

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Diplomová práce**

**Studium interakcí antibiotik a rostlinných olejů  
s obsahem mastných kyselin o střední délce řetězce**

**Autor práce: Bc. Josef Soukup**

**Obor studia: Výživa a potraviny (AMD)**

**Vedoucí práce: doc. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D.**

© 2018 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Studium interakcí antibiotik a rostlinných olejů s obsahem mastných kyselin o střední délce řetězce" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu použitých zdrojů na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 9. 4. 2018

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval doc. MVDr. Evě Skřivanové, Ph.D. za skvělé vedení, podporu a odborné i osobní rady. Dále Ing. Kláře Laloučkové za pomoc a instruktáž při zpracovávání a provádění praktické části této práce. A na závěr také svým rodičům, kteří mě již od mala ve studiu podporovali.

# Studium interakcí antibiotik a rostlinných olejů s obsahem mastných kyselin o střední délce řetězce

## Abstrakt

Jedním z nejvýznamnějších a nejrozšířenějších problémů při léčbě infekčních onemocnění je vznik rezistence na chemoterapeutika. Je znepokojivé, že se objevují bakterie rezistentní vůči důležitým lékům. Typickým příkladem je meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) nebo *Enterococcus faecalis* rezistentní proti vankomycinu, které se stávají v nemocnicích běžnými, což vede k velmi významné morbiditě a mortalitě u dříve léčitelných bakteriálních infekcí. Tato situace je alarmující a je třeba ji řešit. Vyvíjí se značné úsilí na objevení nových antibakteriálních látek proti kmenům MRSA, které si vyvinuly rezistenci vůči většině existujících antibiotik. Jednou z možností jsou mastné kyseliny o střední délce řetězce (MCFA). Nicméně nevíme nic o jejich interakci s antibiotiky u *S. aureus*.

Cílem této diplomové práce je zhodnotit interakce mezi oleji obsahujícími nasycené mastné kyseliny o střední délce řetězce, které mají antibakteriální účinky, a standardním antibiotikem (oxacilinem) proti referenčním kmenům *Staphylococcus aureus* a jednomu klinickému izolátu. Použitými oleji byly kokosový (*Cocos nucifera*), palmojádrový (*Elaeis guineensis*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*) a muru-muru (*Astrocaryum murumuru*). Testovanými kmeny *Staphylococcus aureus* byly standardní kmeny ATCC 29213 a ATCC 43300, které představují kmeny na meticilin citlivé a rezistentní, a jeden klinický izolát (SA1) poskytnutý Fakultní nemocnicí v Motole (Praha, ČR). Plynovou chromatografií byly u všech olejů identifikovány koncentrace jednotlivých mastných kyselin v nich obsažených. K aktivaci antibakteriálních účinků olejů bylo třeba jejich štěpení lipázou. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) jednotlivých olejů byly stanoveny mikrodilučním testem v 96-jamkové mikrotitrační destičce. K vyhodnocení kombinačního efektu vybraných naštěpených rostlinných olejů byla použita hodnota frakční inhibiční koncentrace (FIC). Všechny vybrané naštěpené oleje působily v kombinaci s oxacilinem antagonisticky v koncentraci 2048 mg/l, a to u všech vybraných kmenů (citlivých i rezistentních na oxacilin). Některé tak působily i v koncentraci 1024 mg/l.

**Klíčová slova:** inhibice, antibiotika, aditivní účinek, *Staphylococcus*, rostlinné oleje

# The study of interactions between antibiotics and plant oils rich in medium-chain fatty acids

## Abstract

One of the most significant and widespread problems in infectious disease treatment is the development of resistance to chemotherapeutics. It is disturbing that bacteria resistant to important drugs appear. Typical example is methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) or vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* that become common in hospitals, leading to very significant morbidity and mortality in previously curable bacterial infections. This situation is alarming and needs to be addressed. Considerable efforts are being made to discover new antibacterial agents against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains that have developed resistance to most existing antibiotics. One of the options are medium-chained fatty acids (MCFA). Nothing is known, however, about their interactions with antibiotics in case of *S. aureus*.

The objective of this diploma thesis was to evaluate the interactions between medium chain saturated fatty acids, which have antibacterial activity, and the standard antibiotic (oxacillin) against the reference strains of *Staphylococcus aureus* and one clinical isolate. The oils used were coconut (*Cocos nucifera*), palm kernel (*Elaeis guineensis*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*) and muru-muru (*Astrocaryum murumuru*). Tested strains of *Staphylococcus aureus* were strains ATCC 29213 and ATCC 43300, which are representing methicillin sensitive and resistant strains, and one clinical isolate (SA1) provided by the Motol University Hospital (Prague, Czech Republic). The fatty acids profile of each oil was determined by the gas chromatography. Activation of antibacterial effects of oils required lipase cleavage. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of individual oils were determined by microdilution assay in a 96-well microtiter plate. To evaluate the combinatory effect of selected cleaved vegetable oils, the fractional inhibitory concentration (FIC) value was used. All selected cleaved oils combined with oxacillin acted antagonistically at concentration 2048 mg/l for all chosen strains (sensitive and resistant to oxacillin). Some had the same results at concentration 1024 mg/l.

**Keywords:** inhibition, antibiotics, additive effect, *Staphylococcus*, plant oils

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>10</b>
<b>2 Cíl práce a metodika .....</b>	<b>11</b>
2.1 Cíl práce .....	11
2.2 Metodika .....	11
<b>3 Teoretická východiska .....</b>	<b>12</b>
3.1 Rostlinné oleje s obsahem mastných kyselin o střední délce řetězce .....	12
3.1.1 Mastné kyseliny o střední délce řetězce .....	12
3.1.2 Nejvýznamnější zástupci rostlinných olejů obsahujících MCFA.....	13
3.1.2.1 Kokosový olej.....	13
3.1.2.2 Palmový a palmojádrový olej .....	14
3.1.2.3 Tucuma olej .....	15
3.1.2.4 Muru-muru olej .....	16
3.1.3 Další rostlinné oleje obsahující MCFA .....	17
3.1.4 Čisté MCT oleje.....	17
3.1.5 Antibakteriální účinky .....	17
3.1.5.1 Antibakteriální účinky na biofilmech .....	21
3.1.6 Role ve výživě člověka .....	22
3.1.6.1 Absorpce ve střevě .....	22
3.1.6.2 Buněčná manipulace s MCFA v játrech a jiných orgánech .....	23
3.1.6.3 Mimojaterní ukládání MCFA .....	23
3.1.6.4 Vliv MCT na zdraví.....	24
3.2 <i>Staphylococcus</i> spp. ....	30
3.2.1 Charakteristika .....	30
3.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> a jeho patogenita .....	31
3.3 Antibiotika a antibiotická léčba .....	32
3.3.1 Úvod.....	32
3.3.2 Historie.....	32
3.3.3 Rozdělení antibiotik a mechanismy účinku .....	35
3.3.4 Hlavní skupiny antibiotik dle chemické struktury .....	37
3.3.5 Negativní dopady léčby antibiotiky .....	40
3.3.5.1 Ekologická perspektiva .....	40
3.3.5.2 Účinky antibiotik na mikrobiom jako celek .....	41
3.3.5.3 Zásobník antibiotické rezistence mikrobiomu.....	42

3.3.6	Rezistence .....	44
3.3.6.1	Základní mechanismy rezistence.....	46
3.3.7	Biofilmy .....	47
3.4	Interakce mezi antibakteriálními látkami.....	47
3.4.1	Hodnocení různých typů interakcí .....	48
3.4.1.1	Frakční inhibiční koncentrace (FIC) .....	48
<b>4</b>	<b>Vlastní práce .....</b>	<b>50</b>
4.1	Materiál a metody .....	50
4.1.1	Testované látky .....	50
4.1.2	Bakteriální kmeny a kultivační podmínky.....	50
4.1.3	Stanovení profilu zastoupení MK v testovaných olejích.....	51
4.1.4	Stanovení minimálních inhibičních koncentrací testovaných látek a hodnocení kombinačního účinku testovaných látek sachovnicovou metodou.....	51
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>54</b>
5.1	Plynová chromatografie použitých olejů .....	54
5.2	Kombinační efekt vybraných olejů s oxacilinem.....	55
<b>6</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použitých zdrojů .....</b>	<b>61</b>

## Seznam použitých zkratek

<b>ATCC</b>	– Americká sbírka typových kultur
<b>FIC</b>	– frakční inhibiční koncentrace
<b>MCTs</b>	– triglyceridy obsahující mastné kyseliny se střední délkou řetězce
<b>LCTs</b>	– triglyceridy obsahující mastné kyseliny s dlouhou délkou řetězce
<b>MCFAs</b>	– mastné kyseliny se střední délkou řetězce
<b>LCFAs</b>	– mastné kyseliny s dlouhou délkou řetězce
<b>TAG</b>	– triacylglyceridy
<b>FFAs</b>	– volné mastné kyseliny
<b>FA</b>	– mastná kyselina
<b>MSSA</b>	– meticilin senzitivní <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>MRSA</b>	– meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>MIC</b>	– minimální inhibiční koncentrace
<b>TSST-1</b>	– toxin toxického šoku
<b>TSS</b>	– syndrom toxického šoku
<b>GML</b>	– glycerol monolaurát
<b>GEH</b>	– glycerol ester hydroláza
<b>CoA</b>	– koenzym A
<b>FAT</b>	– translokáza mastných kyselin
<b>VLDL</b>	– lipoprotein s velmi nízkou hustotou
<b>HDL</b>	– lipoprotein s vysokou hustotou
<b>LDL</b>	– lipoprotein s nízkou hustotou
<b>ApoB</b>	– Apolipoprotein B
<b>SFA</b>	– nasycené mastné kyseliny
<b>MUFA</b>	– monoenoové mastné kyseliny
<b>PUFA</b>	– polyenoové mastné kyseliny
<b>BMI</b>	– body mass index
<b>VLCD</b>	– dieta s velmi nízkým obsahem kalorií
<b>IL</b>	– interleukin
<b>CDC</b>	– The Centers for Disease Control and Prevention
<b>DNA</b>	– deoxyribonukleová kyselina
<b>RNA</b>	– ribonukleová kyselina



- ESKAPE** – zkratka pro patogeny *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter*
- VRE** – enterokoci rezistentní na vankomycin
- MDR** – rezistentní na vícero léčiv
- DMSO** – dimethylsulfoxid
- MHB** – Mueller-Hintonův bujón
- MK** – mastná kyselina

# 1 Úvod

Masivní užívání antibiotik vede ke zvýšenému selekčnímu tlaku na rozvoj rezistentních kmenů bakterií, které se poměrně úspěšně šíří a dramaticky komplikují antibiotickou terapii. Z toho důvodu se kromě uvážlivého přístupu k užívání antibiotik hledají i jejich alternativy, popř. jejich kombinace. Kombinací s jinými antibakteriálními látkami by se mohlo významně snížit nezbytně nutné množství použitého antibiotika a současně zvýšit jeho účinnost u kmenů na něj rezistentních, jelikož tyto látky často působí odlišnými mechanismy.

Ve své práci jsem se zaměřil na kombinaci standardního antibiotika (oxacilinu) a olejů s obsahem mastných kyselin o středně délce řetězce, u kterých již byla prokázána antibakteriální aktivita, jsou velmi dobře stravitelné i pro osoby s onemocněními trávicí soustavy, a které jsou často dostupné či běžně konzumované i v zemích s nedostatečnou zdravotní pomocí.

## 2 Cíl práce a metodika

### 2.1 Cíl práce

Stanovit minimální inhibiční koncentrace olejů s obsahem mastných kyselin o střední délce řetězce pro vybrané kmeny *Staphylococcus aureus*. Stanovit minimální inhibiční koncentrace antibiotik používaných pro léčbu stafylokokových infekcí u člověka. Analyzovat interakce mezi výše zmíněnými látkami.

#### **Hypotéza:**

Oleje s obsahem mastných kyselin se středním uhlíkovým řetězcem, v kombinaci s antibiotiky, se budou ve svých vlastnostech ovlivňovat. To se projeví jejich interakcemi (synergie, aditivní účinek, nebo antagonismus).

### 2.2 Metodika

Antibakteriální účinky rostlinných olejů a antibiotik budou testovány *in vitro* (mikrodiluční stanovení minimálních inhibičních koncentrací). Jako cílový mikroorganismus bude použit *Staphylococcus aureus* (několik kmenů). Na základě zjištěných inhibičních vlastností bude stanovena případná interakce. Synergie, aditivní účinek, nebo antagonismus bude vyjádřen pomocí frakční inhibiční koncentrace (FIC).

## 3 Teoretická východiska

### 3.1 Rostlinné oleje s obsahem mastných kyselin o střední délce řetězce

#### 3.1.1 Mastné kyseliny o střední délce řetězce

Mastné kyseliny se střední délkou řetězce je označení pro nasycené mastné kyseliny s 6 až 10 atomy uhlíku. Do této skupiny řadíme kyselinu hexanovou (C6:0, běžný název kyselina kapronová), oktanovou (C8:0, běžný název kyselina kaprylová) a dekanovou (C10:0, běžný název kyselina kaprinová). Někdy je do této skupiny řazena i kyselina dodekanová (C12:0, běžný název kyselina laurová), která je hlavní mastnou kyselinou např. v kokosovém oleji (Marten et al., 2006). Kyselina laurová může být řazena buď mezi mastné kyseliny se střední délkou řetězce (MCFA), nebo s řetězcem dlouhým (LCFA). Z hlediska trávení a metabolismu se však chová více jako LCFA, protože její většina (70-75 %) je absorbována chylomikrony (Denke et Grundy, 1992), v porovnání s 95 % MCFA, které jsou absorbovány přímo do vrátnicové žíly, kde jsou vázány převážně na albumin a transportovány do jater (Swift et al, 1990).

Ve srovnání s triglyceridy obsahujícími hlavně LCFA mají triglyceridy obsahující MCFA nižší bod tání, menší molekulovou velikost, jsou kapalné při pokojové teplotě a mají menší energetickou hustotu (8,4 vs. 9,2 kcal\*g<sup>-1</sup>). Tyto odlišné chemické a fyzikální vlastnosti ovlivňují způsob, jakým jsou MCFA absorbovány a metabolizovány. MCFA jsou ve vodě rozpustnější než LCFA a jsou solubilizovány/rozpuštěny ve vodné fázi střevních obsahů bez tvorby micel, a proto se absorbují rychleji (Marten et al., 2006). MCFA jsou také slabé elektrolyty a při neutrální pH jsou vysoce ionizovány, což dále zvyšuje jejich rozpustnost. Tento výrazný rozdíl v rozpustnosti se vyskytuje u řetězců délky C:10 a méně, což vylučuje kyselinu laurovou (Eyres et al., 2016).

Pokud mastné kyseliny tvoří triglyceridy, můžeme i je rozdělit na ty se středně dlouhými řetězci (MCT) nebo na ty s řetězci dlouhými (LCT). MCT mají celkový počet uhlíků C24:0 až C30:0. Pouze 4 % triglyceridů v kokosovém oleji má tuto délku. Triglyceridy obsahující kyselinu laurovou mají vyšší molekulovou hmotnost a jsou metabolizovány odlišně než triglyceridy s nižší molekulovou hmotností, které obsahují pouze řetězce C8:0 a C10:0. Průměrná molekulová hmotnost triglyceridů v kokosovém oleji je 638, zatímco u olejů s triglyceridy obsahující MCFA je tato průměrná molekulová hmotnost 512. Nižší molekulová hmotnost triglyceridů s MCFA usnadňuje působení

pankreatické lipázy. V důsledku toho jsou triglyceridy s MCFA hydrolyzovány rychleji a úplněji než triglyceridy s řetězci delšími (Bach et Babayan, 1992).

### **3.1.2 Nejvýznamnější zástupci rostlinných olejů obsahujících MCFA**

#### **3.1.2.1 Kokosový olej**

Kokosový olej je tropický olej extrahovaný z kopry (sušené vnitřní části kokosového ořechu, Obr. 1) kokosovníku ořechoplodého (*Cocos nucifera*), palmy z čeledi arekovité (*Areaceae*). Obvyklý komerční produkt je většinou rafinovaný, bělený a deodorizovaný, nicméně v poslední době se vlivem zdravého způsobu stravování dostává stále více do popředí panenský (nerafinovaný) kokosový olej (Eyres et al., 2016). K tepelné úpravě se využívá především v jižních částech Indie a dalších zemí jihovýchodní Asie (Srivastava et al., 2010).

Výroba kokosového oleje se celosvětově zvyšuje. V roce 2010 ho bylo vyrobeno 3,5 milionu tun, přičemž hlavními producenty byly Filipíny (1,7 milionu tun), Indonésie (0,7 milionu tun) a Indie (0,5 milionu tun). V roce 2010 byla ve Spojených státech hlášena spotřeba 0,4 milionu tun, s průměrnou spotřebou 1,28 kg na obyvatele za rok. V Evropské unii to bylo 0,6 milionu tun, s podobnou průměrnou spotřebou 1,3 kg na jednoho obyvatele za rok (Eyres et al., 2016).

Kokosový olej obsahuje převážně TAG s MCFA s celkovým zastoupením 86,5 % SFA (kyselina laurová (C12:0) tvoří až 50 % obsahu MK), 5,8 % MUFA a 1,8 % PUFA. Jednou z výhod kokosového oleje je jeho odolnost vůči oxidaci a polymeraci, což z něj činí stabilní olej pro tepelnou úpravu (Eyres et al., 2016). Nedoporučuje se ale samozřejmě pro smažení, které je samo o sobě značně rizikovou tepelnou úpravou. Kokosový olej má nízký kouřový bod a může tedy dojít k jeho přepálení a produkci potenciálně karcinogenních či genotoxických látek, jako jsou například polycyklické aromatické uhlovodíky (Srivastava et al., 2010).



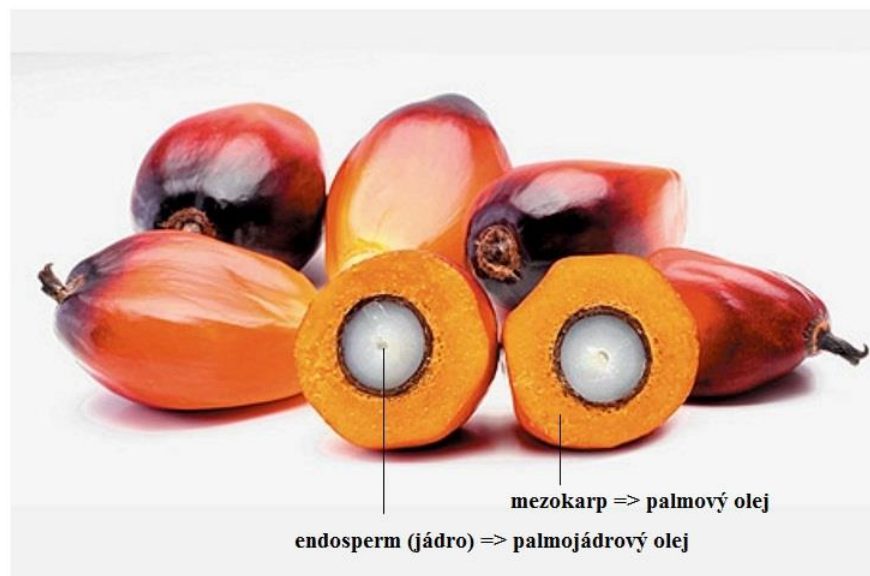
**Obrázek 1: Plod kokosovníku ořechoplodého**

(zdroj obrázku: <http://www.vitarianstvi.cz/kokosovy-orech-2650/>)

### 3.1.2.2 Palmový a palmojádrový olej

Palma olejná (*Elaeis guineensis*) poskytuje dva oleje s velkým ekonomickým významem, obvykle označované jako palmový olej a olej z palmových jader (palmojádrový), extrahované z mezokarpu a endospermu (Obr. 2). Zatímco kyselina laurová převládá v endospermovém oleji, hlavními mastnými kyselinami mezokarpového oleje jsou kyselina palmitová a kyselina olejová. Embryo palmy olejné také ukládá olej, který obsahuje významnou část kyseliny linolové. Tyto tři tkáně vykazují vysokou variabilitu olejů při zralosti (Dussert et al., 2013).

Ovoce palmy olejné (*Elaeis guineensis*) je peckovice s tlustým, masitým mezokarpem obklopujícím vytvrzený endokarp, který obsahuje velké semeno tvořené bohatým endospermem a malým embryem. Mezokarp a endosperm palmy olejné jsou dobře známy kvůli jejich výjimečně vysokému obsahu oleje (přibližně 85 % a 50 % suché hmotnosti). Složení mastných kyselin palmového oleje a oleje z palmových jader se výrazně liší. Zatímco mastné kyseliny o střední délce řetězce (MCFA, C8:0-C12:0) převládají v endospermu, hlavními mastnými kyselinami mezokarpového oleje jsou kyselina palmitová (16:0) a kyselina olejová (18:1) (Dussert et al., 2013).



**Obrázek 2: Příčný řez plodem palmy olejně**

(zdroj obrázku: <https://www.seeds-gallery.shop/en/home/african-oil-palm-seeds-elaeis-guineensis.html>)

### 3.1.2.3 Tucuma olej

Palma tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) se nachází v degradovaných prostředích mezi sekundární vegetací v centrálním a západním amazonském ekosystému. Její ovoce je široce konzumováno amazonskou populací v přírodní formě v sendvičích a tapiocce, dezertech a zmrzlině. Indové aplikují olej extrahovaný z dřene/dužiny ovoce a semen na tělo a vlasy (Maia et al., 2014).

Tucumã má hladkou kůru s epikarpem a mezokarpem, která se může velmi lišit v barvě (žlutá až tmavě oranžová a červená nebo bělavá), tvaru (oválný, kulovitý), tloušťce mezokarpu (2,8 až 10 mm), endokarpu a typu semen. Konzistence plodů je slizovitá a mastná, s charakteristickou sladkou chutí. Hmotnost se pohybuje od 20 do 100 g, z čehož 22,4 % je jedlá část (Maia et al., 2014). Pokud jde o nutriční složení, vyniká vysokým obsahem vlákniny. Navíc některé druhy ovoce téhož rodu obsahují nenasycené mastné kyseliny (Ferreira et al., 2008).



**Obrázek 3: Příčný řez plodem palmy Tucuma**

(zdroj obrázku: <https://www.amazon.com/Unrefined-Virgin-Wild-Harvested-Organic-Tucuma/dp/B00D3FMB2O?th=1>)

#### 3.1.2.4 Muru-muru olej

Murumuru (*Astrocaryum murumuru* var. *Murumuru* Mart.) je typická amazonská palma s vizuálně přitažlivým a bujným vzrůstem a může dosahovat výšky až 10 m. Vlákňité vlastnosti listů a stonku a jeho jedlého palmového oleje a palmetto jsou mezi amazonskými komunitami dobře známy, ačkoli komerčně jsou málo využívány, pravděpodobně kvůli četným trnům, které znesnadňují manipulaci (de Menezes et al., 2016).

V současné době existují na trhu kosmetické výrobky, které používají oleje extrahované z plodů. Když plod dozraje, celé ovoce padá na zem, představující důležitý zdroj potravy pro místní faunu. Plody jsou složeny z dužiny a ořechu. Ten obsahuje asi 50 % bílého tuku bez zápachu a bez chuti, s výhodou, že lehce nežlukne a je bohatý na nasycené MCFA, jako je kyselina laurová (de Menezes et al., 2016). Ořech (Obr. 4) obsahuje 40 - 42 % bílého tuku. Hlavní mastné kyseliny tvořící tento tuk jsou kyselina kaprylová (1,1 %), kyselina kaprinová (1,1 %), kyselina laurová (48,6 %), kyselina myristová (30,0 %), kyselina palmitová (6,8 %), kyselina stearová (2,5 %), kyselina olejová (6,7 %) a kyselina linolová (3,0 %) (Lima et al., 2017).





**Obrázek 4: Příčný řez plodem palmy Murumuru (zdroj obrázku: <https://rainforestchica.com/products/murumuru-butter>)**

### **3.1.3 Další rostlinné oleje obsahující MCFA**

Mezi další zástupce olejů obsahující MCFA řadíme Palmový červený olej, Cuphea či Babassu olej.

### **3.1.4 Čisté MCT oleje**

Tzv. MCT oleje se nejčastěji vyrábí hydrolyzou kokosového nebo palmojádrového oleje, filtrací MCFA a následnou reesterifikací. Tyto MCT oleje obsahují téměř výlučně kyselinu oktanovou (kaprylovou) a kyselinu dekanovou (kaprinovou) v poměru od 50:50 do 80:20 (Bach et Babayan, 1982).

### **3.1.5 Antibakteriální účinky**

Antimikrobiální vlastnosti volných mastných kyselin (FFA) jsou známé již mnoho let (Conley et Kabara, 1973, Kabara et al., 1972). Mají širokospektrální aktivitu proti grampozitivním bakteriím, včetně *S. aureus* (Conley et Kabara, 1973, Kabara et al., 1972), gramnegativním bakteriím jako jsou *Neisseria gonorrhoeae* a *Helicobacter pylori* (Bergsson et al., 2002, Bergsson et al., 1999), *Chlamydia trachomatis* (Bergsson et al., 1998), zapouzdřeným virům (Thormar et al., 1987) a *Candida albicans* (Bergsson et al., 2001). Mastné kyseliny a jejich monoglyceridy se ve zvířecím modelu ukázaly jako účinné vaginální mikrobicidy (Neyts et al., 2000, Thormar et al., 1999). Mastné kyseliny a jejich

monoglyceridy, které se běžně vyskytují v přírodních produktech, jsou považovány za netoxické. Přispívají k antimikrobiálním vlastnostem mateřského mléka (Thormar et al., 1987) a kůže (Miller et al., 1988). Úřad pro potraviny a léčiva uvedl monoestery mastných kyselin jako obecně uznávané za bezpečné. Antistafylokoková aktivita a minimální toxicita mastných kyselin činí tyto formulace potenciálními alternativami k mupirocinu pro nazální dekolonizaci *S. aureus*, protože vzhledem k vznikající rezistenci na mupirocin u *S. aureus* je potřeba dalších alternativ (Rouse et al., 2005).

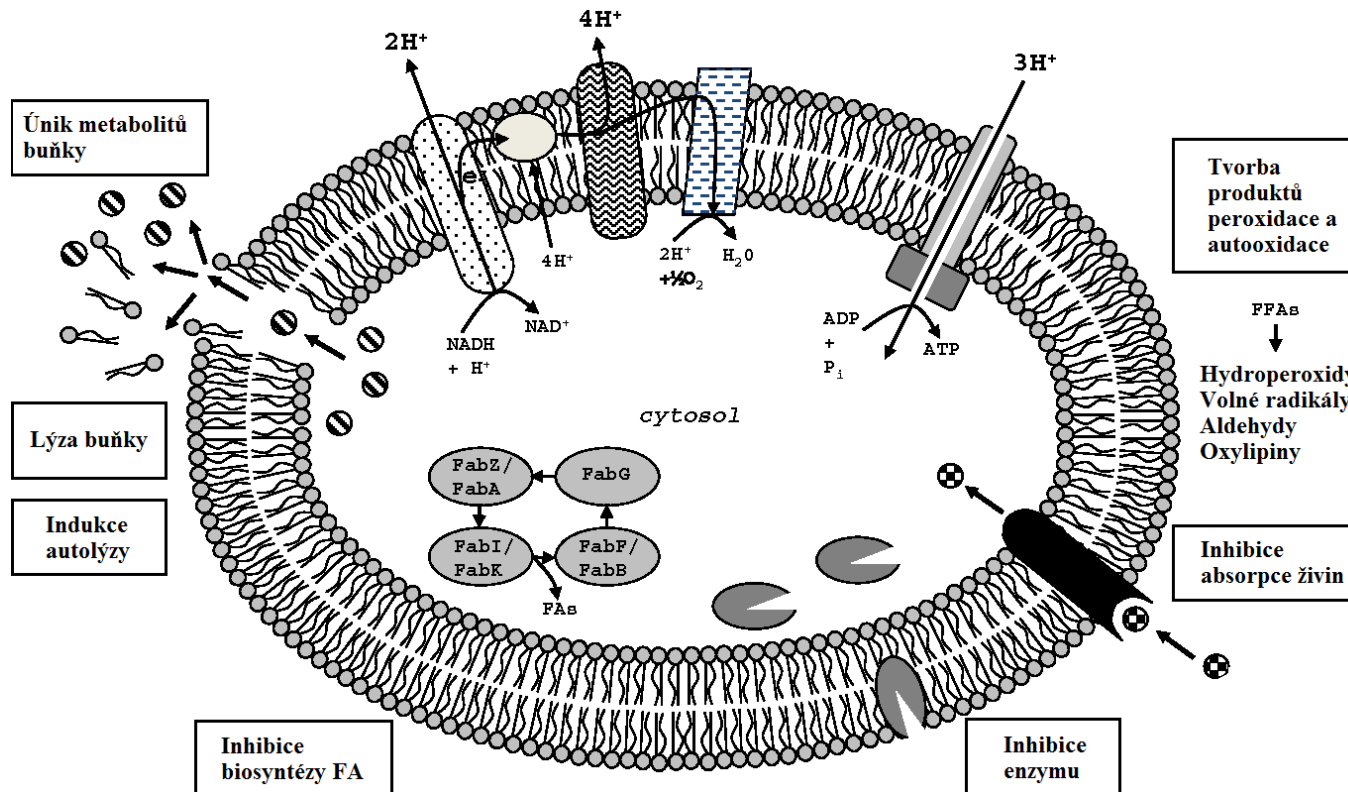
Zatímco způsob jejich antibakteriálního působení není stále ještě úplně objasněn, primárním cílem působení FFA je buněčná membrána, kde FFA narušují transportní řetězec elektronů a oxidační fosforylaci. Vedle interference s produkcí buněčné energie mohou být účinky FFA výsledkem inhibice enzymatické aktivity, zhoršené absorpce živin, tvorby degradačních produktů peroxidace a autooxidace nebo přímé lýzy bakteriálních buněk (Obr. 5, Desbois et Smith, 2010).

#### Narušení řetězce přenosu elektronů:

- přímou vazbou na přenašeče elektronů
- vložením mezi přenašeče zabraňující jim v interakci
- úplným vytlačáním přenašečů z membrány
- zabráněním interakce přenašečů snížením fluidity membrány

#### Interference s oxidační fosforylací:

- zabráněním správnému fungování ATP syntázy
- přímou vazbou nebo úplným vytlačáním z membrány
- snížením protonového gradientu/membránového potenciálu zvýšením propustnosti membrány pro protony nebo FFAs disociujících proton uvnitř buňky a následně navracející se do extracelulárního prostoru



Obrázek 5: Schématické znázornění možných buněčných cílů a mechanismů antibakteriálního působení volných mastných kyselin (FFA) (přpracováno podle Desbois et Smith, 2010)

Přípravky s monoestery kyseliny laurové (LAM) vykazují aktivitu proti *S. aureus*. MIC přípravků obsahujících monoestery kyseliny laurové (1 - 3%) byly hned ve dvou pracích podobné (Holland et al., 1994, Rouse et al., 2005). Holland et al. (1994) uvádějí MIC<sub>90</sub> 15 µg/ml a rozsah 10 až 20 µg/ml u 29 izolátů *S. aureus*. Rouse et al. (2005) uvádějí MIC<sub>90</sub> 1 - 4 µg/ml u 18 unikátních meticilin senzitivních kmenů *S. aureus* (MSSA) a 17 unikátních MRSA. MIC byly podobné jak pro MRSA, tak pro MSSA.

Přípravky s LAM, které byly výše studovány, jsou lipofilní surfaktanty/emulgátory. Jejich přesný mechanismus účinku není znám, ale pravděpodobně zahrnuje účinky na obal bakteriální buňky a/nebo indukci aktivity autolyzinu a inhibici syntézy proteinů (Rouse et al., 2005). Například Bergsson et al. (2001) ukázali, že *S. aureus* je usmrcován mastnými kyselinami, a zejména monokaprinem, rozpadem buněčné membrány, přičemž buněčná stěna zůstává nedotčená. Ved et al. (1984a, 1984b) ukázali, že dodecylglycerol inhibuje syntézu peptidoglykanu a stimuluje proteinázu, která aktivuje enzym degradující peptidoglykan - autolyzin. Několik vědců uvádí účinky na syntézu toxinů. Například Schlievert et al. (1992) ukázali, že tvorba hemolyzinu, toxinu toxického šoku (TSST-1 – Toxic Shock Syndrome Toxin-1) a exfoliativního toxinu A u *S. aureus* byla inhibována při koncentracích glycerol monolaurátu (GML) pod koncentracemi nezbytnými pro inhibici růstu. Mechanistické studie prováděné Projanem et al. (1994) ukázaly, že monolaurát glycerolu inhibuje syntézu stafylokokových toxinů (a dalších exoproteinů) na úrovni transkripce interferencí se signálovou transdukcí. Interference se signálovou transdukcí byla také prokázána u jiných rodů; Rusin et Novick (1998) prokázali, že GML potlačuje růst *Enterococcus faecalis* rezistentního na vankomycin v přítomnosti vankomycinu a blokuje indukci rezistence k vankomycinu, který zahrnuje s membránou spojený mechanismus transdukce buď v, nebo před zahájením transkripce (Rouse et al., 2005).

Schlievert et Peterson (2012) zkoumali antibakteriální aktivitu GML a porovnávali ji i s kyselinou laurovou. V dřívější práci prokázali, že β-hemolytické streptokoky bez glycerol ester hydrolázy (GEH) vykazují větší náchylnost ke GML než *Staphylococcus aureus*, který produkuje GEH (Schlievert et al., 1992). To naznačuje, že GML má větší antibakteriální účinnost než kyselina laurová, která s glycerolem tvoří dva hlavní produkty štěpení GML. Nicméně publikace Ruzin et Novicky (2000) naznačuje, že schopnost GML inhibovat produkci exotoxinu *Staphylococcus aureus* je ekvivalentní inhibici produkce exotoxinu kyselinou laurovou. Porovnávali tedy GML a kyselinu laurovou pro jejich

antibakteriální aktivitu a schopnost inhibovat produkci exotoxinu v koncentracích, které neinhibují růst bakterií (Schlievert et Peterson, 2012). GML působil baktericidně při 200násobně nižších koncentracích než kyselina laurová při testování na *Staphylococcus aureus* MN8, typickém kmeni syndromu menstruačního toxického šoku (TSS). GML působil baktericidně, definováno v této studii jako  $\geq 3$  log redukce CFU/ml vzhledem k počátečnímu inokulu, při 0,25 mM, zatímco kyselina laurová byla baktericidní při 50 mM. Když byly GML a kyselina laurová testovány proti kmenu *Streptococcus pyogenes* (kmen T253curedT12), organismu, který postrádá GEH, GML vykazoval pětikrát (0,05 mM) větší baktericidní aktivitu než při testování proti *Staphylococcus aureus* MN8. Na rozdíl od toho neexistoval žádný rozdíl v baktericidní účinnosti kyseliny laurové pro *Streptococcus pyogenes* nebo *Staphylococcus aureus* MN8 (Schlievert et Peterson, 2012). Předběžné ošetření GML (1000 ug/0,4 ml Todd Hewitt bujónu) s 0,1 sterilní kultivační tekutinou ve stacionární fázi ze *Staphylococcus aureus* MN8 přes noc při 37 °C eliminovalo jeho antibakteriální účinnost proti *Staphylococcus aureus* MN8, zatímco srovnatelné ošetření se *Streptococcus pyogenes* neredukovalo antimikrobiální aktivitu GML (Schlievert et Peterson, 2012). Jak GML, tak kyselina laurová významně inhibovaly produkci superantigenů *Staphylococcus aureus* MN8 a *Streptococcus pyogenes* při inhibičních koncentracích, které nezabraňovaly růstu. Avšak koncentrace GML, která byla potřebná pro inhibici produkce exotoxinu bez inhibice růstu, byla u obou organismů nižší než u kyseliny laurové (Schlievert et Peterson, 2012).

#### 3.1.5.1 Antibakteriální účinky na biofilmech

Antibakteriálnímu účinku GML v biofilmech bylo věnováno jen málo pozornosti. Za použití *in vitro* modelu biofilmů ze *S. aureus* zkoumali Hess et al. (2014) antibakteriální účinek samotného GML stejně jako schopnost GML působit synergicky se specifickými antibiotiky. Protože měli vizuální důkaz, že lipid může být součástí matrice biofilmů *S. aureus* (Hess et al., 2012), je pravděpodobné, že role GML jako povrchově aktivní látky by mohla usnadnit penetraci matrice a existují důkazy o tom, že rhamnolipidy a biosurfaktanty rostlin mají antibiofilmní účinky (Quinn et al., 2013). Jejich pozorování toto tvrzení potvrzují (Hess et al., 2014). Dále údaje z této studie ukázaly, že baktericidní účinky GML a kyseliny laurové byly srovnatelné na molárním základě. Zjistili však, že tvořící se biofilmy *S. aureus* (spíše než předem vytvořené) byly 10násobně náchylnější ke

GML. Jiní autoři (Schlievert et Peterson, 2012) uváděli, že GML má větší baktericidní aktivitu pro planktonické buňky než kyselina laurová, že GML je účinnější na molárním základě než kyselina laurová při inhibici produkce TSST-1, a že 500 µg/ml GML eliminuje detekovatelný růst biofilmů kultivovaných na tamponových vláknech. Za použití planktonických buněk zaznamenali Ruzin et Novick (2000) podobné inhibiční účinky GML a kyseliny laurové na stafylokokové exoproteiny, což naznačuje, že kyselina laurová může být odpovědná za inhibiční účinky GML. Relativní aktivita GML a kyseliny laurové je tedy pravděpodobně závislá na modelu (Hess et al., 2014).

Studie Hess et al. (2014) je první, která zkoumala možnou synergii mezi GML a aminoglykosidy v biofilmovém modelu. Byl zde zaznamenán aditivní baktericidní účinek, když se GML nebo kyselina laurová kombinovala s GEN, tj. 1 µg/ml GEN eliminoval všechny detekovatelné biofilmové bakterie v kombinaci s 0,3 až 0,5 mM GML nebo kyselinou laurovou. Tento výsledek je pozoruhodný vzhledem k tomu, že 0,35 mM GML je ekvivalentní 100 µg/ml a v dalších studiích zahrnujících planktonické buňky byla MIC GML uváděna  $\geq 10$  µg/ml (Schlievert et al., 1992, Schlievert et Peterson, 2012, Holland et al., 1994).

### **3.1.6 Role ve výživě člověka**

Existuje obrovský počet studií, které se zabývají úlohou MCFA, stejně jako řada reviews. Většina pozornosti je směřována na potenciální roli MCFA při regulaci hmotnosti a léčbě metabolického syndromu. Je hned několik aspektů metabolismu MCFA, které ovlivňují příznaky metabolického syndromu. Ty zahrnují hladiny lipidů v plazmě, inzulinovou rezistenci, zánětlivou odezvu a regulaci tělesné hmotnosti.

#### **3.1.6.1 Absorpce ve střevě**

Intraluminální hydrolýza MCT je rychlejší a účinnější než hydrolýza LCT. Stejně tak je absorpce MCFA rychlejší a účinnější než u LCFA. MCFA stimulují sekreci cholecystokininu, sekreci žlučových fosfolipidů a cholesterolu méně než LCFA. V případě nedostatku pankreatické lipázy nebo žlučové soli mohou být MCFA stále absorbovány, na rozdíl od LCFA (Bach et Babayan, 1982).

Většina absorbovaných MCFA je transportována portální žilou do jater, zatímco LCFA jsou začleněny do chylomikronových triglyceridů a dostávají se do oběhu lymfatickým systémem (Bach et Babayan, 1982). Podíl MCFA v chylomikronech se

zvyšuje s rostoucí délkou řetězce a s jejich chronickým podáváním. Současné podávání MCT a LCT zvyšuje výskyt MCFA v chylomikronech (Marten et al., 2006).

#### 3.1.6.2 Buněčná manipulace s MCFA v játrech a jiných orgánech

V hepatocytech i v jiných buňkách je esterifikace MCFA omezena. MCFA mají tedy vysoký sklon k oxidaci a zdá se, že se chovají víc jako glukóza než tuk. Na rozdíl od LCFA, MCFA nevyžadují karnitin palmitoyltransferázu (CPT) pro intramitochondriální transport. MCFA snadno procházejí mitochondriální membránou, aktivují se intramitochondriálně pomocí acyl-CoA syntetáz se středním řetězcem a rychle se oxidují (Marten et al., 2006). V důsledku toho je oxidace MCFA vyšší než u LCFA, a to jak u hlodavců (Crozier, 1988, Noguchi et al., 2002), tak u lidí (St Onge et al., 2003). K oxidaci mastných kyselin je zapotřebí dostatku oxalacetátu, aby se zvýšil příliv acetyl-CoA do cyklu kyseliny trikarboxylové. Nadměrná dodávka acetyl-CoA vede ke zvýšené produkci ketonových tělísek, jak se tomu děje u MCFA ve srovnání s LCFA. Souběžně se zvýšenou oxidací MCFA byla pozorována zvýšená jaterní lipogeneze vlivem zvýšené *de novo* syntézy mastných kyselin a zvýšená elongace mastných kyselin po konzumaci vysokých dávek MCT v dietě (> 38 % hmotnosti). Zvýšená cytosolová koncentrace malonylového CoA reguluje aktivitu CPT1 a vede tak ke snížení intramitochondriálního transportu a oxidace LCFA, zatímco MCFA obcházejí tento transportní proces (Marten et al., 2006).

Ve srovnání s LCFA nevyžadují MCFA vazbu na protein vázající mastnou kyselinu, transportní bílkoviny mastných kyselin nebo translokázu mastných kyselin (FAT).

#### 3.1.6.3 Mimojaterní ukládání MCFA

Menší podíl MCFA, který obchází játra, je distribuován do periferní tkáně prostřednictvím obecné cirkulace (Bach & Babayan, 1982). Přestože se předpokládá, že požitá MCFA jsou především oxidována v játrech, ukázalo se, že MCFA jsou rovněž začleňovány do triglyceridů tukové tkáně hlodavců (Han et al., 2003), mohou ovlivňovat tukovou tkáň a následně tedy i systémovou funkci podstatně více než se dříve předpokládalo. Myši 3T3-L1 preadipocyty vystavené kyselině oktanové nahromadily méně tuku a nevyvolaly diferenciaci buněk ve srovnání s kyselinou olejovou (Guo et al., 2000).

Když byly 3T3-L1 a lidské adipocyty vystaveny kyselině oktanové, nahromadily méně tuku a vykazovaly sníženou adipogenezi ve srovnání s buňkami vystavenými LCFA (Guo et al., 2003, Han et al., 2002).

Navíc, ve srovnání s dietou LCT, 2 měsíční podávání MCT snížilo tukovou hmotu u potkanů, zřejmě prostřednictvím regulace adipogenních genů a transkripčního faktoru PPAR $\gamma$ , kromě zlepšení citlivosti na inzulin a tolerance glukózy (Han et Al., 2003). Snížená akumulace tuku v adipocytech může být důsledkem preferenční lipolýzy MCFA uložených v poloze sn-1,3 triacylglycerolů tukové tkáně (Guo et al., 2000). Vzhledem k tomu, že MCFA jsou při fyziologickém pH vysoce ionizovány, jsou mnohem rozpustnější ve vodných biologických tekutinách ve srovnání s LCFA a mohou se rychleji vzdalovat od tukových kapének, aby se snížila produktová inhibice hormon senzitivní lipázy (Marten et al., 2006).

#### 3.1.6.4 Vliv MCT na zdraví

##### 3.1.6.4.1 Plazmatické lipidy nalačno

Sérové lipidy jsou vylučovány do oběhu ze střeva jako chylomikrony a z jater jako lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDL). Oba lipoproteiny nesou jednu molekulu apolipoproteinu (apo) B48 nebo B100. LCFA stejně jako kyselina olejová obecně stimulují sekreci a současně zvyšují intracelulární triglyceridy. Nicméně kyselina oktanová (Sato et al., 2005, Tachibana et al., 2002), kyselina dekanová a dodekanová (Sato et al., 2005) stimulovaly v kultivovaných hepatocytech sekreci apoB, triglyceridů a cholesterolu méně než kyselina palmitová (C16:0). Současně byla kyselinou dekanovou a dodekanovou redukována intracelulární exprese mRNA apoB a nedošlo k akumulaci intracelulárních triglyceridů. MCFA dokonce oslabují sekreci apoB stimulovanou kyselinou palmitovou (Sato et al., 2005, Tachibana et al., 2002). Sekrece apoB, stejně jako koncentrace jaterních triglyceridů a cholesterolu, byly rovněž nižší v případě kyseliny oktanové v porovnání s kyselinou olejovou (C18:1) nebo kyselinou linolovou (C18:2), pokud byly myším tyto mastné kyseliny podávány jako syntetické triglyceridy (Xie et al., 2002).

Nicméně v mnoha (avšak starších) studiích se zjistilo, že diety obsahující MCT ve srovnání s dietami LCT zvýšily u lidí plazmatický cholesterol nalačno, stejně jako koncentrace triglyceridů. V těchto studiích byly většinou použity LCT ze sóji, kukuřice nebo olivového oleje (Cater et al., 1997, Hill et al., 1989, 1990, Swift et al., 1992,



Tholstrup et al., 2004). Problém však je, že polynenasycené LCFA jsou ve srovnání s nasycenými LFCFA hypocholesterolemické a hypotriglyceridemické (Mensink et al., 2003). Pokud byla dieta bohatá na MCT srovnávána s dietou bohatou na kyselinu dodekanovou, s identickým množstvím MUFA a PUFA, celkový a LDL cholesterol se zvýšil méně u stravy s MCT. MCT-dieta ve srovnání s dietou bohatou na kyselinu dodekanovou rovněž výrazně zvýšila aktivitu LDL receptorů (Tsai et al., 1999). Nicméně diety se syntetickými triglyceridy obsahujícími pouze kyselinu hexanovou nebo oktanovou nezměnily aktivitu LDL receptorů ve srovnání s tristearátů při pokusu na zvířatech (Dietschy et al., 1993).

Všechny tyto experimenty byly prováděny s velmi vysokým množstvím MCT ve stravě a v některých případech byl příjem polynenasycených mastných kyselin v těchto dietách kriticky nízký. Ve dvou studiích zvolili jiný přístup a používali nižší množství MCT. V jednom případě bylo ve standardní stravě (28 % energie z tuku, celkem 2200 kcal za den) podáváno pouze 5 g MCT proti LCT dietě obohacené o MUFA a PUFA (Nosaka et al., 2003). Během 12 týdenní intervence se hladiny cholesterolu a triglyceridů postupně snižovaly v obou experimentálních skupinách, ale poněkud více ve skupině s MCT. VLDL cholesterol byl snížen významně více pomocí MCT-diety. V jiné studii (Krotkiewski, 2001) bylo ve velmi nízkokalorické stravě (VLCD) po dobu 4 týdnů podáváno 10 g MCT nebo nespecifikovaného oleje obsahujícího LCT. I zde oba testované oleje výrazně snížily hladiny celkového cholesterolu a triglyceridů a účinek byl opět výraznější u MCT. Není jasné, zda byl rozdíl mezi skupinami testován na významnost.

Jak bude později zmiňováno v souvislosti s účinkem na redukci hmotnosti, konzumace mírného množství může být významná pro dosažení hypocholesterolemického účinku (a hypotriglyceridemického účinku). Ačkoliv MCFA snižují sekreci triglyceridů při použití v nižších množstvích, jejich konzumace v množství vyšším (nebo dokonce více, než je kalorické potřeba), může zvyšovat *de novo* lipogenezi. To by zvýšilo sekreci triglyceridů a mohlo by zodpovídat za zvýšené hladiny triglyceridů v plazmě nalačno. Jelikož jsou hladiny cholesterolu a triglyceridů regulovány koordinovaně, může být zvýšená sekrece cholesterolu důsledkem zvýšené sekrece triglyceridů, což může v delším časovém horizontu také zvýšit hladinu cholesterolu v plazmě (Marten et al., 2006).

#### 3.1.6.4.2 Postprandiální plazmatické lipidy

Jak bylo uvedeno výše, inhibiční účinek MCFA na sekreci apoB a triglyceridů akutně ovlivní postprandiální odpověď triglyceridů. Hladiny triglyceridů v plazmě se

zvyšují po jídle obsahujícím tuky a vracejí se do výchozího stavu za 6 - 12 hodin. Stupeň postprandiální reakce triglyceridů na jídlo obsahující tuk pozitivně koreluje s rizikem kardiovaskulárních onemocnění a příznaky metabolického syndromu (Karpe, 1999). Dle konvenčních znalostí je tato postprandiální triglyceridová odpověď, obvykle vyjádřená jako plocha pod křivkou (AUC), výraznější u SFA (v porovnání s PUFA). Postprandiální odpověď triglyceridů byla obecně nižší při příjmu MCFA spíše než při příjmu MUFA nebo PUFA LCFA, a to u zvířat (Kalogeris et al., 1996) i u člověka (Asakura et al., 2000, Borel et al., 1998). Tato snížená postprandiální odpověď triglyceridů není jednoduše vysvětlena skutečností, že MCFA nejsou transportovány lymfou. Pokud po jídle obsahující MCT následovalo jídlo obsahující LCT, postprandiální odpověď na druhé jídlo byla neočekávaně výrazná a celková AUC byla přibližně stejná jako u dvou po sobě jdoucích LCT jídel (Borel et al., 1998). Autoři dospěli k závěru, že část MCFA byla dočasně uložena ve sliznici a sekretována až po druhém jídle, a že LCFA jsou nezbytně nutné pro tvorbu chylomikronu. Je však dobré si položit otázku, zda nedostatek LCFA je dostatečným vysvětlením, neboť chylomikronové triglyceridy jsou obecně obohaceny o endogenní LCFA (Lambert et al., 1995).

Není překvapením, že obézní jedinci reagovaly na MCFA lépe než ti hubení a také byla snížena odezva postprandiálního cholesterolu (Kasai et al., 2003). Rozdíl byl hlavně v tom, co autoři nazvaly lipoprotein s nízkou hustotou (LDL), ale co je pravděpodobně aterogenní zbytková frakce. Množství tuku bylo v této studii malé, pouze 10 g sójového a řepkového oleje nebo čistých MCT ve smíšeném tekutém jídle. Postprandiální reakce triglyceridů na mléčný tuk v porovnání s olejem bohatým na PUFA byla v několika studiích stejná nebo dokonce menší (Mekki et al., 2002). Tato oslabená reakce je pravděpodobně způsobena SCFA a MCFA v mléčném tuku. V jedné studii nebyla odezva na stravu obohacenou o MCT odlišná od reakce na smetanové jídlo (Thomas et al., 2001).

#### 3.1.6.4.3 Tělesná hmotnost

Krmení MCT způsobuje u živočichů menší přírůstky hmotnosti v porovnání s izoenergetickými dietami obsahujícími LCT a snížení hmotnosti bylo spojeno se sníženým ukládáním tuků (Baba et al., 1982, Crozier et al., 1987, Geliebter et al., 1983, St Onge, 2003a). Obecně se předpokládá, že ztráta hmotnosti vyvolaná MCT je sekundární efekt při oxidaci MCFA v játrech, což vede ke zvýšení výdajů na energii. Izoenergetické podávání MCT zvyšuje u hlodavců termogenezi ve větší míře než LCT (Bach et Babayan,

1982, Dulloo et al., 1995, Geliebter et al., 1983, Noguchi et al., 2002). Lidé však z dlouhodobého hlediska nemohou konzumovat stravu s tak vysokým obsahem MCT kvůli nedostatku chutnosti a nepříjemným gastrointestinálním a jiným příznakům. V několika studiích byl u lidí energetický výdej po jídlech na bázi MCT rovněž vyšší než u pokrmů na bázi LCT, a to do 6 hodin po jídle (St Onge et al., 2003a) nebo po 24 hodinách (Dulloo et al., 1996). Tento účinek byl závislý na dávce (Dulloo et al., 1996). Vyšší termogeneze byla patrná ještě po 6 dnech přerušování tekutou formou stravy obsahující MCT (Hill et al., 1989), ale po 4 týdnech byla snížena ve srovnání s kontrolní dietou na olivovém oleji (St Onge et al., 2003a). Při porovnávání MCT s hovězím lojem se však po 4 týdnech projevil zvýšený výdej na energii (St Onge, 2003b).

Vyvstává otázka, jak MCTs ovlivňují tělesnou hmotnost a složení těla v delším časovém horizontu. Intervenční studie se prováděly většinou u obézních subjektů s množstvím energie pokrývajícím energetické potřeby. Ve dvou intervenčních studiích na obézních pacientech trvajících 4 týdny, byl podáván vysoký obsah tuku (40 % energie) a MCT (přibližně 80 g denně) (St Onge et al., 2003b, St Onge et al., 2003a). V jednom pokusu byly MCT porovnány s hovězím lojem (St Onge et al., 2003b). V jiném byl porovnán s tzv. funkčním MCT olejem obsahujícím také lněný olej a fytosteroly s olivovým olejem (St Onge et al., 2003a). V obou studiích se úbytek hmotnosti mezi intervenčními skupinami nelišil. V následující studii se však tělesný tuk významně snížil u MCT skupiny (St Onge et al., 2003a). V sérii intervenčních studií z Japonska u obézních subjektů ( $BMI > 23 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ ), z nichž každá trvala 12 týdnů, bylo přijímáno 26 - 27 % energie z tuku a MCT dávka byla přiměřená - buď 10 g na den během snídaně (Tsuji et al., 2001), 5 g na den v margarínu (Nosaka et al., 2003), nebo 1,7 g za den v chlebu (Kasai et al., 2003), oproti směsi řepkového a sójového oleje jako kontroly. Ve všech studiích byla tělesná hmotnost i tělesný tuk významně snížena pomocí stravy s MCT. V delším časovém intervalu nebyl zaznamenán tlumící se účinek. Účinky nebyly významné u subjektů netrpících obezitou, tj. subjektů s  $BMI < 23 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  (Tsuji et al., 2001). Pokud obézní jedinci dostávaly MCT nebo LCT VLCD (dietu s velmi nízkým obsahem kalorií), s 9,9 nebo 8,8 g testovaných tuků na den, což odpovídá 25 % z celkové energie, MCT olej snížil tělesnou hmotnost více než LCT olej pouze během prvních 2 týdnů. Během čtyřtýdenní intervenční doby však podávané MCT podstatně více snížily tělesný tuk a méně svalové hmoty (Krotkiewski, 2001). Takže tyto výsledky nenaznačují, že by vliv

MCT na tělesnou hmotnost a složení těla při dlouhodobější aplikaci ztrácel účinnost. Je pozoruhodné, že takové malé množství MCT za den mělo tak jasný účinek. V dalších studiích bude třeba zjistit, zda to bylo malé množství MCT, poměr MCFA k jiným mastným kyselinám, celkové množství tuku nebo potravinová matrice, do které jsou MCT začleněny, co bylo zodpovědné za tento účinek. Dále je třeba tyto režimy testovat u subjektů s odlišným genetickým zázemím (Marten et al., 2006).

Kromě zvýšené klidové metabolické rychlosti (White et al., 1999) a postprandiálního výdaje energie, existují výzkumy, které ukazují, že by MCT mohly snižovat příjem potravy a zvyšovat sytost, a tím snížit příjem energie u potkanů (Bray et al., 1980) a člověka (Krotkiewski, 2001, Stubbs et Harbron, 1996). Snížená spontánní výživa a tím i příjem energie při obědě byl pozorován po vysokých sacharidových snídaních doplněných o MCT ve srovnání s olivovým olejem nebo sádlem. Příjem energie při večeři se již nelišil (Van Wymelbeke et al., 2001). Je třeba poznamenat, že klidová oxidace glukózy a lipidů a postprandiální oxidace lipidů byla také vyšší u krmiva s máslem ve srovnání s obézními potkany kmenými sójovým olejem a zdálo se, že máselná strava zabraňuje akumulaci tuků v dlouhodobém horizontu. Neexistoval žádný jasný příznivý účinek másla u hubených zvířat (Rolland et al., 2002).

#### 3.1.6.4.4 Účinek na metabolismus glukózy a rezistenci na inzulin

Vzhledem k tomu, že diety s vysokým obsahem LCFA jsou spojeny s patogenezí inzulinové rezistence (Riccardi et al., 2004), stojí za to zkoumat, zda MCFA zlepšují metabolismus glukózy zprostředkovaný inzulinem. Kyselina octová stimulovala sekreci inzulinu zprostředkovanou glukózou v perfundované slinivce méně než mastné kyseliny s delšími řetězci (Marten et al., 2006). Oxidace LCFA je rovněž obvykle snížena, pokud dieta současně obsahuje vysoké množství sacharidů. Ve studiích s euglykemickou svorkou však vysoká hladina glukózy snížila oxidaci kyseliny olejové, ale ne oktanové (Sidossis et al., 1996). To znamená, že glukóza kontroluje vstup LCFA, ale ne MCFA, do mitochondrií. Na druhé straně infuze MCT/LCT snížila oxidaci glukózy méně než infuze LCT (Stouthard et al., 1994).

Ve většině studií na zvířatech nebo na člověku však nedošlo k žádnému zřetelnému snížení plazmatické hladiny glukózy nebo inzulinu (Marten et al., 2006). Ve studii, kdy byla po dobu 3 týdnů konzumována vysoká dávka 70 g testovaných tuků, zvýšily MCT ve srovnání se slunečnicovým olejem s vysokým obsahem oleje nejen LDL cholesterol,

VLDL cholesterol a plazmatické triglyceridy, ale také hladiny glukózy nalačno (Tholstrup et al., 2004). Přesto u jedinců s normální hmotností nemělo množství 5 g MCT za den žádný účinek ve srovnání s olejem LCT (Nosaka et al., 2003). Přiměřený přísun MCT (10 g denně) ve VLCD po dobu 4 týdnů postupně snižoval u obézních subjektů hladinu glukózy na lačno a zejména hladiny inzulínu více než LCT-dieta (Krotkiewski, 2001). Hladiny glukózy nalačno a hladiny inzulínu nalačno se u pacientů s diabetem II. typu po 30 dnech na stravě bohaté na MCT nezměnily, avšak postprandiální exkurze glukózy byla nižší po intervenci MCT (Yost et al., 1994). Další studie u člověka prokázaly zlepšenou citlivost na inzulín u MCT diety po krátkodobé léčbě (Eckel et al., 1992) i dlouhodobější léčbě (Yost et al., 1989), v posledním uvedeném případě v rámci hypokalorické diety. Citlivost na inzulín a glukózová tolerance se rovněž zlepšily u potkanů krmených MCT ve srovnání s LCT po dobu 2 měsíců (Han et al., 2003).

Je nutno poznamenat, že překrmění s MCT ve srovnání s LCT snížilo postprandiální volné mastné kyseliny (FFA) (Hill et al., 1990). To je pozoruhodné, protože zvýšená hladina FFA je spojena s inzulínovou rezistencí a metabolickým syndromem. Navíc krmení MCT nestimulovalo akumulaci triglyceridů v hepatocytech v buněčné kultuře (Tachibana et al., 2002, Sato et al., 2005) a játrech zvířecích modelů (Han et al., 2003, Nagata et al., 2003).

#### 3.1.6.4.5 Záněť

Předpokládá se, že ateroskleróza je způsobena chronickým slabě zánětlivým stavem a riziko koronárních onemocnění srdce je spojeno se zvýšenou úrovní markerů zánětu, jako je interleukin-6, C-reaktivní protein a rozpustné adhezní molekuly. Vysoká hladina některých markerů je také spojena s příznaky metabolického syndromu včetně obezity a inzulínové rezistence. Nasycené LCFA jsou prozánětlivé, zatímco *n*-3 nenasycené mastné kyseliny z rybích olejů tlumí zánětlivé reakce (Marten et al., 2006). *In vitro*, emulze MCT zvyšují expresi adhezní molekuly a aktivační marker v neutrofilech a monocytech (Wanten et al., 2002), mění signalizaci vápníku zprostředkovanou proteinem kinázou C v lidských neutrofilech (Wanten et al., 2001) a vykonávají řadu změn spojených se zvýšenou zánětlivou odpovědí (Bellinati-Pires et al., 1993). V případě prozkoumání však tento účinek nebyl pozorován u MCFA (Wanten et al., 2002) nebo strukturovaných triglyceridů obsahujících jak MCFA, tak LCFA (Wanten et al., 2001). Klinický význam těchto zjištění má být stanoven. Nejvíce absorbované MCFA jsou transportovány v krvi vázané na

albumin a rychle se vylučují játry nebo jsou přítomné ve smíšených triglyceridech (Marten et al., 2006).

Zatímco kyselina dekanová, stejně jako kyselina olejová, zvýšila sekreci mediátorů prozánětlivého interleukinu (IL)-8 buňkami Caco-2 v jedné studii (Tanaka et al., 2001), oktanová kyselina a MCT potlačily sekreci IL-8 v jiné studii (Hoshimoto et al., 2002). MCT se ve skutečnosti často podávají pacientům s Crohnovou chorobou nebo syndromem krátkého střeva. Konzumace MCT chránila střeva potkanů modulací imunitní odpovědi na lipopolysacharidy a zvýšením sekreční exprese imunoglobulinu A (Kono et al., 2004). Zvýšení dávky MCT na úkor kukuřičného oleje také snížilo hepatotoxicitu vyvolanou alkoholem, včetně akumulace triglyceridů a oxidativního stresu u potkanů (Ronis et al., 2004). Protože kyselina máselná (C4:0) inhibuje expresi adhezních molekul indukovanou cytokiny v endotelových buňkách (Zapolska-Downar et al., 2004), bylo by zajímavé také zkoumat vliv MCFA (Marten et al., 2006).

#### 3.1.6.4.6 Vedlejší účinky konzumace MCT

Množství MCT, které můžeme během jednoho jídla zkonsumovat, je omezeno na 25-30 g. Při požití většího množství MCT dochází k nežádoucím gastrointestinálním příznakům, jako je nevolnost, zvracení, nadýmání, abdominální křeče a osmotický průjem (Jeukendrup et al., 2004). Neexistuje riziko ketoacidózy nebo ketonémie s MCT v hladinách souvisejících s běžnou spotřebou (Traul et al., 2000). Kromě toho se potkani přizpůsobili k dlouhodobému podávání diety obsahující MCT, jelikož jaterní a krevní hladiny ketonových tělísek byly sníženy (Crozier et al., 1987, Papamandjaris et al., 1998). Z několika studií na zvířatech a na člověku bylo zjištěno, že MCT nemají toxikologické vlastnosti bez ohledu na to, zda se podávají perorálně nebo parenterálně nebo zda jsou konzumovány jako doplněk ve vyvážené stravě, v množstvích až 15 % energie (což odpovídá >30 g MCT denně v dietě o 2000 kcal) (Traul et al., 2000).

## 3.2 *Staphylococcus* spp.

### 3.2.1 Charakteristika

Grampozitivní bakterie mající kulovité buňky, o průměru 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ , které se vyskytují jednotlivě, v párech, v tetradách, v krátkých řetězcích (3-4 buňkách) a charakteristicky se dělí ve více než jedné rovině a vytvářejí nepravidelné shluky. Jsou

nepohyblivé a nemají klidová stádia. Ultrastruktura a chemické složení buněčné stěny stafylokoků je podobné jako u jiných gram-pozitivních bakterií. Skládá se z tlusté (obvykle 60-80 nm), spíše homogenní a elektronně ne příliš husté vrstvy. Je tvořena peptidoglykanem, kyselinou teikovou a bílkovinami. Diaminokyselina přítomná v peptidoglykanu je L-lysin (peptidoglykanová skupina A3). Obvykle netvoří kapsle nebo jen omezeně (Bergey, 2009).

Stafylokoky jsou fakultativně anaerobní (s výjimkou *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* a *Staphylococcus saccharolyticus*), obvykle kataláza pozitivní a oxidáza negativní. Citlivý na lýzu lysostafinem, ale rezistentní vůči lýze lysozymem (Bergey, 2009).

Většina kmenů roste v přítomnosti 10% NaCl a mezi 18 a 40 °C. Jsou chemoorganotrofní, metabolismus respirační a fermentační. Využívají sacharidy a/nebo aminokyseliny jako zdroje uhlíku a energie. Různé sacharidy mohou být využívány aerobně s produkcí kyseliny. U většiny druhů je hlavním produktem fermentace glukózy kyselina mléčná. Za přítomnosti vzduchu jsou hlavními produkty kyselina octová a CO<sub>2</sub>. Požadavky na výživu jsou variabilní. Většina druhů vyžaduje organický zdroj dusíku, tj. určité aminokyseliny a vitamíny skupiny B. Jiné mohou růst s (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> jako jediným zdrojem substrátového dusíku. Uracil a/nebo fermentovatelný zdroj uhlíku mohou být vyžadovány určitými druhy pro anaerobní růst (Bergey, 2009).

Přírodní populace jsou spojovány především s kůží, kožními žlázami a sliznicemi teplokrevných zvířat. Některé druhy jsou oportunními patogeny lidí a/nebo zvířat. Koaguláza pozitivní druhy *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus delphini* a *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* a různé druhy *Staphylococcus hyicus* jsou považovány za potenciálně závažné patogeny (Bergey, 2009).

### **3.2.2 *Staphylococcus aureus* a jeho patogenita**

*Staphylococcus aureus* je významný lidský patogen, který způsobuje širokou škálu klinických infekcí. Jedná se o hlavní příčinu bakterémie a infekční endokarditidy, stejně jako infekce osteoartikulární, kožní, měkkých tkání a pleuropulmonární (Tong et al., 2015).

Ke konci padesátých a na začátku šedesátých let způsobil *Staphylococcus aureus* značnou morbiditu a mortalitu jako nosokomiální patogen hospitalizovaných pacientů.

Mezi hlavní lidské infekce způsobené tímto druhem patří furuncles (infekce vlasového folikulu), carbuncles (shluk vředů způsobený bakteriální infekcí), impetigo (nakažlivá infekce povrchové vrstvy kůže), toxická epidermální nekrolýza (syndrom opadlé kůže), pneumonie, osteomyelitida, akutní endokarditida, myokarditida, perikarditida, enterokolitida, mastitida, cystitida, prostatitida, cervicitis, cerebritis, bakterémie, syndrom toxického šoku a abscesy svalů, kůže, urogenitálního traktu, centrálního nervového systému a různých intraabdominálních orgánů (Bergey, 2009).

Kromě toho se stafylokokový enterotoxin podílí na otravě potravinami. Kmeny *Staphylococcus aureus* rezistentní na methicillin (MRSA) se objevily v nemocnicích v 80. letech jako významný klinický a epidemiologický problém. Tyto kmeny se začaly rozšiřovat z nemocnic a do komunit (Bergey, 2009).

### **3.3 Antibiotika a antibiotická léčba**

#### **3.3.1 Úvod**

Antibiotika jsou důležitými látkami při léčbě infekčních onemocnění. Většinou jsou produkovány různými druhy mikroorganismů (bakterie, houby, aktinomycety), které potlačují růst jiných mikroorganismů a mohou je nakonec zničit. Obecné použití však často rozšiřuje termín "antibiotika" tak, aby zahrnoval syntetické nebo polosyntetické antibakteriální látky, jako jsou sulfonamidy a metronidazol, které nejsou produkovány mikroby (Soares et al., 2012).

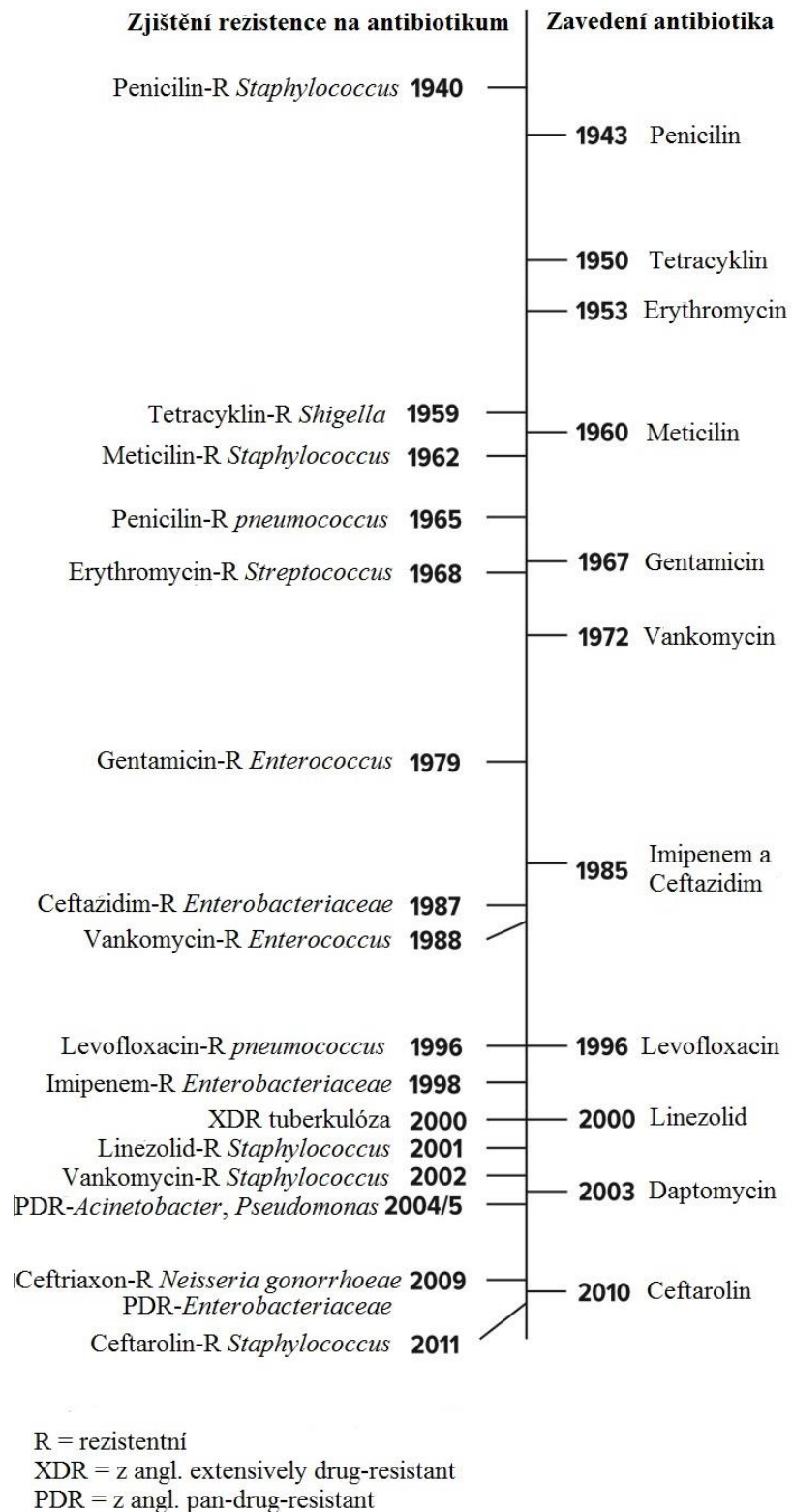
#### **3.3.2 Historie**

Problémy s mikrobiálními infekcemi již ve starověkém Egyptě, Řecku a Číně jsou dobře zdokumentovány (Sengupta et al., 2013). Moderní doba antibiotik začala s objevením penicilinu Sirem Alexanderem Flemिंगem v roce 1928 (Sengupta et al., 2013, Piddock, 2012). Od té doby antibiotika změnila moderní medicínu a zachránila miliony životů (Gould et Bal, 2013, CDC, 2013). Antibiotika byla nejprve (ve čtyřicátých letech) předepisována k léčbě závažných infekcí (CDC, 2013). Penicilin byl následně úspěšný při kontrole bakteriálních infekcí u vojáků druhé světové války (Sengupta et al., 2013). Nicméně krátce poté se rezistence vůči penicilinu stala závažným klinickým problémem, takže v roce 1950 bylo ohroženo mnoho pokroků předchozího desetiletí (Spellberg et Gilbert, 2014). V reakci na to byla objevena, vyvinuta a nasazena nová  $\beta$ -laktamová



antibiotika, obnovující důvěru (Sengupta et al., 2013, Spellberg et Gilbert, 2014). První případ meticilin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA) byl zjištěn během téže dekády, ve Spojeném království v roce 1962 a ve Spojených státech v roce 1968 (Sengupta et al., 2013, CDC, 2013).

Bohužel se nakonec objevila rezistence na téměř všechna antibiotika, která byla vyvinuta (obr. 6, Ventola, 2015, CDC, 2013). V roce 1972 byl v klinické praxi zaveden vankomycin pro léčbu rezistence na meticilin jak u *S. aureus*, tak u koaguláza-negativních stafylokoků (Sengupta et al., 2013, CDC, 2013). Vyvolat rezistenci na vankomycin bylo tak obtížné, že se nepředpokládal výskyt v klinickém prostředí (Sengupta et al., 2013). Nicméně případy rezistence k vankomycinu byly zaznamenány u koaguláza-negativních stafylokoků v letech 1979 a 1983 (Sengupta et al., 2013). Od pozdních šedesátých let do počátku 80. let zavedl farmaceutický průmysl mnoho nových antibiotik k vyřešení problému s rezistencí, ale poté začala pomyslná antibiotická studna vysychat a bylo zaváděno stále méně nových léků. V důsledku toho v roce 2015, mnoho desetiletí poté, co byli první pacienti léčeni antibiotiky, se znovu bakteriální infekce stávají hrozbou (Spellberg et Gilbert, 2014).



**Obrázek 6: Vývoj rezistence na antibiotika: časová osa klíčových událostí**  
(přepřacováno dle Spellberg et Gilbert, 2014)

### 3.3.3 Rozdělení antibiotik a mechanismy účinku

Naše chápání toho, jak antibiotika indukují smrt bakteriálních buněk, je soustředěno na základní buněčnou funkci inhibovanou primární interakcí léčiva a cílové látky. Antibiotika mohou být klasifikována na základě buněčné složky nebo systému, který ovlivňují. Obecně je rozdělujeme na ta, která indukují buněčnou smrt (baktericidní) a ta, která pouze inhibují růst buněk (bakteriostatické). Většina současných baktericidních antimikrobiálních látek inhibuje syntézu DNA, syntézu RNA, syntézu buněčné stěny nebo syntézu proteinů (Kohanski et al., 2010, Thrum, 1997, Lüllman et al., 2012).

Podle toho, zda dané léčivo dokáže působit na malé anebo naopak velké množství bakteriálních druhů, mluvíme o tzv. antibiotiku s úzkým spektrem (např. penicilin G), a nebo o antibiotiku se spektrem širokým (např. tetracykliny) (Lüllman et al., 2012).

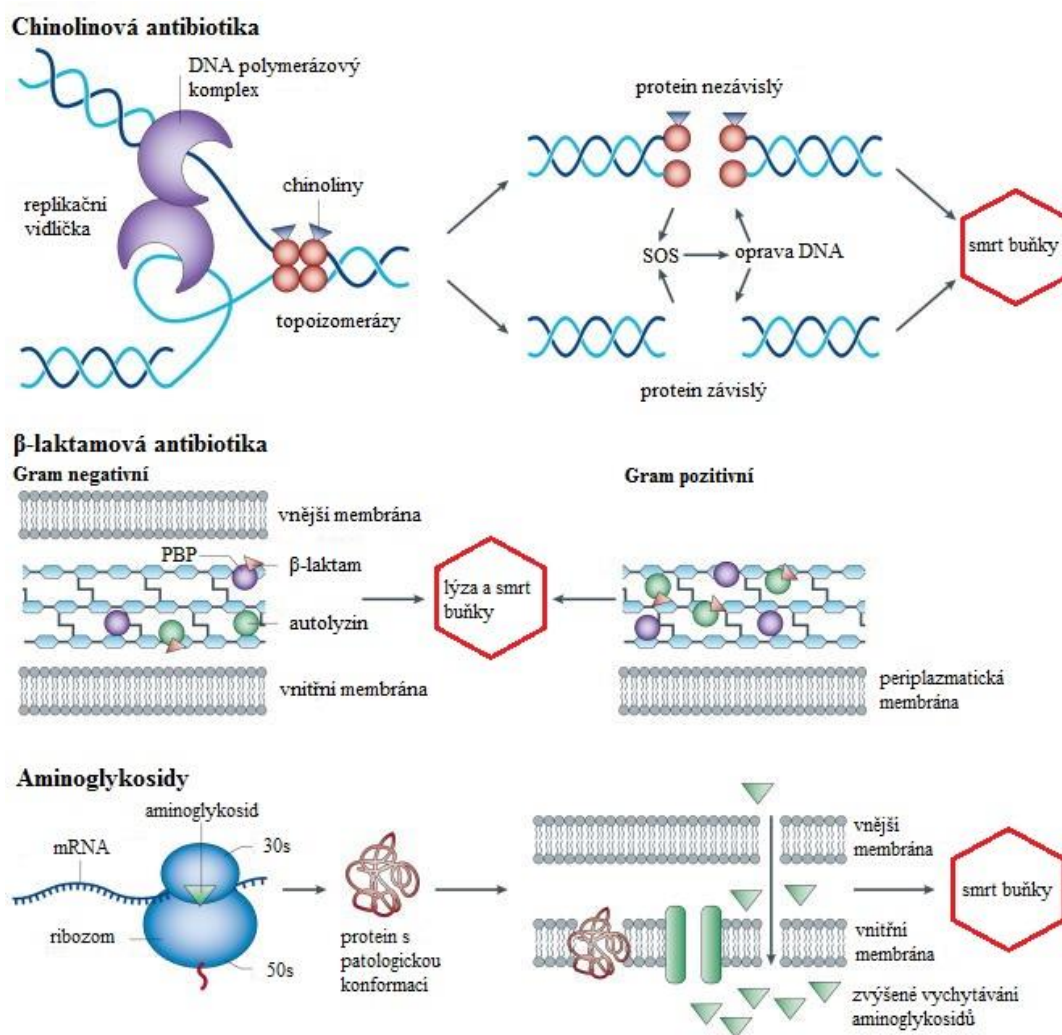
Soares et al. (2012) rozdělují antibiotika na základě mechanismu účinku na:

1. Agens, které inhibují syntézu buněčných stěn bakterií (např. peniciliny a cefalosporiny)
2. Agens, které interferují s buněčnou membránou mikroorganismů, ovlivňující její propustnost (např. některé antifungální látky)
3. Agens, které inhibují syntézu proteinů ovlivněním funkce 30S nebo 50S ribozomálních podjednotek (např. tetracykliny, makrolidy a klindamycin)
4. Agens, které blokují důležité metabolické kroky mikroorganismů (např. sulfonamidy a trimetoprim)
5. Agens, které interferují se syntézou nukleových kyselin (např. metronidazol a chinoliny)

Antibiotiky zprostředkovaná buněčná smrt je však komplexní proces, který začíná fyzikální interakcí mezi molekulou léčiva a bakteriálně specifickým cílem a zahrnuje změny postižené bakterie na úrovni biochemické, molekulární a ultrastrukturní. Rostoucí výskyt bakterií rezistentních na léky (Taubes, 2008), jakož i způsoby získání rezistence poukázaly na to, že je zásadní, abychom lépe porozuměli vícevrstevným mechanismům, kterými antibiotika, která jsou v současné době k dispozici, zabíjejí bakterie a také zkoumali a snažili se najít alternativní antibakteriální terapie (Kohanski et al., 2010).

Antibiotiky indukovaná buněčná smrt byla spojena s tvorbou dvouřetězcových zlomů DNA po léčbě inhibitory DNA gyrázy (Drlica et al., 2008), se zastavením syntézy DNA-závislé RNA po léčbě rifamyciny (Floss et Yu, 2005), s poškozením buněčného

obalu a ztrátou strukturální integrity po léčbě inhibitory syntézy buněčné stěny (Tomasz, 1979) a buněčnou energetikou, vazbou na ribozom a chybnou translací proteinů po léčbě inhibitory syntézy proteinu (Vakulenko et Mobashery, 2003). Navíc nedávné poznatky ukazují na společný mechanismus buněčné smrti, zahrnující nevýhodné buněčné odpovědi na stresy vyvolané léky, které jsou sdíleny všemi třídami baktericidních antibiotik, což nakonec přispívá k usmrcování těmito léky (Kohanski et al., 2007). Přesněji řečeno, léčba letálními koncentracemi baktericidních antibiotik vede k tvorbě škodlivých hydroxylových radikálů prostřednictvím běžné dráhy buněčné smrti oxidačním poškozením, která zahrnuje změny centrálního metabolismu (TCA cyklus = citrátový cyklus) a metabolismus železa (Kohanski et al., 2007, Dwyer et al., 2007, Kohanski et al., 2008).



**Obrázek 7: Interakce mezi léčivem a cílovým organismem - způsob buněčné smrti**

(přepřacováno dle Kohanski et al., 2010)

Chinolinová antibiotika interferují se změnami v supersilici DNA vazbou na topoizomerázu II nebo IV. To vede k tvorbě dvouřetězcových zlomů DNA a smrti buněk buď nezávisle, nebo nezávisle na proteinové syntéze.

$\beta$ -laktamy inhibují transpeptidaci vazbou na PBP na zrajících peptidoglykanových řetězcích. Pokles syntézy peptidoglykanu a zvýšení autolyzinů vede k lýze a smrti buněk.

Aminoglykosidy se vážou na 30S podjednotku ribozomu a způsobují nesprávné začlenění aminokyselin do prodlužujících se peptidů. Tyto nesprávně přeložené proteiny mohou být složeny do špatné terciální struktury (misfold) a začlenění těchto membránových proteinů s patologickou konformací do buněčného obalu vede ke zvýšené absorpci léčiva, což společně se zvýšením vazby ribozomu bylo spojeno se smrtí buněk.

### 3.3.4 Hlavní skupiny antibiotik dle chemické struktury

Jelikož popsání všech skupin antibiotik by přesahovalo rámec této práce, zaměřím se pouze peniciliny, s jejichž zástupcem (oxacilinem) jsem pracoval ve své práci. Hejzlar (1995) rozděluje antibiotika do těchto skupin:

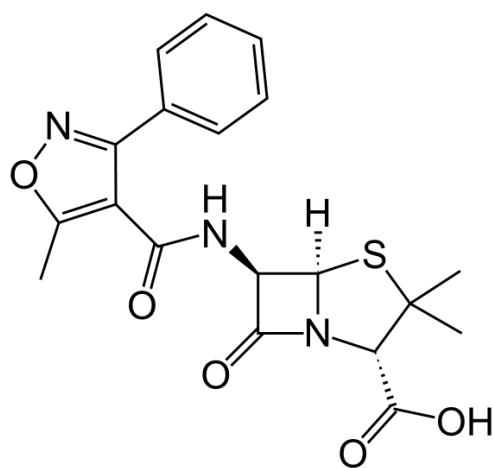
#### 1. Peniciliny

Peniciliny společně s cefalosporiny jsou hlavními  $\beta$ -laktamovými antibiotiky. Základní struktura penicilinů se skládá z thiazolidinového kruhu připojeného k  $\beta$ -laktamovému kruhu, ke kterému je připojen acylový postranní řetězec. První zavedený penicilin, penicilin G, je jediný přirozený penicilin, který se v současnosti klinicky používá (Soares et al. 2012). Získává se z kultur plísní, původně z *Penicilium notatum*. Základní strukturu (společnou všem penicilinům) tvoří kyselina 6-aminopenicilanová (6-APK) s jedním čtyřčlenným  $\beta$ -laktamovým kruhem (Lüllman et al., 2012). První polysyntetický derivát, penicilin V, se ukázal po orálním podání stabilnější než penicilin G (Soares et al., 2012), jehož  $\beta$ -laktamový kruh je štěpen žaludeční šťávou a tím inaktivován. Proto se musí podávat injekčně (Lüllman et al., 2012). Nicméně obě léčiva mají omezenou aktivitu proti gramnegativním bakteriím a jsou snadno hydrolyzovány bakteriálně produkovanými hydrolyzujícími enzymy,  $\beta$ -laktamázi. Později další modifikace a náhrady acylového postranního řetězce vedly k produkci jiných polosyntetických penicilinů se zlepšenými antimikrobiálními vlastnostmi. Tyto vlastnosti zahrnovaly aktivitu proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím s úzkým spektrem aktivity směřujícím proti specifickým bakteriím, zvýšenou stabilitou v ústní a žaludeční kyselině a zvýšenou absorpcí, což vedlo

k nižším dávkám nezbytným pro stanovení terapeutických hladin (Soares et al., 2012, Walker 1996b).

Peniciliny a další  $\beta$ -laktamová antibiotika jsou baktericidní léky. Zabíjejí vnímavé bakterie inhibicí syntézy bakteriální peptidoglykanové buněčné stěny (Yocum et al., 1980). Peptidoglykan poskytuje buňce tuhou stabilitu díky své vysoce zesílené struktuře a její syntéza má 3 fáze. První a druhá fáze se odehrávají v cytoplasmě. Zpočátku je vazba aminocukru následovaná přidáním specifických aminokyselin (L-alanin, D-glutamová kyselina, L-lysin, následovaný dipeptidem, D-alanyl-D-alaninem) v předepsaném pořadí za vzniku uridin difosfátu (UDP)-acetylmuramyl-pentapeptidu. Poslední fáze probíhá mimo buňku, aby se dokončila křížová vazba, kdy do rostoucího peptidoglykanu jsou přidávány nové podjednotky. Konečný glycinový zbytek pentaglycinového můstku je spojen se čtvrtým zbytkem pentapeptidu (D-alaninem), čímž se uvolní pátý zbytek (také D-alanin) (Magnusson, 1994). Peniciliny a cefalosporiny interferují s tímto posledním krokem syntézy peptidoglykanů tím, že působí jako analog D-alanin-D-alaninové části N-acetylmuramického celku. Konformace penicilinu je velmi podobná struktuře D-alanin-D-alaninu, takže enzymy podílející se na transpeptidační reakci reagují s  $\beta$ -laktamovým jádrem, inaktivují transpeptidázovou reakci a vedou k tvorbě nových peptidoglykanových řetězců, které nejsou zesíťované a postrádají pevnost v tahu. V rostoucí stěně buněk se objevují slabé body, které způsobí prasknutí buněk osmotickou lýzou (Yocum, 1980). Kromě toho existuje více cílů pro působení penicilinů, které jsou kolektivně nazývány penicilin-vázajícími proteiny (PBP) (Spratt, 1980), struktury, které mají všechny bakterie (Soares et al., 2012).

Oxacilin je úzkospektrální  $\beta$ -laktamové antibiotikum. Jedná se o penicilin rezistentní k penicilináze (Soares et al., 2012). Je podobný meticilinu a nahradil ho v klineckém využití, ale MRSA je rezistentní i k oxacilinu (tzv. ORSA).



**Obrázek 8: Chemická struktura oxacilinu**

2. Cefalosporiny (parenterální)
  - a. 1. generace
  - b. 2. generace
  - c. 3. generace
  - d. 4. generace
3. Cefalosporiny (perorální)
4. Monobaktamy
5. Karbapenemy
6. Aminoglykosidy
7. Aminocyklitoly
8. Peptidy (peptolidy)
9. Glykopeptidy – lipopeptidy
10. Ansamyciny
11. Chinolinová antibiotika
12. Makrolidy
13. Linkosamidy
14. Chloramfenikol
15. Tetracykliny
16. Polyenová antibiotika
17. Imidazoly
18. Sulfoamidy (Lüllman et al., 2012)

### 3.3.5 Negativní dopady léčby antibiotiky

Antibiotika jsou základním kamenem inovací v oblasti veřejného zdraví, zemědělství a medicíny. Nedávné studie však ukazují, že tyto léky mění taxonomickou, genomickou a funkční kapacitu lidské intestinální mikrobioty s účinky, které jsou rychlé a někdy i trvalé. Širokospektrální antibiotika snižují bakteriální rozmanitost a ohrožují zastoupení specifických domácích taxonů. Kromě toho antibiotická léčba selektuje rezistentní bakterie, zvyšuje příležitost pro horizontální přenos genů a umožňuje proniknutí patogenních organismů prostřednictvím vyprázdnění obsazených přírodních nik, s hlubokými důsledky pro vznik rezistence. Vzhledem k tomu, že tyto všudypřítomné změny lze považovat za odpojení vzájemných vztahů mezi hostitelem a mikrobenem, je velmi důležité přehodnotit antimikrobiální terapie v kontextu ekologického rámce (Modi et al., 2014).

#### 3.3.5.1 Ekologická perspektiva

Geny rezistence proti antibiotikům jsou v dnešním přírodním prostředí všudypřítomné. Částečně to odráží všeobecné užívání velkého množství antibiotik lidskou populací za posledních 70 let a silné selektivní tlaky, které toto použití vyvíjelo, včetně šíření rezistentních organismů (Modi et al., 2014). Avšak samotné geny rezistence jsou starověké. Sekvence DNA, u nichž se předpokládá, že kódují  $\beta$ -laktamázy, determinant rezistence na tetracyklin TetM a proteiny vankomycinové rezistence, byly získány z 30 000 let starého permafrostového sedimentu v severní Britské Kolumbii (D'Costa, 2011). Přestože tyto sekvence souvisejí s těmi, které se vyskytují u současných genů rezistence, byly významně divergentní. Ale přinejmenším v jednom případě (VanA ligáza) gen exprimoval protein s očekávanou funkcí. Bakteriální izoláty, které byly získány ze starých chráněných lokalit, včetně jednoho místa, které bylo údajně izolováno již více než 4 miliony let (Bhullar et al., 2012), prokázaly rezistenci vůči více léčivům. Přítomnost těchto genů před moderním užíváním antibiotik lidskou populací silně naznačuje, že tato antibiotika byla široce distribuována v životním prostředí, a že geny rezistence cirkulují nejméně tisíce let. Moderní použití vysokých dávek antibiotik obohacuje geny rezistence a z hostitelské ekologické perspektivy může vést k rozpojení vzájemných vztahů mezi střevní mikrobiotou a lidským hostitelem, které se vyvíjely po dlouhou dobu (Costello et al., 2012, Dethlefsen et al., 2007).



### 3.3.5.2 Účinky antibiotik na mikrobiom jako celek

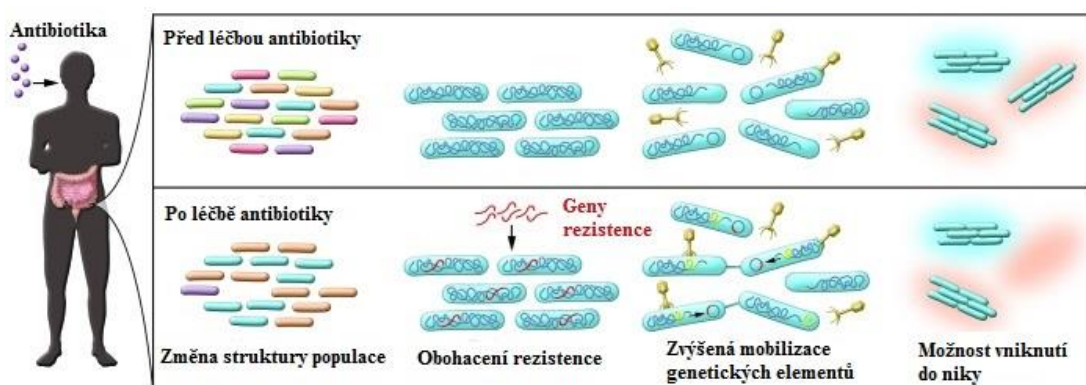
Jednou z nejdříve popsaných vedlejších účinků antibiotik na střevo byla ztráta kolonizační rezistence (tj. ztráta "konkurenčního vyloučení", Bohnhoff et Miller, 1962, Miller et al., 1957). Ztráta se projevila mnohem snadnější kolonizací a onemocněním způsobeným salmonelou ihned po léčbě antibiotiky. Jak konkurence o zdroje, tak přímé ovlivňování hrají roli v odolnosti neporušené mikrobioty vůči kolonizaci patogeny. Mezi nepřímé faktory patří indukce různých vrozených cest imunitní odpovědi a efektorových molekul (Buffie et Pamer, 2013). Antibiotika narušují strukturu komunity natolik, že způsobují rozsáhlé poruchy ve zdrojích a v mezidruhových interakcích. Nedávná práce na myších naznačuje, že antibiotika vedou ke zvýšenému množství volné kyseliny sialové ve střevě hostitele, která pak může být využita oportunitními patogeny jako je *Salmonella typhimurium* a *Clostridium difficile* ke zvýšení intenzity jejich růstu (Ng et al., 2013).

Studie účinků antibiotik na taxonomické složení komunity střev obecně zjistily snížené úrovně bakteriální diverzity, stereotypní poklesy a relativní rozšíření výskytu některých taxonů, určitý stupeň obnovy u většiny jedinců, ale trvalý účinek u jiných, a antibiotické a individuální efekty specifické pro hostitele. Antibiotika se silnou a širokou aktivitou proti anaerobům (např. klindamycin) typicky způsobily nejdéle trvající účinky na složení komunity ve střevě (Jernberg et al., 2007, Jernberg et al., 2010, Jernberg et al., 2005). Jakobsson et al. (2010) studovali vliv klaritromycinu, metronidazolu a omeprazolu po sedm dní na taxinální složení hltnanu a stolice a zjistil široký taxonomický efekt na složení s rychlým, avšak pouze částečným obnovením, a přetrvávajícími účinky nejméně čtyři roky po expozici.

Vyvíjejí se snahy o zkoumání účinku antibiotik na jiné hostitelské fenotypy spojené s mikrobiálními mikroorganismy. Studie Cho et al. ukázala, že myším se po expozici subterapeutickými dávkami antibiotik na počátku života (kromě změn složení střevní mikroflóry) zvýšila také celková a relativní hmotnost tělesného tuku, hustota kostí, produkce SCFA u intestinální mikrobioty a změnil se metabolismus mastných kyselin v játrech (Cho et al., 2012). Zda a do jaké míry se tyto účinky vyskytují u dětí a to, do jaké míry tyto účinky závisí na jiných mikrobiálních, hostitelských a environmentálních faktorech, je předmětem výzkumu (Modi et al., 2014).

### 3.3.5.3 Zásobník antibiotické rezistence mikrobiomu

Převládající účinky antibiotik na populační strukturu ve střevě jsou paralelizovány s jejich pozměněním genomové kapacity střevních mikrobiálních komunit. V laboratorních podmínkách léčba bakteriálních populací antibiotiky selektuje a obohacuje o rezistentní kmeny a druhy (Lee et al., 2010, Toprak et al., 2012), studie antibiotik a rezistence *in vivo*, byť jsou teprve v zárodcích, přinesly podobné nálezy (obr. 9). Ve studii Jakobssona et al. (2010) u pacientů léčených kombináčnícím antibiotickým režimem obsahujícím klaritromycin pro peptické vředy spojené s *H. pylori* bylo bezprostředně po ukončení léčby zjištěno 1 000násobné zvýšení *ermB* rezistentního genu. Ačkoli subjekty neobdržely další antibiotika v průběhu studie, jejich střevní mikrobiota zůstala i po čtyřech letech na srovnatelných úrovních rezistenčních genů (Jakobsson et al., 2010). Zdá se, že rovněž subterapeutické dávky vedou k obohacení genů rezistence. Použití antibiotik zvyšujících růst ASP40 (koktejl chlortetracyklinu, sulfametazinu a penicilinu) v krmivech prasat způsobilo významné zvýšení množství a rozmanitosti genů s vícero rezistencemi po pouhých třech dnech expozice. Došlo rovněž k obohacení o geny poskytující rezistenci vůči třídám léků, které nebyly přítomny ve zdroji krmiva, jako jsou geny rezistence na aminoglykosidy, což svědčí o úloze antibiotik jakožto podporovatelů vzniku rezistence na nesouvisející skupiny léků u komenzálních mikrobů (Looft et al., 2012).

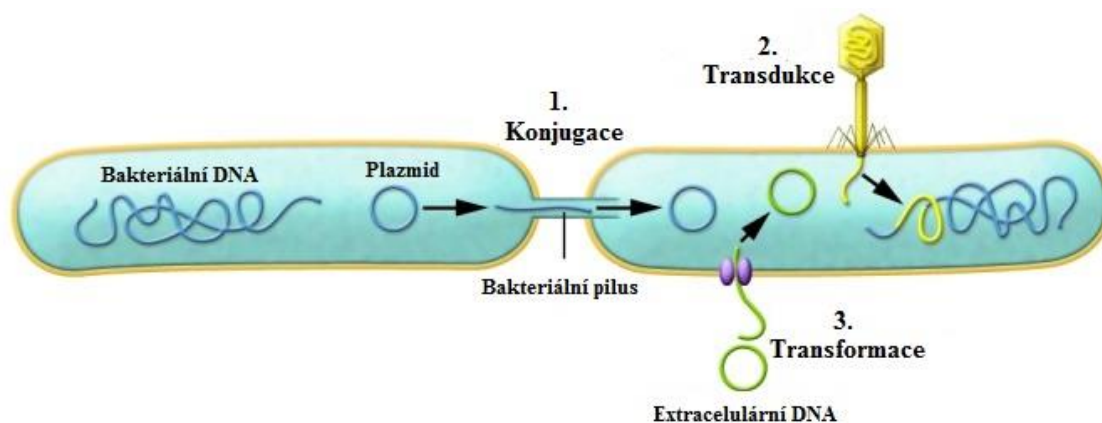


**Obrázek 9: Účinky antibiotik na mikrobiom jako celek**

(přepřacováno dle Modi et al., 2014)

Vývoj rezistence vůči antibiotikům ve střevním mikrobiomu byl nejčastěji studován pomocí genomických a metagenomických přístupů nebo alternativně sledováním fenotypů jednotlivých druhů (Lofmark et al., 2006, Sjolund et al., 2003). Dynamika vývoje rezistence na úrovni komunity je zatím nejasná, stejně jako mechanismy, které udržují

mikrobiální organismus před stresem antibiotik. Identifikace zdroje této rezistence je klíčem k pochopení vzniku rezistence. Rezistence může vzniknout spontánně kvůli mutabilitě bakteriálních genomů (Bagel et al., 1999), nebo může vzniknout z přenosu genetického materiálu z jedné buňky do druhé (obr. 8 a 9). Jako další příklad vlastní a přirozené úlohy lékové rezistence v mikrobiálních ekosystémech (D'Costa et al., 2011, Dantas et al., 2008) se nedávno ukázalo, že lidský mikrobiom slouží jako impozantní zásoba genů antibiotické rezistence. Kolonizace střeva rezistentními bakteriemi se může objevit během tří dnů po narození (Koenig et al., 2011); navíc byly rezistentní fenotypy zdokumentovány i ve vzdálených lidských komunitách s omezenou expozicí antibiotik (Bartoloni et al., 2004).



**Obrázek 10: Mechanismy pro získání genů rezistence**

(přepřacováno dle Modi et al., 2014)

Bakterie si navzájem vyměňují genetickou informaci pomocí horizontálních cest konjugace, fágové transdukce a přirozené transformace. Při konjugaci (1.) jsou buňky dárce a příjemce fyzicky propojeny vytvořením přechodového můstku (pilus) a DNA zkopírovaná z jedné buňky proudí do další. Buňky mohou přenášet plazmidovou DNA, integrační konjugační elementy (chromozomálně kódované genové shluky s autonomním konjugačním mechanismem) nebo chromozomální DNA prostřednictvím vysoké frekvence rekombinace zprostředkované F plazmidy. Fágy nebo bakteriální viry slouží jako nosiče přenosu bakteriálních genů (2.) transdukci DNA z jedné hostitelské buňky do druhé. Během lýzy mohou fágy neúmyslně zabalit bakteriální DNA, buď náhodně začleněním kousků bakteriálního genomu do fágových částic (generalizovanou transdukci) nebo zachycením bakteriální DNA umístěné v blízkosti místa integrace fága (specializovaná

transdukce). Při lysogenní infekci nového hostitele může být genomový materiál udržován v genomu homologní rekombinací nebo specifickou lokální integrací. Při procesu přirozené transformace (3.) mohou některé bakteriální druhy převzít volnou DNA z prostředí pomocí membránových proteinových komplexů. Zatímco některé druhy vykazují kompetenci během fází svého životního cyklu, jiní reagují na extracelulární podněty k zahájení absorpce DNA (Modi et al., 2014).

Studie, která popisuje kultivovatelné mikroby od více než 600 jedinců, ukázala, že většina těchto jedinců tvořila střevní komunity, ve kterých bylo alespoň 10 % členů rezistentních na jedno antibiotikum a více než třetina přinesla mikroby, které vykazovaly fenotypy multidrogové rezistence (Levy et al., 1988). Tyto subjekty pocházely z venkovských, městských a nemocničních prostředí, a přestože rezistence vůči určitým lékům byla zjištěna s vyšší frekvencí v hospitalizované skupině, rezistence vůči většině antibiotik byla přítomna na podobných úrovních ve všech kohortách. V samostatné studii byly studovány fekální bakteriální populace od dvou jedinců s použitím kulturně nezávislých a kulturně závislých přístupů (Sommer et al., 2009). Nejméně 20 % izolátů kultivovaných od každého jednotlivce bylo rezistentních na 10 různých léků, které obsahovaly řadu antibiotických tříd. Genomové inzerty zachycené z celkové DNA v komunitě dále odhalily rozsáhlý repertoár kódovacích sekvencí poskytujících rezistenční funkce v lidském mikrobiomu. Vzhledem k tomu, že většina bakterií spojených s hostitelem (host-associated) „nespolupracuje“ při současných kultivačních technikách, tato metagenomická perspektiva poskytuje méně předpojaté hodnocení výskytu genů rezistence v celé šíři střevní mikrobiální komunity (Modi et al., 2014).

### **3.3.6 Rezistence**

Achillovou patou antibiotik je rozvoj rezistence cílových patogenních bakterií. Během 2 let od uvedení na trh se obvykle objevuje rezistence i na nové třídy sloučenin. Pokud se podíl bakterií, které způsobují specifické typy klinické infekce, zvýší na 20 % nebo více, antibiotikum se stává pro tuto indikaci špatně účinné, a mělo by být staženo. Jedná se o unikátní rys antimikrobiálních léků, že se časem stávají neúčinnými, což je něco, co neovlivňuje jiné skupiny léčiv, např. ty na onemocnění kardiovaskulárního

systemu, centrálního nervového systému a léčiva působící protizánětlivě (Modi et al., 2014).

Antimikrobiální rezistenci lze rozdělit do tří skupin (Soares et al., 2012): vnitřní, mutační a získaná rezistence. Vnitřní rezistence se vztahuje k inherentní rezistenci na antibiotikum, která je přirozeně se vyskytující vlastností mikroorganismu. Například některé orální bakterie, jako je mnoho streptokoků, postrádají nitroreduktázy nezbytné pro konverzi metronidazolu na jeho aktivní metabolity, a proto nejsou lékem ovlivněny (Walker, 1996a, Soares et al., 2012). Mutační rezistence vzniká v důsledku spontánní chromozomální mutace, která produkuje geneticky změněnou bakteriální populaci, která je rezistentní vůči léčivu. Mutace vyplývající ze změny jedné nukleotidové báze mohou vést k rezistenci, jak bylo dobře zdokumentováno pro aminoglykosidy a rifampicin (Walker, 1996a, Soares et al., 2012). Získaná rezistence se týká horizontálního získávání genetického prvku, který kóduje odolnost vůči antibiotikům, z jiného mikroorganismu. Tento proces může nastat transdukcí, transformací nebo konjugací (Obr. 10) (Walker, 1996a, Soares et al., 2012).

Během uplynulých 20 let se stoupající frekvence výskytu a šíření bakteriálních patogenů odolných vůči antibiotikům stala celosvětovým problémem zdravotní péče (Witte, W., 2013). Některé bakterie mutují pomalu, zatímco jiné rychleji nebo získávají rezistentní elementy jiných druhů (Coates et al., 2011). Například některé kmeny *Neisseria meningitidis* (du Plessis et al., 2008) stále vykazují pouze sníženou náchylnost k penicilinu, zatímco u *S. aureus* (Chambers et Deleo, 2009) se rezistence vůči penicilinu objevila na počátku 40. let, krátce po jeho uvedení na trh, a rezistence na meticilin byla zaznamenána pouhý 1 rok po jeho zavedení. V roce 2005 se v USA odhadlo, že *S. aureus* způsobil 10 800 úmrtí, z nichž 5500 bylo způsobeno MRSA (Klein et al., 2007). Většina nemocničních infekcí v USA je způsobena tzv. ESKAPE patogeny (Rice, 2010), pro které jsou naléhavě potřeba nová antibiotika. Jsou to *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* a druh *Enterobacter*. Gram-negativní bakterie jsou v tomto ohledu obzvláště znepokojivé a postupně se stávají odolnými vůči každé třídě antibiotik. V mnoha zemích se objevuje velké úsilí zabývat se prevencí těchto infekcí (Coates et Hu, 2008) zlepšením kontroly infekcí v nemocnicích, stažením zranitelných skupin antibiotik, omezením používání antibiotik a zavedením

nových vakcín. Nicméně „superbakterie“, které jsou odolné proti klíčovým třídám antibiotik, se nadále objevují (Coates et al., 2011).

Dle Ventoli (2015) je 5 hlavních příčin vznikající krize rezistence na antibiotika:

1. Nadužívání antibiotik
2. Nevhodné předepisování
3. Rozsáhlé využívání v zemědělství
4. Dostupnost malého množství nových antibiotik
5. Regulační bariéry

Každá z těchto příčin je podrobně rozebrána v jeho práci *The Antibiotic Resistance Crisis* (Ventola, 2015).

### 3.3.6.1 Základní mechanismy rezistence

Některá antibiotika indukují rezistenci snadno, například rifampicin (Lambert, 2005), zatímco jiná, například ta, které se zaměřují na buněčnou membránu, tak mohou činit pomaleji (Zhanel et al., 2008).

Klíčové mechanismy genetické rezistence jsou (Coates et al., 2002):

1. inaktivace antibiotika produkcí například  $\beta$ -laktamázy, která degraduje  $\beta$ -laktamový kruh, který je klíčovou částí penicilinů a cefalosporinů
2. snížení membránové permeability antibiotiku
3. zvýšení výtoku antibiotika z buňky
4. nadprodukce cílového enzymu
5. obejití inhibovaného kroku
6. změna místa působení antibiotika

Některá antibiotika, zejména fluorochinolony, indukují odpověď SOS, která zvyšuje chybovost replikace DNA a urychluje vývoj rezistence (Da Re et al., 2009).

Navíc před vznikem genetické rezistence mohou bakterie přežít antibiotickou léčbu tím, že vstoupí do pomalého nebo nerozmnožovacího stavu (Coates et al., 2002). Předpokládá se, že asi 60 % všech klinických infekcí obsahuje bakterie v tomto stavu (Coates et Hu, 2008). Komezální bakterie, například ty, které přirozeně žijí na kůži, ústech, nose a střevech, obsahují velké množství organismů rezistentních vůči antibiotikům a mohou být zdrojem markerů antibiotické rezistence pro patogenní bakterie (Gillings et al., 2008). Také asi polovina všech antibiotik, která jsou používána každý rok

ve světě, je konzumována i zvířaty. To je rovněž možným zdrojem rezistence k antibiotikům u lidí, ačkoli to někteří napadají (Soulsby, 2008). Před několika lety (van Cleef et al., 2010) bylo zjištěno, že MRSA se nachází v polovině chovů prasat v Evropě a rozšířil se na chovatele prasat a jejich rodiny, avšak dosud se nerozšířil do obecné populace.

Tyto údaje naznačují, že rezistence vůči antibiotikům by neměla být brána v úvahu, zvláště u gram-negativních bakterií, pouze jako problém izolovaný na malém počtu „superbakterií“. Spíše je součástí mnohem většího obrazu, tedy celého bakteriálního království, které se zdá, že spolupracuje a horizontálně přenáší DNA obsahující antibiotickou rezistenci mezi různými druhy. Zároveň jsou rezistentní bakterie schopné přežít a přetrvávat po dlouhou dobu, i když není přítomen žádný antibiotický selektivní tlak (Andersson, 2006, Coates et al., 2011).

### **3.3.7 Biofilmy**

U lidských infekcí, včetně těch, které souvisí s inhalačními zařízeními, jako jsou katétry, stehy a stenty, se stále častěji projevuje prevalence a význam bakteriálních biofilmů (Fux et al., 2005, Hall-Stoodley et Stoodley, 2009, Bjarnsholt, 2013). Biofilmy mohou být definovány jako povrchové mikrobiální komunity, které se vyvíjejí v kapalném prostředí. Mikroby v biofilmech jsou často zakotveny v hydratované matici složené z extracelulární polymerní látky obsahující proteiny, polysacharidy, lipidy a extracelulární DNA (Flemming et al., 2007, Flemming et Wingender, 2010). Biofilmy jsou typicky rezistentní vůči terapeutickým koncentracím antibiotik, které jsou částečně založeny na MIC planktonických buněk (Fux et al., 2005, Hall-Stoodley et Stoodley, 2009, Cos et al., 2010). Infikovaná zařízení tedy mohou být terapeutickým problémem a často vyžadují chirurgické odstranění (Hess et al., 2014).

## **3.4 Interakce mezi antibakteriálními látkami**

Někdy se používají k léčbě rutinních bakteriálních infekcí (Ball, 2007, Tängdén, 2014) stejně jako tuberkulózy (Zumla et al., 2014) kombinace různých léků. Proto je rozumné navrhnout kombinovanou terapii s jinými antibakteriálně působícími látkami (He et al., 2015).

### 3.4.1 Hodnocení různých typů interakcí

Pro měření antimikrobiálních interakcí se měří minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro růst v bujónu diluční metodou. To se často provádí testováními šachovnicového typu, ve kterém jsou sloučeniny A a B sériově zředěny v řadách a sloupcích několika jamkové destičky (multiwell plate) a jamky bez růstu v průsečíku mezi účinnými koncentracemi A a B jsou pozorovány (Greco et al., 1995). Zatímco šachovnicové synergické testování bylo široce používáno, několik autorů zaznamenalo významné nedostatky v tomto přístupu (Greco et al., 1995, Bonapace et al., 2002, Hsieh et al., 1993, Bonapace et al., 2000, White et al., 1996), které vyplývaly hlavně ze skutečnosti, že pouze jedna nebo několik jamek v celé desce skutečně poskytuje informace o synergii. Tento nedostatek statistické robustnosti způsobuje, že výsledky jsou citlivé na náhodné experimentální chyby. Znamená to také, že zdánlivě triviální rozdíly v metodě interpretace výsledků šachovnicového modelu mohou vést k velmi rozdílným závěrům, a to i pro tytéž nezpracované údaje (Bonapace et al., 2002, Hsieh et al., 1993).

Statisticky robustní jsou tzv. FIC (fractional inhibitory concentration) měření (He et al., 2015).

#### 3.4.1.1 Frakční inhibiční koncentrace (FIC)

FIC ve směsi látek je definována jako:

$$\mathbf{FIC}_{AB} = \frac{\mathbf{MIC}_A \text{ (kombinace)}}{\mathbf{MIC}_A \text{ (samostatná)}} + \frac{\mathbf{MIC}_B \text{ (kombinace)}}{\mathbf{MIC}_B \text{ (samostatná)}}$$

kde MIC jsou měřeny pro čisté sloučeniny a ve směsích obou. Neočekává se, že FIC bude nezbytně konstantní pro všechny poměry sloučenin A a B, nicméně pokud je poměr koncentrace podobný poměru MIC, hodnoty FIC jsou poměrně necitlivé vůči malým změnám v poměru mezi A a B.

He et al. (2015) ve své práci používá jednoduchou matematickou definici  $\text{FIC} < 1$  pro synergii,  $1 \leq \text{FIC} \leq 2$  pro aditivitu až k nezávislosti a  $\text{FIC} > 2$  pro antagonismus. Zmiňuje však, že mnoho autorů postupuje podle konzervativnějších zásad a používá



následující hodnoty: synergie:  $FIC \leq 0,5$ ; additivita:  $0,5 < FIC \leq 2$ ; indiference:  $2 < FIC \leq 4$ ; antagonismus  $FIC > 4$ .

## 4 Vlastní práce

### 4.1 Materiál a metody

#### 4.1.1 Testované látky

Palmojádrový olej (*Elaeis guineensis*), olej z palmy kokosové (*Cocos nucifera*) a oxacilin společnosti Sigma-Aldrich (ČR). Tucuma (*Astrocaryum vulgare*) společně s muru-muru olejem (*Astrocaryum murumuru*) byly zakoupeny u firmy Sweet Natural Botanicals (USA). Palmové oleje byly převedeny na olejovou emulzi rozpuštěním v dimethylsulfoxidu za přidání kapky detergentu Tween 80 (Sigma-Aldrich, ČR). Konečná koncentrace DMSO a Tween 80 nepřesáhla ve vzorcích 1%. Následně bylo odpovídající množství emulze pro vytvoření zásobního roztoku oleje o koncentraci 4096 µg/ml rozpuštěno v Mueller-Hintonově bujónu (MHB) (Oxoid, UK) s přidavkem porcinní pankreatické lipázy (Sigma-Aldrich, ČR), která zajistila uvolnění MK z triacylglycerolů. Množství lipázy bylo stanoveno na základě molekulové hmotnosti převažujících MCFA v olejích a dle enzymatické aktivity použité lipázy. Emulze byla hodinu třepána ve vodní lázni při 37 stupních Celsia. Oxacilin byl přidán do odpovídajícího množství destilované vody. Pro vytvoření zásobních roztoků antibiotika o konečné koncentraci 16 µg/ml (MSSA) a 256 µg/ml (MRSA) bylo rozpuštěno příslušné množství vodného roztoku antibiotika v MHB.

#### 4.1.2 Bakteriální kmeny a kultivační podmínky

Použitými bakteriálními kmeny byly standardní kmeny *S. aureus* ATCC 29213 a ATCC 43300, které představují kmeny na methicilin citlivé a rezistentní, a jeden klinický izolát (SA1) poskytnutý Fakultní nemocnicí v Motole (Praha, ČR). Pro kultivaci bakterií byl použit MHB v množství 10,5 g/l s přidavkem (na 1 litr): 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 6,1 g TrisBase. Následně byl upraven na hodnotu pH 7,6 za pomoci 35% HCl a povařen za stálého míchání (tab. 1).

**Tabulka 1: Složení kultivačního média**

Složka	Množství (g/l)
MHB	10,5
NaCl	8

KCl	0,2
TrisBase	6,1
pH	7,6

**Tabulka 2: Složení Mueller-Hintonova bujónu**

Složka	Množství (g/l)
masová infúze	2
hydrolyzát kaseinu	17,5
škrob	1,5

#### 4.1.3 Stanovení profilu zastoupení MK v testovaných olejích

Zastoupení jednotlivých MCFA a jejich koncentrace byla stanovena plynovou chromatografií (GC-FID) v laboratoři Výzkumného ústavu živočišné výroby (Praha - Uhřetěves, ČR). Extrahované MK byly převedeny na methylestery alkalickou transmethyloací dle standardu ISO 5509 (2001). Vzniklé methylestery se následně analyzovaly za použití plynového chromatografu HP 6890 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA). Použita byla 60 m DB-23 kapilární kolona (JaW Scientific, Folsom, USA). Jednotlivé MK byly identifikovány porovnáním retenčních časů analyzovaných MK se 37 standardy FAME Mix (Sigma-Aldrich, ČR).

#### 4.1.4 Stanovení minimálních inhibičních koncentrací testovaných látek a hodnocení kombinačního účinku testovaných látek šachovnicovou metodou

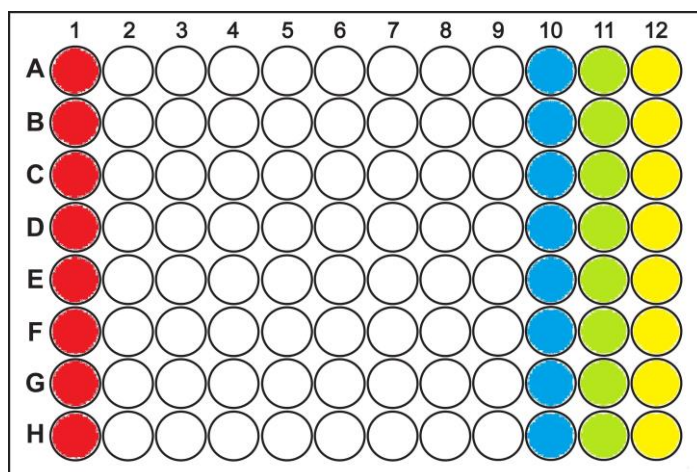
Minimální inhibiční koncentrace (MIC) rostlinných olejů s obsahem mastných kyselin o střední délce řetězce a antibiotik byly určeny pomocí *in vitro* mikrodiluční metody s živným médiem v mikrotitrační destičce o 96ti jamkách. Pro vytvoření testovaných kombinací bylo 8 dvojnásobných sériových ředění oxacilinu pipetovaných z horizontálních řad mikrotitrační destičky následně křížově ředěno vertikálně pipetovanými osmi dvojnásobnými sériovými ředěními naštěpeného testovaného oleje za pomoci automatické pipetovací platformy Freedom EVO 100 vybavené čtyřkanálovým manipulačním ramenem (Tecan, Männedorf, CH) v laboratořích Fakulty tropického zemědělství (FTZ-ČZU, ČR). Takto vytvořené destičky poskytují 64 různých kombinací

koncentrací k testování (Obr. 11). Destičky byly inokulovány bakteriální suspenzí (konečná hustota  $5 \times 10^5$  CFU/ml) a inkubovány při 37 °C po dobu 24 h. Nárůst bakterií byl následně měřen spektrofotometricky za použití Multimode Reader Cytation 3 (BioTek Instruments, Winooski, VT) při 405 nm.

Jako MIC byly určeny nejnižší zjištěné koncentrace olejů a oxacilinu, které inhibovaly bakteriální růst ve více nebo stejně jak 80% při srovnání s bakteriální kontrolou růstu. MIC prezentované v této práci jsou průměrem hodnot získaných ze tří nezávislých experimentů, provedených vždy v triplicátu. Pro kontrolu bakteriálního růstu bylo provedeno barvení thiazolylovou modří (Sigma-Aldrich, ČR; Obr. 12). Účinky kombinací antibiotika a oleje byly následně určeny podle hodnoty indexů frakční inhibiční koncentrace (FIC), které byly vypočítány dle vzorce:

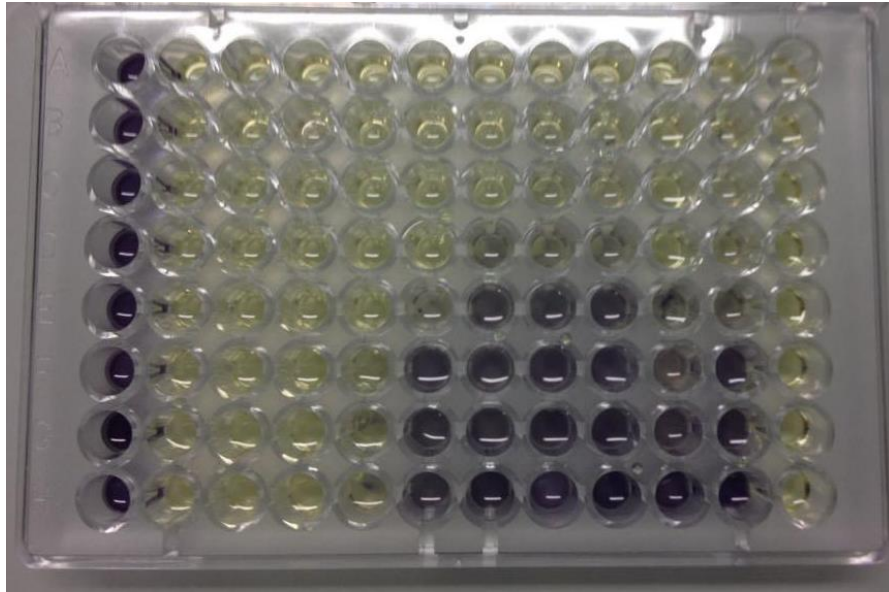
$$FIC_{AB} = \frac{MIC_A \text{ (kombinace)}}{MIC_A \text{ (samostatná)}} + \frac{MIC_B \text{ (kombinace)}}{MIC_B \text{ (samostatná)}}$$

Dle hodnot  $FIC_i$  lze definovat čtyři různé způsoby interakce (He et al., 2015): synergie:  $FIC \leq 0,5$ ; additivita:  $0,5 < FIC \leq 2$ ; indiference:  $2 < FIC \leq 4$ ; antagonismus  $FIC > 4$ .



**Obrázek 11: Design mikrotitrační destičky pro experiment**

**Červeně:** kontrola bakteriálního růstu, **žlutě:** kontrola čistoty, **zeleně:** sestupná ředící řada oleje, **modře:** sestupná ředící řada antibiotika. Nezabarvené jamky jsou kombinace antibiotika a oleje.



**Obrázek 12: Mikrotitrační destička po experimentu**

## 5 Výsledky

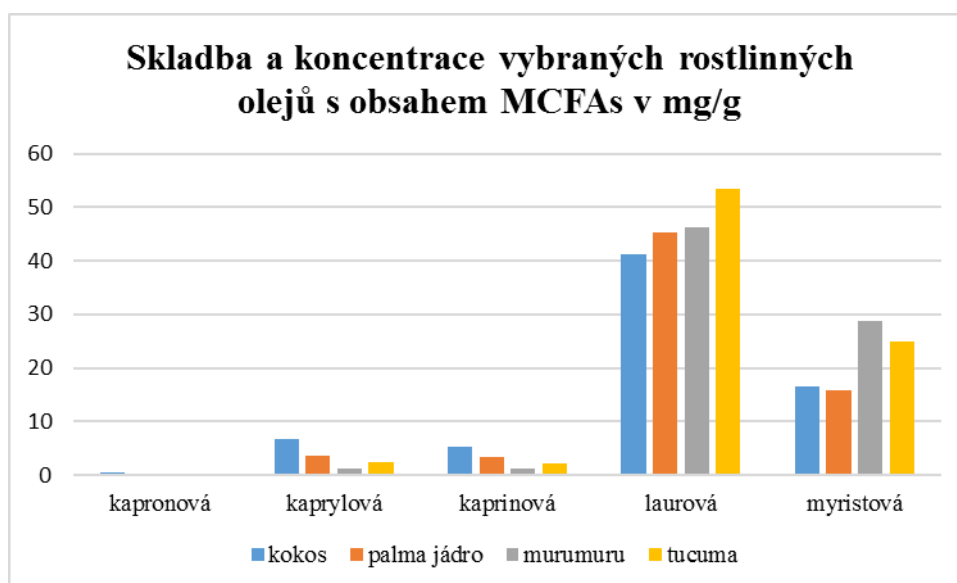
### 5.1 Plynová chromatografie použitých olejů

Porovnáním retenčních časů jednotlivých analyzovaných MK se standardy bylo zjištěno složení všech zkoumaných rostlinných olejů. Koncentrace jsou uvedeny v mg/g. Jedná se o průměr dvou analýz, přičemž každá byla provedena v triplicátu. V nejvyšším množství byla zjištěna ve všech olejích kyselina laurová.

**Tabulka 3: Koncentrace MCFA v použitých olejích v mg/g**

Původ oleje	Mastná kyselina				
	kapronová	kaprylová	kaprinová	laurová	myristová
kokos	0,55	6,73	5,29	<b>41,31</b>	16,5
palma jádro	0,25	3,48	3,27	<b>45,24</b>	15,85
murumuru	0,10	1,29	1,30	<b>46,34</b>	28,72
tucuma	0,21	2,47	2,15	<b>53,37</b>	24,82

**Graf 1: Skladba a koncentrace vybraných rostlinných olejů s obsahem MCFAs v mg/g**



## 5.2 Kombinační efekt vybraných olejů s oxacilinem

Vybrané oleje vykazují s oxacilinem antagonistické účinky u všech testovaných kmenů *S. aureus* v koncentraci 2048 mg/l. Olej z *A. murumuru* zároveň i v koncentraci 1024 mg/l u kmenu 43300 a hodnoty blížíci se antagonismu byly zjištěny i u kmenu SA1. Olej z *A. vulgare* vykazoval antagonistické účinky i v koncentraci 1024 mg/l u kmenů 43300 a SA1.

MIC oxacilinu se zvyšovaly se snižující se koncentrací vybraných olejů.

**Tabulka 4: Kombinační efekt vybraných olejů s oxacilinem proti *S. aureus* zjištěný pomocí šachovnicového modelu – průměr tří analýz, každá provedena v triplikátu**

MIC látek samotných (mg/L):		oxacilin s <i>A. murumuru</i> olejem v koncentraci (mg/L):																	
		2048		1024		512		256		128		64		32		16			
<i>S. aureus</i> kmen	MIC OXA	MIC OLEJ	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	
29213	1,08	369,78	0,06	<b>5,60</b>	0,06	2,83	0,06	1,44	0,28	0,96	0,69	0,98	1,29	1,37	1,61	1,57	1,5	1,43	
43300	64	184,89	1	<b>11,09</b>	1,11	<b>5,56</b>	1	2,78	1,67	1,41	2,11	0,73	13,33	0,55	24,89	0,56	46,22	0,81	
SA1	2	298,67	0,06	<b>6,89</b>	0,06	3,46	0,16	1,79	0,26	0,99	0,56	0,71	1	0,71	1,39	0,8	2	1,05	

MIC látek samotných (mg/L):		oxacilin s <i>A. vulgare</i> olejem v koncentraci (mg/L):																	
		2048		1024		512		256		128		64		32		16			
<i>S. aureus</i> kmen	MIC OXA	MIC OLEJ	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	
29213	1,67	242	0,06	<b>8,51</b>	0,06	<b>4,27</b>	0,06	2,16	0,23	1,2	0,44	0,8	1,11	0,93	2,22	1,47	2,89	1,8	
43300	56,89	356	1	<b>5,78</b>	1	2,9	6	1,55	7	0,84	21,67	0,74	30,22	0,71	43,56	0,86	53,33	0,98	
SA1	2	240	0,06	<b>8,56</b>	0,06	<b>4,3</b>	0,07	2,17	0,21	1,17	0,41	0,74	0,63	0,58	1,06	0,66	1,88	1	

MIC látek samotných (mg/L):		oxacilin s <i>C. nucifera</i> olejem v koncentraci (mg/L):																	
		2048		1024		512		256		128		64		32		16			
<i>S. aureus</i> kmen	MIC OXA	MIC OLEJ	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	
29213	0,72	512	0,06	<b>4,09</b>	0,71	2,98	0,32	1,44	0,38	1,02	0,71	1,23	0,94	1,43	2,39	3,37	2	2,80	
43300	49,78	327	1	<b>6,28</b>	1	3,15	1	1,59	6,89	0,92	14,22	0,68	21,33	0,62	28,44	0,67	32	0,69	
SA1	2	241	0,06	<b>6,03</b>	0,06	3,03	0,08	1,54	0,28	0,89	0,58	0,67	1	0,69	1,33	0,76	2	1,05	

MIC látek samotných (mg/L):		oxacilin s <i>E. guineensis</i> olejem v koncentraci (mg/L):																	
		2048		1024		512		256		128		64		32		16			
<i>S. aureus</i> kmen	MIC OXA	MIC OLEJ	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	MIC OXA	FIC	
29213	0,75	427	0,06	<b>4,88</b>	0,06	2,48	0,09	1,32	0,31	1,02	0,53	1	0,69	1,08	0,78	1,11	0,56	0,78	
43300	56,89	512	1	<b>4,02</b>	1	2,02	7	1,12	15,78	0,78	19,56	0,59	32	0,69	37,33	0,72	42,67	0,78	
SA1	2	427	0,06	<b>4,83</b>	0,07	2,43	0,21	1,30	0,40	0,80	0,89	0,74	1,53	0,93	2	1,08	2	1,04	



## 6 Diskuse

Rezistence na antibiotika je fenomén stejně starý jako sám objev antibiotik. Rozvoj a rozšíření rezistence na v současnosti dostupná antibiotika je celosvětovým problémem (Modi et al., 2014, Spellberg et Gilbert, 2014, Witte, W., 2013, Coates et al., 2011). S nárůstem bakteriální rezistence vůči antibiotikům získaly antimikrobiální látky rostlinného původu ve vědeckém výzkumu pozornost. Použití přírodních antimikrobiálních látek je důležité nejen při konzervaci potravin, ale také při kontrole lidských onemocnění (Moussaoui et Alaoui, 2016).

Mastné kyseliny a zejména ty se středním řetězcem skrývají společně s oleji, ve kterých se přirozeně vyskytují, velký potenciál antimikrobiální léčby. Mastné kyseliny a jejich monoglyceridy, které se běžně vyskytují v přírodních produktech, jsou považovány za netoxické. Přispívají k antimikrobiálním vlastnostem mateřského mléka (Thormar et al., 1987) a kůže (Miller et al., 1988). Úřad pro potraviny a léčiva označil monoestery mastných kyselin jako obecně uznávané a bezpečné. Antistafylokoková aktivita a minimální toxicita mastných kyselin činí tyto formulace potenciálními alternativami k léčbě stafylokokových infekcí (Rouse et al., 2005, Desbois et Smith, 2010).

V současné době existuje pouze malé množství studií antibakteriální aktivity zmiňovaných rostlinných olejů. Několik studií již potvrdilo antibakteriální (i antistafylokokové) účinky MCFA – zejména kyseliny kaprinové (C10:0), laurové (C12:0) a GML (Holland et al., 1994, Rouse et al., 2005, Bergsson et al., 2001, Schlievert et Peterson 2012, Schlievert et al., 1992), ale komplexní studie, která by se zabývala antibakteriálními účinky těchto olejů v kombinaci s antibiotiky, nebyla dosud zpracována. Vzhledem k tomu, že se potraviny obsahující MCFA běžně konzumují (např. kokosový a palmový olej, mléko a mléčné produkty), je žádoucí poznat možné interakce s antibiotiky, a na základě těchto zjištění doporučit či vyloučit současné podávání.

Z výsledků zmíněných v předchozí kapitole vyplývá, že oxacilin působí se všemi naštěpenými oleji antagonisticky v koncentraci 2048 mg/l a to u všech testovaných kmenů (citlivých i rezistentních na oxacilin). U rezistentních kmenů by výsledky mohly poukazovat na zkříženou rezistenci, nicméně podobné výsledky vycházely i u kmenů citlivých na oxacilin. Tyto dvě látky tedy pravděpodobně působí proti sobě a snižují účinek látky samotné.

Zajímavé ale je, že MIC antibiotika se zvyšovala se snižující se koncentrací oleje. To poukazuje na fakt, že MCFA a jejich monoestery (zejména GML, protože v olejích převládá kyselina laurová) z naštěpených olejů podporují antibakteriální působení.

Na základě pozorování v tomto experimentu vyvstává otázka, zda by nebylo vhodné doporučovat při antibiotické léčbě stafylokokových infekcí/onemocnění eliminaci zdrojů MCT tuků, protože i v malých koncentracích působily s antibiotiky antagonisticky a mohly by tedy teoreticky snižovat účinnost antibiotické léčby a podporovat tak dokonce vznik rezistence. Výsledky totiž ukazují, že pro stejný účinek (inhibici) je potřeba antibiotika větší pokud je v kombinaci s naštěpeným olejem než v případě, že se jedná o antibiotikum samotné. Pro takovéto tvrzení je samozřejmě třeba dalšího výzkumu, nicméně potraviny obsahující MCT tuky jsou běžně konzumovány, a to v nemalém množství.

Mezi nejběžnější zdroje MCT tuků v naší stravě patří kokosový olej, palmojádrový olej a mléčné výrobky. U těch je ale obsah MCT (z celkového podílu tuku) malý. Dle Ministerstva zemědělství USA obsahuje jeden šálek plnotučného mléka 0,55 g MCT, zatímco odstředěné mléko obsahuje sotva stopové množství. Jedna polévková lžice másla má 1 g MCT a jeden plátek sýru čedar (1 unce) poskytuje 0,4 g. Kokosový olej a olej z palmových jader jsou největším zdrojem MCT. Oba mají asi 11 g SFA v 1 polévkové lžici oleje, z čehož v případě oleje z palmových jader tvoří MCT 7,4 g a z kokosového oleje je to pak 7,9 g. Výroba i spotřeba kokosového oleje se celosvětově zvyšuje. V roce 2010 ho bylo vyrobeno 3,5 milionu tun. V roce 2010 byla ve Spojených státech hlášena spotřeba 0,4 milionu tun, s průměrnou spotřebou 1,28 kg na obyvatele za rok. V Evropské unii to bylo 0,6 milionu tun, s podobnou průměrnou spotřebou 1,3 kg na jednoho obyvatele za rok (Eyres et al., 2016). To odpovídá necelým 3,6 g na den. V současné době je spotřeba kokosového oleje dokonce o něco málo vyšší a to hned z několika důvodů. Prvním je jeho rostoucí oblíba u zastánců zdravého stravování (panenská verze, lisovaná za studena), druhým využití ve sportu, jelikož MCT se snadno tráví a dají se rychle využít (podobně jako glukóza) k oxidaci na energii. Na závěr nesmíme zapomenout na jeho využití v asijské kuchyni a jako pojidla do dnes tak populárních „raw“ dezertů.

Ve studii Hess et al. (2014) zjistili, že při ~ 0,3 mM působily jak GML, tak jeho složka kyselina laurová baktericidně u rezistentních biofilmů *Staphylococcus aureus*. Při použití MIC antibiotik získaných z planktonických buněk působil GML a kyselina laurová synergicky s gentamicinem a streptomycinem (inhibitory proteinové syntézy), avšak nikoliv ampicilem nebo vankomycinem (působících na buněčnou stěnu), v odstranění detekovatelných životaschopných biofilmových bakterií. Obrázky biofilmů ošetřených pomocí GML naznačují, že GML může usnadnit interakci antibiotik s bakteriemi zakotvenými v matrici. Jejich studie je vůbec první, která zkoumala možnou synergii mezi GML a aminoglykosidy v biofilmovém modelu. Byl zde zaznamenán aditivní baktericidní

účinek, když se GML nebo kyselina laurová kombinovala s GEN, tj. 1 µg/ml GEN eliminoval všechny detekovatelné biofilmové bakterie v kombinaci s 0,3 až 0,5 mM GML nebo kyselinou laurovou. Tento výsledek je pozoruhodný vzhledem k tomu, že 0,35 mM GML je ekvivalentní 100 µg/ml a v dalších studiích zahrnujících planktonické buňky byla MIC GML uváděna  $\geq 10$  µg/ml (Schlievert et al., 1992, Schlievert et Peterson, 2012, Holland et al., 1994). Tato studie tedy došla zřejmě k rozdílným výsledkům, jelikož GML nebo kyselina laurová byla pravděpodobně hlavní účinnou složkou i našich naštěpených olejů (vzhledem k množství 40 - 55 mg/g). Nicméně zároveň zmiňuje fakt, že mechanismus, jakým antibiotika působí baktericidně, bude hrát ve výsledné interakci s GML/kyselinou laurovou velkou roli.

## 7 Závěr

Jeden z cílů této diplomové práce, stanovit minimální inhibiční koncentrace olejů s obsahem mastných kyselin pro vybrané kmeny *Staphylococcus aureus* a antibiotikum oxacilin, byl splněn.

Teoretický úvod do tématu, který shrnuje současné poznatky spojené s antibakteriálními účinky mastných kyselin o střední délce řetězce, jejich vliv na lidské zdraví, ale také problematiku antibiotik, rezistence a rod *Staphylococcus*, byl poskytnut v teoretické části práce.

Praktická část potvrzuje antibakteriální působení naštěpených rostlinných olejů obsahujících MCFAs a tedy i MCFAs samotných. Výsledky této práce získané za pomoci standardizované mikrodiluční metody v 96-jamkové mikrotitrační destičce a vyhodnocené pomocí hodnoty frakční inhibiční koncentrace (FIC), ukazují, že všechny vybrané oleje vykazují s oxacilinem antagonistické účinky u všech vybraných kmenů *S. aureus* v koncentraci 2048 mg/l. Na základě pozorování v tomto experimentu tedy vyvstává otázka, zda by nebylo vhodné doporučovat při antibiotické léčbě stafylokokových infekcí/onemocnění eliminaci zdrojů MCT tuků, protože i v malých koncentracích působily s antibiotiky antagonisticky a mohly by tedy teoreticky snižovat účinnost antibiotické léčby a podporovat tak dokonce vznik rezistence.

## 8 Seznam použitých zdrojů

- Andersson, D. I. 2006. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Current Opinion in Microbiology*. 9 (5). 461–465.
- Asakura, L., Lottenberg, A. M. P., Neves, M. Q. T. S., Nunes, V. S., Rocha, J. C., Passarelli, M., Nakandakare, E. R., Quintão, E. C. 2000. Dietary medium-chain triacylglycerol prevents the postprandial rise of plasma triacylglycerols but induces hypercholesterolemia in primary hypertriglyceridemic subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 71 (3). 701–705.
- Baba, N., Bracco, E. F., Hashim, S. A. 1982. Enhanced thermogenesis and diminished deposition of fat in response to overfeeding with diet containing medium chain triglyceride. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 35 (4). 678–682.
- Bagel, S., Hullén, V., Wiedemann, B., Heisig, P. 1999. Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 43 (4). 868–875.
- Bach, A., Babayan, V. 1982. Medium-chain triglycerides: an update. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 36 (5). 950–962.
- Ball, P. 2007. Conclusions: the future of antimicrobial therapy - Augmentin and beyond. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 30 (Supply 2). S139–S141.
- Bartoloni, A., Bartalesi, F., Mantella, A., Dell'Amico, E., Roselli, M., Strohmeyer, M., Barahona, H. G., Barrón, V. P., Paradisi, F., Rossolini, G. M. 2004. High prevalence of acquired antimicrobial resistance unrelated to heavy antimicrobial consumption. *The Journal of Infectious Diseases*. 189 (7). 1291–1294.
- Bellinati-Pires, R., Waitzberg, D. L., Salgado, M. M., CarneiroSampaio, M. M. 1993. Functional alterations of human neutrophils by medium-chain triglyceride emulsions: evaluation of phagocytosis, bacterial killing, and oxidative activity. *Journal of Leukocyte Biology*. 53 (4). 404–410.
- Bergey, D. H. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology III, Second Edition*. Springer. New York, USA. p. 1422. e-ISBN: 978-0-387-68489-5.
- Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Karlsson, S. M., Steingrímsson, O., Thormar, H. 1998. In vitro inactivation of *Chlamydia trachomatis* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42 (9). 2290–2294.

Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Steingrimsson, O., Thormar, H. 2001. In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45 (11). 3209-3212.

Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Steingrimsson, O., Thormar, H.. 2001. Killing of gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS* 109 (10). 670-678.

Bergsson, G., Steingrimsson, O., Thormar, H. 1999. In vitro susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43 (11). 2790-2792.

Bergsson, G., Steingrimsson, O., Thormar, H.. 2002. Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 20 (4). 258-262.

Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D., Johnston, M. D., Barton, H. A., Wright, G. D. 2012. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*. 7(4). e34953.

Bjarnsholt, T. 2013. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Supplementum*. May (136). 1–51.

Bohnhoff, M., Miller, C. P. 1962. Enhanced susceptibility to Salmonella infection in streptomycin-treated mice. *The Journal of Infectious Diseases*. 111 (2). 117–127.

Bonapace, C. R., Bosso, J. A., Friedrich, L. V., White, R. L. 2002. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 44 (4). 363–366.

Bonapace, C. R., White, R. L., Friedrich, L. V., Bosso, J. A. 2000. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 38 (1). 43–50.

Borel, P., Tyssandier, V., Mekki, N., Grolier, P., Rochette, Y., AlexandreGouabau, M. C., Lairon, D., Azais-Braesco, V. 1998. Chylomicron beta-carotene and retinyl palmitate responses are dramatically diminished when men ingest betacarotene with medium-chain rather than long-chain triglycerides. *The Journal of Nutrition*. 128 (8). 1361–1367.

Bray, G. A., Lee, M., Bray, T. L. 1980. Weight-gain of rats fed medium-chain triglycerides is less than rats fed long-chain triglycerides. *International Journal of Obesity*. 4 (1). 27–32.

Brazil. *Revista Árvore*. 39 (5). 883-892.

Buffie, C. G., Pamer, E. G. 2013. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews, Immunology*. 13 (11). 790–801.

Cater, N. B., Heller, H. J., Denke, M. A. 1997. Comparison of the effects of medium-chain triacylglycerols, palm oil, and high oleic acid sunflower oil on plasma triacylglycerol fatty acids and lipid and lipoprotein concentrations in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 65 (1). 41–45.

Centers for Disease Control and Prevention, Office of Infectious Disease. Antibiotic resistance threats in the United States. 2013. April 10, 2017 [cit. 2017-12-05]. Dostupné z <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>.

Coates, A. R., Hu, Y. 2008. Targeting non-multiplying organisms as a way to develop novel antimicrobials. *Trends in Pharmacological Sciences*. 29 (3). 143–150.

Coates, A., Hu, Y., Bax, R., Page, C. 2002. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nature Reviews, Drug Discovery*. 1 (11). 895–910.

Coates, R. M. A., Halls, G., Hu, Y. 2011. Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology*. 163 (1). 184-194.

Conley, A. J., Kabara, J. J. 1973. Antimicrobial action of esters of polyhydric alcohols. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 4 (5). 501-506.

Cos, P., Tote, K., Horemans, T., Maes, L. 2010. Biofilms: an extra hurdle for effective antimicrobial therapy. *Current Pharmaceutical Design*. 16 (20). 2279–2295.

Costello, E. K., Stagaman, K., Dethlefsen, L., Bohannon, B. J., Relman, D. A. 2012. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science*. 336 (6086). 1255–1262.

Crozier, G., Boisjoeux, B., Chanez, M., Girard, J., Peret, J. 1987. Metabolic effects induced by long-term feeding of medium-chain triglycerides in the rat. *Metabolism - Clinical and Experimental*. 36 (8). 807–814.

Da Re, S., Garnier, F., Guerin, E., Campoy, S., Denis, F., Ploy, M. C. 2009. The SOS response promotes qnrB quinolone-resistance determinant expression. *EMBO Reports*. 10 (8). 929–933.

Dantas, G., Sommer, M. O., Oluwasegun, R. D., Church, G. M. 2008. Bacteria subsisting on antibiotics. *Science*. 320 (5872). 100–103.

D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., Wright, G. D. 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 477(7365). 457-461.

de Menezes, B. P., Rodrigues, L. S., Lourenco, J., de B., e Silva, A. G. M., de Andrade, S. J. T., da Silva, J. A. R., Faturi, C., Garcia, A. R., Nahúm, B. de S., Barbosa, A. V. C., Budel, J. C. de C., Araújo, G. S. 2016. Intake, digestibility, and nitrogen balance of rations

containing different levels of murumuru meal in sheep diets. *Semina-ciencias Agrarias*. 37 (1). 415-421.

Denke, M. A., Grundy, S. M. 1992. Comparison of effects of lauric acid and palmitic acid on plasma lipids and lipoproteins. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 56 (5). 895–898.

Desbois, A. P., Smith, V. J. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*. 85 (6). 1629-1642.

Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., Relman, D. A. 2007. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*. 449 (7164). 811–818.

Dietschy, J. M., Woollett, L. A., Spady, D. K. 1993. The interaction of dietary-cholesterol and specific fatty-acids in the regulation of ldl receptor activity and plasma LDL -cholesterol concentrations. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 676. 11–26.

Drlica, K, Malik, M, Kerns, R. J., Zhao, X. 2008. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52 (2). 385–392.

du Plessis, M., von Gottberg, A., Cohen, C., de Gouveia, L., Klugman, K. P. 2008. *Neisseria meningitidis* intermediately resistant to penicillin and causing invasive disease in South Africa in 2001 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*. 46 (10). 3208–3214.

Dulloo, A. G., Fathi, M., Mensi, N., Girardier, L. 1996. Twenty-fourhour energy expenditure and urinary catecholamines of humans consuming low-to-moderate amounts of medium-chain triglycerides: A dose-response study in a human respiratory chamber. *European Journal of Clinical Nutrition*. 50 (3). 152–158.

Dulloo, A. G., Mensi, N., Seydoux, J., Girardier, L. 1995. Differential-effects of high-fat diets varying in fatty-acid composition on the efficiency of lean and fat tissue deposition during weight recovery after low food-intake. *Metabolism - Clinical and Experimental*. 44 (2). 273–279.

Dussert, S, Guerin, Ch., Andersson, M., Joët, T., Tranbarger, T. J., Pizot, M., Sarah, G., Omere, A., Durand-Gasselín, T., Morcillo, F. 2013. Comparative Transcriptome Analysis of Three Oil Palm Fruit and Seed Tissues That Differ in Oil Content and Fatty Acid Composition. *Plant Physiology*. 162 (3). 1337-1358.

Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., Hayete, B., Collins, J. J. 2007. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*. 3. 91.



- Eckel, R. H., Hanson, A. S., Chen, A. Y., Berman, J. N., Yost, T. J., Brass, E. P. 1992. Dietary substitution of medium-chain triglycerides improves insulin-mediated glucose-metabolism in NIDDM subjects. *Diabetes*. 41 (5). 641–647.
- Eyres, L., Eyres, F. M., Chisholm, A., Brown, C. R. 2016. Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. *Nutrition reviews*. 74 (4). 267-280.
- Ferreira, E. S., Lucien, V. G., Amaral, A. S., Silveira, C. S. 2008. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart). *Alimentos e Nutrição Araraquara*. 19 (4). 427–433.
- Flemming, H-C., Neu, T. R., Wozniak, D. J. 2007. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of Bacteriology*. 189 (22). 7945–7947.
- Flemming, H-C., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews, Microbiology*. 8 (9). 623–633.
- Floss, H. G., Yu, T. W. 2005. Rifamycin-mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chemical Reviews*. 105 (2). 621–632.
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., Stoodley, P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*. 13 (1). 34–40.
- Geliebter, A., Torbay, N., Bracco, E. F., Hashim, S. A., Vanitallie, T. B. 1983. Overfeeding with medium-chain triglyceride diet results in diminished deposition of fat. *The American Journal of Clinical Nutrition* 37 (1). 1–4.
- Gillings, M., Boucher, Y, Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M., Stokes, H. W. 2008. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*. 190 (14). 5095–5100.
- Gould, I. M., Bal, A. M. 2013. New antibiotic agents in the pipeline and how they can overcome microbial resistance. *Virulence*. 4 (2). 185–191.
- Greco, W. R., Bravo, G., Parsons, J. C. 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacological Reviews*. 47 (2). 331–385.
- Guo, W., Choi, J. K., Kirkland, J. L., Corkey, B. E., Hamilton, J. A. 2000. Esterification of free fatty acids in adipocytes: a comparison between octanoate and oleate. *Biochemical Journal*. 349. 463–471.
- Guo, W., Lei, T. G., Wang, T., Corkey, B. E., Han, J. R. 2003. Octanoate inhibits triglyceride synthesis in 3T3-L1 and human adipocytes. *The Journal of Nutrition*. 133 (8). 2512–2518.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*. 11 (7). 1034–1043.

Han, J. R., Farmer, S. R., Kirkland, J. L., Corkey, B. E., Yoon, R., Pirtskhalava, T., Ido, Y., Guo, W. 2002. Octanoate attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *The Journal of Nutrition*. 132 (5). 904–910.

Han, J. R., Hamilton, J. A., Kirkland, J. L., Corkey, B. E., Guo, W. 2003. Medium-chain oil reduces fat mass and downregulates expression of adipogenic genes in rats. *Obesity Research*. 11 (6). 734–744.

He, J., Starr, C. G., Wimley, W. C. 2015. A Lack of Synergy Between Membrane-permeabilizing Cationic Antimicrobial Peptides and Conventional Antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. 1848 (1 Pt A). 8-15.

Hejzlar, M. 1995. *Antibiotika v praxi*. Makropulos (edice: Galén). Praha. 499. ISBN 80-901776-4-6.

Hess, D. J., Henry-Stanley, M. J., Barnes, M. T., Dunny, G. M., Wells, C. L. 2012. Ultrastructure of a novel bacterial form located in *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo catheter-associated biofilms. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 60 (10). 770–776.

Hess, D. J., Henry-Stanley, M. J., Wells, C. L. 2014. Antibacterial Synergy of Glycerol Monolaurate and Aminoglycosides in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58 (11). 6970–6973.

Hill, J. O., Peters, J. C., Swift, L. L., Yang, D., Sharp, T., Abumrad, N., Greene, H. L. 1990. Changes in blood-lipids during 6 days of overfeeding with medium or long-chain triglycerides. *Journal of Lipid Research*. 31 (3). 407–416.

Hill, J. O., Peters, J. C., Yang, D., Sharp, T., Kaler, M., Abumrad, N. N., Greene, H. L. 1989. Thermogenesis in humans during overfeeding with medium-chain triglycerides. *Metabolism - Clinical and Experimental*. 38 (7). 641–648.

Holland, K. T., Taylor, D., Farrell, A. M. 1994. The effect of glycerol monolaurate on growth of, and production of toxic shock syndrome toxin-1 and lipase by, *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 33 (1). 41-55.

Hoshimoto, A., Suzuki, Y., Katsuno, T., Nakajima, H., Saito, Y. 2002. Caprylic acid and medium-chain triglycerides inhibit IL-8 gene transcription in Caco-2 cells: Comparison with the potent histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *British Journal of Pharmacology*. 136 (2). 280–286.

Hsieh, M. H., Yu, C. M., Yu, V. L., Chow, J. W. 1993. Synergy assessed by checkerboard. A critical analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 16 (4). 343–349.

- Chambers, H. F., Deleo, F. R. 2009. Resistance *Staph aureus* to penicillin and methicillin. *Nature Reviews Microbiology*. 7 (9). 629–641.
- Cho, I., Yamanishi, S., Cox, L., Methé, B. A., Zavadil, J., Li, K., Gao, Z., Mahana, D., Raju, K., Teitler, I., Li, H., Alekseyenko, A. V., Blaser, M. J. 2012. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*. 488 (7413). 621–626.
- Jakobsson, H. E., Jernberg, C., Andersson, A. F., Sjolund-Karlsson, M., Jansson, J. K., Engstrand, L. 2010. Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS One*. 5 (3). e9836.
- Jernberg, C., Lofmark, S., Edlund, C., Jansson, J. K. 2007. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME journal*. 1 (1). 56–66.
- Jernberg, C., Lofmark, S., Edlund, C., Jansson, J. K. 2010. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*. 156 (pt 11). 3216–3223.
- Jernberg, C., Sullivan, A., Edlund, C., Jansson, J. K. 2005. Monitoring of antibiotic-induced alterations in the human intestinal microflora and detection of probiotic strains by use of terminal restriction fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (1). 501–506.
- Joesoef, M. R., Schmid, G. P. 1995. Bacterial vaginosis: review of treatment options and potential clinical indications for therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 20. S72–S79.
- Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J., Truant, J. P. 1972. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2 (1). 23–28.
- Kalogeris, T. J., Monroe, F., Demichele, S. J., Tso, P. 1996. Intestinal synthesis and lymphatic secretion of apolipoprotein A-IV vary with chain length of intestinally infused fatty acids in rats. *Journal of Nutrition*. 126. 2720–2729.
- Karpe, F. 1999. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine*. 246 (4). 341–355.
- Kasai, M., Maki, H., Nosaka, N., Aoyama, T., Ooyama, K., Uto, H. 2003. Effect of medium-chain triglycerides on the postprandial triglyceride concentration in healthy men. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 67 (1). 46–53.
- Klein, E., Smith, D. L., Laxminarayan, R. 2007. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005. *Emerging Infectious Diseases*. 13 (12). 1840–1846.

Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T., Ley, R. E. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (suppl 1). 4578–4585.

Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Collins, J. J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews, Microbiology*. 8 (6). 423-435.

Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., Collins, J. J. 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. 130 (5). 797–810.

Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Wierzbowski, J., Cottarel, G., Collins, J. J. 2008. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell*. 135 (4). 679–90.

Kono, H., Fujii, H., Asakawa, M., Maki, A., Amemiya, H., Hirai, Y., Matsuda, M., Yamamoto, M. 2004. Medium-chain triglycerides enhance secretory IgA expression in rat intestine after administration of endotoxin. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 286 (6). G1081–G1089.

Krotkiewski, M. 2001. Value of VLCD supplementation with medium chain triglycerides. *International Journal of Obesity*. 25 (9). 1393–1400.

Lambert, M. S., Botham, K. M., Mayes, P. A. 1995. Variations in composition of dietary fats affect hepatic-uptake and metabolism of chylomicron remnants. *Biochemical Journal*. 310 (3). 845–852.

Lambert, P. A. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57 (10). 1471–1485.

Lee, H. H., Molla, M. N., Cantor, C. R., Collins, J. J. 2010. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature*. 467 (7311). 82–85.

Levy, S. B., Marshall, B., Schluederberg, S., Rowse, D., Davis, J. 1988. High frequency of antimicrobial resistance in human fecal flora. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 32 (12). 1801–1806.

Lima, R. P., Souza da Luz, P. T., Braga, M., dos Santos Batista, P. R., Ferreira da Costa, C. E., Zamian, J. R., Santos do Nascimento, L. A., da Rocha Filho, G. N. 2017. Murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) butter and oils of buriti (*Mauritia flexuosa* Mart.) and pracaxi (*Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze) can be used for biodiesel production: Physico- chemical properties and thermal and kinetic studies. *Industrial Crops and Products*. 97. 536-544.

Lofmark, S., Jernberg, C., Jansson, J. K., Edlund, C. 2006. Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. and resistance genes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58 (6). 1160–1167.

Looft, T., Johnson, T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfeld, R. D., Sul, W. J., Stedtfeld, T. M., Chai, B., Cole, J. R., Hashsham, S. A., Tiedje, J. M., Stanton, T. B. 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109 (5). 1691–1696.

Lugo-Miro, V. I., Green, M., Mazur, L. 1992. Comparison of different metronidazole therapeutic regimens for bacterial vaginosis. A meta-analysis. *JAMA*. 268 (1). 92–95.

Lüllman, H., Mohr, K., Hein, L. 2012. *Barevný atlas farmakologie*. Grada Publishing, a. s. Praha. p. 347. ISBN: 978-80-247-3908-3.

Magnusson, I., Low, S. B., McArthur, W. P., Marks, R. G., Walker, C. B., Maruniak J., Taylor, M., Padgett, P., Jung, J., Clark, W. B. 1994. Treatment of subjects with refractory periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 21 (9). 628–637.

Maia, G. C. H. M., Campos, M. S., Barros-Monteiro, J., Castillo, J. E. L., Faleiros, M. S., Sales, R. S. A., Galeno, D. M. L., Lira, E., Souza, F. Ch. A., Ortiz, C., Morales, L., Carvalho, R. P. 2014. Effects of *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Tucumã) on Diet-Induced Dyslipidemic rats. *Journal of Nutrition and Metabolism*. Article ID 202367. 9.

Marten, B., Pfeuffer, M., Schrezenmeir, J. 2006. Medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal*. 16. 1374–1382.

Mekki, N., Charbonnier, M., Borel, P., Leonardi, J., Juhel, C., Portugal, H., Lairon, D. 2002. Butter differs from olive oil and sunflower oil in its effects on postprandial lipemia and triacylglycerol-rich lipoproteins after single mixed meals in healthy young men. *Journal of Nutrition*. 132 (12). 3642–3649.

Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D. M., Katan, M. B. 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*. 77 (5). 1146–115.

Miller, C. P., Bohnhoff, M., Rifkind, D. 1957. The effect of an antibiotic on the susceptibility of the mouse's intestinal tract to *Salmonella* infection. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 68. 51–55.

Miller, S. J., Aly, R., Shinefeld, H. R., Elias, P. M. 1988. In vitro and in vivo antistaphylococcal activity of human stratum corneum lipids. *Archives of Dermatology*. 124 (2). 209-215.

- Modi, S. R., Collins, J. J., Relman, D. A. 2014. Antibiotics and the gut microbiota. *The Journal of Clinical Investigation*. 124 (10). 4212-4218.
- Moussaoui, F., Alaoui, T. 2016. Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6 (1). 32-37.
- Nagata, J., Kasai, M., Watanabe, S., Ikeda, I., Saito, M. 2003. Effects of highly purified structured lipids containing medium-chain fatty acids and linoleic acid on lipid profiles in rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 67 (9). 1937–1943.
- Neyts, J., Kristmundsdottir, T., De Clercq, E., Thormar, H. 2000. Hydrogels containing monocaprin prevent intravaginal and intracutaneous infections with HSV-2 in mice: impact on the search for vaginal microbicides. *Journal of Medicinal Virology*. 61 (1). 107-110.
- Ng KM, Ferreyra, J. A., Higginbottom, S. K., Lynch, J. B., Kashyap, P. C., Gopinath, S., Naidu, N., Choudhury, B., Weimer, B. C., Monack, D. M., Sonnenburg, J. L. 2013. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature*. 502 (7469). 96–99.
- Noguchi, O., Takeuchi, H., Kubota, F., Tsuji, H., Aoyama, T. 2002. Larger diet-induced thermogenesis and less body fat accumulation in rats fed medium-chain triacylglycerols than in those fed long-chain triacylglycerols. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 48 (6). 524–529.
- Nosaka, N., Maki, H., Suzuki, Y., Haruna, H., Ohara, A., Kasai, M., Tsuji, H., Aoyama, T., Okazaki, M., Igarashi, O., Kondo, K.. 2003. Effects of margarine containing medium-chain triacylglycerols on body fat reduction in humans. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 10 (5). 290–298.
- Oguntibeju, O., Esterhuysen, A., Truter, E. 2009. Red palm oil: nutritional, physiological and therapeutic roles in improving human wellbeing and quality of life. *British Journal of Biomedical Science*. 66 (4). 216–222.
- Piddock, L. J. 2012. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? *The Lancet - Infectious Diseases*. 12 (3). 249–253.
- Projan, S. J., Brown-Skrobot, S., Schlievert, P. M., Vandenesch, F., Novick, R. P.. 1994. Glycerol monolaurate inhibits the production of beta-lactamase, toxic shock toxin-1, and other staphylococcal exoproteins by interfering with signal transduction. *Journal of Bacteriology*. 176 (14). 4204-4209.

Quinn, G. A., Maloy, A. P., Banat, M. M., Banat, I. M. 2013. A comparison of effects of broad-spectrum antibiotics and biosurfactants on established bacterial biofilms. *Current Microbiology*. 67 (5). 614–623.

Riccardi, G., Giacco, R., Rivellese, A. A. 2004. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clinical Nutrition*. 23 (4). 447–456.

Rice, L. B. 2010. Progress and challenges in implementing the research on ESKAPE pathogens. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1. S7–S10.

Rolland, V., Roseau, S., Fromentin, G., Nicolaidis, S. V., Tome, D., Even, P. C. 2002. Body weight, body composition, and energy metabolism in lean and obese Zucker rats fed soybean oil or butter. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 75 (1). 21–30.

Ronis, M. J. J., Korourian, S., Zipperman, M., Hakkak, R., Badger, T. M. 2004. Dietary saturated fat reduces alcoholic hepatotoxicity in rats by altering fatty acid metabolism and membrane composition. *Journal of Nutrition* 134 (4). 904–912.

Rouse, M. S., Rotger, M. M., Piper, K. E., Steckelberg, J. M., Scholz, M., Andrews, J., Patel, R. 2005. In Vitro and In Vivo Evaluations of the Activities of Lauric Acid Monoester Formulations against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49 (8). 3187-3191.

Ruzin, A., Novick, R. P. 1998. Glycerol monolaurate inhibits induction of vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*. 180 (1). 182-185.

Sato, K., Cho, Y., Tachibana, S., Chiba, T., Schneider, W. J., Akiba, Y. 2005. Impairment of VLDL secretion by medium-chain fatty acids in chicken primary hepatocytes is affected by the chain length. *The Journal of Nutrition*. 135 (7). 1636–1641.

Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K., Grossart, H. P. 2013. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*. 4 (47). doi: 10.3389/fmicb.2013.00047.

Schlievert, P. M., Deringer, J. R., Kim, M. H., Projan, S. J., Novick., R. P. 1992. Effect of glycerol monolaurate on bacterial growth and toxin production. *Antimicrobial Agents in Chemotherapy*. 36 (3). 626-631.

Schlievert, P. M., Peterson, M. L. 2012. Glycerol Monolaurate Antibacterial Activity in Broth and Biofilm Cultures. *PLoS One*. 7 (7). e40350.

Sidossis, L. S., Stuart, C. A., Shulman, G. I., Lopaschuk, G. D., Wolfe, R. R. 1996. Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the mitochondria. *Journal of Clinical Investigation*. 98 (10). 2244–2250.

Sjölund, M., Wreiber, K., Andersson, D. I., Blaser, M. J., Engstrand, L. 2003. Long-term persistence of resistant *Enterococcus* species after antibiotics to eradicate *Helicobacter pylori*. *Annals of Internal Medicine*. 139 (6). 483–487.

Soares, G. M. S., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Cortelli, S. C., Duarte, P. M., Feres, M. 2012. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *Journal of Applied Oral Science*. 20 (3). 295-304.

Sommer, M. O., Dantas, G., Church, G. M. 2009. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*. 325 (5944). 1128–1131.

Soulsby, L. 2008. The 2008 Garrod Lecture: antimicrobial resistance-animals and the environment. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 62 (2). 229–233.

Spellberg, B., Gilbert, D. N. 2014. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clinical Infectious Diseases*. 59 (suppl 2). S71–S75.

Spratt, B. G. 1980. Biochemical and genetical approaches to the mechanism of action of penicillin. *Philosophical Transactions of the Royal Society in London, Series B - Biological Sciences*. 289 (1036). 273–283.

Srivastava, S., Singh, M., George, J., Bhui, K., Murari, S. A., Shukla, Y. 2010. Genotoxic and carcinogenic risks associated with the dietary consumption of repeatedly heated coconut oil. *The British Journal of Nutrition*. 104 (9). 1343-1352.

St Onge, M. P., Bourque, C., Jones, P. J. H., Ross, R., Parsons, W. E. 2003b. Medium-versus long-chain triglycerides for 27 days increases fat oxidation and energy expenditure without resulting in changes in body composition in overweight women. *International Journal of Obesity*. 27 (1). 95–102.

St Onge, M. P., Ross, R., Parsons, W. D., Jones, P. J. H. 2003a. Medium-chain triglycerides increase energy expenditure and decrease adiposity in overweight men. *Obesity Research*. 11 (3). 395–402.

Stouthard, J. M. L., Endert, E., Romijn, J. A., Sauerwein, H. P. 1994. Infusion of long-chain or medium-chain triglycerides inhibits peripheral glucose-metabolism in men. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 18 (5). 436–441.

Stubbs, R. J., Harbron, C. G. 1996. Covert manipulation of the ratio of medium- to long-chain triglycerides in isoenergetically dense diets: Effect on food intake in ad libitum feeding men. *International Journal of Obesity*. 20 (5). 435–444.



Swift, L. L., Hill, J. O., Peters, J. C., Greene, H. L. 1992. Plasma-lipids and lipoproteins during 6 d of maintenance feeding with long-chain, medium-chain, and mixed-chain triglycerides. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 56 (5). 881–886.

Swift, L. L., Hill, J. O., Peters, J. C., Greene, H. L. 1990. Medium-chain fatty acids: evidence for incorporation into chylomicron triglycerides in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 52. 834–836.

Tachibana, S., Sato, K., Takahashi, T., Akiba, Y. 2002. Octanoate inhibits very low-density lipoprotein secretion in primary cultures of chicken hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology A - Molecular and Integrative Physiology*. 132 (3). 621–627.

Tanaka, S., Saitoh, O., Tabata, K., Matsuse, R., Kojima, K., Sugi, K. 2001. Medium-chain fatty acids stimulate interleukin-8 production in Caco-2 cells with different mechanisms from long-chain fatty acids. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 16. 748–754.

Tangden T. 2014. Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 119 (2). 149-153.

Taubes, G. 2008. The bacteria fight back. *Science*. 321 (5887). 356–361.

Tholstrup, T., Ehnholm, C., Jauhiainen, M., Petersen, M., Hoy, C. E., Lund, P., Sandström, B. 2004. Effects of medium-chain fatty acids and oleic acid on blood lipids, lipoproteins, glucose, insulin, and lipid transfer protein activities. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79 (4). 564–569.

Thomas, T. R., Horner, K. E., Langdon, M. M., Zhang, J. Q., Krul, E. S., Sun, G. Y., Cox, R. H. 2001. Effect of exercise and medium-chain fatty acids on postprandial lipemia. *Journal of Applied Physiology*. 90 (4). 1239–1246.

Thormar, H., Bergsson, G., Gunnarsson, E., Georgsson, G., Witvrouw, M., Steingrimsson, O., De Clercq, E., Kristmundsdottir, T. 1999. Hydrogels containing monocaprin have potent microbicidal activities against sexually transmitted viruses and bacteria in vitro. *Sexually Transmitted Infections*. 75 (3). 181-185.

Thormar, H., Isaacs, C. E., Brown, H. R., Barshatzky, M. R., Pessolano, T. 1987. Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 31 (1). 27-31.

Thrum, H. 1977. Classes of antibiotics and their mechanisms of action. *Zeitschrift für die gesamte innere Medizin und ihre Grenzgebiete*. 32 (14). 209-214.

Tomasz, A. 1979. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 33. 113–137.

- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., Fowler, V. G. Jr. 2015. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*. 28 (3). 603-661.
- Toprak, E., Veres, A., Michel, J. B., Chait, R., Hartl, D. L., Kishony, R. 2012. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nature Genetics*. 44 (1). 101–105.
- Tsai, Y. H., Park, S., Kovacic, J., Snook, J. T. 1999. Mechanisms mediating lipoprotein responses to diets with medium-chain triglyceride and lauric acid. *Lipids*. 34 (9). 895–905.
- Tsuji, H., Kasai, M., Takeuchi, H., Nakamura, M., Okazaki, M., Kondo, K. 2001. Dietary medium-chain triacylglycerols suppress accumulation of body fat in a double-blind, controlled trial in healthy men and women. *The Journal of Nutrition*. 131 (11). 2853–2859.
- Vakulenko, S. B., Mobashery, S. 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical Microbiology Reviews*. 16 (3). 430–450.
- van Cleef, B. A., Verkade, E. J., Wulf, M. W., Buiting, A. G., Voss, A., Huijsdens, X. W., van Pelt, W., Mulders, M. N., Kluytmans, J. A. 2010. Prevalence of livestock-associated MRSA in communities with high pig-densities in the Netherlands. *PLoS ONE*. 5 (2). e9385.
- Van Wymelbeke, V., Louis-Sylvestre, J., Fantino, M. 2001. Substrate oxidation and control of food intake in men after a fat-substitute meal compared with meals supplemented with an isoenergetic load of carbohydrate, long-chain triacylglycerols, or medium-chain triacylglycerols. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 74 (5). 620–630.
- Ved, H. S., Gustow, E., Mahadevan, V., Pieringer, R. A. 1984. Dodecylglycerol. A new type of antibacterial agent which stimulates autolysin activity in *Streptococcus faecium* ATCC 9790. *The Journal of Biological Chemistry*. 259 (13). 8115-8121.
- Ved, H. S., Gustow, E., Pieringer, R. A. 1984. Inhibition of peptidoglycan synthesis of *Streptococcus faecium* ATCC 9790 and *Streptococcus mutans* BHT by the antibacterial agent dodecyl glycerol. *Bioscience Reports*. 4 (8). 659-664.
- Ventola, C. L. 2015. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*. 40 (4). 277-283.
- Walker, C. B. 1996a. The acquisition of antimicrobial resistance in the periodontal microflora. *Periodontology 2000*. 10. 79–88.
- Walker, C. B. 1996b. Selected antimicrobial agents: mechanisms of action, side effects and drug interactions. *Periodontology 2000*. 10. 12–28.

Wanten, G. J., Janssen, F. P., Naber, A. H. 2002. Saturated triglycerides and fatty acids activate neutrophils depending on carbon chain-length. *European Journal of Clinical Investigation*. 32 (4). 285–289.

Wanten, G., van Emst-De Vries, S., Naber, T., Willems, P. 2001. Nutritional lipid emulsions modulate cellular signaling and activation of human neutrophils. *Journal of Lipid Research*. 42. 428–436.

White, M. D., Papamandjaris, A. A., Jones, P. J. H. 1999. Enhanced postprandial energy expenditure with medium-chain fatty acid feeding is attenuated after 14 d in premenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 69 (5). 883–889.

White, R. L., Burgess, D. S., Manduru, M., Bosso, J. A. 1996. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40 (8). 1914–1918.

Xie, C. L., Woollett, L. A., Turley, S. D., Dietschy, J. M. 2002. Fatty acids differentially regulate hepatic cholesteryl ester formation and incorporation into lipoproteins in the liver of the mouse. *Journal of Lipid Research*. 43 (9). 1508–1519.

Yocum, R. R., Rasmussen, J. R., Strominger, J. L. 1980. The mechanism of action of penicillin. Penicillin acylates the active site of *Bacillus stearotherophilus* D-alanine carboxypeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 255 (9). 3977–3986.

Yost, T. J., Eckel, R. H. 1989. Hypocaloric feeding in obese women— Metabolic effects of medium-chain triglyceride substitution. *American Journal of Clinical Nutrition*. 49 (2). 326–330.

Yost, T. J., Erskine, J. M., Gregg, T. S., Podlecki, D. L., Brass, E. P., Eckel, R. H. 1994. Dietary substitution of medium-chain triglycerides in subjects with non-insulin-dependent diabetes-mellitus in an ambulatory setting - Impact on glycemic control and insulin-mediated glucose-metabolism. *Journal of the American College of Nutrition*. 13 (6). 615–622.

Yuyama, L. K. O., Maeda, R. N., Pantoja, L., Aguilar, J. P. L., Marinho, H. A. 2008. Processamento e avaliação da vida-de-prateleira do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) desidratado e pulverizado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 28 (2). 408-412.

Zapolska-Downar, D., Siennicka, A., Kaczmarczyk, M., Kolodziej, B., Naruszewicz, M. 2004. Butyrate inhibits cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in cultured endothelial cells: the role of NFkappaB and PPARalpha. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 15 (4). 220–228.

Zhanel, G. G., Trapp, S., Gin, A. S., DeCorby, M., Lagace-Wiens, P. R., Rubinstein, E., Hoban, D. J., Karlowsky, J. A. 2008. Dalbavancin and telavancin: novel lipoglycopeptides for the treatment of Gram-positive infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 6 (1). 67–81.

Zumla, A. I., Gillespie, S. H., Hoelscher, M., Philips, P. P., Cole, S. T., Abubakar, I., McHugh, T. D., Schito, M., Maeurer, M., Nunn, A. J. 2014. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. *The Lancet - Infectious Diseases*. 14 (4). 327–340.