivátů thiosemikarbazonů nesoucích pyrazinový kruh. Lze tedy spekulovat, zda přítomnost skupin, které jsou přítomny ve sloučeninách **MR39** a **MR45**, schopných vytvářet vazby s intracelulárními biomolekulami a způsobující elektronový deficit thiosemikarbazonu umožňují interakce těchto sloučenin se specifickými metabolickými pochody v buňkách kvasinek, což vede k selektivnímu zvýšení aktivity. Jmenované sloučeniny mají také nejvyšší index selektivity z celého testovaného souboru a jsou tedy dále zajímavé z hlediska studia antifungální aktivity.

Čtvrtou skupinu tvořily sloučeniny, u kterých byla provedena změna v základním skeletu. Sloučeniny **MR80** a **MR206** byly místo piperazinu substituovány morfolinem, což vedlo k totální ztrátě antifungální i antimykobakteriální aktivity. Sloučeniny **MR63**, **MR253** a **MR256** byly v pozici R<sup>1</sup> substituované thioxantem namísto substituovaného benzenu nebo pyridinu. Mírnou aktivitu vykázal pouze derivát **MR63** s R<sup>2</sup> substitucí 4-NO<sub>2</sub> na fenylu. U sloučeniny **MR253** došlo rovněž k záměně piperazinu substituovány morfolinem, což způsobilo ztrátu jakékoli antimikrobiální aktivity.

#### **4.6.5 Antibiofilmová aktivita vybraných derivátů thiosemikarbazonů**

Vzhledem k dobré antifungální aktivitě byly vybrané sloučeniny testovány z hlediska schopnosti inhibovat vznik biofilmu *C. albicans*. Výsledky jsou zobrazeny v grafu na Obr. 37. Minimální fungistatické koncentrace a minimální biofilmové inhibiční koncentrace jsou porovnány v Tabulce 12.



**Obrázek 37:** Inhibice růstu biofilmu *C. albicans* vybranými deriváty thiosemikarbazonů. Pozn: U sloučeniny **MR36** není pro přehlednost grafu zobrazena inhibice v koncentraci 1 µg/ml, která byla  $-88.33 \pm 11,21$  %.

**Tabulka 12:** Porovnání minimální inhibiční aktivity vyjádřené jako minimální fungistatická aktivita (MFC) a minimální biofilmová fungistatická koncentrace (MBFC<sub>80</sub>) vybraných thiosemikarbazonů proti planktonickým buňkám *C. albicans* (MFC [µg/ml]) a bifilmu *C. albicans*. (MBCF<sub>80</sub> [µg/ml]).

Slouč.	MFC [µg/ml]	MBFC <sub>80</sub> [µg/ml]
<b>MR36</b>	32	>128
<b>MR80</b>	64	64
<b>MR253</b>	>128	>128
<b>MR39</b>	0.5	16
<b>MR45</b>	0.5	8
<b>MR60</b>	16	8
<b>MR38</b>	4	32
<b>Triapin</b>	32	128

Hodnota minimální biofilmové fungistatické koncentrace, která inhibovala tvorbu biofilmu alespoň z 80 %, byla kromě sloučenin **MR 80** a **MR 60** minimálně 4krát vyšší, než MFC. U látky **MR80** se MBFC rovnala MFC a u sloučeniny **MR60** byla poloviční. Vzhledem k rozdílné metodice použité pro získání hodnot MFC a MBFC a zejména porovnávání MFC<sub>100</sub> s hodnotou MBFC<sub>80</sub> se dá říci, že hodnoty jsou si rovny. Sloučeniny tedy neinhibují tvorbu biofilmu v koncentracích nižších než je hodnota MFC, naopak, některé z nich v nižších koncentracích tvorbu biofilmu indukují.

#### 4.6.6 Vliv sorbitolu na antifungální aktivitu vybraných derivátů thiosemikarbazonů

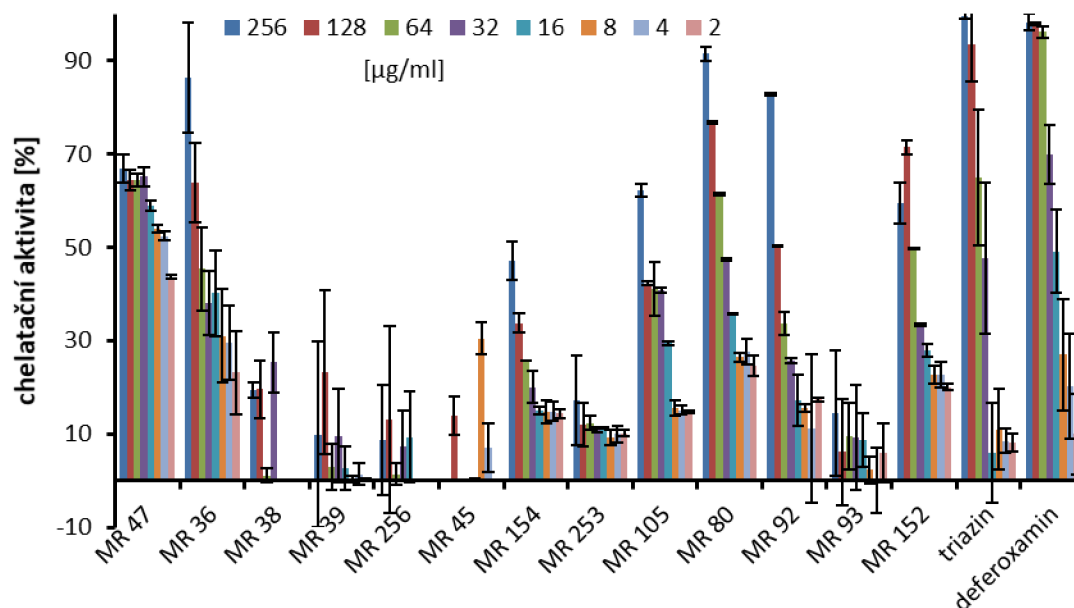
Buněčná stěna kvasinek slouží jako ochrana před hypotonickým prostředím, ve kterém se buňka nachází a brání tak osmotickým rupturám protoplastu. Enzymy zodpovědné za syntézu a další procesy v buněčné stěně jsou tak zajímavým cílem antimykotik. Pro zjištění, zda hodnocené látky interagují se syntézou buněčné stěny, je možné použít experiment se sorbitolem (viz metodiku). Sorbitol jakožto osmoticky aktivní látka stabilizuje kvasinkový protoplast a umožňuje růst i v prostředí inhibitorů buněčné stěny.

Deriváty thiosemikarbazonů s nejvyšší antifungální aktivitou **MR169**, **MR174**, **MR203**, **MR45** a **MR38** byly hodnoceny paralelně v médiu YNB s glukosou a v médiu obsahujícím navíc 0,8 M sorbitolu. Hodnoty MFC byly shodné v médiu obsahujícím sorbitol i bez sorbitolu. Sloučeniny tedy neovlivňují syntézu buněčné stěny *C. albicans*.

#### 4.6.7 Chelatační aktivita vybraných derivátů thiosemikarbazonů

Chelatační schopnosti thiosemikarbazonů obecně jsou považovány za jeden z klíčových mechanismů aktivity, u námi hodnocených sloučenin nebyla ale pozorována významná korelace mezi chelatačními vlastnostmi a aktivitou.

Deriváty **MR39** a **MR45** vykazaly jednu z nejsilnějších antifungálních aktivit (rozmezí 1,04-4,31  $\mu\text{M}$ ) v rámci všech hodnocených MR derivátů, ale chelatační aktivita obou sloučenin byla velice nízká. Tato skutečnost pravděpodobně souvisí s přítomností elektron-akceptorových skupin  $\text{NO}_2$  a  $\text{CN}$ , které snižují ochotu thiosemikarbazonové skupiny chelátovat kovy (Opletalová et al., 2008). Na druhou stranu, sloučenina **MR80**, jejíž jeden dusíkový atom byl inkorporován do morfolinu, leč její aktivita vůči patogenům byla nízká, vykazala výraznou chelatační aktivitu.



**Obrázek 38:** Chelatační aktivita vybraných derivátů thiosemikarbazonů.

#### 4.6.8 Závěr

Byla zhodnocena komplexní antibakteriální, antimykobakteriální a antifungální aktivita 23 nových derivátů thiosemikarbazonů. Sloučeniny obecně vykazovaly dobrou aktivitu proti všem kandidám a mykobakteriím; aktivita proti grampozitivním bakteriím byla oproti tomu nízká. Sloučeniny lze podle substituentů rozdělit do čtyř podskupin. U první podskupiny sloučenin, kde byl jako substituent  $R^1$  aminopyridin, měla antimikrobiální aktivita úzkou korelaci s celkovou toxicitou sloučenin. U druhé podskupiny sloučenin substituovaných v poloze  $R^1$  4-hydroxy-3-methoxyfenylem byla antifungální aktivita výrazně vyšší než aktivita antimykobakteriální. Sloučeniny s nejlepším indexem selektivity proti testovaným kvasinkám byly látky **MR204** a **MR101**. U podskupiny substituované v pozici  $R^1$  5-brom-2-hydroxyfenzyl byla antimykobakteriální aktivita příznivě ovlivněna zvyšující se lipofilitou a přítomností nitroskupiny. Sloučeniny substituované thioxantem ( $R^1$ ) nebo analoga s morfolinem místo piperazinu (substituce  $R^2$ ) ztratily jakoukoli antikrobiální účinnost.

U vybraných sloučenin byl hodnocen vliv na růst kvasinkového biofilmu a chelatační schopnosti. Žádná ze sloučenin neinhibovala tvorbu biofilmu v koncentracích nižších než MFC. Vztah mezi schopností chelatovat železo a antifungální aktivitou potvrzen nebyl. Chelatace tedy pravděpodobně není klíčový mechanismus účinku pro antifungální působení těchto látek.

Dosažené výsledky lze shrnout do několika bodů:

- Některé deriváty thiosemikarbazonů mají výborné antifungální účinky proti *Candida* spp. s hodnotami MFC nižšími než u referenčních antifungálních látek amfotericinu B a flucytosinu.
- Pro antifungální aktivitu je klíčová inkorporace dusíku thiosemikarbazonu do piperazinu, který je na druhém dusíku substituován buď objemným a lipofilním substituentem (benzhydryl) nebo fenylem substituovaným skupinou s výraznými elektron-akceptorovými vlastnostmi (4-CN, 4-NO<sub>2</sub>, 3,4-Cl).
- Antifungální aktivita není závislá na lipofilitě látek a nelze vysvětlit pouhými chelatačními schopnostmi daných sloučenin, stejně tak sloučeniny nemají vliv na buněčnou stěnu *C. albicans*.
- Pouze dvě sloučeniny inhibovaly formování kvasinkového biofilmu v koncentraci rovné nebo nižší než MFC. Naopak některé sloučeniny tvorbu biofilmu v koncentracích nižších než MFC indukovaly.

## 4.7 Protiinvazivní aktivita Schiffových bází odvozených od chinazolinonu a jejich měďnatých komplexů

Shiffovy báze jsou dusíkaté analogy aldehydů nebo ketonů, u kterých je karbonylová skupina nahrazena iminovou nebo azometinovou skupinou. Vznikají reakcí primárního aminu s aldehydem nebo ketonem za specifických podmínek. Jedná se o široce užívané chemické sloučeniny, které mají využití v organické syntéze, jako katalyzátory nebo jako barviva. Látky zároveň vykazují řadu biologických aktivit včetně antibakteriální, antifungální, protizánětlivé nebo antipyretické (da Silva et al., 2011).

Chinazolinové jádro se vyskytuje u asi 150 přírodních alkaloidů. Řada z nich se používá v tradiční medicíně, například trypantrin s antifungální aktivitou je součástí japonské lidové medicíny (Sharma et al., 2011). Chinazolinonové deriváty se na základě pozice keto nebo oxo skupiny rozdělují na tři typy.

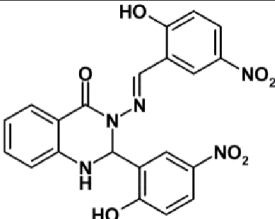
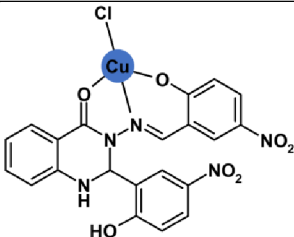
- A. 2(1*H*)chinazolinony,
- B. 4(3*H*)chinazolinony,
- C. 2,4(1*H*,3*H*)chinazolidiony

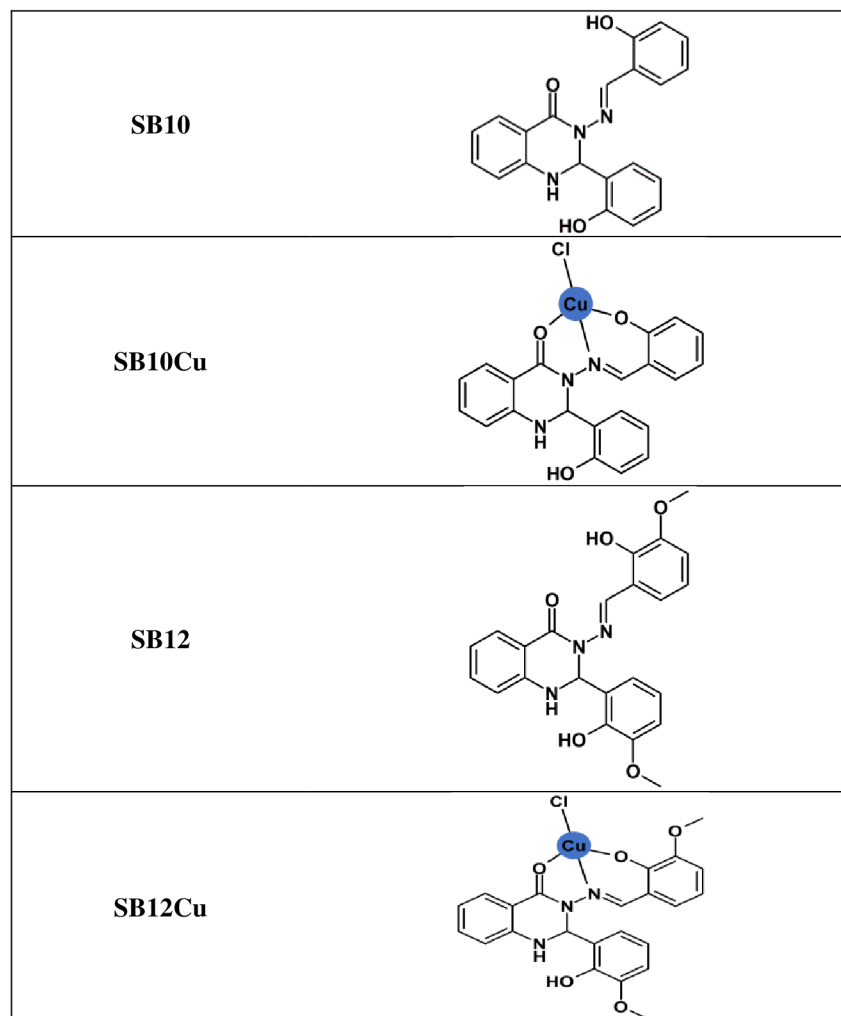
Z těchto skupin je obvykle největší pozornost věnována skupině B (Asif, 2014).

### 4.7.1 Charakteristika hodnocených bází a komplexů

Sloučeniny byly připraveny Dr. Zuzanou Hricovíniovou z Chemického ústavu Slovenské akademie věd. Ligandy již byly připraveny a popsány dříve různými autory (Gudasi et al., 2006; Zahedifard et al., 2015). Struktury sloučenin a jejich molekulové hmotnosti jsou uvedeny v Tabulce 13.

**Tabulka 13:** Struktury hodnocených sloučenin.

Sloučenina	Struktura
SB3	
SB3Cu	



#### 4.7.2 Screening antibakteriální aktivity hodnocených bazí a komplexů

Antibakteriální aktivita byla hodnocena proti 4 izolátům *S. aureus* a 4 izolátům *E. faecalis*. Výsledky jsou zobrazeny v Tabulce 14.

Z hodnocených ligandů vykazovala významnou antibakteriální aktivitu pouze sloučenina **SB3** substituovaná nitroskupinami a to pouze proti *S. aureus* a MRSA izolátům. Oproti tomu měďnaté komplexy vykazovaly přibližně srovnatelnou aktivitu a to bez ohledu na použitý ligand. Sloučeniny působily pouze proti *S. aureus*; všechny izoláty enterokoků byly rezistentní ( $\text{MIC} \geq 128 \mu\text{g/ml}$ ). Tento výsledek lze vysvětlit dvěma teoriemi:

- ligand a komplex mají vlastní odlišný mechanismus antibakteriální aktivity
- za vlastní aktivitu odpovídá ligand a komplex ji pouze zvyšuje zlepšením fyzikálně-chemických vlastností. Samotné ligandy **SB10** a **SB12** mají antibakteriální aktivitu jen ve vyšších koncentracích.

**Tabulka 14:** Antibakteriální aktivita Schiffových bází a jejich měďnatých komplexů. (SA= *S. aureus* ATCC 29213, EF = *E. faecalis* ATCC 29212, cytotoxicita (IC<sub>50</sub>) vůči leukemickým monocytům THP-1 hodnocená metodou WST-1).

Slouč	MIC (MBC) [μg/ml] / MIC(MBC) [μM]								THP-1 IC <sub>50</sub> [μM]
	SA	MRSA 63718	MRSA SA 3202	MRSA SA 630	EF	VRE 342B	VRE 368	VRE 725 B	
<b>SB3</b>	32 (128)/ 71,2 (284)	64 (128)/ 141 (284)	64 (128)/ 141 (284)	16 (16)/ 35,6 (35,6)	256 (256)/ 569 (569)	256 (>256)/ 569 (>569)	256 (>256)/ 569 (>569)	256 (>256)/ 569 (>569)	1274±1,15
<b>SB3 Cu</b>	16 (>256)/ 29,2 (>466)	64 (64)/ 116 (116)	16 (16)/ 29,2 (29,2)	8 (8)/ 14,6 (14,6)	128 (>256)/ 233 (>466)	256 (256)/ 466 (466)	256 (>256)/ 466 (>466)	256 (>256)/ 466 (>466)	0,31±1,17
<b>SB10</b>	>256 (>256)/ >712 (>712)	>256 (>256)/ >712 (>712)	>256 (>256)/ >712 (>712)	>256 (>256)/ >712 (>712)	>256 (>256)/ >712 (>712)	>256 (>256)/ >712 (>712)	>256 (>256)/ >712 (>712)	256 (>256)/ 712 (>712)	> 60
<b>SB10 Cu</b>	32 (32)/ 69,8 (69,8)	32 (32)/ 69,8 (69,8)	8 (8)/ 17,4 (17,4)	8 (8) / 17,4 (17,4)	256 (>256)/ 558 (>558)	256 (256)/ 558 (558)	256 (>256)/ 558 (>558)	256 (256)/ 558 (558)	0,20±1,43
<b>SB12</b>	>256 (>256)/ >610 (>610)	>256 (>256)/ >610 (>610)	128 (256)/ 305 (610)	128 (>256)/ 305 (>610)	>256 (>256)/ >610 (>610)	256 (>256)/ 610 (>610)	256 (>256)/ 610 (>610)	256 (>256)/ 610 (>610)	9,84±1,33
<b>SB12 Cu</b>	64 (64)/ 123 (123)	32 (32)/ 61,7 (61,7)	16 (32)/ 30,8 (61,7)	16 (16)/ 30,8 (30,8)	256 (>256)/ 493 (>493)	128 (>256)/ 246 (>493)	256 (>256)/ 493 (>493)	256 (>256)/ 493 (>493)	0,29±1,37
<b>AMP</b>	2 (2) / 5,7/5,7	16 (>16)/ 45,8 (45,8)	>16 (>16)/ >45,8 (45,8)	>16 (>16)/ >45,8 (45,8)	1 (1) / 2,8 (2,8)	4 (4) / 11,5 (11,5)	4 (4) / 11,5 (11,5)	4 (4) / 11,5 (11,5)	-
<b>CPX</b>	1 (1) / 3 (3)	8 (8) / 24,1 (24,1)	8 (8) / 24,1 (24,1)	64 (128) / 192 (385)	1 (1) / 3,0 (3,0)	1 (1) / 3,0 (3,0)	1 (1) / 3,0 (3,0)	64 (64) / 193 (193)	-

U sloučenin byla hodnocená cytotoxická aktivita vůči lymfatickým monocytům THP-1. Hodnocení bylo provedeno Mgr. Lucií Černou z RCPTM a hodnoty IC<sub>50</sub> jsou uvedeny v Tabulce 14. Na první pohled je zřejmé, že cytotoxický efekt komplexů byl násobně vyšší než samotných ligandů. Jediná sloučenina bez cytotoxického efektu na lymfocyty byla **SB10**, která ale nevykazovala žádnou antibakteriální ani antimykobakteriální aktivitu (viz dále). Nejaktivnější ligand **SB3** měl střední aktivitu toxicity (IC<sub>50</sub>=12,74±1,15 μM), tato hodnota byla ale stále skoro trojnásobná oproti nejnižší hodnotě MIC dosažené proti stafylokokům (MIC= 36,5 μM). Vytvoření komplexu **SB3Cu** vedlo k více než čtyřicetinásobnému zvýšení cytotoxického efektu, ale antibakteriální aktivita vzrostla pouze dvojnásobně. Vytvoření komplexu tedy nevede ke zvýšení selektivní aktivity proti bakteriím.

Sloučenina **SB3** již byla z hlediska cytotoxického efektu podrobně charakterizována. Hricoviniová et al. (2018) hodnotili toxicitu na linii hepatocytů HepG2. Tento model se používá pro studium jaterního metabolismu a toxicity xenobiotik a genotoxik. Toxicita sloučeniny **SB3** byla pouze nevýznamná, takže IC<sub>50</sub> nebylo možné stanovit.

Zahedifard et al. (2015) připravili sloučeninu **SB3** a studovali její efekt na nádorové buňky linie MCF7. Sloučenina vyvolávala apoptózu zvýšením tvorby ROS, což vedlo k disrupci mitochondriálního membránového potenciálu a úniku cytochromu c do cytosolu. Cytochrom c aktivoval iniciační kaspázu 9, která následně aktivovala efektorové kaspázy 3



a 7, což vedlo k apoptóze. Látka navíc indukovala apoptózu i vnější drahou aktivace, aktivací kaspázy 8.

Existuje řada studií popisujících antibakteriální aktivitu strukturně podobných Shiffových bazí a jejich komplexů, většina je ale zaměřena na sloučeniny obsahující dihydrochinazolin-4(3*H*)-on. Zhang et al. (2016) popsali syntézu a antibakteriální aktivitu Shiffových bazí odvozených od bis-2,3-dihydrochinazolin-4(1*H*)-onu. Sloučeniny byly aktivní zejména proti *S. lactis* a *S. aureus*, aktivita proti gramnegativním patogenům byla nízká. Aktivita látek se zvyšovala zavedením halogenu, který zvyšoval lipofilitu a stabilitu sloučeniny. Náhrada benzenu za pyridin nebo furan taktéž vedla je zvýšení aktivity. Prasad et al. (2011) studovali diorganotinové komplexy odvozené od 4(3*H*)-chinazolinu. Antibakteriální aktivita komplexů byla ve srovnání s ligandem asi dvojnásobná, což autoři vysvětlují na základě Tweedyho chelatanční teorie. Chelatace vede ke zvýšení lipofility sloučenin, což usnadňuje jejich průnik do buňky a tím vede ke zvýšení antibakteriální aktivity. U sloučenin byla prokázána schopnost interkalačně se vázat na DNA. Ke stejným výsledkům ohledně zvýšení lipofility dospěl i Al-Amiery (2012), Islam et al. (2011) nebo Raman et al. (2014). V těchto studiích ovšem nebyl hodnocen cytotoxický efekt na eukaryotické buňky. Swamy et al. (2013) připravili měďnatý komplex odvozený od 4(1*H*)-chinazolinu s potenciálním antibakteriálním účinkem. Sloučeniny působily proti grampozitivním patogenům, aktivita proti gramnegativním bakteriím a kvasinkám pozorována nebyla. Aktivita komplexů byla v porovnání s ligandem asi dvojnásobná. Toxicita hodnocena nebyla.

Pokud se zaměříme na srovnání aktivit různých ligandů s antibakteriální aktivitou a jejich metalokomplexů, chelatace obecně vede ke zvýšení aktivity tím, že zvyšuje lipofilitu látek a usnadňuje jejich vstup do buňky. K tomuto výsledku dospěli například Imran et al., (2007) při hodnocení antibakteriálního efektu iminů odvozených od ciprofloxacinu a jejich komplexů. Mohahan et al. (2014) při studiu komplexů Shiffových bazí s lanthanem. Rosu et al. (2010) při studiu komplexů odvozených od 4-amino-2,3-dimethyl-1-fenyl-3-pyrazolin-5-onu nebo Nair et al. (2012) hodnotící antibakteriální aktivitu Shiffových bazí odvozených od indol-3-karboxaldehydu a kyseliny *m*-aminobenzoové a jejich komplexů. Na základě výše uvedených studií lze říct, že komplexace sloučenin zvyšovala jejich aktivitu, ale nositelem aktivity je převážně ligand. Žádná ze studií ale nehodnotila toxicitu na eukaryotické buňky ani nepoužívala jako standart jinou sloučeninu použitého kovu.

Chohan (2009) hodnotil antibakteriální, antifungální a cytotoxickou aktivitu furanyl-substituovaných sulfonamidů a jejich komplexů s mědí, zinkem, niklem a kobaltem.

Komplexace obecně vedla ke zvýšení účinku, nejaktivnější byly komplexy se zinkem. Toxicita byla hodnocena na *Artemia salina*. Pouze měďnaté komplexy vykazovaly toxické působení. Atria et al. (2011) studovali antibakteriální a cytotoxickou aktivitu měďnatých a kobaltnatých komplexů s ligandy odvozenými od imidazolu. Sloučeniny působily antibakteriálně, ale hodnoty MIC byly vyšší než hodnoty IC<sub>50</sub> u humáních nefronů řady linie HEK 293.

Existují i studie popisující antibakteriální aktivitu komplexů s ligandem bez vlastní aktivity. Tavman et al. (2003) studovali antibakteriální aktivitu komplexů stříbra, mědi, železa a zinku s ligandy odvozenými od benzimidazolu. Některé měďnaté komplexy vykazovaly antibakteriální aktivitu proti *S. aureus*, ačkoliv samotný ligand i CuNO<sub>3</sub> použitý jako standart aktivitu neměly. Antibakteriální efekt měďnatých komplexů byl ale v porovnání s komplexy stříbra a zinku nižší. De Paiva et al. (2012) hodnotili antibakteriální aktivitu stříbrného komplexu nimesulidu. Nimesulid je sloučenina s antiflogistickým efektem, která nemá vlastní antibakteriální aktivitu. Komplex měl antibakteriální aktivitu proti *S. aureus*, *E. coli* a *P. aeruginosa*, ale kromě *S. aureus* byla inhibiční aktivita nižší než u AgNO<sub>3</sub> použitého jako standart. Bykowska et al. (2018) hodnotili mechanismus cytotoxického působení měďných a měďnatých komplexů fosfinových derivátů fluorochinolonů. Toxicita komplexů byla vyšší než toxicita fluorochinolonů a jejich derivátů, stejně jako toxicita měďnatých a měďných solí. Měďné komplexy měly nižší IC<sub>50</sub> než měďnaté komplexy. Měďnaté komplexy také indukovaly tvorbu ROS více než ostatní hodnocené sloučeniny.

Na základě zjištěných antibakteriálních a cytotoxických hodnot samotných ligandů a jejich měďnatých komplexů a porovnáním s publikovanými studiemi lze říci, že antibakteriální efekt komplexů je ovlivněn jak strukturou ligandu, tak i druhem kovu a jeho oxidačním stavem. Antibakteriální aktivita ligandu **SB3** je podmíněna přítomností nitroskupiny, který umožňuje interakci s řadou enzymů nutných pro přežívání bakteriální buňky. Cytotoxický efekt látky pravděpodobně souvisí s generací ROS a vyvolání apoptózy. (Zahedifard et al., 2015). Antibakteriální aktivita ostatních sloučenin je vyvolána pouze přítomností mědi. Komplexace vedoucí ke zvýšení aktivity je přímo spojená s toxickým efektem komplexů, který je nejspíš vyvolán zvýšením produkce ROS nebo interkalací s DNA. Vzhledem k tomu, že hodnoty IC<sub>50</sub> jsou násobně nižší než hodnoty MIC, nemohou být tyto látky dále studovány jako potenciální antibiotika. Jedinou možnou aplikací by mohl být vývoj dezinfekčních prostředků, kdy by nedocházelo k přímému kontaktu s organismem.

### 4.7.3 Screening antimykobakteriální aktivity Shiffových bazí a komplexů

Antimykobakteriální inhibiční aktivita byla stanovena proti všem kmenům mykobakterií a je shrnuta v Tabulce 15. U kmenů *M. smegmatis* a *M. kansasii* byla stanovena i minimální baktericidní koncentrace.

**Tabulka 15:** Antimykobakteriální aktivita Shiffových bazí a jejich měďnatých komplexů.

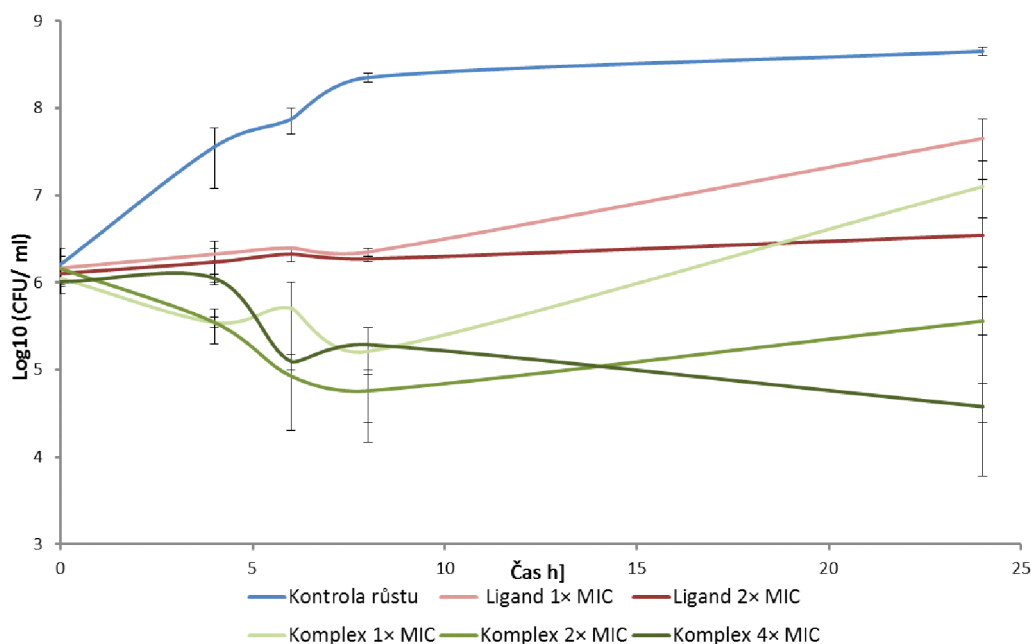
Slouč.	MIC (MBC) [ $\mu\text{g/ml}$ ] / MIC(MBC) [ $\mu\text{M}$ ]			
	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<b>SB3</b>	128 (128)/	128 (128)/	64/	64/
	284 (284)	284 (284)	142	142
<b>SB3Cu</b>	64 (64)/	128 (128)/	128/	32/
	116 (116)	233 (233)	233	58,4
<b>SB10</b>	>256 (>256)/	>256 (>256)/	>256/	>128/
	>712 (>712)	>712 (>712)	>712	>356
<b>SB10Cu</b>	64 (64)/	256 (256)/	>256/	16/
	123 (123)	493 (493)	>493	30,9
<b>SB12</b>	256 (>256)/	256 (>256) /	128/	>128/
	>610 (>610)	>610 (>610)	305	>305
<b>SB12Cu</b>	64 (64)/	128 (128)/	256/	32 /
	123 (123)	246 (246)	293	61,7
<b>INH</b>	16/117	4/29,1	32/234	8/58
<b>CPX</b>	0,125/0,4	1/3,0	0,25/0,75	16/48,3

Stejně jako u grampozitivních bakterií měly komplexy vyšší aktivitu i proti mykobakteriím. Neaktivnější sloučenina **Sb10Cu** působila proti *M. tuberculosis* v koncentraci 16  $\mu\text{g/ml}$  (30,9  $\mu\text{M}$ ). Oproti tomu komplex **SB3Cu** s ligandem substituovaným nitroskupinou, který vykazoval nejvyšší aktivitu proti stafylokokům, byl asi 4krát méně aktivní. Substituce nitroskupinou tedy přináší výhodu z hlediska antistafylokokového působení, ale nemá vliv na antimykobakteriální aktivitu. Stejně jako u antibakteriální aktivity, i antimykobakteriální aktivita koreluje s cytotoxicitou, index selektivity je ale ještě nižší. Hodnota MIC u neaktivnější sloučeniny **SB10Cu** proti *M. tuberculosis* je asi 150krát vyšší než její cytotoxicita (30.9  $\mu\text{M}$  vs. 0.2  $\mu\text{M}$ ). Neaktivnější ligand **SB3** měl MIC vůči *M. tuberculosis* asi 11krát vyšší, než bylo jeho  $\text{IC}_{50}$ . Stejně jako u grampozitivních bakterií, vytvoření měďnatého komplexu vedlo k výrazně slabšímu zvýšení antibakteriálního účinku vzhledem k účinku cytotoxickému.

### 4.7.4 Dynamika antibakteriální aktivity Shiffových bazí a komplexů

Dynamika antibakteriální aktivity proti *S. aureus* ATCC 29213 byla hodnocena pouze u sloučenin **SB3** v koncentraci  $1\times\text{MIC}$  a  $2\times\text{MIC}$  a **SB3Cu** ve všech koncentracích; ostatní látky měly vysoké hodnoty MIC. Vliv koncentrace a času inkubace jednotlivých látek na bakteriální růst jsou graficky zobrazeny na Obrázku 39.

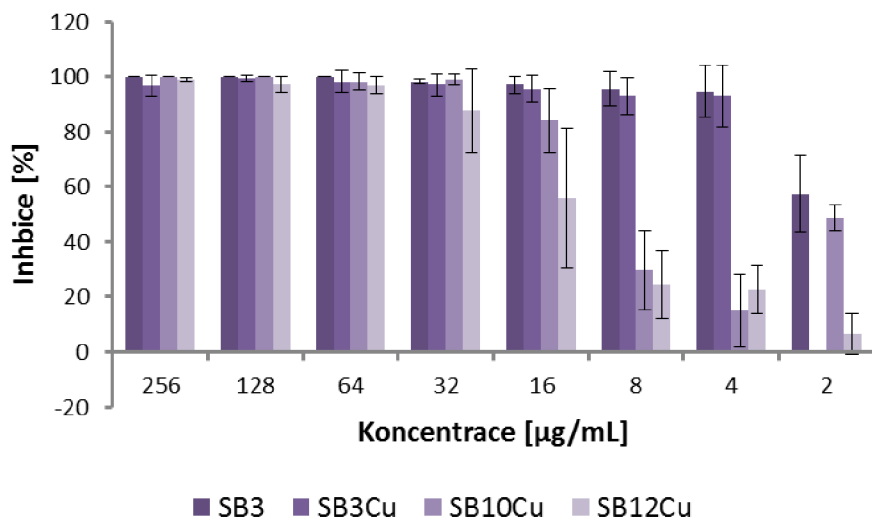
Obě látky působily ve všech časech a koncentracích pouze bakteriostaticky. Výsledky byly hodnoceny dvoucestnou ANOVOU a Tukey testem. Statisticky významný rozdíl v aktivitě ( $P < 0,05$ ) byl zaznamenán pouze mezi aktivitou ligandu v koncentraci  $1 \times \text{MIC}$  v čase 24 hodin a komplexem v koncentracích  $2 \times \text{MIC}$  a  $4 \times \text{MIC}$  v čase 24 hodin. Jak je ale vidět z grafu, aktivita samotného ligandu se v čase snižovala, což bylo pravděpodobně způsobeno selekcí rezistentních mutantů. Závěrem lze tedy říci, že koncentrace ani přítomnost komplexu nemá statisticky významný vliv na baktericidní aktivitu.



**Obrázek 39:** Dynamika antibakteriálního účinku sloučenin **Sb3** (ligand) a **SB3Cu** (komplex) na *S. aureus* ATCC 29213.

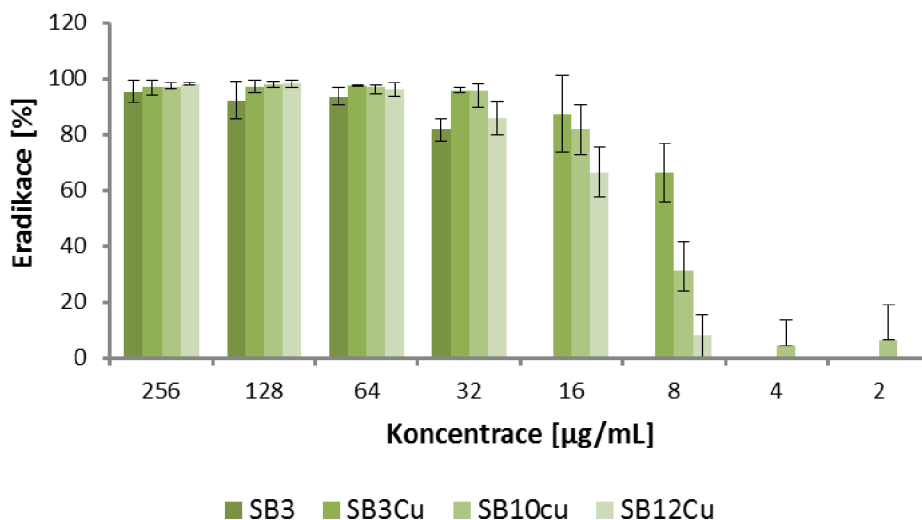
#### 4.7.5 Antibiofilmová aktivita Shiffových bází a komplexů

Antibiofilmová aktivita proti *S. aureus* byla hodnocena pouze u látek, které vykazovaly aktivitu proti planktonickým buňkám, tedy u báze **SB3** a u všech měďnatých komplexů. Všechny sloučeniny inhibovaly formaci biofilmu alespoň z 80 % v koncentraci rovné polovině MIC, látka **SB3** dokonce při hodnotě rovné  $\frac{1}{4}$  MIC (Obrázek 40). Tato hodnota je jako jediná z dosažených antibakteriálních výsledků nižší než  $\text{IC}_{50}$ .

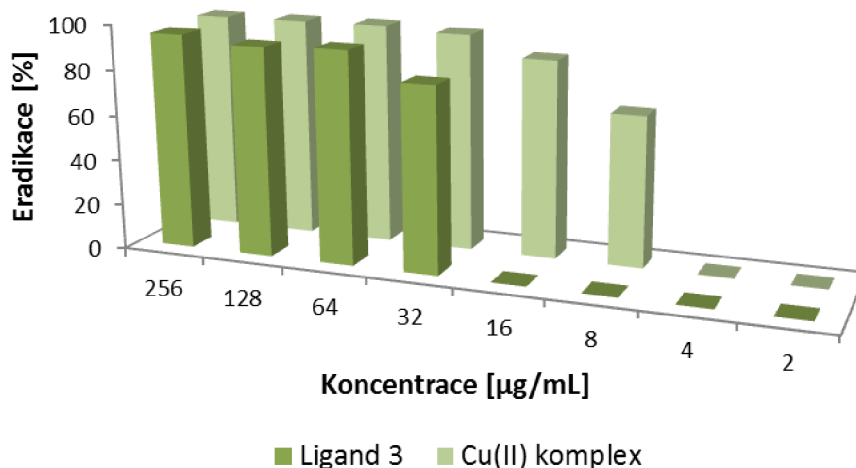


**Obrázek 40:** Inhibice růstu biofilmu *S. aureus* ATCC 29213 látkami **SB3**, **SB3Cu**, **SB10Cu** a **SB12Cu**.

Sloučeniny **SB3** a **SB3Cu** eradikovaly 80 % biofilmu *S. aureus* při koncentraci rovné MIC; u zbývajících látek se jednalo o dvojnásobek této hodnoty (Obrázek 41). Pokud porovnáme aktivitu ligandu **SB3** a jeho komplexu (Obrázek 42), při koncentraci rovné MIC (**SB3**=16 µg/ml, **SB3Cu** = 32 µg/ml) je eradikační aktivita pouze mírně vyšší než aktivita ligandu ( $87,3 \pm 4$  % vs.  $81,7 \pm 13,7$  %). Při koncentraci rovné  $\frac{1}{2}$  MIC snižoval komplex životaschopnost biofilmu o  $66,4 \pm 10,6$  %, kdežto samotný ligand neměl žádnou aktivitu. Vyšší eradikační aktivitu komplexu lze vysvětlit jeho výrazně vyšší cytotoxicitou.



**Obrázek 41:** Eradikace biofilmu *S. aureus* ATCC 29213 látkami **SB3**, **SB3Cu**, **SB10Cu** a **SB12Cu**.



**Obrázek 42:** Srovnání eradikační aktivity báze **SB3** (Ligand 3) a jejího měďnatého komplexu (CuII komplex) na maturovaném biofilmu *S. aureus* ATCC 29213.

#### 4.7.6 Závěr

Byla hodnocena antibakteriální, antimykobakteriální a antibiofilmová aktivita 3 Shiffových bází odvozených od chinazolinonu a jejich měďnatých komplexů. Aktivita proti stafylokokům byla obecně vyšší u komplexů než u samotných ligandů; nejvyšší aktivita byla zaznamenána u nitrosubstituované sloučeniny **SB3** a jejího komplexu **Sb3Cu**. Antimykobakteriální aktivita neaktivnějšího ligandu **SB3** byla asi čtvrtinová v porovnání s aktivitou proti stafylokokům, z komplexů měl nejvyšší aktivitu komplex **SB10Cu**, který ale zároveň vykazoval nejvyšší cytotoxicitu.

Vyšší aktivita komplexů může být vysvětlena jejich vyšší lipofilitou a tím pádem lepším průnikem do buněk, a zároveň jejich vlastním cytotoxickým působením, které je pravděpodobně vyvoláno zvýšením produkce ROS. Komplexace ovšem současně vede k výraznému zvýšení cytotoxicity. U jediného aktivního ligandu **SB3** vedla komplexace ke zvýšení toxicity čtyřicetinasobně, ale antistafylokokový účinek se zvýšil pouze dvojnásobně. Vytvoření komplexů tedy nevede k požadovanému snížení selektivního indexu.

Všechny komplexy a ligand **SB3** dále vykazovaly významnou antibiofilmovou aktivitu, jelikož vedly ke snížení formace biofilmu a eradikaci maturovaného biofilmu *S. aureus* o 80 % i v koncentracích nižších než hodnota MIC.

Závěry lze tedy shrnout do několika bodů:

- Aktivita měďnatých solí Shiffových bází byla vyšší než samotných ligandů; u ligandu byla antistafylokoková aktivita zvýšena substitucí nitroskupinou.
- Vyšší aktivitu komplexů lze vysvětlit jejich vyšší lipofilitou, což vede ke zvýšení průniku do buňky, a zároveň jejich vlastní nesespecifickou toxickou aktivitou.
- Při komplexaci je zvýšení cytotoxicity násobně vyšší než zvýšení antibakteriální aktivity, proto nejsou měďnaté komplexy vhodné k dalšímu studiu jako potenciální antibakteriální látky.

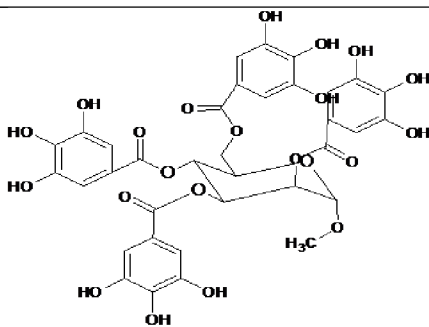
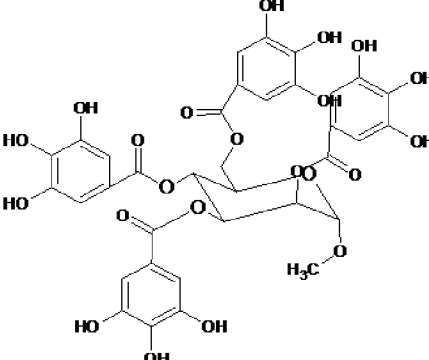
## 4.8 Protiinvazivní aktivita gallotaninů

### 4.8.1 Charakteristika hodnocených gallotaninů

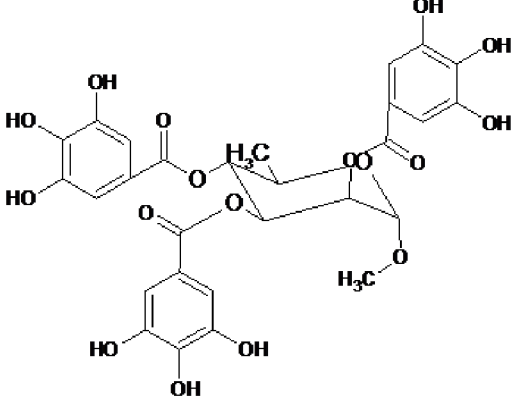
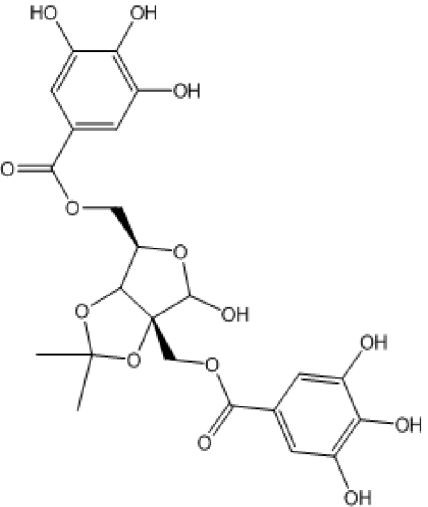
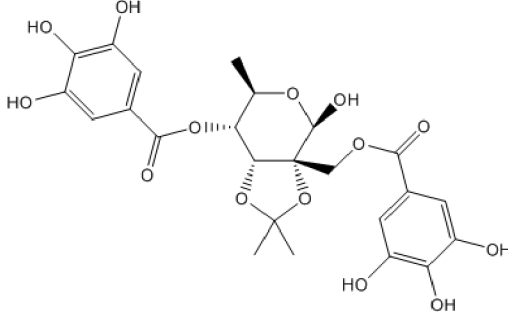
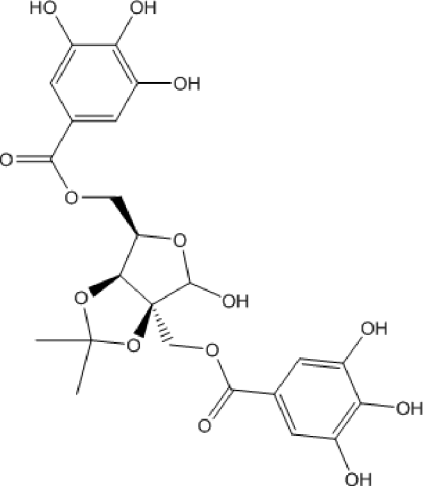
Gallotaniny jsou polyfenolické sloučeniny skládající se z centrální molekuly cukru, na kterou jsou esterickou vazbou navázány zbytky kyseliny gallové. (Chung et al., 1998). Vyznačují se řadou farmakologických aktivit jako je cytostatická (Houssein & Gali-Muhtasib, 2019) antioxidační, antibakteriální (Bag et al., 2017), nebo protizánětlivá (Kiss & Piwowarski, 2018).

Sloučeniny byly připraveny Dr. Janou Hricovíniovou a Dr. Zuzanou Hricovíniovou z Chemického ústavu Slovenské akademie věd. Výchozí strukturou byla již známá a v literatuře mnohokrát popsána 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukosa (**PGG**), ze které byly odvozeny nové deriváty lišící se typem cukru, počtem zbytků kyseliny gallové a případným zavedením dalších substituentů (viz Tabulku 16). Syntéza a antioxidační účinky sloučenin G4Glc, G4Man a G3Rham již byly publikovány (Hricovíniová et al, 2020). Molekulové hmotnosti látek a screening jejich antibakteriální aktivity jsou zobrazeny v Tabulkách 16–19. Hodnoty  $IC_{50}$  stanovené metodou WST-1 na buněčné linii THP-1.

**Tabulka 16:** Přehled struktur hodnocených gallotaninů, jejich molekulové hmotnosti a hodnoty  $IC_{50}$  stanovené metodou WST-1 na buněčné linii THP-1.

Slouč.	Systematický název	Mol. hm.	Struktura	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]
G4Glc	Methyl 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -(3,4,5-tri- <i>O</i> -benzylgalloyl)- $\alpha$ -D-glukosid	802,5		10,44
G4Man	Methyl 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -(3,4,5-tri- <i>O</i> -benzylgalloyl)- $\alpha$ -D-mannosid	802,5		19,83



<p><b>G3Rham</b></p>	<p>Methyl 2,3,4-tri-<i>O</i>- (3,4,5-tri-<i>O</i>- benzylgalloyl)-<math>\alpha</math>-L- rhamnosid</p>	<p>724,7</p>		<p>17,98</p>
<p><b>G2Rib</b></p>	<p>2',5-di-<i>O</i>-galloyl-2- C-(hydroxymethyl)- 2,3-<i>O</i>-isopropyliden- D-ribo-furanosa</p>	<p>524,6</p>		<p>-</p>
<p><b>G2Rham</b></p>	<p>2',4-di-<i>O</i>-galloyl-2- C-(hydroxymethyl)- 2,3-<i>O</i>-isopropyliden- <math>\beta</math>-L-rhamno-pyranosa</p>	<p>561,4</p>		<p>-</p>
<p><b>G2Lyx</b></p>	<p>2',5-di-<i>O</i>-galloyl-2- C-(hydroxymethyl)- 2,3-<i>O</i>-isopropyliden- D-lyxo-furanosa</p>	<p>507,9</p>		<p>-</p>

<b>GMan</b>	2'- <i>O</i> -galloyl-2- <i>C</i> - (hydroxymethyl)- 2,3:5,6-di- <i>O</i> - isopropyliden- <i>D</i> - <i>manno</i> -furanosa	442,9		-
<b>GFru</b>	3- <i>O</i> -galloyl-1,2:4,5- di- <i>O</i> -isopropyliden- <i>D</i> - <i>fructo</i> -pyranosa	412,9		-
<b>PGG</b>	1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> - galloyl- $\alpha$ - <i>D</i> -glukosa	940,6		0,65
<b>Gal</b>	kyselina 3,4,5- trihydroxybenzoová	170,1		9,97

#### 4.8.2 Screening antibakteriální a antimykobakteriální aktivity gallotaninů

U sloučenin byla hodnocena inhibiční a baktericidní sloučenina proti všem izolátům stafylokoků, enterokoků a mykobakterií. U *M. tuberculosis* byla stanovena pouze inhibiční aktivita.

**Tabulka 17:** Antistafylokoková (*S. aureus*, klinické izoláty methicilin-rezistentních *S. aureus*) aktivita MIC ([ $\mu\text{g/ml}$ ], resp. [ $\mu\text{M}$ ]) a MBC ([ $\mu\text{g/ml}$ ], resp. [ $\mu\text{M}$ ]) hodnocených gallotaninů. (OG = oktylgallát, MG = methylgallát, Gal = kyselina gallová)

Slouč.	<i>S. aureus</i> ATCC 29213		MRSA 63718		MRSA SA 3202		MRSA SA 630	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
G4Gcl	256/	>256/	256 /	>256/	64/	256/	64/	>256/
	318	>318	318	318	79,7	318	79,7	>318
G4Man	64/	128/	256/	>256/	64/	128/	64	256/
	79,7	159	318	318	79,7	159	79,7	318
G3Rham	128/	>256/	256/	>256/	128/	256/	128/	>256/
	201	>403	403	>403	201	403	201	>403
G2Lyx	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/
	504	>504	>504	>504	>504	>504	>504	>504
G2Rham	256/	256/	256/	256/	256/	256/	256/	256/
	456	456	456	456	456	456	456	456
G2Rib	128/	128/	256/	256/	256/	256/	128/	256/
	244	244	488	488	488	488	244	488
GMan	128/	128/	256/	256/	256/	256/	128/	256/
	289	289	578	578	578	578	289	578
GFru	128/	128/	128/	128/	256/	256/	128/	256/
	310	310	310	310	620	620	310	620
OG	16/	16/	16/	16/	8/	8/	16/	16/
	56,6	56,6	56,6	56,6	28,3	28,3	56,6	56,6
PGG	32/	32/	128/	128/	32/	32/	16/	16/
	34,0	34,0	136	136	34,0	34,0	17,0	17,0
MG	128/	128/	256/	256/	128/	256/	128/	128/
	695	695	1390	1390	695	1390	695	695
Gal	256/	256/	64/	64/	64 /	64/	32/	32/
	1487	1487	371	371	371	371	185	185
AMP	2/5,7	2/2,7	16/45,8	>16/	>16/	>16/	>16/	>16/
				>45,8	>45,8	>45,8	>45,8	>45,8
CPX	1/3	1/3	8/24,1	8/24,1	8/24,1	8/24,1	64/192	128/385

**Tabulka 18:** Aktivita MIC ([ $\mu\text{g/ml}$ ], resp. [ $\mu\text{M}$ ]) a MBC ([ $\mu\text{g/ml}$ ], resp. [ $\mu\text{M}$ ]) hodnocených gallotaninů proti enterokokům (*E. faecalis*, klinické izoláty vankomycin-rezistentních *E. faecalis*). (OG = oktylgallát, MG = methylgallát, Gal = kyselina gallová)

Slouč.	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		VRE 342 B		VRE 368		VRE 725 B	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
G4Gcl	32/	>256/	64/	>256/	256/	>256/	256/	>256/
	39,8	>318	79,7	>318	318	>318	318	>318
G4Man	16/	>256/	32/	>256/	256/	>256/	256/	>256/
	19,9	>318	39,8	>318	318	>318	318	>318
G3Rham	32/	>256/	128/	>256/	256/	>256/	256/	>256/
	50,4	>403	201	>403	403	>403	403	>403
G2Lyx	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/
	>504	>504	>504	>504	>504	>504	>504	>504
G2Rham	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/
	>456	>456	>456	>456	>456	>456	>456	>456
G2Rib	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/	>256/
	>488	>488	>488	>488	>488	>488	>488	>488

<b>GMan</b>	>256/ >578	>256/ >578	>256/ >578	>256/ >578	>256/ >578	>256/ >578	>256/ >578	>256/ >578
<b>GFru</b>	>256/ >620	>256/ >620	>256/ >620	>256/ >620	>256/ >620	>256/ >620	>256/ >620	>256/ >620
<b>OG</b>	64/ 226	128/ 453	64/ 226	128/ 453	128/ 453	128/ 453	64/ 226	64/ 226
<b>PGG</b>	16/ 17.0	>256/ >272	64/ 68.0	>256/ >272	128/ 136	>256/ >272	256 / 272	>256/ >272
<b>MG</b>	>256 >1390	>256 >1390	128/ 695	>256/ >1390	>256/ >1390	>256/ >1390	>256/ >1390	>256/ >1390
<b>Gal</b>	>256/ >1487	>256/ >1487	>256/ >1487	>256/ >1487	>256/ >1487	>256/ >1487	>256/ >1487	>256/ >1487
<b>AMP</b>	1 /2,8	1 /2,8	4/11,5	4/11,5	4/11,5	4/11,5	4/11,5	4/11,5
<b>CPX</b>	1 /3,0	1 /3,0	1 /3,0	1 /3,0	1 /3,0	1 /3,0	64/ 193	64/ 193

**Tabulka 19:** Antimykobakteriální aktivita MIC ([ $\mu\text{g/ml}$ ], resp. [ $\mu\text{M}$ ]) a MBC ([ $\mu\text{g/ml}$ ], resp. [ $\mu\text{M}$ ]) hodnocených gallotaninů. (OG = oktylgallát, MG = methylgallát, Gal = kyselina gallová)

Slouč.	<i>M. smegmatis</i>		<i>M. kansasii</i>		<i>M. marinum</i>	<i>M. tuberculosis</i>
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MIC
<b>G4Gcl</b>	256/ 318	>256/ >318	256/ 318	256/ 318	256/ 318	>128/ >159
<b>G4Man</b>	256/ 318	>256/ >318	128/ 159.	128/ 159	256/ 318	>128/ >159
<b>G3Rham</b>	256/ 403	>256/ >403	128/ 201	>256/ >403	256/ 403	>128/ >201
<b>G2Lyx</b>	>256/ 504	>256/ >504	>256/ 504	>256/ >504	>256/ 504	>128/ >252
<b>G2Rham</b>	>256/ >456	>256/ >456	>256/ >456	>256/ >456	>256/ >456	>256/ >456
<b>G2Rib</b>	>256/ >488	>256/ >488	>256/ >488	>256/ >488	>256/ >488	>128/ >244
<b>GMan</b>	>256/ >578	>256/ >578	>256/ >578	>256/ >578	>256/ >578	>128/ >289
<b>GFru</b>	>256/ >620	>256/ >620	>256/ >620	>256/ >620	>256/ >620	>128/ >310
<b>OG</b>	>256/ 906	>256/ >906	128/ 453	128/ 453	128/ 453	>128/ >453
<b>PGG</b>	>256/ >272	>256/ 2272	256/ 272	>256/ >272	256/ 272	>128/ >136
<b>MG</b>	>256/ >1390	>256/ >1390	128/ 695	>256/ >1390	64/ 347	>128/ >695
<b>Gal</b>	>256/ >1487	>256/ >1487	256/ 1487	>256/ >1487	128/ 743	>128/ >743
<b>CPX</b>	0,125/0,4	1/3,0	0,25/0,75	16/48,3	0,125/0,4	1/3,0

Aktivita nově připravených sloučenin proti stafylokokům a enterokokům byla v celkovém pohledu pouze střední až nízká s hodnotami MIC pohybujícími se v rozmezí 16–256  $\mu\text{g/ml}$ . Aktivita látek byla nižší než u referenčních sloučenin **PGG** a **OG** a nebyla významně ovlivněna přítomností genů *mecA* a *vanA*.

Ze strukturního hlediska lze sloučeniny rozdělit na dvě podskupiny, které se současně liší aktivitou. První podskupina (sloučeniny **G4Glc**, **G4Man** a **G3Rham**) jsou jednoduché

gallotaniny složené pouze z hexosy a kyseliny gallové. Sloučeniny z této podskupiny byly aktivnější než sloučeniny patřící do druhé podskupiny. Nejaktivnější z těchto sloučenin byla **G4Man**, která měla hodnotu minimální inhibiční koncentrace proti *E. faecalis* ATCC 29212 srovnatelnou s výchozí látkou **PGG** a hodnota MIC proti *S. aureus* byla v porovnání s **PGG** zhruba dvojnásobná.

Sloučeniny druhé podskupiny (**G2Rham**, **G2Lyx**, **GMan** a **GFru**) mají sacharidové jádro navíc substituované isopropylidenem. Tato substituce může stát za jejich sníženou aktivitou vůči gram pozitivním patogenům v porovnání s první podskupinou. Sloučenina **G2Lyx**, která obsahovala dva zbytky kyseliny gallové navázané na lyxosu substituovanou isopropylidenem, nevykazovala žádnou antibakteriální aktivitu.

Antimykobakteriální aktivita byla pouze nízká. Nejúčinnější sloučeniny měly hodnoty MIC 128 µg/ml. Aktivita referenčních sloučenin **PGG**, **OG** a **MG** se pohybovala ve stejném rozmezí. Sloučeniny substituované isopropylidenem nevykazovaly žádnou antimykobakteriální aktivitu.

Jelikož je antibakteriální aktivita gallotaninů studována již několik desítek let, je možné dosažené výsledky porovnat s literaturou.

Řada autorů se věnovala hodnocení antibakteriální aktivity a mechanismu účinku **PGG**. **PGG** je hydrolyzovatelný tannin přírodně se vyskytující v řadě rostlinných čeledí, např. *Myrtaceae*, *Lamiaceae*, *Fabaceae* nebo *Geraniaceae*. Látka se získává extrakcí z rostlinných zdrojů, nebo lze připravit synteticky (Torres-Leon et al., 2017). **PGG** má řadu farmakologických aktivit (Zhang, 2008), např. antivirotickou (Lee et al., 2006; Ahn et al., 2002), protirakovinnou (Hu et al., 2008; Kuo et al., 2009), antioxidační (Choi et al., 2002), protizánětlivou (Yokozawa et al., 2000); dále funguje jako inhibitor sekrece žaludeční kyseliny (Ono et al., 2000), snižuje hladinu cholesterolu (Park et al., 2002) a má antikonvulzivní účinky (Sugaya et al., 1991).

Jiamboonsri et al (2011) studovali antistafylokokovou aktivitu extraktu z jader thajského manga (*Mangifera indica*). Semena obsahují více než 60 % **PGG** a méně než 1 % kyseliny gallové a methylgalátu. Byla hodnocena aktivita jak komplexního extraktu, tak jednotlivých složek. Sloučeniny byly hodnoceny proti *S. aureus* ATCC 25623 a 19 MRSA izolátům. Ukázalo se, že hlavní antibakteriální efekt poskytuje **PGG**, jehož MIC byly proti všem izolátům asi třikrát nižší než MIC extraktu. Průměrná MIC proti MRSA byla 160 µg/ml a efekt byl bakteriostatický. Tato hodnota je v souladu s hodnotami zjištěnými u našich izolátů, ačkoliv metodou subkultivace alikvotu na agar byl zjištěn baktericidní účinek. Sloučeniny působily synergicky s penicilinem G. Studium buněk pomocí elektronového

mikroskopu po kultivaci se sloučeninami prokazuje interakci látek s cytoplasmatickou membránou (Jiamboonsri et al, 2011). Lin et al (2011) zkoumali aktivitu **PGG** proti stafylokokovému biofilmu. Při koncentraci 6,25  $\mu\text{M}$  neinhiboval růst planktonických buněk, ale docházelo k inhibici formace biofilmu v iniciální fázi jeho tvorby. **PGG** také inhiboval expresi polysacharidového intracelulární adhezinu (PIA), ale neměl vliv na transkripci *icaA* (Lin et al., 2011).

Zhao et al. (2015) izolovali **PGG** z rostliny *Paeonia suffruticosa* a hodnotili jeho antifungální aktivitu proti *Candida glabrata* CBS 138. Hodnota MIC byla 0,39  $\mu\text{g/ml}$ , což bylo 10krát méně než u referenčního antimykotika flukonazolu. Pomocí TEM byl prokázáno, že **PGG** vyvolává lokální praskliny v buněčné stěně, ale neovlivňuje membránu, jádro ani mitochondrie. Působení **PGG** na buněčnou stěnu je přímé, bez ovlivnění syntézy  $\beta$ -1,3-D-glukan synthasy.

Existuje řada derivátů **PGG** s prokázanými antibakteriálními účinky. 1-*O*-Galloyl- $\beta$ -D-glukosa byla poprvé izolována již v roce 1903 z kořenů *Rheum officinale* (Gilson, 1903). Bag et al. (2013, 2017) publikovali dvě studie zabývající se antimikrobiální aktivitou gallotaninu 1,2,6-tri-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukopyranosy izolovaného z *T. chebula* proti multirezistentní *E. coli*. Sloučenina působila synergicky v kombinaci s gentamicin a trimethoprimem a aditivně v kombinaci s amoxicilinem, ciprofloxaciem a ceftazidinem (Bag et al., 2013). Látka byla schopna eradikovat preformovaný biofilm *E. coli* a zároveň působit synergickou antibiofilmovou aktivitou v kombinaci s gentamicinem a trimetoprimem (Bag et al., 2017). Tato sloučenina se od testované sloučeniny **G4Glc** liší pouze polohou zbytku kyseliny gallové.

1-*O*-galloyl- $\alpha$ -L-rhamnosa a 1-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukosa byly izolovány Abou-Zaidem a Nozzolillem (1999) z listů javoru (*Acer rubrum*). Látky se strukturně liší od hodnocených látek **G4Glc** a **G3Rham** v počtu a pozici galloyl substituentů. Antibakteriální aktivita v tomto případě hodnocena nebyla. (Abou-Zai & Nozolillo, 1999).

Množství studií zaměřených na antimikrobiální aktivitu galloyl rhamnosidů je omezené. Chan et al (2014) studovali antistafylokokovou aktivitu galloyl flavonol rhamnosidů extrahovaných z listů *Calliandra tergemina*. Izolovali tři nové látky kempferol-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-galloyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid, quercetin-3-*O*-(3,4-di-*O*-galloyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid a quercetin-3-*O*-(2,3,4-tri-*O*-galloyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid. Tyto sloučeniny prokázaly pouze slabou aktivitu proti třem izolátům MRSA (256  $\mu\text{g/ml}$ ). Sloučeniny neobsahující zbytek kyseliny gallové nebo nesoucí pouze jeden galloyl substituent nevykazovaly žádnou anti-MRSA aktivitu. Násobná esterifikace rhamnosy může zvyšovat antibakteriální účinek.

Pomocí SEM byla studována interakce sloučenin s bakteriálními buňkami. Všechny hodnocené sloučeniny interagovaly s bakteriální membránou.

Rashed et al. (2016) hodnotili antibakteriální a antifungální aktivitu extraktu z listů *Pistacia chinensis*. Extrakt inhiboval růst všech hodnocených bakterií kromě *S. aureus*. Extrakt byl chromatograficky separován na složky  $\beta$ -sitosterol, luepol, quercetin, myricetin, quercetin 3-O- $\alpha$ -rhamnosid, quercetin 3-O- $\beta$ -glukosid, myricetin 3-O- $\alpha$ -rhamnosid a myricetin 3-O- $\beta$ -glukuronid, antibakteriální aktivita jednotlivých složek ale studována nebyla.

Gallotaniny substituované isopropylidenem jsou nové sloučeniny, jejichž antibakteriální aktivita nebyla zatím v literatuře popsána. Jak je ovšem vidět z prezentovaných výsledků, substituce cukerné jednotky isopropylidenem má nepříznivý účinek na antibakteriální aktivitu.

Deriváty kyseliny gallové methylgalát, oktylgallát a samotná kyselina gallová byly rovněž použity jako referenční látky. Dle Jiamboonsriho et al. (2011) byla hodnota MIC methylgalátu (**MG**) proti souboru MRSA v průměru 1330  $\mu\text{g/ml}$  a u kyseliny gallové bylo MIC >1070  $\mu\text{g/ml}$ . Tyto hodnoty jsou v souladu s hodnotami zjištěnými u našich izolátů. Antistafylokokový účinek těchto derivátů je tedy v porovnání s **PGG**, **OG** a novými látkami **G4Man** a **G4Glc** nižší.

Oktylgallát (**OG**) je látka schválená pro použití v potravinářství, která má antioxidační, antifungální (Kubo et al., 2001) a antibakteriální aktivitu (Kubo et al., 2003). Oh et al. (2018) prokázali, že koncentrace **OG** 2  $\mu\text{g/ml}$  výrazně zvyšuje antibiofilmovou aktivitu bacitracinu. Dle experimentů provedených Gabem et al. (2019) **OG** v koncentraci 100,24  $\mu\text{M}$  inhibuje růst biofilmu *S. mutans* a ovlivňuje expresi genu *atpD*. Zjištěná hodnota minimální eradikační biofilmové koncentrace MBEC<sub>(80)</sub> proti *S. aureus* ATCC 29213 je srovnatelná s touto hodnotou.

### 4.8.3 Antibiofilmová aktivita hodnocených gallotaninů

Zajímavější jsou výsledky antibiofilmové aktivity proti *S. aureus* ATCC 29213. Látky byly testovány z hlediska inhibice růstu nově vznikajícího biofilmu a eradikace již maturovaného biofilmu. Hodnota minimální inhibiční biofilmové koncentrace inhibující  $\geq 80\%$  biofilmu v porovnání s kontrolou růstu byla u látky **G4Glc** 64krát nižší než hodnota MIC proti planktonickým buňkám, u látky **G4Man** byla hodnota 32krát nižší. MBEC v obou případech byly 4krát nižší než MIC. Hodnota MBEC u látky **G3Rham** byla osmina MIC a inhibiční koncentrace byla dokonce 256krát nižší než MIC proti planktonickým buňkám. Oproti tomu MBEC u **PGG** byl dvojnásobek hodnoty MIC. Porovnáním těchto výsledků

Ize konstatovat, že při zachování stejného počtu zbytků kyseliny gallové (látky **G4Glc** a **G4Man**) nemá záměna glukosy za mannosu vliv na antibiofilmový účinek. Vyšší počet substituentů kyseliny gallové (**G4Glc** vs. **PGG**) vedl ke snížení eradikačního antibiofilmového účinku. Nejméně aktivní byla látka **G3Rham**, což může být dané nejmenším počtem zbytků kyseliny gallové, nebo přítomností rhamnosy. Vzhledem k omezenému počtu hodnocených sloučenin nelze tuto závislost určit.

#### 4.8.4 Inhibice systému *quorum sensing* u *Ch. violaceum*

Na základě výsledků antibiofilmové aktivity se předpokládalo, že látky by mohly interagovat se systémem *quorum sensing*. Tato interakce je popsána v literatuře u řady strukturně podobných sloučenin. Různé deriváty kyseliny gallotaninové inhibovaly produkci violaceinu u *Ch. violaceum* a snižovaly expresi genů zapojených do systému QS (Ta, 2015). Extrakt z listů *Moringa oleifera* obsahující řadu fenolických derivátů včetně kyseliny gallové také inhiboval QS u *Ch. violaceum*. (Singh et al., 2009).

Předpoklad byl ověřen agarovým experimentem s *Ch. violaceum*. Jako pozitivní kontrola byl použit karvakrol (Burt et al., 2014). Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 20. Inhibiční aktivita byla měřena jako průměr zóny kolem jamky s hodnocenou sloučeninou, měření bylo třikrát zopakováno a výsledky byly zprůměrovány. Jelikož byly látky rozpuštěny v DMSO, byl hodnocen vliv rozpouštědla na *Ch. violaceum*. DMSO nemělo v žádné koncentraci (100–25 %) vliv na růst ani na *quorum sensing* u této bakterie, což je v souladu s publikovanými studiemi (Szabó et al., 2010).

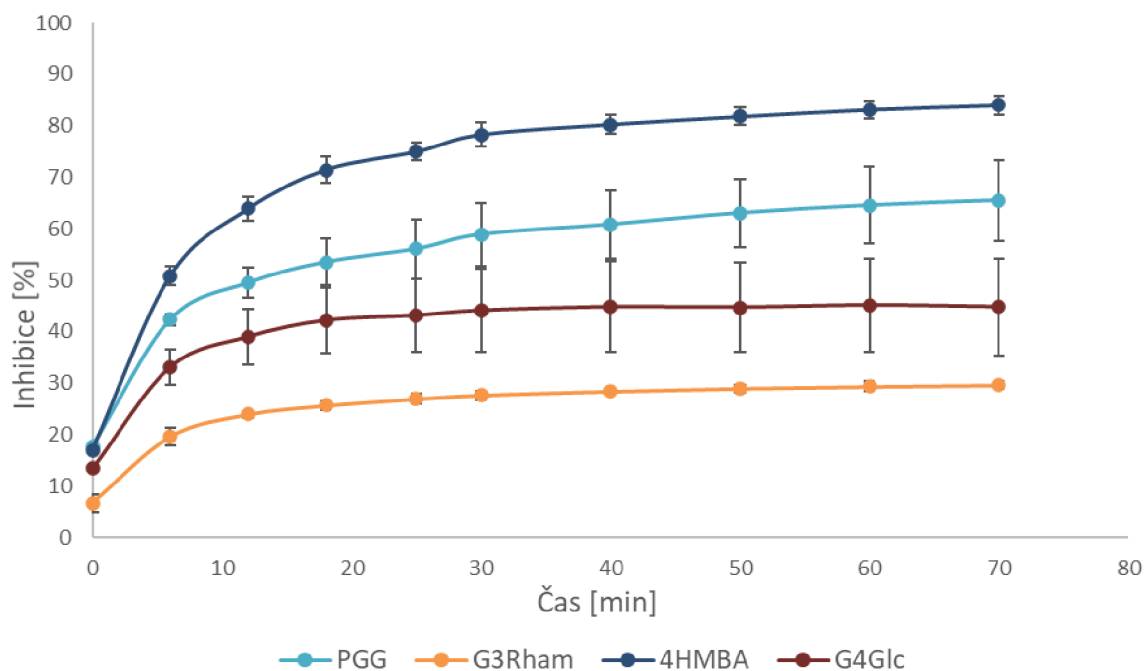
**Tabulka 20:** Vliv derivátů gallotaninů na systém *quorum sensing* u *Ch. violaceum*.

Sloučenina (konc. 10 mg/ml)	Průměr inhibiční zóny na agaru [mm]
G <sub>4</sub> Glc	5.0±0.0
G <sub>4</sub> Man	8.5±2.9
G <sub>3</sub> Rham	7.0±1.4
G <sub>2</sub> Rham	-
G <sub>2</sub> Rib	8.3±0.6
GMan	3.0±0.0
G <sub>2</sub> Lyx	5.0±1.0
GFru	6.5±1.3
PGG	6.0±0.0
Karvakrol 15%	7.0±0.0
Karvakrol 7,5 %	7.0±0.0



#### 4.8.5 Inhibice sortasy A

Sloučeniny **PGG**, **G4Glc** a **G3Rham** byly testovány jako inhibitory sortasy A. Všechny sloučeniny byly testovány v koncentraci 200 µg/ml. Jako pozitivní kontrola byla použita 4HMBA. Procento inhibice enzymu v čase vyvolané jednotlivými sloučeninami je zobrazeno v následujícím grafu (Obrázek 43).



**Obrázek 43:** Inhibice sortasy A sloučeninami PGG, G3Rham a G4Glc 200 µg/ml.

Z hodnocených látek měla nejvyšší inhibiční efekt sloučenina **PGG**, která po 70 minutách inhibovala enzym z  $65,5 \pm 7,9$  %. Sloučeniny **G4Glc** a **G3Rham** měly přibližně poloviční ( $44,8 \pm 9,5$  %), respektive čtvrtinovou aktivitu ( $29,6 \pm 0,8$  %). Lze tedy říci, se schopnost inhibovat sortasu A zvyšuje s počtem navázaných zbytků kyseliny gallové.

Schopnost derivátu **PGG** inhibovat sortasu A zatím nebyla v literatuře popsána. Existuje ale řada studií zkoumajících efekt jiných polyfenolických sloučenin, převážně flavonoidů, na bakteriální sortasy. Wang et al. (2018) prokázali, že flavonoid baicalin se váže na sortasu B u *S. aureus* a tím snižuje jeho virulenci. Flavonoidy izolované z kořene čínské rostliny *Sophora flavescens*, zejména sloučenina kurarinol, působí jako inhibitory sortasy A. Pro inhibici byla zásadní přítomnost prenylových skupin (Oh, 2011). Dalšími inhibitory potenciálně použitými v léčbě bakteriálních infekcí jsou například isovitexin (Mu et al., 2018), astilbin (Wang et al., 2019) nebo rutin (Dong et al., 2021). **PGG** a jeho deriváty tak mohou být novým směrem ve výzkumu inhibitorů sortasy A.

#### 4.8.6 Závěr

Byla stanovena komplexní antibakteriální a antibiofilmová aktivita 8 derivátů kyseliny gallové odvozených od **PGG** a jejich interakce se systémem *quorum sensing* u *Chromobacterium violaceum*. U vybraných sloučenin byla dále hodnocena schopnost inhibovat enzym sortasa A. Zjištěné výsledky je možno shrnout do několika bodů:

- Gallotaniny odvozené od **PGG** mají pouze střední antibakteriální aktivitu proti grampozitivním patogenům. Zavedení isopropylidinového zbytku na molekulu cukru dále antibakteriální aktivitu snižuje. Aktivita se snižuje se snižujícím se počtem navázaných zbytků kyseliny gallové a pravděpodobně souvisí se schopností gallotaninů interagovat se sortasou A.
- Všechny hodnocené sloučeniny inhibovaly formaci biofilmu *S. aureus* při hodnotách mnohonásobně nižších, než byla hodnota MIC proti planktonickým buňkám.
- Hodnocené sloučeniny **PGG**, **G4Glc**, **G4Man** a **G3Rham** eradikovaly biofilm *S. aureus* v koncentracích nižších než MIC a MBC proti planktonickým buňkám. Vzhledem k omezenému počtu hodnocených sloučenin nelze stanovit vztah struktury a účinku.
- Všechny hodnocené sloučeniny s výjimkou **G2Rham** působily jako inhibitory systému *quorum sensing* u *Ch. violaceum*.
- Sloučeniny **PGG**, **G4Glc** a **G3Rham** inhibovaly aktivitu enzymu sortasa A. Inhibice enzymu se zvyšovala se zvyšujícím se počtem zbytků kyseliny gallové.
- Hodnoty IC<sub>50</sub> u sloučenin **G4Glc**, **G4Man** a **G3Rham** byly vůči buňkám linie THP-1 více než 200násobně nižší než u **PGG**. Sloučeniny jsou tedy potenciálně využitelné pro další vývoj sloučenin s antibakteriálním a především antibiofilmovým účinkem.

## 4.9 Protiinvazivní aktivita dibazických karbamátů

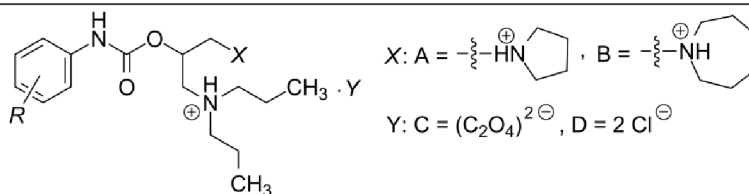
Od roku 1970 se zvyšuje tendence v hodnocení potenciální antimikrobiální aktivity u sloučenin patřících do jiných terapeutických skupin (Dastidar et al., 2013; Hamad et al.; 2019). Tento trend je viditelný zejména ve vývoji antimykobakteriálních látek. Jednou z nejvíce zkoumaných skupin jsou neuroleptika fenothiazinového skeletu, jejichž antimykobakteriální aktivita je známá již řadu let (Ordway et al., 2003; Kristiansen & Amaral, 1997; Chan et al., 2007; Amaral et al., 1996; Bettencourt et al., 2000). Amaral & Viveiros (2017) studovali antimykobakteriální aktivitu neuroleptika thioridazinu. Prokázali, že látka interaguje s řadou buněčných struktur *M. tuberculosis* bez ohledu na typ rezistence ke klinicky používaným antituberkulotikům. Existuje také řada studií popisujících antibakteriální a antibiofilmovou aktivitu lokálních anestetik (Schmidt & Rosenkranz, 1970; e Silva et al., 2017; Sriram et al., 2011; Meylheuc et al., 2001; Rewak-Soroczyńska et al., 2019; Aidyn et al., 2001), stejně jako aktivitu proti kandidám (Pina-Vaz et al., 2000) nebo orální mikroflóře (Srisatjaluk et al., 2016). Na základě těchto optimistických výsledků byla hodnocena antimikrobiální aktivita dibazických karbamátů, původně syntetizovaných jako lokální anestetika.

### 4.9.1 Charakteristika hodnocených dibazických karbamátů

Hodnocené sloučeniny byly připraveny prof. Csölleiem na FaF UK v Bratislave jako lokální anestetika. Látky vykazovaly dobrý anestetický potenciál, kdy neaktivnější sloučeniny měly anestetickou aktivitu více než stonásobnou v porovnání s kokainem a prokainem (Csöllei et al., 1988). Jednotlivé deriváty a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti jsou zobrazeny v Tabulce 21.

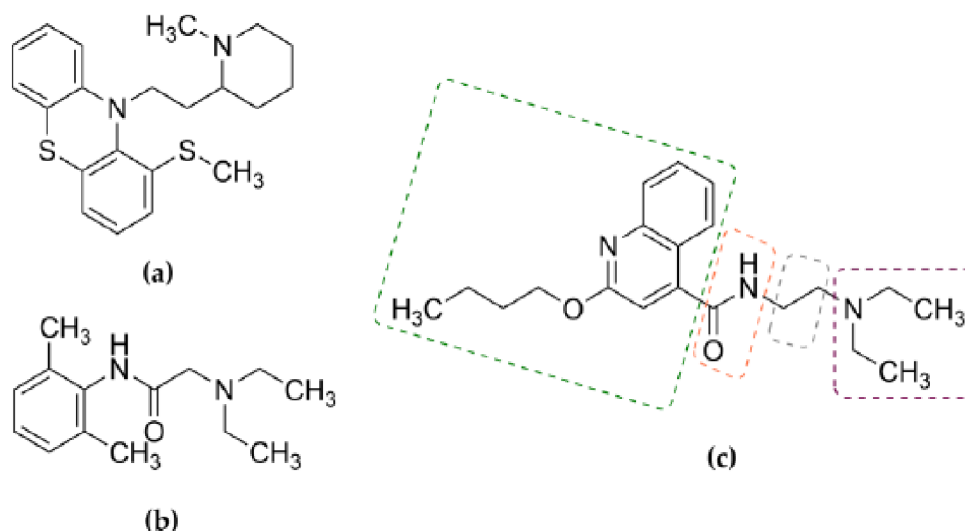
**Tabulka 21:** Struktury hodnocených dibazických karbamátů **1a–1p**, jejich povrchové napětí  $\gamma$ ,  $\log k_w$  a  $\log \epsilon$ . (Převzato z Malík et al., 2018).

Slouč.	R	X	Y	$\log k_w$	$\gamma$ [N/m]	$\log \epsilon_{2(\text{Ch-T})}^a$
<b>1a</b>	2-OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	A	C	3,7688	0,06464	4,19
<b>1b</b>	2-OC <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	A	C	4,0454	0,06366	4,05
<b>1c</b>	2-OC <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	A	C	4,6049	0,06222	4,52
<b>1d</b>	2-OC <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	A	C	4,9487	0,05985	4,08
<b>1e</b>	3-OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	A	D	4,0258	0,06316	4,24
<b>1f</b>	3-OC <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	A	D	4,6722	0,06285	4,27



<b>1g</b>	3-OC <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	A	D	4,9446	0,06105	4,13
<b>1h</b>	3-OC <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	A	D	5,5384	0,05786	4,27
<b>1i</b>	2-OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	B	C	4,4679	0,06302	4,08
<b>1j</b>	2-OC <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	B	C	4,8466	0,06206	4,22
<b>1k</b>	2-OC <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	B	C	5,2359	0,06065	4,10
<b>1l</b>	2-OC <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	B	C	5,8966	0,05853	4,14
<b>1m</b>	3-OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	B	D	4,7099	0,06298	4,09
<b>1n</b>	3-OC <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	B	D	5,2087	0,06154	4,18
<b>1o</b>	3-OC <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	B	D	5,6569	0,05925	4,01
<b>1p</b>	3-OC <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	B	D	6,1749	0,05692	4,20

Strukturální podobnost hodnocených látek s fenothiazinovými neuroleptiky a lokálními anestetiky (viz Obrázek 44) a jejich prokázaná anestetická aktivita vedla k předpokladu, že tyto látky by mohly působit i antibakteriálně a antimykobakteriálně.



**Obrázek 44:** Chemická struktura thioridazinu (a), neuroleptika obsahující fenothiazinovou strukturu, (b) lidokainu a (c) cinchokainu. Všechny látky působí *in vitro* antimykobakteriálně. Části struktury cinchocainu (c) jsou vyznačeny barevně: lipofilní část (zeleně), polární skupina (oranžově) spojovací uhlovodíkový řetězce (šedý) a zásaditá část molekuly schopná vytvářet soli (červeně). (Převzato z Malík et al., 2018).

Komplexní hodnocení antibakteriální aktivity dibazických karbamátů proti enterokokům bylo provedeno PharmDr. Kristýnou Bezouškovou v rámci její rigorózní práce. Cytotoxicita vůči eukaryotickým buňkám (monocytům THP-1) byla hodnocena PharmDr. Terezou Kauerovou a doc. Peterem Kollárem z FaF VFU Brno.

#### 4.9.2 Screening antibakteriální aktivity dibazických karbamátů

Antimikrobiální aktivita (Tabulka 22) byla hodnocena proti referenčním kmenům *S. aureus* a *E. faecalis* a dále proti všem dostupným izolátům MRSA a VRE.

**Tabulka 22:** Antistafylokoková a antienterokoková aktivita hodnocených dibazických karbamátů a jejich cytotoxický efekt na monocyty řady THP-1. (SA= *S. aureus* ATCC 29213; EF = *E. faecalis* ATCC 29213; CA = *C. albicans* CCM 8261;; CMP = camptothecin; SDS = laurylsíran sodný; CRB = carbethopendecinium bromid; CTC = cetalkonium chlorid; PRC = prokain; TRC = trimekain; TEC = tetrakain)

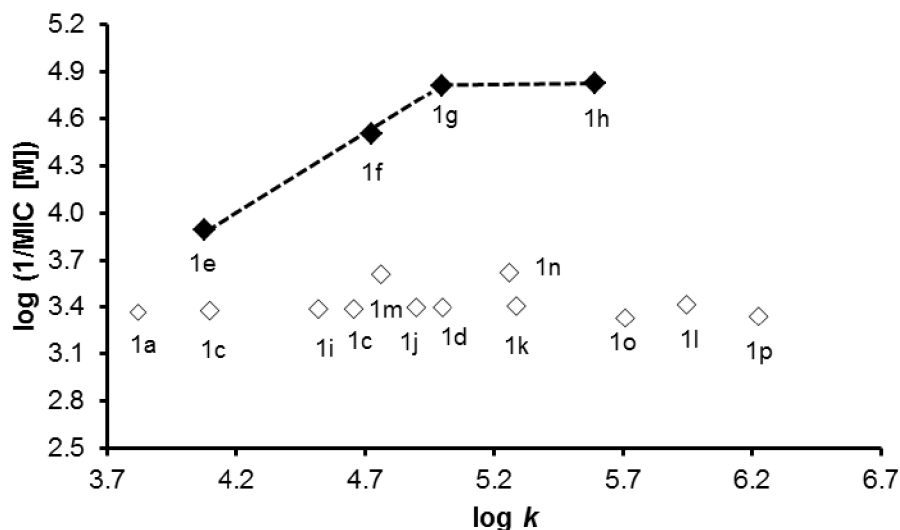
Slouč.	MIC [ $\mu\text{g/mL}$ ( $\mu\text{M}$ )]									Tox IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]
	SA	MRSA 63718	MRSA SA 630	MRSA SA 3202	EF	VRE 342B	VRE 368	VRE 725 B	CA	
<b>1a</b>	>256 (>427)	>256 (>427)	>256 (>427)	>256 (>427)	>256 (>427)	>256 (>427)	>256 (>427)	>256 (>427)	>128 (>213)	10,80 ±1,11
<b>1b</b>	>256 (>417)	>256 (>417)	>256 (>417)	>256 (>417)	>256 (>417)	>256 (>417)	>256 (>417)	>256 (>417)	>128 (>208)	12,53 ±1,22
<b>1c</b>	>256 (>407)	>256 (>407)	>256 (>407)	>256 (>407)	>256 (>407)	>256 (>407)	>256 (>407)	>256 (>407)	>128 (>203)	15,42 ±0,22
<b>1d</b>	>256 (>398)	>256 (>398)	>256 (>398)	>256 (>398)	>256 (>398)	>256 (>398)	>256 (>398)	>256 (>398)	>128 (199)	16,32 ±0,70
<b>1e</b>	64 (129)	64 (129)	64 (129)	64 (129)	128 (259)	32 (65,1)	64 (129)	32 (65,1)	>128 (>259)	4,20± 0,79
<b>1f</b>	<b>16</b> <b>(31,6)</b>	<b>16</b> <b>(31,6)</b>	<b>32</b> <b>(63,2)</b>	<b>16</b> <b>(31,6)</b>	<b>32</b> <b>(63,2)</b>	<b>16</b> <b>(31,6)</b>	<b>16</b> <b>(31,6)</b>	<b>16</b> <b>(31,6)</b>	<b>128</b> <b>(252)</b>	4,19 ±0,54
<b>1g</b>	<b>8</b> <b>(15,4)</b>	<b>8</b> <b>(15,4)</b>	<b>16</b> <b>(30,8)</b>	<b>8</b> <b>(15,4)</b>	<b>16</b> <b>(30,8)</b>	<b>8</b> <b>(15,4)</b>	<b>8</b> <b>(15,4)</b>	<b>8</b> <b>(15,4)</b>	<b>16</b> <b>(30,8)</b>	3,50 ±0,31
<b>1h</b>	<b>8</b> <b>(15,0)</b>	<b>8</b> <b>(15,0)</b>	<b>8</b> <b>(15,0)</b>	<b>8</b> <b>(15,0)</b>	<b>8</b> <b>(15,0)</b>	<b>4</b> <b>(7,51)</b>	<b>4</b> <b>(7,51)</b>	<b>4</b> <b>(7,51)</b>	<b>8</b> <b>(15,0)</b>	3,67 ±0,01
<b>1i</b>	>256 (>407)	>256 (>407)	>256 (>407)	>256 (>407)	>256 (>407)	>256 (>407)	>256 (>407)	>256 (>407)	>128 (>203)	23,06 ±0,95
<b>1j</b>	>256 (>398)	>256 (>398)	>256 (>398)	>256 (>398)	>256 (>398)	>256 (>398)	>256 (>398)	>256 (>398)	>128 (>199)	26,45 ±1,91
<b>1k</b>	>256 (>390)	>256 (>390)	>256 (>390)	>256 (>390)	>256 (>390)	>256 (>390)	>256 (>390)	>256 (>390)	>128 (>195)	31,24 ±2,24
<b>1l</b>	>256 (>382)	>256 (>382)	>256 (>382)	>256 (>382)	>256 (>382)	>256 (>382)	>256 (>382)	>256 (>382)	>128 (>191)	29,75 ±0,14
<b>1m</b>	128 (245)	32 (61,5)	64 (122)	64 (122)	32 (61,5)	32 (61,5)	64 (122)	<b>16</b> <b>(30,7)</b>	>128 (>245)	4,90 ±0,19
<b>1n</b>	128 (239)	64 (119)	128 (239)	256 (478)	<b>16</b> <b>(29,9)</b>	<b>32</b> <b>(59,9)</b>	64 (119)	<b>16</b> <b>(29,9)</b>	>128 (>239)	4,99 ±0,99
<b>1o</b>	>256 (>466)	128 (233)	>256 (>466)	>256 (>466)	<b>16</b> <b>(29,2)</b>	<b>32</b> <b>(58,3)</b>	256 (466)	<b>8</b> <b>(14,6)</b>	>128 (>233)	4,71 ±0,07
<b>1p</b>	>256 (>455)	256 (455)	>256 (>455)	>256 (>455)	<b>8</b> <b>(14,2)</b>	<b>64</b> <b>(113)</b>	256 (455)	<b>16</b> <b>(28,4)</b>	>128 (>227)	6,32 ±0,58
<b>AMP</b>	2 (5,72)	16 (45,8)	>16 (>45,8)	>16 (>45,8)	4 (11,5)	4 (11,5)	4 (11,5)	2 (5,72)	–	–
<b>CPX</b>	0,5 (1,51)	>16 (>45,8)	>16 (>45,8)	>16 (>45,8)	1 (3,02)	1 (3,02)	1 (3,02)	64 (193)	–	–
<b>VAN</b>	1 (0,69)	2 (1,38)	1 (0,69)	1 (0,69)	–	512 (353)	512 (353)	1024 (706)	–	–
<b>5-FLU</b>	–	–	–	–	–	–	–	–	1 (7,75)	–
<b>CMP</b>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,20 ±0,07
<b>SDS</b>	128 (443)	128 (443)	64 (222)	64 (222)	128 (443)	256 (887)	128 (443)	128 (443)	–	148,43 ±8,42
<b>CRB</b>	0,25 (0,59)	0,25 (0,59)	0,5 (1,18)	2 (4,73)	0,5 (1,18)	0,5 (1,18)	0,25 (0,59)	0,5 (1,18)	–	1,73 ±0,08
<b>CTC</b>	0,25 (0,63)	0,25 (0,63)	0,5 (1,26)	1 (2,53)	1 (2,53)	0,5 (1,26)	0,5 (1,26)	0,5 (1,25)	–	1,29 ±0,07
<b>PRC</b>	>256 (>1083)	>256 (>1083)	>256 (>1083)	>256 (>1083)	>256 (>1083)	>256 (>1083)	>256 (>1083)	>256 (>1083)	–	>300
<b>TRC</b>	>256 (>1030)	>256 (>1030)	>256 (>1030)	>256 (>1030)	>256 (>1030)	>256 (>1030)	>256 (>1030)	>256 (>1030)	–	>300

<b>TEC</b>	>256 (>968)	>256 (>968)	>256 (>968)	>256 (>968)	>256 (>968)	>256 (>968)	>256 (>968)	>256 (>968)	–	224,13 ±6,52
------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	---	-----------------

Antimikrobiální aktivita sloučenin závisela na délce alkylového řetězce a na povrchové aktivitě. Toto pozorování je v souladu s předchozími výsledky a také se vztahem struktury a účinku antibakteriálně působících lokálních anestetik publikovaných Perem et al. (1999). Aktivita se zároveň zvyšovala se zvyšující se toxicitou látek. Pro srovnání byla studována antibakteriální aktivita lokálních anestetik tetrakainu, trimekainu a prokainu a povrchově aktivních látek cetalkonium chloridu, karbetopendecinium bromidu a laurylsíranu sodného. Lokální anestetika neměla v hodnocených koncentracích žádnou antibakteriální aktivitu.

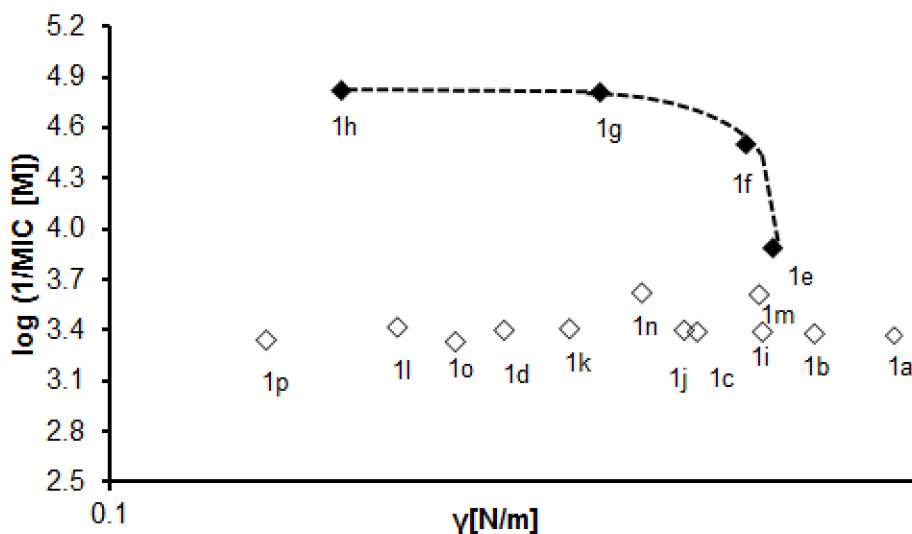
Aktivita byla dále ovlivněna typem heterocyklu. Všechny deriváty s vysokou aktivitou proti grampozitivním bakteriím (**1f-1h**) obsahovaly pyrrolidinový kruh, který se tedy zdá být výhodnější než kruh azepamový. Substituce polohy 3 alkoxyem vedla k vyšší aktivitě než substituce pozice 2. Na druhou stranu, deriváty obsahující lipofilní azepamový kruh byly aktivní proti mykobakteriím (viz dále).

Závislost aktivity proti *S. aureus* ATCC 29213 na lipofilitě vyjádřené jako  $\log k$  a povrchové aktivitě je zobrazena na Obrázcích 46 a 47. Pokud bereme v úvahu pouze aktivní sloučeniny **1e-1h**, aktivita se zvyšuje se zvyšující se lipofilitou až do hodnoty 4,9446 pro látku **1g**, poté zůstává stejná.



**Obrázek 45:** Závislost antistafylokokové aktivity (1/MIC) na lipofilitě. Neaktivní sloučeniny jsou vyznačeny prázdnými symboly. Pro sloučeniny s hodnotami MIC vyššími než nejvyšší měřená hodnota 256  $\mu\text{g/ml}$  byla pro zobrazení v grafu zvolena tato hodnota.

Aktivita sloučenin mírně klesala se zvyšujícím se povrchovým napětím až k hodnotě 0.06285 N/ml pro látku **1f**, poté došlo k prudkému poklesu aktivity k látce **1e** (MIC= 64 µg/ml).



**Obrázek 46:** Závislost antistafylokokové aktivity (1/MIC) na povrchovém napětí. Neaktivní sloučeniny jsou vyznačeny prázdnými symboly. Pro sloučeniny s hodnotami MIC vyššími než nejvyšší měřená hodnota 256 µg/ml byla pro zobrazení v grafu zvolena tato hodnota.

Všechny testované látky byly hodnoceny metodou subkultivace alikvotu na agar pro zjištění hodnoty MBC. Hodnoty MBC testovaných látek byly ve všech případech kromě **1f** u VRE 368 (MIC = 16 µg/ml, MBC = 32 µg/ml), **1h** u VRE 368 (MIC = 4 µg/ml, MBC = 8 µg/ml) a **1e** u VRE 725B (MIC = 16 µg/ml, MBC = 32 µg/ml) shodné s hodnotami MIC, proto nejsou hodnoty MBC pro větší přehlednost tabulky uvedeny. Všechny látky tedy působily baktericidně.

#### 4.9.3 Screening antimykobakteriální a antifungální aktivity dibazických karbamátů

U sloučenin byla stanovena inhibiční aktivita proti všem izolátům mykobakterií a antifungální aktivita proti *C. albicans*, *C. krusei* a rostlinným patogenům *F. avenaceum* a *B. sorokiniana*. Výsledky jsou zobrazeny v Tabulce 23.

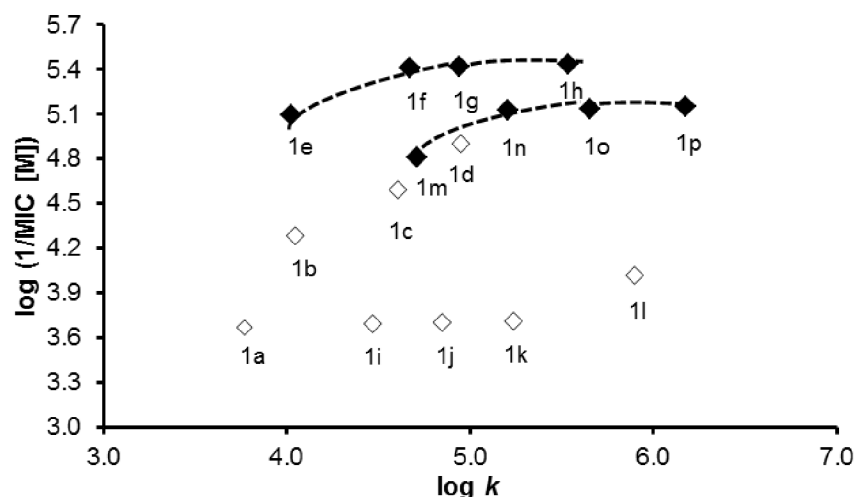
Vztahy mezi aktivitou sloučenin vůči *M. tuberculosis* a jejich lipofilitou a povrchovým napětím jsou zobrazeny na Obrázcích 47 a 48. Ze schématu na Obr. 48 vyplývá, že pokud aktivní látky (vyznačené plnými symboly) rozdělíme do dvou skupin dle heterocyklu, aktivita se zvyšuje se zvyšující se hodnotou  $\log k$ . Látky obsahující pyrrolidin jsou při stejné hodnotě  $\log k$  aktivnější než látky obsahující azepamový kruh. Na druhou stranu, azepamem substituované sloučeniny nevykazovaly žádnou antibakteriální aktivitu vůči gram pozitivním patogenům.

**Tabulka 23:** Hodnoty minimální inhibiční aktivity hodnocených látek proti mykobakteriím. (MS = *M. smegmatis*, MK = *M. kansasii*, MM = *M. marinum*, MTB = *M. tuberculosis*, CA = *C. albicans*, CK = *C. krusei*, BS = *Bipolaris sorokiniana*, FA = *Fusarium avenaceum*, RIF = rifampicin, CPX = ciprofloxacin, ). Hodnoty MIC u *F. avenaceu* a *B. sorokiana* byly stanoveny spektrofotometricky jako MIC<sub>80</sub>.

Slouč.	MIC [ $\mu\text{g/mL}/(\mu\text{M})$ ]							
	MS	MK	MM	MTB	CA	CK	FA	BS
1a	128/	32/	64/	128/	>128/	>128	128	>128
	213	53	106	213	>213	>213	213	>213
1b	64/	16/	32/	32/	>128/	>128/	>128/	>128/
	104	26	52	52	>208	>208	>208	>208
1c	32/	8/	16/	16/	>128/	>128/	>128/	128/
	51	13	25.5	25.5	204	>204	>204	204
1d	16/	4/	8/	8/	>128/	>128/	128/	>128/
	24.9	6	12.5	12.5	199	199	199	199
1e	8/	8/	16/	4/	>128/	>128/	>128/	64/
	16.2	16.2	32.5	8.1	>260	>260	>260	130
1f	8/	4/	2/	2/	128/	>128/	>128/	128
	15.8	7.8	3.9	3.9	246	>246	>246	246
1g	8/	2/	2/	2/	16/	>128/	32/	128
	15,4	3,8	3,8	3,8	30,8	>246,4	61,6	246,4
1h	8	1	2	2	8/	>128/	8/	128/
	/15.0	/1.9	/3.7	/3.7	15.0	>240	15	240
1i	128	32	32	128	>128/	>128/	>128/	>128/
	/203	/51	/51	/203	>203	>203	>203	>203
1j	4	32	32	128	>128/	>128/	>128/	>128/
	/6.2	/50	/50	/199	>199	>199	>199	>199
1k	256	64	64	128	>128/	>128/	-	128/
	/390	/98	/98	/195	>195	>195	-	195
1l	256	256	128	64	>128/	>128/	-	128/
	/382	/382	/191	/96	>191	>191	-	191
1m	16	4	8	8	>128/	>128/	-	128/
	/30.7	/7.9	/15.4	/15.4	245	245	-	245
1n	8	4	8	4	>128/	>128/	-	128/
	/15.0	/7.5	/15.0	/7.5	>240	>240	-	240
1o	4	2	4	4	>128/	>128/	-	32/
	/7.3	/3.7	/7.3	/7.3	233,6	233,6	-	58,4
1p	4	2	4	4	>128/	>128/	-	32/
	/7.1	/3.6	/7.1	/7.1	>227,2	>227,2	-	56,8
CPX	0,125/ 04	0,25/ 0,75	0,125/4 0,4	1/ 3,0	-	-	-	-
AMF	-	-	-	-	0,5/ 0,5	1/ 1,1	-	-

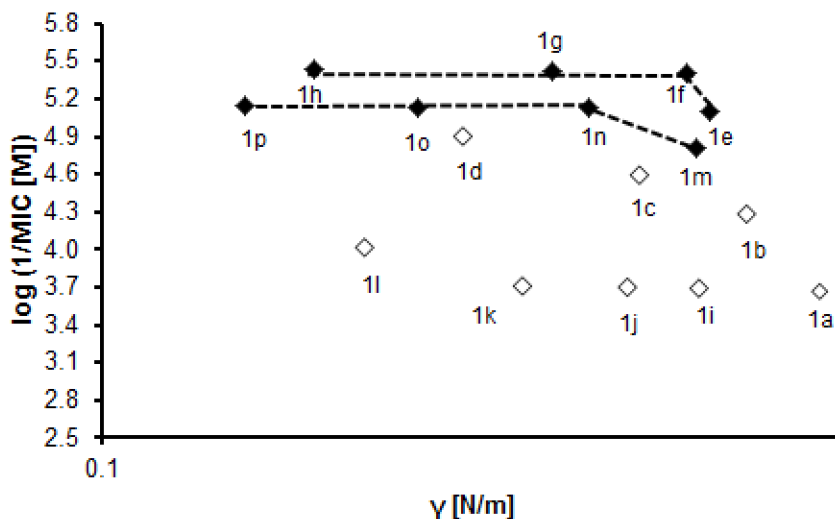
Hodnoty MBC byly stanoveny pro netuberkulózní mykobakterie a byly shodné s hodnotami MIC, proto nejsou pro přehlednost v tabulce zobrazeny.





**Obrázek 47:** Závislost antituberkulózní aktivity ( $1/\text{MIC}$ ) na lipofilitě ( $\log k$ ). Neaktivní sloučeniny ( $\text{MIC} \geq 16 \mu\text{g/mL}$ ) jsou vyznačeny prázdnými symboly. Pro sloučeniny s hodnotami MIC vyššími než nejvyšší měřená hodnota  $128 \mu\text{g/ml}$  byla pro zobrazení v grafu zvolena tato hodnota.

Povrchové napětí nemá vliv na antituberkulózní aktivitu až do hodnoty  $0,06285 \text{ N/ml}$  pro sloučeninu **1f** obsahující pyrolidin, respektive do hodnoty  $0,06154 \text{ N/ml}$  pro sloučeninu **1n** obsahující azepam, poté aktivita klesá. Stejně jako v případě lipofility, látky se stejným povrchovým napětím jsou aktivnější, pokud obsahují pyrolidinový kruh.



**Obrázek 48:** Závislost antituberkulózní aktivity ( $1/\text{MIC}$ ) na povrchovém napětí. Neaktivní sloučeniny ( $\text{MIC} \geq 16 \mu\text{g/mL}$ ) jsou vyznačeny prázdnými symboly. Pro sloučeniny s hodnotami MIC vyššími než nejvyšší měřená hodnota  $128 \mu\text{g/ml}$  byla pro zobrazení v grafu zvolena tato hodnota.

Antifungální aktivita sloučenin byla obecně velice nízká. Žádná látka nebyla aktivní proti *C. krusei*. Celkově nejvyšší aktivita byla pozorována u sloučeniny **1h**,

což pravděpodobně souvisí s její nescifickou toxickou aktivitou. Sloučeniny **1p** a **1o** vykazovaly střední aktivitu (32 µg/ml) proti *F. avenaceum*, což může být vysvětleno jejich lipofilitou.

#### 4.9.4 Kombinovaný účinek vybraných dibazických karbamátů

U sloučenin **1g** a **1h**, které měly nejnižší hodnoty MIC proti grampozitivním bakteriím, byl následně hodnocen synergický účinek v kombinaci s konvenčně užívanými antibiotiky ciprofloxacinem, oxacilinem, gentamicinem a vankomycinem. Zástupci různých skupin byli zvoleni pro ověření předpokladu rozdílného kombinovaného efektu vzhledem k různým mechanismům účinku a rezistence daných sloučenin. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 24.

**Tabulka 24:** Kombinovaný účinek látek **1g** a **1h** s ciprofloxacinem (CPX), vankomycinem (VAN), oxacilinem (OXA) a gentamicinem (GEN). (IND = indiference, ADD = aditivní účinek, SYN = synergický účinek)

Izolát	Kombinace (MIC [µg/ml])	FIC index	Komb. úč. (MIC [µg/ml])
MRSA 63718	<b>1g</b> + CPX (16/16)	1,000	IND
	<b>1h</b> + CPX (8/16)	0,531	ADD 0,25/0,032
	<b>1g</b> + OXA (8/512)	0,500	<b>SYN 2/128</b>
	<b>1h</b> + OXA (4/512)	0,562	ADD 2/32; 1/256
MRSA SA 3202	<b>1g</b> + CPX (16/16)	1,000	IND
	<b>1h</b> + CPX (8/16)	1,000	IND
	<b>1g</b> + OXA (8/512)	1,000	IND
	<b>1h</b> + OXA (8/512)	0,750	ADD 4/128
VRE 342B	<b>1g</b> + VAN (8/1024)	0,625	ADD 4/128
	<b>1h</b> + VAN (8/1024)	0,500	<b>SYN 2/256</b>
	<b>1g</b> + GEN (8/32)	0,750	ADD 4/8
	<b>1h</b> + GEN (8/32)	1,000	IND
VRE 368	<b>1g</b> + VAN (8/512)	0,750	ADD 4/128
	<b>1h</b> + VAN (4/512)	0,750	ADD 2/256
	<b>1g</b> + GEN (8/64)	1,000	IND
	<b>1h</b> + GEN (2/128)	1,016	IND

Synergický efekt byl pozorován u sloučeniny **1g** s oxacilinem proti MRSA 63718 a **1h** s vankomycinem proti VRE 342B. Kombinace látky **1g** s vankomycinem proti VRE 342B a **1h** s oxacilinem proti MRSA 63718 měla aditivní efekt s hodnotami FIC 0,562 a 0,625,

což je blízko hranice pro synergii (0,500). Oxacilin a vankomycin jsou antibiotika interagující se syntézou buněčné stěny, každá látka ovšem působí v jiném kroku syntézy (Breukink et al., 2006; Tipper et al., 1965). Mechanismus rezistence k vankomycinu a oxacilinu je také odlišný. Vankomycin-rezistentní enterokoky mají nahrazený terminální D-Ala peptidoglykanového prekurzoru D-laktátem, což snižuje afinitu vankomycinu asi 1000krát (Arias et al., 2012). Rezistence k oxacilinu je zprostředkována expresí odlišných penicilin-vázajících protein PBP2a (Stapleton et al., 2002). Schopnost sloučenin **1g** a **1h** zvyšovat antibakteriální aktivitu vankomycinu a oxacilinu tedy může být vysvětlena jejich přímou interakcí s bakteriální stěnou.

U použitých izolátů vankomycin-rezistentních enterokoků byl stanoven genetický profil. Všechny izoláty byly nositeli genů *vanA*, *tetM*, a *ermB*. Izoláty VRE 368 and VRE 725B nesly gen *aac*, který je zodpovědný za získanou rezistenci k aminoglykosidům. Narozdíl od „vnitřní“ rezistence nemůže být tento typ rezistence překonán kombinací gentamicinu s antibiotikem interagujícím s buněčnou stěnou. Rozdíl v synergickém efektu hodnocených látek s gentamicinem proti jednotlivým VRE izolátům by mohl být způsoben právě rozdílným typem rezistence. Hodnocené látky mohly přímou interakcí s buněčnou stěnou VRE 342B zvýšit prostup gentamicinu do buňky a tím pádem potencovat jeho aktivitu.

#### **4.9.5 Dynamika antibakteriálního účinku vybraných dibazických karbamátů**

Sloučeniny s nejnižší hodnotou MIC **1g** a **1h** byly hodnoceny metodou „time-kill“ pro stanovení vlivu koncentrace a délky inkubace na baktericidní aktivitu. Výsledky (viz Tabulky 25 a 26) jsou interpretovány jako logaritmus rozdílu v počtu kolonií vzhledem k hodnotě negativní kontroly v čase 0. Pokles o  $\log=3$  odpovídá poklesu o 99,9 % CFU/ml a značí baktericidní aktivitu látky.

**Tabulka 25:** Dynamika baktericidního účinku látky **1g**. (SA = *S. aureus* ATCC 29213; EF = *E. faecalis* ATCC 29213; MRSA = klinický izolát methicilin-rezistentní *S. aureus*; VRE = klinické izoláty vankomycin-rezistentních *E. faecalis*. Tučně-baktericidní efekt; \*- statisticky významná interakce mezi koncentrací a časem.).

Izolát	Konc.	Log10 rozdílu CFU/ml vzhledem k negativní kontrole t=0			
		4 h	6 h	8 h	24 h
SA	1× MIC	1,54	1,98	2,33	2,74
	2× MIC	0,87	0,98	1,26	2,24
	4× MIC	-0,26	-0,04	0,10	1,85
MRSA 63718	1× MIC	0,00	0,66	1,00	1,99
	2× MIC	-1,33	-0,93	-0,26	1,29
	4× MIC	-2,57*	-1,99	-1,26*	1,21
EF	1× MIC	-1,63	-1,01	-0,61	0,27
	2× MIC	<b>-3,37*</b>	<b>-3,43*</b>	-2,68	1,04
	4× MIC	<b>-5,62*</b>	<b>-5,14*</b>	<b>-5,92*</b>	-0,31
VRE 342 B	1× MIC	-0,14	0,97	1,01	1,11
	2× MIC	-0,36	-1,89	-0,64	1,51
	4× MIC	-0,92	-1,00	-1,09	0,77
VRE 368	1× MIC	-2,00	0,29	0,25	-0,16
	2× MIC	-2,34	-1,97	-1,01	0,32
	4× MIC	-2,72*	-2,71*	-2,45	0,97
VRE 725B	1× MIC	-0,09	-0,29	0,19	2,41
	2× MIC	-0,75	-0,74	0,56	0,43
	4× MIC	-1,85	-1,85	-2,15	-2,27

Látka **1g** působila baktericidně pouze proti *E. faecalis*, a to v koncentraci 2MIC po 5 a 6 hodinách inkubace a v koncentraci 4 MIC po 4,6 a 8 hodinách. Snížení počtu CFU/ml o  $\geq 90\%$  bylo pozorováno u VRE 725B, VRE 368, and MRSA 63718 alespoň v jednom čase a koncentraci. Výsledky byly statisticky analyzovány dvoucestnou ANOVOU a Tukey testem. Interakce mezi koncentrací a časem byly statisticky významné pro aktivitu proti MRSA 63718 a VRE 368. Antibakteriální efekt proti *S. aureus* a VRE 342B závisel na čase i koncentraci, ale mezi těmito parametry nebyla nalezena statisticky významná interakce. U izolátu VRE 725B byla antimikrobiální aktivita pouze koncentračně závislá. Souhrnem lze říci, že statisticky významný antimikrobiální efekt byl pozorován již v čase 4 hodiny po začátku inkubace, což podporuje teorii o interakci látek s plazmatickou membránou a buněčnou stěnou.

**Tabulka 26:** Dynamika baktericidního účinku látky **1h**. (SA = *S. aureus* ATCC 29213; EF = *E. faecalis* ATCC 29213; MRSA = klinický izolát methicilin-rezistentní *S. aureus*; VRE = klinické izoláty vankomycin-rezistentních *E. faecalis*. \*- statisticky významná interakce mezi koncentrací a časem.)

Izolát	Konc.	Log10 rozdílu CFU/ml vzhledem k negativní kontrole t=0			
		4 h	6 h	8 h	24 h
SA	1× MIC	0,08	0,31	0,50	2,07
	2× MIC	0,05	0,10	0,05	2,01
	4× MIC	-0,25	-0,13	-0,08	1,93
MRSA 63718	1× MIC	-0,73*	-0,11	0,98	1,58
	2× MIC	-0,92*	-0,42*	-0,13	1,62
	4× MIC	-2,48*	-2,40*	-2,08*	1,35
EF	1× MIC	-0,64	0,16	0,24	0,34
	2× MIC	-1,87	-1,36	-0,86	0,42
	4× MIC	-2,57*	-2,23*	-1,62	0,49
VRE 342 B	1× MIC	0,07	1,08	-0,08	1,42
	2× MIC	0,09	0,41	-0,02	0,47
	4× MIC	-0,78	-0,99	-0,66	0,85
VRE 368	1× MIC	0,46	0,71	1,25	1,13
	2× MIC	0,28	0,54	-0,37	0,66
	4× MIC	-0,32	0,05	0,22	0,37
VRE 725B	1× MIC	-0,70	0,08	-0,05	0,92
	2× MIC	-1,81	-1,31	-0,81	0,95
	4× MIC	-1,75*	-0,76	-0,76	1,08

U látky **1h** nebyl pozorován žádný baktericidní efekt. Statisticky významné poklesy CFU/ml byly zaznamenány v čase 4 hodiny. Interakce mezi časem a koncentrací byla významná pro aktivitu proti všem izolátům s výjimkou VRE 342B a VRE 368. Stejně jako u látky **1g**, toto pozorování podporuje předpokládaný mechanismus účinku dibazických karbamátů. Opětovný nárůst kultury po uplynutí 8-24 hodin od počátku inkubace je pravděpodobně způsoben selekcí rezistentních mutantů.

#### 4.9.6 Antibiofilmová aktivita vybraných dibazických karbamátů

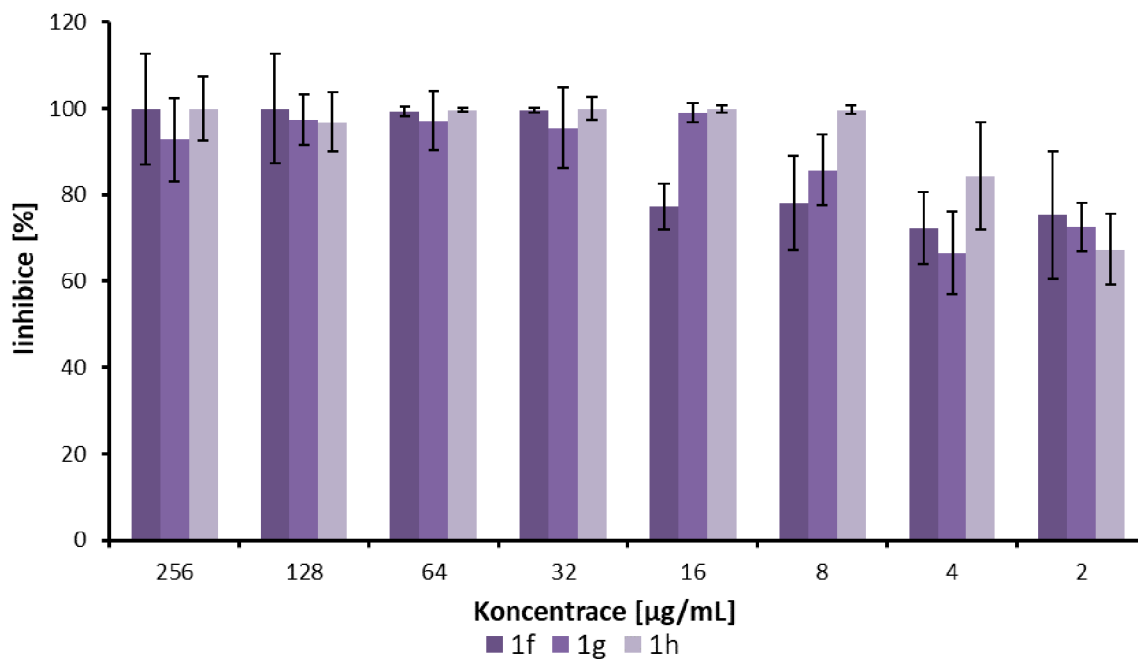
Antibiofilmový efekt byl studován u látek **1f**, **1g**, a **1h** proti *S. aureus* ATCC 29213. Minimální biofilmová inhibiční koncentrace a minimální biofilmová eradikační koncentrace byla stanovena jako nejnižší koncentrace inhibující růst/ eradikující 80 % biofilmu

v porovnání s kontrolou. MBIC byla shodná s MIC v případě **1g** a **1h** a dvojnásobná v případě **1f**. MBEC byla u látky **1h** pouze dvojnásobek MIC a v případě zbývajících sloučenin čtyřnásobná. Antibiofilmová aktivita sloučenin se zvyšovala se zvyšující se povrchovou aktivitou a délkou alkylového řetězce. Inhibiční a eradikační aktivita v závislosti na koncentraci je zobrazena graficky na Obrázcích 49 a 50.

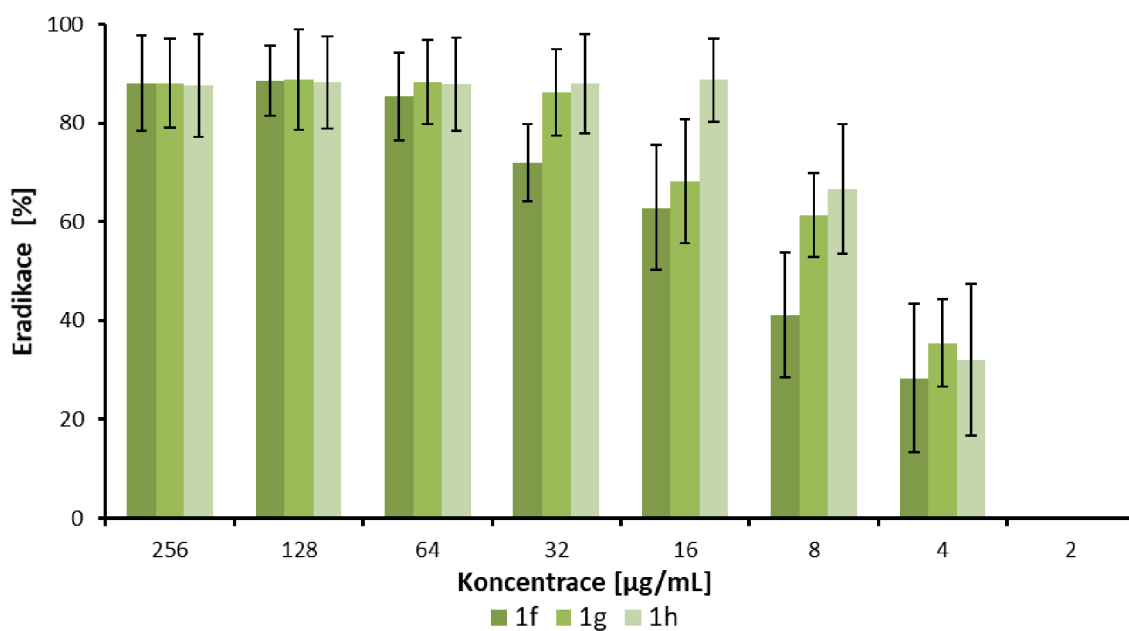
Pro srovnání byla stanovena minimální biofilmová inhibiční a eradikační koncentrace také pro referenční látky laurylsíran sodný, cetalkonium bromid, karbetopendecinium chlorid a pro lokální anestetika. U lokálních anestetik nebyla v hodnocených koncentracích pozorována žádná aktivita na formaci a eradikaci biofilmu. Povrchově aktivní sloučeniny měly minimální biofilmovou inhibiční aktivitu srovnatelnou s hodnotami MIC, ale hodnoty minimální biofilmové eradikační koncentrace byly násobně vyšší. Hodnota MBEC u surfaktantu laurylsíranu sodného byla shodná s MIC, na druhou stranu hodnota MIC (128 µg/ml) byla 3-4 násobná oproti hodnoceným sloučeninám. Na základě těchto výsledků lze tedy říct, že antibiofilmová aktivita sloučenin **1f–1h** není podmíněna pouze jejich povrchovou aktivitou.

**Tabulka 27:** Srovnání minimální inhibiční aktivity (MIC), minimální biofilmové inhibiční aktivity (MBIC) a minimální biofilmové eradikační aktivity (MBEC) hodnocených látek **1f**, **1g** a **1h** s lokálními anestetiky a povrchově aktivními látkami. (SDS = laurylsulfát sodný, CRB = carbethopendecinium bromid, CTC = cetalkonium chlorid, PRC = prokain, TRC = trimekain, TEC = tetrakain)

Slouč.	[µg/mL]		
	MIC	MBIC <sub>80</sub>	MBEC <sub>80</sub>
<b>1f</b>	16	32	64
<b>1g</b>	8	8	16
<b>1h</b>	8	8	16
<b>SDS</b>	128	32	128
<b>CRB</b>	0.25	0.25	64
<b>CTC</b>	0.25	0.25	>256
<b>PRC</b>	>256	>256	>256
<b>TRC</b>	>256	>256	>256
<b>TEC</b>	>256	>256	>256



**Obrázek 49:** Inhibiční biofilmová aktivita vybraných dibazických karbamátů na tvorbu biofilmu *S. aureus* ATCC 29213.



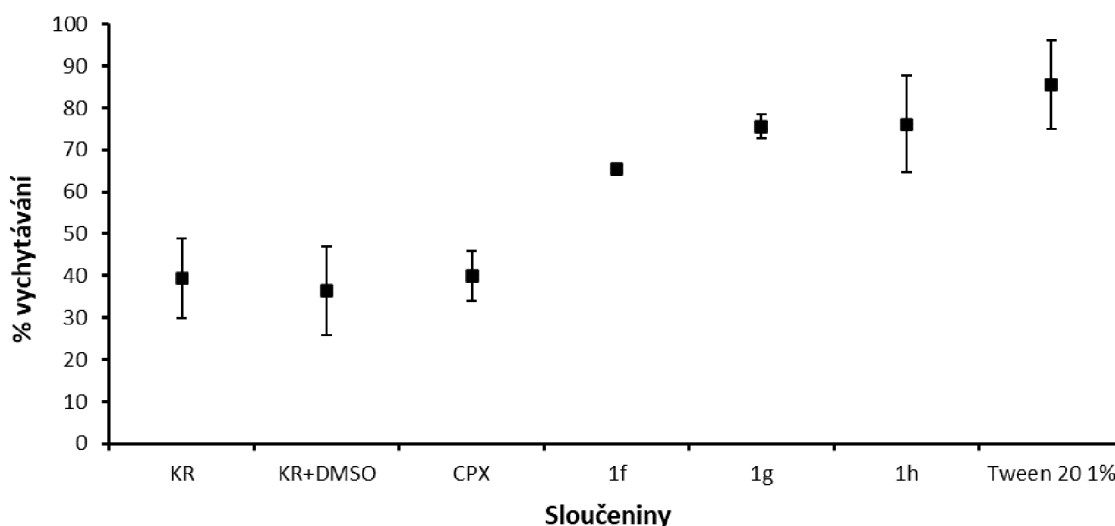
**Obrázek 50:** Eradikační aktivita vybraných dibazických karbamátů na biofilm *S. aureus* ATCC 29213.

#### 4.9.7 Ovlivnění permeability cytoplazmatické membrány vybranými dibazickými karbamáty

Efekt na plazmatickou membránu *S. aureus* ATCC 29213 byl studován u sloučenin **1f**, **1g** a **1h** v koncentraci 64 µg/ml. Vychytávání krystalové violeti bylo vyjádřeno procentuálně ve srovnání s roztokem violeti. Jak negativní kontrola byl požit roztok ciprofloxacinu

(64 µg/ml) a roztok obsahující DMSO ve stejné koncentraci jako vzorky; jako pozitivní kontrola 1% roztok Tweenu 20. Výsledky jsou zobrazeny graficky na Obrázku 51.

Všechny hodnocené látky měly efekt na vychytávání violeti srovnatelný s pozitivní kontrolou a mezi jednotlivými látkami nebyl pozorován signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ). Negativní kontrola ciprofloxacin (CPX) stejně jako kontrola obsahující DMSO ve stejné koncentraci jako u hodnocených látek byla statisticky srovnatelná s kontrolou růstu.



**Obrázek 51:** „Crystal violet uptake“ studovaný u *S. aureus* ATCC 29213 po kultivaci se sloučeninami **1f**, **1g** a **1h**. KR-negativní kontrola, KR+DMSO-negativní kontrola + DMSO, CPX-ciprofloxacin.

#### 4.9.8 Závěr

Byla zhodnocena komplexní antibakteriální a antimykobakteriální aktivita 16 dibazických karbamátů lišících se délkou uhlovodíkového řetězce a heterocyklem. Pro aktivitu vůči grampozitivním patogenům se jako nejdůležitější prokázala přítomnost pyrrolidonového kruhu a povrchová aktivita látky. Antimykobakteriální účinek látek se zvyšoval se zvyšující se lipofilitou. Sloučeniny obsahující pyrrolidinový kruh byly při stejné hodnotě lipofility aktivnější než sloučeniny s azepamovým cyklem.

Sloučeniny **1g** a **1h** s nejvyšší aktivitou proti grampozitivním patogenům byly studovány metodou „time-kill“ a byl u nich stanoven kombinovaný účinek s klinicky užívanými antibakteriálními látkami. Metodou „time-kill“ a následnou statistickou analýzou byl zjištěn pokles CFU/ml již po 4 hodinách od začátku inkubace, což podporuje teorii o interakci s cytoplazmatickou membránou. Interakce s plazmatickou membránou byla následně potvrzena experimentem s vychytáváním krystalové violeti. Při kombinaci



s gentamicinem proti kmenu VRE 342 s vnitřní rezistencí ke gentamicinu byl pozorován synergický, respektive aditivní účinek, kdežto u kmenu VRE 368 tato kombinace aktivitu nezvyšovala. Tento výsledek je možné vysvětlit schopností hodnocených dibazických karbamátů usnadnit vstup gentamicinu do bakteriální buňky a tím snižovat hodnotu MIC.

Sloučeniny **1g**, **1f** a **1h** byly testovány jako inhibitory a disruptory biofilmu *S. aureus* ATCC 29213. Hodnoty minimální biofilmové inhibiční a eradikační koncentrace byly pouze 2–4 vyšší než hodnoty MIC. U povrchově aktivních látek karbetopendecinium bromidu a cetylyalkonium chloridu, které byly použity jako referenční, byly hodnoty MBEC násobně větší. Můžeme tedy předpokládat, že eradikační aktivita vůči stafylokovému biofilmu není vyvolána pouze povrchovou aktivitou látek.

U látek byla stanovena toxicita vůči monocytům linie THP-1. Hodnoty IC<sub>50</sub> jsou bohužel vyšší, než hodnoty MIC, což tyto látky vylučuje z dalšího hodnocení jako antibakteriální sloučeniny použitelné *in vivo*. Na druhou stranu, jejich silná antibiofilmová aktivita a zároveň anestetický účinek by mohl nalézt uplatnění například ve vývoji katétrů opatřených antibakteriálním povrchem.

Závěry lze shrnout do několika bodů

- Dibazické karbamáty jsou povrchově aktivní látky působící baktericidně interakcí s cytoplasmatickou membránou.
- Sloučeniny **1g**, **1f** a **1h** inhibují a eradikují stafylokokový biofilm v koncentracích 2–4 vyšších než MIC. Srovnáním s povrchově aktivními látkami lze říci, že pouze povrchová aktivita dibazických karbamátů nevysvětluje eradikační efekt na biofilm.
- Sloučeniny **1g** a **1h** zvyšují aktivitu gentamicinu proti VRE 342, což může být vysvětleno jejich přímou interakcí s buněčnou stěnou.
- Látky se vzhledem k vysoké toxicitě nehodí k dalšímu studiu jako antibakteriální léčiva, ale díky anestetickému efektu a efektu na bakteriální biofilm by mohly být využity například ve vývoji katétrů s antibakteriálním povrchem.

## 4.10 Protiinvazivní aktivita substituovaných 3-(piperazin-1-yl)propan-1,2-diolů

Piperazinové jádro je součástí řady biologicky aktivních sloučenin a je jednou z privilegovaných struktur používaných v organické syntéze (Lemke et al, 2013). Tato struktura umožňuje řadu cílených modifikací jako je ovlivnění lipofility a elektronových vlastností (Horton, 2003). Deriváty piperazinů jsou známy řadou farmakologických účinků jako například antidepressivní, anthelmintický, antikonvulzivní a samozřejmě antibakteriální, antimykobakteriální a antifungální (Shaquiquzzaman e at., 2015).

### 4.10.1 Charakteristika hodnocených substituovaných 3-(piperazin-1-yl)propan-1,2-diolů

Tato skupina látek byla rozdělena na základě struktury do 2 podskupin:

- A. nitrofenylpiperaziny označené **P11-P20**, které byly připraveny Dr. Marvanovou z FaF VFU Brno jako látky s potenciálním antiarytmickým účinkem.
- B. karbamoyhydroxylpiperaziny označené **5a-5d1** připravené Dr. Čurillovou a doc. Malíkem z FaF UK v Bratislave.

#### 4.10.1.1 Charakteristika podskupiny A: nitrofenylpiperaziny

Struktury celkem 10 nových nitrofenylpiperazinů a jejich fyzikálně chemické vlastnosti jsou shrnuty v Tabulce 28.

**Tabulka 28:** Struktury sloučenin podskupiny nitrofenylpiperazinů a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti: lipofility vyjádřená jako  $\log k_w$ , acidobazická disociační konstanta  $pK_a$ , elektronové  $\sigma^*$  parametry a povrchové napětí. (Převzato z Pospíšilová et al., 2019).

Slouč.	R <sup>1</sup>	$\log k_w$	$pK_a$	$\sigma^*$	Povrchové napětí [dyne/cm <sup>2</sup> ]
P11	CH <sub>3</sub>	3,57±0,08	6,08±0,02	0,00	54,54
P12	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	4,12±0,12	5,87±0,04	-0,11	53,41
P13	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	4,80±0,08	5,89±0,03	-0,12	52,41
P14	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4,52±0,07	5,83±0,02	-0,19	51,74
P15	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	5,42±0,08	5,37±0,02	-0,25	51,51
P16	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub>	3,35±0,04	5,99±0,01	0,20	53,11
P17	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	3,84±0,08	6,13±0,02	0,20	52,18
P18	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	4,52±0,08	5,86±0,03	0,20	51,34
P19	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4,35±0,09	6,22±0,03	0,22	50,75
P20	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>	4,20±0,07	5,83±0,02	0,22	51,79

#### 4.10.1.2 Screening antimikrobiální, antimykobakteriální a antifungální aktivity nitrofenylpiperazinových derivátů

Sloučeniny byly testovány z hlediska aktivity vůči referenčním kmenům *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29213, methicilin rezistentnímu izolátu MRSA 63718, mykobakteriím a rostlinným patogenům *F. avenaceum* a *B. sorokiniana*. Screening aktivity proti stafylokokům a netuberkulózním mykobakteriím byl proveden PharmDr. Janou Kašťánkovou a je součástí její rigorózní práce. Výsledky jsou shrnuty v Tabulkách 29 a 30.

**Tabulka 29:** Antibakteriální aktivita nitrofenylpiperazinů. (SA = *S. aureus* ATCC 29213, EF = *E. faecalis* ATCC 29213).

Slouč.	R	MIC [µg/ml]/ [µM]		
		SA	MRSA 63718	EF
P11	CH <sub>3</sub>	>256 / >524	>256/ >524	>256/ >524
P12	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	>256/ >509	>256/ >509	>256/ >509
P13	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	>256/ >495	>256/ >495	>256/ >495
P14	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	>256/ >495	>256/ >495	>256/ >495
P15	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	>256/ >482	>256/ >482	>256/ >482
P16	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub>	>256/ >480	>256/ >480	>256/ >480
P17	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	>256/ >468	>256/ >468	>256/ >468
P18	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	>256/ >456	>256/ >456	>256/ >456
P19	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	>256/ >456	>256/ >456	>256/ >456
P20	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>	>256/ >458	>256/ >458	>256/ >458
AMP		2/ 5.72	>16/ >45.5	2/ 5.72

**Tabulka 30:** Antimykobakteriální a antifungální aktivita nitrofenylpiperazinů. (MS = *M. smegmatis*, MK = *M. kansasii*, MTB = *M. tuberculosis*, BS = *Bipolaris sorokiniana*, FA = *Fusarium avenaceum*).

Slouč.	R	MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ]/ [ $\mu\text{M}$ ]					
		MS	MK	MM	MTB	BS	FA
<b>P11</b>	CH <sub>3</sub>	>256 / >524	16 / 32.7	128 / 262	128/ 262	64/ 131	64/ 131
<b>P12</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	>256/ >509	32 / 63.7	128 / 254	128 / 254	128/ 254	>256/ >509
<b>P13</b>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	>256/ >495	32/ 61.7	32/ 61.7	64/ 123	128/ 247	>256/ >495
<b>P14</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	>256/ >495	8/ 15.4	128/ 247	128/ 247	64/ 123	64/ 123
<b>P15</b>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	>256/ >482	8 / 15.0	8/ 15.0	128/ 241	64/ 120	64/ 120
<b>P16</b>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub>	>256/ >480	16/ 30.0	>256/ >480	128/ >240	128/ 240	32/ 60.1
<b>P17</b>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	>256/ >468	32/ 58.6	64/ 115	>128/ >234	128/ 234	64/ 117
<b>P18</b>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	>256/ >456	16/ 28.5	64/ 114	>128/ >228	64/ 114	8/ 14.2
<b>P19</b>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	>256/ >456	32/ 57.1	256/ 456	>128/ >228	64/ 114	64/ 114
<b>P20</b>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>	>256/ >458	16/ 28.6	32/ 57.3	>128/ >229	128/ 229	>256/ >458
<b>INH</b>		116/17	4/29.2	64/467	5/36.5	–	–
<b>BNM</b>		–	–	–	–	5/17.2	0,5/1.7

Žádná z hodnocených sloučenin nebyla aktivní proti stafylokokům, *E. faecalis* ATCC 29212 ani rychle rostoucí mykobakterii *M. smegmatis*. Sloučenina **P18** (R = C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>) byla nejaktivnější proti *F. avenaceum*, sloučeniny **P14** (R = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) a **P15** (R = C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>) měly nejvyšší aktivitu proti *M. kansasii*; sloučenina **P15** byla navíc aktivní proti *M. marinum*. Aktivita většiny testovaných sloučenin proti *M. kansasii* a *M. marinum* byla vyšší nebo srovnatelná s izoniazidem. Vzhledem k limitované aktivitě hodnocených sloučenin nelze přesně zhodnotit vztahy mezi strukturou a aktivitou, nicméně lze pozorovat určité trendy v rámci jejich antimykobakteriálního efektu.

Z Tabulek 28 a 30 vyplývá, že na účinnost má určitý vliv lipofilita; tři nejvíce lipofilní deriváty **P14**, **P15** a **P18** (interval log  $k_w$  4,52 až 5,42) mají i nejvyšší aktivitu. Aktivita je i částečně ovlivněna ionizovatelností vyjádřenou hodnotou  $pK_a$ ; aktivita se snižuje se zvyšující se hodnotou  $pK_a$ . Při hodnocení vlivu elektronových parametrů alkoxylových, resp. alkoxyethoxylových řetězců lze vysledovat, že čím vyšší je elektron-donorová schopnost alkoxy substituentů ( $\sigma^* = -0,19$  a  $-0,25$ ), resp. elektron-akceptorní vlastnosti alkoxyethoxylových řetězců, tím je aktivita vyšší. Aktivita rovněž koreluje s velikostí

povrchového napětí. Tedy čím je hodnota povrchového napětí nižší (neboli čím je větší povrchová aktivita sloučeniny) tím je látka účinnější.

Výše zmíněná skutečnost podporuje předpoklad důležitosti délky řetězce pro aktivitu, jak bylo např. popsáno ve studiích (Zadrazilová et al., 2015; Goněc et al., 2016; Imramovský et al., 2011) přičemž se lze ale domnívat, že izosterní náhrada uhlíku uprostřed řetězce snižuje aktivitu zásahem do všech výše diskutovaných parametrů (lze srovnat **P15** s izosterní **P16** ( $R = C_2H_4OCH_3$ )). Otázkou však zůstává, zda by došlo k poklesu aktivity i s prodlužujícím se uhlíkatým řetězcem delším než  $C_4$ . Protože delší alkoxyderiváty nebyly připraveny lze jen konstatovat, že z dané série se jako nejvýhodnější ukázala substituce butoxy řetězcem, což je na druhou stranu v souladu s výsledky popsány u strukturně podobných sloučenin (Malík et al., 2016; Goněc et al., 2017; Bak et al., 2018).

Hodnocené sloučeniny **P11–P20** byly součástí souboru derivátů *N*-fenylpiperazinů, u kterých byla hodnocena antibakteriální a antimykobakteriální aktivita (Kaštánková, 2018). Deriváty byly rozděleny do 6 podskupin na základě substituentu fenylpiperazinového kruhu (H, 2-OCH<sub>3</sub>, 4-OCH<sub>3</sub>, 2-F, 4-F, 4-NO<sub>2</sub>). Skupina nitroderivátů diskutovaná v této kapitole, vykazovala ze všech testovaných substituentů fenylpiperazinového kruhu nejlepší antimykobakteriální proti *M. kansasii* a *M. marinum* (*M. tuberculosis* hodnocena nebyla). Žádná ze skupin nebyla aktivní proti grampozitivním patogenům. Z těchto výsledků lze usuzovat, že nitroskupina je z hlediska antimykobakteriální aktivity klíčová. Důležité je také zjištění, že prekurzory těchto derivátů, tj. nitrofenylpiperazin a 3-[4-(4-nitrofenyl)piperazin-1-yl]propan-1,2-diol nevykazoval prakticky žádnou antimykobakteriální aktivitu; nejnižší hodnota byla naměřena u nitrofenylpiperazinu proti *M. kansasii* a to 128 µg/ml.

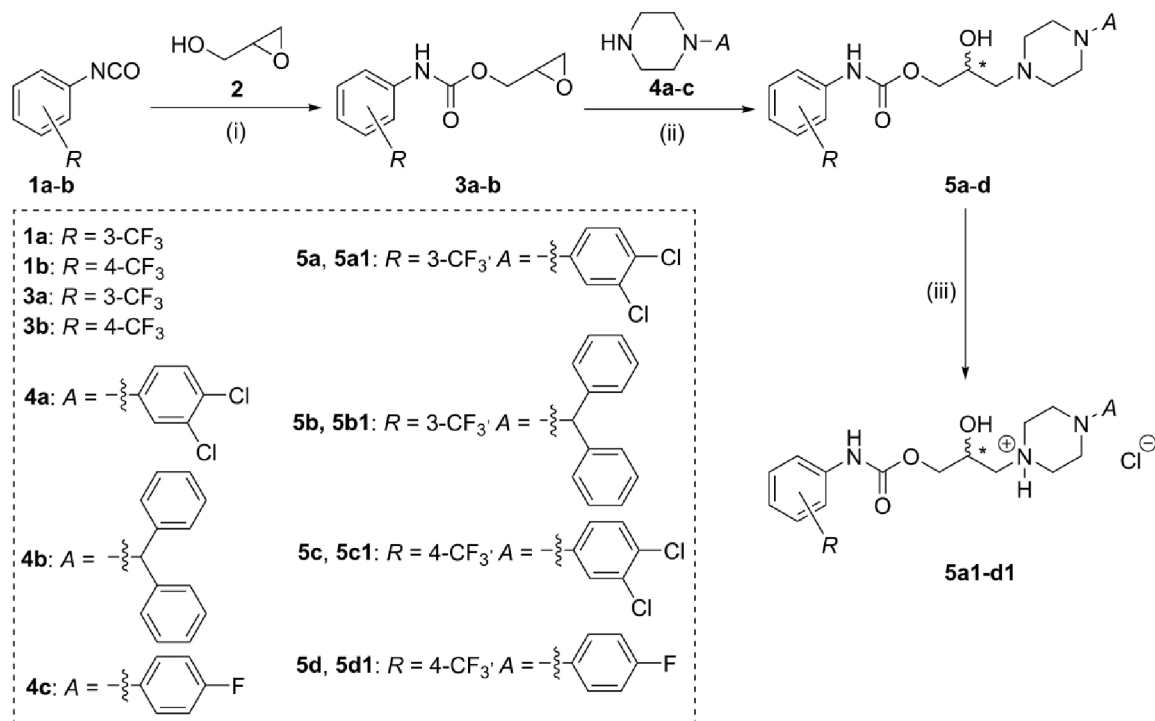
U některých derivátů byla zaznamenána i aktivita vůči *F. avenaceum* a *B. sorokiniana*. Hodnoty MIC u neaktivnější sloučeniny **P18** byly ovšem asi osminásobné v porovnání s referenční antifungální sloučeninou benomylem.

#### 4.10.1.3 *In vivo* toxicita *N*-fenylpiperazinů proti rostlinným buňkám

U všech nitrofenylpiperazinových derivátů byl *in vivo* studován potenciální cytotoxický efekt na buňky *Nicotiana tabacum* var. Samsun. Vodný roztok sloučenin o koncentraci odpovídající  $1 \times$  MIC proti *Bipolaris sorokiniana* byl injektován v triplicátech do pokožky listů 3 různých rostlin. Žádná z hodnocených látek **P11–P20** ani negativní kontrola (vodný roztok DMSO o stejné koncentraci jako ve vzorcích) nezpůsobil žádné pozorovatelné morfologické změny na listech. Pozitivní kontrola 5% roztok DMSO naopak vyvolával signifikantní toxický efekt, který se projevil jako ztráta chlorofylu v injektované oblasti.

#### 4.10.2 Charakteristika podskupiny B: karbamoylhydroxypiperaziny

Syntéza hodnocených karbamoylhydroxypiperazinů je zobrazena na Obrázku 52. Struktury a fyzikálně-chemické vlastnosti jednotlivých derivátů jsou shrnuty v Tabulce 31.



**Obrázek 52:** Syntéza karbamoylhydroxypiperazinů. Převzato z Pospíšilová et al., 2020.

**Tabulka 31:** Struktury a fyzikálně-chemické vlastnosti hodnocených karbamoylhydroxypiperazinů: hydrofobní substituentová konstanta  $\pi$ , elektronové  $\sigma$  parametry a molární objem.

Slouč.	R	R			A	A			ClogP <sup>b</sup>
		$\pi^a$	$\sigma^a$	MV <sup>a</sup> [cm <sup>3</sup> ]		$\pi^a$	$\sigma^a$	MV <sup>a</sup> [cm <sup>3</sup> ]	
<b>5a</b>	3-CF <sub>3</sub>	2,73	0,89	113,57	3,4-Cl-Ph	2,77	1,19	103,54	5,7703
<b>5a1</b>	3-CF <sub>3</sub>	2,73	0,89	113,57	3,4-Cl-Ph	2,77	1,19	103,54	5,9677
<b>5b</b>	3-CF <sub>3</sub>	2,73	0,89	113,57	(Ph) <sub>2</sub> CH	3,47	0,41	155,33	5,8727
<b>5b1</b>	3-CF <sub>3</sub>	2,73	0,89	113,57	(Ph) <sub>2</sub> CH	3,47	0,41	155,33	6,0701
<b>5c</b>	4-CF <sub>3</sub>	2,73	0,95	113,57	3,4-Cl-Ph	2,77	1,19	103,54	5,7703
<b>5c1</b>	4-CF <sub>3</sub>	2,73	0,95	113,57	3,4-Cl-Ph	2,77	1,19	103,54	5,9677
<b>5d</b>	4-CF <sub>3</sub>	2,73	0,95	113,57	4-F-Ph	1,69	0,62	85,90	4,5475
<b>5d1</b>	4-CF <sub>3</sub>	2,73	0,95	113,57	4-F-Ph	1,69	0,62	85,90	4,7449

<sup>a</sup> predikováno pomocí ACD/Percepta ver. 2012 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, 2012), <sup>b</sup> predikováno pomocí ChemBioDraw Ultra 13.0 (CambridgeSoft, PerkinElmer Inc., MA, USA)

#### 4.10.2.1 Screening antibakteriální aktivity karbamoylhydroxypiperazinů

Sloučeniny podskupiny B byly otestovány proti všem isolátům stafylokoků, enterokoků a mykobakterií. Všechny sloučeniny byly aktivní v koncentracích 8–64 µg/ml. Aktivita vůči stafylokokům a enterokokům nebyla ovlivněna prezencí genu *mecA*, resp. *vanA*. Výsledky jsou zobrazeny v Tabulkách 32–34.

**Tabulka 32:** Antistafylokoková aktivita karbamoylhydroxypiperazinů.

Slouč.	MIC (MBC) [µg/ml] / MIC (MBC) [uM]			
	<i>S.aureus</i> ATCC 29213	MRSA 63718	MRSA SA 630	MRSA SA 3202
<b>5a</b>	8 (16)/ 16,25 (32,5)	8 (16)/ 16,25 (32,5)	16 (16)/ 32,5 (32,5)	8 (8)/ 16,2 (16,2)
<b>5a1</b>	4 (4)/ 7,5 (7,5)	4 (4)/ 7,5 (7,5)	8 (8)/ 15,1 (15,1)	8 (8)/ 15,1 (15,1)
<b>5b</b>	8 (16)/ 15,5 (31,1)	16 (16)/ 31,1 (31,1)	16 (16)/ 31,1 (31,1)	16 (16)/ 31,6 (31,1)
<b>5b1</b>	8 (8)/ 14,5 (14,5)	8 (8)/ 14,5 (14,5)	8 (8)/ 14,5 (14,5)	8 (8)/ 14,5 (14,5)
<b>5c</b>	8 (8)/ 16,25 (16,25)	8 (8)/ 16,25 (16,25)	8 (8)/ 16,25 (16,25)	8 (8)/ 16,25 (16,25)
<b>5c1</b>	16 (16)/ 30,2 (30,2)	16 (16)/ 30,2 (30,2)	16 (16)/ 30,2 (30,2)	16 (16)/ 30,2 (30,2)
<b>5d</b>	8 (16)/ 18,12 (36,2)	16 (16)/ 36,2 (36,2)	8 (8)/ 18,1 (18,1)	8 (16)/ 18,1 (36,2)
<b>5d1</b>	32 (32)/ 66,9 (66,9)	16 (16)/ 33,4 (33,4)	16 (16)/ 33,4 (33,4)	16 (16)/ 33,4 (33,4)
<b>3a</b>	8/30,6	-	-	-
<b>3b</b>	4/15,3	-	-	-
<b>4a</b>	>256/>1107	-	-	-
<b>4b</b>	>256/>1014	-	-	-
<b>4c</b>	>256/>1420	-	-	-
<b>AMP</b>	2/ 5,7	>16 />45,8	>16 />45,8	>16 />45,8
<b>CPX</b>	0,5/1,5	1/3,0	64/193	1/3,0

**Tabulka 33:** Antienterokoková aktivita karbamoylhydroxypiperazinů.

Sloučenina	MIC (MBC) [µg/ml] / MIC (MBC) [uM]			
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	VRE 342B	VRE 368	VRE 725B
<b>5a</b>	16 (16)/ 32,5 (32,5)	16 (16)/ 32,5 (32,5)	16 (16)/ 32,5 (32,5)	8 (8)/ 16,2 (16,2)
<b>5a1</b>	8 (8)/ 15,1 (15,1)	16 (16)/ 30,2 (30,2)	8 (8)/ 15,1 (15,1)	8 (8)/ 15,1 (15,1)
<b>5b</b>	16 (16)/ 31,1 (31,1)	16 (16)/ 31,1 (31,1)	32 (32) / 62,3 (62,1)	8 (16) 15,5
<b>5b1</b>	64 (64)/ 116,3 (116,3)	64 (64)/ 116,3 (116,3)	128 (128)/ 232,7 (232,7)	32 (32)/ 58,1 (58,1)

<b>5c</b>	4 (8)/ 8,12(16,25)	8 (8)/ 16,25 (16,25)	8 (8)/ 16,25 (16,25)	2 (4)/ 4,06 (8,12)
<b>5c1</b>	16 (16)/ 30,2 (30,2)	16 (16)/ 30,2 (30,2)	16 (16)/ 30,2 (30,2)	16 (16)/ 30,2 (30,2)
<b>5d</b>	16 (16)/ 36,2 (36,2)	16 (32)/ 36,2 (72,4)	32 (32)/ 72,4 (72,4)	32 (32)/ 72,4 (72,4)
<b>5d1</b>	32/ 66,9	32/ 66,9	32/ 66,9	32/ 66,9
<b>3a</b>	32/122	-	-	-
<b>3b</b>	128/490	-	-	-
<b>4a</b>	>256/>1107	-	-	-
<b>4b</b>	>256/>1014	-	-	-
<b>4c</b>	>256/>1420	-	-	-
<b>AMP</b>	4/11,5	4/11,5	4/11,5	2/5,7
<b>CPX</b>	1/3	1/3	1/3	64/193

**Tabulka 34:** Antimykobakteriální aktivita karbamoylhydroxypiperazinů.

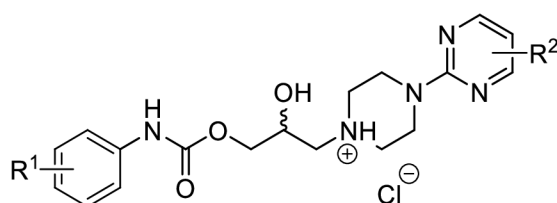
Sloučenina	MIC (MBC) [ $\mu\text{g/ml}$ ] / MIC (MBC) [ $\mu\text{M}$ ]			
	<i>M. marinum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<b>5a</b>	8 (8)/ 16,2 (16,2)	32/ 65	8 (8)/ 16,2 (16,2)	2/ 4,06
<b>5a1</b>	8 (8) / 15,1 (15,1)	8 / 15,1	16 (16) / 30,2 (30,2)	2 / 3,7
<b>5b</b>	8 (8) / 15,5 (15,5)	32 / 62,3	16 (16) / 31,1 (31,1)	8 / 15,5
<b>5b1</b>	4 (4) / 7,2 (7,2)	8 / 14,5	8 (8)/ 14,5 (14,5)	2 / 3,6
<b>5c</b>	4 (32)/ 8,12 (65,00)	4 / 8,12	16 (16) / 32,50 (32,50)	8 / 16,2
<b>5c1</b>	16 (16)/ 30,2 (30,2)	8/ 15,1	16 (16)/ 30,2 (30,2)	64/ 121
<b>5d</b>	32 (64) / 72,4 (144,9)	8 / 18,1	64 (64) / 144,9 (144,9)	8/ 18,1
<b>5d1</b>	16/ 33	16/ 33,4	32/ 66,9	64/ 133
<b>INH</b>	116/17	4/29,2	64/467	5/36,5

Protože u sloučenin nebyl pozorován významný rozdíl v aktivitě, předpokládalo se, že antibakteriální aktivita je primárně závislá na karbamoylhydroxypiperazinovém skeletu bez ohledu na substituci. Pro zjištění, která část molekuly je primárně zodpovědná za aktivitu, bylo provedeno hodnocení antibakteriální aktivity prekurzorů, a to karbamátů **3a**, **3b** (viz schéma syntézy na Obrázku 52) a piperazinů **4a**, **4b** a **4c**. Z důvodu stability při inkubační teplotě byly sloučeniny hodnoceny pouze proti grampozitivním bakteriím. Susbtituované piperaziny **4a**, **4b** a **4c** byly neaktivní proti *S. aureus* a *E. faecalis*, naopak karbamáty **3a** a **3b** vykazovaly anti-stafylokokovou aktivitu srovnatelnou s hodnocenými



sloučeninami **5a/a1-5d/d1**. Aktivita vůči *E. faecalis* byla 2-8krát nižší než aktivita produktů syntézy.

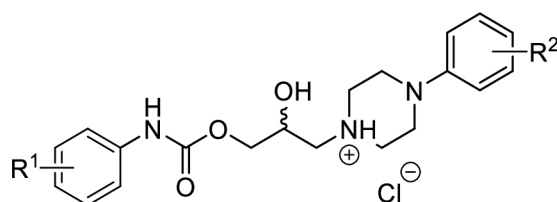
Pro zhodnocení významu jednotlivých modifikací na karbamátovém a piperazinovém skeletu byly dále analyzovány výsledky publikované ve vědecké literatuře. Malík et al. (2014) syntetizovali a analyzovali antibakteriální aktivitu esterů *orto/meta*-alkoxyfenylkarbamové kyseliny substituovaných 4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-ylem a 2-/3-methoxy nebo ethoxy skupinou (viz Obrázek 53). Ačkoliv jsou sloučeniny prezentovány jako potenciální antibakteriální látky s účinkem proti *S. aureus* a *E. coli* a autoři diskutují vliv substituentů a lipofility na aktivitu, prezentované hodnoty MIC převyšující 10 mg/ml jsou přibližně tisícinásobné v porovnání s referenčními antibiotiky ciprofloxacinem.



**Obrázek 53:** Struktura substituovaných derivátů kyseliny alkoxyfenylkarbamové připravených jako potenciální antibakteriální látky. (Převzato z Malík et al, 2014.)

Podobně nízkou aktivitu vykazovaly alkoxy deriváty publikované ve studii z roku 2017 (Malík et al., 2017), viz Obrázek 54. Substituce piperazinu fluorem (substituent  $R^2$ ) sice vedla ke zvýšení antimykobakteriálního účinku ale hodnoty MIC byly stále přibližně desetinasobné v porovnání s referenčními antibiotiky rifampicinem a ciprofloxacinem. Na druhou stranu, substituce karbamátu (pozice  $R^1$ ) elektron-akceptorní skupinou (především  $CF_3$ ) provedená Waisserem et al. (2007) výrazně zvýšila antimykobakteriální aktivitu (MIC = 8–16  $\mu\text{g/ml}$ ). Tyto závěry jsou v souladu s výsledky získanými v této studii.

Lze tedy říci, že přítomnost elektron-akceptorové skupiny na karbamátové části molekuly je základní podmínkou pro antibakteriální aktivitu karbamoylpiperazinů, zatímco substituce na piperazinu nevede ke zvýšení aktivity.



**Obrázek 54:** Základní struktura potenciálních antibakteriálních látek hodnocených Malíkem et al. a Waisserem et al. Převzato z Malík et al, 2016.

#### 4.10.2.2 Cytostatická aktivita hodnocených karbamoylpiperazinů

Protože zavedení substituovaného piperazinu nepřináší žádné výhody z hlediska antibakteriální aktivity, byla u hodnocených sloučenin **5a/a1–5d/d1** i u výchozích karbamátů a piperazinů zhodnocena cytotoxicita vůči buňkám linie THP-1. Cílem bylo zjistit, zda připravené sloučeniny budou mít lepší selektivní index než výchozí látky. Hodnocení bylo provedeno Dr. Hoškem a Mgr. Černou a výsledky jsou sumarizovány v Tabulce 35.

**Tabulka 35:** Cytotoxicita vybraných sloučenin vůči buňkám linie THP-1 vyjádřena jako IC<sub>50</sub>.

Slouč.	IC <sub>50</sub> [μM]
<b>5a</b>	2,87±1,16
<b>5a1</b>	5,63±1,05
<b>5b</b>	7,33±1,12
<b>5b1</b>	5,91±1,15
<b>5c</b>	>30
<b>5d</b>	8,66±2,56
<b>3a</b>	11,15±1,04
<b>4a</b>	21,26±1,08
<b>4b</b>	>30
<b>4c</b>	>30
<b>Cisplatina</b>	13,65±1,03

Cytostatický efekt všech hodnocených sloučenin **5a/a1–5d/d1** s výjimkou sloučeniny **5c** byl vyšší než jejich minimální inhibiční koncentrace a zároveň vyšší, než inhibiční efekt cisplatin, která byla použita jako pozitivní kontrola. Na druhou stranu, meziprodukt syntézy **3a** vykazoval pouze střední hodnotu IC<sub>50</sub>=11,15±1,04 μM a samotné piperaziny byly prakticky netoxické. Připojení substituovaného piperazinu na ester kyseliny karbamové tedy nejen nezvyšuje antibakteriální aktivitu, ale vede navíc k výraznému zvýšení cytotoxicity. Hodnota IC<sub>50</sub> nižší než hodnota MIC zároveň vede k diskvalifikaci všech výsledných sloučenin s výjimkou **5c** z dalších studií zaměřených na jejich antibakteriální aktivitu.

#### 4.10.2.3 Kombinovaný účinek vybraných sloučenin ze skupiny alkylpiperazin karbamátů

Aktivní sloučeniny byly hodnoceny z hlediska schopnosti synergického efektu s vybranými klinicky užívanými antimikrobiálními látkami: vankomycinem, gentamicinem, oxacilinem a ciprofloxacinem, viz Tabulka 36. Tyto látky mají různé mechanismy účinku a stejně tak si na ně bakterie pěstují různé mechanismy rezistence. Tento výběr látek

a zvolené mikroorganismy měly tedy za cíl přiblížit mechanismus účinku hodnocených sloučenin.

**Tabulka 36:** Kombinovaný účinek vybraných alkylpiperazin karbamátů

Slouč.	MRSA 63178		MRSA SA 630	VRE 725B		VRE 342B	VRE 368
	OXA	VAN	CPX	VAN	CPX	GEN	GEN
<b>5a</b>	IND (FIC=1,004)	IND (FIC=1,004)	ADD 0,125/128 (FIC=0,516)	IND (FIC=1,004)	IND (FIC=1,008)	<b>SYN 4/4</b> (FIC=0,313)	<b>ADD 16/8</b> (FIC=0,563)
<b>5a1</b>	IND (FIC=1,004)	IND (FIC=1,004)	ADD 2/32 (FIC=0,750)	IND (FIC=1,016)	ADD 4/32; 2/64 (FIC=0,750)	<b>SYN 16/4</b> (FIC=0,313)	<b>ADD 4/4</b> (FIC= 0,516)
<b>5b</b>	IND (FIC=1,004)	IND (FIC=1,004)	ADD 2/128 (FIC=0,625)	IND (FIC=1,004)	IND (FIC=1,008)	<b>SYN 8/16</b> (FIC=0,500)	<b>SYN 16/16</b> (FIC=0,375)
<b>5b1</b>	ADD 2/32 (FIC=0,563)	IND (FIC=1,004)	ADD 2/128 (FIC=0,750)	IND (FIC=1,008)	ADD 2/64 (FIC=0,750)	<b>SYN 8/16;</b> <b>4/32</b> (FIC=0,375)	<b>SYN 8/8</b> (FIC=0,188)
<b>5c</b>	IND (FIC=1,004)	IND (FIC=1,004)	ADD 2/32; 1/64 (FIC=0,750)	IND (FIC=1,008)	IND (FIC=1,000)	<b>SYN 2/8;</b> <b>1/16</b> (FIC=0,375)	<b>SYN 4/8</b> (FIC=0,313)
<b>5c1</b>	IND (FIC=1,004)	IND (FIC=1,004)	IND (FIC=1,000)	IND (FIC=1,016)	ADD 16/16 (FIC=0,563)	<b>SYN 8/16</b> (FIC=0,375)	<b>SYN 8/32</b> (FIC=0,500)
<b>5d</b>	IND (FIC=1,004)	IND (FIC=1,004)	ADD 2/32 (FIC=0,750)	IND (FIC=1,004)	IND (FIC=1,002)	ADD 8/4 (FIC=0,563)	ADD 16/8 FIC=(0,563)
<b>5d1</b>	IND (FIC=1,004)	IND (FIC=1,125)	IND (FIC=1,000)	IND (FIC=1,016)	IND (FIC=1,016)	<b>SYN 8/32;</b> <b>16/16</b> (FIC=0,375)	ADD 32/8 (FIC=0,563)

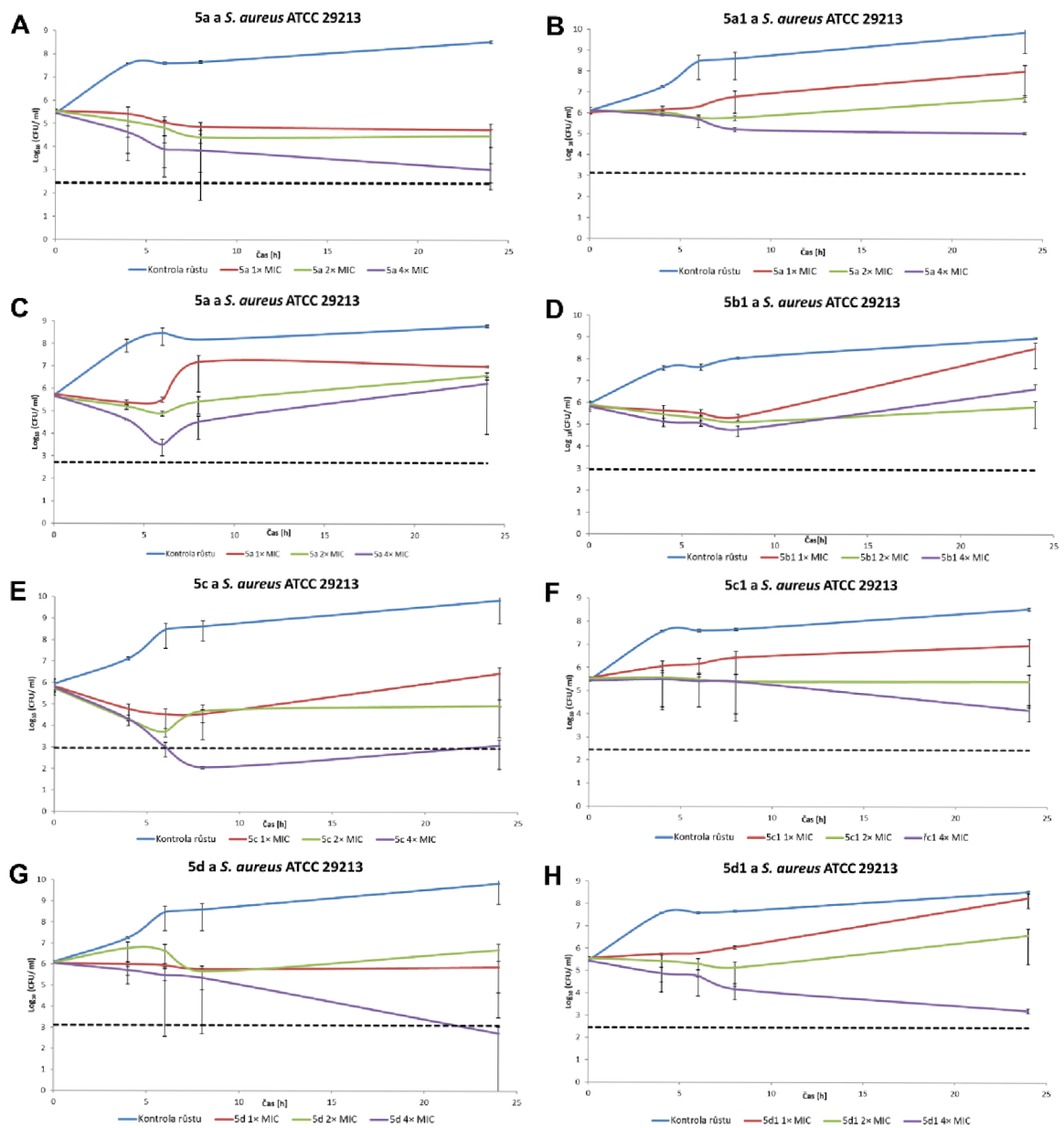
Kombinace s vankomycinem byla indiferentní jak v případě MRSA 63718, který je charakterizován intermediální citlivostí k vankomycinu, tak v případě vankomycin-rezistentního izolátu *E. faecalis* VRE 725B. Kombinace s oxacilinem proti MRSA 63718 poskytovala aditivní efekt pouze v případě látky **5b1**, ostatní kombinace byly indiferentní. Kombinace s ciprofloxacinem proti MRSA SA 630 vykazovala aditivitu ve všech případech kromě **5c1** a **5d1**. Tyto látky působily indiferentně, ale jejich FIC hodnoty byly na rozhraní aditivního a indiferentního působení (FIC=1,00). V případě kombinace hodnocených látek s ciprofloxacinem proti VRE 725 B byla aktivita solí vyšší než aktivita originálních bází; všechny soli kromě **5d1** působily aditivně. Jelikož u izolátu VRE 725B není známý přesný typ rezistence k chinolonům, lze pouze spekulovat o možném mechanismu aditivního působení. Jedním z vysvětlení by mohla být blokáda efluxních pump, které jsou častou příčinou rezistence bakterií k chinolonům (Aldred et al., 2014).

Izoláty VRE 368 a VRE 725B jsou nositeli genů *aph(3')-IIIa* a *aac(6')aph(2'')*, které poskytují vysokou hladinu rezistence ke gentamicinu (Oravcová et al., 2014). Gen *aac(6')aph(2'')* kóduje syntézu bifunkčního enzymu AAC(6')-APH(2''), který má acetyltransferasovou a fosfottransferasovou aktivitu. Enzym APH(3')-IIIa katalyzuje

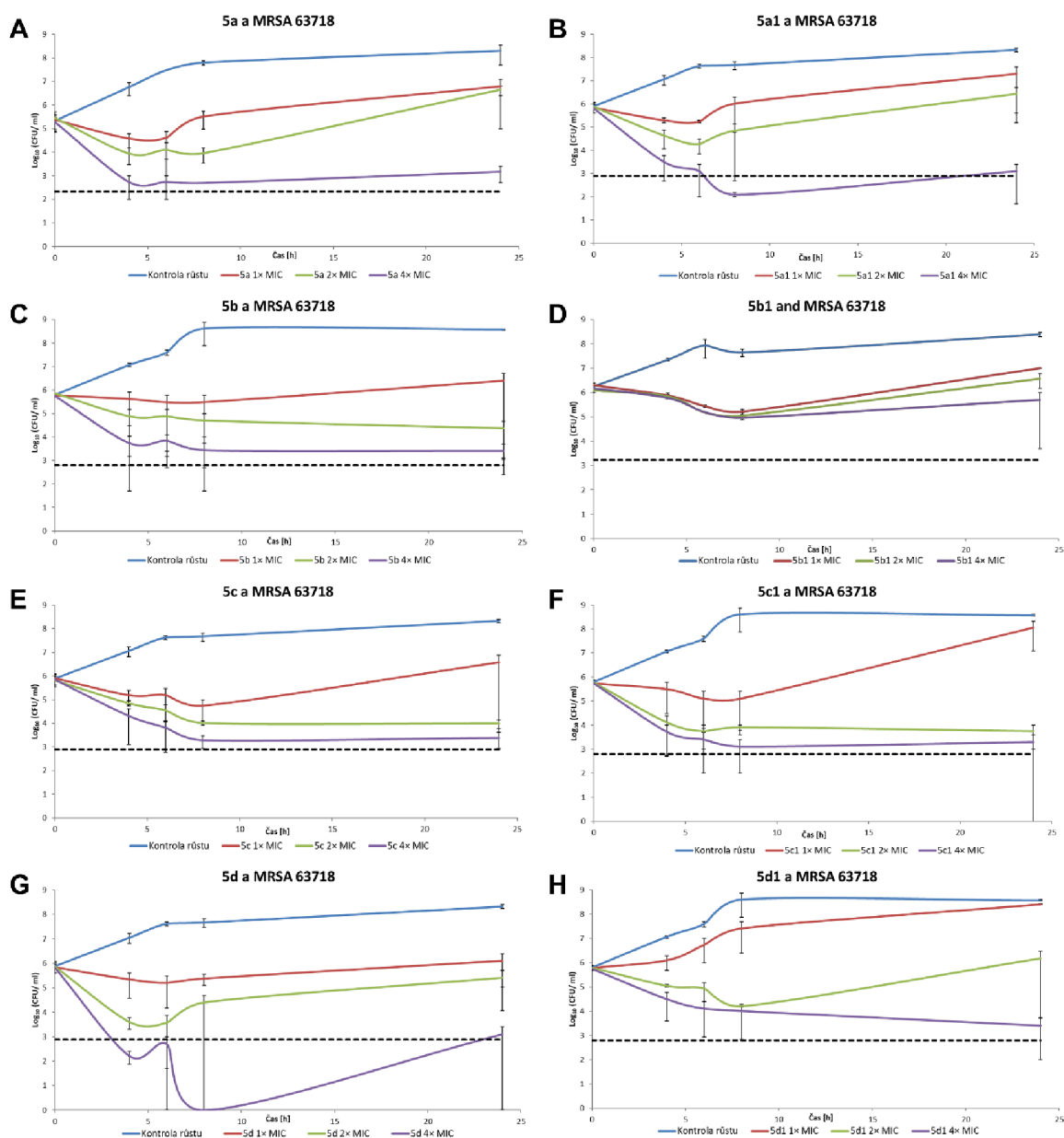
fosforylaci skupiny 3'-OH u aminoglykosidů (Culebras et al., 1999). Izolát VRE 342B není nositelem těchto genů, a proto je u něj rezistence ke gentamicinu způsobena pouze snížením průniku antibiotika do buňky. Tento typ rezistence může být překonán použitím kombinace aminoglykosidu s antimikrobiální látkou interagující s buněčnou stěnou, jako jsou například penicilinová antibiotika nebo glykopeptidy (Szychowski et al., 1961; Cetinkaya et al., 2000). Jelikož některé z testovaných sloučenin působily s gentamicinem synergicky jak proti VRE 342B tak proti VRE 368, je možné říci, že mechanismus synergického působení není pouze ve zvýšení průniku gentamicinu do bakteriální buňky. Kombinovaný účinek proti VRE 725B nebyl hodnocen z důvodu vysoké hodnoty MIC gentamicinu proti tomuto izolátu (>2000 µg/ml).

#### **4.10.2.4 Dynamika antibakteriálního účinku vybraných sloučenin ze skupiny alkyl karbamátů**

Dynamika antibakteriálního účinku bází a od nich odvozených solí byla porovnána metodou „time-kill“ proti *S. aureus* ATCC 29123 (Obr. 55) a MRSA 63718 (Obr. 56). V souhrnu byla aktivita bází vyšší než aktivita solí. Sloučeniny působily převážně bakteriostaticky, baktericidní účinek byl pozorován pouze u sloučenin **5c** a **5d** proti *S. aureus* a **5a1** a **5d** proti MRSA 63718, a to vždy v nejvyšší testované koncentraci rovné čtyřnásobku MIC. Na druhou stranu, všechny báze působily usmrcení alespoň 90 % bakteriálních buněk alespoň v jednom čase a koncentraci, a to u obou použitých izolátů. Vyšší aktivita bází může být vysvětlena jejich jednodušším průnikem do bakteriální buňky.



**Obrázek 55:** Dynamika baktericidního účinku derivátů karbamoylpiperazinů proti *S. aureus* ATCC 29213.



**Obrázek 56:** Dynamika baktericidního účinku derivátů karbamoylpiperazinů proti MRSA 63718.

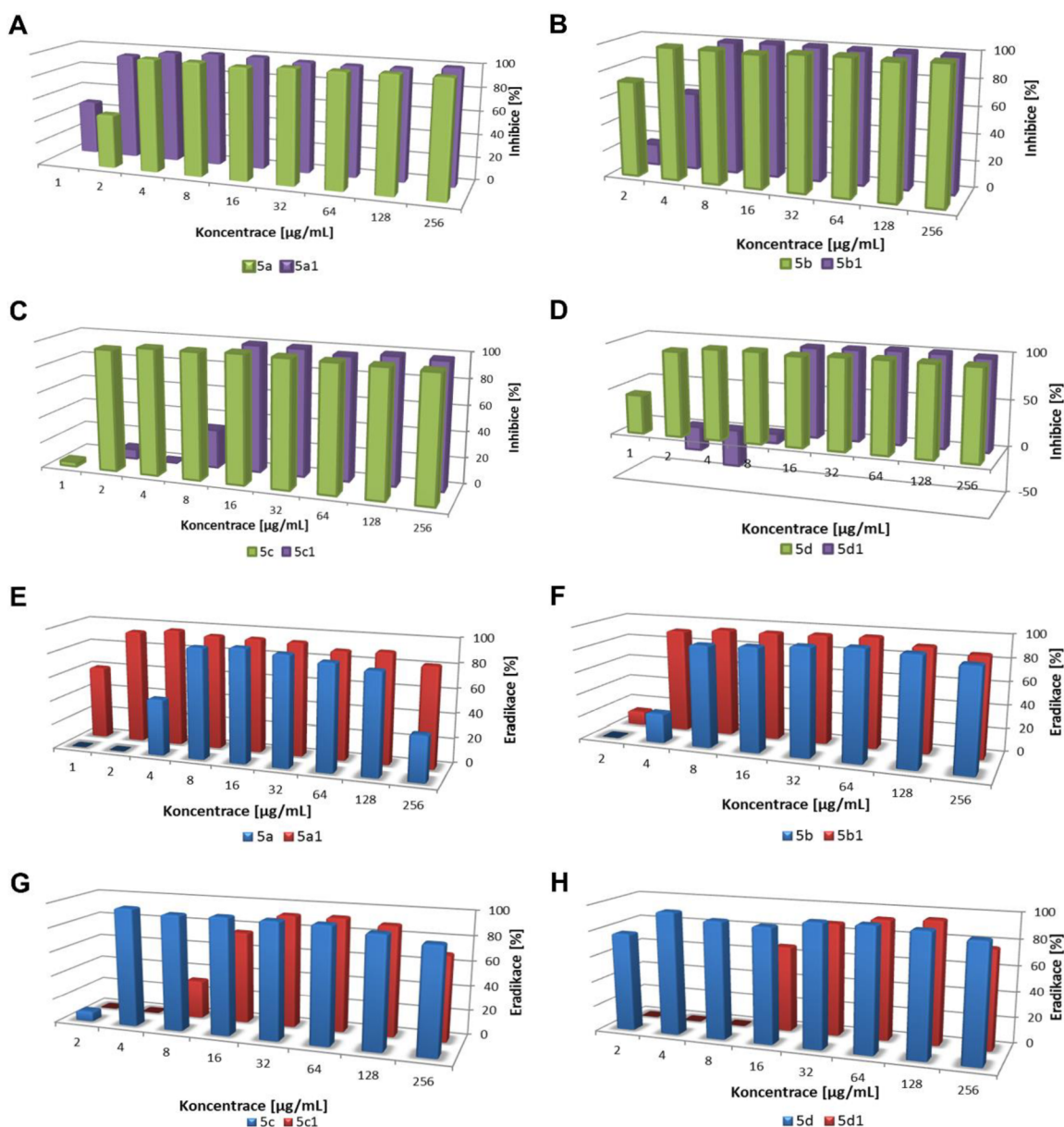
#### 4.10.2.5 Antibiofilmová aktivita vybraných sloučenin ze skupiny alkylkarbamátů

U sloučenin byla hodnocena schopnost inhibovat růst biofilmu *S. aureus* ATCC 29213 a také rozrušovat již maturovaný biofilm, viz Obr. 57. Minimální biofilmová inhibiční a eradikační koncentrace byla stanovena jako minimální koncentrace látky inhibující/eradikující 90 % biofilmu v porovnání s kontrolou růstu.

Srovnání hodnot MIC/MBC a MBIC, MBEC je zobrazeno v Tabulce 37. Všechny látky vykazovaly silnou antibiofilmovou aktivitu s hodnotami MBIC a MBEC srovnatelnými nebo dokonce 2-4krát nižšími než byly hodnoty MIC. Toto pozorování naznačuje,

že antibiofilmová aktivita těchto látek nebyla vyvolána pouze vlastním antibakteriálním působením, ale i interakcí s faktory ovlivňujícími formaci biofilmu, jako je například biosyntéza polysacharidového intercelulárního adhesinu (PIA), systém Agr nebo tzv. „*staphylococcal accessory regulator*“ (Otto, 2008). Pro ověření této teorie by bylo třeba hodnocení genetické exprese odpovědných genů po kultivaci s látkami.

Kromě dvojice **5a/5a1** byly báze aktivnější než soli a jejich aktivita byla koncentračně závislá. Sloučenina **5a** v koncentraci 256 µg/ml vykazovala nižší eradikační aktivitu ( $37,17 \pm 6,70 \%$ ) než v následných ředěních, což mohlo být vyvoláno omezenou rozpustností látky v této koncentraci a vznikem staženiny.



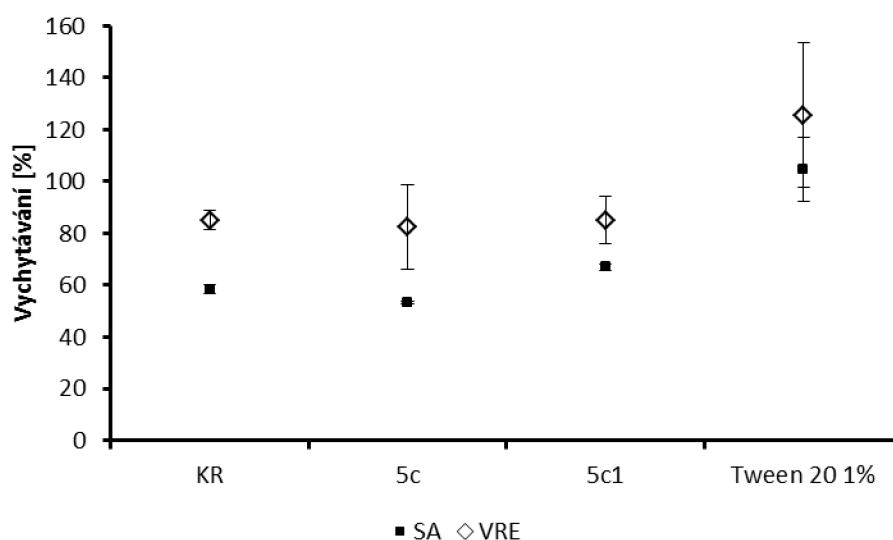
**Obrázek 57:** Porovnání inhibičního a eradikačního efektu bází a jejich solí na bakteriální biofilm *S. aureus* ATCC 29213.

**Tabulka 37:** Srovnání minimální inhibiční/eradikační antibiofilmové aktivity s hodnotami minimální inhibiční a baktericidní koncentrace proti planktonickým buňkám *S. aureus* ATCC 29213. (MIC = minimální inhibiční koncentrace, MBIC = minimální biofilmová inhibiční koncentrace, MBC = minimální baktericidní koncentrace, MBEC = minimální biofilmová eradikační koncentrace)

Slouč.	[ $\mu\text{g/ml}$ ]			
	MIC	MBIC <sub>80</sub>	MBC	MBEC <sub>80</sub>
<b>3a</b>	8	8	–	–
<b>3b</b>	4	4	–	–
<b>4a</b>	>256	>256	–	–
<b>5a</b>	8	4	16	8
<b>5a1</b>	4	2	4	2
<b>5b</b>	8	4	16	8
<b>5b1</b>	8	8	8	8
<b>5c</b>	8	2	8	4
<b>5c1</b>	16	16	16	32
<b>5d</b>	8	2	16	4
<b>5d1</b>	32	16	32	32

#### 4.10.2.6 Ovlivnění permeability cytoplazmatické membrány

U sloučenin **5c** a **5c1** byla hodnocen interakční potenciál s cytoplazmatickou membránou *S. aureus* ATCC 29213 a VRE 342B, viz Obr. 59. Sloučeniny byly hodnoceny v koncentraci 8  $\mu\text{g/ml}$ .



**Obrázek 58:** Vychytávání krystalové violeti u *S. aureus* ATCC 29213 a VRE 342B po kultivaci se sloučeninami **5c** a **5c1**. KR-negativní kontrola.



Oba hodnocené deriváty **5c** a **5c1** neovlivňovaly permeabilitu cytoplazmatické membrány *S aureus* ATCC 29213 ani VRE 342B, jelikož jejich vliv na vychytávání krystalové violeti byl srovnatelný s negativní kontrolou. Interakce s plazmatickou membránou tedy není mechanismem účinku těchto látek.

#### 4.10.3 Závěr

Byla hodnocena antibakteriální, antimykobakteriální a antifugální aktivita derivátů *N*-nitrofenylpiperazinů, které byly z hlediska struktury rozděleny do dvou podskupin. První skupina obsahovala 10 derivátů nitrofenylpiperazinu lišících se délkou alkoxylového řetězce. Tyto látky byly pouze středně aktivní proti mykobakteriím a rostlinným patogenům *F. avenaceum* a *B. sorokiniana*, nevykazovaly ale žádnou aktivitu proti grampozitivním bakteriím z rodu *Staphylococcus* a *Enterococcus*. Porovnáním se sloučeninami téhož skeletu lišícími se substitucí nitroskupiny za jinou skupinu lze říci, že právě přítomnost nitroskupiny je nutná pro antibakteriální aktivitu.

Druhou skupinu tvořilo 8 derivátů karbamoylhydroxypiperazinu. Sloučeniny se lišily substitucí fenyلكarbamového jádra. Ukázalo se, že typ substituce neměl vliv na antibakteriální aktivitu. Po otestování výchozích sloučenin a porovnání výsledků s publikovanými studiemi zaměřenými na strukturně podobné sloučeniny lze usuzovat, že pro antibakteriální aktivitu je klíčová přítomnost fenyلكarbamátového skeletu nesoucí elektron-akceptorové skupiny. Substituovaný piperazin vliv na antibakteriální aktivitu nemá, naopak negativně ovlivňuje toxicitu vůči eukaryotickým buňkám, čímž většinu látek vyřazuje z dalších kroků testování.

Závěry lze shrnout do několika bodů:

- Nitroskupina u *N*-nitrofenylpiperazinů je základní podmínkou pro jejich antimykobakteriální aktivitu.
- Pro antibakteriální aktivitu karbamoylpiperazinů je klíčové karbamátové jádro, substituované elektron-akceptorovými skupinami. Piperazinové jádro nevede ke zvýšení antibakteriální aktivity v porovnání se samotným substituovaným karbamátem, naopak zvyšuje cytotoxický efekt vůči eukaryotickým buňkám.
- U všech hodnocených karbamoylpiperazinů s výjimkou sloučeniny **5c** byla hodnota IC<sub>50</sub> vůči monocytární buněčné linii THP-1 nižší než hodnoty MIC.
- Hodnocené karbamoylpiperaziny neovlivňují permeabilitu cytoplazmatické membrány u *S. aureus* ani *E. faecalis*.

## 5 Závěr

Mikroorganismy se nepřetržitě přizpůsobují podmínkám vnějšího prostředí, což vede i k vývoji antibakteriální rezistence. Většina bakterií se běžně vyskytuje ve formě biofilmu, který je navíc k antibakteriálním látkám přirozeně méně citlivý. Vývoj nových antimikrobiálních látek je tedy jedním ze způsobů, jak s tímto, pro lidstvo nepříznivým, fenoménem bojovat.

V rámci této dizertační práce byla hodnocena komplexní antimikrobiální aktivita 87 sloučenin, rozdělených do 6 podskupin na základě chemické struktury.

První skupinu tvořilo 16 derivátů amidu kyseliny skořicové. Výraznější účinek proti stafylokokům se projevil pouze u sloučenin substituovaných trifluormethylovou skupinou. Sloučeniny působily jako inhibitor a disruptor biofilmu *S. aureus*. Předpoklad o interakci se systémem *quorum sensing* u *Ch. violaceum* se nepotvrdil. Fluorem substituovaný derivát se ukázal jako silný inhibitor růstu rostlinného patogenu *Bipolaris sorochiana* bez toxického působení na jak na rostlinné buňky, tak na humnní lymfocyty řady THP-1. Tato sloučenina je tedy perspektivní z hlediska dalšího studia jako fungicid.

Druhou skupinu tvořilo 23 nových derivátů thiosemikarbazonu. Některé z těchto sloučenin inhibovaly růst kvasinek rodu *Candida* v koncentracích nižších, než referenční antimykotika flucytosin a amfotericin-B. Pro antimykotickou aktivitu byla nutná inkorporace dusíku thiosemikarbazonu do piperazinu, který je na druhém dusíku substituován buď objemným a lipofilním substituentem (benzhydryl) nebo fenylem substituovaným skupinou s výraznými elektron-akceptorovými vlastnostmi (4-CN, 4-NO<sub>2</sub>, 3,4-Cl). Antimykotická aktivita není ovlivněna lipofilitou ani pouhou schopností chelátovat železo, jak by se nabízelo při pohledu na jejich základní strukturu. Sloučeniny též neinteragují se syntézou buněčné stěny.

Třetí skupinu tvořily 3 Shiffovy báze odvozené od chinazolinu a jejich měďnaté komplexy. Pro antistafylokokovou aktivitu je výhodná substituace nitroskupinou. Komplexy měly obecně vyšší antibakteriální aktivitu než báze, toto zvýšení aktivity zároveň vedlo k násobně vyšší cytotoxicitě. Chelatace tedy není vhodnou metodou pro zvýšení antibakteriálního účinku, jelikož vede ke snížení selektivního indexu.

Ve čtvrté skupině se nacházelo 8 derivátů kyseliny gallové. Tyto sloučeniny, strukturně odvozené od pentagalloylglukosy vykazovaly pouze střední aktivitu proti gramnegativním bakteriím. Aktivita se snižovala se snižujícím se počtem navázaných zbytků kyseliny gallové a pravděpodobně souvisela se schopností gallotaninů inhibovat bakteriální

enzym sortasa A. Všechny hodnocené deriváty inhibovaly formaci biofilmu *S. aureus* v koncentracích nižších než MIC a kromě jedné též působily jako inhibitory systému *quorum sensing* u *Ch. violaceum*. Vzhledem k vhodnému selektivnímu indexu jsou tyto deriváty potenciálně využitelné pro další vývoj sloučenin s antibakteriálním a především antibiofilmovým účinkem.

Pátou skupinu tvořilo 16 dibazických karbamátů lišících se délkou uhlovodíkového řetězce a heterocyklem. Pro aktivitu vůči grampozitivním patogenům se jako nejdůležitější prokázala přítomnost pyrrolidonového kruhu a povrchová aktivita látky. Antimykobakteriální účinek látek se zvyšoval se zvyšující se lipofilitou. Sloučeniny obsahující pyrrolidinový kruh byly při stejné hodnotě lipofility aktivnější než sloučeniny s azepamovým cyklem. Látky inhibovaly a eradikovaly stafylokokový biofilm s koncentracích 2-4 vyšších než MIC. Sloučeniny interagovaly s plazmatickou membránou stafylokoků a enterokoků a inhibovaly a eradikovaly stafylokokový biofilm s koncentracích 2-4 vyšších než MIC. Antibiofilmovou aktivitu nelze vysvětlit pouze povrchovou aktivitou těchto látek, jelikož referenční povrchově aktivní látky růst biofilmu neovlivňovaly. Vzhledem k výrazné cytotoxicitě se sloučeniny nehodí k dalšímu studiu jako antibakteriální léčiva, ale díky anestetickému efektu a efektu na bakteriální biofilm by mohly být využity například ve vývoji katétrů s antibakteriálním povrchem.

Šestá skupina byla tvořena 18 *N*-nitrofenylpiperaziny, které byly z hlediska struktury rozděleny do dvou podskupin. Podskupina alkoxyderivátů nitrofenylpiperazinu nevykazovala žádnou aktivitu proti grampozitivním bakteriím, působila ale jako inhibitor růstu mykobakterií a rostlinných patogenů *F. avenaceum* a *B. sorokiniana*. Porovnáním se sloučeninami téhož skeletu lišícími se substitucí nitroskupiny za jinou skupinu lze říci, že právě přítomnost nitroskupiny je nutná pro antibakteriální aktivitu. V druhé podskupině se nacházelo 8 derivátů karbamoylhydroxypiperazinu lišících se substitucí fenylového jádra. Substituce neměla vliv na antibakteriální účinek těchto látek, pro aktivitu byla klíčová přítomnost fenyلكarbamátového skeletu nesoucí elektron-akceptorové skupiny. Substituovaný piperazin vliv na antibakteriální aktivitu neměl, naopak negativně ovlivňoval toxicitu vůči eukaryotickým buňkám, čímž většinu látek vyřadil z dalších kroků testování.

Je zřejmé, že strukturální modifikací již známých sloučenin je možné vytvořit nepřeberné množství nových derivátů s antibakteriálními účinky. Avšak skutečnou výzvou je objevit, resp. navrhnout sloučeninu, jejíž aktivita bude limitována pouze na požadované patogeny a nebude působit toxicky na lidský organismus. Nepříznivý index selektivity je hlavní limitující faktor i u sloučenin hodnocených v této práci.

Primární screening antimikrobiální aktivity je časově i finančně náročná činnost. Pro nalezení 87 aktivních sloučenin prezentovaných v této práci bylo nutno otestovat více než tisíc nově připravených potenciálních antimikrobiálních látek. Většina z těchto aktivních sloučenin se navíc nakonec ukázala jako neperspektivní z důvodu jejich toxicity vůči eukaryotickým buňkám. Jedním ze způsobů, jak snížit finanční náklady na primární screening by bylo využití *in silico* metod, jako je „computer-aided drug design“. Cílená syntéza sloučenin s antibakteriálním efektem, předvídatelným mechanismem účinku a bez potenciálně působit toxicky na eukaryotické buňky by mohla vést ke zrychlení vývoje nových antibakteriálních léčiv, které jsou i v dnešním světě stále aktuální.

## 6 Seznam publikací

### Publikace výstupů disertační práce

HRICOVINIOVA, Z.; MASCARETTI, S.; HRICOVINIOVA, J.; CIZEK, A.; JAMPILEK, J. New Unnatural Gallotannins: A Way toward Green Antioxidants, Antimicrobials and Antibiofilm Agents. *Antioxidants*. Roč. 10(8), s. 1288, 2021

POSPISILOVA, S.; MALIK, I.; BEZOUSKOVA, K.; KAUEROVA, T.; KOLLAR, P.; CSOLLEI, J.; ORAVEC, M.; CIZEK, A.; JAMPILEK, J. Dibasic derivatives of phenylcarbamic acid as prospective antibacterial agents interacting with cytoplasmic membrane. *Antibiotics*. Roč. 9(2), s. 64, 2020

POSPISILOVA, S.; MALIK, I.; CURILLOVA, J.; MICHNOVA, H.; CERNA, L.; PADRTOVA, T.; HOSEK, J.; PECHER, D.; CIZEK, A.; JAMPILEK, J. Insight into antimicrobial activity of substituted phenylcarbamoxyloxypiperazinypropanols. *Bioorganic Chemistry*. Roč. 102, s. 104060, 2020

POSPISILOVA, S.; MARVANOVA, P.; TREML, J.; MORICZ, A. M.; OTT, P. G.; MOKRY, P.; ODEHNALOVA, K.; SEDO, O.; CIZEK, A.; JAMPILEK, J. Activity of N-phenylpiperazine derivatives against bacterial and fungal pathogens. *Current Protein and Peptide Science*. Roč. 20(11), s. 1119-1129, 2019.

POSPISILOVA, S.; KOS, J.; MICHNOVA, H.; KAPUSTIKOVA, I.; STRHARSKY, T.; ORAVEC, M.; MORICZ, A.M.; BAKONYI, J.; KAUEROVA, T.; KOLLAR, P.; CIZEK, A.; JAMPILEK, J. Synthesis and spectrum of biological activities of novel N-arylcinnamamides. *International Journal of Molecular Sciences*. Roč. 19(8), s. 2318, 2018

MALIK, I.; CSOLLEI, J.; SOLOVIC, I.; POSPISILOVA, S.; MICHNOVA, H.; JAMPÍLEK, J.; KAPUSTIKOVA, I.; CURILLOVA, J.; PECHACOVA, M.; STOLARIKOVA, J.; PECHER, D.; ORAVEC, M. Dibasic derivatives of phenylcarbamic acid against mycobacterial strains: Old drugs and new tricks? *Molecules*. Roč. 23(10), s. 2493, 2018.

## Další publikace

HAVRANKOVA, E.; GARAJ, V.; **MASCARETTI, S.**; ANGELI, A.; SOLDANOVA, Z.; KEMKA, M.; MOTYCKA, J.; BRAZDOVA, M.; CSOLLEI, J.; JAMPILEK, J.; SUPURAN, C. T. Novel 1, 3, 5-Triazinyl Aminobenzenesulfonamides Incorporating Aminoalcohol, Aminochalcone and Aminostilbene Structural Motifs as Potent Anti-VRE Agents, and Carbonic Anhydrases I, II, VII, IX, and XII Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 231, 2022

CURILLOVA, J.; PECHACOVÁ, M.; PADRTOVA, T.; PECHER, D.; **MASCARETTI, S.**; JAMPILEK, J.; PASKOVA, L.; BILKA, F.; KOVAC, G.; MALIK, I. (2022). Synthesis and Critical View on the Structure-Activity Relationships of N-(Substituted phenyl)-N-Diphenylmethyl-piperazine-Based Conjugates as Antimycobacterial Agents. *Applied Sciences*. Roč. 12(1), s. 300, 2022.

BAK, A.; KOS, J.; MICHNOVA, H.; GONEC, T.; **POSPISILOVA, S.**; KOZIK, V.; CIZEK, A.; SMOLINSKI, A.; JAMPILEK, J. Consensus-Based Pharmacophore Mapping for New Set of N-(disubstituted-phenyl)-3-hydroxyl-naphthalene-2-carboxamides. *International Journal of Molecular Sciences*. Roč. 21(18), s. 6583, 2020

MICHNOVA, H., **POSPISILOVA, S.**, GONEC, T., KAPUSTIKOVA, I., KOLLAR, P., KOZIK, V., MUSIOL, R.; JENDRZEJEWSKA, I.; VANCO, J.; TRAVNICEK, Z.; CIZEK, A.; BAK, A.; JAMPÍLEK, J. Bioactivity of methoxylated and methylated 1-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides: Comparative molecular surface analysis. *Molecules*. Roč. 24(16), s. 2991, 2019.

## Konferenční příspěvky

**POSPÍŠILOVÁ, Š.**; HRICOVÍNIOVÁ, J.; HRICOVÍNIOVÁ, Z.; ČÍŽEK, A.; JAMPÍLEK, J. Antibiofilmová aktivita nově připravených gallotaninů. *Tomáškovy dny 2020*. Sborník abstraktů s. 48, ISBN 978-80-210-9611-0.

**POSPISILOVA, S.**; HRICOVINIOVA, J.; CIZEK, A.; HRICOVINIOVA, Z.; JAMPILEK, J. Antibacterial and anti-biofilm activity of quinazolinone derived Schiff base and its Cu(II) complex. *The 5 th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (ECMC-4)*, November 1–30, 2019 (10.3390/ECMC2019-06299).

<https://sciforum.net/paper/view/conference/6299>. Editor: Jean Jacques Vanden Eynde.

Published in 2019 by MDPI, Basel, Switzerland

## 7 Seznam použitých zdrojů

- ABOU-ZAID, M.M.. NOZZOLILLO, C. 1-O-galloyl- $\alpha$ -L-rhamnose from *Acer rubrum*. *Phytochemistry* Roč. 52 s.1629-1631, 1999.
- ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C. H.; PHILLIPS, C. A. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. Roč. 113, s. 1217-1227, 2012.
- ALBANO, M.; CRULHAS, B. P.; ALVES, F. C. B.; PEREIRA, A. F. M.; ANDRADE, B. F. M. T.; BARBOSA, L. N.; JÚNIOR, A. F. Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. *Microbial pathogenesis*. Roč. 126: s.231-238, 2019
- AL-AMIERY, A. A. Synthesis and antioxidant, antimicrobial evaluation, DFT studies of novel metal complexes derivate from Schiff base. *Research on Chemical Intermediates*. Roč. 38, s. 745-759, 2012
- AHN M.J.; KIM C.Y.; LEE J. S. Inhibition of HIV-1 integrase by galloyl glucoses from *Terminalia chebula* and flavonol glycoside gallates from *Euphorbia pekinensis*. *Planta Medica*. Roč. 68(5), s. 457–459, 2002.
- K.J. Aldred, K.J.; Kerns, R.J.; Osheroff, N. Mechanism of quinolone action and resistance, *Biochemistry*. Roč. 53 s.1565–1574, 2014
- AMARAL, L.; KRISTIANSSEN, J. E.; ABEBE, L. S.; MILLETT, W. Inhibition of the respiration of multi-drug resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by thioridazine: potential use for initial therapy of freshly diagnosed tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*., Roč. 38, s. 1049-1053, 1996.
- AMARAL, L., & VIVEIROS, M. Thioridazine: A non-antibiotic drug highly effective, in combination with first line anti-tuberculosis drugs, against any form of antibiotic resistance of *Mycobacterium tuberculosis* due to its multi-mechanisms of action. *Antibiotics*. Roč. 6 s. 3, 2017.
- AMMONS, M. C. Anti-biofilm strategies and the need for innovations in wound care. *Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery*. Roč. 5(1), s. 10-17, 2010.
- ANDERL, J. N.; MICHAEL J. F. R.; STEWART, P. S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč. 44, s. 1818-1824, 2000.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*. Roč. 10(4), s. 266-278, 2012
- ASIF, M. Chemical characteristics, synthetic methods, and biological potential of quinazoline and quinazolinone derivatives. *International Journal of Medicinal Chemistry*. 2014.
- ATRIA, A., CORTES-CORTES, P., GARLAND, M. T., BAGGIO, R., MORALES, K., SOTO, M., CORSINI, G. X-ray studies and antibacterial activity in copper and cobalt complexes with imidazole derivative ligands. *Journal of the Chilean Chemical Society*. Roč. 56, s. 786-792, 2011
- AYDIN, O. N.; EYIGOR, M.; AYDIN, N. Antimicrobial activity of ropivacaine and other local anaesthetics. *European Journal of Anaesthesiology*. Roč. 18, s. 687-694, 2001

- AZEREDO, J.; AZEVEDO, N. F.; BRIANDET, R.; CERCA, N.; COENYE, T.; COSTA, A. R.; KAČÁNIOVÁ, M.; KNØCHEL, S.; LOURENÇO, A.; MERGULHÃO, F.; MEYER, R.L.; NYCHAS, G.; SIMÕES, M.; TRESSE, O.; STERNBERG, C. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*. Roč. 43, s. 313-351, 2017.
- BAK, A.; KOZIK, V.; MALIK, I.; JAMPILEK, J.; SMOLINSKI, A. Probability-driven 3D pharmacophore mapping of antimycobacterial potential of hybrid molecules combining phenylcarbamoyloxy and N-arylpiperazine fragments. *SAR and QSAR in Environmental Research*. Roč. 29(10),s. 801-821, 2018.
- BAG A; BHATTACHARYYA S. K; CHATTOPADHYAY R.R. Isolation and identification of a gallotannin 1,2,6-tri-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose from hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruits effective against multidrug-resistant uropathogens. *Journal of Applied Microbiology*. Roč. 115, s. 390–397, 2013
- BAG, A.; CHATTOPADHYAY, R.R. Synergistic antibiofilm efficacy of a gallotannin 1, 2, 6-tri-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose from *Terminalia chebula* fruit in combination with gentamicin and trimethoprim against multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *PloS one*,Roč.12.5: e0178712, 2017
- BAZARGANI, M. M.; ROHLOFF, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*. Roč. 61, s. 156-164, 2016.
- BETTENCOURT, M. V.; BOSNE-DAVID, S.; AMARAL, L. Comparative in vitro activity of phenothiazines against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Roč. 16, s. 69-71, 2000.
- BISCEGLIE, F.; BACCI, C.; VISMARRA, A.; BARILLI, E.; PIOLI, M.; ORSONI, N.;PELOSI, G. Antibacterial activity of metal complexes based on cinnamaldehyde thiosemicarbazone analogues. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Roč. 203. 2020
- BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS pathogens*. Roč. 4, e1000052, 2008.
- BONAPACE, C. R.; BOSSO, J. A.; FRIEDRICH, L. V.; WHITE, R. L. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Roč. 44(4), s. 363-366, 2002.
- BORRIELLO, G.; RICHARDS, L.; EHRLICH, G. D.; STEWART, P. S. Arginine or nitrate enhances antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč. 50, s. 382–384, 2006.
- BRACKMAN, G.; COENYE, T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Current Pharmaceutical Design*. Roč. 21, s. 5-11, 2015.
- BRACKMAN, G.; DEFOIRDT, T.; MIYAMOTO, C.; BOSSIER, P.; VAN CALENBERGH, S.; NELIS, H.; COENYE, T. Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio spp.* by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR. *BMC microbiology*. Roč. 8, s. 149, 2008.
- BRACKMAN, G.; NELIS, H.; COENYE, T. Inhibition of quorum sensing as a novel antimicrobial strategy. In: *Antimicrobial Drug Discovery: Emerging Strategies*. CABI, 2012. p. 115-134, 2012.



- BRADY, A.; LOUGHLIN, R.; GILPIN, D.; KEARNEY, P.; TUNNEY, M. In vitro activity of tea-tree oil against clinical skin isolates of meticillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci growing planktonically and as biofilms. *Journal of Medical Microbiology*. Roč. 55, s. 1375-1380, 2006.
- BREUKINK, E.; DE KRUIJFF, B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nature Reviews Drug Discovery*. Roč. 5(4), s.321-323, 2006
- BUDZYNSKA, A.; WIECKOWSKA-SZAKIEL, M.; SADOWSKA, B.; KALEMBA, D.; ROZALSKA, B. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Polish Journal of Microbiology*. Roč. 60, s. 35–41, 2011
- BURT, S. A.; OJO-FAKUNLE, V. T.; WOERTMAN, J.; VELDHUIZEN, E. J. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS One*, 9(4), e93414, 2014.
- BYKOWSKA, A.; KOMARNICKA, U. K.; JEŻOWSKA-BOJCZUK, M.; KYZIOŁ, A. CuI and CuII complexes with phosphine derivatives of fluoroquinolone antibiotics—a comparative study on the cytotoxic mode of action. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Roč. 181, s. 1-10, 2018
- ÇAVUŞOĞLU, B. K.; SAĞLIK, B. N.; OSMANIYE, D.; LEVENT, S.; ACAR ÇEVIK, U.; KARADUMAN, A. B.; KAPLANCIKLI, Z. A. Synthesis and biological evaluation of new thiosemicarbazone derivative Schiff bases as monoamine oxidase inhibitory agents. *Molecules*. Roč 23, s. 60, 2018
- CERI, H.; OLSON, M. E.; STREMIC, C.; READ, R. R.; MORCK, D.; BURET, A. I. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*. Roč. 37, s. 1771–6, 1999.
- CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical microbiology reviews*. Roč. 13.4, s. 686-707, 2000
- CHA, J. O.; PARK, Y. K.; LEE, Y. S.; CHUNG, G. T. In vitro biofilm formation and bactericidal activities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones prevalent in Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Roč. 70, s. 112–118, 2011.
- CHAIEB, K.; KOUIDHI, B.; JRAH, H.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. Roč. 11, s. 29, 2011.
- CHAN, Y. Y., CHUA, K. L. The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence. *Journal of Bacteriology*. Roč. 187, s. 4707-4719, 2005.
- CHAN, Y. Y.; ONG, Y. M.; CHUA, K. L. Synergistic interaction between phenothiazines and antimicrobial agents against *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč. 51, s. 623-630, 2007.
- CHAN, E. W. L.; GRAY, A. I.; IGOLI, J. O.; LEE, S. M.; GOH, J. K.. Galloylated flavonol rhamnosides from the leaves of *Calliandra tergemina* with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytochemistry*. Roč. 107, s. 148-154, 2014

- CHEN, X.; STEWART, P. S. Chlorine penetration into artificial biofilm is limited by a reaction–diffusion interaction. *Environmental Science & Technology*. Roč. 30, s. 2078-2083, 1996.
- CHIANG, W. C.; NILSSON, M.; JENSEN; P. Ø., HØIBY, N.; NIELSEN, T. E., GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč. 57, s. 2352-2361, 2013.
- CHOHAN, Z. H. Metal-based antibacterial and antifungal sulfonamides: synthesis, characterization, and biological properties. *Transition Metal Chemistry*. Roč. 34(2), s. 153-161, 2009
- CHOI B.M.; KIM H.J.; OH, G. S. 1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloylbeta- D-glucose protects rat neuronal cells (Neuro 2A) from hydrogen peroxide-mediated cell death via the induction of heme oxygenase-1. *Neuroscience Letters*. Roč. 328(2), s. 185–189, 2002.
- CHUNG, K.T.; WONG, T.Y.; WEI, C.I.; HUANG, Y.W.; LIN, Y. Tannins and Human Health: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Roč. 38, s. 421–464, 1998
- CHRISTENSEN, G. D; SIMPSON, W.A; YOUNGER, J.J; BADDOUR, .L. M; BARRETT F.F; MELTON D.M; BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*. Roč. 22, s. 996–1006, 1985.
- CIOFU, O.; TOLKER-NIELSEN, T.; JENSEN, P. Ø.; WANG, H.; HØIBY, N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Roč. 85, s. 7-23, 2015
- CSÖLLEI, J.; BOROVSANÝ, A.; CIZMARIK, J.; SVEC, P.; RACANSKA, E.; TUMOVÁ, I. Local anesthetics. 90. Asymmetric dibasic alkyl esters of alkoxyphenylcarbamic acids. *Die Pharmazie*. Roč. 43, s. 609-610, 1988.
- CUI, Y.; LIANG, G.; HU, Y. H.; SHI, Y.; CAI, Y. X.; GAO, H. J.; WANG, Q. Alpha-substituted derivatives of cinnamaldehyde as tyrosinase inhibitors: inhibitory mechanism and molecular analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Roč. 63(2), s. 716-722, 2015
- CULEBRAS, E.; MARTÍNEZ, J. L. Aminoglycoside resistance mediated by the bifunctional enzyme 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase-2 "-O-aminoglycoside phosphotransferase. *Front Biosci*, 1999
- CURTIN, J.; CORMICAN, M.; FLEMING, G.; KEELEHAN, J.; COLLERAN, E. Linezolid compared with eperzolid, vancomycin, and gentamicin in an in vitro model of antimicrobial lock therapy for *Staphylococcus epidermidis* central venous catheter-related biofilm infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* .Roč. 47, s. 3145–3148, 2003.
- DAROUCHE, R. Infections associated with surgical implants. *The New England Journal of Medicine*. [Roč. 351.2, s. 94-195. 2004
- DA SILVA, C. M.; DA SILVA, D. L.; MODOLO, L. V.; ALVES, R. B.; DE RESENDE, M. A.; MARTINS, C. V.; DE FÁTIMA, Â. . Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research*, Roč. 2, s. 1-8., 2011.

- DASTIDAR, S.G.; KRISTIANSEN, J.E.; MOLNAR, J.; AMARAL, L. Role of phenothiazines and structurally similar compounds of plant origin in the fight against infections by drug resistant bacteria. *Antibiotics*. Roč. 2, s. 58-72. 2013
- DE LUCCA, A. J.; WALSH, T. J.; DAIGLE, D.J. N-acetylcysteine inhibits germination of conidia and growth of *Aspergillus spp.* and *Fusarium spp.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč. 40, s. 1274–1276, 1996.
- DE PAIVA, R. E.; ABBEHAUSEN, C.; GOMES, A. F.; GOZZO, F. C.; LUSTRI, W. R.; FORMIGA, A. L.; CORBI, P. P. Synthesis, spectroscopic characterization, DFT studies and antibacterial assays of a novel silver (I) complex with the anti-inflammatory nimesulide. *Polyhedron*. Roč. 36(1), s. 112-119, 2012.
- DE VITA, D.; SIMONETTI, G.; PANDOLFI, F.; COSTI, R.; DI SANTO, R.; D'AURIA, F.D.; SCIPIONE, L. Exploring the anti-biofilm activity of cinnamic acid derivatives in *Candida albicans*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Roč. 26, s.5931–5935, 2016
- DEL POZO, J. Biofilm-related disease. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, Roč. 16(1), s. 51-65, 2018
- DOMINGUEZ-BENETTON, X.; SEVDA, S.; VANBROEKHOVEN, K.; PANT, D. The accurate use of impedance analysis for the study of microbial electrochemical systems. *Chemical Society Reviews*. Roč. 41, s. 7228-7246, 2012.
- DONG, J.; ZHANG, L.; XU, N.; ZHOU, S.; SONG, Y.; YANG, Q.; AI, X. Rutin reduces the pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* to tilapia by inhibiting the activity of sortase A. *Aquaculture*. Roč. 530, 735743, 2021
- DUNNE, W. M.; MASON, E. O.; KAPLAN, S. L. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč, 37, s. 2522-2526, 1993.
- EDMISTON, C. E.; MCBAIN, A. J.; KIERNAN, M.; LEAPER, D. J. A narrative review of microbial biofilm in postoperative surgical site infections: clinical presentation and treatment. *Journal of Wound Care*. Roč. 25(12), s. 693-702,2016
- ENGELS, C.; SCHIEBER, A.; GÄNZLE, M. G. Fractionation of gallotannins from mango (*Mangifera indica* L.) kernels by high-speed counter-current chromatography and determination of their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Roč. 58(2), s. 775-780, 2010
- ENGELS, C.; SCHIEBER, A.; GÄNZLE, M. G. Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from mango kernels (*Mangifera indica* L.). *Applied and Environmental Microbiology*. Roč. 77(7),s. 2215-2223, 2011
- DE SILVA, S. S.; CARVALHO, J. W. P.; AIRES, C. P.; NITSCHKE, M. Disruption of *Staphylococcus aureus* biofilms using rhamnolipid biosurfactants. *Journal of Dairy Science*. Roč. 100, s. 7864-7873, 2017.
- FILOCHE, S. K.; SOMA, K.; SISSONS, C. H. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiology and Immunology*. Roč. 20, s. 221-225, 2005.
- FLETCHER M. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Canadian Journal of Microbiology*. Roč. 23, s. 1-6, 1977.

- FUX, C. A.; STOODLEY, P.; HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. Roč. 1(4), s. 667-683, 2003
- GABE, V.; KACERGIUS, T.; ABU-LAFI, S.; ZEIDAN, M.; ABU-FARICH, B.; AUSTYS, D.; RAYAN, A. Suppressive effects of octyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation, acidogenicity, and gene expression. *Molecules*, Roč. 24(17), s. 3170, 2019
- GANDER, S.; KINNAIRD, A.; FINCH, R. Telavancin: in vitro activity against *staphylococci* in a biofilm model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Roč. 56, s. 337-343, 2005.
- GILLIS R. J.; WHITE, K. G; CHOI, K. H.; WAGNER, V. E.; SCHWEIZER, H. P.; IGLEWSKI, B .H. Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč. 49, s. 3858-3867, 2005.
- GILSON, E. R. Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences. Roč. 136, s. 385, 1903
- GOERES, D. M.; HAMILTON, M. A.; BECK, N. A.; BUCKINGHAM-MEYER, K.; HILYARD, J. D.; LOETTERLE, L. R. A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nature Protocols*. Roč. 4, s. 783, 2009.
- GONEC, T.; POSPISILOVA, S.; KAUEKOVA, T.; KOS, J.; DOHANOSOVA, J.; ORAVEC, M.; KOLLAR, P.; COFFEY, A.; LIPTAJ, T.; CIZEK, A.; JAMPILEK, J. N-Alkoxyphenylhydroxynaphthalenecarboxamides and their antimycobacterial activity. *Molecules*. Roč. 21(8), s. 1068, 2016.
- GONEC, T.; MALIK, I.; CSOLLEI, J.; JAMPILEK, J.; STOLARIKOVA, J.; SOLOVIC, I.; MIKUS, P.; KELTOSOVA, S.; KOLLAR, P.; O'MAHONY, J.; COFFEY, A. Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of novel Narylpiperazines containing an ethane-1,2-diyl connecting chain. *Molecules*. Roč. 22(12), s. 2100, 2017
- GOVENDER, H.; MOCKTAR, C.; KUMALO, H. M.; KOORBANALLY, N. A. Synthesis, antibacterial activity and docking studies of substituted quinolone thiosemicarbazones. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*,. Roč. 194(11), 1074-1081, 2019
- HALL, C. W.; MAH, T. F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. Roč. 41, s. 276-301, 2017.
- HAMAD, M.; AL-MARZOOQ, F.; ORIVE, G.; AL-TEL, T.H. Superbugs but no drugs: Steps in averting apost-antibiotic era. *Drug Discovery Today*. Roč. 24, s. 2225-2228, 2019.
- HAWVER, L. A.; JUNG, S. A.; NG, W. L. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS Microbiology Reviews*. Roč. 40, s. 738-752, 2016.
- HASSETT, D. J.; KORFHAGEN, T. R.; IRVIN, R. T.; SCHURR, M. J.; SAUER, K.; LAU, G. W.; HOIBY, N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in cystic fibrosis: insights into pathogenic processes and treatment strategies. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. Roč. 14(2), s. 117-130, 2010
- HE, Z; HUANG, Z.; JIANG, W.;ZHOU, W. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde on *Streptococcus mutans* biofilms. *Frontiers in Microbiology*. Roč. 10, s.2241, 2019.

- HOFFMANN, N.; LEE, B.; HENTZER, M.; RASMUSSEN, T. B.; SONG, Z.; JOHANSEN, H. K.; HØIBY, N. Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in Cfr<sup>-/-</sup> mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč. 51, s. 3677-3687, 2007.
- HØIBY, N.; CIOFU, O.; BJARNSHOLT, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiology*. Roč. 5(11) s. 1663-1674, 2010
- HOLMBERG, A.; MÖRGELIN, M.; RASMUSSEN, M. Effectiveness of ciprofloxacin or linezolid in combination with rifampicin against *Enterococcus faecalis* in biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Roč. 67, s. 433-439., 2011.
- HONRAET, K.; NELIS, H. J. Use of the modified robbins device and fluorescent staining to screen plant extracts for the inhibition of *S. mutans* biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. Roč. 64, s. 217-224, 2006.
- HORTON, D. A.; BOURNE, G. T.; SMYTHE, M. L. The combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures. *Chemical Reviews*. Roč. 103.3: s 893-930,2003
- HOUSSEIN, M., & GALI-MUHTASIB, H. Cell Death Mechanisms of the Promising Anticancer Compound Gallotannin. In: Programmed Cell Death. IntechOpen, 2019
- HU H.; LEE H.J.; JIANG C. Penta-1, 2, 3, 4, 6-O-galloyl-beta- D-glucose induces p53 and inhibits STAT3 in prostate cancer cells in vitro and suppresses prostate xenograft tumor growth in vivo. *Molecular Cancer Therapy*. Roč. 7(9), s. 2681–2691, 2008
- HRICOVINIOVA, Z. HRICOVINI, M.; KOZICS, K. New series of quinazolinone derived Schiff's bases: synthesis, spectroscopic properties and evaluation of their antioxidant and cytotoxic activity. *Chemical Papers*. Roč. 72(4), s. 1041–1053, 2018.
- HRICOVÍNIOVÁ, J.; ŠEVČOVIČOVÁ, A.; HRICOVÍNIOVÁ, Z. . Evaluation of the genotoxic, DNA-protective and antioxidant profile of synthetic alkyl gallates and gallotannins using in vitro assays. *Toxicology in Vitro*. Roč. 65, s. 104789, 2020
- IMRAMOVSKY, A.; PESKO, M.; KRALOVA, K.; VEJSOVA, M.; STOLARIKOVA, J.; VINSOVA, J.; JAMPILEK, J. Investigating spectrum of biological activity of 4- and 5-chloro-2-hydroxy-n-[2-(arylamino)-1-alkyl-2-oxoethyl]benzamides. *Molecules*. Roč. 16(3), s. 2414-2430, 2011.
- IMRAN, M.; IQBAL, J.; IQBAL, S.; IJAZ, N. In vitro antibacterial studies of ciprofloxacin-imines and their complexes with Cu (II), Ni (II), Co (II), and Zn (II). *Turkish Journal of Biology*. Roč. 31(2), s. 67-72, 2007.
- ISLAM, S. M.; ROY, A. S.; MONDAL, P.; MUBARAK, M.; MONDAL, S.; HOSSAIN, D.; SANTRA, S. C. Synthesis, catalytic oxidation and antimicrobial activity of copper (II) Schiff base complex. *Journal of Molecular Catalysis*. Roč. 336, s. 106-114, 2011
- JACKSON, S.; COULTHWAIT, L.; LOEWY, Z.; SCALLAN, A.; VERRAN, J. Biofilm development by blastospores and hyphae of *Candida albicans* on abraded denture acrylic resin surfaces. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. Roč. 112, s. 988-993, 2014.
- JAMAL, M., AHMAD; W., ANDLEEB, S.; JALIL, F.; IMRAN, M.; NAWAZ, M. A.; KAMIL, M. A. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, Roč. 81, s. 7-11, 2018.

- JIAMBOONSRI, P.; PITHAYANUKUL, P.; BAVOVADA, R.; CHOMNAWANG, M.T. The inhibitory potential of Thai mango seed kernel extract against methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus*. *Molecules*. Roč. 16, s. 6255–6270, 2011
- JEFFERSON K. K; GOLDMANN D. A; PIER G. B. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč. 49, s.2467–73, 2005.
- JIA, P.; XUE, Y. J.; DUAN, X. J.; SHAO, S. H. Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and sarA expression by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*. Roč. 53, s. 409-416., 2011.
- JOHNSON, L.; MULCAHY, H.; KANEVETS, U.; SHI, Y.; LEWENZA, S. Surface-localized spermidine protects the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane from antibiotic treatment and oxidative stress. *Journal of Bacteriology*. Roč. 194, s. 813-826, 2012.
- KANAANI, J. & GINSBURG, H. Effects of cinnamic acid derivatives on in vitro growth of *Plasmodium falciparum* and on the permeability of the membrane of malaria-infected erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč. 36.5: s. 1102-1108, 1992.
- KALIA, V. C. *Quorum sensing vs. quorum quenching: a battle with no end in sight*. India, Springer, 2015.
- KAŠTÁNKOVÁ, J. Hodnocení antimikrobiální aktivity substituovaných 3-(piperazin-1-yl)propan-1,2-diolů. Rigorózní práce. FAF VFU Brno, 2018.
- KHAN, S. A. ; YUSUF, M. Synthesis, spectral studies and in vitro antibacterial activity of steroidal thiosemicarbazone and their palladium (Pd (II)) complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Roč. 44, s. 2270-2274, 2009
- KHARAZMI, A.; GIWERCMAN, B.; HØIBY, N. Robbins device in biofilm research. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1999 S. 207-215, 1999
- KIEDROWSKI, M. R.; HORSWILL, A. R. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Roč. 1241, s. 104-121, 2011.
- KIM, P. J.; STEINBERG, J. S. Wound care: biofilm and its impact on the latest treatment modalities for ulcerations of the diabetic foot. In: *Seminars in Vascular Surgery*. WB Saunders. s.. 70-74, 2012.
- KISS, A.K.; PIWOWARSKI, J.P. Ellagitannins, gallotannins and their metabolites - The contribution to the Anti-Inflammatory effect of food products and medicinal plants. *Current Medicinal Chemistry*. Roč. 25, s. 4946–4967, 2018
- KNOBLOCH, J. K. M.; HORSTKOTTE, M. A.; ROHDE, H.; MACK, D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*. Roč. 191(2), s. 101-106, 2002.
- KOVACEVIC, Z.; CHIKHANI, S.; LOVEJOY, D. B.; RICHARDSON, D. R. Novel thiosemicarbazone iron chelators induce up-regulation and phosphorylation of the metastasis suppressor N-myc down-stream regulated gene 1: a new strategy for the treatment of pancreatic cancer. *Molecular Pharmacology*. Roč. 80, s. 598-609. 2011
- KRISTIANSEN, J. E. & AMARAL, L. The potential management of resistant infections with non-antibiotics. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Roč. 40, s. 319-327, 1997.

- KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, Ken'ichi. Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Roč. 11.3: s. 347-350, 2001
- KUBO, I.; FUJITA, K. I.; NIHEI, K. I.; MASUOKA, N. Non-antibiotic antibacterial activity of dodecyl gallate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Roč. 11(4), s. 573-580, 2003
- KUEHL, R.; AL-BATAINEH, S.; GORDON, O.; LUGINBUEHL, R.; OTTO, M.; TEXTOR, M.; LANDMANN, R. Furanone at subinhibitory concentrations enhances staphylococcal biofilm formation by *luxS* repression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč. 53, s. 4159–4166, 2009.
- KUO P.T.; LIN T.P.; LIU L.C. Penta-O-galloyl-beta-D-glucose suppresses prostate cancer bone metastasis by transcriptionally repressing EGF-induced MMP-9 expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Roč. 57(8), s. 3331–3339, 2009.
- KWIECIŃSKI, J.; EICK, S.; WÓJCIK, K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Roč. 33(4), s. 343-347, 2009
- LAPLANTE K. L.; MERMEL L. A. 2007. In vitro activity of daptomycin and vancomycin lock solutions on staphylococcal biofilms in a central venous catheter model. *Nephrology Dialysis Transplantation*. Roč. 22, s. 2239–46, 2007.
- LEE S.J.; LEE H.K.; JUNG M.K.; MAR W. In vitro antiviral activity of 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose against hepatitis B virus. *Biol Pharm Bull*. Roč. 29(10), s. 2131–2134, 2006.
- LEITE, B.; GOMES, F.; TEIXEIRA, P.; SOUZA, C.; PIZZOLITTO, E.; OLIVEIRA, R. In vitro activity of daptomycin, linezolid and rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Current Microbiology*. Roč. 63, s. 313, 2011.
- LEITCH, E. C.; WILLCOX, M. D. P. Lactoferrin increases the susceptibility of *S. epidermidis* biofilms to lysozyme and vancomycin. *Current Eye Research*. Roč. 19, s. 12-19, 1999.
- LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7th ed.; Lippincott Williams & Wilkins and Wolters Kluwer, Baltimore, MD, USA, 2013.
- LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč. 45, s. 999-1007, 2001.
- LIN, M. H.; CHANG, F. R.; HUA, M. Y.; WU, Y. C.; LIU, S. T. Inhibitory effects of 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose on biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč. 55(3), s. 1021-1027, 2011
- LYNCH, A. S.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annual Review of Medicine*. Roč. 59, s. 415-428, 2008.
- MACFARLANE, S. Microbial biofilm communities in the gastrointestinal tract. *Journal of Clinical Gastroenterology*. Ročník 42: s. 142-143, 2008
- MALHEIRO, J. F.; MAILLARD, J. Y.; BORGES, F.; SIMÕES, M. Evaluation of cinnamaldehyde and cinnamic acid derivatives in microbial growth control. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Roč. 141, s. 71-78, 2019

- MALIK, I.; SEDLAROVA, E.; BUKOVSKY, M.; CSOLLEI, J.; STANZEL, L.; SICHROVSKA, L. In vitro Antimicrobial Evaluation of Ortho-/meta-Alkoxyphenylcarbamic acid esters containing 4-(Pyrimidin-2-yl) piperazin-1-yl Moiey. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*. Roč. 13(2), s. 215-219, 2014
- MALIK, I.; CURILLOVA, J.; CSOLLEI, J.; JAMPILEK, J.; ZADRAZILOVA, I.; GOVENDER, R.; MIKUS, P. The synthesis and in vitro screening of the 2-/3--alkoxyphenylcarbamic acid derivatives containing a 4-(2-fluorophenyl) piperazin-1-yl moiety against some non-tuberculous mycobacterial strains. *Fresenius Environmental Bulletin*. Roč. 26(4), s. 2759-2770, 2016
- MALIK, I.; CSOLLEI, J.; JAMPILEK, J.; STANZEL, L.; ZADRAZILOVA, I.; HOSEK, J.; POSPISILOVA, S.; CIZEK, A.; COFFEY, A.; O'MAHONY, J. The structure-antimicrobial activity relationships of promising class of the compounds containing N-aryl piperazine scaffold. *Molecules*. Roč. 21(10), s. 1274, 2016
- MALONE, M.; GOERES, D. M.; GOSBELL, I.; VICKERY, K.; JENSEN, S.; STOODLEY, P. Approaches to biofilm-associated infections: the need for standardized and relevant biofilm methods for clinical applications. *Expert Review of Anti-infective therapy*. Roč. 15, s. 147-156, 2017.
- MARRIE, T. J.; NELLIGAN, J.; COSTERTON, J. W. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation*. Roč. 66.6., s. 1339-1341, 1982
- MARTIN, I.; WATERS, V.; GRASEMANN, H. Approaches to targeting bacterial biofilms in cystic fibrosis airways. *International Journal of Molecular Sciences*. Roč. 22(4), s. 2155, 2021.
- MATHEW, B.; BAEK, S. C.; LEE, J. P.; JOY, M.; RILDA, P. A.; RANDEV, R. V.; LOHIDAKSHAN, K. K. Selected aryl thiosemicarbazones as a new class of multi-targeted monoamine oxidase inhibitors. *MedChemComm*. Roč. 9, s. 1871-1881, 2018
- MEYLHEUC, T.; VAN OSS, C. J.; BELLON-FONTAINE, M. N. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. *Journal of Applied Microbiology*. Roč. 91, s. 822-832, 2001.
- MERRITT, J. H.; KADOURI, D. E.; O'TOOLE, G. A. Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols in Microbiology*. Roč. 22, s. 1.1-1B, 2011.
- MICHALET, S.; CARTIER, G.; DAVID, B.; MARIOTTE, A. M.; DIJOUX-FRANCA, M. G.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S.. N-caffeoylphenalkylamide derivatives as bacterial efflux pump inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Roč. 17(6), s. 1755-1758, 2007.
- MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*. Roč. 55, s. 165-199, 2001.
- MINVIELLE, M. J.; BUNDERS, C. A.; MELANDER, Ch. Indole-triazole conjugates are selective inhibitors and inducers of bacterial biofilms. *Medchemcomm*. Roč. 4, s. 916-919, 2013.
- MLADĚNKA, P.; MACÁKOVÁ, K.; FILIPSKÝ, T.; ZATLOUKALOVÁ, L.; JAHODÁŘ, L.; BOVICELLI, P.; SASO, L. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Roč. 105(5), s. 693-701, 2011.



- MOHANAN, K.; ASWATHY, R.; NITHA, L. P.; MATHEWS, N. E.; KUMARI, B. S. Synthesis, spectroscopic characterization, DNA cleavage and antibacterial studies of a novel tridentate Schiff base and some lanthanide (III) complexes. *Journal of Rare Earths*. Roč. 32, s. 379-388. 2014
- MU, D.; XIANG, H.; DONG, H.; WANG, D.; WANG, T. Isovitexin, a potential candidate inhibitor of sortase A of *Staphylococcus aureus* USA300. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. Roč. 28(9), s. 1426-1432, 2018
- MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS pathogens*. Roč. 4, 2008.
- MURPHY, T. M.; DEITZ, J. M.; PETERSEN, P. J.; MIKELS, S. M.; WEISS, W. J. Therapeutic efficacy of GAR-936, a novel glycylicycline, in a rat model of experimental endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč. 44, s. 3022-3027, 2000.
- NAIR, M. S.; ARISH, D.; JOSEYPHUS, R. S. Synthesis, characterization, antifungal, antibacterial and DNA cleavage studies of some heterocyclic Schiff base metal complexes. *Journal of Saudi Chemical Society*. Roč. 16(1), s. 83-88, 2012.
- NOSTRO, A.; ROCCARO, A. S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M. A.; PIZZIMENTI, F. C.; BLANCO, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*. Roč. 56, s. 519-523., 2007.
- NOSTRO, A.; MARINO, A.; BLANCO, A. R.; CELLINI, L.; DI GIULIO; M., PIZZIMENTI, F; BISIGNANO, G.. In vitro activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. *Journal of Medical Microbiology*. Roč. 58, s. 791-797, 2009.
- NÜBEL, U.; DORDEL, J.; KURT, K.; STROMMENGER, B.; WESTH, H.; SHUKLA, S. K.; ŽEMLIČKOVÁ, H.; LEBLOIS, R.; WIRTH, T.; JOMBART, T.; BALLOUX, F.; WITTE, W. A timescale for evolution, population expansion, and spatial spread of an emerging clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLOS Pathogens*. Roč. 6, s. e1000855, 2010
- NURYASTUTI, T.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J.; IRAVATI, S.; AMAN, A. T.; KROM, B. P. Effect of cinnamon oil on icaA expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Applied and Environmental Microbiology*. Roč 75, s. 6850-6855., 2009.
- OH, E.; BAE, J.; KUMAR, A.; CHOI, H. J.; JEON, B. Antioxidant-based synergistic eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms with bacitracin. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Roč. 52(1), s. 96-99, 2018.
- OH, I.; YANG, W. Y.; CHUNG, S. C.; KIM, T. Y.; OH, K. B.; SHIN, J. In vitro sortase A inhibitory and antimicrobial activity of flavonoids isolated from the roots of *Sophora flavescens*. *Archives of Pharmacal Research*. Roč. 34(2), s. 217-222, 2011
- OKAHASHI, N.; NAKATA, M.; TERAOKA, Y.; ISODA, R.; SAKURAI, A.; SUMITOMO, T.; OOSHIMA, T. (2011). Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*. Roč. 50(3-4), s. 148-154, 2011

- OLIVARES, E.; BADEL-BERCHOUX, S.; PROVOT, C.; JAULHAC, B.; PRÉVOST, G.; BERNARDI, T.; JEHL, F. The Biofilm Ring Test®: a rapid method for the routine analysis of *P. aeruginosa* biofilm formation kinetics. *Journal of Clinical Microbiology*, JCM-02938, 2015.
- ONO K.; SAWADA T.; MURATA Y. Pentagalloylglucose, an antisecretory component of *Paeoniae radix*, inhibits gastric H<sup>+</sup>, K(+)-ATPase. *Clinica Chimica Acta.* ;Roč. 290(2), s. 159–167, 2000.
- OPLETALOVÁ V.; KALINOWSKI, D. S.; VEJSOVÁ, M.; KUNEŠ, J.;POUR, M.; JAMPÍLEK, J.; RICHARDSON, D. R. Identification and characterization of thiosemicarbazones with antifungal and antitumor effects: cellular iron chelation mediating cytotoxic activity. *Chemical research in Toxicology*, Roč. 21, s. 1878-1889, 2008
- ORAVCOVÁ, V.; ŽŮREK, L.; TOWNSEND, A.; CLARK, A. B.; ELLIS, J. C., ČÍŽEK, A. American crows as carriers of vancomycin-resistant enterococci with vanA gene. *Environmental Microbiology*. Roč. 16, s. 939-949, 2014.
- ORDWAY, D., VIVEIROS, M., LEANDRO, C., BETTENCOURT, R., ALMEIDA, J., MARTINS, M.; AMARAL, L. Clinical concentrations of thioridazine kill intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. Roč. 47, s. 917-922, 2003.
- O'TOOLE, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. Roč 47, 2011.
- OTTO, M. Staphylococcal biofilms. In: *Bacterial biofilms*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008, s. 207-228, 2008.
- PACE, J. L. RUPP, M. E.; FINCH, R. G. *Biofilms, infection, and antimicrobial therapy*. CRC Press, 2005.
- PADMANABHAN, P.; KHALEEFATHULLAH, S.; KAVERI, K., PALANI, G.; RAMANATHAN, G.; THENNARASU, S.; TIRICHURAPALLI SIVAGNANAM, U. Antiviral activity of Thiosemicarbazones derived from  $\alpha$ -amino acids against Dengue virus. *Journal of Medical Virology*, Roč. 89, s. 546-552. 2017
- PARK J.K.; CHO H.J.; LIM Y.; CHO Y.H.; LEE C.H. Hypocholesterolemic effect of CJ90002 in hamsters: a potent inhibitor for squalene synthase from *Paeonia moutan*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. Roč.12, 2002 (2):222–227.
- PARSEK, M. R.; VAL, D. L.; HANZELKA, B. L.; CRONAN, J. E.; GREENBERG, E. P. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 96, s. 4360-4365, 1999.
- PAYNE, D. E.; MARTIN, N. R.; PARZYCH, K. R.; RICKARD, A. H., UNDERWOOD, A.; BOLES, B. R. Tannic acid inhibits *Staphylococcus aureus* surface colonization in an IsaA-dependent manner. *Infection and Immunity*. Roč. 81, s. 496-504, 2013.
- PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*. Roč. 72, s. 157-165, 2008.
- PERE, P.; LINDGREN, L.; VAARA, M. Poor antibacterial effect of ropivacaine: Comparison with bupivacaine. *Anesthesiology* Roč. 91, s. 884–886, 1999

- PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G.; SANSONETTY, F.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; FONSECA, A. F.; MÅRDH, P. A. Antifungal activity of local anesthetics against *Candida* species. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. Roč. 8, s. 124-137, 2000.
- POSPÍŠILOVÁ, Š. „Time-kill curve“ jako metoda pro studium dynamiky baktericidního účinku potenciálních chemoterapeutik. Diplomová práce. Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2015.
- PRASAD, K. S.; KUMAR, L. S.; CHANDAN, S.; JAYALAKSHMI, B.; REVANASIDDAPPA, H. D. Diorganotin (IV) complexes of biologically potent 4 (3H)-quinazolinone derived Schiff bases: Synthesis, spectroscopic characterization, DNA interaction studies and antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Roč. 81, s. 276-282, 2011
- PRUDÊNCIO, M.; MOTA, M. M.; MENDES, M. M. A toolbox to study liver stage malaria. *Trends in Parasitology*. Roč.2011, s. 565-574, 2011.
- RAAD, I., H.; JIANG, Y.; DVORAK, T.; REITZEL, R.; CHAIBAN, G.; HACHEM, R. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus* bacteremic isolates embedded in biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč. 51, s. 1656-1660, 2007.
- RAAD, I.; DAROUICHE, R.; DUPUIS, J.; ABI-SAID, D.; GABRIELLI, A.; HACHEM, R.; ROBERTSON, C. Central venous catheters coated with minocycline and rifampin for the prevention of catheterrelated colonization and bloodstream infections. *Annals of Internal Medicine*. Roč. 127: s. 267–274, 1997.
- RAAD, I.; DAROUICHE, R.; VAZQUEZ, J.; LENTNEK, A.; HACHEM, R.; HANNA, H.; SELTZER, E. Efficacy and safety of weekly dalbavancin therapy for catheter-related bloodstream infections caused by gram-positive pathogens. *Clinical Infectious Diseases*. Roč. 40, s. 374–380, 2005.
- RABIN, N.; ZHENG, Y.; OPOKU-TEMENG, C.; DU, Y.; BONSU, E.; SINTIM, H. O. Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future Medicinal Chemistry*. Roč. 7, 647-671, 2015.
- RADIX, S.; JORDHEIM, A. D.; ROCHEBLAVE, L.; N'DIGO, S.; PRIGNON, A. L., COMMUN, C.; WALCHSHOFER, N. N, N'-disubstituted cinnamamide derivatives potentiate ciprofloxacin activity against overexpressing NorA efflux pump *Staphylococcus aureus* 1199B strains. *European journal of medicinal chemistry*. Roč. 150, s. 900-907, 2018.
- RAJA, A. F.; ALI, F.; KHAN, I. A.; SHAWL, A. S.; ARORA, D. S.; SHAH, B. A.; TANEJA, S. C.. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid from *Boswellia serrata*. *BMC Microbiology*. Roč. 11, s. 54, 2011
- RAJENDRAN, N.; SUBRAMANIAM, S.; CHRISTENA, L. R.; MUTHURAMAN, M. S.; SUBRAMANIAN, N. S., PEMIAH, B.; SIVASUBRAMANIAN, A. Antimicrobial flavonoids isolated from Indian medicinal plant *Scutellaria oblonga* inhibit biofilms formed by common food pathogens. *Natural Product Research*, Roč. 30, s. 2002-2006, 2016.

- RAMAN, N.; KULANDAISAMY, A.; THANGARAJA, C.; MANISANKAR, P.; VISWANATHAN, S.; EDHI, C. Synthesis, structural characterisation and electrochemical and antibacterial studies of Schiff base copper complexes. *Transition Metal Chemistry*. Roč 29, s. 129-135., 2014
- RASHED, K.; SAID, A.; ABDO, A.; SELIM, S. Antimicrobial activity and chemical composition of *Pistacia chinensis* Bunge leaves. *International Food Research Journal*. Roč. 23(1),s. 316, 2016.
- REWAK-SOROCZYŃSKA, J.; PALUCH, E.; SIEBERT, A.; SZALKIEWICZ, K.; OBLĄK, E. Biological activity of glycine and alanine derivatives of quaternary ammonium salts (QASs) against micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*. Roč. 69, s. 212-220, 2019.
- REYES, S.; HUIGENS I. R. W.; SU, Z.; SIMON, M. L.; MELANDER, C. Synthesis and biological activity of 2-aminoimidazole triazoles accessed by Suzuki–Miyaura cross-coupling. *Organic & Biomolecular Chemistry*. Roč. 9, s. 3041-3049, 2011.
- ROY, R.; TIWARI, M.; DONELLI, G.; TIWARI, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. Roč. 9, s. 522-554, 2018.
- ROSU, T.; PAHONTU, E.; MAXIM, C.; GEORGESCU, R.; STANICA, N.; ALMAJAN, G. L.; GULEA, A. Synthesis, characterization and antibacterial activity of some new complexes of Cu (II), Ni (II), VO (II), Mn (II) with Schiff base derived from 4-amino-2,3-dimethyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-one. *Polyhedron*, Roč. 29, s. 757-766, 2010
- RÓŻALSKI, M.; WALENCKA, E.; RÓŻALSKA, B; WYSOKIŃSKA, H. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. *Phytomedicine*. Roč. 14., s. 31-35, 2007.
- SAMBANTHAMOORTHY, K.; GOKHALE, A. A.; LAO, W.; PARASHAR, V.; NEIDITCH, M. B.; SEMMELHACK, M. F.; WATERS, C. M. Identification of a Novel Benzimidazole that Inhibits Bacterial Biofilm Formation in a Broad Spectrum Manner. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, AAC-00583, 2011.
- SCHMIDT, R. M., & ROSENKRANZ, H. S. Antimicrobial activity of local anesthetics: lidocaine and procaine. *The Journal of Infectious Diseases*. Roč. 121, s. 597-607, 1970.
- SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A. C. *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. Boca Raton: CRC Press, 2007.
- SCHWARTZ, K.; STEPHENSON, R.; HERNANDEZ, M.; JAMBANG, N.; BOLES, B. R. The use of drip flow and rotating disk reactors for *Staphylococcus aureus* biofilm analysis. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. Roč. 46, 2010.
- SENEVIRATNE, C. J.; ZHANG, C. F.; SAMARANAYAKE, L. P. DENTAL plaque biofilm in oral health and disease. *Chinese Journal of Dental Research*. Roč. 14(2), s. 87, 2011.
- SERDA, M., KALINOWSKI, D. S.; RASKO, N.; POTŮČKOVÁ, E.; MROZEK-WILCZKIEWICZ, A.; MUSIOL, R.; GIŁĄB, J. Exploring the anti-cancer activity of novel thiosemicarbazones generated through the combination of retro-fragments: Dissection of critical structure-activity relationships. *PloS one*. Roč. 9, 2014.

- SHAN, B.; CAI, Y. Z.; BROOKS, J. D.; CORKE, H. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Roč 55, s. 5484-5490, 2017.
- SHAQUIQUZZAMAN, M.; VERMA, G.; MARELLA, A.; AKHTER, M.; AKHTAR, W.; KHAN, M. F.; ALAM, M. M. . Piperazine scaffold: A remarkable tool in generation of diverse pharmacological agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Roč. 102, s. 487-529.
- SHARMA, P.; KAUR, G.; PAHWA, R.; SHARMA, A. RAJAK, H. Quinazolinone analogs as potential therapeutic agents. *Current Medicinal Chemistry*. Roč. 18(31), s. 4786-4812, 2011
- SHEN, G.; RAJAN, R.; ZHU, J.; BELL, C. E.; PEI, D. Design and synthesis of substrate and intermediate analogue inhibitors of S-ribosylhomocysteine. *Journal of Medicinal Chemistry*. Roč. 49, s. 3003-3011. 2006.
- SINGH, S.; SINGH, S. K.; CHOWDHURY, I.; SINGH, R. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The Open Microbiology Journal* Roč. 11, s. 53-62, 2017.
- SINGH, B. N.; SINGH, B. R.; SINGH, R. L.; PRAKASH, D.; DHAKAREY, R.; UPADHYAY, G. SINGH, H. B. . Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food and Chemical Toxicology*. Roč. 47(6), s. 1109-1116, 2009
- SINGH, M.; SINGH, S. K.; GANGWAR, M.; NATH, G.; SINGH, S. K. Design, synthesis and mode of action of novel 2-(4-aminophenyl) benzothiazole derivatives bearing semicarbazone and thiosemicarbazone moiety as potent antimicrobial agents. *Medicinal Chemistry Research*, Roč. 25, s. 263-282. 2016
- SKOGMAN, M. E., KUJALA, J.; BUSYGIN, I.; LEINO, R.; VUORELA, P.; FALLARERO, A. Antibacterial and anti-biofilm activities of Cinchona alkaloid derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Planta Medica*. Roč. 78, s. PD130, 2012.
- SPECHLER, S. J; GOYAL, R. K. Barrett's esophagus. *New England Journal of Medicine*. Roč. 315.6, s. 362-371, 1986.
- SONI, K. A.; OLADUNJOYE, A.; NANNAPANENI, R.; SCHILLING, M. W.; SILVA, J. L.; MIKEL, B.; BAILEY, R. H. Inhibition and inactivation of *Salmonella Typhimurium* biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. *Journal of Food Protection*. Roč. 76, s. 205-212, 2013.
- SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*. Roč. 4, s. 223-229, 2013.
- SOTO, S.; SMITHSON, A.; HORCAJADA, J. P.; MARTINEZ, J. A.; MENSA, J. P.; VILA, J. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*. Roč. 12(10), s. 1034-1036, 2006
- SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. Roč.12(8), s. 749-767, 2012.
- STAPLETON, P. D.; TAYLOR, P. W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science rogress*. Roč. 85.1, s. 57-72, 2002

- SOUČKOVÁ, L.; RUZSÍKOVÁ, A. Nová antibiotika v klinické praxi a výzkumu. *Klinická farmakologie a farmacie*. Roč. 30, s. 27–31, 2016.
- SPOERING, A. L.; LEWIS, K. I. M. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology*. Roč 183, s. 6746-6751, 2001.
- SRIRAM, M. I.; KALISHWARALAL, K.; DEEPAK, V.; GRACEROSEPAT, R.; SRISAKTHI, K.; GURUNATHAN, S. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Roč. 85, s. 174-181, 2011.
- SRISATJALUK, R. L.; KLONGNOI, B.; WONGSIRICHAT, T. Antimicrobial effect of topical local anesthetic spray on oral microflora. *Journal of Dental Anesthesia and Pain Medicine*. Roč. 16, s. 17-24, 2016.
- STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. Roč. 40, s. 175-179, 2000.
- STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G. D.; DJUKIĆ, S., ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*. Roč. 115, s. 891-899, 2007.
- SUGAYA, A.; SUZUKI, T.; SUGAYA, E.; YUYAMA, N.; YASUDA K.; TSUDA T. Inhibitory effect of peony root extract on pentylenetetrazol induced EEG power spectrum changes and extracellular calcium concentration changes in rat cerebral cortex *Journal of Ethnopharmacology*. 1991;Roč. 33(1–2), s.159–167, 1991.
- SWAMY, G. Y. S. K.; RAVIKUMAR, K.; RAMAKRISHNA, K. V. S. Synthesis and crystal structure of bis [2-(4-methylphenyl)-1-phenethyl-4 (1H)-quinazolinone] dichlorocopper (II). *Polyhedron*. Roč.49, s.145-150, 2013
- SZABÓ, E. Isolation and characterization of EBR specific induced chitinases from tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Acta Biologica Szegediensis*. Roč. 52.1, s. 251-252, 2008
- SZYCHOWSKI, J.; KONDO, J.; ZAHR, O.; AUCLAIR, K.; WESTHOF, E.; HANESSIAN, S.; KEILLOR, J. W. Inhibition of aminoglycoside-deactivating enzymes APH (3')-IIIa and AAC (6')-II by amphiphilic paromomycin O2 "-ether analogues. *ChemMedChem*. Roč. 6(11), 1961.
- TA, C., J. Mini r eview of phytochemicals and plant taxa with activity as microbial biofilm and quorum sensing in-hibitors. *Molecules*. 2015
- TAVMAN, A.; ÜLKÜSEVEN, B.; BIRTEKSÖZ, S.;ÖTÜK, G. Antimicrobial activity of some 2-and 3-pyridinyl-1H-benzimidazoles and their Fe III, Cu II, Zn II, and Ag I complexes. *Folia Microbiologica* Roč. 48, s. 479-483, 2003
- TENKE, P.; KÖVES, B.; NAGY, K.; HULTGREN, S. J.; MENDLING, W.; WULLT, B.;JOHANSEN, T. E. B. Update on biofilm infections in the urinary tract. *World Journal of Urology*. Roč. 30(1), s. 51-57, 2012
- TIPPER, D. J.; STROMINGER, J. L. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Roč. 54.4, s.1133, 1965.

- TOTE, K.; BERGHE, D. V.; MAES, L.; COS, P. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Letters in Applied Microbiology*. Roč. 46, s. 249-254, 2008.
- TORRES-LEÓN, C.; VENTURA-SOBREVILLA, J.; SERNA-COCK, L.; ASCACIO-VALDÉS, J. A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J.; AGUILAR, C. N. Pentagalloylglucose (PGG): a valuable phenolic compound with functional properties. *Journal of Functional Foods*. Roč. 37, s. 176-189, 2017
- TRULEAR, M. G.; CHARACKLIS, W. G. Dynamics of biofilm processes. *Journal (Water Pollution Control Federation)*. S. 1288-1301, 1982.
- VALM, A. M. The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. *Journal of Molecular Biology*. 431.16: 2957-2969, 2019
- VAN ACKER, H.; SASS, A.; BAZZINI, S.; DE ROY, K.; UDINE, C.; MESSIAEN, T.; COENYE, T. Biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species. *PLoS One*. Roč. 8, s. 58943, 2013.
- VANČATOVÁ, I. Antimikrobiální aktivita přirozených polyfenolů Ústav infekčních chorob a mikrobiologie. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012.
- VIMBERG, V.; KUZMA, M.; STODULKOVA, E.; NOVAK, P.; BEDNAROVA, L.; SULC, M.; GAZAK, R. Hydnocarpin-type Flavonolignans: semisynthesis and inhibitory effects on *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Journal of Natural Products*. Roč. 78, s. 2095-2103, 2015.
- WANG, J.; JIAO, H.; MENG, J.; QIAO, M.; DU, H.; HE, M.; WU, Y. . Baicalin inhibits biofilm formation and the quorum-sensing system by regulating the MsrA drug efflux pump in *Staphylococcus saprophyticus*. *Frontiers in Microbiology*. Roč. 10, s. 2800, 2018
- WANG, J.; SHI, Y.; JING, S.; DONG, H.; WANG, D.; WANG, T. Astilbin inhibits the activity of sortase a from *Streptococcus mutans*. *Molecules*. Roč. 24(3),s. 465, 2019
- WALTERS, M. C., ROE, F., BUGNICOURT, A., FRANKLIN, M. J., STEWART, P. S. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Roč. 47, s. 317-323, 2003.
- WAISSER, K.; DOLEZAL, R.; CIZMARIK, J.; MALIK, I, KAUSTOVA, J. The potential antituberculotics of the series of 2-hydroxy-3-(4-phenylpiperazin-1-yl)-propylphenyl-carbamates. *Folia Pharm. Univ. Carol*. Roč. 35/36, s. 45–48., 2007
- WHITNALL M; HOWARD J; PONKA P; RICHARDSON D.R. A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* . 2006;Roč. 103, s.14901-14906, 2006
- WHO. *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report*; HO Press: Geneva, Switzerland, 2017
- XIE, Q.; LI, J.; ZHOU, X. Anticaries effect of compounds extracted from *Galla chinensis* in a multispecies biofilm model. *Oral Microbiology and Immunology*. Roč. 23(6), s. 459-465, 2008

- XING, M.; SHEN, F.; LIU, L.; CHEN, Z.; GUO, N.; WANG, X.; LI, Y. Antimicrobial efficacy of the alkaloid harmaline alone and in combination with chlorhexidine digluconate against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* grown in planktonic and biofilm cultures. *Letters in Applied Microbiology*. Roč. 54, s. 475-482, 2012.
- YADAV, M. K.; PARK, S. W.; CHAE, S. W.; SONG, J. J. Sinefungin, a natural nucleoside analogue of S-adenosylmethionine, inhibits *Streptococcus pneumoniae* biofilm growth. *BioMed research international*, 2014.
- YARWOOD, J. M.; BARTELS, D. J.; VOLPER, E. M.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Bacteriology*. Roč. 186, s. 1838-1850, 2004.
- YATES, E. A.; PHILIPP, B.; BUCKLEY, C.; ATKINSON, S.; CHHABRA, S. R.; SOCKETT, R. E.; Williams, P. . N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*. Roč. 70(10), s. 5635-5646, 2002.
- YEAGLEY, A. A.; SU, Z.; MCCULLOUGH, K. D.; WORTHINGTON, R. J.; MELANDER, C. N-substituted 2-aminoimidazole inhibitors of MRSA biofilm formation accessed through direct 1, 3-bis (tert-butoxycarbonyl) guanidine cyclization. *Organic & Biomolecular Chemistry*. Roč. 11, s. 130-137, 2013.
- YIN, L. Y.; LAZZARINI, L.; LI, F.; STEVENS, C. M.; CALHOUN, J. H. Comparative evaluation of tigecycline and vancomycin, with and without rifampicin, in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* experimental osteomyelitis in a rabbit model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Roč. 55, s. 995-1002, 2005.
- YIN, H.; DENG, Y.; WANG, H.; LIU, W.; ZHUANG, X.; CHU, W. Tea polyphenols as an antivirulence compound disrupt quorum-sensing regulated pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*. Roč. 5(1), s. 1-12, 2015
- YOKOZAWA T.; CHEN C.P.; TANAKA T.; KITANI K. A study on the nitric oxide production-suppressing activity of *Sanguisorbae* Radix components. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. Roč. 23(6), s. 717-722, 2000.
- ZADRAZILOVA, I.; POSPISILOVA, S.; MASARIKOVA, M.; IMRAMOVSKY, A.; MONREAL-FERRIZ, J.; VINSOVA, J.; CIZEK, A.; JAMPILEK, J. Salicylanilide carbamates: Promising antibacterial agents with high in vitro activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Roč. 77, s. 197-207, 2015
- ZAHEDIFARD M.; FARAJ F.L.; PAYDAR M.; LOOI CH.Y.; HAJREZAEI M.; HASANPOURGHADI M.; KAMALIDEHGHAN B.; MAJID N.A.; ALI H.M.; ABDULLA M.A. Synthesis, characterization and apoptotic activity of quinazolinone Schiff base derivatives toward MCF-7 cells via intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Scientific Reports*. Roč. 5(11544), 2015.
- ZHANG, L.; MAH, T. Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *Journal of Bacteriology*. Roč. 190, s. 4447-4452, 2008.
- ZHANG, J.; CHENG, P.; MA, Y.; LIU, J.; MIAO, Z.; REN, D.; LIU, L. An efficient nano CuO-catalyzed synthesis and biological evaluation of quinazolinone Schiff base derivatives and bis-2, 3-dihydroquinazolin-4 (1H)-ones as potent antibacterial agents against *Streptococcus lactis*. *Tetrahedron Letters*. Roč. 57, s. 5271-5277, 2016



- ZHAO, G.; WAN, W.; MANSOURI, S.; ALFARO, J. F.; BASSLER, B. L.; CORNELL, K. A.; ZHOU, Z. S. Chemical synthesis of S-ribosyl-Lhomocysteine and activity assay as a LuxS substrate. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Roč. 13, s. 3897–3900, 2003.
- ZHAO, Y.; WANG, B. E.; ZHANG, S. W.; YANG, S. M.; WANG, H.; REN, A. M.; YI, E. T. Isolation of antifungal compound from *Paeonia suffruticosa* and its antifungal mechanism. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. Roč. 21(3), s.211-216, 2015
- ZIEMICHÓD, A.; SKOTARCZAK, B. QS–systems communication of Gram-positive bacterial cells. *Acta Biologica*. Roč. 2017, s. 39-49, 2017.
- ZIJNGE, V.; VAN LEEUWEN, M. B. M.; DEGENER, J. E.; ABBAS, F.; THURNHEER, T.; GMÜR, R.; M. Harmsen, H. JOral biofilm architecture on natural teeth. *PloS one*. Roč. 5(2), e9321.2010.

### Internetové zdroje:

- URL-1: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tuberculosis-surveillance-and-monitoring-europe-2021-2019-data>. [Cit 21-07-2021]
- URL-2: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/annual-report/2020-annual-report-european-medicines-agency\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/annual-report/2020-annual-report-european-medicines-agency_en.pdf) [Cit 21-07-2021]
- URL-3: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/annual-report/2019-annual-report-european-medicines-agency\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/annual-report/2019-annual-report-european-medicines-agency_en.pdf) [Cit 21-07-2021]
- URL-4: <https://antibiotic.ecdc.europa.eu/cs> [Cit 21-07-2021]
- URL-5: <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/overview/antimicrobial-resistance/european-surveillance-veterinary-antimicrobial-consumption-esvac>). [Cit 21-07-2021]
- URL-6: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/annual-report/2020-annual-report-european-medicines-agency\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/annual-report/2020-annual-report-european-medicines-agency_en.pdf) [Cit 21-07-2021]