

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

VYHODNOCENÍ AKTIVITY POTENCIÁLNĚ ANTIBAKTERIÁLNÍCH LÁTEK
POMOCÍ MIKRODILUČNÍ BUJŇONOVÉ METODY

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Autor:

Bc. Jana Pospíchalová

Hradec Králové, 2015

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

Datum:

Podpis:

Děkuji Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za cenné připomínky a čas, který mi věnovala. Dále děkuji paní Idě Dufkové za ochotu a pomoc při zpracovávání experimentální části.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Bc. Jana Pospíchalová

Školitel: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vyhodnocení aktivity potenciálně antibakteriálních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody

Cílem diplomové práce je zhodnocení aktivity potenciálně antibakteriálních látek syntetizovaných na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Pro testování antimikrobiální aktivity byla použita mikrodiluční bujónová metoda vhodná pro kvantitativní stanovení antimikrobiální citlivosti. Látky byly testovány na 8 bakteriálních kmenech zahrnujících grampozitivní i gramnegativní bakterie včetně rezistentních původců závažných nozokomiálních infekcí.

52 testovaných látek bylo rozděleno do 6 skupin na základě společné struktury. Jako nejúčinnější skupina byla vyhodnocena skupina derivátů *N*-benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidu a nejúčinnější látkou ze všech testovaných byl 3-chloro-*N*-(3,4-dichlorobenzyl)pyrazin-2-karboxamid patřící do této skupiny. Nejcitlivější vůči testovaným látkám se ukázal *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Bc. Jana Pospíchalová

Supervisor: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Evaluation of activity of potential antibacterial substances through the use of microdilution broth method

The aim of this thesis is to evaluate activity of potential antibacterial substances synthesized at the Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové.

For testing of the antimicrobial activity was used microdilution broth method. This method is suitable for the quantitative determination of antimicrobial susceptibility. The substances were tested at eight bacterial strains, which consisted of Gram positive and Gram negative bacteria including resistant agents of serious nosocomial infections.

52 tested substances were divided into 6 groups based on a common structure. The most effective group was evaluated by a group of N-benzyl-3-chloro-pyrazin-2-carboxamide and the most effective substance of all tested was 3-chloro-N-(3,4-dichlorobenzyl) pyrazine-2-carboxamide belonging to this group. Most sensitive to the tested substances showed *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*.

SEZNAM ZKRATEK

CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CNS	centrální nervová soustava
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	<i>Escherichia coli</i>
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
EHEC	enterohemoragická <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvazivní <i>E.coli</i>
EPEC	enteropatogenní <i>E.coli</i>
ESBL	extended spekter beta-lactamase
ETEC	enterotoxigenní <i>E.coli</i>
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ID	inkubační doba
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MHB	Mueller-Hintonův bujón
MIC	minimální inhibiční koncentrace
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> methicilin rezistentní
MW	molekulová hmotnost
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP 2'	penicilin binding protein 2
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
VRE	vankomycin rezistentní enterokoky

OBSAH

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE – CÍL PRÁCE	9
1. ÚVOD.....	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Testované bakteriální kmeny	11
2.1.1 Rod <i>Staphylococcus</i>	11
2.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.1.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> - methicillin rezistentní (MRSA).....	12
2.1.2.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	13
2.1.3 Rod <i>Enterococcus</i>	13
2.1.4 Rod <i>Escherichia</i>	14
2.1.4.1 <i>Escherichia coli</i>	14
2.1.5 Rod <i>Klebsiella</i>	15
2.1.5.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
2.1.5.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL pozitivní	15
2.1.6 Rod <i>Pseudomonas</i>	16
2.1.6.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
2.2 Antimikrobní látky.....	17
2.2.1 Desinficiencia	17
2.2.2 Antiseptika	18
2.2.3 Konzervancia	18
2.2.4 Antibiotika	18
2.2.4.1 Mechanismus účinku.....	19
2.2.4.2 Rozdělení antibiotik.....	21
2.2.4.2.1 Beta-laktamy	21
2.2.4.2.2 Tetracykliny	25
2.2.4.2.3 Aminoglykosidy	26
2.2.4.2.4 Makrolidy	26
2.2.4.2.5 Linkosamidy.....	27
2.2.4.2.6 Amfenikoly	27
2.2.4.2.7 Polypeptidová antibiotika.....	28
2.2.4.2.8 Glykopeptidová antibiotika.....	28
2.2.4.2.9 Ansamycinová antibiotika.....	28

2.2.4.2.10	Sulfonamidy a pyrimidiny.....	29
2.2.4.2.11	Nitroimidazoly a nitrofurany.....	29
2.2.4.2.12	Chinolony a fluorochinolony	29
2.2.4.2.13	Antituberkulotika	30
2.2.4.3	Racionální antibiotická terapie	30
2.2.4.3.1	Nesprávné užívání antibiotik.....	31
2.2.5	Antibiotická rezistence	33
2.2.5.1	Podstata vzniku rezistence.....	33
2.2.5.2	Mechanismy vzniku rezistence	34
2.2.5.3	Multirezistence	35
2.2.6	Vyšetření antimikrobiální citlivosti	36
2.2.6.1	Difúzní diskový test.....	36
2.2.6.2	Bujónový mikrodiluční test	37
2.2.6.3	Diluční test v agaru.....	38
2.2.6.4	E-test.....	38
2.2.6.5	Automatizované systémy testování antimikrobiální citlivosti	39
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
3.1	Materiál.....	40
3.1.1	Testované kmeny bakterií.....	40
3.1.2	Testované látky	40
3.2	Metodika	52
3.3	Výsledky	60
3.3.1	Deriváty 3-aminopyrazin-2-karboxamidu	60
3.3.2	Deriváty 3-chlorpyrazin-2-karboxamidu	62
3.3.3	Deriváty <i>N</i> -benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidu	63
3.3.4	Deriváty 3-amino- <i>N</i> -benzylpyrazin-2-karboxamidu	65
3.3.5	Deriváty <i>N</i> -benzylpyrazin-2-aminu	67
3.3.6	Deriváty 5-amino-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu.....	69
4.	DISKUZE	70
5.	ZÁVĚR	77

LITERATURA

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE – CÍL PRÁCE

1. Rešerše literatury
2. Zvládnutí základních mikrobiologických laboratorních technik
3. Vypracování postupu vyhodnocení antibakterální aktivity *in vitro* pomocí mikrodiluční bujónové metody
4. Vlastní experimenty
5. Zpracování výsledků
6. Vyhodnocení výsledků, jejich interpretace a diskuze s využitím teoretických a praktických znalostí dané problematiky

1. ÚVOD

Antibiotika jsou považována za nejdůležitější objevený lék v historii medicíny. Přinesla zlom v naší schopnosti odvolávat smrtelným infekčním onemocněním způsobeným mikroorganismy a pro svoji schopnost vyléčit dosud smrtelná onemocnění byla označována jako „zázračný lék“. Tato skutečnost však vedla k jejich nesprávnému používání a zneužívání a tím i ke vzniku rezistence. Tento nepříznivý výsledek užívání antibiotik ukazuje dvě strany účinku antibiotik a naznačuje, proč by se měla používat s rozmyslem. V léčbě převážné většiny bakteriálních onemocnění jsou antibiotika naštěstí stále velmi účinná, tento stav se však postupně mění (Levy, 2002).

Mezi základní podmínky omezení vzniku a šíření rezistence patří celkové snížení spotřeb antibiotik a jejich správná indikace. Jednou z dalších možností je hledání a rychlé klinické uplatnění nových látek se spolehlivým antibakteriálním účinkem i na rezistentní mikroorganismy (Nyč, 2007).

Tato diplomová práce je zaměřena na hodnocení účinnosti nově syntetizovaných potenciálně antibakteriálních látek. Testování probíhalo na osmi často se vyskytujících bakteriálních kmenech za použití bujónové mikrodiluční metody, která slouží pro určení minimální inhibiční koncentrace antibiotika, tedy koncentrace, jež je schopná zastavit růst daného mikroba.

Mezi nalezením účinné látky a jejím uplatněním v klinické praxi musí látka projít mnoha dalšími procesy hodnocení, které kladou důraz na její účinnost a maximální bezpečnost. Teprve poté je možné danou látku užít v léčbě bakteriální infekce, avšak je stále důležité mít na paměti, že globálně narůstající rezistence k antibiotikům znamená ztrátu účinnosti nejen starších, ale i těch nejnovějších přípravků (Nyč, 2007).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Testované bakteriální kmeny

2.1.1 Rod *Staphylococcus*

Do rodu *Staphylococcus* bylo doposud zařazeno okolo 40 druhů a poddruhů, avšak pouze některé se uplatňují v humánní medicíně. Největší význam pro člověka má z hlediska patogenity koaguláza - pozitivní *Staphylococcus aureus* a koaguláza - negativní *Staphylococcus epidermidis* a dále také *Staphylococcus saprophyticus* (Bednář a kol., 1996).

Jedná se o grampozitivní koky s průměrem přibližně 1 μm , uspořádané ve shlucích tvaru hroznů (řecky *staphyle* - hrozen). Netvoří spóry, bičíky a obvykle ani pouzdra. Až na výjimky jsou fakultativně aerobní, katalázapozitivní a oxidázanegativní (Votava a kol., 2007).

2.1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je podmíněný patogen a může být přítomen v nose či na kůži určitého procenta zdravých lidí. Infikuje nejčastěji místa se sníženou odolností, jako je poškozená kůže, sliznice nebo hematomy měkkých tkání.

Staphylococcus aureus produkuje řadu faktorů virulence vázaných na buňku nebo extracelulárních. Tyto faktory jsou nástrojem k překonání obraných reakcí hostitele, k invazi a ke kolonizaci tkání (Greenwood a kol., 1999).

Mezi faktory vázané na buňku patří peptidoglykany, polysacharidy a protein A, dále pak vázaná koaguláza neboli clumping factor, která mění fibrinogen na fibrin, čímž vyvolává koagulaci plazmy.

Mezi extracelulární faktory virulence patří enzymy a toxiny. Z enzymů to jsou volná koaguláza, fibrinolysin, hyaluronidáza, nukleáza, lipáza, kataláza a penicilináza. K toxicky působícím látkám se řadí cytolyziny, enterotoxiny, toxin syndromu toxického šoku a exfoliatiny.

Staphylococcus aureus vyvolává hnisavé infekce, méně často infekce s toxickými příznaky. Může také způsobovat otravy z potravin.

Nejčastějšími stafylokokovými infekcemi jsou pyodermie neboli hnisavá onemocnění kůže, mezi které patří impetigo, folikulitida a furunkl. *Staphylococcus aureus* dále způsobuje hnisání ran včetně popálenin a ran operačních. Z rány stafylokoky pronikají do mizních uzlin a z nich poté do krevního oběhu, kde vyvolají bakteriémi, která může vést až k těžkému systémovému onemocnění, k sepsi.

V dýchacím traktu mohou být příčinou sinusitid a sekundárních pneumonií a bronchopneumonií doprovázejících infekci způsobenou virem chřipky.

Mezi onemocnění vyvolaná některými z toxinů patří např. exfoliativní dermatitida, syndrom toxického šoku nebo enterokolitida (Votava a kol., 2007).

2.1.2.1 *Staphylococcus aureus* - methicillin rezistentní (MRSA)

Většina kmenů *Staphylococcus aureus* je v současné době rezistentní k penicilinu. Rezistence je kódována plazmidy, které nesou informaci pro tvorbu penicilinázy, která hydrolyzuje beta-laktamový kruh penicilinových antibiotik. Tento problém řeší semisyntetické penicilináza - rezistentní peniciliny, což jsou penicilinové preparáty kombinované s enzymovými inhibitory beta-laktamázy, kyselinou klavulanovou nebo sulbaktamem a cefalosporiny I. generace. Jsou to např. oxacilin, meticilin, kloxacilin nebo flukloxacilin. V klinickém materiálu se však mohou vyskytovat kmeny, které jsou k penicilináza - rezistentním penicilinům rezistentní. Jedná se o tzv. *Staphylococcus aureus* - meticilin rezistentní kmeny neboli MRSA.

Na základě mutace *mecA* genu dochází v membráně stafylokokových buněk k expresi penicilin vázající bílkoviny PBP2', která má značně sníženou afinitu k penicilinovým antibiotikům (Bednář a kol., 1996).

MRSA je významný nozokomiální patogen se schopností rychle se šířit a to zejména v prostředí vysokého selekčního tlaku antibiotik. Nejedná se však o virulentnější kmen než původní citlivé bakterie *S. aureus*. K vyvolání infekce je zapotřebí stejný počet bakteriálních buněk, ale pro multirezistenci k antibiotikům a k řadě desinfekčních prostředků je mnohem obtížnější MRSA eliminovat nebo zcela zničit, a proto představují velmi závažný terapeutický problém u infikovaných oslabených pacientů.

V České republice byl v letech 2005-2015 zaznamenán vzestupný trend výskytu MRSA z téměř 15 % na necelých 20 %. Také se rychle zvyšuje počet nemocnic, kde byl výskyt MRSA zaznamenán. V porovnání s celou Evropou patří Česká republika k zemím se

střední četností výskytu kmenů MRSA. Nejlépe je na tom severní Evropa s výskytem v řádech jednotlivých procent, naopak nejhůře jsou na tom jižní státy Evropy, kde izoláty MRSA představují více než polovinu všech kmenů *Staphylococcus aureus* (Alušíková a kol, 2015, Bergerová a kol., 2005).

2.1.2.2 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis je typický oportunní patogen, který napadá oslabené pacienty např. s popáleninami, po těžkých úrazech, po chirurgickém zákroku nebo pacienty s imunologickou nedostatečností. U člověka je součástí normální mikroflóry na kůži a sliznicích.

Na rozdíl od *Staphylococcus aureus* neprodukuje koagulázu, fibrinolysin a nukleázu. Neprodukuje ani exotoxiny jako jsou enterotoxiny, toxin syndromu toxického šoku a exofoliatiny.

Predispozice pro vznik infekce je přítomnost cizího tělesa, především předmětů z umělých hmot zavedených do těla pacienta lékařským zákrokem. Nejčastěji se jedná o katetry, cévní náhrady, nebo umělé chlopně a klouby. *Staphylococcus epidermidis* velmi dobře adheruje na umělý povrch a do svého okolí produkuje polysacharidovou substanci, tím vytváří kolem buněk slizovou vrstvu, která upevňuje adhezenci a zabraňuje průniku antibiotik, protilátek a kontaktu s fagocyty.

Kontaminující bakterie mohou pocházet z povrchu kůže a sliznice pacienta nebo ošetřujícího personálu. Mohou chronicky infikovat organismus a způsobovat sepse, endokarditidy, meningitidy, endoftalmitidy nebo infekce močových cest (Bednář a kol., 1996).

2.1.3 Rod *Enterococcus*

Z mnoha druhů enterokoků vyvolává u člověka onemocnění nejčastěji *Enterococcus faecalis*, asi z 90 %, méně často i *Enterococcus faecium*, přibližně v 7 % (Votava a kol., 2007).

Jedná se o grampozitivní oválné koky uspořádané ve dvojicích, drobných shlucích nebo krátkých řetězcích. Jsou fakultativně anaerobní a kataláza negativní.

Enterokoky neprodukují toxin, ale jako faktory virulence se zde uplatňují mnohé secernované produkty, např. želatináza, která hydrolyzuje kolagen, želatinu a

hemoglobin nebo substance typu feromonu, která přitahuje neutrofilů a může regulovat zánětlivou odpověď. Dále se mohou uplatnit kolonizační faktory, jako jsou fimbrie, které umožňují vazbu na epitelové buňky nebo sacharidové adhezíny.

Jsou schopny tvořit biofilm a mají schopnost snadno přijímat plasty nesoucí geny antibiotické rezistence.

Enterokoky jsou součástí normální mikroflóry střeva a infikují hlavně močové cesty, vyvolávají i nozokomiální infekce. Jsou také spojovány s infekcí ran a nitrobřišními záněty. Způsobují bakteriémie a bakteriální sepsi, meningitidy, peritonitidy, osteomyelitidy, infekce žlučových cest a gynekologické záněty (Votava a kol., 2003).

2.1.4 Rod *Escherichia*

Jedná se o gramnegativní nespportující fakultativně anaerobní bičíkaté bakterie, které se řadí mezi enterobakterie.

Typovým druhem je *Escherichia coli*. Nově charakterizované druhy *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris* nebo *Escherichia blattae* se běžně neidentifikují a jejich význam pro člověka nebyl určen.

2.1.4.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli je běžnou součástí střevní mikroflóry zdravých lidí. Svým působením znemožňuje průnik patogenů a podílí se na tvorbě některých vitamínů, především vitamínu K (Votava a kol., 2003).

Jedná se však o podmíněně patogenní bakterii. *E. coli* může vyvolávat dva typy onemocnění a to extraintestinální a intestinální. Extraintestinální onemocnění jsou zejména infekce močových cest, septická onemocnění, infekce ran a hnisavé projevy.

V zažívacím traktu se určité kmeny *E. coli* uplatňují jako patogeny různými mechanismy. Podle toho se rozděluje na enteropatogenní (EPEC), enterotoxigenní (ETEC), enteroinvazivní (EIEC) a enterohemoragické (EHEC).

Enteropatogenní *E. coli* vyvolávají novorozenecké průjmy. U většiny dětí a dospělých onemocnění nevyvolávají. Největší problém představují v rozvojových zemích.

Enterotoxigenní *E. coli* kolonizují tenké střevo pomocí faktorů kolonizace, což jsou proteinové fimbrie. Produkují dva typy enterotoxinů, termolabilní enterotoxin a termostabilní enterotoxin a mohou vyvolat průjemy u dětí i u dospělých.

Enteroinvazivní *E. coli* pronikají do buněk ve střevě a v nich se poté množí. Onemocnění probíhá jako bacilární dysenterie.

Enterohemoragické *E. coli* se váží převážně v tlustém střevě a jsou producenty verotoxinu, který je podobný shigelovému toxinu. Způsobují hemoragickou kolitidu a u některých nemocných se může vyvinout hemolyticko-uremický syndrom.

2.1.5 Rod *Klebsiella*

Klebsiely jsou nepohyblivé gramnegativní tyčinky, které bývají výrazně opouzdřené polysacharidovým pouzdem. Vyskytují se především v zažívacím traktu a v dýchacích cestách. Nalezneme je také v půdě a ve vodě.

Jedná se o podmíněné patogeny a často se uplatňují jako původci nozokomiálních infekcí a to především na novorozeneckých odděleních a jednotkách intenzivní péče.

Nejběžnějším druhem je *Klebsiella pneumoniae*, poměrně běžná je také *Klebsiella oxytoca*. Ostatní druhy jsou méně významné (Bednář a kol., 1996).

2.1.5.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae se rozlišuje na 77 typů podle pouzdrného polysacharidového antigenu. Mezi jednotlivými kmeny je značná variabilita ve virulenci. Klíčovým faktorem virulence u *Klebsiella pneumoniae* je pouzdro.

Je příčinou bronchopnemonií a infekcí močových cest u imunodeficientních pacientů a na jednotkách intenzivní péče. Poměrně často bývá také původcem infekcí operačních ran a u novorozenců může vyvolávat sepsi a meningitidy (Bednář a kol., 1996).

2.1.5.2 *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní

ESBL je označení pro širokospektré betalaktamázy z anglického názvu extended spekter beta-lactamase. ESBL jsou nejčastější příčinou rezistence gramnegativních bakterií k betalaktamovým antibiotikům. Jedná se o enzymy hydrolyzující peniciliny, cefalosporiny všech generací a monobaktamy.

ESBL pozitivní kmeny *Klebsiella pneumoniae* se vyskytují převážně v nemocničním prostředí jako původci nozokomiálních nákaz (Brhelová, 2010).

2.1.6 Rod *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* obsahuje více jak 200 druhů. Většinou se jedná o saprofytické bakterie přítomné v půdě, vodě a ve vlhkém prostředí. Nejčastějším patogenem pro člověka je *Pseudomonas aeruginosa* (Greenwood a kol., 1999).

2.1.6.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Jedná se o drobnější gramnegativní nefermentující tyčinku se sklonem k polárnímu barvení běžnou v zevním prostředí. Někdy může být obalená slizem a pohybuje se pomocí polárně umístěného bičíku.

Pseudomonas aeruginosa je vybavena rozličnými faktory virulence. Jedná se o strukturální, toxické a enzymatické faktory. Jedním z faktorů virulence je lipopolysacharid, který působí jako endotoxin. Dalšími faktory jsou dva exotoxiny a cytotoxický leukocidin a množství enzymů charakteru proteáz a hemolyzinů.

I přes velké množství faktorů virulence se *Pseudomonas aeruginosa* chová pouze jako oportunní patogen. Může napadnout prakticky kterýkoli orgán se sníženou odolností. Je významným původcem nozokomiálních nákaz. Způsobuje pozdní ventilátorové pneumonie a napadá plíce poškozené cystickou fibrózou. U pacientů s dlouhodobě zavedeným močovým katetrem vyvolává infekce močových cest. Velmi nebezpečné jsou pseudomonádové infekce popálenin, které mohou vyústit až ve smrtelnou sepsi (Votava a kol., 2007).

Do dvou dnů po přijetí do nemocnice se pseudomonádová infekce vyskytuje asi u 30 % pacientů. Časté jsou také epidemie pseudomonádových infekcí novorozenců a kojenců v porodnici a na dětském oddělení (Greenwood a kol., 1999).

Sekundární infekce ran se projevuje tvorbou typického nazelenalého až modrozeleného hnisu. Při kontaktu s kontaminovanou vodou může dojít ke vzniku folikulitidy, nebo zánětu zevního zvukovodu. Nebezpečné jsou infekce oka a keratitidy vyvolané kontaminovanými kontaktními čočkami (Votava a kol., 2007).

2.2 Antimikrobní látky

Mezi antimikrobní látky řadíme všechny látky, které působí proti mikroorganismům tak, že je usmrcují, nebo brání jejich růstu. Patří mezi ně antibiotika, chemoterapeutika, antiseptika, dezinfekční a konzervační prostředky. Obecná charakteristika antimikrobních látek je uvedena v tab. 1.

Tab. 1 Charakteristika antimikrobních látek (Buchta a kol., 2002)

	desinficiens	antiseptikum	konzervans	antibiotikum
antimikrobní účinek	mikrobicidní	alespoň mikrobiostatický	alespoň mikrobiostatický	mikrobiostatický mikrobicidní
použití	zábrana šíření infekce v prostředí tj. usmrcení mikrobů na neživých předmětech	zábrana vstupu infekce do těla tj. likvidace či výrazná redukce počtu mikrobů na kůži, sliznice, v ráně	ochrana farmak před mikrobiální degradací a před množením mikrobů v nich	terapie a profylaxe infekčních onemocnění
toxická	nesmí ohrozit toho, kdo aplikuje	nepřípustná	nepřípustná	nepřístupná
kdo aplikuje	kdokoliv, hlavně zdrav. personál	zdravotníci pacienti	farmaceuti	zdravotníci pacienti
vztah k ceně	hodně zřetele	druhořadý	druhořadý	druhořadý

2.2.1 Desinficiencia

Jedná se o látky, které slouží k chemické dezinfekci neživých objektů a atmosféry. Cílem těchto látek je zamezení šíření nákazy od zdroje k vnímavému jedinci či objektu a to likvidací potenciálně patogenních mikroorganismů.

Pro každou konkrétní situaci je třeba pečlivě volit přípravek a jeho způsob aplikace. Při výběru dezinfekčního přípravku bychom měli být seznámeni s vlastnostmi dezinfikovaného objektu (pracovní plocha, nástroje, podlahy, ovzduší atd.). Dále

bychom měli znát vlastnosti mikroorganismů, které kontaminují materiál a důležité jsou také vlastnosti samotného dezinfekčního přípravku, jako je výbušnost, toxicita, zanechávání toxických reziduí, alergizační a iritační potenciál a samozřejmě také cena a dostupnost (Buchta a kol., 2002).

2.2.2 Antiseptika

Antiseptika jsou látky určené k ošetření kůže a sliznic před invazivními zákroky, nebo také k sanaci ran. Jedná se o léčiva, a proto musí splňovat požadavky na přijatelnou dráždivost, toxicitu a alergizaci. Jako antiseptika se často používají nižší koncentrace netoxických dezinfekčních přípravků.

2.2.3 Konzervancia

Konzervancia jsou látky, které udržují mikrobiologickou nezávadnost léčivého přípravku. Jejich úkolem je zajistit, aby v léčivém přípravku během skladování a používání nepůsobily a nemnožily se mikroorganismy a neovlivnily tak jeho kvalitu.

U konzervancí se klade důraz na stabilitu a dobrou antimikrobní účinnost během celé doby použitelnosti léčivého přípravku. Přidávají se k přípravkům již sterilizovaným nebo konzervovaným jiným způsobem, např. sušením, přidáním alkoholu. Konzervancia se musí volit tak, aby negativně neovlivnila přípravek. Dále se klade důraz na dostatečnou aktivitu proti všem mikroorganismům. Důležitá je přijatelná toxicita a dráždivost, stabilita během technologických procesů i během doby expirace. Nesmí dojít k žádné interakci se složkami léčivého přípravku.

2.2.4 Antibiotika

Antibiotika jsou látky mikrobiálního původu, které v nízkých koncentracích inhibují růst jiných mikroorganismů. Antimikrobiální látky připravené synteticky se označují jako chemoterapeutika. V praxi se však stále častěji používá termín antibiotikum jak pro látky produkované mikroorganismy, tak pro synteticky připravené látky (Buchta a kol., 2002).

Antibiotikum se považuje za léčivo tehdy, když usmrtí nebo alespoň inhibuje mikroorganismy v dávkách, které ještě nepoškozují makroorganismus. Jedná se o selektivní toxicitu, což znamená, že látka poškozuje mikroorganismus nikoli však hostitele. Selektivní toxicitu vyjadřujeme pomocí chemoterapeutického indexu, který se vyjadřuje jako poměr mezi dávkou toxickou pro hostitele a dávkou účinnou na

mikroorganismus. Čím je chemoterapeutický index vyšší, tím je daná látka pro hostitele méně toxická.

Antibiotika rozdělujeme na látky s baktericidním účinkem a na látky s bakteriostatickým účinkem. Baktericidní látky ireverzibilně a rychle usmrcují mikrobiální buňku. Klinický účinek se obvykle dostavuje do 48 hodin po aplikaci. Přednostně se užívají při závažných klinických stavech a při snížené obranyschopnosti nemocného. Bakteriostatické látky reverzibilně inhibují růst a množení mikrobů. Klinický účinek je patrný po 3 - 4 dnech. Po jejich předčasném vysazení se mohou mikroby opět začít množit. Zástupci baktericidních a bakteriostatických antibiotik jsou uvedeny v tab. 2.

Tab. 2 Baktericidní a bakteriostatická antibiotika (Votava a kol., 2007)

Baktericidní antibiotika	Bakteriostatická antibiotika
beta-laktamy	tetracykliny
aminoglykosidy	chloramfenikol
polypeptidy	makrolidy
glykopeptidy	linkosamidy
ansamyciny	sulfonamidy
co-trimoxazol	trimethoprim
nitroimidazoly	nitrofurany
fluorchinolony	
isoniazid	

2.2.4.1 Mechanismus účinku

Podle mechanismu účinku lze antibiotika rozdělit do pěti základních skupin.:

1) Inhibitory syntézy bakteriální stěny.

Látky, které inhibuje syntézu bakteriální stěny, jsou pro makroorganismus prakticky netoxické, protože tato struktura se v eukaryotických buňkách nenachází. Patří sem velká skupina beta-laktamů, dále glykopeptidy a některá antituberkulotika. Všechny mají baktericidní účinek (Votava a kol., 2007).

Syntéza peptidoglykanu v buněčné stěně probíhá ve třech stupních. První stupeň, který probíhá v cytoplazmě a spočívá v syntéze nízkomolekulárních prekurzorů a syntéze di- a tri-peptidů, je inhibován antibiotiky fosfomycinem nebo cykloserinem. Druhý stupeň, který je katalyzován enzymy vázanými na membránu a spočívá v přenosu prekurzorů přes membránu, je inhibován např. bacitracinem. Pokud prekurzory projdou membránou, mohou být inhibovány tvorbou komplexů jejich C-terminálního D-alaninu např. s vankomycinem. Ten není schopen procházen membránou. Ve třetím stupni následuje konečná polymerace a připojení nově syntetizovaných peptidoglykenů ke stěně pomocí transpepidáz. Tyto enzymy se nazývají penicilin-binding proteins a mohou být inhibovány beta-laktamovými antibiotiky (Julák, 2006).

2) Inhibitory cytoplazmatické membrány.

Cytoplazmatická membrána je organizovaná struktura složená z lipidové dvojvrstvy s globulárními proteiny, která působí jako difuzní bariéra pro vodu, ionty, živiny a umožňuje jejich transport. Rozvrat membrány a porušení těchto funkcí mohou způsobit různé antimikrobiální látky kationové, aniontové nebo neutrální povahy. Nejčastěji to jsou polypeptidová antibiotika jako polymyxin B nebo kolistin, dále antimykotika ze skupiny imidazolů a polyenů. Polymyxiny jsou toxické pro živočišné buňky ledvin a nervů, proto se nepodávají systémově (Julák, 2006).

3) Inhibitory syntézy nukleových kyselin

Syntéza nukleových kyselin může být narušena v různých stádiích. Antimikrobiální látky mohou inhibovat syntézu purinových a pyrimidinových nukleotidů, nebo mohou zabránit templátové funkci DNA, nebo mohou interferovat s polymerázami účastnicími se replikace a transkripce DNA. Do první skupiny patří zejména analoga nukleových bází, která se používají zejména v antivirové a antifungální léčbě. Do druhé skupiny patří látky, které tvoří s DNA sloučeniny, např. chloroquin a uracil D. Látky třetí skupiny mohou inhibovat DNA-polmerázu, sem patří např. rifampicin, nebo DNA-gyrázu a topoisomerázu, to je např. skupina chinolonů a fluorochinolonů.

Existují také antibiotika schopná přerušovat a destruovat vlákna DNA bakterií a protozoí. Sem patří zejména skupina nitroimidazolů, např. metronidazol (Julák, 2006).

4) Inhibice syntézy bílkovin

Mezi látky potlačující proteosyntézu patří aminoglykosidy (streptomycin, gentamycin, amikacin), které mají baktericidní účinek. Ireverzibilně se váží na jednotku 30S bakteriálního ribozomu, což znemožní průběh proteosyntézy, nebo to vede ke vzniku nefunkčních bílkovin. Na ribozomální jednotku 30S účinkují i bakteriostatické tetracykliny. Bakteriostatický účinek mají i další inhibitory tvorby bílkovin, působící na jednotku 50S bakteriálního ribozomu. Patří sem chloramfenikol, makrolidy a linkosamidy (Votava a kol., 2007).

5) Inhibitory metabolismu kyseliny listové (antimetabolity).

Bakterie a protozoa neumějí přijímat esenciální kyselinu listovou z okolí, a proto ji syntetizují. Tuto syntézu narušují zejména antibiotika trimethoprim a sulfonamidy. Trimethoprim se velmi pevně váže na dihydrofolátreduktázu a inhibuje tak syntézu tetrahydrofolátu. Sulfonamidy kompetitivně blokují konverzi pteridinu a p-aminobenzoové kyseliny na kyselinu dihydrolistovou (Julák, 2006).

2.2.4.2 Rozdělení antibiotik

Antibiotika rozdělujeme do skupin nejlépe podle chemické struktury, se kterou souvisí řada společných vlastností, jako je mechanismus působení, rezistence, spektrum nebo nežádoucí účinky.

Rozlišujeme 13 základních skupin antibiotik: beta-laktamy, tetracykliny, aminoglykosidy, makrolidy, linkosamidy, amfenikoly, polypeptidová antibiotika, glykopeptidová antibiotika, ansamycinová antibiotika, sulfonamidy a pyrimidiny, nitroimidazoly a nitrofurany, chinolony a fluorochinolony a antituberkulotika

2.2.4.2.1 Beta-laktamy

Beta-laktamová antibiotika obsahují čtyřčlennou strukturu, která se skládá ze tří atomů uhlíku a jednoho atomu dusíku, tzv. beta-laktamový kruh. Různé typy beta-laktamů se liší složením dalšího kruhu připojeného na beta-laktamový cyklus.

Jejich působení spočívá v inhibici syntézy bakteriální stěny. V bakteriální buňce se váží na enzymy účastnící se tvorby peptidoglykanu, základní složky buněčné stěny. Tím zastaví tvorbu peptidoglykanové vrstvy a podpoří uvolnění autolytických enzymů, které

rozvolní již hotovou buněčnou stěnu. Konečným stádiem je rozpad bakteriální buňky, jedná se tedy o baktericidní antibiotika.

Toxicita beta-laktamů je zanedbatelná, avšak vedlejší účinky jsou časté. Jedná se především o alergické reakce, nejčastěji po ampicilinu. Těžké reakce typu anafylaktického šoku se mohou objevit po podání penicilinu (Votava a kol. 2005).

Skupina beta-laktamových antibiotik zahrnuje peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a inhibitory beta-laktamázy (Beneš, 2009).

1) PENICILINY

Peniciliny jsou vysoce účinná antibiotika s velmi nízkou toxicitou. Získávají se z kultury plísni rodu *Penicillium*, která produkuje kyselinu 6-aminopenicilanovou. Beta-laktamový kruh je konjugován s pětičlenným thiazolidinovým kruhem. Úpravou této struktury dostaneme rozmanité druhy penicilinů, které se liší šířkou antibakteriálního spektra a stabilitou vůči nízkému pH a vůči beta-laktamázám.

Z farmakologického hlediska se peniciliny dělí na:

- základní (acidolabilní a acidostabilní)
- rezistentní vůči stafylokokovým penicilinázám
- aminopeniciliny
- ureidopeniciliny
- karboxypeniciliny

Acidolabilní peniciliny

V žaludku jsou inaktivovány nízkým pH, proto se podávají pouze parenterálně. Patří sem benzylpenicilin (penicilin G). Spektrum zahrnuje grampozitivní koky i tyčinky, gramnegativní koky a gramnegativní mikroby spirálovitého tvaru. Citlivé jsou i některé gramnegativní tyčinky. Ve formě draselné soli se podává intravenózně u závažných infekcí. Prokain benzylpenicilin (prokain penicilin G) je špatně rozpustná sůl, která se podává intramuskulárně a během 24 hodin uvolňuje benzylpenicilin.

Acidostabilní peniciliny

Řadíme sem phenoxymethylpenicilin (penicilin V), který patří k nejčastěji předepisovaným antibiotikům. Odolává nízkému pH žaludeční šťávy, a proto je

účinným perorálním penicilinovým preparátem. Jeho spektrum účinku je totožné se spektrem benzylpenicilinu.

Peniciliny rezistentní vůči beta-laktamázám *Staphylococcus aureus*

Tyto peniciliny působí podobně jako benzylpenicilin, jejich účinnost je ale zřetelně nižší. Odolávají však účinku stafylokokových beta-laktamáz. Používají se u stafylokokových infekcí a u smíšených infekcí stafylokokových a streptokokových. Patří sem oxacilin a methicilin. Bohužel stále častěji se vyskytují kmeny *S. aureus* na tyto peniciliny rezistentní, tzv. MRSA.

Aminopeniciliny

Aminopeniciliny působí na širší spektrum mikrobů než předchozí antibiotika. Účinkují na řadu gramnegativních tyčinek, pokud ovšem neprodukují beta-laktamázy. Je možné je podávat perorálně a z nežádoucích účinků se vyskytují kožní vyrážky, ale nebývají nijak závažné. Patří sem amoxicilin používaný perorálně např. při infekcích dolních cest dýchací a při močových infekcích a ampicilin, který se perorálně vstřebává hůře.

Ureidopeniciliny

Jsou to širokospektrá antibiotika podávaná pouze parenterálně. Působí baktericidně, ale jen na množící se bakterie. Patří sem azlocilin a piperacilin, které se již nevyrábějí. Mezi používané antibiotikum patří co-piperacilin, což je kombinace piperacilinu s inhibítorem beta-laktamáz tozobaktamem.

Karboxypeniciliny

Vlastnosti jsou podobné ureidopenicilinům. Řadíme k nim ticarcilin. K dispozici je také jeho kombinace s kyselinou klavulanovou, co-ticarcilin (Votava a kol., 2005).

2) CEFALOSPORINY

Základ cefalosporinových antibiotik tvoří kyselina 7 - aminocefalosporanová, která byla izolována z plísně rodu *Cephalosporium*. Beta-laktamový kruh je připojen na šestičlenný dihydrothiazinový cyklus obsahující atom síry.

Cefalosporiny inhibují syntézu buněčné stěny a mají baktericidní účinek (Votava a kol., 2005).

Oproti penicilinům mají vyšší stabilitu vůči beta-laktamázám. Mají široké spektrum účinku a nízkou toxicitu. Podle účinnosti na grampozitivní a gramnegativní mikroorganismy a podle stability vůči beta-laktamázám se cefalosporiny dělí na pět generací (Beneš 2009). Od I. do IV. generace stoupá účinnost na gramnegativní bakterie a od I. do III. generace výrazně klesá účinnost na grampozitivní koky.

Cefalosporiny I. generace

Spektrům účinku se podobají ampicilinu. Lépe účinkují na gramnegativní bakterie rodu *Escherichia*, *Klebsiella* a *Proteus*. Patří sem perorálně podávaný cefalexin a cefadroxil. Injekčně se v chirurgii užívá cefalotin nebo cefazolin.

Cefalosporiny II. generace

Cefalosporiny II. generace jsou stabilnější vůči beta-laktamázám a jejich spektrum účinku je rozšířeno o další gramnegativní tyčinky. Perorálně se velmi často používá cefuroxim axetil a cefprozil. Injekčně se podává cefuroxim.

Cefalosporiny III. generace

Jedná se o látky s vysokou účinností na gramnegativní bakterie. Perorálně podávaný cefixim však nepůsobí na pseudomonády ani na stafylokoky. Injekčně se podává cefotaxim a ceftriaxon. Ceftazidim a cefoperazon jsou poměrně spolehlivě účinné na *Pseudomonas aeruginosa*. Cefoperazon se často používá v kombinaci se sulbaktamem jako co-cefoperazon.

Cefalosporiny IV. generace

Cefalosporiny IV. Generace jsou podávány pouze parenterálně. Velmi rychle pronikají membránou gramnegativních bakterií a jsou stabilní vůči beta-laktamázám. Ve srovnání s ostatními cefalosporiny účinkují i na grampozitivní bakterie. Patří sem např. cefepim (Votava a kol., 2005).

Cefalosporiny V. generace

Mezi cefalosporiny V. generace řadíme ceftarolin fosamil. Jedná se o antibiotiku určené k parenterálnímu podání pro léčbu akutních bakteriálních infekcí kůže a měkkých tkání a komunitní bakteriální pneumonie. Je účinný vůči grampozitivním bakteriím včetně

kmenů MRSA i vůči gramnegativním bakteriím čeledi *Enterobacteriaceae*. Výsledný efekt ceftarolinu je baktericidní (www.awmsg.org, medimoon.com).

3) KARBAPENEMY

Jedná se o vysoce účinná antibiotika s nejširším spektrem účinku a vyznačují se výrazným postantibiotickým efektem. Působí na gramnegativní i grampozitivní bakterie včetně kmenů produkujících beta-laktamázy. Podávají se parenterálně vzhledem ke špatné absorpci perorálně. Patří sem imipenem, meropenem, a ertapenem.

4) MONOBAKTAMY

Monobaktamy patří mezi méně užívaná antibiotika. Baktericidní účinek mají pouze proti aerobním gramnegativním bakteriím. Jediným v klinické praxi používaným zástupcem této skupiny je aztreonam.

5) INHIBITORY BETA-LAKTAMÁZ

Kyselina klavulanová, sulbaktam a tozobaktam mají podobnou chemickou strukturu jako penicilin. Tyto látky jsou schopné ireverzibilně obsadit aktivní centrum bakteriálních beta-laktamáz a tím tyto enzymy inaktivovat (Beneš 2009).

Kombinací amoxicilinu s kyselinou klavulanovou získáme velmi účinný co-amoxicilin a kombinací ampicilinu se sulbaktamem získáme co-ampicilin (Votava a kol., 2005).

2.2.4.2.2 Tetracykliny

Molekula tetracyklinů obsahuje čtyři šestičlenné kondenzované cykly. Jednotlivé tetracykliny se od sebe liší svými farmakologickými vlastnostmi, účinky a spektrum jsou totožné. Mechanismus působení tetracyklinů spočívá v inhibici proteosyntézy. Výsledný účinek je bakteriostatický a jejich spektrum účinnosti je velmi široké, řada běžných bakterií je však již na tetracykliny rezistentní.

Vedlejší účinky jsou časté a projevují se hlavně v gastrointestinálním traktu. Nejčastěji se jedná o průjem a nauzeu. Dále nepříznivě ovlivňují tvorbu kostí a způsobují žluté zbarvení zubů, proto se nedoporučují u těhotných žen a dětí do 8 let (Votava a kol., 2005).

Patří sem perorálně podávaný doxycyklin, minocyklin a tigecyklin, který se podává infuzní formou (Beneš, 2009).

2.2.4.2.3 Aminoglykosidy

Většinou se jedná o trisacharidy obsahující neobvyklé aminocukry. Základem molekuly je aminocyklitolový kruh, což je struktura odvozená od inositolu substituovaného různými aminoskupinami. K tomuto kruhu jsou pak připojeny další dva aminocukry.

Působí na ribozomy v začátku bakteriální proteosyntézy a jejich účinek je baktericidní. Jejich antibakteriální spektrum působí především na aerobní gramnegativní bakterie. Účinkují i na stafylokoky a některé aminoglykosidy i na mykobakteria. S řadou antibiotik vykazují výrazný synergický efekt. Nejčastěji se využívá jejich kombinace s beta-laktamy.

Vzhledem k tomu, že se aminoglykosidy prakticky vůbec nevstřebávají ze střeva, při léčbě systémových infekcí musí být podány parenterálně.

K nežádoucím účinkům patří nefrotoxicita, ototoxicita a neurotoxicita objevující se při dlouhodobé léčbě.

Nejčastěji používaný je silně ototoxický gentamycin a tobramycin dostupný ve formě očních kapek nebo roztoku k inhalaci. Méně toxický než gentamycin je netilmicin. Dále sem patří amikacin, isepamicin, streptomycin, konamycin, neomycin, spektinomycin a paromomycin (Votava a kol., 2005).

2.2.4.2.4 Makrolidy

Jedná se o makrocyclické laktony, jejichž molekula obsahuje 14-16členný kruh většinou se dvěma méně obvyklými cukry.

Mechanismus účinku spočívá ve vazbě na ribozomální RNA a následné inhibici proteosyntézy, výsledný efekt je bakteriostatický.

Erytromycin je základní makrolid I. generace izolovaný z aktinomycety *Streptomyces erythreus*. Jeho spektrum odpovídá spektru penicilinu, tudíž zasahuje převážně grampozitivní mikroby, gramnegativní koky a spirochéty. Většinou se podává perorálně a dobře proniká do všech buněk, tudíž může zasáhnout i intracelulárně uložené patogeny. Je celkem málo toxický, ale občas se může vyskytnout nauzea a zvracení. Po delším podávání se může projevit hepatotoxicky a ototoxicky.

Jako další se používají spiramycin, roxitromycin, azitromycin a claritromycin. Modifikací molekuly erytromycinu lze získat nový typ antimikrobiálních látek zvaný

ketolidy. Z ketolidů se používá telithromycin, který si zachovává účinnost na bakterie rezistentní na erytromycin.

2.2.4.2.5 Linkosamidy

Do této skupiny patří antibiotikum linkomycin. Je odvozen od aminokyseliny prolinu substituovaného amidy a aminocukrem thiolinkosamidem. Váže se na ribozomy, inhibuje peptidyltransferázu a brání tak vzniku peptidické vazby a prodlužování molekuly proteinu. Působí bakteriostaticky. Účinkuje na grampozitivní bakterie včetně penicilinrezistentních stafylokoků.

Je velmi málo toxický a podává se jak perorálně tak parenterálně. Z nežádoucích účinků se objevují reakce v místě aplikace, průjem, zvýšení jaterních testů a někdy také pseudomembranózní kolitida způsobená přemnožením *Clostridium difficile*, který je na linkosamidy rezistentní.

Náhradou atomu vodíku v molekule linkomycinu chlorem vzniká klindamycin, který má totožné spektrum a linkomycinem, ale má odlišné farmakologické vlastnosti a razantnější antibakteriální účinek.

2.2.4.2.6 Amfenikoly

Jediné u nás dostupné antibiotikum z této skupiny je chloramfenikol. Původně byl izolován ze *Streptomyces venezuelae*, dnes se již připravuje synteticky. Jeho molekula obsahuje dva atomy chlóru a nitrobenzenové jádro, které je příčinou některých toxických účinků.

Mechanismem působení je blokáce peptidyltransferázy a zamezení vzniku peptidických vazeb. Spektrum chloramfenikolu je široké. Působí na aerobní i anaerobní grampozitivní i gramnegativní bakterie, včetně mykoplazmat, rickettsií a chlamydií. Jeho účinek je bakteriostatický.

Je poměrně toxický a proto se uplatňuje jen jako antibiotikum druhé volby. Toxický účinek chloramfenikolu může způsobit tzv. šedý syndrom u novorozenců, vzácně pak poruchy kostní dřeně. Po delším podávání dochází k útlumu krvetvorby, nebo může dojít k idiosynkratické reakci na lék, která způsobí aplastickou anémii.

2.2.4.2.7 Polypeptidová antibiotika

Jedná se o rozvětvené cyklické polypeptidy. Mezi hlavní zástupce řadíme polymyxiny. Polymyxiny působí jako kationické detergenty a rozrušují tak fosfolipidovou vrstvu cytoplazmatické membrány, jejich účinek je baktericidní.

Spektrum polypeptidových antibiotik je spíše užší, zasahují jen gramnegativní bakterie. Jsou výrazně neurotoxické a špatně difundují tkáněmi.

Klinicky se užívá polymyxin E neboli kolistin podávaný injekčně, perorálně i lokálně a polymyxin B k lokálnímu použití. Dále sem řadíme antituberkulotikum kapreomycin a baktericidní antibiotikum bacitracin.

2.2.4.2.8 Glykopeptidová antibiotika

Chemicky se jedná o heptapeptidy s navázanou cukernou složkou. Vyznačují se výrazným antibakteriálním, převážně baktericidním účinkem proti většině aerobních i anaerobních grampozitivních mikroorganismů. Zasahují do syntézy bakteriální stěny tím, že inhibují tvorbu peptidoglykanu (Beneš, 2009).

Ke glykopeptidům řadíme dvě látky, a to vankomycin a teikoplanin. Vankomycin je klasickým glykopeptidem původně izolovaným ze *Streptomyces orientalis*. Působí jen na některé grampozitivní mikroorganismy a na spirochéty. Toxicky působí na ucho ledviny a CNS, většinou se podává jako infuze. Teikoplanin je směs několika látek příbuzných vankomycinu. Jeho spektrum účinnosti je prakticky stejné jako u vankomycinu, avšak je méně toxický (Votava a kol., 2005).

2.2.4.2.9 Ansamycinová antibiotika

Ansamycinová antibiotika jsou makrocyclické sloučeniny obsahující systém aromatických kruhů. Původní sloučeninou je rifamycin izolovaný ze *Streptomyces mediterranei*, klinicky se však používají jeho polysyntetické deriváty rifampicin a rifabutin.

Mechanismem působení je inhibice proteosyntézy. Selektivně se vážou na bakteriální RNA polymerázu a blokují tak syntézu mRNA. Mají baktericidní účinek.

Rifampicin má poměrně široké spektrum účinnosti, podává se perorálně a dobře proniká do všech tkání. Má vysokou afinitu k plastům a proto je vhodný při léčbě infekcí z kolonizovaných umělohmotných implantátů.

2.2.4.2.10 Sulfonamidy a pyrimidiny

Podle mechanismu působení se sulfonamidy řadí mezi antimetabolity. Mají podobnou strukturu jako kyselina p-aminobenzoová, a proto s ní soutěží o aktivní místo na enzymu, který katalyzuje reakci nezbytnou pro syntézu kyseliny tetrahydrolistové. Tato sloučenina je nutná k syntéze purinů a pyrimidinů a tím pádem i k syntéze nukleových kyselin.

Spektrum působení je velmi široké, působí na grampozitivní i na mnohé gramnegativní bakterie, účinek je bakteriostatický. Nežádoucí účinky jsou poměrně časté, výjimečně i závažné. Samotné sulfonamidy se dnes již celkově nepodávají.

Další antimetabolit, trimethoprim, rovněž zasahuje do syntézy kyseliny listové, ale inhibuje jiný enzym. Spektrum je o něco širší než u sulfonamidů. Běžně se podává v kombinaci se sulfonamidem sulfamethoxazolem jako co-trimoxazol. Tato kombinace působí baktericidně. Podává se jak perorálně tak intravenózně a z nežádoucích účinků se mohou vyskytnout gastrointestinální a kožní problémy, někdy i poruchy krvetvorby.

2.2.4.2.11 Nitroimidazoly a nitrofurany

Nitroimidazoly jsou deriváty imidazolu a řadíme mezi ně metronidazol a ornidazol. V mikrobiální buňce působí tak, že porušují její DNA. Účinkují jen anaerobní bakterie a výsledek je baktericidní.

Nitrofurany blokují zahájení translace a tím potlačují syntézu mikrobiálních bílkovin. Jsou to bakteriostatická antibiotika s poměrně širokým spektrem účinku, špatně však pronikají do tkání a mají časté nežádoucí účinky, jako je nauzea, zvracení nebo enantémy. Patří mezi ně nitrofurantoin a nifuratel.

2.2.4.2.12 Chinolony a fluorochinolony

Jedná se o velkou skupinu syntetických látek, jejichž mechanismem účinku je inhibice enzymu DNA-gyrázy, která odpovídá za štěpení a opětovné spojení řetězce DNA, výsledný efekt je baktericidní.

Klasické chinolony mají úzké spektrum, které zahrnuje prakticky jen enterobakterie. Špatně pronikají do tkání, a proto se uplatňují jen v léčbě močových infekcí. Patří sem bakteriostatická kyselina nalidixová a baktericidní kyselina oxolinová.

Fluorochinolony mají spektrum poměrně široké, zaměřené spíše na gramnegativní mikroorganismy. Dobře pronikají do tkání, proto se používají k léčbě systémových infekcí. Z fluorochinolonů se u nás používají norfloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin a moxifloxacin.

Nežádoucí účinky jsou časté, ale ne příliš závažné. Většinou se týkají gastrointestinálního traktu, dále se mohou vyskytnout neurologické a hematologické poruchy a postižení kloubní chrupavky (Votava a kol., 2005).

2.2.4.2.13 Antituberkulóza

Jedná se o heterogenní skupinu látek určených k léčbě tuberkulózy, lepry a dalších mykobakterií. Patří k nim klasická antibiotika streptomycin a makrocyclické antibiotikum rifampicin, které ovlivňují růst mykobakterií inhibicí syntézy nukleových kyselin. Podobně působí i antituberkulóza isoniazid, pyrazinamid, ethambutol a dapson.

Pro léčbu mykobakteriálních infekcí se antituberkulóza podávají v různých kombinacích. U tuberkulózy se užívá klasická kombinace isoniazid-rifampicin-pyrazinamid doplněná streptomycinem nebo ethambutolem (Julák, 2006).

2.2.4.3 Racionální antibiotická terapie

Antimikrobiální léčba je vhodná jen u infekčních stavů a to v případě, je-li původce antimikrobiální látkou postižitelný.

V klinické praxi je nejprve třeba odlišit řadu neinfekčních horečnatých stavů. Horečka tedy není indikací k nasazení antibiotik, ale je indikací k podrobnému vyšetření. Výjimky se týkají jen pacientů v imunosupresi (Votava a kol., 2005).

Podávání antibiotik by vždy mělo být racionální. Ideální je cílená terapie, kdy známe původce nemoci a jeho citlivost a můžeme podle toho zvolit účinný přípravek. Při cílené terapii se volí spíše antibiotika s úzkým spektrem, která působí selektivně na původce onemocnění.

Někdy je nutné podat antibiotika, aniž bychom znali původce onemocnění. V tomto případě se jedná o terapii empirickou, která vychází z předpokladu, že určité infekční onemocnění je s jistou pravděpodobností vyvoláno určitým agens a že toto agens je s jistou pravděpodobností citlivé na určitá antibiotika.

K iniciální terapii se přistupuje v případech, kdy jde o život ohrožující bakteriální infekci, u níž je nutné podat antibiotikum bez znalosti etiologie a nelze riskovat selhání. Po odběru hemokultur a dalších potřebných materiálů se ihned zahájí léčba širokospektrým antibiotikem nebo kombinací antibiotik, která pokryje všechny pravděpodobné patogeny. Po obdržení mikrobiologických výsledků se počáteční léčba upraví tak, aby odpovídala požadavkům cílené terapie.

Při výběru vhodného antibiotika není důležitá pouze citlivost daného mikroba. Důležitý je i celkový stav nemocného, předpokládaná farmakokinetika antibiotika v organismu, výskyt alergických reakcí v anamnéze a současná další medikace. Dalším důležitým faktem je lokalizace infekce v organismu. Souhrn kritérií pro výběr nejvhodnější antibiotické léčby je uveden v tab. 3.

Tab. 3 Kritéria pro výběr nejvhodnější antibiotické léčby (Beneš, 2009)

Vlastnosti mikroorganismu	Citlivost k antibiotikům Produkce toxinů Chování mikroba v organismu
Vlastnosti antibiotika	Způsob účinku Distribuce a metabolizace v organismu Cena, dostupnost
Vlastnosti makroorganismu	Alergie a jiné příčiny nesnášenlivosti léků Aktuální farmakokinetika Současné podávání další léčby Stav imunity
Vlastnosti ložiska	Velikost Lokalizace, ohraničenost vůči okolí Doba trvání a přítomnost cizích těles

2.2.4.3.1 Nesprávné užívání antibiotik

Objev antibiotik znamenal zásadní zlom v boji s nakažlivými nemocemi. Množství antibiotik, která jsou každoročně podána lidem, se počítá na tuny. Předepisují je praktičtí lékaři, jsou podávána lidem v nemocnicích. Jejich aplikace je léčebná i preventivní. Značné množství antibiotik se používá také v zemědělství (www.who.cz).

Odolnost bakterií k antibiotikům v důsledku nadbytečného a nesprávného užívání dnes představuje reálnou hrozbu. Antibiotika jsou užívána, když to není potřeba, někdy se předepisují chybně, podávají se v nízkých nebo v příliš vysokých dávkách, příliš dlouho nebo příliš krátce. Nesprávným užíváním se snižuje účinnost antibiotik, protože se objevují bakterie k antibiotikům rezistentní (Levy, 2002).

Nejčastější chyby při volbě antibiotické léčby:

- Podání antibiotika u neinfekčních stavů
- Podání antibiotika u běžných respiračních infekcí (většinou se jedná o banální virózy)
- Podání antibiotika před odběrem biologického materiálu
- Předčasná změna antibiotika
- Chybná výměna antibiotika (za látku téže skupiny)
- Zbytečné prodlužování nebo zkrácení terapie
- Nízká dávka antibiotika (riziko vzniku rezistentních klonů)
- Podání dle výsledku citlivosti bez ohledu na farmakokinetiku
- Použití širokospektrého antibiotika tam, kde by stačil preparát s užším spektrem
- Použití injekční formy tam, kde by stačila perorální
- Dávkování bez ohledu na změněné jaterní nebo ledvinové funkce (vysoké nebezpečí toxicity)
- Použití kombinace antibiotik, když by stačilo jedno
- Jen lokální podání antibiotika, které lze dávkovat celkově (riziko vzniku alergie a rezistence)
- Neznalost situace, pokud jde o rezistenci
- Nedostatečný počet mikrobiologických vyšetření (často z úsporných důvodů) (Votava a kol., 2005)

Při nesprávném užívání antibiotika je mnohdy chyba na straně pacientů. Nedodržují pokyny lékaře, zkracují délku léčby, berou nižší dávky nebo neužívají antibiotika v předepsaných časových intervalech a tím přispívají ke vzniku rezistence. Vzniklé rezistentní bakterie pak mohou předávat ostatním a původní antibiotikum již není účinné (ecdc.europa.eu).

2.2.5 Antibiotická rezistence

Antibiotická rezistence je schopnost mikroorganismu odolávat působení antimikrobiální látky. Jedná se o adaptaci mikroorganismu na prostředí. Bakterie jsou rezistentní, pokud určitá antibiotika ztratila schopnost tyto bakterie zabít nebo zastavovat jejich růst (ecdc.europa.eu).

Některé bakteriální druhy jsou k určitým antibiotikům primárně (přirozeně) rezistentní. Jedná se o schopnost bakteriálních druhů odolávat aktivitě antimikrobiálních látek díky svým vrozeným strukturálním a funkčním vlastnostem. Mechanismem přirozené rezistence může být necitlivost či absence cílových struktur, nepropustnost zevní membrány, chromozomálně kódovaný aktivní export antibiotika z buňky nebo vrozená produkce enzymů, které antibiotikum inaktivují (amrls.cvm.msu.edu).

Sekundární (získaná) rezistence vzniká u mikrobů původně na dané antibiotikum citlivých. K navození rezistence dochází buď rychle a přímo nebo pomaleji a postupně. Trvání rezistence je u některých antibiotik permanentní, dlouhodobé nebo může mít jen přechodný krátkodobý charakter (Buchta a kol., 2002).

„Výskyt rezistentních kmenů bakterií je bezpochyby výsledkem selekce spontánních mutantů bakterií pod silným selekčním tlakem prostředí, který byl vytvořen širokým použitím antibiotik“ (Hubáček, 1992).

2.2.5.1 Podstata vzniku rezistence

Rezistence vzniká dvěma základními způsoby, fenotypickou adaptací a genetickými změnami.

Fenotypická rezistence vzniká přechodným přizpůsobením mikroba ke změnám jeho vnitřního a vnějšího prostředí. Řada mikrobů je zranitelnější k působení antibiotik v aktivní růstové fázi. Některé mikroorganismy vyvíjejí fenotypickou rezistenci ztrátou či změnou buněčné stěny (Buchta a kol., 2002).

Genotypická rezistence může být způsobena mutací nebo přenesením genu pro rezistenci pomocí plazmidu či transpozonu (Votava a kol., 2005).

Získaná chromozomální rezistence vzniká jako následek jedné či více mutací na bakteriálním chromozomu. Všechna antibiotika mají svá cílová místa, často to jsou proteiny s důležitou funkcí pro růst buňky. Tyto proteiny jsou kódovány určitými geny.

Interakce mezi antibiotikem a zásahovým místem je specifická a změna jen jedné báze genu může toto místo pozměnit tak, že antibiotikum není schopné se na něj navázat a působit tak na bakteriální buňku, která se stává k tomuto antibiotiku rezistentní (Schindler, 2010).

Extrachromozomální rezistence spočívá v převzetí genetického materiálu od rezistentních bakteriálních buněk prostřednictvím R-plazmidů, což jsou malé kruhové molekuly DNA schopné replikace a přirozeně se vyskytují v cytoplazmě bakterií. Plazmidová DNA nese genetické determinanty rezistence a umožňuje jejich přenos mezi různými kmeny bakterií. Celé plazmidy nebo jejich části mohou být vloženy do bakteriálního chromozomu pomocí inzerčních sekvencí.

Geny pro rezistenci jsou často inkorporovány do traspozonů, což jsou elementy mající schopnost translokace z plazmidu do chromozomu i mezi plazmidy navzájem (Hubáček, 1992).

2.2.5.2 Mechanizmy vzniku rezistence

Mechanizmy rezistence bakteriálních buněk vůči antimikrobiálním látkám lze rozdělit do čtyř typů.

1. Zhoršený průnik antibiotika stěnou do bakteriální buňky.

Pronikání antibiotika z okolí do bakteriální buňky závisí na vlastnostech jejího obalu. Silnou stěnou gram pozitivních bakterií většina antibiotik dobře penetruje. U gram negativních bakterií závisí schopnost penetrace na vlastnostech antibiotika. Hydrofobní antibiotika pronikající do buňky přímo lipidovou dvojvrstvou vnější membrány mohou být mechanicky odstíněna zvýšenou hustotou polárních polysacharidových řetězců lipopolysacharidů. Hydrofilní antibiotika mohou do buňky proniknout pouze kanálky porinů začleněných do membrány. Snížením hustoty porinů nebo změnami jejich propustnosti může bakterie omezit pronikání antibiotika do buňky (Julák, 2006).

2. Aktivní exkrece antibiotika z bakteriální buňky.

Aktivní exkrece antibiotika je spojena s produkcí transmembránových proteinů v bakteriální buňce. Některé transmembránové proteiny jsou úzce specifické vůči transportovanému antibiotiku, jiné jsou schopné z buňky odstraňovat celou řadu antibiotik a jsou tak odpovědné za multirezistenci. Aktivní exkrece antibiotika je nejdůležitějším mechanismem rezistence k tetracyklinu (Dolejská, 2008).

3. Změna cílové molekuly.

Jedná se o modifikaci receptorů, cílového místa působení antibiotika nebo metabolické dráhy, kterou antibiotikum blokuje. U grampozitivních bakterií se tento typ mechanismu uplatňuje při rezistenci k beta-laktamovým antibiotikům a glykopeptidům.

4. Inaktivace nebo modifikace antibiotika, nejčastěji enzymaticky.

Typickým příkladem inaktivačních enzymů jsou beta-laktamázy bakterií kódované na R-plazmidech. Jejich účinek spočívá v interakci s β -laktamovým antibiotikem, hydrolýze jeho β -laktamového kruhu a ztrátě schopnosti antibiotika vázat se na cílová místa v bakteriální buněčné stěně (Dolejská 2008, Julák, 2006, Votava a kol., 2005).

V některých případech se může stát, že jsou mikroorganismy schopné přežít v tkáních za přítomnosti antibiotika, ačkoli *in vitro* vykazují vůči danému antibiotiku citlivost. Tento jev se označuje jako perzistence. Je to způsobeno tím, že mikrob může přežít v buňkách, do kterých antibiotikum neproniká, např. v makrofázích, nebo se jedná o bakterie, které rostou v biofilmu, a odolávají tak běžným dávkám antibiotika (Buchta a kol., 2002, Votava a kol., 2005).

2.2.5.3 Multirezistence

Kmeny bakterií rezistentní k více než dvěma antibiotikům se označují jako multirezistentní. Bakterie mohou být současně rezistentní k příbuzným antibiotikům, ale i k antibiotikům s odlišnou chemickou strukturou. U příbuzných antibiotik jde obvykle o jeden mechanismus vzniku, ale při rezistenci k antibiotikům s odlišnou chemickou strukturou jde o různé mechanismy zapříčiněné různými zodpovědnými geny. Multirezistence často vzniká získem genů z plazmidů nebo transpozonů (Shindler, 2008).

Mezi časté multirezistentní bakterie patří methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE), *Enterobacteriaceae* produkující širokospektrou beta-laktamázu (ESBL), multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa* a *Clostridium difficile*.

Problém multirezistence spočívá v omezených možnostech, které zbývají pro léčbu pacientů infikovaných multirezistentními mikroorganismy (ecdc.europa.eu).

2.2.6 Vyšetření antimikrobiální citlivosti

Vyšetření citlivosti bakterií se provádí za účelem zjistit, zda je mikrob na dané antibiotikum citlivý a do jaké míry. Metody používané pro stanovení citlivosti mohou být kvalitativní nebo kvantitativní (Bednář a kol., 1996).

Kvantitativně je citlivost přímo vyjádřena minimální inhibiční koncentrací (MIC), což je nejnižší koncentrace dané látky, která zabrání růstu příslušného mikroba. Pokud koncentraci dále zvyšujeme, dostaneme se na hodnotu minimální baktericidní koncentrace (MBC), což je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která během 24 hodin usmrtí 99,9 % původní populace mikrobů (Votava a kol., 2007).

Stanovení MIC se v diagnostické laboratoři používá především pro stanovení rezistence mikrobů na současná antibiotika, často se však také využívá pro výzkumné účely při stanovení *in vitro* aktivity nových antimikrobiálních látek (Andrews, 2001).

Mezi metody používané pro stanovení antimikrobiální citlivosti patří difúzní diskový test, bujónový mikrodiluční test, diluční test v agaru a E-test (Bednář a kol., 1996).

2.2.6.1 Difúzní diskový test

Difúzní diskový test je jedním z nejstarších postupů testování antimikrobiální citlivosti a stále zůstává jednou z nejvíce používaných rutinních metod v mikrobiologických laboratořích. Tato metoda je vhodná pro testování většiny bakteriálních patogenů a antimikrobiálních látek a nevyžaduje žádné speciální vybavení. Jedná se o reprodukovatelný a přesný způsob stanovení antimikrobiální citlivosti (Matuschek a kol., 2013).

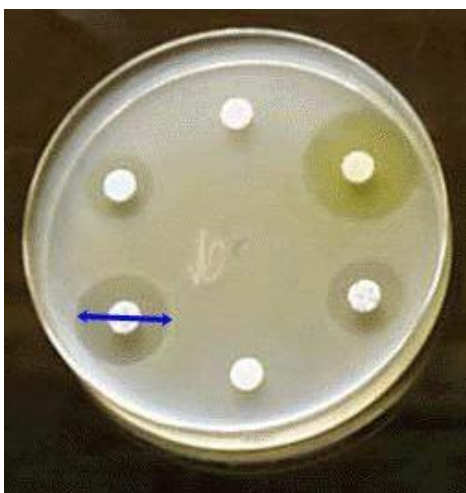
Test se provádí na Mueller-Hinton agaru, nalitém na Petriho misku do vrstvy o standardní tloušťce a o standardním pH v rozmezí 7,2-7,4. K testování se používají antibiotické disky dodávané prověřeným výrobcem.

Do fyziologického roztoku se připraví suspenze bakterií a sterilním vatovým tampónem se naočkuje rovnoměrným rozetřením po celém povrchu plotny. Na naočkovanou plotnu se přiloží 6 různých disků s předepsaným množstvím antibiotika. Inkubuje se 18-24 hodin a poté se změří průměry inhibičních zón (Obr. 1) a interpretují výsledky (Bednář a kol., 1996).

Jedná se o kvalitativní test a jeho cílem je zařadit vyšetřovaný kmen do příslušné kategorie citlivosti k testovanému antibiotiku. EUCAST uvádí 3 kategorie citlivosti.

1. Kmen klinicky citlivý – aktivita antibiotika poskytuje vysokou pravděpodobnost léčby
2. Kmen klinicky intermediálně rezistentní – úspěch léčby antibiotikem s danou aktivitou je nejistý
3. Kmen klinicky rezistentní – aktivita antibiotika poskytuje vysokou pravděpodobnost selhání léčby

Interpretace výsledků do kategorií citlivosti vyžaduje užití tzv. klinických breakpointů antibiotik neboli hraničních koncentrací nebo mezních hodnot. U difúzního diskového testu jsou breakpointy vyjádřeny průměrem inhibičních zón v mm (Urbášková a kol., 2010).

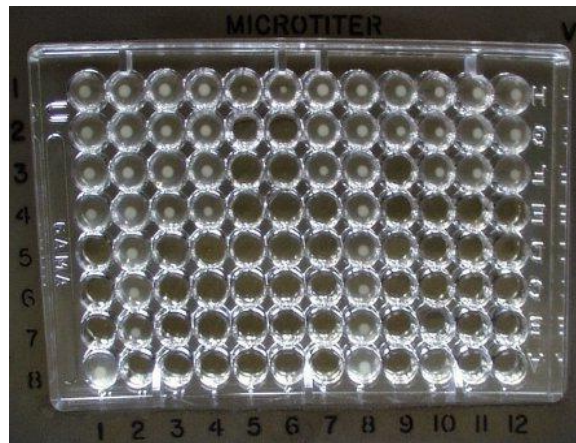


Obr. 1 Difúzní diskový test (Votava a kol., 2007)

2.2.6.2 Bujónový mikrodiluční test

Bujónový test se provádí v mikrotitračních destičkách s dvanácti sloupci a osmi řadami jamek. Pro jedno antibiotikum se používá 8 koncentrací dosažených dvojnásobným ředěním základního roztoku antibiotika.

Do každé jamky se napipetuje 200 μ l bujónu s příslušnou koncentrací antibiotika a očkuje se 10 - 20 μ l suspenze bakterií o koncentraci 10^8 v 1 ml. Po inkubaci se odečítá nárůst bakterií a porovnává se s kontrolou (Obr. 2). Minimální inhibiční koncentrace je v první jamce bez známek viditelného růstu (Bednář a kol., 1996).



Obr. 2 Bujónový mikrodiluční test (old.lf3.cuni.cz)

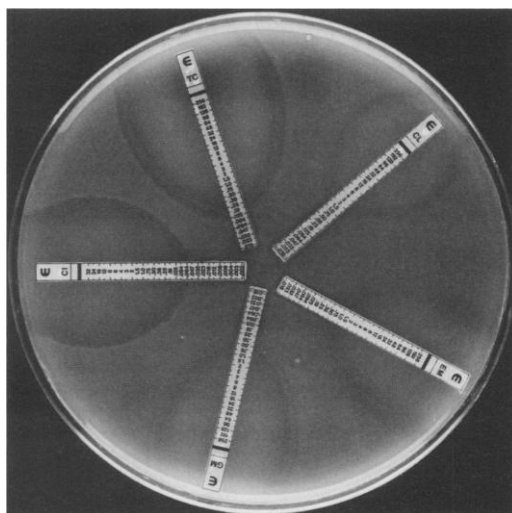
2.2.6.3 Diluční test v agaru

Na Petriho misky se nalije standardní objem agarové půdy s různou koncentrací antibiotika. Poté se na plotnu bodově naočkuje 30-40 kmenů bakterií a po inkubaci se odečítá růst ve formě uzavřené kolonie. Plotna, kde již není pozorován růst, obsahuje MIC antibiotika. Jedná se o referenční metodu, je přesnější než ostatní a lépe stanovuje zástavu růstu, ale je velmi pracná a ekonomicky náročná, proto se pro běžné vyšetřování citlivosti kmenů příliš nepoužívá.

2.2.6.4 E-test

E-test je modifikací difúzního diskového testu. Jedná se o gradientovou difúzní metodu pro stanovení MIC na agarové plotně. Na agar naočkovaný suspenzí bakterií se přiloží kalibrovaný proužek obsahující diskontinuální gradient koncentrací antibiotika. Podél proužku se difúzí vytváří kontinuální gradient a inhibuje růst bakterií. Na proužku je vyznačena stupnice s hodnotami MIC. Inhibiční zóna má vejčitý tvar a v místě, kde ostřejší konec protíná E-testový proužek, se odečítá hodnota MIC (Obr. 3) (Bednář a kol., 1996).

Tato metoda je kvantitativní a interpretace je prováděna pomocí klinických breakpointů antibiotik stanovených systémy CLSI nebo EUCAST. Klinické breakpointy jsou vyjádřeny hodnotou MIC v mg/l (Urbášková a kol., 2010).



Obr. 3 E-test (Baker a kol., 1991)

2.2.6.5 Automatizované systémy testování antimikrobiální citlivosti

Za účelem omezení vzniku technických chyb a snížení dlouhé doby přípravy a testování vzorků bylo vyvinuto několik automatizovaných systémů pro testování antimikrobiální citlivosti. Patří mezi ně např. Vitek 2 systém od francouzské firmy bioMérieux (Obr. 4), Micronaut od německé firmy Merlin nebo Phoenix od americké firmy BD Biosciences.

Tyto systémy poskytují automatické očkování, odečítání a interpretaci. Jsou rychlé a pohodlné, ale jedním z hlavních omezení je pořizovací cena a náklady spojené s provozem a údržbou strojního zařízení (amrls.cvm.msu.edu).



Obr. 4 Vitek 2 systém (www.biomerieuxconnection.com)

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Testované kmeny bakterií

K otestování antimikrobiálních látek pomocí bujónové mikrodiluční metody byly použity suspenze následujících bakteriálních kmenů.

Staphylococcus aureus **SA** CCM4516/08

Staphylococcus aureus - methicillin rezistentní **MRSA** H 5996/08

Staphylococcus epidermidis **SE** H6966/08

Enterococcus faecalis **EF** J 14365/08

Esherichia coli **EC** CCM 4517

Klebsiella pneumoniae **KP** D 11750/08

Klebsiella pneumoniae ESBL pozitivní **KP ESBL** J 14368/08

Pseudomonas aeruginosa **PA** CCM 1961

3.1.2 Testované látky

K otestování jsem měla k dispozici látky syntetizované na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Celkem bylo otestováno 52 látek v následujících koncentracích:

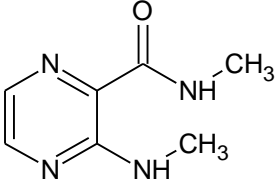
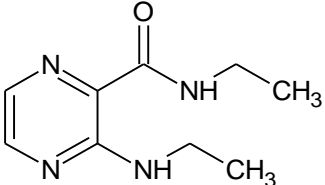
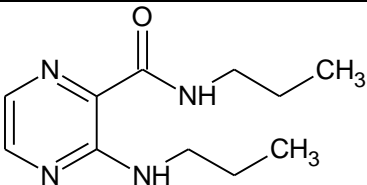
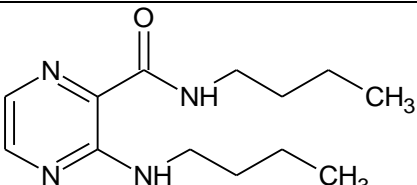
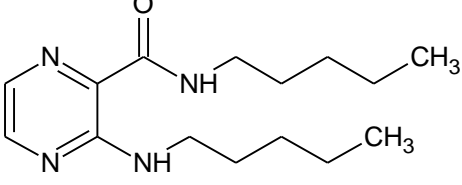
500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3,906; 1,953; 0,977 a 0,488 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

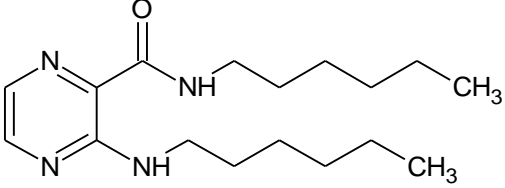
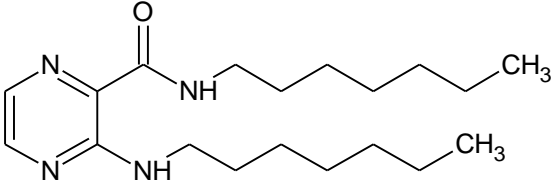
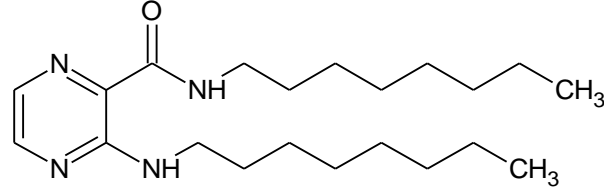
Testované látky byly podle základní společné chemické struktury rozděleny na 6 skupin.

1. Deriváty 3-aminopyrazin-2-karboxamidu (LS 02 - LS 09, OJ 26 - OJ 28)

Zadavatel: prof. Doležal M., Mgr. Semelková L.

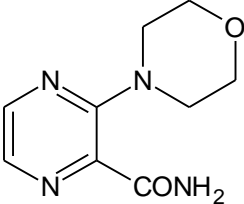
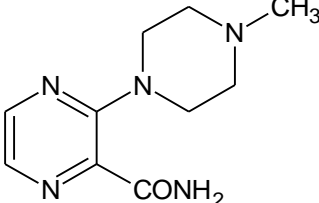
Tab. 4 Strukturní vzorce a údaje o molekulové hmotnosti a navážce látek LS 02 - LS 09

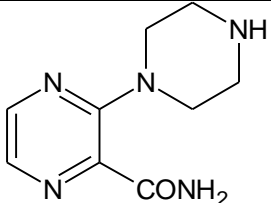
KÓD	VZOREC	MW	NAVÁŽKA
LS 02	 <i>N</i> -methyl-3-(methylamino)pyrazin-2-karboxamid	166,18	6,7 mg
LS 03	 <i>N</i> -ethyl-3-(ethylamino)pyrazin-2-karboxamid	194,24	8,2 mg
LS 04	 <i>N</i> -propyl-3-(propylamino)pyrazin-2-karboxamid	222,29	9,1 mg
LS 05	 <i>N</i> -butyl-3-(butylamino)pyrazin-2-karboxamid	250,35	10,6 mg
LS 06	 <i>N</i> -pentyl-3-(pentylamino)pyrazin-2-karboxamid	278,40	11,5 mg

LS 07	 <p><i>N</i>-hexyl-3-(hexylamino)pyrazin-2-karboxamid</p>	306,45	13,0 mg
LS 08	 <p><i>N</i>-heptyl-3-(heptylamino)pyrazin-2-karboxamid</p>	334,51	15,5 mg
LS 09	 <p><i>N</i>-oktyl-3-(oktylamino)pyrazin-2-karboxamid</p>	362,52	16,1 mg

Zadavatel: prof. Doležal M., Mgr. Jand'ourek O.

Tab. 5 Strukturální vzorce a údaje o molekulové hmotnosti a navážce látek OJ 26 - OJ 28

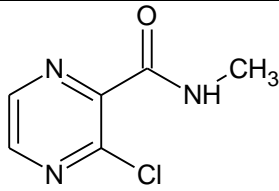
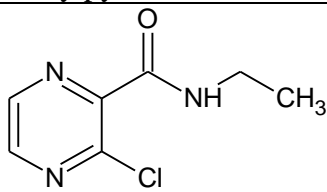
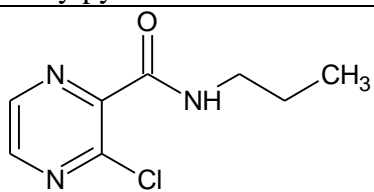
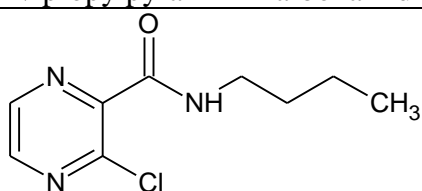
KÓD	VZOREC	MW	NAVÁŽKA
OJ 26	 <p>3-(morfolin-4-yl)pyrazin-2-karboxamid</p>	208,22	8,1 mg
OJ 27	 <p>3-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrazin-2-karboxamid</p>	221,26	9,4 mg

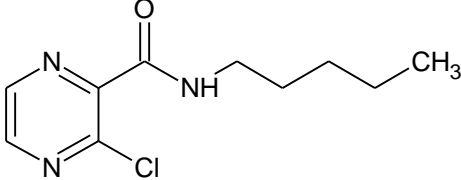
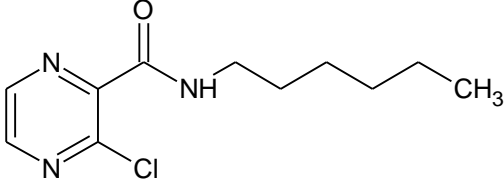
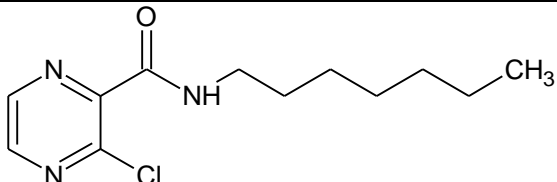
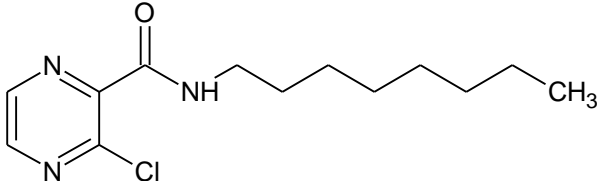
OJ 28	 3-(piperazin-1-yl)pyrazin-2-karboxamid	207,23	8,7 mg
-------	---	--------	--------

2. Deriváty 3-chlorpyrazin-2-karboxamidu (LSMP 02 - LSMP 09)

Zadavatel: prof. Doležal M., Mgr. Semelková L.

Tab. 6 Strukturní vzorce a údaje o molekulové hmotnosti a navážce látek LSMP 02 - LSMP 09

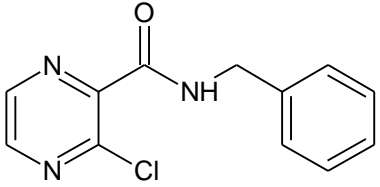
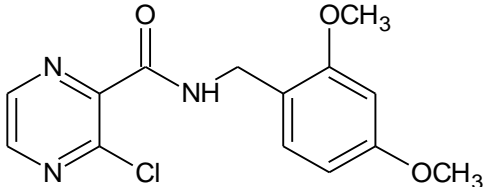
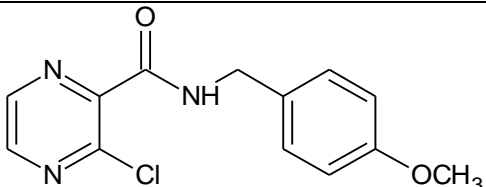
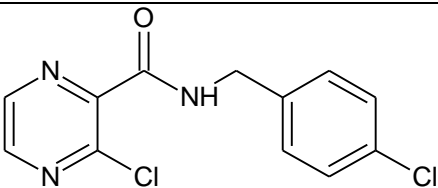
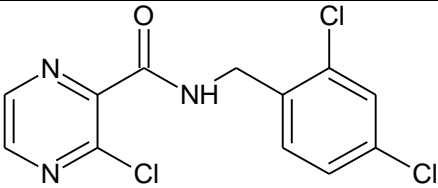
KÓD	VZOREC	MW	NAVÁŽKA
LSMP 02	 3-chloro- <i>N</i> -methylpyrazin-2-karboxamid	171,58	6,8 mg
LSMP 03	 3-chloro- <i>N</i> -ethylpyrazin-2-karboxamid	185,61	7,3 mg
LSMP 04	 3-chloro- <i>N</i> -propylpyrazin-2-karboxamid	199,64	7,9 mg
LSMP 05	 <i>N</i> -butyl-3-chloropyrazin-2-karboxamid	213,66	8,6 mg

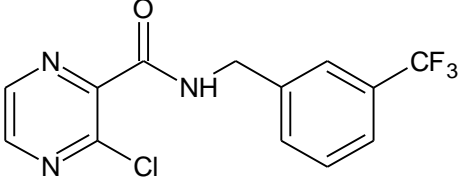
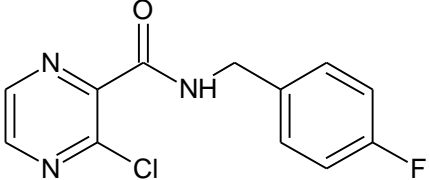
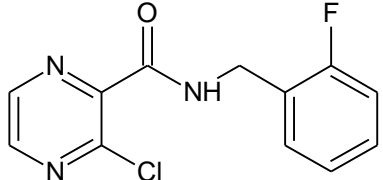
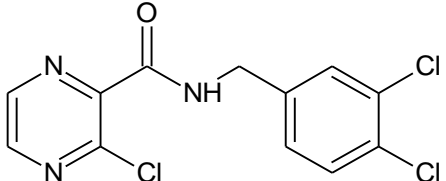
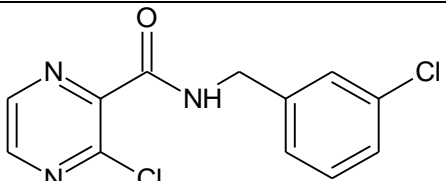
LSMP 06		227,69	9,3 mg
	3-chloro- <i>N</i> -pentylpyrazin-2-karboxamid		
LSMP 07		241,72	9,6 mg
	3-chloro- <i>N</i> -hexylpyrazin-2-karboxamid		
LSMP 08		255,75	10,1 mg
	3-chloro- <i>N</i> -heptylpyrazin-2-karboxamid		
LSMP 09		269,77	10,6 mg
	3-chloro- <i>N</i> -oktylpyrazin-2-karboxamid		

3. Deriváty *N*-benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidu (LS 24 - LS 34)

Zadavatel: prof. Doležal M., Mgr. Semelková L.

Tab. 7 Strukturní vzorce a údaje o molekulové hmotnosti a navážce látek LS 24 - LS 30 a LS 32 - LS 34

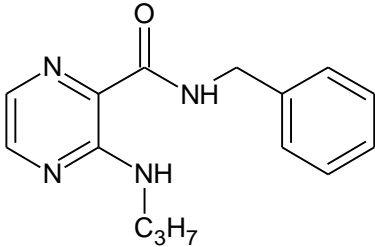
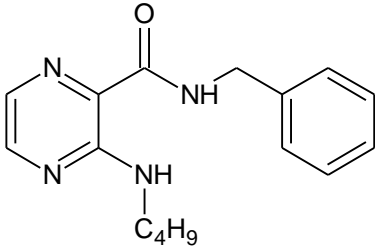
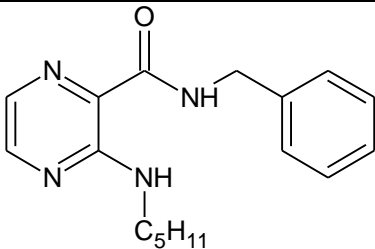
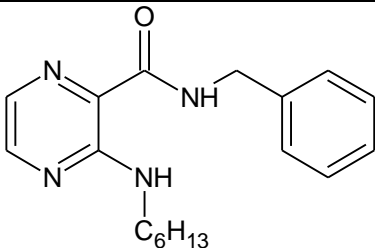
KÓD	VZOREC	MW	NAVÁŽKA
LS 24	 <p><i>N</i>-benzyl-3-chloropyrazin-2-karboxamid</p>	247,68	12,2 mg
LS 25	 <p>3-chloro-<i>N</i>-(2,4-dimethoxybenzyl)pyrazin-2-karboxamid</p>	307,73	12,8 mg
LS 26	 <p>3-chloro-<i>N</i>-(4-methoxybenzyl)pyrazin-2-karboxamid</p>	277,71	13,0 mg
LS 27	 <p>3-chloro-<i>N</i>-(4-chlorobenzyl)pyrazin-2-karboxamid</p>	282,12	11,9 mg
LS 28		316,57	14,0 mg

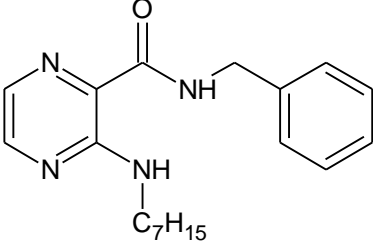
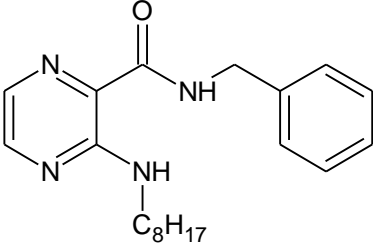
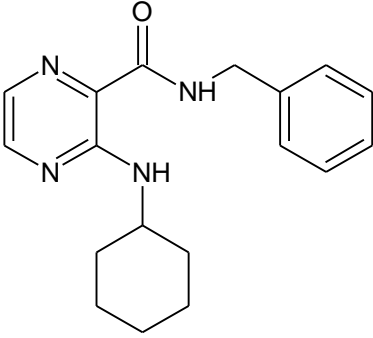
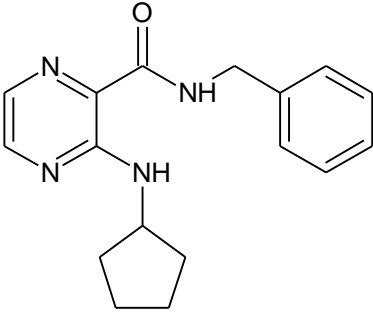
	3-chloro- <i>N</i> -(2,4-dichlorobenzyl)pyrazin-2-karboxamid		
LS 29	 <p>3-chloro-<i>N</i>-[3-(trifluoromethyl)benzyl]pyrazin-2-karboxamid</p>	315,68	12,8 mg
LS 30	 <p>3-chloro-<i>N</i>-(4-fluorobenzyl)pyrazin-2-karboxamid</p>	265,67	10,9 mg
LS 32	 <p>3-chloro-<i>N</i>-(2-fluorobenzyl)pyrazin-2-karboxamid</p>	265,67	14,2 mg
LS 33	 <p>3-chloro-<i>N</i>-(3,4-dichlorobenzyl)pyrazin-2-karboxamid</p>	316,57	13,2 mg
LS 34	 <p>3-chloro-<i>N</i>-(3-chlorobenzyl)pyrazin-2-karboxamid</p>	282,12	11,8 mg

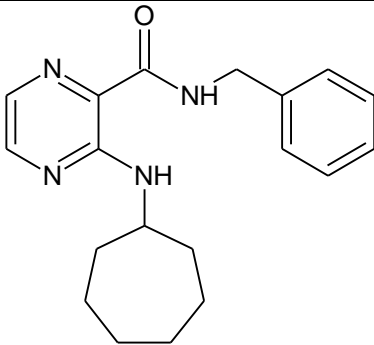
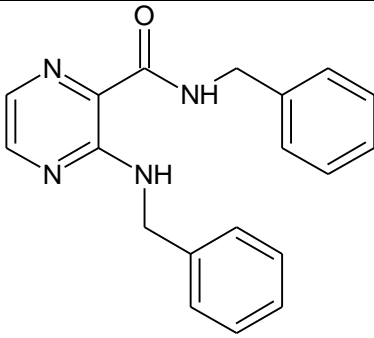
4. Deriváty 3-amino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu (OJ 110 - OJ 119)

Zadavatel: prof. Doležal M., Mgr. Jand'ourek O.

Tab. 8 Strukturní vzorce a údaje o molekulové hmotnosti a navážce látek OJ 110 - OJ 119

KÓD	VZOREC	MW	NAVÁŽKA
OJ 110	 <p><i>N</i>-benzyl-3-(propylamino)pyrazin-2-karboxamid</p>	270,34	11,1 mg
OJ 111	 <p><i>N</i>-benzyl-3-(butylamino)pyrazin-2-karboxamid</p>	284,36	11,3 mg
OJ 112	 <p><i>N</i>-benzyl-3-(pentylamino)pyrazin-2-karboxamid</p>	298,39	11,8 mg
OJ 113	 <p><i>N</i>-benzyl-3-(hexylamino)pyrazin-2-karboxamid</p>	312,42	12,7 mg

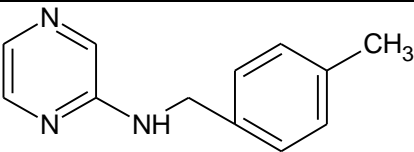
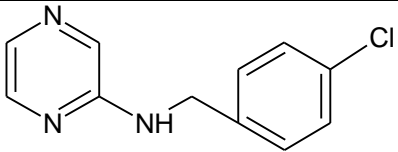
OJ 114	 <p><i>N</i>-benzyl-3-(heptylamino)pyrazin-2-karboxamid</p>	326,44	13,4 mg
OJ 115	 <p><i>N</i>-benzyl-3-(oktylamino)pyrazin-2-karboxamid</p>	340,23	13,6 mg
OJ 116	 <p><i>N</i>-benzyl-3-(cyklohexylamino)pyrazin-2-karboxamid</p>	310,18	12,3 mg
OJ 117	 <p><i>N</i>-benzyl-3-(cyklopentylamino)pyrazin-2-karboxamid</p>	296,37	12,1 mg

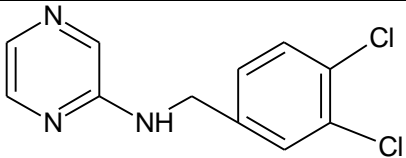
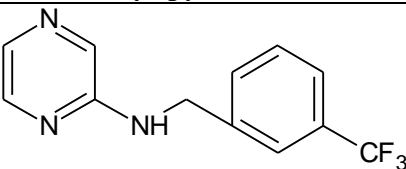
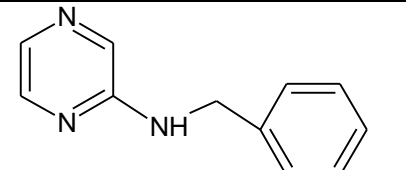
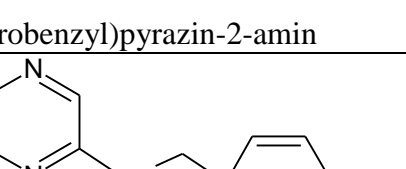
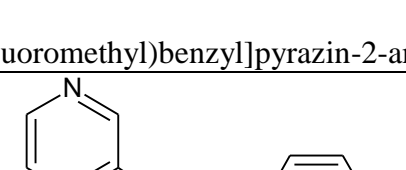
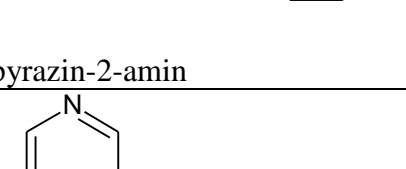
OJ 118	 <p><i>N</i>-benzyl-3-(cykloheptylamino)pyrazin-2-karboxamid</p>	324,43	12,9 mg
OJ 119	 <p><i>N</i>-benzyl-3-(benzylamino)pyrazine-2-karboxamid</p>	318,38	12,7 mg

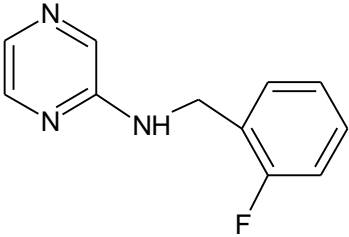
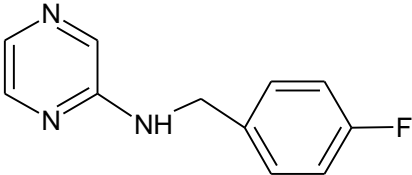
5. Deriváty *N*-benzylpyrazin-2-aminu (OJMB 1 - OJMB 10)

Zadavatel: prof. Doležal M., Mgr. Jand'ourek O.

Tab. 9 Strukturní vzorce a údaje o molekulové hmotnosti a navážce látek OJMB 1 - OJMB 10

KÓD	VZOREC	MW	NAVÁŽKA
OJMB 1	 <p><i>N</i>-(4-methylbenzyl)pyrazin-2-amin</p>	199,26	7,9 mg
OJMB 2	 <p><i>N</i>-(4-chlorobenzyl)pyrazin-2-amin</p>	219,67	8,7 mg

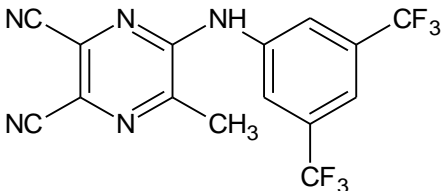
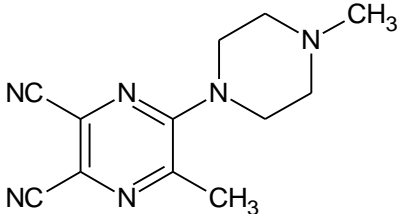
OJMB 3		254,11	11,1 mg
	<i>N</i> -(3,4-dichlorobenzyl)pyrazin-2-amin		
OJMB 4		253,23	11,3 mg
	<i>N</i> -[3-(trifluoromethyl)benzyl]pyrazin-2-amin		
OJMB 5		219,67	8,5 mg
	<i>N</i> -(3-chlorobenzyl)pyrazin-2-amin		
OJMB 6		253,23	10,2 mg
	<i>N</i> -[4-(trifluoromethyl)benzyl]pyrazin-2-amin		
OJMB 7		185,23	7,5 mg
	<i>N</i> -benzylpyrazin-2-amin		
OJMB 8		219,67	9,0 mg
	<i>N</i> -(2-chlorobenzyl)pyrazin-2-amin		

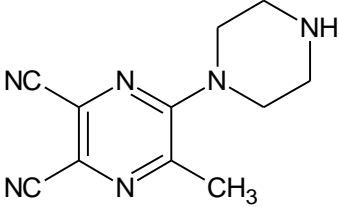
OJMB 9	 <i>N</i> -(2-fluorobenzyl)pyrazin-2-amin	203,22	8,0 mg
OJMB 10	 <i>N</i> -(4-fluorobenzyl)pyrazin-2-amin	203,22	8,2 mg

6. Deriváty 5-amino-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (OJ 5, OJ 13, OJ 17)

Zadavatel: prof. Doležal M., Mgr. Jand'ourek O.

Tab. 10 Strukturní vzorce a údaje o molekulové hmotnosti a navážce látek OJ 5, OJ 13 a OJ 17

KÓD	VZOREC	MW	NAVÁŽKA
OJ 5	 5-[[3,5-bis(trifluoromethyl)fenyl]amino]-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril	371,24	15,2 mg
OJ 13	 5-methyl-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril	242,28	9,9 mg

OJ 17	 <p data-bbox="391 474 906 562">5-methyl-6-(piperazin-1-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril</p>	228,25	9,3 mg
-------	---	--------	--------

3.2 Metodika

Pomůcky:

- Sterilní mikrotitrační destičky s víčky
- Mikropipety
- Sterilní špičky
- 12ti jamkový rezervoár na médium
- Sterilní zkumavky
- Stojánky na zkumavky
- Očkovací kličky

Přístroje:

- Laminární box
- Termostat
- Denzitometr
- Vortex

Chemikálie:

- Mueller-Hinton bujon (MHB)
- Dimetylsufoxid (DMSO)
- Sterilní voda

Pracovní postup:

Pracovní postup se skládá z následujících kroků:

1. Příprava suspenzí testovaných kmenů bakterií
2. Příprava ředící řady testované látky
3. Pipetování do destičky
4. Inkubace
5. Vyhodnocení

Příprava suspenzí testovaných kmenů bakterií:

Připravíme si 8 sterilních zkumavek, popíšeme je zkratkami testovacích bakteriálních kmenů a do každé zkumavky napipetujeme 3 ml sterilní vody. Z kultury bakterií narostlých na živném agaru odebereme malou část kolonie a resuspendujeme ji do sterilní vody v příslušné zkumavce. Důkladně promícháme na vortexu a několikrát změříme hustotu suspenze, která by měla být 0,5 stupňů McFarlanda.

Příprava ředící řady testované látky:

Testovaná látka byla dodána společně s informací o navážce a molekulové hmotnosti. Navážku rozpustíme v příslušném objemu DMSO, aby první testovaná koncentrace byla $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a zároveň koncentrace DMSO v jamce nepřesáhla 1 %. K výpočtu potřebného objemu DMSO použijeme následující vzorec.

$$V_{DMSO} = \frac{m \cdot 10^6 \text{ (převod na } \mu\text{l)}}{c \cdot M \cdot 100 \text{ (zakoncentrování)}} = x \mu\text{l DMSO}$$

m.....navážka (g)

c.....1. testovaná koncentrace= $500 \mu\text{mol.l}^{-1}=0,0005 \text{ mol.l}^{-1}$

M.....molární hmotnost

Koncentrace DMSO v jamce nesmí přesáhnout 1 %, proto při přípravě pracovního roztoku přidáme k růstovému médiu jen 1 % látky rozpuštěné v DMSO, z toho důvodu musíme připravit látku 100x koncentrovanější.

Obsah zkumavky promícháme na vortexu. Pokud se látka rozpustí, nebo vytvoří homogenní suspenzi, přistoupíme k dalšímu kroku. Jestliže se však látka vysráží nebo

nerozpustí, přidáme 2. případně 3. ekvivalent rozpouštědla. Každým přidáním ekvivalentu rozpouštědla posuneme 1. testovanou koncentraci o jedno ředění dozadu.

V dalším kroku si připravíme sterilní zkumavku, označíme ji číslem 1, napipetujeme do ní 1,98 ml růstového média a poté přidáme 20 μ l rozpuštěné testované látky. Důkladně promícháme na vortexu. Pokud se látka v růstovém médiu nevysráží, přistoupíme k dalšímu kroku. V případě vysrážení přidáme 2. případně 3. ekvivalent růstového média. Každým přidáním ekvivalentu růstového média se posouvá 1. testovaná koncentrace o jedno ředění dozadu. Tímto získáme pracovní roztok 1. testované koncentrace, který sterilně přemístíme do 1. jamky 12ti jamkového rezervoáru. Informace o rozpuštění v DMSO/MH zaznamenáme do příslušného protokolu (Tab. 11- Tab. 17)

Tab. 11 Příprava testovacího média a ředění testovaných látek LS 02 - LS 09

LÁTKA	ROZPOUŠTĚNÍ		FINÁLNÍ ROZTOK (ŘEDĚNÍ)		
	X = navážka (mg) + DMSO (μ l)	vysl	X (μ l) + Y (médiu, ml)	vysl	Max. koncent. látky μ mol.l ⁻¹ / DMSO
LS 02	6,7 + 806,4	+	20 + 1,98	+	500
LS 03	8,2 + 844,3	+	20 + 1,98	+	500
LS 04	9,1 + 818,8	+	20 + 1,98	+	500
LS 05	10,6 + 846,8	+	20 + 1,98	Zákal	500
LS 06	11,5 + 826,1	+	20 + 1,98	Zákal!	500
LS 07	13,0 + 848,4	+	20 + 1,98	Zákal!	500
LS 08	15,5 + 926,7	+	20 + 1,98	Zákal!	500
LS 09	16,1 + 888,1	+	20 + 1,98	Zákal!	500

Tab. 12 Příprava testovacího média a ředění testovaných látek OJ 26 - OJ 27

LÁTKA	ROZPOUŠTĚNÍ		FINÁLNÍ ROZTOK (ŘEDĚNÍ)		
	X = navážka (mg) + DMSO (μl)	vysl	X (μl) + Y (médiu, ml)	vysl	Max. koncent. látky μmol.l ⁻¹ / DMSO
OJ 26	8,1 + 778,0	+	20 + 1,98	+	500
OJ 27	9,4 + 849,7	+	20 + 1,98	+	500
OJ 28	8,7 + 839,6 + 839,6	- +	20 + 1,98	+	250

Tab. 13 Příprava testovacího média a ředění testovaných látek LSMP 02 - LSMP 09

LÁTKA	ROZPOUŠTĚNÍ		FINÁLNÍ ROZTOK (ŘEDĚNÍ)		
	X = navážka (mg) + DMSO (μl)	vysl	X (μl) + Y (médiu, ml)	vysl	Max. koncent. látky μmol.l ⁻¹ / DMSO
LSMP 02	6,8 + 792,6	+	20 + 1,98	+	500
LSMP 03	7,3 + 786,6	+	20 + 1,98	+	500
LSMP 04	7,9 + 791,4	+	20 + 1,98	+	500
LSMP 05	8,6 + 805,0	+	20 + 1,98	+	500
LSMP 06	9,3 + 816,9	+	20 + 1,98	+	500
LSMP 07	9,6 + 794,3	+	20 + 1,98	+	500
LSMP 08	10,1 + 789,8	+	20 + 1,98	+	500
LSMP 09	10,6 + 785,9	+	20 + 1,98	+	500

Tab. 14 Příprava testovacího média a ředění testovaných látek LS 24 - LS 30 a LS 32 - LS 34

LÁTKA	ROZPOUŠTĚNÍ		FINÁLNÍ ROZTOK (ŘEDĚNÍ)		
	X = navážka (mg) + DMSO (μl)	vysl	X (μl) + Y (médium, ml)	vysl	Max. koncent. látky μmol.l ⁻¹ / DMSO
LS 24	12,2 + 985,1	+	20 + 1,98	+	500
LS 25	12,8 + 831,9	+	20 + 1,98	+	500
LS 26	13,0 + 936,2	+	20 + 1,98	+	500
LS 27	11,9 + 843,6	+	20 + 1,98	+	500
LS 28	14,0 + 884,5	+	20 + 1,98	Zákal	500
LS 29	12,8 + 810,9	+	20 + 1,98	+	500
LS 30	10,9 + 820,6	+	20 + 1,98	+	500
LS 32	14,2 + 1069,0	+	20 + 1,98	+	500
LS 33	13,2 + 833,9	+	20 + 1,98	Zákal	500
LS 34	11,8 + 836,5	+	20 + 1,98	+	500

Tab. 15 Příprava testovacího média a ředění testovaných látek OJ 110 - OJ 119

LÁTKA	ROZPOUŠTĚNÍ		FINÁLNÍ ROZTOK (ŘEDĚNÍ)		
	X = navážka (mg) + DMSO (μl)	vysl	X (μl) + Y (médium, ml)	vysl	Max. koncent. látky μmol.l ⁻¹ / DMSO
OJ 110	11,1 + 821,2	+	20 + 1,98	Zákal	500
OJ 111	11,3 + 794,8	+	20 + 1,98	Zákal	500
OJ 112	11,8 + 790,9	+	20 + 1,98	Zákal	500
OJ 113	12,7 + 813,0	+	20 + 1,98	Zákal	500
OJ 114	13,4 + 821,0	+	20 + 1,98	Zákal	500
OJ 115	13,6 + 799,5	+	20 + 1,98	Zákal	500
OJ 116	12,3 + 793,1	+	20 + 1,98	Zákal	500
OJ 117	12,1 + 816,5	+	20 + 1,98	Zákal	500
OJ 118	12,9 + 795,2	+	20 + 1,98	Zákal	500
OJ 119	12,7 + 797,8	+	20 + 1,98	Zákal	500

Tab. 16 Příprava testovacího média a ředění testovaných látek OJMB 1 - OJMB 10

LÁTKA	ROZPOUŠTĚNÍ		FINÁLNÍ ROZTOK (ŘEDĚNÍ)		
KÓD	X = navážka (mg) + DMSO (μl)	vysl	X (μl) + Y (médium, ml)	vysl	Max. koncent. látky μmol.l ⁻¹ / DMSO
OJMB 1	7,9 + 792,9	+	20 + 1,98	+	500
OJMB 2	8,7 + 792,1	+	20 + 1,98	+	500
OJMB 3	11,1 + 873,6	+	20 + 1,98	+	500
OJMB 4	11,3 + 892,5	+	20 + 1,98	+	500
OJMB 5	8,5 + 773,9	+	20 + 1,98	+	500
OJMB 6	10,2 + 805,6	+	20 + 1,98	+	500
OJMB 7	7,5 + 809,8	+	20 + 1,98	+	500
OJMB 8	9,0 + 819,4	+	20 + 1,98	+	500
OJMB 9	8,0 + 787,3	+	20 + 1,98	+	500
OJMB 10	8,2 + 807,0	+	20 + 1,98	+	500

Tab. 17 Příprava testovacího média a ředění testovaných látek OJ 5, OJ 13 a OJ 17

LÁTKA	ROZPOUŠTĚNÍ		FINÁLNÍ ROZTOK (ŘEDĚNÍ)		
KÓD	X = navážka (mg) + DMSO (μl)	vysl	X (μl) + Y (médium, ml)	vysl	Max. koncent. látky μmol.l ⁻¹ / DMSO
OJ 5	15,2 + 818,9	+	20 + 1,98	Zákal	500
OJ 13	9,9 + 817,2	+	20 + 1,98	+	500
OJ 17	9,3 + 814,9 + 814,9 + 2x 814,9	- - -	NETESTOVÁNO NEROZPUSTNÉ V DMSO		

X- počet μl naředěné látky v DMSO tak, aby konečná koncentrace DMSO byla ≤ 2,5 %

Y-počet ml testovacího média – MH bujón

+ - látka je rozpustná v DMSO / v MH bujónu nebo tvoří homogenní suspenzi (před naředěním)

(+)-látka je částečně rozpustná v DMSO / MH bujónu (po určité době se vysráží)

- látka je nerozpustná v DMSO nebo nevratně vysráží MH bujón

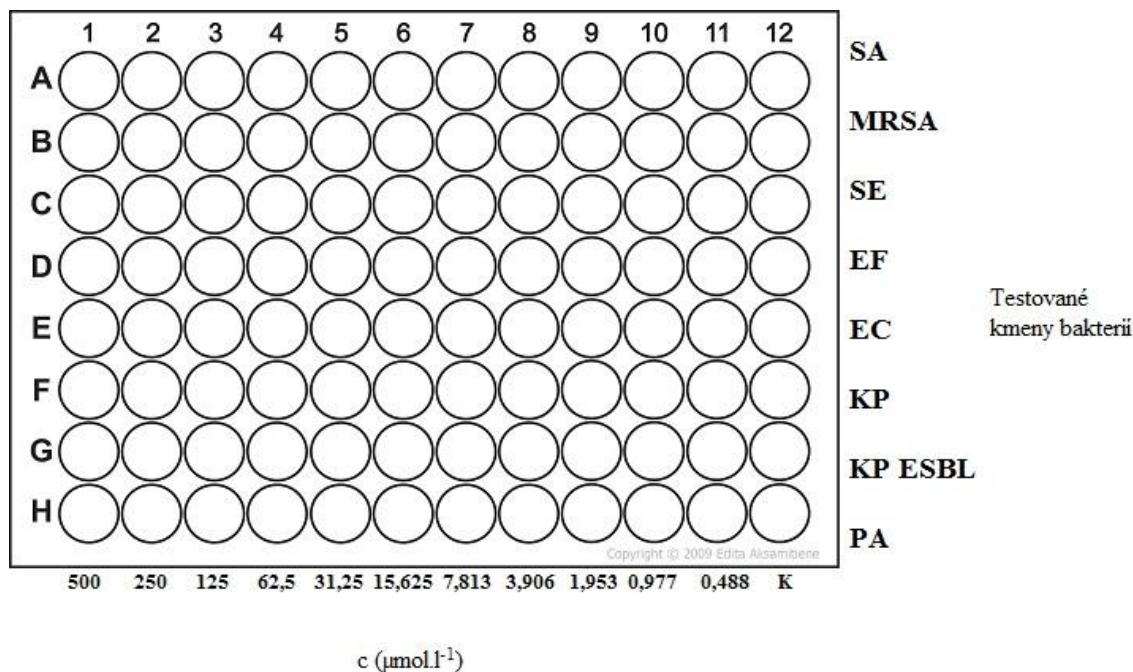
Do 10 sterilních zkumavek, které popíšeme číslem 2-11, si připravíme dvojkovou ředící řadu testované látky s DMSO. Do každé zkumavky nepipetujeme 0,5 ml DMSO, do 1. zkumavky označené číslem 2 napipetujeme 0,5 ml testované látky rozpuštěné v DMSO, promícháme a přeneseme 0,5 ml do zkumavky č. 3, opět promícháme a přeneseme 0,5 ml do zkumavky č. 4 a pokračujeme až po zkumavku č. 11.

Připravíme si 12ti jamkový rezervoár. Do jamek 2-12 napipetujeme 1,98 ml růstového média a přidáme 20 μ l naředěné testované látky podle čísel zkumavek z připravené ředící řady. Do 12. jamky rezervoáru přidáme 20 μ l samotného DMSO pro negativní kontrolu. V každé jamce rezervoáru získáme 2 ml pracovního roztoku s příslušnou koncentrací testované látky a kontrolu.

Pipetování do destičky:

Mikrotitrační destičku si popíšeme zkratkami jednotlivých bakteriálních kmenů. Jeden řádek mikrotitrační destičky přísluší jednomu bakteriálnímu kmenu, ve sloupcích jsou postupně klesající koncentrace testované látky (Obr. 5). Připíšeme kód testované látky a datum a poté pomocí 12ti kanálové pipety napipetujeme 200 μ l příslušného zásobního roztoku do všech řádků jedné mikrotitrační destičky.

Do každé jamky v příslušném řádku napipetujeme 10 μ l připravené suspenze bakteriálního kmene.



Obr. 5 Schéma mikrotitrační destičky

Inkubace:

Mikrotitrační destičku přiklopíme víčkem a inkubujeme v termostatu při teplotě 35 °C po dobu 24 a 48 hodin.

Vyhodnocení:

Po uplynutí inkubační doby hodnotíme nárůst v jamkách mikrotitrační destičky. Nárůst kolonie se projeví zákalem, pokud je růst inhibován, růstové médium v jamce zůstane čiré. Koncentrace látky inhibující růst bakterie odpovídá jamce, ve které dojde k 95 % potlačení růstu.

Testované látky poté lze rozdělit podle výsledné hodnoty MIC do čtyř skupin.

1. Silně účinné – hodnoty MIC 3,906; 1,953; 0,977 a 0,488 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
2. Středně účinné – hodnoty MIC 62,5; 31,25; 15,625 a 7,813 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
3. Slabě účinné – 500; 250 a 125 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
4. Neúčinné

3.3 Výsledky

3.3.1 Deriváty 3-aminopyrazin-2-karboxamidu

Tab. 18 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek LS 02 - LS 09

KMEN (kód)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC /IC 95 ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)							
		LS 02	LS 03	LS 04	LS 05	LS 06	LS 07	LS 08	LS 09
SA	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
MRSA	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
SE	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
EF	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
EC	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
KP	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
KP-E	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
PA	72 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	120 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500

Všechny látky z této skupiny se projevily na daných kmenech bakterií jako neúčinné.

Tab. 19 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek OJ 26 - OJ28

KMEN (kód)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC /IC 95 ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)		
		OJ 26	OJ 27	OJ 28
SA	24 h	> 500	> 500	> 250
	48 h	> 500	> 500	> 250
MRSA	24 h	> 500	> 500	> 250
	48 h	> 500	> 500	> 250
SE	24 h	> 500	> 500	250
	48 h	> 500	> 500	250
EF	24 h	> 500	> 500	> 250
	48 h	> 500	> 500	> 250
EC	24 h	> 500	> 500	> 250
	48 h	> 500	> 500	> 250
KP	24 h	> 500	> 500	> 250
	48 h	> 500	> 500	> 250
KP-E	24 h	> 500	> 500	> 250
	48 h	> 500	> 500	> 250
PA	72 h	> 500	> 500	> 250
	120 h	> 500	> 500	> 250

Žádná z těchto látek nevykázala výraznější antibakteriální účinek na dané kmeny bakterií. Pouze u látky OJ 28 se projevil velmi slabý účinek na *Staphylococcus epidermidis* a to pouze v nejvyšší koncentraci, která byla v tomto případě $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

3.3.2 Deriváty 3-chlorpyrazin-2-karboxamidu

Tab. 20 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek LSMP 02 - LSMP 09

KMEN (kód)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC /IC 95 ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)							
		LSMP 02	LSMP 03	LSMP 04	LSMP 05	LSMP 06	LSMP 07	LSMP 08	LSMP 09
SA	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
MRSA	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
SE	24 h	> 500	> 500	500	500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
EF	24 h	> 500	> 500	> 500	500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
EC	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
KP	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
KP-E	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
PA	72 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	120 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500

Žádná z těchto látek nevykázala významnější antibakteriální účinek na dané kmeny bakterií. Po 24 hodinách inkubace se projevila mírná citlivost *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus aureus* - methicillin rezistentní na látku LSMP 09, dále se projevila mírná citlivost *Staphylococcus epidermidis* na látku LSMP 04 a LSMP 05 a citlivost *Enterococcus faecalis* na látku LSMP 05. Ve všech případech se jednalo o nejvyšší koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Po 48 hodinách inkubace již však tento účinek nebyl patrný.

3.3.3 Deriváty *N*-benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidu

Tab. 21 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek LS 24 - LS 30

KMEN (kód)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC /IC 95 ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)						
		LS 24	LS 25	LS 26	LS 27	LS 28	LS 29	LS 30
SA	24 h	31,25	125	31,25	> 500	125	500	> 500
	48 h	31,25	125	31,25	> 500	250	500	> 500
MRSA	24 h	250	> 500	125	> 500	250	> 500	> 500
	48 h	250	> 500	125	> 500	500	> 500	> 500
SE	24 h	125	> 500	250	> 500	125	500	500
	48 h	125	> 500	250	> 500	250	500	500
EF	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
EC	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
KP	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
KP-E	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
PA	72 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	120 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500

Tab. 22 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek LS 32 - LS 34

KMEN (kód)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC /IC 95 ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)		
		LS 32	LS 33	LS 34
SA	24 h	500	62,5	> 500
	48 h	> 500	62,5	> 500
MRSA	24 h	> 500	250	> 500
	48 h	> 500	250	> 500
SE	24 h	500	31,25	250
	48 h	500	62,5	250
EF	24 h	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500
EC	24 h	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500
KP	24 h	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500
KP-E	24 h	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500
PA	72 h	> 500	> 500	> 500
	120 h	> 500	> 500	> 500

Některé látky z této skupiny již projevily výraznější účinek na bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* - methicillin rezistentní a *Staphylococcus epidermidis*, na ostatní kmeny však byly neúčinné. U látky LS 24 byl prokázán střední účinek na SA a slabý účinek na MRSA a SE, podobně na tom byla i látka LS 26. Látka LS 25 projevila slabší účinek na SA, látka LS 27 neprojevila zcela žádný účinek. Látka LS 28 projevila pouze slabý účinek na všech třech výše uvedených kmenech. Látky LS 29, LS 30, LS 32 a LS 34 projevili velmi slabý účinek. Jako nejúčinnější z této skupiny se ukázala látka LS 33, u které byl prokázán střední účinek alespoň na dvou bakteriálních kmenech a to na SA a SE, u MRSA se projevila také slabá citlivost.

3.3.4 Deriváty 3-amino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu

Tab. 23 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek OJ 110 - OJ 114

KMEN (kód)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC /IC 95 ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)				
		OJ 110	OJ 111	OJ 112	OJ 113	OJ 114
SA	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
MRSA	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
SE	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
EF	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
EC	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
KP	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
KP-E	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
PA	72 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	120 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500

Tab. 24 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek OJ 115 - OJ 119

KMEN (kód)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC /IC 95 ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)				
		OJ 115	OJ 116	OJ 117	OJ 118	OJ 119
SA	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
MRSA	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
SE	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
EF	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
EC	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
KP	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
KP-E	24 h	> 500	500	500	> 500	250
	48 h	> 500	500	500	> 500	250
PA	72 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	120 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500

Látky OJ 116, OJ 117 a OJ 119 vykázali slabý účinek na kmen *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní. Ostatní látky z této skupiny neprojevovaly zcela žádný účinek na žádném z testovaných bakteriálních kmenů.

3.3.5 Deriváty *N*-benzylpyrazin-2-aminu

Tab. 25 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek OJMB 1 - OJMB 5

KMEN (kód)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC /IC 95 ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)				
		OJMB1	OJMB2	OJMB3	OJMB4	OJMB5
SA	24 h	> 500	> 500	250	> 500	125
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	500
MRSA	24 h	> 500	> 500	250	> 500	500
	48 h	> 500	> 500	500	> 500	> 500
SE	24 h	500	500	125	500	125
	48 h	500	500	125	500	250
EF	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
EC	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
KP	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
KP-E	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
PA	72 h	500	500	500	> 500	> 500
	120 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500

Tab. 26 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek OJMB 6 - OJMB 10

KMEN (kód)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC /IC 95 ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)				
		OJMB6	OJMB7	OJMB8	OJMB9	OJMB10
SA	24 h	125	> 500	500	500	> 500
	48 h	125	> 500	500	> 500	> 500
MRSA	24 h	250	> 500	> 500	500	> 500
	48 h	500	> 500	> 500	> 500	> 500
SE	24 h	62,5	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	250	> 500	> 500	> 500	> 500
EF	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
EC	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
KP	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
KP-E	24 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
PA	72 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	120 h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500

Z této skupiny testovaných látek prokázala výraznější aktivitu pouze látka OJMB6, která projevila po 24 hodinové inkubaci střední účinek na kmen *Staphylococcus epidermidis*, za dalších 24 hodin byl však účinek slabý. Pouze slabý účinek projevily také látky OJMB 1 a OJMB 2 na kmenech SE a PA, látka OJMB 3 na kmenech SA, MRSA, SE a PA, látka OJMB 4 na kmenu SE, látka OJMB 5 na kmenech SA, MRSA a SE, látka OJMB 8 na kmenu SA a látka OJMB 9 na kmenech SA a MRSA. Látky OJMB 7 a OJMB 10 byly zcela neúčinné.

3.3.6 Deriváty 5-amino-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

Tab. 27 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek OJ 5, OJ 13 a OJ 17

KMEN (kód)	ID	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) -MIC /IC 95 ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)		
		OJ 5	OJ 13	OJ 17
SA	24 h	> 500	> 500	
	48 h	> 500	> 500	
MRSA	24 h	> 500	> 500	
	48 h	> 500	> 500	
SE	24 h	> 500	> 500	
	48 h	> 500	> 500	
EF	24 h	> 500	> 500	
	48 h	> 500	> 500	
EC	24 h	> 500	> 500	
	48 h	> 500	> 500	
KP	24 h	> 500	> 500	
	48 h	> 500	> 500	
KP-E	24 h	> 500	> 500	
	48 h	> 500	> 500	
PA	72 h	> 500	> 500	
	120 h	> 500	> 500	

Látky OJ 5 i OJ 13 se projeví na daných bakteriálních kmenech jako neúčinné. Látka OJ 17 se nerozpustila v DMSO, a proto nebyla dále testována.

4. DISKUZE

Počet bakterií, které jsou odolné vůči současným antibakteriálním látkám, neustále roste a s tím roste i potřeba vývoje nových, na tyto bakterie účinných struktur. Naléhavá potřeba vývoje nových antibiotik se týká zejména mikroorganismů vysoce adaptovaných na nemocniční prostředí. Z grampozitivních bakterií se jedná především o *Staphylococcus aureus* rezistentní k beta-laktamovým (MRSA) a glykopeptidovým antibiotikům (VRSA) a často také k dalším skupinám antibiotik, dále to jsou enterokoky rezistentní k vankomycinu (VRE). Mezi gramnegativními bakteriemi představují vážný problém multirezistentní enterobakterie s produkcí širokospektrých beta-laktamáz, nejčastěji je to *Klebsiella spp.* nebo *E. coli*, dále pak multirezistentní kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* nebo *Burkholderia cepacia*. U původců komunitních infekcí není situace v našich podmínkách zatím tak závažná a základní přípravky, jako jsou například peniciliny u bakteriálních respiračních infekcí, si stále zachovávají vysokou účinnost (Nyč, 2007).

Při vývoji nových antibakteriálních látek je třeba rozlišovat deriváty již známých molekul a zcela nové molekuly s mechanismem účinku dosud nevyužitým v klinické praxi. Deriváty mohou projevovat vyšší antibakteriální aktivitu, mohou mít lepší farmakologické vlastnosti, případně mohou lépe překonávat některé z mechanismů rezistence, ale málokdy se jedná o zásadní změnu oproti původnímu přípravku (Nyč, 2007).

V rámci diplomové práce jsem otestovala 52 nově syntetizovaných látek pomocí mikrodiluční bujónové metody na osmi bakteriálních kmenech. Látky byly rozděleny do 6 skupin na základě společné chemické struktury. Z těchto šesti skupin projevíly výraznější antibakteriální účinek pouze některé látky ze skupiny derivátů N-benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidu a ze skupiny derivátů N-benzyl-2-aminu. Ostatní čtyři skupiny se projevíly jako neúčinné nebo pouze slabě účinné.

Do první skupiny testovaných látek patří deriváty 3-aminopyrazin-2-karboxamidu. Jedná se o látky LS 02 – LS 09, které neprojevily zcela žádný účinek, a látky OJ 26 – OJ 28, z nichž látka OJ 28 jako jediná projevíla slabý účinek a to na kmen SE. Od ostatní látek ve skupině se liší přítomností piperazinu na třetím uhlíku pyrazin-2-karboxamidu. Prodlužování uhlíkových řetězců v pozicích *N* u látek LS 02 – LS 09 nemělo žádný vliv na antibakteriální účinnost.

Druhá skupina je složena z derivátů 3-chlorpyrazin-2-karboxamidu. Patří sem látky LSMP 04 – LSMP 09, z nichž látky LSMP 04, LSMP 05 a LSMP 09 projevily slabý účinek na některé kmeny bakterií při koncentraci $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$, za 48 hodin již inhibice růstu patrná nebyla a proto je tento účinek zanedbatelný. Látky této skupiny se liší délkou uhlíkového řetězce v *N* pozici 3-chlorpyrazin-2-karboxamidu, počet uhlíků připojených na amid však nemá na účinnost těchto látek žádný vliv.

Látky třetí skupiny s kódy LS 24 - LS 30 a LS 32 - LS 34 jsou deriváty *N*-benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidu. Tyto látky se mezi sebou liší přítomností methanolu (LS 25, LS 26), chloru (LS 27, LS 28, LS 33, LS 34), trifluormethanu (LS 29) nebo fluoru (LS 30, LS 32) na benzenovém jádře. Látka LS 24 nemá na benzenovém jádře navázanou žádnou skupinu nebo prvek a přesto vykazuje podobný účinek jako látka LS 26, která má na benzenovém jádře v pozici 4 navázaný methanol. Obě prokázaly střední účinek na SA a slabý účinek na MRSA a SE. Naopak látka LS 25, která má navázaný methanol v pozicích 2 a 4 benzenového jádra projevila pouze slabý účinek na SA. Z toho lze vyvodit, že navázání jedné molekuly methanolu na *N*-benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamid nemá na výslednou aktivitu žádný vliv, přidání další molekuly však aktivitu této látky snižuje.

Navázání jednoho chloru na benzenové jádro ať už v pozici 3 (LS 34) nebo 4 (LS 27) má za následek snížení aktivity *N*-benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidu. U látky LS 27 nebyl prokázán žádný účinek, látka LS 34 projevila pouze slabý účinek na SE. Přidáním dalšího chloru (LS 28, LS 33) se aktivita těchto látek zvyšuje. Látka LS 28 má navázaný chlor v pozicích 2 a 4 a projevila slabý účinek na kmeny SA, MRSA a SE. Látka LS 33 má navázaný chlor v pozicích 3 a 4 a projevila střední účinek na kmeny SA a SE a slabý účinek na MRSA. Z těchto výsledků se tedy dá usoudit, že přesunutím chloru z pozice 2 do pozice 3 na benzenovém jádře se zvyšuje antibakteriální aktivita dané látky. Třetí skupina se projevila jako nejúčinnější ze všech šesti, patří sem také nejúčinnější látka ze všech testovaných a to 3-chloro-*N*-(3,4-dichlorobenzyl)pyrazin-2-karboxamid (LS 33).

Přítomnost trifluormethanu na benzenovém jádře *N*-benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidu má za následek snížení antimikrobiální aktivity, stejně tak i přítomnost fluoru v pozici 4 (LS 30) a 2 (LS 32).

Třetí skupina se projevila jako neúčinnější ze všech šesti, patří sem také neúčinnější látka ze všech testovaných a to 3-chloro-*N*-(3,4-dichlorobenzyl)pyrazin-2-karboxamid (LS 33).

Čtvrtou skupinou jsou deriváty 3-amino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu označené kódy OJ 110 – OJ 119. Většina látek z této skupiny se projevila jako neúčinná, látky OJ 116, OJ 117 a OJ 119 projevily slabý účinek na KP-E. Prodlužování uhlíkového řetězce v pozici *N* na aminopyrazinu u látek OJ 110 – OJ 115 nemá žádný vliv na antibakteriální aktivitu. Připojení cyklohexanu (OJ 116) způsobilo slabý účinek na KP-E, připojení cyklopentanu (OJ 117) mělo stejný efekt a taktéž připojení methylbenzenu (OJ 119). Přítomnost cyklické struktury tedy může být příčinou tohoto slabého účinku, připojení cyklohexanu (OJ 118) však nemělo efekt žádný.

Do páté skupiny patří deriváty *N*-benzylpyrazin-2-aminu označené kódy OJMB 1 – OJMB 10. Látky této skupiny se od sebe odlišují navázáním prvku nebo skupiny prvků na benzenové jádro. Samotný *N*-benzylpyrazin-2-amin neprojevil žádný účinek na testované kmeny. Navázání methylové skupiny v pozici 4 na benzenovém jádře (OJMB 1) způsobilo pouze slabý účinek na SE a PA. Ten samý efekt mělo navázání chloru na tutéž pozici (OJMB 2). Chlor v pozici 2 (OJMB 8) způsobil pouze slabý účinek na SA. Navázání chloru na pozici 3 (OJMB 5) způsobilo slabý účinek na SE, SA a MRSA. Navázáním chloru na 3. pozici se tedy zvýšil počet citlivých kmenů, účinek této látky je však stále zanedbatelný. Podobná situace nastane i po navázání dvou chlorů na pozice 3 a 4 (OJMB 3). Zde je navíc slabý účinek na EF a PA, ale jen po 24 hodinové inkubaci.

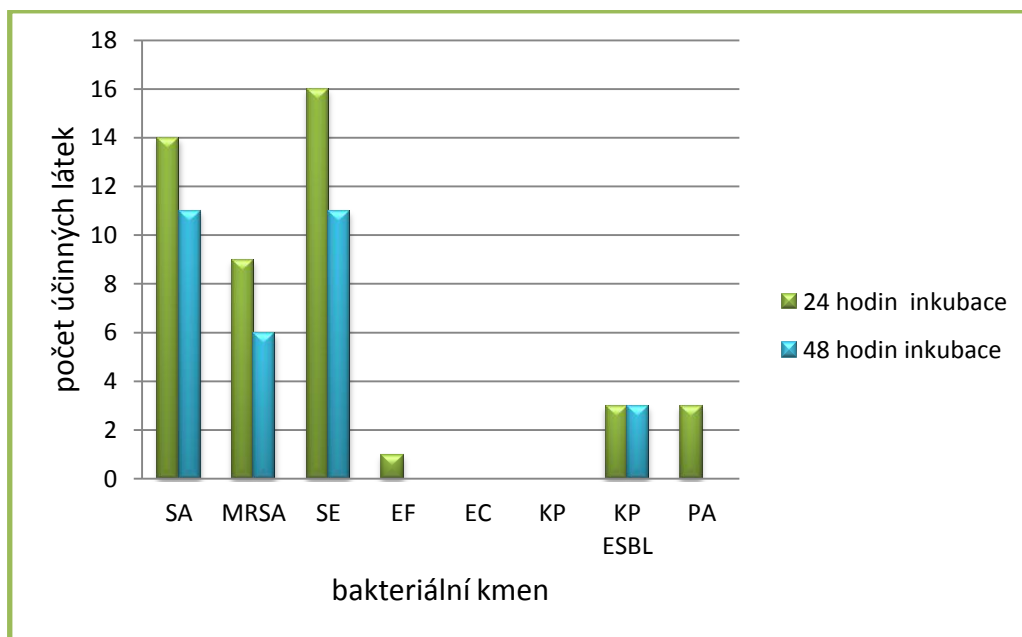
Látky OJMB 4 a OJMB6 se liší pozicí, na které je navázaný trifluomethan. V prvním případě se jedná o 3. pozici a tato látka má pouze slabý účinek na SE. Přesunutím CF₃ do pozice 4 (OJMB 6) došlo k navýšení citlivých kmenů o MRSA a SE. Zvýšil se také účinek na SA ze slabého na střední, ale jen po 24 hodinové inkubaci.

Navázání fluoru na pozici 2 (OJMB 9) způsobilo účinek na SA a MRSA, ovšem v zanedbatelné míře. Přesunutím fluoru do pozice 4 (OJMB 10) látka ztratila veškerou schopnost inhibovat testované kmeny.

Do šesté skupiny jsou řazeny pouze 3 látky, z nichž jedna nebyla testována z důvodu nerozpustnosti v DMSO. Jedná se o deriváty 5-amino-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Na tuto struktury byly navázány 3,5-bis(trifluormethy)benzen v pozici *N*

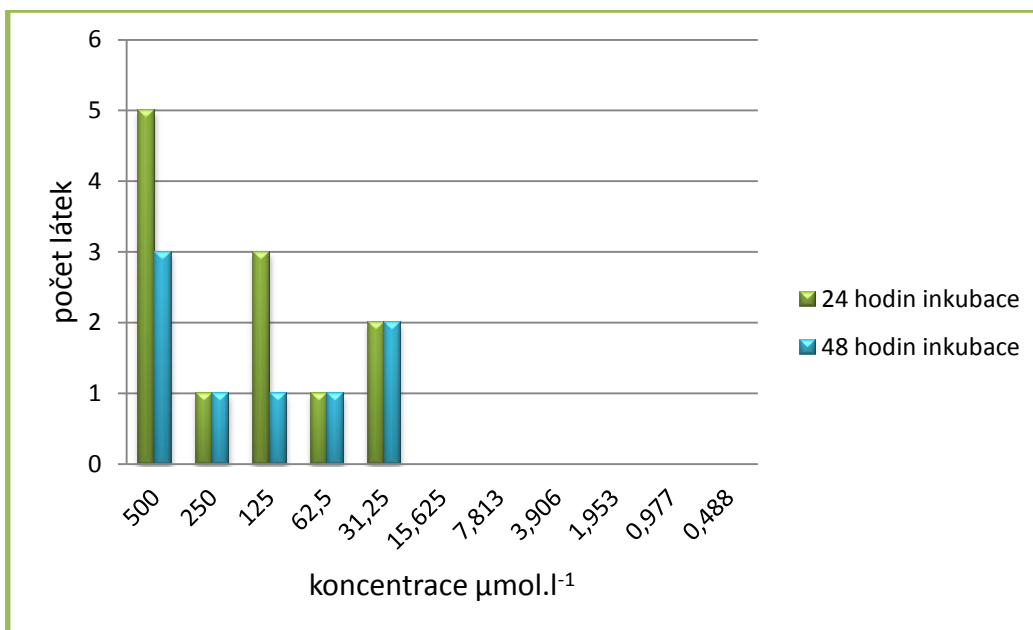
(OJ 5), methylpiperazin v 6. pozici 5-methylpyrazin-2,3 dikarbonitrilu (OJ 13) a piperazinu v téže pozici (OJ 17). Žádná z těchto struktur nemá vliv na účinek této skupiny, který je nulový.

Jako nejcitlivější k testovaným látkám se ukázal kmen SE, dále SA a jako třetí nejcitlivější byl kmen MRSA. Rezistenci ke všem testovaným látkám prokázaly kmeny EC a KP. (Graf 1). Vybrané látky tedy hlavně působily na grampozitivní koky.



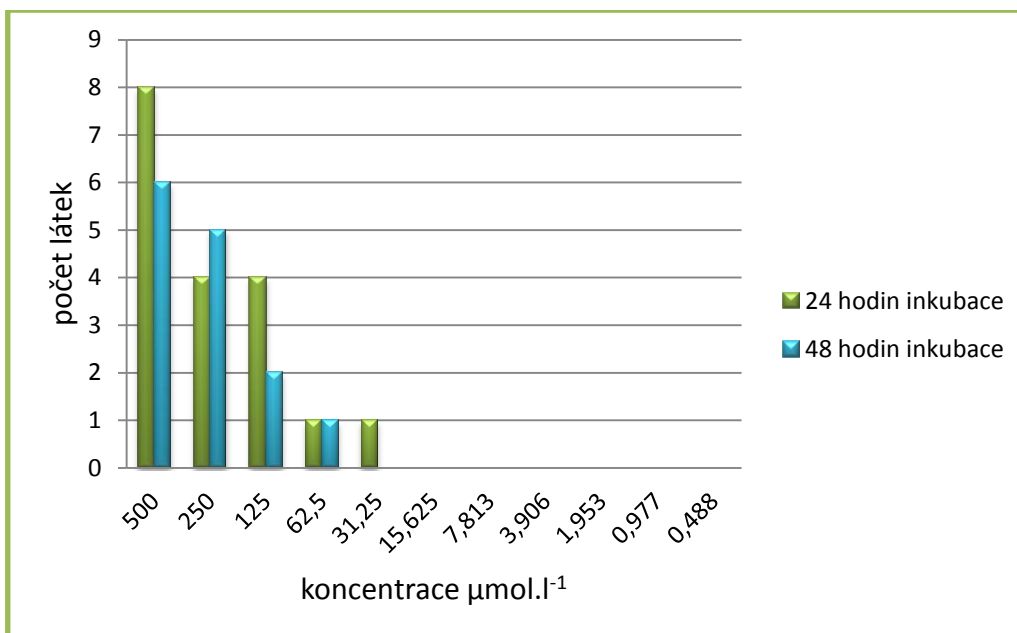
Graf 1 Počet látek účinných na jednotlivé bakteriální kmeny

Celkem 13 látek projevilo alespoň slabý účinek na kmen SA, z toho látka LS 33 působila při koncentraci $62,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a látky LS 24 a LS 26 účinkovali již při koncentraci $31,25 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Zbytek projevilo pouze slabý účinek (Graf 2).



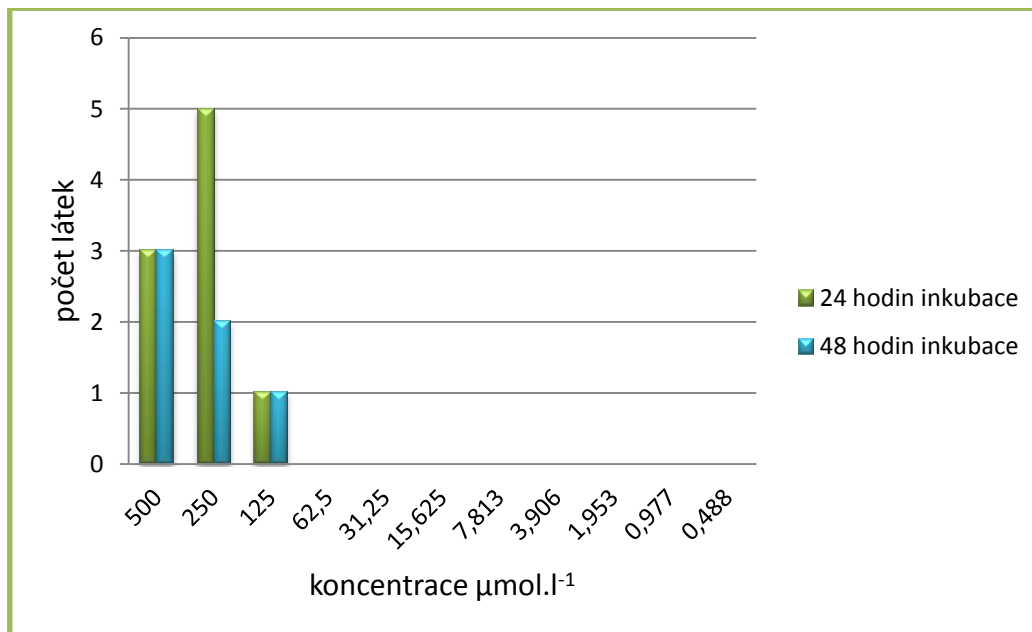
Graf 2 Počet látek účinných v jednotlivých koncentracích na kmen SA

Na kmen SE projevilo alespoň slabý účinek nejvíce testovaných látek a to celkem 17, většina však projevila pouze slabý účinek. Střední účinek projevila látka OJMB 6 a to při koncentraci 62,5 μmol.l⁻¹ po 24 hodinách (po 48 hodinách 250 μmol.l⁻¹) a látka LS 33 při koncentraci 31,25 μmol.l⁻¹ po 24 hodinách (po 48 hodinách 62,5 μmol.l⁻¹) (Graf 3).



Graf 3 Počet látek účinných v jednotlivých koncentracích na kmen SE

Celkem 8 látek projevilo účinek na kmen MRSA. Jedná se však pouze o koncentrace 500, 250 a 125 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (Graf 4) a tudíž pouze o slabé působení těchto látek.



Graf 4 Počet látek účinných v jednotlivých koncentracích na kmen MRSA

Na kmen EF působila slabě pouze 1 látka. Na kmen KP-ESBL projevily účinek i po 48 hodinách 3 z testovaných látek avšak pouze velmi slabý a na kmen PA působily slabě 3 látky, pouze však po 24 hodinové inkubaci.

Testované látky neprokázaly příliš dobrou účinnost na vybrané kmeny bakterií, a proto není pravděpodobné, že by mohly mít v budoucnu uplatnění v léčbě bakteriálních infekcí.

Vývoj nových antimikrobiálních látek je nezbytný, avšak technicky i finančně velmi náročný proces. Struktura bakteriální buňky je složitá, a tak není lehké vyvinout látku, která bude schopná dobře pronikat do bakteriální buňky a usmrtit ji. Bakterie si také v průběhu let vyvinuly vysoce účinné obranné mechanismy, jak proti těmto látkám bojovat (www.gsk.com).

Většina antibiotik objevených během let 1945-1960 jsou přírodní produkty vyrobené z větší části samotnými bakteriemi. Tyto biologicky aktivní sekundární metabolity byly produkovány za účelem zabíjení konkurenčních bakterií v prostředí, nebo jako signální molekuly, které mají zcela jinou funkci a jejich antibakteriální aktivita je pouze vedlejším účinkem. Mikroorganismy, které antibiotika produkují a mikroorganismy

žijící vedle nich si tak mohli vyvinout specifické mechanismy rezistence, které inaktivují antibiotikum nebo jinak chrání před toxickým účinkem těchto látek. Co se týče synteticky vyrobených látek, bakterie neměly možnost mnohaleté expozice a tak bychom se mohli domnívat, že si bakterie proti těmto látkám nevypěstují odolnost tak snadno, nicméně obranné mechanismy vyvinuté za účelem chránit mikroorganismus před různými toxickými molekulami přírodního původu často poskytují zkříženou ochranu i látkám synteticky vyrobeným (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Další překážkou v rozvoji nových antibiotik spočívá v procesu klinických studií, který zahrnuje preklinické, klinické a regulační schvalovací procesy. Tento proces je zdoluhavý a je spojen s velmi vysokými náklady (Cooper, 2015).

Vzhledem k velmi omezeným možnostem vývoje nových antibiotik s unikátním mechanismem účinku na rezistentní původce infekčních onemocnění je třeba zachovat účinnost existujících léčiv a zajistit co nejširší možnosti antibiotické léčby. Je proto nezbytné velmi pečlivě dodržovat zásady správné antibiotické praxe (Jindrák a kol., 2014).

„Optimální léčebné praxe a dlouhodobého zachování účinnosti antibiotik je možné dosáhnout pouze systematickou a důslednou podporou jejich uvážlivého používání bez uplatňování represivních opatření. K tomu je třeba vytvořit systém založený na široce dostupném poradenství a pomoci kvalifikovaných specialistů při řešení klinických situací i závažných epidemiologických problémů souvisejících s antibiotickou rezistencí. Jde tedy o trpělivé poskytování specializovaných odborných služeb klinickým pracovištím označované nepřeložitelným anglickým pojmem „antimicrobial stewardship““ (Jindrák a kol., 2014).

5. ZÁVĚR

1. Pomocí mikrodiluční bujónové metody byla vyhodnocena aktivita 52 potenciálně antibakteriálních nově syntetizovaných látek.
2. Na základě chemické struktury byly testované látky rozděleny do 6 skupin.
3. Všechny látky byly otestovány na 8 bakteriálních kmenech zahrnujících grampozitivní i gramnegativní bakterie včetně původců závažných nozokomiálních infekcí.
4. Nejvyšší antibakteriální aktivita byla zaznamenána u skupiny derivátů *N*-benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidu.
5. Jako neúčinnější byla vyhodnocena látka 3-chloro-*N*-(3,4-dichlorobenzyl)pyrazin-2-karboxamid patřící do skupiny s nejvyšší antibakteriální aktivitou.
6. Testované látky účinkovali především na grampozitivní koky. Nejcitlivější byly kmeny SE, SA a MRSA. Kmeny EC a KP byly zcela rezistentní ke všem testovaným látkám.
7. Vzhledem k vysokým hodnotám MIC testovaných látek není pravděpodobné, že by tyto látky mohly v budoucnu sloužit k léčbě bakteriálních infekcí.

LITERATURA

Odborná literatura:

1. BEDNÁŘ, Marek, FRAŇKOVÁ, Věra, SCHINDLER, Jiří, SOUČEK, Andrej a VÁVRA, Jiří. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996. 558 s.
2. BENEŠ, Jiří. *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén, c2009. 651 s. ISBN 978-807-2626-441
3. BRHELOVÁ, Eva. *Beta-laktamázy se širokým spektrem účinku, jejich genetický základ a metody detekce*. Brno, 2010. 56 s. Bakalářská práce. Ústav experimentální biologie. Přírodovědecká fakulta. Masarykova univerzita.
4. BUCHTA, Vladimír. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. 192 s. ISBN 80-718-4565-5
5. DOLEJSKÁ, Monika. *Escherichia coli a koliformní bakterie rezistentní k antimikrobiálním látkám na mléčných farmách v České republice*. Brno, 2008. 70 s. Rigorózní práce. Přírodovědecká fakulta. Masarykova univerzita
6. GREENWOOD, David, SLACK, Richard C. a PEUTHERER, John F. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. 1. vyd. Překlad Jiří Schindler. Praha: Grada, 1999. 686 s. ISBN 80-716-9365-0
7. HUBÁČEK, Josef, BEZDĚK, Milan a JANEČEK, Jiří. *Vybrané kapitoly z molekulární genetiky mikroorganismů*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1992. 253 s. ISBN 80-200-0168-9
8. JINDRÁK, Vlastimil, HEDLOVÁ, Dana a URBÁŠKOVÁ, Pavla. *Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici*. 1. vyd. Praha: Mladá fronta, 2014. 709 s. Aeskulap. ISBN 978-802-0428-158
9. JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006. 404 s. ISBN 80-246-1270-4
10. LEVY, Stuart B. *Antibiotický paradox: jak se nesprávným používáním antibiotik ruší jejich léčebná moc*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2007. 312 s. Galileo, sv. 8. ISBN 978-802-0014-856
11. SCHINDLER, Jiří. *Ze života bakterií*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2008. 143 s. ISBN 978-80-200-1666-9

12. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. 223 s., [24] s. příl. ISBN 978-802-4731-704
13. VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902-8966-5
14. VOTAVA, Miroslav, BROUKAL, Zdeněk a VANĚK, Jiří. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2., přepr. vyd. Brno: Neptun, 2005. 351 s. ISBN 80-868-5000-5
15. VOTAVA, Miroslav, BROUKAL, Zdeněk a VANĚK, Jiří. *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře*. Brno: Neptun, c2007. 567 s. ISBN 978-808-6850-030

Odborné články:

1. ALUŠÍKOVÁ, Marie a kol. *Možnosti antimikrobní léčby infekcí způsobených MRSA*. FARMAKOTERAPEUTICKÉ INFORMACE. Měsíčník pro lékaře a farmaceuty, 2015, no. 4, p. 1-4. ISSN 1211-0647
2. ANDREWS, Jennifer M. *Determination of minimum inhibitory concentrations*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001, vol. 48, suppl 1, p. 5-16. ISSN 1460-2091
3. BAKER, Carolyn N., STOCKER, Sheila A., CULVER, David H. and THORNSBERRY, Clyde. *Comparison of the E Test to Agar Dilution, Broth Microdilution, and Agar Diffusion Susceptibility Testing Techniques by Using a Special Challenge Set of Bacteria*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1991, vol. 29, no. 3, p. 533-538. 0095-1137/91/030533-06\$02.00/0
4. BERGEROVÁ, Tamara, HENDLOVÁ, Dana, JINDRÁK Vlastimil, URBÁŠKOVÁ, Pavla a CHMELÍK, Václav. *Doporučený postup pro kontrolu výskytu kmenů Staphylococcus aureus rezistentních k oxacilinu (MRSA) a s jinou nebezpečnou antibiotickou rezistencí ve zdravotnických zařízeních*. Státní zdravotní ústav [online], 2005, 15s. [cit. 2015-02-12]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/lecebne-doporucene-postupy?highlightWords=MRSA>
5. COOPER, Matthew. *We need new antibiotics to beat superbugs, but why are they so hard to find?* [online]. THE CONVERSATION 14. 1. 2015 [cit. 2015-04-04] Dostupné z: <http://theconversation.com/we-need-new-antibiotics-to-beat-superbugs-but-why-are-they-so-hard-to-find-36144>

6. MATUSCHEK, Erika, BROWN, Derek F. J. and KAHLMETER, Gunnar. *Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories*. EUCAST, 2013, Clin Microbiol Infect 2014; 20: O255–O266 10.1111/1469-0691.12373
7. NYČ, Otakar. *Potřeba a perspektivy nových antibiotik* [online]. Remedia, 2007, roč. 17, č. 5 [cit. 2015-03-18]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2007/5-2007/Potreba-a-perspektivy-novych-antibiotik/e-9p-9Z-iu.magarticle.aspx>
8. URBÁŠKOVÁ, Pavla, ŽEMLIČKOVÁ, Helena a HRABÁK, Jaroslav. *Jaké breakpointy používat pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti bakterií k antibiotikům?* ZPRÁVY EPIDEMIOLOGIE A MIKROBIOLOGIE. SZÚ, PRAHA 2010; 19(9), p. 266–267

Internetové zdroje:

9. *All Wales Medicines Strategy Group. ceftarolin fosamil (Zinforo®)* [online]. 29. 7. 2013 [cit. 2015-02-16]. Dostupné z: <http://www.awmsg.org/awmsgonline/app/appraisalinfo/1065>
10. *Antibiotics research* [online]. 2001-2015 [cit. 2015-04-04]. Dostupné z: <http://www.gsk.com/en-gb/research/antibiotics-research/>
11. *Antibiotika a jejich použití* [online]. Poslední revize 5. 6. 2011. [cit. 2015-01-29]. Dostupné z: http://www.who.cz/attachments/article/64/NM_Antibiotika_panely.8_10.pdf
12. *ANTIMICROBIAL RESISTANCE LEARNING SITE. Examples of Antibiotic Sensitivity Testing Methods* [online]. 2011 [cit. 2015-02-16]. Dostupné z: <http://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/detecting-antimicrobial-resistance/test-methods/examples-of-antibiotic-sensitivity-tesing-methods>
13. *ANTIMICROBIAL RESISTANCE LEARNING SITE. Intrinsic Resistance* [online]. 2011. [cit. 2015-02-07]. Dostupné z: <http://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/molecular-basis-for-antimicrobial-resistance/intrinsic-resistance>
14. *Classification of Cephalosporin Antibiotics* [online]. 20. 5. 2013 [cit. 2015-02-16]. Dostupné z: <http://medimoon.com/2013/05/classification-of-cephalosporin-antibiotics/>

15. *EUROPEA ANTIBIOTIC AWARENESS DAY. Factsheet for experts* [online]. 2005-2015 [cit. 2015-02-10]. Dostupné z: <http://ecdc.europa.eu/en/eaad/antibiotics/Pages/factsExperts.aspx>
16. *Challenges for the Development of New Antimicrobials— Rethinking the Approaches* [online]. Report of a Workshop. National Academy of Sciences, 2006 [cit. 2015-04-03]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19843/>
17. *Informační materiály určené předepisujícím lékařům v primární péči. Brožura pro pacienty* [online]. Poslední revize 12. 9. 2011. [cit. 2015-01-29]. Dostupné z: http://ecdc.europa.eu/cs/eaad/Documents/Primary%20care%20-%20Patient%20Flyer_CZE.pdf
18. *New VITEK® 2 GN AST Cards Available* [online]. 15. 8. 2012 [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://www.biomerieuxconnection.com/08-15-12-new-vitek-cards.html>
19. *PŘÍRUČKA MIKROBIOLOGIE PRO BAKALÁŘE 3. LF UK. Diluční metoda* [online]. Poslední revize 12. 2. 1014. [cit. 2015-02-25]. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/mic/mic.htm>

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Obr. 1 Difúzní diskový test.....	37
Obr. 2 Bujónový mikrodiluční test.....	38
Obr. 3 E-test.....	39
Obr. 4 Vitek 2 systém.....	39
Obr. 5 Schéma mikrotitrační destičky.....	59
Tab. 1 Charakteristika antimikrobních látek.....	17
Tab. 2 Baktericidní a bakteriostatická antibiotika.....	19
Tab. 3 Kritéria pro výběr nejvhodnější antibiotické léčby.....	31
Tab. 4 Strukturní vzorce a údaje o molekulové hmotnosti a navážce látek LS 02 - LS 09.....	41
Tab. 5 Strukturní vzorce a údaje o molekulové hmotnosti a navážce látek OJ 26 - OJ 28.....	42
Tab. 6 Strukturní vzorce a údaje o molekulové hmotnosti a navážce látek LSMP 02 - LSMP 09.....	43
Tab. 7 Strukturní vzorce a údaje o molekulové hmotnosti a navážce látek LS 24 - LS 30 a LS 32 - LS 34.....	45
Tab. 8 Strukturní vzorce a údaje o molekulové hmotnosti a navážce látek OJ 110 - OJ 119.....	47
Tab. 9 Strukturní vzorce a údaje o molekulové hmotnosti a navážce látek OJMB 1 - OJMB 10.....	49
Tab. 10 Strukturní vzorce a údaje o molekulové hmotnosti a navážce látek OJ 5, OJ 13 a OJ 17.....	51
Tab. 11 Příprava testovacího média a ředění testovaných látek LS 02 - LS 09.....	54

Tab. 12 Příprava testovacího média a ředění testovaných látek OJ 26 - OJ 27.....	55
Tab. 13 Příprava testovacího média a ředění testovaných látek LSMP 02 - LSMP 09...	55
Tab. 14 Příprava testovacího média a ředění testovaných látek LS 24 - LS 30 a LS 32 - LS 34.....	56
Tab. 15 Příprava testovacího média a ředění testovaných látek OJ 110 - OJ 119.....	56
Tab. 16 Příprava testovacího média a ředění testovaných látek OJMB 1 - OJMB 10...	57
Tab. 17 Příprava testovacího média a ředění testovaných látek OJ 5, OJ 13 a OJ 17....	57
Tab. 18 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek LS 02 - LS 09.....	60
Tab. 19 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek OJ 26 - OJ28.....	61
Tab. 20 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek LSMP 02 - LSMP 09.....	62
Tab. 21 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek LS 24 - LS 30.....	63
Tab. 22 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek LS 32 - LS 34.....	63
Tab. 23 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek OJ 110 - OJ 114.....	64
Tab. 24 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek OJ 115 - OJ 119.....	65
Tab. 25 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek OJMB 1 - OJMB 5.....	66
Tab. 26 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek OJMB 6 - OJMB 10.....	66
Tab. 27 Výsledné hodnoty MIC testovaných látek OJ 5, OJ 13 a OJ 17.....	67
Graf 1 Počet látek účinných na jednotlivé bakteriální kmeny.....	72
Graf 2 Počet látek účinných v jednotlivých koncentracích na kmen SA.....	73
Graf 3 Počet látek účinných v jednotlivých koncentracích na kmen SE.....	73
Graf 4 Počet látek účinných v jednotlivých koncentracích na kmen MRSA.....	74