

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Stanovení antimikrobiální aktivity vybraných salicylamidů obsahujících
benzthiazolový blok

Bc. Simona Jadrná

Diplomová práce

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Simona Jadrná**
Osobní číslo: **C17441**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Stanovení antimikrobiální aktivity vybraných salicylamidů obsahujících benzthiazolový blok**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

1. Zpracovat poznatky studia antimikrobiálních aktivit popsaných derivátů 1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl) alkylaminů.
2. Zpracovat dostupné metody stanovení antimikrobiálních aktivit chemických sloučenin.

Experimentální část:

1. Provést stanovení hodnot minimálních inhibičních koncentrací u vybraných gram pozitivních i gram negativních bakterií mikrodiluční agarovou metodou.
2. Zjištěné minimální inhibiční koncentrace porovnat s účinky běžně používaných antibiotik.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Vladimír Pejchal, Ph.D.**

Ústav organické chemie a technologie

Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

/ V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

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

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice. Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 1. 5. 2019

.....

Bc. Simona Jadrná

Poděkování:

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Vladimírovi Pejchalovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a za poskytnutí testovaných derivátů. Děkuji také doc. Ing. Marcele Pejchalové, Ph.D. za cenné rady a vstřícnost při konzultacích. Mé poděkování patří také doc. MVDr. Renátě Karpíškové, Ph.D. z výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně za poskytnutí klinického materiálu. Dále děkuji Bc. Ingrid Galgaňákové a Bc. Haně Odehnalové za nemalý podíl na vývoji metody. Děkuji také laborantce Drahomíře Hofmanové za vstřícný přístup. Závěrem patří velké poděkování mé rodině a příteli, kteří mi v průběhu celého studia byli oporou a pomáhali mi.

ANOTACE

Téma této diplomové práce je stanovení antimikrobiální aktivity derivátů 1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl) alkylaminů. Minimální inhibiční koncentrace byly stanoveny agarovou mikrodiluční metodou. Zjištěné minimální inhibiční koncentrace byly porovnány s účinky běžně používaných antibiotik.

KLÍČOVÁ SLOVA

antimikrobiální aktivita, mikrodiluční metoda, deriváty 1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl) alkylaminů, minimální inhibiční koncentrace, rezistence, antibiotika

TITLE

Determination of antimicrobial activity of selected salicylamides containing benzthiazole block

ANNOTATION

The topic of this thesis is the determination of antimicrobial activity of 1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl) alkylamines derivatives. Minimum inhibitory concentrations were determined by agar microdilution method. The observed minimal inhibitory concentrations were compared with those of commonly used antibiotics.

KEYWORDS

antimicrobial activity, microdilution method, 1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl) alkylamines derivatives, minimum inhibitory concentration, resistance, antibiotics

Obsah

ÚVOD	12
1 TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1 Antimikrobiální aktivita	13
1.2 Antibiotika	13
1.2.1 β -laktamy	15
1.2.2 Aminoglykosidy	15
1.2.3 Polypeptidy	16
1.2.4 Glykopeptidy	16
1.2.5 Tetracykliny	17
1.2.6 Makrolidy	17
1.2.7 Linkosamidy	18
1.2.8 Sulfonamidy	18
1.3 Biologické aktivity benzthiazolu a jeho derivátů	19
1.4 Rezistence na antimikrobiální látky	20
1.4.1 Mechanismy získané rezistence	22
1.5 Charakteristika testovaných mikroorganismů	25
1.5.1 Rod <i>Escherichia</i>	25
1.5.2 Rod <i>Pseudomonas</i>	26
1.5.3 Rod <i>Enterococcus</i>	27
1.5.4 Rod <i>Streptococcus</i>	27
1.5.5 Rod <i>Staphylococcus</i>	28
1.6 Stafylokoková enterotoxikóza	29
1.6.1 Stafylokokové enterotoxiny (SE)	29
1.6.2 Detekce stafylokokových enterotoxinů	30
1.7 Testování citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám	31
1.7.1 Disková difúzní metoda	32
1.7.2 E-test	33
1.7.3 Makrodiluční bujonová metoda	34
1.7.4 Mikrodiluční bujonová metoda	35
1.7.5 Agarová difúzní metoda	35
1.7.6 Agarová diluční metoda	36
1.7.7 Automatizované přístrojové systémy	36

2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
2.1	Laboratorní pomůcky	38
2.2	Přístroje a zařízení laboratoře	38
2.3	Chemikálie	39
2.4	Kultivační média a pracovní roztoky	39
2.4.1	Mueller Hinton Agar	39
2.4.2	Mueller Hinton Bujón	39
2.4.3	Fyziologický roztok	39
2.4.4	1 M NH ₄ OH	40
2.5	Testované mikroorganismy	40
2.6	Testované deriváty 1-(6-fluorbenzothiazol-2-yl) alkylaminů	41
2.7	Metody charakterizace	42
2.7.1	Bod tání	42
2.7.2	NMR spektroskopie	42
2.7.3	Optická otáčivost	42
2.8	Charakterizace připravených látek	43
2.9	Testovaná antibiotika	59
2.9.1	Ampicilin sodium salt	59
2.9.2	Amoxicilin	59
2.9.3	Tetracycline hydrochloride	59
2.9.4	Penicilin G salt	60
2.9.5	Clindamycin hydrochloride	60
2.9.6	Erythromycin	61
2.10	Pracovní postupy	61
2.10.1	Příprava bakteriální suspenze	61
2.10.2	Ředění bakteriální suspenze	61
2.10.3	Agarová mikrodiluční metoda	61
2.10.4	Příprava výchozí koncentrace antibiotik	64
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	65
	ZÁVĚR	97
	POUŽITÁ LITERATURA	98
	SEZNAM PŘÍLOH	110

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 Rozdělení antibiotik dle místa působení	14
Obrázek 2 Struktura benzothiazolu.....	19
Obrázek 3 Biochemická a genetická podstata rezistence	22
Obrázek 4 Disková difúzní metoda.....	33
Obrázek 5 E-test.....	34
Obrázek 6 Mikrodiluční bujonová metoda.....	35
Obrázek 7 Agarová difúzní metoda, testovaný kmen <i>S. aureus</i> na ATB oxacilin	36
Obrázek 8 Přístroj Sensititre ARIS 2X	37
Obrázek 9 Strukturní vzorec - Ampicilin sodium salt	59
Obrázek 10 Strukturní vzorec – Amoxicilin	59
Obrázek 11 Strukturní vzorec – Tetracycline hydrochloride	60
Obrázek 12 Strukturní vzorec – Penicilin G salt	60
Obrázek 13 Strukturní vzorec – Clindamycin hydrochloride.....	60
Obrázek 14 Strukturní vzorec – Erythromycin.....	61
Obrázek 15 Strukturní vzorce neúčinnějších derivátů S3 a S6	92
Schéma 1 Příprava koncentrační řady	63
Schéma 2 Pipetování do mikrotitrační destičky	63

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Hlavní typy efluxních systémů.....	24
Tabulka 2 Přehled testovaných bakteriálních kmenů	40
Tabulka 3 Příprava výchozí koncentrace antibiotik.....	64
Tabulka 4 Antimikrobiální aktivita derivátu S1	65
Tabulka 5 Antimikrobiální aktivita derivátu S2	66
Tabulka 6 Antimikrobiální aktivita derivátu S3	67
Tabulka 7 Antimikrobiální aktivita derivátu S4	68
Tabulka 8 Antimikrobiální aktivita derivátu S5	69
Tabulka 9 Antimikrobiální aktivita derivátu S6	70
Tabulka 10 Antimikrobiální aktivita derivátu S7	71
Tabulka 11 Antimikrobiální aktivita derivátu S8	72
Tabulka 12 Antimikrobiální aktivita derivátu S9	73
Tabulka 13 Antimikrobiální aktivita derivátu S10	74
Tabulka 14 Antimikrobiální aktivita derivátu S11	75
Tabulka 15 Antimikrobiální aktivita derivátu S12	76
Tabulka 16 Antimikrobiální aktivita derivátu S13	77
Tabulka 17 Antimikrobiální aktivita derivátu S14	78
Tabulka 18 Antimikrobiální aktivita derivátu S15	79
Tabulka 19 Antimikrobiální aktivita derivátu S16	80
Tabulka 20 Antimikrobiální aktivita ampicilinu sodium salt	81
Tabulka 21 Antimikrobiální aktivita erythromycinu	83
Tabulka 22 Antimikrobiální aktivita penicilinu G salt	85
Tabulka 23 Antimikrobiální aktivita clindamycinu hydrochloride	86
Tabulka 24 Antimikrobiální aktivita tetracyclinu hydrochloride	88
Tabulka 25 Antimikrobiální aktivita amoxicilinu	90

SEZNAM ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
BIA	bioelektrická impedanční analýza
CA-MRSA	methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> spojený s komunitou
CFU	jednotky tvořící kolonie (z angl. <i>colony forming units</i>)
CNS	centrální nervová soustava
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	z angl. <i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
ESBL	širokospektré β -laktamázy
EUCAST	evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (z angl. <i>The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
MALDI-TOF MS	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (z angl. <i>matrix-assisted laser desorption /ionization time-of-flight</i>)
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. <i>mass spectrometry</i>)
NMR	nukleární magnetická rezonance
PBP	protein vázající penicilin (z angl. <i>penicillin-binding protein</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PET	pozitronová emisní tomografie
PVL	Pantonův-Valentinův leukocidin
RNA	ribonukleová kyselina
RPLA	reverzní pasivní latexová aglutinace
SE	stafylokokový enterotoxin
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
XTT	solubilní sloučenina (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid)

ÚVOD

Tématem této diplomové práce je stanovení antimikrobiální aktivity vybraných salicylamidů obsahujících benzthiazolový blok. Benzthiazol je spojován s celou řadou biologických aktivit. Benzthiazolové deriváty přitahují velký zájem zejména pro své antimikrobiální, antifungální, antikarcinogenní, antivirotické a další účinky. Syntéza nových benzthiazolových derivátů a jejich testování je proto aktuální téma, zejména z důvodu objevu nových potenciálních antimikrobiálních činidel, která by mohla být zavedena do klinické praxe.

Antimikrobiální rezistence představuje narůstající problém ve zdravotnictví. Každý rok si infekce způsobené rezistentními kmeny na antibiotika vyžádají smrt mnoha tisíců lidských životů. Proto je velmi důležité neustále objevovat nové potenciální antimikrobiální látky, které by byly účinné proti těmto rezistentním kmenům, zejména proti *Pseudomonas aeruginosa* a methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*.

Cílem této práce je stanovit minimální inhibiční koncentrace derivátů 1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl) alkylaminů u vybraných testovaných bakteriálních kmenů pomocí agarové mikrodiluční metody. Dále otestovat běžně používaná antibiotika a hodnoty minimálních inhibičních koncentrací testovaných derivátů porovnat s hodnotami minimálních inhibičních koncentrací antibiotik.

V případě, že by se antimikrobiální účinnost nově syntetizovaných derivátů přibližovala antimikrobiálnímu účinku antibiotik, mohly by být tyto deriváty dále zkoumány a případně využity v budoucnosti jako léčivé prostředky.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální látky jsou využívány k profylaxi a k léčbě infekčních onemocnění. Pokud jsou takové látky získané z bakterií nebo plísní, nazývají se antibiotika (Votava a kol., 2010). Antimikrobiální látky působí bakteriostaticky či baktericidně. Ovšem různé bakterie reagují na baktericidní látky odlišně. To je dáno buď vlastními rozdíly, jako je např. jedinečné složení buněčných struktur anebo je to dáno rozvojem rezistence – adaptací či genetickou výměnou. Při nízkých koncentracích působí baktericidní látky často pouze bakteriostaticky a jsou baktericidní pouze ve vyšších koncentracích. Aby byly baktericidní látky účinné, musí dosáhnout dostatečně vysoké koncentrace v cílovém místě (Cloete, 2003).

Problémy s rezistencí na antibiotika vyžadují neustálý vývoj nových antibakteriálních látek. Je potřeba stále objevovat nové sloučeniny, které jsou účinné proti patogenům odolným vůči antibiotikům. Především se to týká mikroorganismů jako jsou MRSA (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*), koaguláza-negativní stafylokoky a gramnegativní bakterie, způsobující těžké nozokomiální infekce (Bush K. a kol., 2011). Navzdory rostoucím problémům s rezistencí na antimikrobiální látky mezi významnými bakteriálními patogeny, počet nových antibiotik uváděných na trh poklesl. Jejich vývoj čelí významným překážkám. Značný problém představují výdaje na farmaceutický výzkum a vývoj nové látky. Dalším z důvodů poklesu je skutečnost, že většina zřejmých cílů pro antibakteriální aktivitu již byla objevena (Moellering, 2011).

1.2 Antibiotika

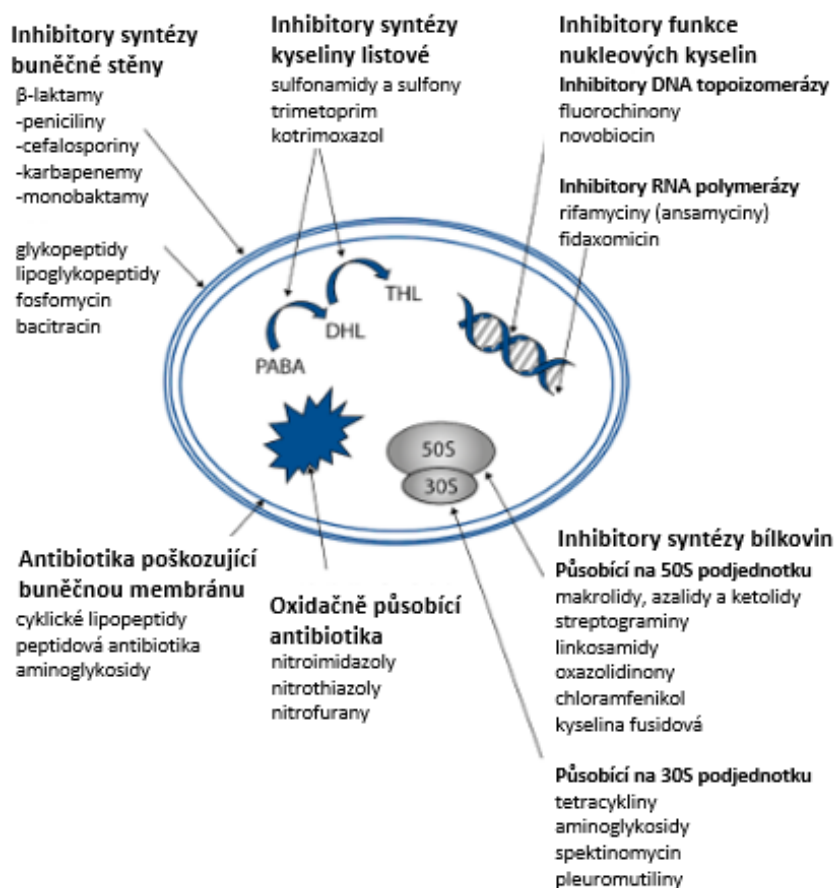
Antibiotika jsou produkována především bakteriemi, plísněmi a aktinomycetami. Odlišení antibiotik od ostatních léků spočívá především v tom, že většina léků působí na buňky lidského těla, ovšem antibiotika působí na bakterie vyskytující se v tkáních (Beneš, 2018). Na mikroorganismy mají antibiotika baktericidní či bakteriostatický účinek. Baktericidní účinek spočívá v rychlém usmrcení mikroorganismu, na rozdíl od bakteriostatického, při kterém dochází k zastavení růstu a množení mikroorganismu (Julák, 2006).

Antibiotika působí na citlivé bakteriální buňky různými mechanismy, viz obr. 1. Jedním z možných mechanismů je potlačení tvorby buněčné stěny bakterií – takto působí např. penicilin a cykloserin (Klaban, 2005). Další mechanismus spočívá v inhibici proteosyntézy –

erytromycin, streptomycin, aj. (Votava a kol., 2010). Některá antibiotika inhibují syntézu nukleových kyselin bakterií – aktinomycin D. Posledním mechanismem je poškození buněčné membrány, která v sobě má vlivem poškození otvory a je porušena její osmotická funkce – polymyxin B (Klaban, 2005).

Mezi antibiotika s baktericidním účinkem řadíme β -laktamy, aminoglykosidy, polypeptidy, glykopeptidy, fluorochinolony, nitroimidazoly, aj. K antibiotikům s bakteriostatickým účinkem patří mimo jiné tetracykliny, chloramfenikoly, makrolidy, linkosamidy a sulfonamidy (Votava, 2005). Každé antibiotikum má spektrum účinnosti a podle toho se dělí na antibiotika se širokým spektrem (aminoglykosidy, tetracykliny, aj.), se středním spektrem (penicilin, bacitracin, aj.) a úzkým spektrem (např. viomycin) (Klaban, 2005).

Antibiotika představují jednu z neúspěšnějších forem terapie v medicíně. Jejich účinnost je však ohrožena rostoucím počtem patogenů rezistentních vůči antibiotikům (Lin a kol., 2015).



PABA – kyselina p-aminobenzoová, **DHL** – kyselina dihydrolistová, **THL** – kyselina tetrahydrolistová

Obrázek 1 Rozdělení antibiotik dle místa působení (Beneš, 2018)

1.2.1 β -laktamy

Antibiotika patřící mezi β -laktamy, mají ve své chemické struktuře β -laktamový kruh, na který jsou navázány různé substituenty. Podle charakteru těchto substituentů a dalších kritérií existuje několik podskupin β -laktamových antibiotik. Patří mezi ně peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy (Julák, 2006). Mechanismus jejich působení spočívá ve vazbě na penicilin vázající protein, což je transpeptidáza podílející se na syntéze peptidoglykanu – klíčová složka buněčné stěny. Touto vazbou na aktivní místa penicilin vázajícího proteinu se inhibuje jeho aktivita, čímž se zničí integrita buněčných stěn a nastává buněčná smrt (Lingzhi a kol., 2018).

Peniciliny jsou získávány z kultury plísně *Penicillium chrysogenum* a dalších plísní, produkujících 6-aminopenicilanovou kyselinu. Jsou vysoce účinné a vyznačují se velmi nízkou toxicitou. Cefalosporiny jsou tvořeny zejména kyselinou 7-aminocefalosporanovou, která byla poprvé izolována z kultury plísně *Cephalosporium acremonium*. Mají široké spektrum účinku a značí se malou toxicitou (Kong a kol., 2009). β -laktamy jsou nejrozšířenějšími antibiotiky používanými k léčbě řady bakteriálních infekcí.

Celosvětovým problémem v oblasti zdravotní péče se stala rezistence na tyto antibiotika. Hlavním ohrožujícím mechanismem rezistence vůči β -laktamovým antibiotikům je produkce β -laktamázy. Tento enzym štěpí β -laktamový kruh a dochází tím ke ztrátě účinku antibiotika (Lin a kol., 2015).

1.2.2 Aminoglykosidy

Aminoglykosidy jsou další třídou klinicky důležitých antibiotik pro léčbu bakteriálních patogenů (Lin a kol., 2015). Poprvé byla tato antibiotika izolována z aktinomycet – gentamicin z rodu *Micromonospora* a streptomycin ze *Streptomyces griseus*. Ve své molekule obsahují aminosacharidy, zejména 2-deoxystreptamin nebo glukosamin. Mají silný baktericidní účinek na gramnegativní aerobní bakterie (Ritter a kol., 2001). Jsou nejčastěji používanými antibiotiky pro léčbu závažných infekcí gramnegativními bakteriemi - například rody *Escherichia*, *Enterobacter* či *Pseudomonas*. Dobře účinkují také na stafylokoky, mykobakterie a některé streptokoky (Hermann, 2007).

Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici funkce ribosomů. Váží se na jednotku 30S a brání vzniku iniciačních komplexů, od nichž se rozvíjí syntéza bakteriálních proteinů. K dosažení tohoto místa se váží na buněčnou stěnu bakterií a aktivním transportem procházejí do buněčného cytosolu. Z aminoglykosidů je nejčastěji používán gentamicin, dále se používá streptomycin, tobramycin, amikacin, aj. Mezi časté nežádoucí účinky patří

nefrotoxicita a ototoxicita. Méně častým nežádoucím účinkem je neurotoxicita (Avent a kol., 2011).

1.2.3 Polypeptidy

Polypeptidová antibiotika mají strukturu rozvětvených cyklických polypeptidů. Řadí se mezi antibiotika baktericidní. Mezi nejvíce klinicky používána antibiotika z této skupiny patří polymyxiny. Polymyxiny jsou tvořeny aminokyselinami, které jsou izolovány z bakterie *Bacillus polymyxa*. Vykazují dobrý účinek na většinu gramnegativních bakterií včetně *Pseudomonas aeruginosa* (Govaerts a kol., 2002). Vzhledem k tomu, že tato antibiotika mají velkou molekulu, nedokáží pronikat dobře tkáněmi a mají výrazný nefrotoxický účinek.

Mechanismus účinku polymyxinů spočívá v přímé interakci s lipidovou složkou lipopolysacharidu (Velkov a kol., 2013). Bakteriální buněčná membrána je počátečním místem působení pro Polymyxin E. Polymyxin E se váže na lipopolysacharid a fosfolipidy ve vnější membráně buněk gramnegativních bakterií. Vytěsňuje dvojmocné kationty (Ca^{2+} a Mg^{2+}) z fosfátových skupin membránových lipidů, což vede k narušení vnější membrány buněk, úniku intracelulárního obsahu a bakteriální smrti (Biswas a kol., 2012).

Polymyxin E, také označovaný jako kolistin, je účinným antibiotikem proti většině gramnegativních bakterií rezistentních vůči více lékům. V současné době se používá pro léčbu závažných bakteriálních infekcí, které způsobují např. *Klebsiella*, *Enterobacter* či *Acinetobacter*. Při léčbě bakteriémie, pneumonie a infekcí močových cest se podávají polymyxiny intravenózně. Polymyxin B lze použít pouze lokálně, vzhledem k jeho vyšší toxicitě (Falagas a kol., 2005).

1.2.4 Glykopeptidy

Glykopeptidová antibiotika mají strukturu glykosylovaného heptapeptidu. Mechanismus jejich účinku spočívá v narušení syntézy bakteriální stěny. Heptapeptidová kostra glykopeptidového antibiotika se váže na terminální D-alanyl-D-alanin na konci peptidových řetězců prostřednictvím vodíkových vazeb. Tím dochází k inhibici transglykosylace a/nebo transpeptidace, které se podílejí právě na biosyntéze buněčné stěny (Butler a kol., 2014). Řadí se mezi antibiotika s baktericidním účinkem.

Významným glykopeptidovým antibiotikem je vankomycin, který byl původně izolovaný ze *Streptomyces orientalis*. Účinkuje na některé grampozitivní bakterie a na spirochety. Působí i na rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* či *Corinebacterium jeikeium*. Vankomycin vykazuje toxicitu – poškozuje ledviny, CNS a

ucho. Podává se v pomalé intravenózní infuzi, aby se zabránilo uvolnění histaminu. Teikoplanin je směs několika látek, které jsou s vankomycinem příbuzné. Má podobné spektrum účinku jako vankomycin a vykazuje menší toxicitu (Votava, 2005).

1.2.5 Tetracykliny

Tetracyklinová antibiotika jsou širokospektrální bakteriostatická antibiotika vykazující aktivitu proti infekcím způsobeným grampozitivními a gramnegativními bakteriemi, dále mykoplazmaty či chlamydiemi. Účinkují také na některé parazitické prvky. Základní strukturu tetracyklinu tvoří čtyři šestičlenné cykly (Daghrir a kol., 2013). Prvním objeveným antibiotikem z této skupiny je chlortetracyklin, který byl produkován *Streptomyces aureofaciens*. Ve své molekule obsahuje atom chloru. Mezi tetracykliny patří i například teramycin, doxycyklin či minocyklin (Klaban, 2005).

Mechanismem účinku tetracyklinů je inhibice proteosyntézy – zabraňují vazbě aminoacyl-tRNA na dané vazebné místo ribosomu. Výsledkem je pak zastavený buněčný růst (Thaker a kol., 2010). Mezi vedlejší účinky těchto antibiotik patří například nauzea a průjem. Většina bakterií rezistentních na tetracyklin nese 1 a více z 36 různých genů rezistentních na tetracyklin. Často jsou tyto geny na mobilních prvcích jako jsou plazmidy či transpozony (Eliopoulos a kol., 2003).

1.2.6 Makrolidy

Makrolidová antibiotika obsahují ve své struktuře makrolaktonový kruh s 14-16 atomy, na které jsou navázány aminosacharidy a další postranní řetězce. Tento makrolaktonový kruh a postranní řetězce přispívají k vazebné afinitě léčiva na ribosomální RNA a tím dochází k inhibici proteosyntézy. Struktura postranních řetězců přímo ovlivňuje interakci léčiva se specifickými zbytky ribosomální RNA (Kannan a kol., 2011). Jejich účinek je bakteriostatický.

První objevené antibiotikum z této skupiny je erythromycin, který byl izolován z aktinomycety *Streptomyces erythreus*. Má podobné spektrum účinku jako penicilin. Proto se využívá jako alternativa při léčbě infekcí u pacientů přecitlivělých na penicilin. Také působí na řadu gramnegativních bakterií (Omura, 2002). Dalšími klinicky často používanými antibiotiky této skupiny jsou například klaritromycin a spiramycin.

Používají se k léčbě infekcí dýchacích cest, (včetně komunitní pneumonie), faryngitid, tonzilitid, infekcí kůže a měkkých tkání a urogenitálních infekcí (Kannan a kol., 2011). Toxicita makrolidů je poměrně nízká a její projevy většinou nastanou až po dlouhodobém

užívání. Mezi vedlejší účinky patří hepatotoxicita, ototoxicita či gastrointestinální potíže (Julák, 2006).

1.2.7 Linkosamidy

Linkosamidy mají chemickou strukturu odvozenou od prolinu, který je substituovaný amidy a aminosacharidem thiolinkosamidem. Mají podobný mechanismus účinku jako antibiotika makrolidová. Jejich působení spočívá ve vazbě na ribosomu, čímž dochází k inhibici peptidyltransferázy a zábrany vzniku peptidické vazby. Mají bakteriostatický účinek (Leclercq, 2002).

Účinkují na grampozitivní koky – zejména streptokoky a stafylokoky, ale i např. na intracelulární bakterie, jako jsou rody *Chlamydia* a *Rickettsia* (Leclercq, 2002). Jako příklad antibiotika této skupiny lze uvést linkomycin, izolovaný z kmene *Streptomyces lincolnensis*. Má velmi nízkou toxicitu a podává se parenterálně či perorálně. Dalším antibiotikem je například clindamycin. Clindamycin je při léčbě bakteriálních infekcí obvykle účinnější než linkomycin, zejména u infekcí způsobených anaerobními bakteriemi. Může být také použitý k léčbě protozoálních onemocnění, např. malárie. Nežádoucí účinky se projevují průjemem či reakcí v místě aplikování léku (Spížek a kol., 2004).

1.2.8 Sulfonamidy

Sulfonamidová antibiotika mají podobnou strukturu jako kyselina sulfanilová. Mechanismus jejich účinku spočívá v tom, že působí jako kompetitivní inhibitory aktivního místa enzymu, který katalyzuje reakci v cyklu metabolismu kyseliny tetrahydrolistové. S kyselinou sulfanilovou soutěží o aktivní místo na tomto enzymu - dihydropteorátsyntetáze. Kyselina tetrahydrolistová je potřebná k syntéze nukleových kyselin, vzhledem k tomu, že je nutná pro syntézu purinů a pyrimidinů. Mechanismem působení je tedy inhibice syntézy nukleových kyselin bakterie (Votava, 2005) (Yang, 2015).

Sulfonamidy mají široké spektrum účinku. Působí na většinu grampozitivních mikroorganismů – například stafylokoky, streptokoky či klostridie. Z gramnegativních mikroorganismů účinkují na chlamydie, legionely, hemofily, aj. Nežádoucí účinky se vyskytují často, ovšem ve výjimečných případech jsou závažné (např. jaterní nekróza nebo akutní hemolytická anémie). Dnes se samotné sulfonamidy nepodávají, ovšem kombinace sulfamethoxazolu s thrimethoprimem se velmi uplatňuje jako co-trimoxazol (Tolika a kol., 2010).

1.3 Biologické aktivity benzthiazolu a jeho derivátů

Benzthiazol je heterocyklická sloučenina s různorodými biologickými aktivitami. Síra a atomy dusíku tvoří základní strukturu thiazolu. Základní struktura benzthiazolu se skládá z benzenového jádra, které je v pozici 4 a 5 spojeno s thiazolem, viz obr. 2. Společně tyto dva kruhy vytváří základní jádro 1,3-benzthiazolu. Heterocyklické sloučeniny jsou velmi široce distribuovány v přírodě a jsou nezbytné pro život různými způsoby. Jako příklad lze uvést vitamín B₆ (pyridoxin), což je derivát pyridinu, který je nezbytný pro metabolismus aminokyselin (Yadav a kol., 2011).



Obrázek 2 Struktura benzothiazolu (Yadav a kol., 2011)

Benzthiazolový kruh je přítomen v různých mořských nebo suchozemských přírodních sloučeninách, které vykazují užitečné biologické aktivity. Benzthiazolové deriváty přitahují velký zájem kvůli své antimikrobiální, antifungální, antivirotické a antikarcinogenní aktivitě. Dále jsou užitečné také jako antialergická a protizánětlivá činidla (Bondock a kol., 2010). Proto našly tyto deriváty své široké uplatnění v bioorganické a medicíně při objevu nových léčiv (Chugunová a kol., 2015).

Protinádorovou aktivitu vykazují zejména fenylyl-substituované benzthiazoly. Substituované 6-nitro a 6-aminobenzthiazoly vykazují především antimikrobiální aktivitu (Prabhu a kol., 2011). Téměř všechny sloučeniny syntetizovaných 6-substituovaných 2-aminobenzthiazolových derivátů vykazovaly antifungální aktivitu. Některé z těchto sloučenin poskytovaly hodnoty minimální inhibiční koncentrace i 4 až 8 $\mu\text{g/ml}$ vůči kvasinkám *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* a *Candida tropicalis* (Catalano a kol., 2013). Studie zabývající se vztahem mezi aktivitou a strukturou derivátů ukázaly, že změna struktury substituční skupiny v pozici 2 zpravidla změní bioaktivitu derivátu (Imramovský a kol., 2013).

Již dříve bylo prokázáno, že účinné inhibitory cholinesterázy mohou být použity pro léčbu pozdních příznaků Alzheimerovy choroby a zároveň by také mohly působit jako neuroprotektivní činidla. Ve studii Pejchal a kol. (2016) bylo syntetizováno 16 nových derivátů (*R*)-1-(6-fluorbenzo[*d*]thiazol-2-yl) ethanaminu jako inhibitorů acetylcholinesterázy

a butyrylcholinesterázy. Byla hodnocena inhibiční aktivita těchto derivátů a také byla zkoumána cytotoxicita nejúčinnějších sloučenin proti lidským buněčným liniím metodou XTT testu. Získané údaje prokázaly vysokou inhibiční aktivitu některých z těchto derivátů proti cholinesterázám a zároveň zanedbatelnou cytotoxicitu. Výsledky studie naznačují, že by tyto deriváty mohly být využity při terapii Alzheimerovy choroby (Pejchal a kol., 2016).

Enzym tyrosinkináza je zapojen do buněčných signálních drah a je spojen s proliferací, apoptózou, opravou a angiogenezí rakovinných buněk. Více než dvě třetiny lidských nádorů pochází z epitelálních tkání a tyrosinkináza je u většiny těchto nádorů nadměrně exprimována. Benzthiazolové deriváty s antikarcinogenními účinky prokázaly, že mají inhibiční účinky proti tyrosinkináze a mohly by sloužit jako její inhibitory. Ve studii Wang a kol. (2006) byla provedena syntéza nových fluorovaných 2-arylbenthiazolů. 4-, 5- a 6-fluorované arylbenthiazoly se značeným uhlíkem se jeví jako nová potencionální činidla při zobrazování nádoru metodou PET pro tyrosinkinázu (Wang a kol., 2006).

Diabetes mellitus je onemocnění považované za jednu z pěti hlavních příčin umrtí na světě. Ve studii Mariappan a kol. (2012), byla syntetizována nová řada benzthiazolových derivátů pro testování hypoglykemické aktivity. Tato aktivita se testovala in vivo na diabetickém modelu indukovaným streptozotocinem na kryse. Nově syntetizované deriváty vykazovaly značné účinky ve srovnání s glibenklamidem – silným antidiabetikem. Perorální podávání syntetizovaných sloučenin významně snížilo hladinu glukózy v krvi (Mariappan a kol., 2012) (Madhuri a kol., 2014).

Významnou antibakteriální aktivitu vykazuje merkapto-benzothiazol a 2-amino-5/6-hydroxybenzothiazol. Antikarcinogenní aktivita byla prokázána u ftalamidu, který obsahoval benzthiazolové deriváty (Yadav a kol., 2011). Benzthiazolové deriváty byly také vyhodnoceny jako potenciální diagnostické látky vázající amyloid u neurodegenerativních onemocnění (Soni a kol., 2010).

V současné době se ve spojení s dřívějšími studiemi o syntéze a biologických vlastnostech substituovaných benzthiazolů syntetizují stále nové deriváty za účelem posílení biologické aktivity. Struktura nově vznikajících syntetizovaných sloučenin se potvrzuje NMR spektroskopii (Prabhu a kol., 2011).

1.4 Rezistence na antimikrobiální látky

Bakteriální odolnost vůči antibiotikům stále ztěžuje léčbu život ohrožujících onemocnění. Nesprávné a nadměrné užívání antibiotik hraje rozhodující roli ve vývoji

rezistence (McEachran a kol., 2015). Antibiotická rezistence v posledních desetiletích přináší rostoucí tlak na celosvětovou lidskou zdravotní péči. Odhaduje se, že představuje každoročně až 700 000 umrtí (Bengtsson-Palme a kol., 2016).

Rezistenci mikrobů k antimikrobiálním látkám lze rozdělit na přirozenou a získanou. Přirozenou rezistenci mají například streptokoky na aminoglykosidy, listerie na cefalosporiny nebo klebsiely na ampicilin (Votava, 2005). Primární rezistence může být zapříčiněna absencí cílové struktury či její nízkou citlivostí ke konkrétnímu antibiotiku (Julák, 2006). Této rezistence se využívá při přípravě selektivních půd – např. se přidává bacitracin do kultivačního média pro izolaci hemofilů (Votava, 2005).

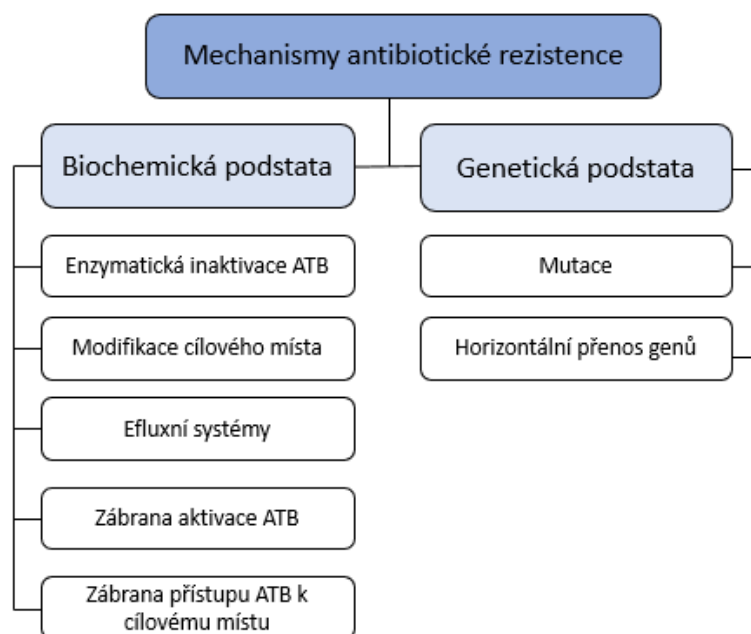
Vznik antibiotické rezistence u *S. aureus* začal v polovině 40. let, kdy se v nemocnicích zvýšil počet infekcí způsobených kmeny *S. aureus* rezistentních vůči penicilinu. Tyto kmeny produkovaly plazmidem kódovanou penicilinázu, která hydrolyzuje β -laktamový kruh penicilinu. Penicilin-rezistentní kmeny způsobovaly komunitní infekce a počátkem 50.let i pandemické infekce. Tyto infekce z velké části vymizely po zavedení methicilinu. První zprávy o rezistenci kmene *S. aureus* na methicilin jsou z roku 1961 (Chambers a kol., 2009). Bylo to o 2 roky později po jeho zavedení. *S. aureus* vyvinul rezistenci na methicilin v důsledku získání genu *mecA*. Během posledních 45 let se po celém světě šířily různé kmeny *S. aureus* rezistentní na methicilin. Kromě toho od 90. let 20. století se v celosvětovém měřítku rozšířily virulentní kmeny MRSA spojené s komunitou (CA-MRSA). Tyto virulentní kmeny mnohdy způsobují infekce u zdravých lidí, kteří žijí v komunitě (např. domov pro seniory) a kteří nebyli v nemocničním zařízení. CA-MRSA kmeny produkují Pantonův-Valentinův leukocidin (PVL) - nejprve byly rozšířeny v komunitě, později i ve zdravotnických zařízeních (Deurenberg a kol., 2008).

Antimikrobiální látky jsou užitečným nástrojem k prevenci a léčbě onemocnění nejen lidí, ale i zvířat. Po podání se významná část antimikrobiálních látek vylučuje stolicí a močí. Pokud se taková stolice použije jako živočišné hnojivo, může se tak dostat do půdy. Hlavním problémem při zavádění antimikrobiálních látek do půdy je šíření antimikrobiální rezistence. Mezi nejrozšířenější veterinární antimikrobiální látky v průmyslových zemích patří tetracykliny, makrolidy, aminoglykosidy a sulfonamidy (Accinelli a kol., 2007).

Znalost molekulárních mechanismů rezistence vůči antibiotikům je nezbytná pro rozvoj nových opatření k překonání tohoto problému. Jedním z možných opatření je vývoj inhibitorů rezistenčních enzymů. Tyto inhibitory mohou být podávány spolu s antibiotiky, čímž dochází k blokaci rezistence a správné účinnosti antibiotika (Džidic a kol., 2008).

1.4.1 Mechanismy získané rezistence

Získaná rezistence se vyvinula u velkého množství bakterií až po zavedení antibiotik do léčby infekčních onemocnění. Bylo popsáno několik mechanismů, které tuto získanou rezistenci zajišťují. Patří k nim: enzymatická inaktivace antibiotika, zábrana přístupu antibiotika k cílovému místu, aktivní transport antibiotika z bakteriální buňky, zábrana aktivace antibiotika či modifikace cílového místa (Beneš, 2018). Rozdělení dle biochemické a genetické podstaty znázorněno na obr. 4.



Obrázek 3 Biochemická a genetická podstata rezistence (vytvořeno dle Džidic a kol., 2008)

Mechanismus enzymatické inaktivace antibiotika může nastat v případě, že bakterie získá geny kódující enzymy, které dokáží rozštěpit molekulu antimikrobiální látky dříve, než je schopna účinkovat. Jako příklad lze uvést β -laktamázy (Tenover, 2006). β -laktamázu kóduje gen *blaZ*. Tento převážně extracelulární enzym je syntetizován při vystavení působení β -laktamových antibiotik. Je schopný hydrolyzovat β -laktamový kruh a tím činí antibiotikum inaktivním. Gen *blaZ* je pod kontrolou dvou sousedních regulačních genů – *blaR1* a *blaI* (Lowy, 2003). Byly rozpoznány čtyři molekulární třídy β -laktamáz: penicilinázy třídy A, β -laktamázy třídy B, cefalosporinázy třídy C a oxakilinázy třídy D (Poole, 2002). Klinicky významné jsou širokospektré β -laktamázy ESBL a AmpC. Produkce ESBL gramnegativními bakteriemi je důsledkem neúčinnosti penicilinu, cefalosporinu a monobaktamu při léčbě závažných infekcí. ESBL se často nacházejí v plasmidech, které jsou přenosné z kmene na kmen mezi bakteriálními druhy. Enterobakterie produkující ESBL jsou zodpovědné za

početné výskyty infekcí na celém světě. Volba antimikrobiální léčby je často komplikovaná multirezistencí. Mnoho mikroorganismů produkujících ESBL exprimuje také β -laktamázy AmpC a mohou být společně přenášeny s plazmidy zprostředkujícími aminoglykosidovou rezistenci. V současné době jsou karbapenemy považovány za léčiva pro léčbu infekcí způsobených mikroorganismy produkujícími ESBL. Použití karbapenemů bylo bohužel spojeno se vznikem bakteriálních druhů rezistentních na karbapenem, jako je např. *Pseudomonas* sp (Rupp a kol., 2003). Bakteriální rezistence na aminoglykosidy je založena také na enzymatické inaktivaci antibiotika. Rozdílem oproti β -laktamům je, že místo rozštěpení molekuly antibiotika dochází k chemické modifikaci připojením postranní skupiny – acetylace, fosforylace (Beneš, 2018). Rovněž jsou známy případy rezistence na makrolidy a tetracykliny v důsledku enzymatické inaktivace. Rezistence na chloramfenikol je typicky zprostředkována acetyltransferázami (Poole, 2002).

Dalším mechanismem je zábrana přístupu antibiotika k cílovému místu. Tento mechanismus spočívá ve schopnosti bakterie vytvořit kolem sebe ochrannou bariéru. Bariérou může být například pouzdro či vrstva hlenu, pokud roste bakterie v biofilmu. U gramnegativních bakterií slouží jako vysoce účinná ochranná bariéra zevní membrána. Hydrofilní antibiotikum se do periplasmatického prostoru dostane přes poriny, kterých jsou v bakteriální buňce různé druhy. Bakterie omezením počtu příslušného typu porinů nebo změnou propustnosti může zabránit vstupu antibiotika. Antibiotika s velkou molekulou nemohou přes poriny projít a tím se jejich účinek omezuje na grampozitivní bakterie, např. glykopeptidy. Poslední možnou ochrannou bariérou je cytoplasmatická membrána. Některá antibiotika se dokážou dostat do cytoplasmy pouze pomocí transportních systémů aktivním transportem. Bakterie je schopna v důsledku mutace kódujícího genu aktivitu těchto systémů omezit nebo zcela zrušit. Takto funguje např. rezistence k fosfomycinu (Beneš, 2018).

Aktivní transport antibiotika z bakteriální buňky je dalším z možných mechanismů. K aktivnímu odčerpávání antibiotika z bakteriální buňky slouží efluxní pumpy. Efluxní pumpy jsou transportní proteiny zapojené do vytlačování toxických substrátů z buněk do vnějšího prostředí. Tyto proteiny se nachází v gramnegativních i grampozitivních bakteriích. Pumpy mohou být specifické pro jeden substrát nebo mohou přenášet řadu strukturně odlišných sloučenin (Webber a kol., 2003). Všechna čerpadla vytlačují chemicky nezměněný substrát systémem závislým na energii, který využívá buď iontový gradient (proton či Na^+) nebo ATP. Hlavní typy efluxních systémů jsou uvedeny v tabulce 1. V mnoha případech jsou geny kódující efluxní pumpy součástí operonu, přičemž regulační gen řídí expresi. Zvýšená exprese je spojena s odolností vůči substrátům. Značnou obavou je široká substrátová

specifita těchto efluxních čerpadel (Kumar a kol., 2005). Efluxní systémy přispívající odolnosti vůči antibiotikům, byly popsány i v řadě klinicky významných bakterií, včetně *Campylobacter jejuni* (CmeABC), *Escherichia coli* (AcrAB) nebo *Pseudomonas aeruginosa* (MexAB). Všechny tyto efluxní systémy spadají do skupiny RND, který je

typický pro gramnegativní bakterie a vyznačuje se širokou substrátovou specifitou. Neregulovaná nadměrná exprese efluxních pump je pro bakterie potenciálně nevýhodná – vyloučí se sice toxické substráty, ale mohou být ztraceny živiny a metabolické meziprodukty (Webber a kol., 2003).

Tabulka 1 Hlavní typy efluxních systémů (vytvořeno dle Beneš, 2018)

Systém	Anglický název	Zdroj energie
MATE	multidrug and toxic compound extrusion family	Na ⁺ /H ⁺ gradient
ABC	ATP-binding cassette superfamily	ATP
MFS	major facilitator superfamily	H ⁺ gradient
SMR	small multidrug resistance family	H ⁺ gradient
RND	resistance/nodulation/division superfamily	H ⁺ gradient

Jako další mechanismus se uplatňuje zábrana aktivace antibiotika. Tento mechanismus funguje pouze u antibiotik, která se podávají ve formě prekurzoru. Jako příklad lze uvést metronidazol. Tento prekurzor se v lidském organismu nejprve musí bakteriálními enzymy rozštěpit, aby vznikla účinná látka. Bakterie může snížit produkci enzymu, který antibiotikum aktivuje. Tím zůstává antibiotikum v inaktivní formě a bakterii nepoškodí. Bakterie může také následkem mutace vytvářet enzym, který je neúčinný (Beneš, 2018).

Modifikace cílového místa antibiotika způsobí, že se antibiotikum nemůže správně navázat. Jelikož může být funkce cílového místa pro bakterii životně důležitá, nemůže se antimikrobiálnímu působení vyhnout úplným odstraněním takového místa. Ovšem lze v něm provést mutační změny, které snižují náchylnost k inhibici a zároveň je zachována buněčná funkce. Jako příklad cílového místa lze uvést peptidoglykanovou složku buněčné stěny bakterií. Objevují se mutace v doméně vázané na penicilin v PBP a tím je snížena afinita k β-laktamovým antibiotikům. Tyto mutace způsobují například rezistenci kmene *Enterococcus faecium* na ampicilin nebo *Streptococcus pneumoniae* na penicilin (Džidic a kol., 2008). Modifikace cílového místa na ribozomální 23S RNA pomocí methylačních enzymů je zodpovědná za rezistenci k makrolidovým a linkosamidovým antibiotikům. Tyto antibiotika

inhibují syntézu bílkovin působením na 50S ribozomální podjednotku, jejíž součástí je právě 23S RNA (Wright, 2003).

Mutace jako příčina antibiotické rezistence má největší klinický dopad na jednotlivé třídy antibiotik (Woodford a kol., 2007). Je běžným mechanismem rezistence vůči mnoha syntetickým antibakteriálním činidlům jako jsou fluorochinolony a oxazolidinony. Tyto antibiotika inhibují syntézu DNA a odolnost je způsobena mutacemi ve specifických oblastech strukturních genů kódujících bakteriální enzymy DNA gyrázu a topoizomerázu IV (Džidic a kol., 2008). Tyto enzymy jsou složeny z podjednotek, které kódují geny *gyrA* a *gyrB* pro DNA gyrázy nebo geny *parC* a *parE* pro topoizomerázy IV. Vývoj rezistence na fluorochinolony je postupný proces, který je důsledkem akumulace aminokyselinových substitucí v těchto podjednotkách. U gramnegativních bakterií bývá DNA gyráza primárním cílem pro fluorochinolony. Jako další příklad lze uvést *Mycobacterium tuberculosis*. Odolnost vůči všem antituberkulotikům je zprostředkována mutacemi v genech *rpoB* – rezistence na rifampicin; *rrs* a *rpsL* – streptomycin; *pncA* – pyrazinamid; *embB* – ethambutol; *katC*, *inhA*, *oxyR*, *ahpC* a *furA* – isoniazid; *gyrA* a *gyrB* – fluorochinolon.

Mechanismy horizontálního přenosu genů mezi bakteriálními kmeny nebo druhy jsou často považovány za hlavní mediátory rezistence vůči antibiotikům (Woodford a kol., 2007). Tento způsob přenosu genů má pro bakterie podobný význam jako pohlavní rozmnožování. Horizontální přenos genů rezistence může být proveden konjugací, transdukcí či transformací. Při konjugaci dochází k přímému přenosu genetické informace pomocí specializovaného výběžku cytoplazmy – tzv. sex pilus. Při transdukcii je přenos genetické informace zprostředkován virem či bakteriofágem. Transformací mohou bakterie získat DNA přímo z okolního prostředí. Mobilní genetické elementy sloužící k horizontálnímu přenosu jsou zejména plasmidy, transpozony a integrony (Beneš, 2018).

1.5 Charakteristika testovaných mikroorganismů

1.5.1 Rod *Escherichia*

Rod *Escherichia* spadá pod čeleď *Enterobacteriaceae*. Bakterie spadající pod tuto čeleď se řadí k nejběžnějším lidským patogenům. Nejznámější bakterií patřící do tohoto rodu je *Escherichia coli* (Nordmann a kol., 2011).

Escherichia coli je gramnegativní, pohyblivá, nesporulující, fakultativně anaerobní tyčinka. Vyskytuje se ve střevní mikroflóře člověka, která se skládá z více než 500 druhů bakterií. *E. coli* je převládající mikroorganismus gastrointestinálního traktu (Tenailon a kol., 2010). Napomáhá rovnováze mikroorganismů ve střevech a podílí se na syntéze některých

vitaminů. Je podmíněně patogenní a může způsobovat průjmové infekce či onemocnění močových cest (Klaban, 2005). Je známo 6 patogenních typů *E. coli* – enteropatogenní (EPEC), enterotoxigenní (ETEC), enteroinvazivní (EIEC), shiga-like toxigenní (STEC), enterohemoragická (EHEC) a uropatogenní (EPEC) (Oh a kol., 2014). Enteropatogenní *E. coli* je původcem průjmových onemocnění u malých dětí (Ochoa a kol., 2011). Původcem hemolyticko-uremického syndromu je shiga-like toxigenní *E. coli*. Tento syndrom je charakterizován intravaskulární hemolytickou anémií, trombocytopenií a akutním poškozením ledvin (Bitzan, 2009).

Z biochemických vlastností štěpí glukosu za vzniku plynu, je laktosa-pozitivní a produkuje indol a katalasu. Neprodukuje oxidasu. Mezi její faktory virulence patří zejména produkce hemolysinů a přítomnost fimbrií (Julák, 2006). Faktory virulence *E. coli* mohou ovlivnit širokou škálu eukaryotických buněčných procesů – jako příklad lze uvést syntézu proteinů, sekreci iontů nebo funkci cytoskeletu a mitochondrií (Kaper a kol., 2004).

1.5.2 Rod *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* spadá pod čeleď *Pseudomonadaceae*. Zásadním lidským patogenem tohoto rodu je *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* je oportunistický patogen, který se nachází v půdě a na površích ve vodném prostředí. Adaptabilita a vysoká vnitřní odolnost vůči antibiotikům umožňuje *Pseudomonas aeruginosa* přežít v širokém spektru přírodních i umělých prostředí, včetně povrchů ve zdravotnických zařízeních (Gellatly a kol., 2013). *Pseudomonas aeruginosa* je gramnegativní, pohyblivá, nesporulující, aerobní, nefermentující tyčinka. Produkuje modrozelený pigment pyocyanin a žlutozelený fluorescein. (Julák, 2006). Může produkovat extracelulární polysacharid alginát – kmeny jsou pak mukózní. Produkuje proteolytické enzymy, jejichž působením dochází k hemoragii a nekróze. Dalšími významnými produkty jsou hemoliziny. Vykultivované kolonie na krevním agaru mají typickou jasmínovou vůni. Způsobuje infekci kteréhokoliv orgánu či systému v těle (Votava, 2003). Mezi faktory virulence povrchu bakteriální buňky patří bičík, fimbrie, lipopolysacharid a alginát. Vylučovanými faktory virulence jsou pigmenty, alkalická proteáza, elastáza, fosfolipáza C a exotoxin A (Kipnis a kol., 2006).

Pseudomonas aeruginosa je jedním z předních nozokomiálních patogenů na celém světě (Strateva a kol., 2009). Závažné infekce způsobené tímto mikroorganismem jsou téměř vždy spojeny s narušenou obranou hostitele, jako příklad lze uvést těžké popáleniny nebo cystickou fibrózu. *Pseudomonas aeruginosa* je schopná vytvořit biofilm. Biofilm je struktura

tvořená bakteriemi připojenými k sobě na určitém povrchu. Bakterie vytvářející biofilm jsou uzavřeny v extracelulárních polymerních látkách, které se mohou skládat z polysacharidů, nukleových kyselin, proteinů a lipidů. Tato matrice poskytuje biofilmu fyzikální a chemickou odolnost (Gellatly a kol., 2013). Nozokomiální infekce způsobené *Pseudomonas aeruginosa* jsou často obtížně léčitelné. Tato bakterie představuje fenomén rezistence vůči antibiotikům a demonstruje prakticky všechny známé enzymatické a mutační mechanismy bakteriální rezistence (Strateva a kol., 2009).

1.5.3 Rod *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* spadá pod čeleď *Enterococcaceae*. Z mikroskopického hlediska jsou enterokoky grampozitivní koky a mohou se vyskytovat ve formě jednotlivých koků i v řetízích. Jsou fakultativně anaerobní. Enterokoky jsou součástí střevní mikroflóry. Jedná se o podmíněně patogenní mikroorganismus. Nejčastěji je u člověka původcem enterokokové infekce *Enterococcus faecalis* (Fisher a kol., 2009). Způsobují zejména onemocnění močového traktu pacientům s dlouhodobě zavedeným močovým katetrem. Dále mohou způsobovat komplikace po operačním zákroku. Mezi faktory virulence enterokoků patří adhesiny, agregační substance a tzv. Esp protein, který se uplatňuje při adhezi k epitelu močového traktu a při tvorbě biofilmu (Julák, 2006). Jsou schopny produkovat hydrolytické enzymy – hyaluronidáza, želatináza a serinové proteázy. Želatináza poskytuje živiny bakteriím degradací hostitelské tkáně a zastává určitou funkci při tvorbě biofilmu. Hyaluronidáza depolymeruje mukopolysacharidovou část pojivové tkáně, čímž usnadňuje šíření enterokoků i jejich toxinů v tkáni hostitele (Fisher a kol., 2009). Jsou schopné růst při koncentracích 6,5% NaCl, při vysokém pH, hydrolyzují eskulin v přítomnosti žluči a neprodukují katalázu. Enterokoky patří mezi nejčastěji izolované nozokomiální patogeny (Hollenback, 2012).

Vankomycin-rezistentní enterokoky byly poprvé identifikovány jako nemocniční patogeny v Evropě v polovině 80. let a rychle se rozšířily po celém světě. Tyto enterokoky kolonizují gastrointestinální trakt a kůži a jsou schopny zde kolonizovat v rozmezí 7 týdnů až 3 let. Infekce způsobené vankomycin-rezistentními enterokoky jsou spojeny s vysokou mírou morbidity a mortality a nadměrnými náklady na zdravotní péči (Tacconelli a kol., 2008).

1.5.4 Rod *Streptococcus*

Rod *Streptococcus* spadá pod čeleď *Streptococcaceae*. Streptokoky jsou grampozitivní koky, tvořící obvykle řetízky či dvojice. Jsou převážně fakultativně anaerobní. Podle

hemolýzy je rozdělujeme na α -hemolytické, β -hemolytické a γ -hemolytické. Mezi β -hemolytické streptokoky patří např. *S. pyogenes*, *S. agalactiae*. Dále lze streptokoky dělit dle přítomnosti skupinově specifického polysacharidu C. Pokud je polysacharid C přítomen, rozlišují se antigenní struktury A-Z (Votava a kol., 2003). Streptokoky skupiny A produkují dva typy hemolyzinů, které mohou přispívat k patogenezi. Prvním z nich je streptolysin S, který je zodpovědný za charakteristickou zónu β -hemolýzy obklopující kolonie na krevním agaru. Druhým hemolyzinem je streptolysin O (Sierig a kol., 2003).

Streptokoky infikují kůži a měkké tkáně, což způsobuje erysipelas, celulitidu a/nebo fasciitidu. Faryngitida je způsobena napadením měkké tkáně hltanu. Streptokoky skupiny A jsou nejčastější bakteriální příčinou faryngitidy. Dále tyto mikroorganismy způsobují pneumonii, tonzilitidu, perikarditidu, meningitidu, impetigo či infekce močových cest. (Zhou a kol., 2015). Patogenní streptokoky jsou schopné tvořit např. deoxyribonukleázu, streptokinázu, lipázu či proteázu. Vzájemným působením těchto produktů je umožněno šíření infekce (Klaban, 2005).

1.5.5 Rod *Staphylococcus*

Rod *Staphylococcus* spadá pod čeleď *Staphylococcaceae* Jsou to grampozitivní koky, které většinou vytváří hroznovité shluky. Stafylokoky jsou fakultativně anaerobní, nepohyblivé, nesporulující a produkují katalasu. Rozdělují se dle produkce plazmakoagulázy na koaguláza pozitivní a koaguláza negativní stafylokoky (Loir a kol., 2003). Jsou velice rozšířené v přírodním prostředí. Kolonizují na povrchu těla člověka nebo zvířat. Ačkoliv jsou stafylokoky součástí lidské mikroflóry, jsou také oportunními patogeny a způsobují širokou škálu onemocnění. Jako příklad lze uvést kožní infekce, abscesy, alimentární intoxikace, syndrom toxického šoku, septikémie, aj. (Malachowa a kol., 2010).

Významným lidským patogenem tohoto rodu je *Staphylococcus aureus*, který patří mezi koaguláza pozitivní stafylokoky. Mezi jeho faktory virulence patří peptidoglykan, protein A, pouzdro, koagulasa, hyaluronidasa, lipasa, aj. Ke stafylokokovým toxinům patří hemolyziny, exfoliativní toxiny, enterotoxiny a toxin syndromu toxického šoku. *Staphylococcus aureus* je známý svou schopností stát se rezistentní vůči antibiotikům. Infekce způsobené kmeny rezistentními na antibiotika se často vyskytují v epidemických vlnách. *S. aureus* rezistentní na methicilin (MRSA) je pro tyto epidemie charakteristický (Chambers a kol., 2009).

1.6 Stafylokoková enterotoxikóza

Stafylokoková enterotoxikóza je alimentární intoxikace. Jedná se o otravu z potravin, která je důsledkem konzumace potravin obsahujících dostatečné množství jednoho či více stafylokokových enterotoxinů. Symptomy této otravy mají rychlý nástup (2-8 hodin) a zahrnují nevolnost, křeče v břichu, zvracení či průjem. Tyto symptomy obvykle samy odezní během 24-48 hodin. Někdy ovšem může být natolik závažná, že vyžaduje hospitalizaci, a to zejména pokud jde o kojence či starší a oslabené osoby. Jako hlavní zdroj kontaminace potravin jsou považováni pracovníci s potravinami, kterým osídluje nosní sliznici nebo ruce *S. aureus* produkující enterotoxin. Dále je kontaminace spojena především s nesprávným skladováním potravin za podmínek, které umožňují růst stafylokoka (Argudín, 2010). Potenciálním zdrojem primární kontaminace potravin jsou také zvířata. Například v případě stafylokokové mastitidy přežvýkavců, jako jsou krávy či kozy, může být *S. aureus* zanesen z vemene do mléka (Henekine a kol., 2012).

Přestože je hlavním odpovědným patogenem za intoxikaci potravin koaguláza pozitivní *Staphylococcus aureus*, některé výzkumy zdůrazňují, že koaguláza negativní stafylokoky jsou také schopné produkovat stafylokokové enterotoxiny a mohou být potenciální příčinou potravinové otravy (Cunha a kol., 2006). Mezi potraviny, které jsou často příčinou stafylokokové intoxikace, patří: maso a masné výrobky, drůbež a výrobky z vajec, mléko a mléčné výrobky, nebo např. sladké pečivo plněné krémem (Argudín, 2010). Ve složitém prostředí jako jsou potraviny, existuje řada faktorů ovlivňujících růst kmene *S. aureus* a produkci toxinů. Patří mezi ně teplota, pH, aktivita vody, redoxní potenciál či koncentrace NaCl ((Henekine a kol., 2012).

1.6.1 Stafylokokové enterotoxiny (SE)

Enterotoxiny, které jsou produkovány kmenem *Staphylococcus aureus*, jsou silnými gastrointestinálními exotoxiny. Jsou odolné vůči podmínkám, které dokážou snadno zničit bakterie, jež je produkují. Odolávají také proteolytickým enzymům a tím si zachovávají svoji aktivitu v zažívacím traktu po požití (Pinchuk a kol., 2010). *Staphylococcus aureus* produkuje více než 20 různých enterotoxinů. Klasickým příkladem jsou SEA, SEB, SEC. Dalšími jsou SED a SEE. A mezi novější typy patří např. SEG, SEH, SEI a SEJ. SE tvoří skupinu strukturně příbuzných exoproteinů, které mají velikost od 22 do 28 kDa a tvoří je přibližně 220-240 aminokyselin (Argudín, 2010). Stafylokokové enterotoxiny mají schopnost stimulovat populace T-lymfocytů. Tato stimulace vede následně k masivní proliferaci T-

buněk a k nekontrolovatelnému uvolňování cytokinů podporujících zánět (Omoe a kol., 2005).

Geny kódující SE se vyskytují v plazmidech, profágu, v blízkosti stafylokokových chromozomových kazet, na genomových ostrovech či ostrovech patogenity (SAPIs) – to jsou specifické oblasti chromozomu (Argudín, 2010). Mezi nejběžnější toxin způsobující alimentární otravu patří SEA (Pinchuk a kol., 2010). Stafylokokový enterotoxin A dokáže udržet určitou biologickou aktivitu i po 28 minutách při 121 °C (Rall a kol., 2008). SED je druhým nejčastějším toxinem způsobujícím otravu z potravin po celém světě a bylo prokázáno, že k vyvolání intoxikace stačí jen velmi malé množství. SEH byl jednou z příčin masivních otrav spojených s konzumací rekonstituovaného mléka v Japonsku v roce 2000. SEB je jediný známý SE, který byl zkoumán jako biologická zbraň. Jeho velmi malé množství je účinné a v dávce 0,02 µg/kg může být smrtelný. Jako zbraň byl studován v aerosolizované formě. Vdechování SEB vede k bolesti na hrudníku několik hodin po expozici. Může nastat až akutní respirační insuficience či septický šok. Nicméně pravděpodobnost terorismu je velmi nízká (Pinchuk a kol., 2010).

1.6.2 Detekce stafylokokových enterotoxinů

V současné době je k dispozici řada technik k detekci stafylokokových enterotoxinů – molekulárně biologické, imunologické, fyzikálně-chemické založené na hmotnostní spektrometrii či biologické.

Jednou z technik pro průkaz stafylokokových enterotoxinů jsou metody molekulární biologie – PCR a real-time PCR. Metody založené na PCR detekují geny kódující enterotoxiny v kmenech *Staphylococcus* spp. Nicméně tyto techniky mají hlavní omezení: výsledky informují o přítomnosti či nepřítomnosti genů kódujících SE, ale neposkytují žádné informace o jejich produkci. Tyto metody proto nelze použít jako jediné metody pro potvrzení *Staphylococcus* spp. jako příčinu intoxikace. Kromě toho je v některých případech průkaz obtížný, jelikož *Staphylococcus aureus* je citlivý na snížení teploty či aktivity vody, zatímco enterotoxiny nikoliv (Liu, 2017). Mezi nejčastěji pozorované geny patří *sea*, *sec*, *sed* a *seb* (Rall a kol., 2008).

Mezi imunologické techniky patří radioimunoanalýza (např. VIDASTM SET2), SET-RPLA a ELISA. Automatizovaný detekční systém VIDASTM SET2 umožňuje současnou detekci sedmi enterotoxinových sérotypů (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED a SEE). Využívá specifické reakce antigen-protilátka. Navázaná sekundární protilátka na primární protilátku je značena enzymem alkalická fosfatáza. Pro detekci slouží fluorescenční substrát,

který alkalická fosfatáza štěpí a intenzita fluorescence pak odpovídá množství antigenu – enterotoxinu (Vernozy-Rozand a kol., 2004). Metoda SET-RPLA je určena k detekci enterotoxinů SEA, SEB, SEC a SED. Jde o metodu tzv. reverzní pasivní latexové aglutinace, která je opět založena na specifické reakci antigen-protilátka. Je to aglutinační reakce na nosičích, kterými jsou barevné latexové částice (Zouharova a kol., 2008). Metoda založena na sendvičovém typu ELISA se provádí v mikrotitrační destičce, v jejíž jamce jsou navázány specifické protilátky pro stafylokokové enterotoxiny. Dostupnost anti-enterotoxinových protilátek vedla k tomu, že se imunologické testování stalo vhodnou a praktickou metodou. ELISA je jednoduchá, citlivá, rychlá a dostupná v několika komerčních sadách. Ovšem jedním z hlavních nedostatků metody ELISA jsou falešně pozitivní výsledky v závislosti na typu zkoušeného jídla, např. přirozeně se vyskytující peroxidasa v potravě zreagovala se substráty používanými při testování (Vernozy-Rozand a kol., 2004).

Jako alternativa imunologických metod byly vyvinuty fyzikálně-chemické metody. Mezi nimi je metoda hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS) či elektrosprejová ionizace (ESI). Dále se využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s biomolekulární interakční analýzou hmotnostní spektrometrie (BIA-MS). Tyto metody umožňují přesnou detekci stafylokokových enterotoxinů v potravinách, ale nevýhodou je vysoká pořizovací cena přístrojů.

Biologické zkoušky jsou založeny na schopnosti extraktu z potenciálně toxické potraviny vyvolat symptomy, jako jsou zvracení nebo gastrointestinální příznaky, u laboratorních zvířecích modelů a/nebo superantigenní působení v modelech buněčné kultury (Liu, 2017).

1.7 Testování citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám

Důležitým úkolem klinické mikrobiologické laboratoře je provedení testů antibakteriální citlivosti bakteriálních izolátů. Cílem testování je odhalit možnou rezistenci na léky u běžných patogenů a zajistit citlivost bakterie ke zvoleným lékům pro léčbu onemocnění. Testování citlivosti jednotlivých izolátů je důležité zejména u druhů, které mohou mít získané mechanismy rezistence - např. *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae* či *Streptococcus pneumoniae* (Reller a kol., 2009). Nejdůležitějším výsledkem každého testování antimikrobiální citlivosti je rychlá a spolehlivá predikce antimikrobiálního účinku při léčbě infekce. I přes vývoj a modernizaci mikrobiologické diagnostiky se stále používají k testování metody, jako je například disková

difúzní metoda, která byla poprvé publikována již v roce 1966. V současné době se testování obvykle provádí buď klasickými manuálními metodami nebo automatizovanými systémy, jako jsou Becton, Bacmed, nebo např. Dickinson Phoenix (Belkum a kol., 2013).

Metody používané pro testování citlivosti na antimikrobiální látky se dělí na kvalitativní a kvantitativní. Mezi kvalitativní metody patří disková difúzní metoda (Votava a kol., 2010). Kvalitativním testováním je zjištěno, zda mikroorganismus patří do kategorie citlivý, středně citlivý či odolný. Mezi kvantitativní metody patří agarová difúzní metoda, mikrodiluční metody a E-test (Votava a kol., 2010) (Bonev a kol., 2008). Výsledkem kvantitativních metod je minimální inhibiční koncentrace (MIC) (Reller a kol., 2009). MIC je nejnižší koncentrace antibiotika, která je schopna inhibovat růst testovaného mikroorganismu. MBC je minimální baktericidní koncentrace, což je nejnižší koncentrace antibiotika, která usmrtí testovaný mikroorganismus. Pro zjištění MBC se vychází ze stanovení MIC – např. při mikrodiluční metodě se z jamek, ve kterých došlo k inhibici růstu, přeočkuje tekutina na pevnou půdu a opět se nechá kultivovat. Pokud na pevné půdě mikroorganismus opět vyroste, tato koncentrace ho pouze inhibuje. Pokud nevyroste, tato koncentrace je baktericidní (Votava a kol., 2010).

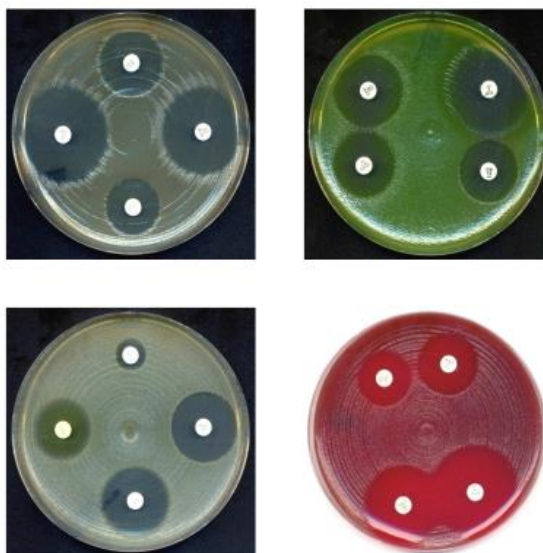
Do budoucna by mohla představovat konkurenci pro současné metody technologie MALDI-TOF MS (Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem). Tato metoda je silným nástrojem pro rychlou identifikaci mikroorganismu a mohla by být využita také jako metoda ke stanovení antimikrobiální citlivosti. Touto metodou byla prozkoumávána např. aktivita enzymů inaktivujících antibiotika a sledovaly se změny v proteinovém spektru mikroorganismu za přítomnosti nebo nepřítomnosti antimikrobiálního činidla. Mezi další metody, které by mohly být v budoucnu využity pro toto testování patří průtoková cytometrie, izotermální mikrokolorimetrie, či mikroskopie v reálném čase, která by mohla být použita pro testování v ne příliš vzdálené budoucnosti (Belkum a kol., 2013).

1.7.1 Disková difúzní metoda

Disková difúzní metoda je jednoduchá, praktická a kvalitativní metoda. Pro testování se používá Mueller-Hinton agar. Tento test se provádí za použití bakteriálního inokula odpovídající zákalu 0,5 McFarlanda, což odpovídá přibližně hodnotě $1-2 \times 10^8$ CFU/ml. Suspenze inokula testovaného mikroorganismu se naočkuje na plotny pomocí vatového tamponu (Reller a kol., 2009). Potom se na povrch inokulovaného agaru umístí komerčně

připravené antibiotické disky z filtračního papíru, které obsahují konkrétní testovaná antibiotika. Následuje inkubace 16-24 hodin při teplotě 35°C.

Antibiotikum difunduje do agarů a inhibuje tím růst testovaného mikroorganismu. Dochází tak ke vzniku inhibičních zón, viz obr. 5. Průměr těchto inhibičních zón se následně měří (Balouiri a kol., 2016). K měření se používá posuvné měřítko a průměr se porovnává s tzv. referenční zónou, což je údaj dodaný od výrobce. Pokud je inhibiční zóna větší, než udává výrobce, tak je mikroorganismus citlivý k danému antibiotiku. Pokud je inhibiční zóna naopak menší, je tento mikroorganismus k antibiotiku rezistentní (Votava a kol., 2010). K automatizovanému odečítání inhibičních zón se používá analyzátor Bacmed. Tento analyzátor umožňuje analýzu podle norem vybraného standardizačního institutu, jako je např. EUCAST (Balouiri a kol., 2016).



Obrázek 4 Disková difúzní metoda (dostupné z:

http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Diskova_metoda/EUCAST_Disk_prezentace_v.5.0_2015.pdf)

1.7.2 E-test

E-test je kvantitativní metoda, jejíž výsledkem je určení minimální inhibiční koncentrace antibiotika. Používá se papírový proužek, který je na spodní straně napuštěný gradientem koncentrace antibiotika a horní strana je označena stupnicí koncentrace. Test se provádí na Mueller-Hinton agaru, který se naočkuje bakteriální suspenzí testovaného kmene. Příprava bakteriální suspenze je stejná jako u diskové difúzní metody, viz 1.7.1. Na inokulovaný agar lze umístit až 5 nebo 6 proužků. Následuje inkubace 16-24 hodin při teplotě

35°C. Antibiotikum difunduje do agarového média a vzniká inhibiční zóna. Inhibiční zóna má u tohoto testu tvar slzy a MIC lze odečíst v místě, kde její okraj protíná papírový proužek, viz obr. 6. Odečtená hodnota MIC odpovídá minimální inhibiční koncentraci, kterou je možné použít pro výběr optimální léčby (Reller a kol., 2009) (Votava a kol., 2010).



Obrázek 5 E-test – izolát *Staphylococcus aureus* testovaný s vankomycinem, daptomycinem a linezolidem (Reller a kol., 2009)

1.7.3 Makrodiluční bujonová metoda

Diluční metody jsou metody kvantitativní a jejich výsledkem je stanovení MIC, příp. MBC. Pro zhotovení makrodiluční metody v bujonu se připraví roztok antibiotika o známé koncentraci. Roztok se postupně dvojnásobně ředí bujonem do zkumavek. Tím vznikne řada zkumavek s koncentracemi, které odpovídají dvojnásobnému ředění antibiotika (např. 1, 2, 4, 8, 16 a 32 $\mu\text{g/ml}$) (Reller a kol., 2009). Zkumavky musí být sterilní, správně označené a uzavřené kovovými víčky (Wiegand a kol., 2008). Takto připravené zkumavky se zaočkují připravenou bakteriální suspenzí. Koncentrace inokula odpovídá zákalu 0,5 stupnice McFarlanda. Zkumavky se nechají inkubovat 18-24 °C při teplotě 37°C. Po inkubační době je provedena kontrola zkumavek. Dle vzniklého zákalu lze pozorovat viditelný růst bakterií. Zkumavka s nejnižší koncentrací antibiotika, která je schopná inhibovat růst mikroorganismu, představuje minimální inhibiční koncentraci.

Hlavními nevýhodami této metody jsou relativně velká spotřeba činidel a možný vznik chyb při přípravě testu. Proto se vyvinula miniaturizace této metody pomocí mikrotitračních destiček a vznikla mikrodiluční bujonová metoda, viz obr. 5 (Reller a kol., 2009).

1.7.4 Mikrodiluční bujonová metoda

U mikrodiluční bujonové metody jamky plastové mikrotitrační destičky obsahují vhodný bujon (např. Mueller-Hinton bujon) a různé koncentrace antibiotik. Koncentrace antibiotik se připravují obdobně jako u makrodiluční metody – vznikají koncentrace odpovídající dvojnásobnému ředění antibiotika. Jamky se zaočkují bakteriální suspenzí a nechají inkubovat. Postup je stejný jako u makrodiluční metody (Votava a kol., 2010). Důležité je, ujistit se, zda během inkubace nedochází k odpařování obsahu jamek. Dále by se na sebe neměly během inkubace umísťovat více než 4 mikrotitrační destičky (Wiegand a kol., 2008). Po inkubaci se odečítá MIC dle zakalení bujonu, viz obr. 7. Odečtená hodnota MIC se porovnává s tzv. *break pointem*, což je hraniční hodnota daného antibiotika. Pokud je hodnota MIC nižší než hraniční hodnota, testovaný mikroorganismus je na toto antibiotikum citlivý. V opačném případě, kdy je tato hodnota vyšší, je daný kmen rezistentní (Votava a kol., 2010).

U makrodiluční i mikrodiluční metody je důležité připravit si pozitivní a negativní kontrolu bakterií. Pozitivní kontrola je čistý bujon se zaočkovaným testovaným kmenem. Negativní kontrola je nezaočkovaný bujon s antibiotikem (Wiegand a kol., 2008).

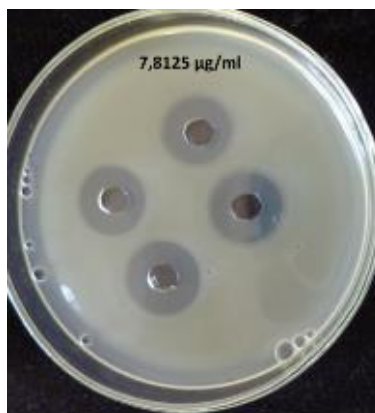


Obrázek 6 Mikrodiluční bujonová metoda (dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/obsah/mic/zvets.jpg>)

1.7.5 Agarová difúzní metoda

U agarové difúzní metody je podobný postup jako u diskové difúzní metody. Na celý povrch Mueller-Hintonova agaru rozetřeme vatovým tamponem bakteriální suspenzi odpovídající zákalu 0,5 stupnice McFarlanda. Poté se asepticky do agaru vytvoří jamky o průměru 6 až 8 mm. Do těchto vytvořených jamek se pipetuje antimikrobiální činidlo v požadované koncentraci. Objem činidla je většinou 20-100 μ l. Poté se provede inkubace za

vhodných podmínek v závislosti na testovaném mikroorganismu. Během inkubační doby antimikrobiální činidlo difunduje v agarovém médiu a inhibuje růst testovaného mikrobiálního kmene, viz obr. 8 (Balouiri a kol., 2016).



Obrázek 7 Agarová difúzní metoda, testovaný kmen *S. aureus* na ATB oxacilin (dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/stanoveni_citlivosti_atb.html)

1.7.6 Agarová diluční metoda

Pro tuto metodu jsou potřeba agarová média obsahující různé koncentrace antimikrobiálního činidla. Způsob vytvoření požadovaných koncentrací antibiotika v agaru je obvykle za použití dvojnásobného ředění (Balouiri a kol., 2016). Nejprve se připraví médium Mueller-Hinton agar dle pokynů výrobce. Po autoklávování se ochladí agar na cca 50°C. Vyšší teploty by mohly antibiotikum inaktivovat, zatímco při nižších teplotách by agar začal vytvářet pevné hrudky, což by ztěžovalo vytvoření homogenní plotny. Připravený roztok antimikrobiálního činidla o určité koncentraci se poté dvojnásobným ředěním ředí agarem a vytvoří se řada požadovaných koncentrací. Připravené agary s požadovanou koncentrací se nalijí na označené misky a nechají ztuhnout. Je potřeba si vytvořit plotnu, která obsahuje pouze čistý agar a tu použít jako pozitivní kontrolu. Stejně tak je nutná negativní kontrola.

Na takto připravené plotny se nanese vatovým tamponem bakteriální suspenze, která odpovídá zákalu 0,5 McFarlanda. Plotna, která inhibuje růst mikroorganismu značí MIC. Miniaturizací této metody je mikrodiluční agarová metoda (Wiegand a kol., 2008).

1.7.7 Automatizované přístrojové systémy

Použití přístrojů vede často k získání výsledků testů citlivosti v kratší době než manuální měření. Důvodem rychlých výsledků jsou citlivé optické detekční systémy, které umožňují detekci minimálních změn růstu bakterií. Jedním z přístrojů je MicroScan WalkAway. Probíhá v něm inkubace a analýza mikrotitrační destičky, která se pro analýzu

připravuje a inokuluje ručně. Během inkubace přístroj pravidelně kontroluje fotometricky růst bakterií. Výsledky jsou během 4,5-18 hodin.

Druhým je BD Phoenix, který monitoruje destičku každých 20 minut. Růst detekuje turbidimetricky a kalorimetricky. Výsledky MIC generuje za 6-16 hodin. Dalším je systém Vitek 2, který používá plastové reagenční karty. Během inkubační doby sleduje turbidimetricky růst bakterií. Výsledky jsou během 4-10 hodin. A posledním je Sensititre ARIS 2X, viz obr. 9. Testovacími panely jsou standardní mikrotitrační destičky. Růst bakterií je určen měřením fluorescence po 18-24 hodinách inkubace (Reller a kol., 2009).



Obrázek 8 Přístroj Sensititre ARIS 2X (dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V3000-VZ>)

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části diplomové práce je popsáno stanovení antimikrobiální aktivity vybraných salicylamidů obsahujících benzthiazolový blok.

2.1 Laboratorní pomůcky

Automatické pipety
Ehrlenmayerova baňka
Kádinka
Kovová víčka
Nitrilové rukavice
Očkovací klíčky (plastové)
Odměrný válec
Petriho misky (plastové)
Plastové mikrotitrační destičky s víčkem
Plastové špičky
Plynový kahan
Pomůcky k navažování (lodička, kopist, lžička)
Stojan na zkumavky
Zkumavky (plastové, skleněné)

2.2 Přístroje a zařízení laboratoře

Analytické váhy	(BOECO, Německo)
Autokláv PS 20A	(Brněnská medicínská technika a. s., ČR)
Biologický termostat ST2	(POL-EKO, Polsko)
Denzitometr McFarland	(Biosan, Litva)
Digitální vodní lázeň NB-304	(N-BIOTEK, Korea)
Horkovzdušný sterilizátor STERIMAT 5104.2	(Brněnská medicínská technika a. s., ČR)
Chladnička	(Gorenje, Slovinsko)
Chladnička	(Liebherr, Německo)
Laboratorní předvážka KERN 440	(KERN, Německo)
Vortex Reax top	(Heidolph, Německo)

2.3 Chemikálie

Dimethylsulfoxid	(PENTA, ČR)
Chlorid sodný	(LACHEMA, ČR)

2.4 Kultivační média a pracovní roztoky

2.4.1 Mueller Hinton Agar

<i>Složení:</i>	kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5 g/l
	hovězí srdcová infuze	2,0 g/l
	škrob, rozpustný	1,5 g/l
	agar	17,0 g/l

Příprava: Bylo naváženo 38,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody a zahříváno do úplného rozpuštění. Sterilizace probíhala v autoklávu 15 minut při 121°C.

Konečné pH (při 25°C) $7,3 \pm 0,2$.

2.4.2 Mueller Hinton Bujón

<i>Složení:</i>	hovězí masová infuze	300,0 g/l
	enzymatický hydrolyzát kaseinu	17,5 g/l
	škrob	1,5 g/l

Příprava: Bylo naváženo 21,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody a zahříváno do úplného rozpuštění. Sterilizace probíhala v autoklávu 15 minut při 121°C.

Konečné pH (při 25°C) $7,4 \pm 0,2$.

2.4.3 Fyziologický roztok

<i>Složení:</i>	NaCl	9,0 g/l
	Destilovaná voda	1,0 l

Příprava: Bylo naváženo 9 g NaCl do 1000 ml destilované vody. Sterilizace probíhala v autoklávu 15 minut při 121°C.

2.4.4 1 M NH₄OH

Příprava: Do 100 ml odměrné baňky bylo napipetováno 15,4 ml vodného roztoku 25% NH₄OH. Odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl promíchán.

2.5 Testované mikroorganismy

Pro experimentální část práce bylo použito k testování antimikrobiální aktivity vybraných salicylamidů 19 bakteriálních kmenů. Přehled testovaných kmenů je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2 Přehled testovaných bakteriálních kmenů

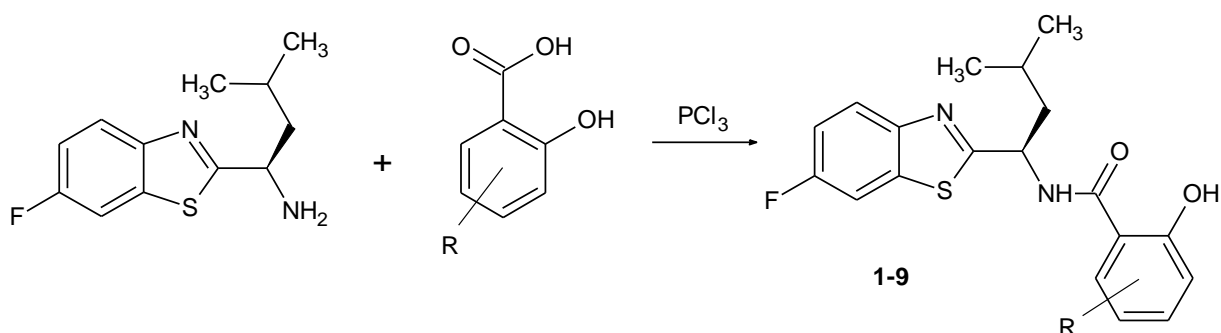
Kmen	Označení	Zdroj	Poznámka
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954	Česká sbírka mikroorganismů Brno	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955	Česká sbírka mikroorganismů Brno	
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 4224	Česká sbírka mikroorganismů Brno	
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 4227	Česká sbírka mikroorganismů Brno	
<i>Staphylococcus aureus</i>		Sbírka Katedry biolog. a biochem. věd Univerzity Pardubice	MRSA, klinický izolát
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 2022	Česká sbírka mikroorganismů Brno	
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 4223	Česká sbírka mikroorganismů Brno	
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 3953	Česká sbírka mikroorganismů Brno	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	CCM 6187	Česká sbírka mikroorganismů Brno	
<i>Streptococcus pyogenes</i>		Sbírka Katedry biolog. a biochem. věd Univerzity Pardubice	Klinický izolát
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CCM 4418	Česká sbírka mikroorganismů Brno	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1260 91398	Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1094 ST398	Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1205 ST398	Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno	MRSA
<i>Staphylococcus aureus</i>	284	Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno	Toxiny E, H
<i>Staphylococcus aureus</i>	1214 ST398	Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno	MRSA
<i>Staphylococcus aureus</i>	340	Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno	Toxiny A, B, D, J
<i>Staphylococcus aureus</i>	650	Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno	Toxiny I, G
<i>Staphylococcus aureus</i>	1185	Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno	Toxin C

Testované bakteriální kmeny byly kultivovány na Mueller Hintonově agaru při 37°C po dobu 24 hodin za aerobních podmínek. Skladovány byly v chladničce při 5-7°C. Pro testování byla použita vždy 24 hodinová kultura a kmeny byly pravidelně přeočkovávány.

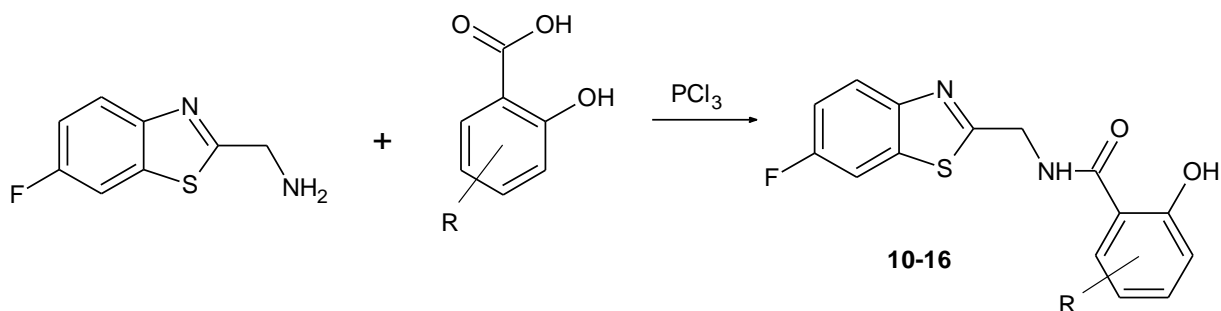
2.6 Testované deriváty 1-(6-fluorbenzothiazol-2-yl) alkylaminů

Pro experiment diplomové práce bylo testováno 16 nově syntetizovaných vybraných benzthiazolových salicylamidů. Testované sloučeniny byly připraveny na pracovišti ÚOCHT modifikovanou reakcí příslušného benzthiazolového aminu s řadou substituovaných (v poloze 4 resp. 5) salicylových kyselin a chloridu fosforitého.

Reakční schémata:



Derivát	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
Substituent	4-CH ₃	5-CH ₃	4-Cl	H	5-F	5-Cl	5-Br	4-F	4-Br



Derivát	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
Substituent	5-Br	5-CH ₃	4-F	5-Cl	5-F	4-CH ₃	H

Látky byly před použitím analyzovány měřením bodu tání a NMR spektrometrií.

2.7 Metody charakterizace

2.7.1 Bod tání

Teplota tání byla stanovena pomocí bodotávku Büchi Melting Point B -540. U bodotávku je možnost sledovat proces tání přes zvětšovací sklo a průběh reakce je viditelný na LCD displeji.

2.7.2 NMR spektroskopie

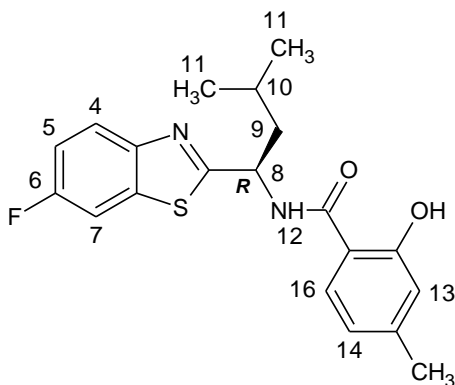
NMR spektra byla měřena v hexadeuteriodimethylsulfoxidu při teplotě 300 K na přístroji BrukerAvance 400 MHz v pulzním módu s Fourierovou transformací. Spektra byla měřena v 5-ti milimetrové širokopásmové laditelné sondě a frekvence použité při měření byly u ^1H spekter 400,13 MHz, pro ^{13}C spektra pak 100,62 MHz, a ^{19}F spektra 376,46 MHz. Všechna NMR spektra (^1H , ^{13}C a ^{19}F) byla měřena standardním způsobem. Hodnoty ^1H a ^{13}C chemických posunů byly vztaženy vůči signálu rozpouštědla ($\delta(^1\text{H}) = 2,5$ ppm ($\delta(^{13}\text{C}) = 39,5$ ppm (DMSO) a přepočteny do δ -stupnice.

2.7.3 Optická otáčivost

K měření byl použit Polarimetr M341 Perkin-Elmer. Polarimetr má zabudovanou sodíkovou výbojku (Na 589 nm) a rtuťovou výbojku (Hg 578, 546, 436 a 365 nm). Přístroj byl kalibrován na methanol.

2.8 Charakterizace připravených látek

4-methyl-N-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamid (S1)



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 139 – 140 °C

$[\alpha]_D^{25} = +74,8$ ($c = 1$, methanol)

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 12,14$ (1H, OH); 9,32 (1H, d, $^3J = 7,8$ Hz, NH 12); 7,99 (1H, dd, $^3J = 9,0$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,9$ Hz, H4); 7,95 (1H, dd, $^4J = 2,7$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,7$ Hz, H7); 7,87 (1H, d, $^3J = 8,6$ Hz, H16); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,7$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 6,76 (2H, m, H13, H14); 5,50 (1H, m, H8); 2,29 (3H, s, CH₃); 2,07 (1H, m, H9); 1,96 (1H, m, H9); 1,77 (1H, m, H10); 0,98 (1H, d, $^3J = 6,7$ Hz, H11); 0,95 (1H, d, $^3J = 6,7$ Hz, H11).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 174,9$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,1$ Hz); 169,1; 159,9; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,1$ Hz); 149,6 (d, $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 1,5$ Hz); 144,8; 135,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,8$ Hz); 128,1; 123,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,6$ Hz); 119,9; 117,6; 114,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,6$ Hz); 112,3; 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,2$ Hz); 50,2; 42,3; 24,6; 22,9; 21,3; 21,1.

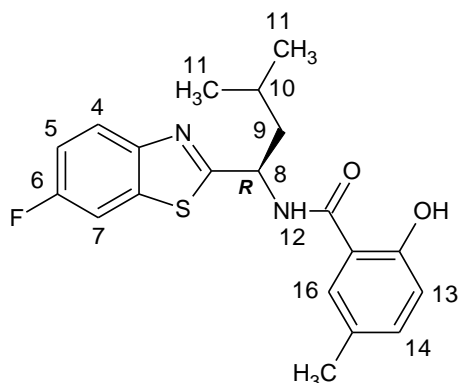
^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,4$

Elementární analýza: C₂₀H₂₁FN₂O₂S ($M_r = 372,46$)

Vypočteno: C(64,49 %), H(5,68 %), N(7,52 %), S(8,61 %)

Stanoveno: C(64,28 %), H(5,77 %), N(7,77 %), S(8,42 %)

5-methyl-*N*-[(*1R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamid (S2)



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 139 – 141 °C

$[\alpha]_D^{25} = +73,0$ ($c = 1$, methanol)

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 11,91$ (1H, OH); 9,37 (1H, d, $^3J = 7,9$ Hz, NH 12); 8,00 (1H, dd, $^3J = 9,0$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,9$ Hz, H4); 7,96 (1H, dd, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,8$ Hz, H7); 7,80 (1H, d, $^4J = 2,2$ Hz, H16); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 7,25 (1H, dd, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 2,1$ Hz, H14); 6,83 (1H, d, $^3J = 8,4$ Hz, H13);

5,50 (1H, m, H8); 2,26 (3H, s, CH₃); 2,07 (1H, m, H9); 1,96 (1H, m, H9); 1,77 (1H, m, H10); 0,97 (1H, d, $^3J = 6,6$ Hz, H11); 0,94 (1H, d, $^3J = 6,6$ Hz, H11).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 174,9$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,3$ Hz); 169,0; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,2$ Hz); 157,6; 149,7 (d, $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 1,3$ Hz); 135,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,8$ Hz); 134,9; 128,1; 127,6; 123,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,7$ Hz); 117,3; 114,8; 114,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,9$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,1$ Hz); 50,2; 42,3; 24,6; 22,9; 21,3; 20,1.

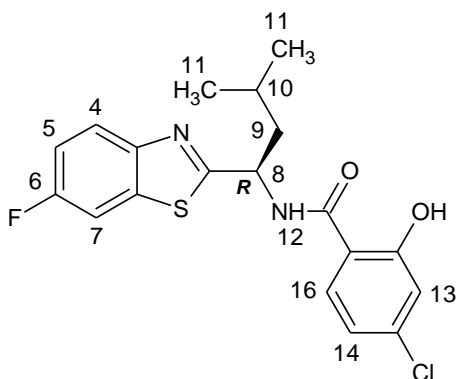
$^{19}\text{F NMR}$ (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,4$

Elementární analýza: C₂₀H₂₁FN₂O₂S ($M_r = 372,46$)

Vypočteno: C(64,49 %), H(5,68 %), N(7,52 %), S(8,61 %)

Stanoveno: C(64,30 %), H(5,75 %), N(7,78 %), S(8,49 %)

4-chlor-N-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamid (S3)



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 139 – 141 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +55,5$ ($c = 1$, methanol)

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 12,37$ (1H, OH); 9,40 (1H, d, $^3J = 7,9$ Hz, NH 12); 7,98 (1H, dd, $^3J = 8,8$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,9$ Hz, H4); 7,97 (1H, d, $^3J = 9,0$ Hz, H16); 7,94 (1H, dd, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H7); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,0$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H5); 7,03 (2H, m, H13, H14); 5,49 (1H, m, H8); 2,05 (1H, m, H9); 1,95 (1H, m, H9); 1,74 (1H, m, H10); 0,96 (1H, d, $^3J = 6,6$ Hz, H11); 0,94 (1H, d, $^3J = 6,6$ Hz, H11).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 174,6$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,3$ Hz); 167,8; 160,1; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,3$ Hz); 149,6 (d, $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 1,5$ Hz); 138,0; 135,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,6$ Hz); 130,2; 123,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,5$ Hz); 119,2; 117,1; 114,9; 114,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,7$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,2$ Hz); 50,4; 42,4; 24,6; 22,9; 21,4.

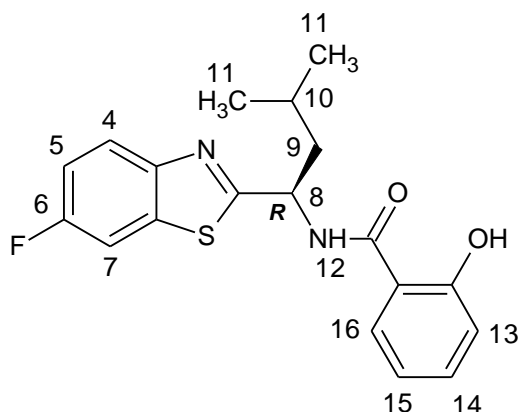
^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,4$

Elementární analýza: C₁₉H₁₈ClFN₂O₂S ($M_r = 392,87$)

Vypočteno: C(58,09 %), H(4,62 %), N(7,13 %), S(8,16 %)

Stanoveno: C(58,25 %), H(4,55 %), N(6,95 %), S(8,39 %)

***N*-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamid (S4)**



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 158 - 160 °C

$[\alpha]_D^{25} = +51,0$ ($c = 1$, methanol)

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 12,11$ (1H, OH); 9,40 (1H, d, $^3J = 8,1$ Hz, NH 12); 8,01 – 7,94 (3H, m, H4, H7, H16); 7,44 (1H, t, $^3J = 7,6$ Hz, H14); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 6,95 (2H, m, H13, H15); 5,51 (1H, m, H8); 2,08 (1H, m, H9); 1,97 (1H, m, H9); 1,76 (1H, m, H10); 0,97 (6H, m, H11).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 174,8$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,1$ Hz); 168,8; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,2$ Hz); 159,6; 149,6; 135,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,4$ Hz); 134,1; 128,4; 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,6$ Hz); 118,9; 117,4; 115,3; 114,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 25,0$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,1$ Hz); 50,2; 42,3; 24,5; 22,9; 21,3.

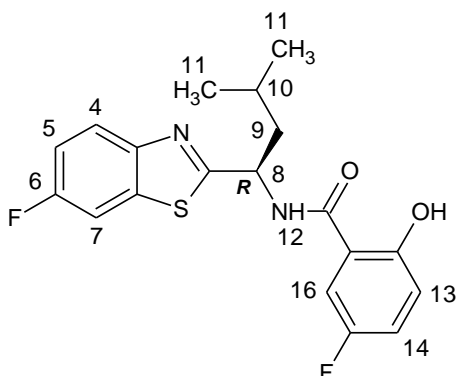
$^{19}\text{F NMR}$ (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,4$

Elementární analýza: C₁₉H₁₉FN₂O₂S ($M_r = 358,43$)

Vypočteno: C(63,67 %), H(5,34 %), N(7,82 %), S(8,95 %)

Stanoveno: C(63,81 %), H(5,38 %), N(7,68 %), S(8,78 %)

5-fluor-N-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamid (S5)



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 172 - 173 °C

$[\alpha]_D^{25} = +59,8$ ($c = 1$, methanol)

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 11,90$ (1H, OH); 9,40 (1H, d, $^3J = 7,8$ Hz, NH 12);

8,00 (1H, dd, $^3J = 9,0$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,9$ Hz, H4); 7,96 (1H, dd, $^4J = 2,7$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,8$ Hz, H7); 7,98 (1H, dd, $^4J = 3,2$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,8$ Hz, H16); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 7,33 (1H, dt, $^4J = 3,2$ Hz, $^3J = 9,0$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H14);

6,98 (1H, dd, $^3J = 9,2$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,8$ Hz, H13); 5,50 (1H, m, H8); 2,07 (1H, m, H9);

1,96 (1H, m, H9); 1,76 (1H, m, H10); 0,97 (1H, d, $^3J = 6,7$ Hz, H11); 0,95 (1H, d, $^3J = 6,7$ Hz, H11).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 174,4$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,4$ Hz); 167,4 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 2,2$ Hz); 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,2$ Hz); 155,6 (d, $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 1,2$ Hz); 154,7 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 235,6$ Hz); 149,6 (d, $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 1,5$ Hz); 135,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,9$ Hz); 123,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,6$ Hz); 121,0 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 23,3$ Hz); 118,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 7,5$ Hz); 115,9 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 6,7$ Hz); 114,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,9$ Hz); 114,0 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,4$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,2$ Hz); 50,4; 42,4; 24,5; 22,9; 21,3.

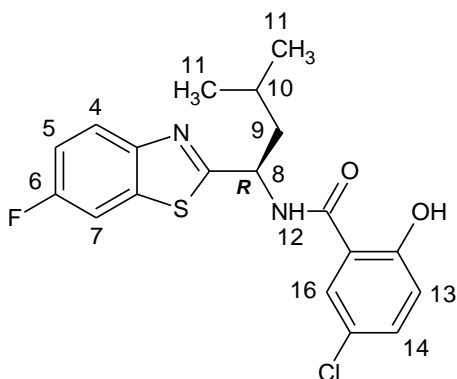
$^{19}\text{F NMR}$ (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -124,6$; -116,4

Elementární analýza: $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ($M_r = 376,42$)

Vypočteno: C(60,62 %), H(4,82 %), N(7,44 %), S(8,52 %)

Stanoveno: C(60,80 %), H(5,00 %), N(7,28 %), S(8,38 %)

5-chlor-N-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamid (S6)



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 148 - 150 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +55,2$ ($c = 1$, methanol)

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 12,16$ (1H, OH); 9,46 (1H, d, $^3J = 7,9$ Hz, NH 12); 8,04 (1H, d, $^4J = 2,6$ Hz, H16); 8,00 (1H, dd, $^3J = 8,9$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,8$ Hz, H4); 7,96 (1H, dd, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,8$ Hz, H7); 7,47 (1H, dd, $^3J = 8,8$ Hz, $^4J = 2,6$ Hz, H14); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 6,98 (1H, d, $^3J = 8,8$ Hz, H13);

5,49 (1H, m, H8); 2,07 (1H, m, H9); 1,96 (1H, m, H9); 1,77 (1H, m, H10); 0,97 (1H, d, $^3J = 6,6$ Hz, H11); 0,94 (1H, d, $^3J = 6,6$ Hz, H11).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 174,4$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,5$ Hz); 167,5; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,2$ Hz); 158,2; 149,6; 135,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 12,0$ Hz); 133,7; 127,7; 123,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,6$ Hz); 122,6; 119,4; 116,9; 114,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,8$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,2$ Hz); 50,4; 42,4; 24,5; 22,9; 21,3.

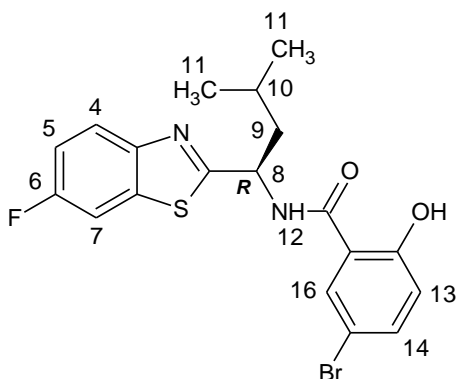
^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,4$

Elementární analýza: C₁₉H₁₈ClFN₂O₂S ($M_r = 492,87$)

Vypočteno: C(58,09 %), H(4,62 %), N(7,13 %), S(8,16 %)

Stanoveno: C(58,29 %), H(4,75 %), N(6,98 %), S(7,99 %)

5-brom-N-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamid (S7)



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 147 - 149 °C

$[\alpha]_D^{25} = +65,5$ ($c = 1$, methanol)

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 12,18$ (1H, OH); 9,46 (1H, d, ³*J* = 7,9 Hz, NH 12); 8,15 (1H, d, ⁴*J* = 2,4 Hz, H16); 8,00 (1H, dd, ³*J* = 9,0 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,9 Hz, H4); 7,96 (1H, dd, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,9 Hz, H7); 7,58 (1H, dd, ³*J* = 8,8 Hz, ⁴*J* = 2,5 Hz, H14); 7,37 (1H, dt, ⁴*J* = 2,6 Hz, ³*J* = 9,0 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,0 Hz, H5); 6,92 (1H, d, ³*J* = 8,8 Hz, H13);

5,49 (1H, m, H8); 2,06 (1H, m, H9); 1,96 (1H, m, H9); 1,76 (1H, m, H10); 0,97 (1H, d, ³*J* = 6,6 Hz, H11); 0,94 (1H, d, ³*J* = 6,6 Hz, H11).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 174,4$ (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,3 Hz); 167,4; 159,5 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 242,2 Hz); 158,6; 149,6; 136,5; 135,6 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,8 Hz); 130,6; 123,8 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,6 Hz); 119,8; 117,5; 114,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,7 Hz); 110,1; 108,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 27,2 Hz); 50,4; 42,4; 24,5; 22,9; 21,4.

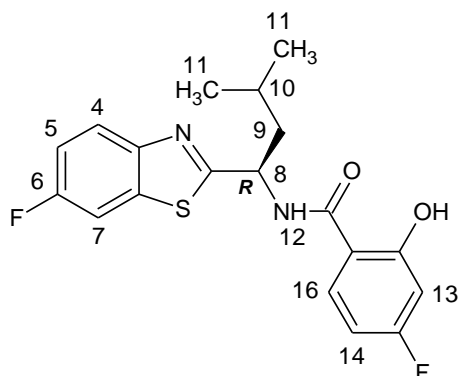
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -116,4$

Elementární analýza: C₁₉H₁₈BrFN₂O₂S ($M_r = 437,33$)

Vypočteno: C(52,18 %), H(4,15 %), N(6,41 %), S(7,33 %)

Stanoveno: C(52,00 %), H(4,05 %), N(6,58 %), S(7,48 %)

4-fluor-N-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamid (S8)



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 170 - 172 °C

$[\alpha]_D^{25} = +58,0$ ($c = 1$, methanol)

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 12,60$ (1H, OH); 9,39 (1H, d, $^3J = 7,9$ Hz, NH 12); 8,06 (1H, dd, $^3J = 8,8$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,8$ Hz, H14); 8,00 (1H, dd, $^3J = 9,0$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 5,0$ Hz, H4); 7,96 (1H, dd, $^4J = 2,5$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,8$ Hz, H7); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 6,81 (2H, m, H13, H16); 5,50 (1H, m, H8); 2,07 (1H, m, H9); 1,96 (1H, m, H9); 1,77 (1H, m, H10); 0,97 (1H, d, $^3J = 6,7$ Hz, H11); 0,95 (1H, d, $^3J = 6,7$ Hz, H11).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 174,6$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,3$ Hz); 168,2; 165,3 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 250,5$ Hz); 161,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 12,8$ Hz); 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,2$ Hz); 149,6 (d, $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 1,2$ Hz); 135,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,6$ Hz); 130,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,6$ Hz); 123,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,4$ Hz); 114,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,7$ Hz); 112,3 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 2,8$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,2$ Hz); 50,3; 42,3; 24,6; 22,9; 21,3.

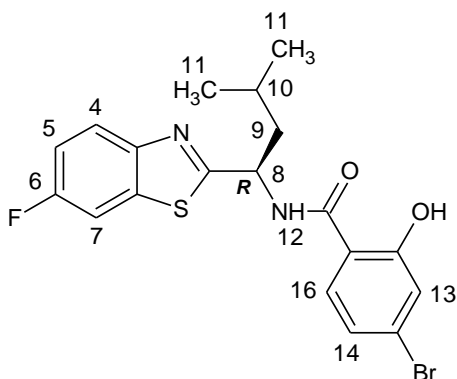
^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -124,6$; -116,4

Elementární analýza: $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ($M_r = 376,42$)

Vypočteno: C(60,62 %), H(4,82 %), N(7,44 %), S(8,52 %)

Stanoveno: C(60,45 %), H(4,72 %), N(7,58 %), S(8,74 %)

4-brom-N-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamid (S9)



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 143 - 145 °C

$[\alpha]_D^{25} = +67,2$ (c = 1, methanol)

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta =$ 12,31 (1H, OH); 9,39 (1H, d, $^3J = 7,9$ Hz, NH 12); 7,99 (1H, dd, $^3J = 8,9$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,9$ Hz, H4); 7,94 (1H, dd, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H7); 7,88 (1H, d, $^3J = 9,2$ Hz, H16); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,0$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H5); 7,17 (2H, m, H13, H14); 5,49 (1H, m, H8); 2,05 (1H, m, H9); 1,95 (1H, m, H9); 1,74 (1H, m, H10); 0,97 (1H, d, $^3J = 6,7$ Hz, H11); 0,95 (1H, d, $^3J = 6,7$ Hz, H11).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta =$ 174,5 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,2$ Hz); 167,8; 159,9; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,1$ Hz); 149,6 (d, $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 1,3$ Hz); 135,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,8$ Hz); 130,3; 126,7; 123,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,4$ Hz); 122,1; 120,0; 115,3; 114,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,5$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,0$ Hz); 50,3; 42,3; 24,5; 22,9; 21,3.

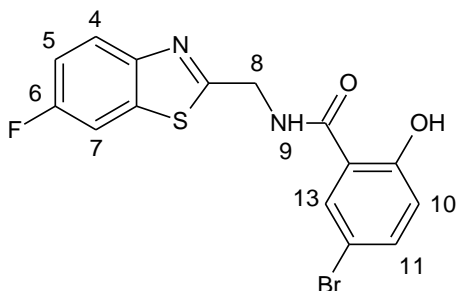
^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta =$ -116,4

Elementární analýza: C₁₉H₁₈BrFN₂O₂S (M_r = 437,33)

Vypočteno: C(52,18 %), H(4,15 %), N(6,41 %), S(7,33 %)

Stanoveno: C(52,46 %), H(4,07 %), N(6,55 %), S(7,14 %)

5-brom-N-[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]-2-hydroxybenzamid (S10)



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 220 - 222 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 12,09 (1H, OH); 9,70 (1H, t, ³J = 5,4 Hz, NH 9); 8,07 (1H, d, ⁴J = 2,5 Hz, H13); 7,98 (1H, dd, ³J = 8,9 Hz, ⁴J(¹⁹F, ¹H) = 5,0 Hz, H4); 7,96 (1H, dd, ⁴J = 2,6 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 8,8 Hz, H7); 7,58 (1H, dd, ³J = 8,9 Hz, ⁴J = 2,6 Hz, H11); 7,37 (1H, dt, ⁴J = 2,6 Hz, ³J = 9,1 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 6,94 (1H, d, ³J = 8,8 Hz, H10); 4,89 (2H, d, ³J = 5,9 Hz, H8).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 170,4 (d, ⁴J(¹⁹F, ¹³C) = 3,2 Hz); 167,1; 159,5 (d, ¹J(¹⁹F, ¹³C) = 242,1 Hz); 158,2; 149,6 (d, ⁵J(¹⁹F, ¹³C) = 1,4 Hz); 136,3; 135,8 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 11,8 Hz); 131,0; 123,8 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 9,4 Hz); 119,7; 117,9; 114,6 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 24,8 Hz); 110,1; 108,6 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 27,1 Hz); 41,6.

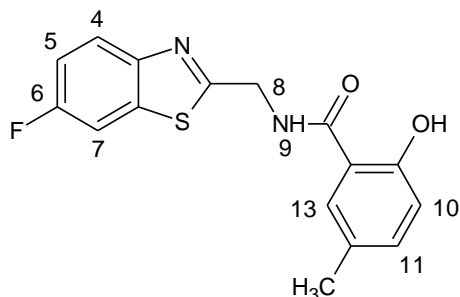
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ= -116,4

Elementární analýza: C₁₅H₁₀BrFN₂O₂S (M_r = 381,22)

Vypočteno: C(47,26 %), H(2,64 %), N(7,35 %), S(8,41 %)

Stanoveno: C(47,48 %), H(2,72 %), N(7,08 %), S(8,58 %)

***N*-[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]-2-hydroxy-5-methylbenzamid (S11)**



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 176 - 177 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 11,83 (1H, OH); 9,65 (1H, t, ³*J* = 5,8 Hz, NH 9); 7,98 (1H, dd, ³*J* = 9,1 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,9 Hz, H4); 7,95 (1H, dd, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,9 Hz, H7); 7,73 (1H, d, ⁴*J* = 1,8 Hz, H13); 7,37 (1H, dt, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J* = 9,1 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 7,25 (1H, dd, ³*J* = 8,3 Hz, ⁴*J* = 2,0 Hz, H11); 6,85 (1H, d, ³*J* = 8,4 Hz, H10); 4,89 (2H, d, ³*J* = 5,9 Hz, H8); 2,25 (3H, s, CH₃).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 170,8 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,3 Hz); 168,9; 159,5 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 242,1 Hz); 157,3; 149,5; 135,8 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,8 Hz); 134,7; 128,3; 127,6; 123,7 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,7 Hz); 117,2; 115,0; 114,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,8 Hz); 108,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 27,2 Hz); 41,5; 20,1.

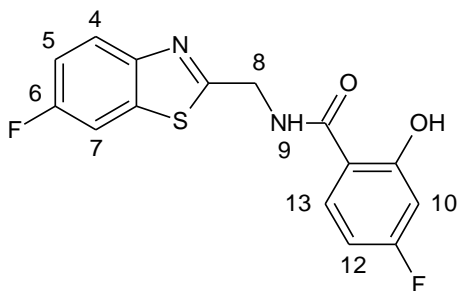
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ= -116,4

Elementární analýza: C₁₆H₁₃FN₂O₂S (M_r = 316,35)

Vypočteno: C(60,75 %), H(4,14 %), N(8,86 %), S(10,14 %)

Stanoveno: C(60,59 %), H(4,23 %), N(8,69 %), S(10,33 %)

4-fluor-N-[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]-2-hydroxybenzamid (S12)



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 171 - 173 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 12,54 (1H, OH); 9,67 (1H, t, ³J = 5,8 Hz, NH 9); 7,97 (3H, m, H4, H7, H13); 7,37 (1H, dt, ⁴J = 2,6 Hz, ³J = 9,0 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 9,0 Hz, H5); 6,81 (2H, m, H10, H12); 4,90 (2H, d, ³J = 5,9 Hz, H8).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170,6 (d, ⁴J(¹⁹F, ¹³C) = 3,1 Hz); 168,1; 165,2 (d, ¹J(¹⁹F, ¹³C) = 250,7 Hz); 161,5 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 13,2 Hz); 159,5 (d, ¹J(¹⁹F, ¹³C) = 242,2 Hz); 149,5 (d, ⁵J(¹⁹F, ¹³C) = 1,2 Hz); 135,8 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 11,9 Hz); 130,8 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 11,7 Hz); 123,7 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 9,8 Hz); 114,6 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 24,9 Hz); 112,5 (d, ⁴J(¹⁹F, ¹³C) = 2,9 Hz); 108,6 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 27,1 Hz); 106,6 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 22,3 Hz); 103,9 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 23,7 Hz); 41,5.

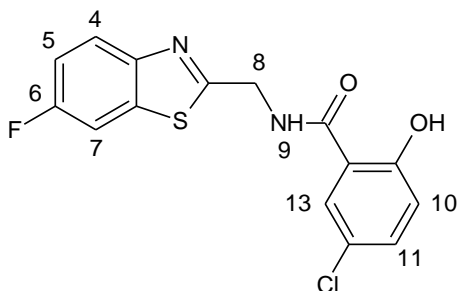
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -105,0; -116,5

Elementární analýza: C₁₅H₁₀F₂N₂O₂S (M_r = 320,31)

Vypočteno: C(56,24 %), H(3,15 %), N(8,75 %), S(10,01 %)

Stanoveno: C(56,47 %), H(3,01 %), N(8,61 %), S(10,27 %)

5-chlor-N-[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]-2-hydroxybenzamid (S13)



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 210 - 212 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 12,08 (1H, OH); 9,70 (1H, t, ³J = 5,7 Hz, NH 9); 7,97 (3H, m, H4, H7, H13); 7,47 (1H, dd, ³J = 8,7 Hz, ⁴J = 2,4 Hz, H11); 7,37 (1H, dt, ⁴J = 2,6 Hz, ³J = 9,1 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 7,00 (1H, d, ³J = 8,8 Hz, H10); 4,90 (2H, d, ³J = 5,7 Hz, H8).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 170,5 (d, ⁴J(¹⁹F, ¹³C) = 3,4 Hz); 167,2; 159,5 (d, ¹J(¹⁹F, ¹³C) = 241,9 Hz); 157,7; 149,5; 135,8 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 11,6 Hz); 133,5; 128,1; 123,7 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 9,5 Hz); 122,7; 119,3; 117,4; 114,6 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 24,7 Hz); 108,6 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 27,2 Hz); 41,6.

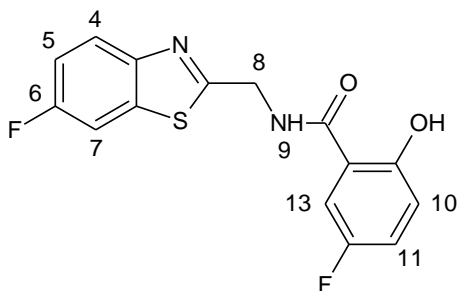
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ= -116,5

Elementární analýza: C₁₅H₁₀ClFN₂O₂S (M_r = 336,77)

Vypočteno: C(53,50 %), H(2,99 %), N(8,32 %), S(9,52 %)

Stanoveno: C(53,29 %), H(2,92 %), N(8,52 %), S(9,29 %)

5-fluor-*N*-[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]-2-hydroxybenzamid (S14)



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 187 - 189 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11,83 (1H, OH); 9,68 (1H, t, ³*J* = 5,9 Hz, NH 9);

7,98 (1H, dd, ³*J* = 9,0 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 5,0 Hz, H4); 7,96 (1H, dd, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,9 Hz, H7); 7,71 (1H, dd, ⁴*J* = 3,2 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,7 Hz, H13); 7,37 (1H, dt, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J* = 9,1 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 7,33 (1H, dt, ⁴*J* = 3,3 Hz, ³*J* = 8,9 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,9 Hz, H14); 6,99 (1H, dd, ³*J* = 9,1 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,7 Hz, H10); 4,91 (2H, d, ³*J* = 5,9 Hz, H8).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170,5 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,0 Hz); 167,3 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 2,2 Hz); 159,5 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 242,2 Hz); 155,3 (d, ⁵*J*(¹⁹F, ¹³C) = 1,4 Hz); 154,8 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 235,2 Hz); 149,5 (d, ⁵*J*(¹⁹F, ¹³C) = 1,5 Hz); 135,8 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,7 Hz); 123,7 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,6 Hz); 121,0 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 23,3 Hz); 118,7 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 7,6 Hz); 116,6 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 6,8 Hz); 114,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,7 Hz); 114,2 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,4 Hz); 108,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 27,1 Hz); 41,6.

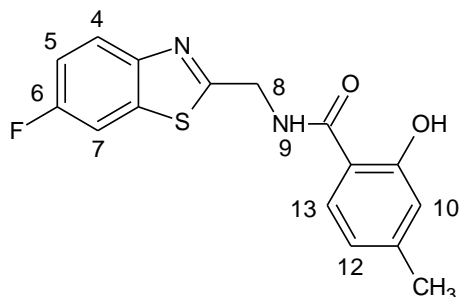
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -124,5; -116,5

Elementární analýza: C₁₅H₁₀F₂N₂O₂S (M_r = 320,31)

Vypočteno: C(56,24 %), H(3,15 %), N(8,75 %), S(10,01 %)

Stanoveno: C(56,43 %), H(3,05 %), N(8,58 %), S(10,24 %)

***N*-[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]-2-hydroxy-4-methylbenzamid (S15)**



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 168 - 170 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 12,11 (1H, OH); 9,63 (1H, t, ³*J* = 5,6 Hz, NH 9); 7,98 (1H, dd, ³*J* = 9,0 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,8 Hz, H4); 7,95 (1H, dd, ⁴*J* = 2,6 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,9 Hz, H7); 7,79 (1H, d, ³*J* = 8,0 Hz, H10); 7,37 (1H, dt, ⁴*J* = 2,6 Hz, ³*J* = 9,1 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 6,75 (2H, m, H11, H13); 4,88 (2H, d, ³*J* = 5,9 Hz, H8); 2,28 (3H, s, CH₃).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 170,8 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,5 Hz); 169,2; 159,8; 159,5 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 242,2 Hz); 149,5; 144,7; 135,8 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,9 Hz); 128,1; 123,7 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,8 Hz); 120,0; 117,6; 114,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,9 Hz); 112,5; 108,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 27,0 Hz); 41,4; 21,1.

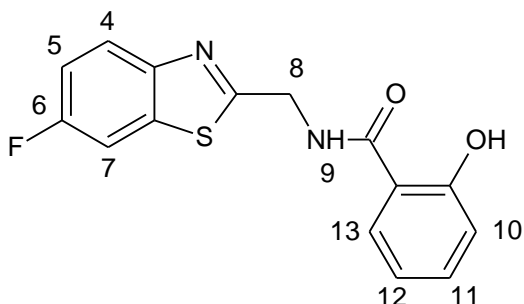
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ= -116,4

Elementární analýza: C₁₆H₁₃FN₂O₂S (M_r = 316,35)

Vypočteno: C(60,75 %), H(4,14 %), N(8,86 %), S(10,14 %)

Stanoveno: C(60,96 %), H(4,28 %), N(8,72 %), S(10,38 %)

N-[(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)methyl]-2-hydroxybenzamide (S16)



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 166 - 168 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12,01 (1H, OH); 9,71 (1H, t, ³J = 5,8 Hz, NH 9); 7,98 (1H, dd, ³J = 9,0 Hz, ⁴J(¹⁹F, ¹H) = 4,9 Hz, H4); 7,96 (1H, dd, ⁴J = 2,6 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 8,8 Hz, H7); 7,92 (1H, dd, ⁴J = 1,8 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 9,0 Hz, H13); 7,44 (1H, dt, ⁴J = 1,5 Hz, ³J = 7,3 Hz, ³J = 7,3 Hz, H11); 7,37 (1H, dt, ⁴J = 2,6 Hz, ³J = 9,1 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 6,94 (2H, m, H10, H112); 4,91 (2H, d, ³J = 5,9 Hz, H8).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170,8 (d, ⁴J(¹⁹F, ¹³C) = 3,2 Hz); 168,9; 159,5 (d, ¹J(¹⁹F, ¹³C) = 242,2 Hz); 157,3; 149,5; 135,8 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 11,8 Hz); 134,7; 128,3; 127,6; 123,6 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 9,6 Hz); 117,2; 115,0; 114,6 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 24,9 Hz); 108,6 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 27,3 Hz); 41,5.

¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -116,4

Elementární analýza: C₁₅H₁₁FN₂O₂S (M_r = 302,32)

Vypočteno: C(59,59 %), H(3,67 %), N(9,27 %), S(10,61 %)

Stanoveno: C(59,74 %), H(3,58 %), N(9,08 %), S(10,78 %)

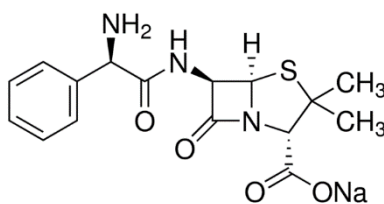
2.9 Testovaná antibiotika

Všechna testovaná antibiotika byla dodána od společnosti Sigma-Aldrich.

2.9.1 Ampicilin sodium salt

Sumární vzorec: $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$

Jedná se o β -laktamové antibiotikum, které inhibuje syntézu bakteriálních buněčných stěn inaktivací transpeptidáz na vnitřním povrchu membrány bakteriálních buněk. Strukturální vzorec znázorněn na obrázku 10.



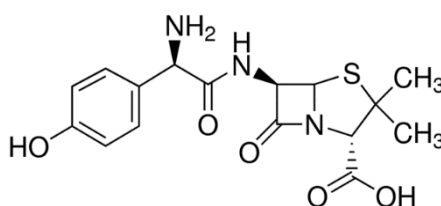
Obrázek 9 Strukturální vzorec - Ampicilin sodium salt (dostupné z:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/a9518?lang=en®ion=CZ>)

2.9.2 Amoxicilin

Sumární vzorec: $C_{16}H_{19}N_3O_5S$

Amoxicilin je širokospektrální β -laktamové antibiotikum. Inhibuje zesíťení mezi lineárními peptidoglykanovými polymerními řetězci, které jsou hlavní složkou jak gram pozitivních, tak gram negativních bakterií. Strukturální vzorec znázorněn na obrázku 11.



Obrázek 10 Strukturální vzorec – Amoxicilin (dostupné z:

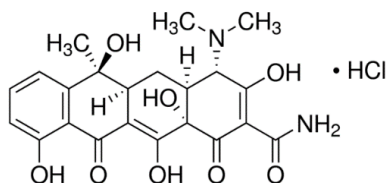
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a8523?lang=en®ion=CZ>)

2.9.3 Tetracycline hydrochloride

Sumární vzorec: $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$

Tetracyklin pasivně difunduje kanály v buněčné membráně, váže se na 30S ribozomy a inhibuje syntézu proteinu tím, že brání přístupu aminoacyl tRNA na akceptorové místo komplexu mRNA-ribozomu. Také se váže na bakteriální 50S ribozomální podjednotku, mění

membránu a způsobuje únik intracelulárních složek z bakteriálních buněk. Strukturální vzorec znázorněn na obrázku 12.

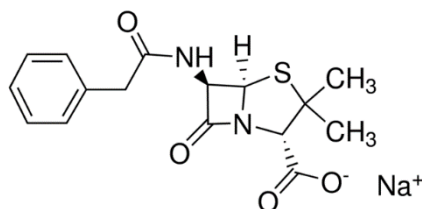


Obrázek 11 Strukturální vzorec – Tetracycline hydrochloride (dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/t8032?lang=en®ion=CZ>)

2.9.4 Penicilin G salt

Sumární vzorec: $C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$

Penicilin G způsobuje inhibici syntézy buněčné stěny prostřednictvím vazby na PBP, což inhibuje zesílení peptidoglykanového řetězce. Strukturální vzorec znázorněn na obrázku 13.

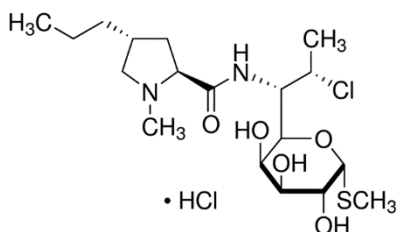


Obrázek 12 Strukturální vzorec – Penicilin G salt (dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/13752?lang=en®ion=CZ>)

2.9.5 Clindamycin hydrochloride

Sumární vzorec: $C_{18}H_{33}ClN_2O_5S \cdot HCl$

Clindamycin je linkosamidové antibiotikum, které se připravuje z lincomycinu. Inhibuje syntézu bakteriálních proteinů interakcemi vodíkových vazeb s komponentou ribozomové podjednotky 50S, která je složkou 23S rRNA, což indukuje disociaci komplexu peptidyl-t-RNA. Strukturální vzorec znázorněn na obrázku 14.

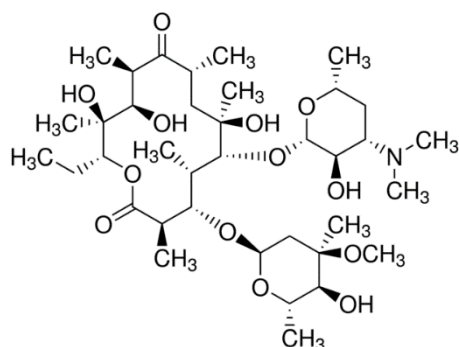


Obrázek 13 Strukturální vzorec – Clindamycin hydrochloride (dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c5269?lang=en®ion=CZ>)

2.9.6 Erythromycin

Sumární vzorec: $C_{37}H_{67}NO_{13}$

Erytromycin působí tak, že inhibuje prodloužení v transpeptidačním kroku, konkrétně aminoacyl translokaci z A-místa do P-místa vazbou na 50S podjednotku komplexu bakteriálních 70S rRNA. Strukturální vzorec znázorněn na obrázku 15.



Obrázek 14 Strukturální vzorec – Erythromycin (dostupné z:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/e6376?lang=en®ion=CZ>)

2.10 Pracovní postupy

2.10.1 Příprava bakteriální suspenze

Pro testování byly používány bakteriální suspenze odpovídající zákalu 0,5 stupnice McFarlanda, což odpovídá přibližně hodnotě $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Výjimkou byla bakteriální suspenze kmene *Enterococcus faecalis*, u které se pro měření používala suspenze odpovídající zákalu 2 stupnice McFarlanda. Do sterilní skleněné zkumavky byly napipetovány 2 ml fyziologického roztoku. Z čerstvé 24 hodinové bakteriální kultury byl vytvořen pomocí plastové kličky, vortexu a denzitometru zákal o požadované denzitě.

2.10.2 Ředění bakteriální suspenze

Z připravené bakteriální suspenze byl odpipetován 1 ml do plastové zkumavky obsahující 9 ml Mueller Hintonova bujónu. Suspenze byla s bujónem důkladně promíchána. Takto byla získána suspenze odpovídající buněčné denzitě přibližně $1,5 \times 10^7$ CFU/ml.

2.10.3 Agarová mikrodiluční metoda

Pro testování antimikrobiální aktivity byla použita agarová mikrodiluční metoda. Pro každou testovanou sloučeninu byla připravena koncentrační řada. Pro přípravu výchozí

koncentrace 256 µg/ml bylo naváženo 0,0256 g testované sloučeniny a navážka byla rozpuštěna v 10 ml DMSO.

Čerstvě připravený Mueller Hintonův agar, byl ihned po ukončení sterilizace v autoklávu přenesen do třepavé vodní lázně (teplota vody v lázni 55°C). Do stojánku ve vodní lázni bylo umístěno 10 označených zkumavek (čísla 1-10). Zkumavka s číslem 1 značí nejvyšší koncentraci testované sloučeniny. Do této zkumavky bylo napipetováno 9 ml horkého agaru a 1 ml výchozího roztoku testované sloučeniny. Ve zkumavkách 2-10 bylo pipetováno po 5 ml horkého agaru. Výchozí koncentrace testované sloučeniny byla ředěna geometrickou řadou, jejíž výsledkem je vždy o 50% nižší koncentrace v následující zkumavce. Tento postup je znázorněn na schématu 1.

Takto připravené koncentrace testovaných sloučenin v horkém agaru, byly pipetovány po 100 µl do mikrotitrační destičky. Pipetování do mikrotitrační destičky je znázorněno na schématu 2. Testování každé sloučeniny bylo prováděno v dubletu. U každého testování byla provedena pozitivní a negativní kontrola. Takto připravené destičky byly ponechány do druhého dne při laboratorní teplotě.

Druhý den byly do příslušných jamek naočkovány testované bakteriální kmeny. Na očkování byla použita čerstvě připravená ředěná bakteriální suspenze, viz 2.5.2. Do každé jamky byly očkovány 2 µl bakteriální suspenze. Takto připravená destička byla v plastovém sáčku vložena do termostatu a inkubována při 37°C 24 hodin.

Po inkubační době bylo provedeno vyhodnocení mikrotitrační destičky. Vizuálně byla vyhodnocena minimální inhibiční koncentrace testované látky. Pro zjištění minimální baktericidní koncentrace byly příslušné jamky vyočkovány na Mueller Hintonův agar a inkubovány 24 hodin při 37°C.

Stejným postupem byly testovány i antibiotika. Rozdílem v postupu oproti testování vybraných salicylamidů je jednak výchozí koncentrace antibiotika, tak i případně jiné zvolené rozpouštědlo.

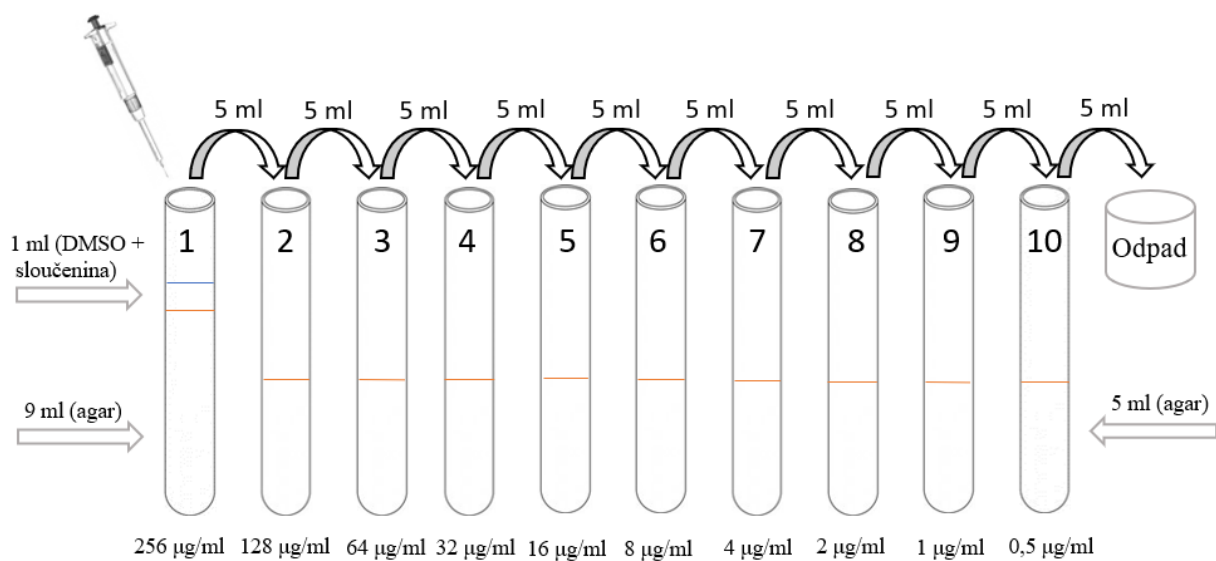


Schéma 1 Příprava koncentrační řady

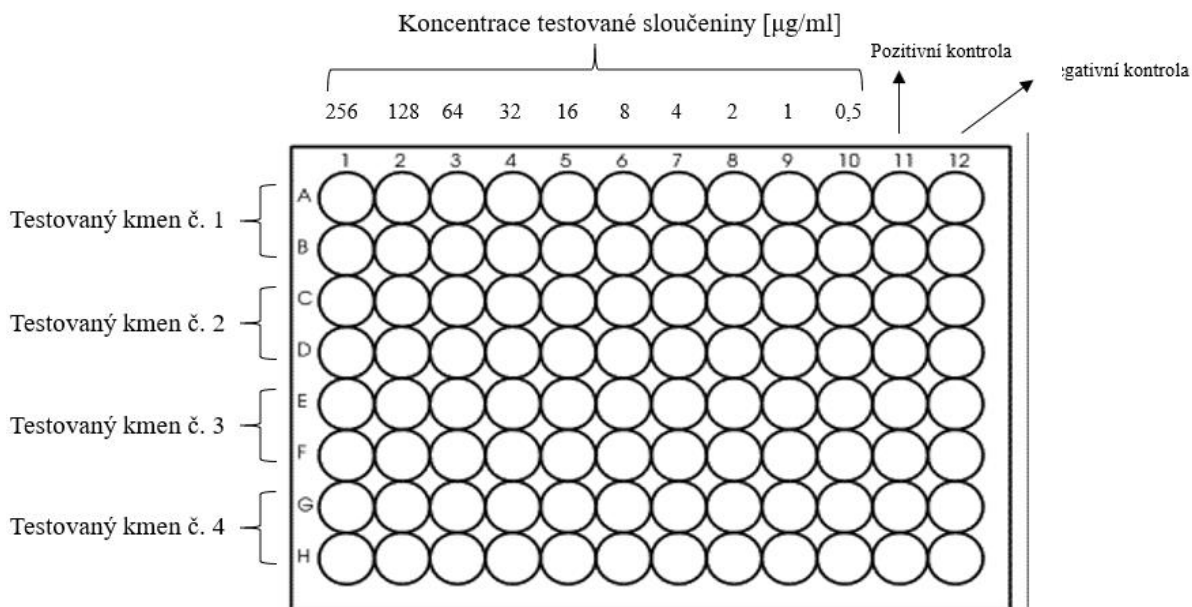


Schéma 2 Pipetování do mikrotitrační destičky

2.10.4 Příprava výchozí koncentrace antibiotik

Přehled výchozích koncentrací antibiotik, zvolená rozpouštědla a navážky jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 3 Příprava výchozí koncentrace antibiotik

Testované antibiotikum	Výchozí koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	Navážka ATB [g]	Rozpouštědlo	Objem rozpouštědla [ml]
Ampicilin sodium salt	64	0,0064	Destilovaná H ₂ O	10
Erythromycin	128	0,0128	DMSO	10
Penicilin G salt	8	0,0008	Destilovaná H ₂ O	10
Amoxicilin	256	0,0256	1 M NH ₄ OH	10
Tetracycline hydrochloride	32	0,0032	Destilovaná H ₂ O	10
Clindamycin hydrochloride	32	0,0032	Destilovaná H ₂ O	10

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Antimikrobiální aktivita **4-methyl-N-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamidu (S1)** je uvedena v tabulce 4.

Tabulka 4 Antimikrobiální aktivita derivátu S1

Kmen	S1	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	256	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	256	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	256	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	256	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	128	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	16	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	16	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	16	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	32	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	16	32
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	16	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	256	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	neinhibuje	-

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S1 vykazoval antimikrobiální aktivitu, ovšem na některé bakteriální kmeny nevykazoval žádný inhibiční účinek. Nejnižší hodnoty MIC 16 µg/ml bylo dosaženo u bakteriálních kmenů *Staphylococcus aureus* CCM 2022, *Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Staphylococcus aureus* 1260 91398 a *Streptococcus pyogenes*. Na kmen *Streptococcus pyogenes* vykazoval S1 kromě inhibičního i baktericidní účinek, a to při koncentraci 32 µg/ml. U gramnegativních bakterií byl potlačen růst pouze při nejvyšší testované koncentraci 256 µg/ml.

Antimikrobiální aktivita **5-methyl-N-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamidu (S2)** je uvedena v tabulce 5.

Tabulka 5 Antimikrobiální aktivita derivátu S2

Kmen	S2	
	MIC [μg/ml]	MBC [μg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	256	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	256	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	128	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	256	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	128	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	16	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	16	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	64	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	16	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	8	16
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	256	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	32	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	16	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	32	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	16	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	16	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	16	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	16	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	128	-

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S2 vykazoval antimikrobiální aktivitu proti všem testovaným mikroorganismům. Nejnižší hodnoty MIC 8 μg/ml bylo dosaženo u bakteriálního kmene *Streptococcus pyogenes*. Na tento kmen měl S2 při koncentraci 16 μg/ml také baktericidní účinek. U gramnegativních bakterií byl potlačen růst pouze při nejvyšší testované koncentraci 256 μg/ml. Při koncentraci 16 μg/ml potlačil i růst MRSA, konkrétně u bakteriálního kmene *Staphylococcus aureus* 1214 ST398.

Antimikrobiální aktivita **4-chlor-N-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamidu (S3)** je uvedena v tabulce 6.

Tabulka 6 Antimikrobiální aktivita derivátu S3

Kmen	S3	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	256	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	256	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	64	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	8	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	16
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	2	256
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	2	16
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	2	32
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	4	16
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	2	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	2	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	2	128
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	2	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	2	256
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	2	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	2	128
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	2	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	2	16

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S3 vykazoval antimikrobiální aktivitu proti všem testovaným bakteriálním kmenům. Nejnižší hodnoty MIC 2 µg/ml bylo dosaženo u 11 kmenů *Staphylococcus aureus* z celkových 13, včetně 2 bakteriálních kmenů MRSA - *Staphylococcus aureus* 1205 ST398 a *Staphylococcus aureus* 1214 ST398. Dále byla stanovena MIC 2 µg/ml u kmenů *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 a *Streptococcus pyogenes*. Na kmen *Streptococcus pyogenes* vykazoval S3 také baktericidní účinek, a to při koncentraci 8 µg/ml. U gramnegativních bakterií byl potlačen růst pouze při nejvyšší testované koncentraci 256 µg/ml.

Antimikrobiální aktivita *N*-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamidů (S4) je uvedena v tabulce 7.

Tabulka 7 Antimikrobiální aktivita derivátu S4

Kmen	S4	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	256	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	256	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	64	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	8	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	8	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	16	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	16	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	16	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	neinhibuje	-

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S4 vykazoval antimikrobiální aktivitu, ovšem téměř na polovinu testovaných bakteriálních kmenů nevykazoval žádný inhibiční účinek. Nejnižší hodnoty MIC 8 µg/ml bylo dosaženo u kmenů *Staphylococcus aureus* CCM 2022 a *Staphylococcus aureus* CCM 4223. Na žádný testovaný kmen nevykazoval S4 baktericidní účinek. U gramnegativních bakterií byl potlačen růst pouze při nejvyšší testované koncentraci 256 µg/ml.

Antimikrobiální aktivita **5-fluor-N-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamidu (S5)** je uvedena v tabulce 8.

Tabulka 8 Antimikrobiální aktivita derivátu S5

Kmen	S5	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	256	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	256	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	128	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	8	64
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	16
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	8	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	8	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	8	256
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	8	32
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4	16
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	8	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	4	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	4	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	4	64
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	4	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	4	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	4	32

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S5 vykazoval antimikrobiální aktivitu proti všem testovaným mikroorganismům. Nejnižší hodnoty MIC 4 µg/ml bylo dosaženo u kmenů *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* 1260 91398, *Staphylococcus aureus* 1094 ST398, *Staphylococcus aureus* 284, *Staphylococcus aureus* 340, *Staphylococcus aureus* 650, *Staphylococcus aureus* 1185. Dále také u kmenů MRSA - *Staphylococcus aureus* 1205 ST398 a *Staphylococcus aureus* 1214 ST398. Nejnižší MBC 16 µg/ml bylo dosaženo u kmenů *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 a *Staphylococcus aureus*.

Antimikrobiální aktivita **5-chlor-N-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamidu (S6)** je uvedena v tabulce 9.

Tabulka 9 Antimikrobiální aktivita derivátu S6

Kmen	S6	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	256	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	256	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	32	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	4	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	8
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	4	256
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	4	16
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	4	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	4	64
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	4	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	2	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	2	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	2	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	4	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	2	128
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	4	16

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S6 vykazoval antimikrobiální aktivitu proti všem testovaným mikroorganismům. Nejnižší hodnoty MIC 2 µg/ml bylo dosaženo u kmenů *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* 1260 91398, *Staphylococcus aureus* 1094 ST398, *Staphylococcus aureus* 650 a u kmenů MRSA *Staphylococcus aureus* 1205 ST398 a *Staphylococcus aureus*. Nejnižší MBC 2 µg/ml bylo dosaženo u kmene *Streptococcus pyogenes*. U gramnegativních bakterií byl potlačen růst pouze při nejvyšší testované koncentraci 256 µg/ml.

Antimikrobiální aktivita **5-brom-N-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamidu (S7)** je uvedena v tabulce 10.

Tabulka 10 Antimikrobiální aktivita derivátu S7

Kmen	S7	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	256	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	256	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	32	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	4	64
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	8
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	4	256
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	4	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	2	16
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	4	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	4	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	4	256
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	4	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	2	16

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S7 vykazoval antimikrobiální aktivitu proti všem testovaným bakteriálním kmenům. Nejnižší hodnoty MIC 2 µg/ml byly stanoveny u kmenů *Streptococcus agalactiae* CCM 6187, *Staphylococcus aureus* 1185 a *Staphylococcus aureus* – MRSA. Nejnižší MBC 4 µg/ml byla zjištěna u kmene *Streptococcus pyogenes*. U gramnegativních bakterií byl potlačen růst pouze při nejvyšší testované koncentraci 256 µg/ml.

Antimikrobiální aktivita **4-fluor-N-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamid (S8)** je uvedena v tabulce 11.

Tabulka 11 Antimikrobiální aktivita derivátu S8

Kmen	S8	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	256	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	256	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	128	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	8	32
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	8
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	8	64
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	8	64
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	8	32
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	4	8
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	4	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	4	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	4	128
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	4	64
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	4	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	4	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	4	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	4	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	4	16

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S8 vykazoval antimikrobiální aktivitu proti všem testovaným bakteriálním kmenům. Nejnižší hodnoty MIC 4 µg/ml byly stanoveny u většiny bakteriálních kmenů *Staphylococcus aureus* včetně všech testovaných kmenů MRSA. Dále byla tato MIC zjištěna u kmenů *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418, *Streptococcus agalactiae* CCM 6187 a *Streptococcus pyogenes*. Na většinu testovaných mikroorganismů vykazoval S8 i baktericidní účinek. Nejnižší MBC byla stanovena u kmene *Streptococcus pyogenes*, a to při koncentraci 4 µg/ml. U gramnegativních bakterií byl potlačen růst pouze při nejvyšší testované koncentraci 256 µg/ml.

Antimikrobiální aktivita **4-brom-N-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-methylbutyl]-2-hydroxybenzamid (S9)** je uvedena v tabulce 12.

Tabulka 12 Antimikrobiální aktivita derivátu S9

Kmen	S9	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	256	256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	256	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	64	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	4	32
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	16
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	4	32
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	4	128
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	4	16
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	8	256
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4	32
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	4	8
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	4	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	4	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	4	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	4	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	4	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	4	64
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	4	128

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S9 vykazoval antimikrobiální aktivitu proti všem testovaným mikroorganismům. Nejnižší hodnota MIC 4 µg/ml byla stanovena pro většinu testovaných bakteriálních kmenů, kromě *Streptococcus agalactiae* CCM 6187, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 a *Escherichia coli* CCM 3954. Na většinu bakteriálních kmenů vykazoval S9 i baktericidní účinek, přičemž nejvyšší hodnota MBC byla 8 µg/ml a to u kmene *Staphylococcus aureus* 1260 91398. U gramnegativních bakterií byl potlačen růst pouze při nejvyšší testované koncentraci 256 µg/ml.

Antimikrobiální aktivita **5-brom-N-[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]-2-hydroxybenzamidu (S10)** je uvedena v tabulce 13.

Tabulka 13 Antimikrobiální aktivita derivátu S10

Kmen	S10	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	neinhibuje	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	neinhibuje	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	neinhibuje	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	neinhibuje	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	neinhibuje	-

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S10 nevykazoval žádné inhibiční účinky na testované bakteriální kmeny.

Antimikrobiální aktivita *N*-[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]-2-hydroxy-5-methylbenzamidu (S11) je uvedena v tabulce 14.

Tabulka 14 Antimikrobiální aktivita derivátu S11

Kmen	S11	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	neinhibuje	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	neinhibuje	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	neinhibuje	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	neinhibuje	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	neinhibuje	-

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S11 nevykazoval žádné inhibiční účinky na testované bakteriální kmeny.

Antimikrobiální aktivita **4-fluor-N-[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]-2-hydroxybenzamidu (S12)** je uvedena v tabulce 15.

Tabulka 15 Antimikrobiální aktivita derivátu S12

Kmen	S12	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	256	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	neinhibuje	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	neinhibuje	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	neinhibuje	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	neinhibuje	-

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S12 vykazoval inhibiční účinek pouze na bakteriální kmen *Escherichia coli* CCM 3954 a to při nejvyšší testované koncentraci 256 µg/ml.

Antimikrobiální aktivita **5-chlor-N-[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]-2-hydroxybenzamid (S13)** je uvedena v tabulce 16.

Tabulka 16 Antimikrobiální aktivita derivátu S13

Kmen	S13	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	neinhibuje	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	neinhibuje	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	neinhibuje	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	neinhibuje	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	neinhibuje	-

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S13 nevykazoval žádné inhibiční účinky na testované bakteriální kmeny.

Antimikrobiální aktivita **5-fluor-N-[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]-2-hydroxybenzamidu (S14)** je uvedena v tabulce 17.

Tabulka 17 Antimikrobiální aktivita derivátu S14

Kmen	S14	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	neinhibuje	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	neinhibuje	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	neinhibuje	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	neinhibuje	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	neinhibuje	-

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S14 nevykazoval žádné inhibiční účinky na testované bakteriální kmeny.

Antimikrobiální aktivita *N*-[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]-2-hydroxy-4-methylbenzamidů (S15) je uvedena v tabulce 18.

Tabulka 18 Antimikrobiální aktivita derivátu S15

Kmen	S15	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	256	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	256	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	neinhibuje	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	neinhibuje	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	neinhibuje	-

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S15 vykazoval inhibiční účinek na bakteriální kmeny *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 to při nejvyšší testované koncentraci 256 µg/ml.

Antimikrobiální aktivita N-[(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)methyl]-2-hydroxybenzamidů (S16) je uvedena v tabulce 19.

Tabulka 19 Antimikrobiální aktivita derivátu S16

Kmen	S16	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	256	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	256	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	neinhibuje	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	neinhibuje	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	neinhibuje	-

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testovaný salicylamid S16 vykazoval inhibiční účinek na bakteriální kmeny *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 při nejvyšší testované koncentraci 256 µg/ml.

Antimikrobiální aktivita testovaného antibiotika ampicilin sodium salt je uvedena v tabulce 20.

Tabulka 20 Antimikrobiální aktivita ampicilinu sodium salt

Kmen	Ampicilin sodium salt	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	32	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	neinhibuje	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	2	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	0,5	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	32	64
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	0,5	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	4	4
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	0,5	0,5
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	0,5	0,5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,125	0,125
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	32	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	8	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	16	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	64	64
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	0,5	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	64	64
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	4	4
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	0,5	1
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	2	-

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testované antibiotikum ampicilin sodium salt vykazovalo inhibiční a zároveň baktericidní účinek již při koncentraci 0,125 µg/ml, a to na bakteriální kmen *Streptococcus pyogenes*. Ampicilin sodium salt inhiboval růst téměř všech bakteriálních kmenů, kromě *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Na většinu testovaných mikroorganismů vykazoval i baktericidní účinek.

Testovaný S3 vykazoval výraznější inhibiční účinek vůči všem testovaným kmenům MRSA oproti ampicilinu. S3 inhiboval růst 2 kmenů MRSA - *Staphylococcus aureus* 1205 ST398 a *Staphylococcus aureus* 1214 ST398 již při koncentraci 2 µg/ml na rozdíl od

ampicilinu, který je inhiboval při koncentraci 64 µg/ml. U kmene *Staphylococcus aureus* – MRSA inhiboval S3 při koncentraci 4 µg/ml oproti ampicilinu, který tento kmen inhiboval při koncentraci 32 µg/ml. Téměř všechny kmeny *Staphylococcus aureus* inhiboval S3 při koncentraci 2 µg/ml, což je u kmenů *Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Staphylococcus aureus* 1260 91398, *Staphylococcus aureus* 1094 ST398 a *Staphylococcus aureus* 340 nižší MIC, než vykazoval ampicilin. Dále S3 výrazněji inhiboval růst kmene *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 a to při 2 µg/ml na rozdíl od ampicilinu, který inhiboval tento kmen při koncentraci 32 µg/ml.

Testovaný S5 vykazoval stejnou MIC 4 µg/ml na kmen *Staphylococcus aureus* 340. S5 měl výraznější inhibiční účinek vůči všem testovaným kmenům MRSA oproti ampicilinu. S5 inhiboval růst 2 kmenů MRSA - *Staphylococcus aureus* 1205 ST398 a *Staphylococcus aureus* 1214 ST398 již při koncentraci 4 µg/ml. Dále u kmene *Staphylococcus aureus* – MRSA vykazoval S5 značně vyšší inhibiční účinek oproti ampicilinu, a to při koncentraci 8 µg/ml.

Testovaný S6 vykazoval stejný inhibiční účinek jako ampicilin u bakteriálních kmenů *Staphylococcus aureus* 340 a *Staphylococcus aureus* CCM 4223 při koncentraci 4 µg/ml. S6 výrazněji inhiboval rezistentní kmeny MRSA. Kmeny *Staphylococcus aureus* – MRSA a *Staphylococcus aureus* 1205 ST398 inhiboval S6 při 2 µg/ml a kmen *Staphylococcus aureus* 1214 ST398 při 4 µg/ml. Dále měl výraznější bakteriostatický účinek na kmeny *Staphylococcus aureus* 1094 ST398, *Staphylococcus aureus* 1260 91398 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418.

Testovaný S7 měl stejný bakteriostatický účinek jako ampicilin na kmeny *Staphylococcus aureus* 1185, *Staphylococcus aureus* 340, *Staphylococcus aureus* CCM 4223. Ostatní kmeny *Staphylococcus aureus* inhiboval S7 při koncentraci 4 µg/ml, což byla u některých kmenů nižší MIC než u ampicilinu. Testované rezistentní kmeny MRSA inhiboval S7 výrazněji než ampicilin. U kmene *Staphylococcus aureus* – MRSA vykazoval i výraznější baktericidní účinek, a to již při koncentraci 8 µg/ml, ovšem u zbývajících kmenů MRSA byl baktericidní účinek značnější u ampicilinu. Výraznější bakteriostatický i baktericidní účinek v porovnání s ampicilinem byl pozorován u kmene *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418.

Testované S8 a S9 inhibovali růst většiny bakteriálních kmenů při koncentraci 4 µg/ml. To je u některých testovaných mikroorganismů nižší MIC než u ampicilinu, zejména u rezistentních kmenů MRSA.

Antimikrobiální aktivita testovaného antibiotika erythromycin je uvedena v tabulce 21.

Tabulka 21 Antimikrobiální aktivita erythromycinu

Kmen	Erythromycin	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	128	128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	128	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	2	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	0,5	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	2	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	2	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	0,5	16
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,125	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	2	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	1	64
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	2	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	2	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	2	4
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	1	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	2	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	1	-

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testované antibiotikum erythromycin vykazovalo inhibiční účinek téměř na všechny testované bakteriální kmeny, kromě *Staphylococcus aureus* – MRSA a *Staphylococcus aureus* 340. Nejnižší hodnoty MIC 0,125 µg/ml bylo dosaženo u kmene *Streptococcus pyogenes*. Zároveň erythromycin vykazoval také baktericidní účinky. Nejnižší hodnoty MBC 4 µg/ml bylo dosaženo u kmenů *Streptococcus pyogenes* a *Staphylococcus aureus* 284. Této hodnoty MBC 4 µg/ml bylo dosaženo také u S7 a S8 na bakteriální kmen *Streptococcus pyogenes*. Stejnou hodnotu MIC 2 µg/ml vykazoval erythromycin spolu s S3 na bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Staphylococcus*

aureus 1094 ST398, *Staphylococcus aureus* 284, *Staphylococcus aureus* 650, *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 a také na *Staphylococcus aureus* 1205 ST398 – MRSA.

Testovaný S6 vykazoval stejnou hodnotu MIC 2 µg/ml jako erythromycin na bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus* 1094 ST398, *Staphylococcus aureus* 1205 ST398 – MRSA a *Staphylococcus aureus* 650. Na rozdíl od erythromycinu dokázal S6 inhibovat růst kmene *Staphylococcus aureus* – MRSA, a to při koncentraci 2 µg/ml.

Antimikrobiální aktivita testovaného antibiotika penicilin G salt je uvedena v tabulce 22.

Tabulka 22 Antimikrobiální aktivita penicilinu G salt

Kmen	Penicilin G salt	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	neinhibuje	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	neinhibuje	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	4	8
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	0,125	0,125
<i>Staphylococcus aureus</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	0,06	0,125
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	0,125	0,125
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	0,125	0,125
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,03	0,06
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	8	8
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	0,125	0,125
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	0,25	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	0,125	0,125
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	0,125	0,125

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testované antibiotikum Penicilin G salt vykazovalo nejvýraznější bakteriostatický a baktericidní účinek na kmen *Streptococcus pyogenes*. Penicilin G salt nepotlačil růst kmenů MRSA, gramnegativních tyčinek, kmene *Staphylococcus aureus* 1094 ST398 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418. Na ostatní kmeny účinkoval již při nízkých koncentracích.

Testované S3 a S6 měli výraznější bakteriostatický účinek na kmen *Staphylococcus aureus* 1260 91398 a to již při koncentraci 2 µg/ml, na rozdíl od penicilinu, u kterého byla hodnota MIC pro tento kmen 8 µg/ml. Dále tento kmen inhibovali S5, S7, S8 a S9 při koncentraci 4 µg/ml.

Antimikrobiální aktivita testovaného antibiotika clindamycin hydrochloride je uvedena v tabulce 23.

Tabulka 23 Antimikrobiální aktivita clindamycinu hydrochloride

Kmen	Clindamycin hydrochloride	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	neinhibuje	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	neinhibuje	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	16	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	0,25	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	0,5	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	8	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	32	32
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,125	32
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	0,25	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	0,5	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	0,5	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	32	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	0,5	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	0,5	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	32	-

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testované antibiotikum Clindamycin hydrochloride vykazovalo nejvýraznější bakteriostatický a baktericidní účinek na kmen *Streptococcus pyogenes*. Baktericidní účinek vykazoval také na kmeny *Streptococcus agalactiae* CCM 6187 a *Staphylococcus aureus* 284 při koncentraci 32 µg/ml.

Testovaný S1 vykazoval stejnou MIC u kmene *Streptococcus agalactiae* CCM 6187 a stejnou MBC u kmene *Streptococcus pyogenes*. Testovaný S2 měl hodnotu MBC u kmene *Streptococcus pyogenes* 16 µg/ml.

Testovaný S3 vykazoval hodnotu MIC 2 µg/ml u kmenů *Staphylococcus aureus* 1185, *Staphylococcus aureus* 1214 ST398 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953, což je nižší hodnota MIC, než vykazoval clindamycin u těchto kmenů. Na kmen *Streptococcus pyogenes* měl S3 baktericidní účinek při koncentraci 8 µg/ml. Na většinu kmenů působil baktericidně oproti clindamycinu.

Testované S5, S8 a S9 vykazovali na bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus* 1185 a *Staphylococcus aureus* 1214 ST398 hodnotu MIC 4 µg/ml, na rozdíl od clindamycinu, který tyto kmeny inhiboval při koncentraci 32 µg/ml. Kmen *Streptococcus agalactiae* CCM 6187 byl inhibován S8 při koncentraci 4 µg/ml. S5 a S9 inhibovali tento kmen při koncentraci 8 µg/ml. S8 a S9 měli na rozdíl od clindamycinu na většinu bakteriálních kmenů také baktericidní účinek.

Antimikrobiální aktivita testovaného antibiotika tetracycline hydrochloride je uvedena v tabulce 24.

Tabulka 24 Antimikrobiální aktivita tetracyclinu hydrochloride

Kmen	Tetracycline hydrochloride	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	8	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	neinhibuje	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	32
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	1	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	2	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	2	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	neinhibuje	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,5	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	32	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	2	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	1	32
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	2	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	8	32

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testované antibiotikum tetracycline hydrochloride mělo hodnotu nejnižší MIC 0,5 µg/ml u kmene *Streptococcus pyogenes*. Tetracycline působil baktericidně na kmeny *Staphylococcus aureus* – MRSA, *Staphylococcus aureus* 340 a *Staphylococcus aureus* 1185 při koncentraci 32 µg/ml. Na některé testované bakteriální kmeny nevykazoval žádný účinek.

Testovaný S3 vykazoval stejnou hodnotu MIC 2 µg/ml jako tetracycline u kmenů *Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Staphylococcus aureus* 284 a *Staphylococcus aureus* 650. U kmenů *Staphylococcus aureus* 1185 a

Staphylococcus epidermidis CCM 4418 byla hodnota MIC nižší než u testovaného antibiotika. Na kmen *Streptococcus pyogenes* působil S3 také baktericidně, a to při koncentraci 8 µg/ml. V porovnání s tetracyclinem vykazoval S3 značně vyšší baktericidní účinek.

Testovaný S5 účinkoval oproti tetracyclinu na všechny bakteriální kmeny. Na kmeny *Staphylococcus aureus* 1185 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 vykazoval i výraznější inhibiční účinek. Na rozdíl od tetracyclinu působil baktericidně již při koncentraci 16 µg/ml, a to u kmenů *Staphylococcus aureus* – MRSA, *Streptococcus pyogenes* a *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418. Baktericidní účinek vykazoval S5 na většinu testovaných mikroorganismů.

Testovaný S6 měl výraznější inhibiční účinek na kmeny *Staphylococcus aureus* 1185 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418. Stejná hodnota MIC 2 µg/ml při porovnání s tetracyclinem byla u kmene *Staphylococcus aureus* 650. S6 měl baktericidní účinek již při koncentraci 2 µg/ml na kmen *Streptococcus pyogenes*.

Testovaný S7 inhiboval růst všech testovaných mikroorganismů a na polovinu těchto kmenů měl i baktericidní účinek. U kmenů *Staphylococcus aureus* 1185 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 byla hodnota MIC nižší než u tetracyclinu. Na rozdíl od tetracyclinu dokázal S7 inhibovat i kmeny *Staphylococcus aureus*, na které tetracycline nevykazoval inhibiční účinky, a také kmeny *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 a *Streptococcus agalactiae* CCM 6187.

Testovaný S8 a S9 měli nižší hodnotu MIC u bakteriálních kmenů *Staphylococcus aureus* 1185 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418. Na rozdíl od tetracyclinu působili na většinu bakteriálních kmenů baktericidně. S8 již při koncentraci 4 µg/ml na kmen *Streptococcus pyogenes*. S9 působil baktericidně při koncentraci 8 µg/ml na kmen *Staphylococcus aureus* 1260 91398.

Antimikrobiální aktivita testovaného antibiotika amoxicilin uvedena v tabulce 25.

Tabulka 25 Antimikrobiální aktivita amoxicilinu

Kmen	Amoxicilin	
	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	neinhibuje	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	neinhibuje	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	neinhibuje	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187	neinhibuje	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1260 91398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1094 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1205 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 284	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1214 ST398	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 340	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 650	neinhibuje	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1185	neinhibuje	-

Pozn.:

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MBC – minimální baktericidní koncentrace

 nejnižší MIC/MBC pro danou sloučeninu

- nevykazuje baktericidní účinek

Testované antibiotikum amoxicilin nevykazovalo bakteriostatický ani baktericidní účinek. Důvodem jeho neúčinnosti je zřejmě to, že nebyl testován v kombinaci s kyselinou klavulanovou.

Kyselina klavulanová je ireverzibilní inhibitor intracelulárních a extracelulárních β -laktamáz a je účinná proti širokému spektru těchto enzymů. Tato kyselina tak chrání amoxicilin před inaktivací β -laktamázami (Todd P. A. a kol., 1990).

Z tohoto důvodu nebude toto antibiotikum porovnáváno s testovanými salicylamidy.

Vývoj a syntéza nových antimikrobiálních látek je jedním ze základních cílů chemie pro biomedicínské aplikace. Hlavním důvodem je rezistence bakterií vůči antimikrobiálním látkám, čímž se léčba infekčních onemocnění stává každým rokem náročnější. To platí zejména pro infekce způsobené oportunistickým patogenem *Pseudomonas aeruginosa*, jehož schopností je rychle vyvinout rezistenci na více tříd antibiotik. Antibiotická rezistence negativně ovlivňuje morbiditu a mortalitu infekčních onemocnění. Dále prodlužuje dobu léčby a má také ekonomický dopad, jelikož jsou náklady na léčbu multirezistentních infekcí značně vyšší.

V experimentální části této diplomové práce byla stanovena antimikrobiální aktivita derivátů 1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl) alkylaminů. Z výsledků je patrné, že deriváty na bázi leucinu (S1-S9) mají podstatně výraznější antimikrobiální aktivitu v porovnání s deriváty na bázi glycinu (S10-S16).

Pokud mezi sebou porovnáme deriváty S1-S9 z hlediska struktury, lze pozorovat určité shody v inhibici. Deriváty S1 a S2 obsahují ve své molekule methyl. Derivát S1 má methyl v pozici 4 a S2 má methyl v pozici 5. Při porovnání minimálních inhibičních koncentrací těchto dvou derivátů lze pozorovat shodné MIC u kmenů *Escherichia coli* CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Staphylococcus aureus* CCM 4227, *Staphylococcus aureus* – MRSA, *Staphylococcus aureus* CCM 2022 a *Staphylococcus aureus* CCM 4223. Oba tyto deriváty měly baktericidní účinek na kmen *Streptococcus pyogenes*, ovšem u S1 byla hodnota MBC dvojnásobně vyšší. Celkově při porovnání těchto dvou derivátů vykazoval výraznější antimikrobiální aktivitu derivát S2.

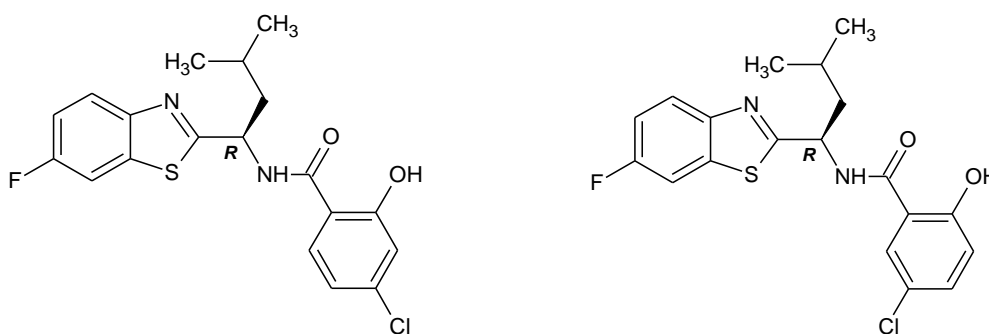
Deriváty S3 a S6 obsahují ve své molekule chlor. Derivát S3 má chlor v pozici 4 a derivát S6 v pozici 5. Při porovnání minimálních inhibičních koncentrací těchto dvou derivátů lze pozorovat shodné MIC u kmenů *Escherichia coli* CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Streptococcus agalactiae* CCM 6187, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* 1260 91398, *Staphylococcus aureus* 1094 ST398, *Staphylococcus aureus* 1205 ST398 a *Staphylococcus aureus* 650. Oba tyto deriváty vykazovaly také baktericidní účinek, přičemž nejnižší MBC oba deriváty dosáhly u kmene *Streptococcus pyogenes*. Při porovnání těchto dvou derivátů vykazoval výraznější antimikrobiální aktivitu derivát S3.

Deriváty S5 a S8 obsahují ve své molekule fluor. Derivát S5 má fluor v pozici 5 a derivát S8 v pozici 4. U těchto dvou derivátů lze pozorovat podstatnou shodu hodnot MIC. Kromě hodnot MIC u kmenů *Staphylococcus aureus* – MRSA, *Streptococcus agalactiae* CCM 6187 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 jsou všechny minimální inhibiční

koncentrace shodné. Hodnoty MBC jsou rozdílné. Při porovnání těchto dvou derivátů vykazoval výraznější antimikrobiální aktivitu derivát S8.

Deriváty S7 a S9 obsahují ve své molekule brom. Derivát S7 má brom v pozici 5 a derivát S9 v pozici 4. I u těchto dvou derivátů lze pozorovat podstatnou shodu hodnot MIC. Kromě hodnot MIC u kmenů *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Staphylococcus aureus* – MRSA, *Streptococcus agalactiae* CCM 6187 a *Staphylococcus aureus* 1185 jsou všechny minimální inhibiční koncentrace shodné. Hodnoty MBC těchto derivátů jsou rozdílné. Při porovnání těchto dvou derivátů vykazoval výraznější antimikrobiální aktivitu derivát S7.

Derivát S4 nemá na atom uhlíku navázaný substituent. V porovnání s deriváty S1-S9 vykazoval S4 nejnižší antimikrobiální aktivitu. Na více než polovinu testovaných bakteriálních kmenů nevykazoval inhibiční účinek. Výsledky naznačují, že je antimikrobiální účinnost testovaných derivátů ovlivňována substituenty v aromatickém kruhu. Jako nejvíce antimikrobiálně aktivní byly vyhodnoceny deriváty S3 a S6 se substituovaným chlorem, jejichž strukturní vzorce jsou znázorněny na obrázku 15.



Obrázek 15 Strukturní vzorce neúčinnějších derivátů S3 a S6

Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) je hlavní příčinou infekcí spojených s poskytováním zdravotní péče a komunit na celém světě. Odhaduje se, že v rámci samotné zdravotní péče postihuje infekce MRSA v Evropské unii každoročně více než 150 000 pacientů (Köck a kol., 2010). V této práci byla stanovena výrazná antimikrobiální aktivita některých testovaných derivátů vůči patogenním kmenům MRSA. Nejnižších hodnot MIC dosáhly testované deriváty S3 a S6 u kmenů *Staphylococcus aureus* - MRSA, *Staphylococcus aureus* 1205 ST398 a *Staphylococcus aureus* 1214 ST398. Dále bylo dosaženo výrazných inhibičních účinků na patogenní kmeny MRSA u derivátů S5, S7, S8 a S9. Tyto deriváty inhibovaly patogenní kmeny MRSA v koncentračním rozmezí 2-8 $\mu\text{g/ml}$.

Při porovnání všech testovaných bakteriálních kmenů v této práci, bylo dosaženo nejlepších antimikrobiálních účinků u kmene *Streptococcus pyogenes*. U většiny testovaných derivátů byla vyhodnocena nejnižší MIC, příp. MBC právě pro tento kmen. Celkově lze konstatovat, že testované deriváty vykazovaly výraznou antimikrobiální účinnost zejména na grampozitivní bakterie. Naopak u gramnegativních bakterií byl potlačen růst u všech derivátů pouze při nejvyšší testované koncentraci

Ve studii Singh a kol. (2016) byla hodnocena antimikrobiální aktivita a mechanismus účinku nových derivátů 2-(4'-aminofenyl) benzthiazolu. Výsledky studie ukázaly, že sloučeniny označené A07a a A07b vykazovaly hodnoty minimálních inhibičních koncentrací v rozmezí 3,91-31,2 µg/ml u kmenů *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli* (Singh a kol., 2016). Testované deriváty 2-(4'-aminofenyl) benzthiazolu značené jako A07a a A07b mají v porovnání s testovanými deriváty 1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl) alkylaminů v této práci podstatně výraznější inhibiční účinek na gramnegativní tyčinky. V případě kmene *Staphylococcus aureus* dosahovaly výsledky v této práci hodnot MIC i 2 µg/ml, zejména testované deriváty S3 a S6.

Na Univerzitě Pardubice byla testována antimikrobiální a antifungální aktivita nově syntetizovaných dusíkatých derivátů 1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl) alkylaminů. Deriváty byly připraveny na pracovišti ÚOCHT Univerzity Pardubice třístupňovou syntézou a před testováním byla provedena analýza NMR spektrometrií. Do testování byly zahrnuty grampozitivní bakterie, gramnegativní bakterie a patogenní kvasinky. Získané hodnoty MIC byly porovnány s běžně užívanými antibiotiky. Byla zjištěna poměrně nízká citlivost testovaných kmenů k těmto derivátům. Nejvyšších antimikrobiálních účinků dosahovaly deriváty u *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus epidermidis*. U kmene *Pseudomonas aeruginosa* byla hodnota MIC 100 µg/ml (Remešová, 2014). Nejnižší hodnoty MIC u kmene *Pseudomonas aeruginosa* v této práci bylo dosaženo při koncentraci 256 µg/ml, což je hodnota nejvyšší testované koncentrace. Tato hodnota MIC byla pozorována i u kmene *Escherichia coli* CCM 3954. Na gramnegativní bakterie nevykazovaly testované deriváty výrazný bakteriální účinek.

V další práci, která se zabývala stanovením antimikrobiální a antifungální aktivity 1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl) alkylaminů na Univerzitě Pardubice ve spolupráci s ÚOCHT bylo otestováno 8 nových sloučenin. Nejvyšší inhibiční účinek byl pozorován u alkylaminu (1S)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-fenylethanamin hydrochlorid na kmen *Enterococcus faecalis* CCM 4224 při koncentraci 100 µg/ml. U alkylaminů (1S)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-fenylethanamin hydrochlorid a (1S)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-

(methylsulfanyl)propan-1amin hydrochlorid byl pozorován vliv na potlačení tvorby pigmentu kmene *Pseudomonas aeruginosa* (Kovárníková, 2015). Při porovnání s testovanými deriváty v této práci, bylo dosaženo u kmene *Enterococcus faecalis* CCM 4224 nižších hodnot MIC – konkrétně u derivátů S3, S6, S7 a S9. Deriváty S6 a S7 inhibovaly růst tohoto kmene již při koncentraci 32 µg/ml.

Ve studii El-Gohary a kol. (2017) byly syntetizovány nové analogy benzimidazolu a testovali se na antimikrobiální účinnost vůči *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* a *Aspergillus fumigatus*. Účinná syntéza nových benzimidazolů 4a, 4b, 5a-c a 6-15 byla provedena s použitím 2-merkaptomethyl-5-nitro-1*H*-benzimidazolu. Pro porovnání výsledků byly použity antibiotikum ampicilin a antimykotikum flukonazol. Pro každou z testovaných sloučenin byla stanovena minimální inhibiční koncentrace. U kmene *Escherichia coli* bylo dosaženo nejnižší MIC 156,25 µg/ml. U kmene *Staphylococcus aureus* bylo dosaženo nejnižší hodnoty MIC 39,06 µg/ml. Obě tyto hodnoty MIC byly zjištěny pro benzimidazol s označením 10. U ostatních benzimidazolů byly hodnoty MIC podstatně vyšší a v mnoha případech přesahovaly tyto hodnoty koncentraci 1000 µg/ml (El-Gohary a kol., 2017). Při porovnání s testovanými deriváty v této práci lze říci, že benzthiazolové deriváty vykazují značně vyšší antibakteriální účinnost než analogy benzimidazolu. U benzimidazolu s označením 10 byla sice hodnota MIC pro gramnegativní bakterii nižší, ovšem ostatní testované deriváty vykazovaly tuto hodnotu mnohonásobně vyšší. Při srovnání účinků na grampozitivní koky, byly hodnoty MIC vůči kmenům *Staphylococcus aureus* u testovaných derivátů v této práci výrazně nižší.

Od 90. let minulého století uváděly různé farmakologické výzkumy nově syntetizované deriváty benzothiazolu a prokázaly jejich biologickou aktivitu. To vedlo k vývoji nových léků pro léčbu různých onemocnění. Ve studii Al-Talib a kol. (2016) se pokračovalo v tomto výzkumu o hodnocení biologické aktivity derivátů benzothiazolu a byla uvedena syntéza nové řady derivátů *N'*-(2-(4-(benzo [*d*] thiazol-2-yl) piperazinu. Antibakteriální účinnost těchto sloučenin byla testována na kmenech *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a patogenní kvasince *Candida albicans*. Tyto deriváty byly testovány při koncentracích 63, 125, 250 a 500 µg/ml. Výsledky ukázaly nízkou nebo žádnou antimikrobiální aktivitu (Al-Talib a kol., 2016).

Ve studii Maddila a kol. (2016) byla syntetizována nová série benzthiazolových pyrimidinových derivátů. Je známo, že pyrimidiny hrají klíčovou roli v několika chemických procesech jako léčiva. Thiazolové deriváty pyrimidinu dosáhly v posledních letech velké pozornosti díky svým biologickým aktivitám. Jako příklad lze uvést antibakteriální, fungicidní, protizánětlivou či antimalarickou aktivitu. Všechny nově syntetizované sloučeniny

v této studii byly charakterizovány elementárními a spektrálními analýzami a byly testovány na jejich antibakteriální a antifungální aktivitu. Testovanými bakteriálními kmeny byly *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* a *Pseudomonas aeruginosa*. Obecně všechny sloučeniny vykazovaly mírnou až dobrou antibakteriální aktivitu proti testovaným mikroorganismům. Nově syntetizované sloučeniny s označením 7b, 7e, 7f, 7g, 7h a 7j vykazovaly výraznou antimikrobiální aktivitu. U všech testovaných kmenů bylo působením derivátu s označením 7g dosaženo MIC 12,5 µg/ml. Je pravděpodobné, že se tyto nově syntetizované sloučeniny s velkým potenciálem pro použití jako antibakteriální činidla v klinické praxi, použijí pro další testování (Maddial a kol., 2016).

Ve studii Kumbhare a kol. (2014) byla připravena nová řada 2-substituovaných benzthiazolových derivátů s fluorem. Tyto nově syntetizované sloučeniny byly testovány na antibakteriální vlastnosti. Z grampozitivních bakterií byly testovány *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus aureus*. Z gramnegativních bakterií byla testována *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*. Testování bylo provedeno bujonovou mikrodiluční metodou. Získané minimální inhibiční koncentrace byly porovnány s účinky antibiotik penicilin a streptomycin. Výsledky ukázaly, že tyto sloučeniny vykazovaly podstatný antimikrobiální účinek proti všem testovaným kmenům. Kmen *Staphylococcus aureus* byl nejvíce inhibován derivátem 8e a to při hodnotě MIC 2,7 µg/ml. U kmene *Staphylococcus epidermidis* byl růst nejúčinněji potlačen derivátem 9g při koncentraci 3,8 µg/ml. Nejvýraznější antimikrobiální účinek na *Escherichia coli* vykazoval derivát 8e, u kterého byla hodnota MIC 10,9 µg/ml. *Pseudomonas aeruginosa* byla nejvíce inhibována derivátem 8e při koncentraci 2,7 µg/ml (Kumbhare a kol., 2014). Účinnost derivátů na grampozitivní koky ze studie Kumbhare a kol. (2014) je srovnatelná s účinky některých testovaných derivátů z této práce. Antimikrobiální účinek na gramnegativní tyčinky ovšem není srovnatelný, jelikož v této práci byly inhibovány pouze při nejvyšší testované koncentraci 256 µg/ml.

Ve studii Singh a kol. (2014) bylo navrženo, syntetizováno a testováno na antibakteriální účinnost 10 benzthiazolových derivátů nesoucích amidovou skupinu (A01-A10). Pro testování antimikrobiální aktivity byly použity bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Salmonella typhi*. Testování bylo provedeno diluční metodou a získané minimální inhibiční koncentrace byly porovnány s účinkem antibiotika penicilin. V předkládané studii byly nejlépe vyhodnoceny deriváty A07 a A10 s účinkem zejména na *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Derivát A10 inhiboval tyto dva kmeny při MIC 15,6 µg/ml a derivát A07 inhiboval růst *Escherichia coli*

již při koncentraci 7,8 µg/ml. Z výsledků této studie vyplývá, že bylo dosaženo nejlepšího antibakteriálního účinku u derivátů nesoucích chlorové, fluorové a methoxylové substituenty (Singh a kol., 2014).

Ve studii Catalano a kol. (2013) byla syntetizována nová série 2-aminobenzothiazolových derivátů jako potenciální antimikrobiální látky. Byla hodnocena jejich antimikrobiální a antifungální aktivita. Tyto sloučeniny vykazovaly velmi nízkou až žádnou aktivitu proti testovaným bakteriálním kmenům *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Enterococcus faecalis*. Nejnižší hodnoty MIC 128 µg/ml bylo dosaženo u kmene *Enterococcus faecalis* u testovaných derivátů s označením 1b, 1f, 1g a 1i. U ostatních testovaných derivátů v mnoha případech přesahovala hodnota MIC koncentraci 512 µg/ml (Catalano a kol., 2013).

ZÁVĚR

- V této diplomové práci bylo provedeno stanovení antimikrobiálních aktivit 16 nově syntetizovaných bezthiazolových salicylamidových derivátů na 19 vybraných bakteriálních kmenech. Testované bakteriální kmeny zahrnovaly jak grampozitivní, tak gramnegativní bakterie. Hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (MIC) byly stanoveny agarovou mikrodiluční metodou, která byla optimalizována pro méně rozpustné látky. Získané hodnoty MIC pro uvedené deriváty byly porovnány s hodnotami MIC šesti běžně používaných antibiotik, které byly stanoveny za použití stejné metodiky.
- V první fázi byly otestovány 4 bakteriální kmeny – *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Na základě získaných výsledků, kde byla pozorována nejvýraznější antimikrobiální aktivita vůči grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus*, bylo testování doplněno o dalších 12 bakteriálních kmenů *Staphylococcus aureus* včetně kmenů MRSA, dále také o kmen *Staphylococcus epidermidis* a o grampozitivní kmeny *Streptococcus pyogenes* a *Streptococcus agalactiae*. Nově syntetizované deriváty výrazně dokázaly potlačit růst bakterie *Staphylococcus aureus* včetně patogenních kmenů MRSA. Hodnoty MIC u kmenů MRSA začínaly již od koncentrace 2 µg/ml. V porovnání s testovanými antibiotiky se antimikrobiální účinek derivátů významně přibližoval účinkům antibiotik.
- Z výsledků stanovených MIC lze konstatovat, že testované salicylamidové deriváty výrazněji potlačovaly růst grampozitivních bakterií. Nejvíce citlivý kmen k těmto derivátům byl *Streptococcus pyogenes*. Většina testovaných derivátů vykazovala kromě inhibičního, také baktericidní účinek. Z hlediska struktury je patrné, že deriváty na bázi leucinu vykazovaly výraznější antimikrobiální účinek v porovnání s deriváty na bázi glycinu. Nejvíce antimikrobiálně aktivní byly deriváty S3 a S6 obsahující ve své molekule atom chloru.
- Vzhledem k získaným výsledkům v této práci lze určitě doporučit dále pokračovat ve vývoji a výzkumu těchto derivátů. Kromě vývoje nových salicylamidových derivátů v rámci syntetické části výzkumu, bude také nutné stávající výsledky antimikrobiálních testů doplnit o toxikologické studie. Poté bude možné predikovat, zda by tyto látky mohly být potenciálními antimikrobiálními činidly zavedenými do klinické praxe.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Accinelli C., Koskinen W. C., Becker J. M., & Sadowsky M. J. (2007). Environmental Fate of Two Sulfonamide Antimicrobial Agents in Soil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(7), 2677-2682. doi: 10.1021/jf063709j
2. Al-Talib M., Al-Sound Y. A., Abussaud M., & Khshashneh S. (2016). Synthesis and biological evaluation of new benzothiazoles as antimicrobial agents. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(1), 926-930. doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.09.003>
3. Argudín M. A., & Mendoza M. C. (2010). Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1751-1773. doi:10.3390/toxins2071751
4. Avent M. L., Rogers B. A., Cheng A. C., & Paterson D. L. (2011). Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. *Internal Medicine Journal*, 41(6), 441-449. doi: 10.1111/j.1445-5994.2011.02452.x
5. Balouiri M., Sadiki M., & Ibsouda S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
6. Belkum A., & Dunne W. M. (2013). Next-Generation Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2018-2024. doi: 10.1128 / JCM.00313-13
7. BENEŠ, Jiří. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0636-3.
8. Bengtsson-Palme J., & Joakim Larsson D. G. (2016). Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environment International*, 86, 140-149. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015>

9. Biswas, S., Brunel, J., Dubus, J., Reynaud-Gaubert, M., & Rolain, J. (2012). Colistin: An update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(8), 917-34. doi:<http://dx.doi.org/10.1586/eri.12.78>
10. Bitzan M. (2009). Treatment options for HUS secondary to *Escherichia coli* O157:H7. *Kidney International*, 75(112), 62-66. doi: <https://doi.org/10.1038/ki.2008.624>
11. Bondock S., Fadali W., & Metwally M. A. (2010). Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazole, thiophene and pyrazole derivatives containing benzothiazole moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(9), 3692-3701. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.05.018>
12. Bonev B., Hooper J., & Parisot J. (2008). Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1295-1301. doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkn090>
13. Bush K., & Pucci M. J. (2011). New antimicrobial agents on the horizon. *Biochemical Pharmacology*, 82(11), 1528-1539. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.077>
14. Butler, M. S., Hansford, K. A., Blaskovich, M. A. T., Halai, R., & Cooper, M. A. (2014). Glycopeptide antibiotics: Back to the future. *Journal of Antibiotics*, 67(9), 631-644. doi:<http://dx.doi.org/10.1038/ja.2014.111>
15. Catalano A., Carocci A., Defrenza I., Muraglia M., Carrieri A., Bambeke F. V., Rosato A., Corbo F., & Franchini C. (2013). 2-Aminobenzothiazole derivatives: Search for new antifungal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 357-364. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.03.064>
16. Cloete T. E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 277-282. doi: [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00042-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00042-8)

17. Cunha M. L. R. S., Peresi E., Calsolari R. A. O., & Júnior J. P. A. (2006). Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(1), 70-74. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000100013>
18. Daghrir R., & Drogui P. (2013). Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 11(3), 209-227. doi: <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0404-8>
19. Deurenberg R. H., & Stobberingh E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(6), 747-763. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.007>
20. Džidic S., Šuškovac J., & Kos B. (2008). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects, *Food Technology & Biotechnology*, 46(1), 11-21. ISSN 1330-9862
21. El-Gohary N. S., & Shaaban M. I. (2017). Synthesis, antimicrobial, anti-quorum-sensing and antitumor activities of new benzimidazole analogs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 137, 439-449. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.064>
22. Eliopoulos G. M., & Roberts M. C. (2003). Tetracycline Therapy: Update. *Clinical Infectious Diseases*, 36(4), 462-467. doi: <https://doi.org/10.1086/367622>
23. Falagas M. E., Kaiakou S. K., & Saravolatz L. D. (2005). Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 40(9), 1333-1341. doi: <https://doi.org/10.1086/429323>
24. Fisher K., & Phillips C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155, 1749-1757. doi: 10.1099/mic.0.026385-0

25. Gellatly S. L., Hancock R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3), 159-173. doi: <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>
26. Govaerts C., Orwa J., Schepdael A. V., Roets E., & Hoogmartens J. (2002). Characterization of Polypeptide Antibiotics of the Polymyxin Series by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Ion Trap Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Peptide Science*, 7, 45-55. doi: 10.1002/psc.367
27. Hennekinne J. A., Buyser M. L., & Dragacci S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *Federation of European Microbiological Societies*, 36, 815-836. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x
28. Hermann T. (2007). Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1841-1852. doi: 10.1007/s00018-007-7034-x
29. Hollenbeck B. L., & Rice L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Landes Bioscience*, 3(5), 421-433. doi: <https://doi.org/10.4161/viru.21282>
30. Chambers H. F., & DeLeo F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature reviews mikrobiology*. 7, 629-641. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>
31. Chugunova E., Boga C., Sazykin I., Cino S., Micheletti G., Mazzanti A., Sazykina M., Burilov A., Khmelevtsova L., & Kostina N. (2015). Synthesis and antimicrobial activity of novel structural hybrids of benzofuroxan and benzothiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 93, 349-359. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.023>
32. Imramovský A., Pejchal V., Štěpánková Š., Vorčáková K., Jampílek J., Vančo J., Šimůnek P., Královec K., Brůčková L., Mandíková J., & Trejtnar F. (2013). Synthesis

and in vitro evaluation of new derivatives of 2-substituted-6-fluorobenzo[*d*]thiazoles as cholinesterase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal chemistry*, 21(7), 1735-1748. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.052>

33. JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1270-4.
34. Kannan K., & Mankin A. S. (2011). Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action. *The New York Academy of Sciences*. 1241, 33-47. ISSN 0077-8923
35. Kaper J. B., Nataro J. P., & Mobley H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 123-140. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
36. Kipnis E., Sawa T., & Wiener-Kronish J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 36(2), 78-91. doi: <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.10.007>
37. KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-7262-341-9.
38. Köck R., Becker K., Cookson B., Gemert-Pijnen J. E., Harbarth S., Kluytmans J., Mielke M., Peters G., Skov R. L., Struelens M. J., Tacconelli J., Torne A., Witte W., & Friedrich A. W. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Eurosurveillance*, 15(41). doi: 10.25646/662
39. Kong K. F., Schnepfer L., & Mathee K. (2009). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 118, 1-36. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x
40. Kovárníková, M. Zjišťování antimikrobiální a antifungální aktivity vybraných 1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl) alkylaminů. Pardubice. 2015. Diplomová práce. Univerzita

Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.

41. Kumar A., & Schweizer H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1486-1513. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.004>
42. Kumbhare R. M., Dadmal T. L., Pamanji R., Kosurkar U. B., Velatooru L. R., Appalanaidu K., Rao Y. K., & Rao J. V. (2014). Synthesis of novel fluoro 1,2,3-triazole tagged amino bis (benzothiazole) derivatives, their antimicrobial and anticancer activity. *Medicinal Chemistry Research*, 23(10), 4404-4413. doi: <https://doi.org/10.1007/s00044-014-1006-0>
43. Leclercq R. (2002). Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clinical Infectious Diseases*, 34(4), 482-492. doi: <https://doi.org/10.1086/324626>
44. Lin J., Nishino K., Roberts M. C., Tolmasky M., Aminov R. I., & Zhang L. (2015). Mechanisms of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 6(34). doi: [10.3389/fmicb.2015.00034](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00034)
45. Lingzhi L., Ge H., Gu D., Meng H., Li Y., Jia M., Zheng Ch., & Zhou X. (2018). The role of two-component regulatory system in β -lactam antibiotics resistance. *Microbiological Research*, 215, 126-129. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.07.005>
46. Liu D. (2017). Laboratory models for foodborne infections. *Food microbiology*. ISBN 1498721672.
47. Loir Y. L., Baron F., & Gautier M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2(1), 7-28. doi: <https://prodinra.inra.fr/record/276956>

48. Lowy F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1265-1273. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI18535>.
49. Madhuri M., Gaurav K., & Anil K. (2014). Comparative study of heterocyclics in the treatment of diabetes. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 796-811. ISSN 2278 – 4357
50. Maddila S., Gorle S., Seshadri N., Lavanya P., & Jonnalagadda S. B. (2016). Synthesis, antibacterial and antifungal activity of novel benzothiazole pyrimidine derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(5), 681-687. doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.003>
51. Malachowa N., & DeLeo F. R. (2010). Mobile genetics elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(18), 3057-3071. doi: <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0389-4>
52. Mariappan G., Prabhat P., Sutharson L., Banerjee J., Patangia U., & Nath S. (2012). Synthesis and Antidiabetic Evaluation of Benzothiazole Derivatives. *Journal of the Korean Chemical Society*, 56(2), 251-256. doi: <https://doi.org/10.5012/JKCS.2012.56.2.251>
53. McEachran A. D., Blackwell B. R., Delton Hanson J., Wooten K. J., Mayer G. D., Cox S. B., & Smith P. N. (2015). Antibiotics, Bacteria, and Antibiotic Resistance Genes: Aerial Transport from Cattle Feed Yards via Particulate Matter. *Environmental Health Perspectives*, 123(4), 337-343. doi: 10.1289/ehp.1408555
54. Moellering R. C. (2011). Discovering new antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(1), 2-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.08.018>
55. Nordmann P., Naas T., & Poirel L. (2011). Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging infectious diseases*, 17(10), 1791-1798. doi: 10.3201/eid1710.110655

56. Oh K H., Kim S. B., Park M. S., & Cho S. H. (2014). Development of a One-Step PCR Assay with Nine Primer Pairs for the Detection of Five Diarrheogenic *Escherichia coli* Types. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 862-868. doi: <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1312.12031>
57. Ochoa T. J., & Contreras C. A. (2011). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. *Current opinion in infectious diseases*, 24(5), 478–483. doi: 10.1097/QCO.0b013e32834a8b8b
58. Omoe K., Hu D. L., Omoe H. T., Nakane A., & Shinagawa K. (2005). Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *Federation of European Microbiological Societies*, 246, 191-198. doi: 10.1016/j.femsle.2005.04.007
59. OMURA, Satoshi. *Macrolide antibiotics: Chemistry, Biology, and Practice*. USA: Elsevier Science. 2002. ISBN 0-12-526451-8
60. Pejchal V., Štěpánková Š., Pejchalová M., Královec K., Havelek R., Růžičková Z., Ajani H., Lo R., & Lepšík M. (2016). Synthesis, structural characterization, docking, lipophilicity and cytotoxicity of 1-[(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]-3-alkyl carbamates, novel acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase pseudo-irreversible inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(7), 1560-1572. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.02.033>
61. Pinchuk I. V., Beswick E. J., & Reyes V. E. (2010). Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins*, 2, 2177-2197. doi: 10.3390/toxins2082177
62. Poole K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 55-64. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.8.x>
63. Prabhu P. P., Shastry C. S., Pande S. S., & Selvam T. P. (2011). Design, synthesis, characterization and biological evaluation of Benzothiazole-6-carboxylate derivatives. *Research in Pharmacy*, 1(2), 6-12. ISSN: 2231-539X

64. Rall V. L. M., Vieira F. P., Rall R., Vieitis R. L., Fernandes A., Candeias J. M. G., Cardoso K. F. G., & Araújo J. P. (2008). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Veterinary microbiology*, 132(3-4), 408-413. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.05.011>
65. Reller L. B., Weinstein M., Jorgensen J. H., & Ferraro M. J. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749-1755. doi: <https://doi.org/10.1086/647952>
66. REMEŠOVÁ, P. Zjišťování antimikrobiální a antifungální aktivity vybraných dusíkatých derivátů 1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl) alkylaminů. Pardubice. 2014. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.
67. Ritter T. K., & Wong Ch. H. (2001). Carbohydrate-Based Antibiotics: A New Approach to Tackling the Problem of Resistance. *A Journal of the German Chemical Society*, 40(19), 3508-3533. doi: [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20011001\)40:19<3508::AID-ANIE3508>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20011001)40:19<3508::AID-ANIE3508>3.0.CO;2-I)
68. Rupp M. E., & Fey P. D. (2003). Enterobacteriaceae producing extended spectral beta-lactamase (ESBL). *Drugs*, 63(4), 353-365. doi: <https://doi.org/10.2165/00003495-200363040-00002>
69. Sierig G., Cywes C., Wessels M. R., & Ashbaugh C. D. (2003). Cytotoxic Effects of Streptolysin O and Streptolysin S Enhance the Virulence of Poorly Encapsulated Group A Streptococci. *Infection and Immunity*, 71(1), 446-455. doi: [10.1128/IAI.71.1.446-455.2003](https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.446-455.2003)
70. Singh M., Singh S. K., Gangwar M., & Nath G. (2014). Design, synthesis and mode of action of some benzothiazole derivatives bearing an amide moiety as antibacterial agents. *Royal Society of Chemistry*, 4, 19013-19023. doi: [10.1039/C4RA02649G](https://doi.org/10.1039/C4RA02649G)

71. Singh M., Kumar-Singh S., Gangwar M., Sellamuthu S., & Nath G. (2016). Design, Synthesis and Mode of Action of Some New 2-(4'-aminophenyl) benzothiazole Derivatives as Potent Antimicrobial Agents. *Letters in Drug Design & Discovery*, 13(5), 429-437. doi: 10.2174/1570180812666150821003220
72. Spížek J., & Řezanka T. (2004). Lincomycin, clindamycin and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(4), 455-464. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1545-7>
73. Strateva T., & Yordanov D. (2009). Pseudomonas aeruginosa – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 1133-1148. doi: 10.1099/jmm.0.009142-0
74. Soni B., Ranawat M. S., Sharma R., Bhandari A., & Sharma S. (2010). Synthesis and evaluation of some new benzothiazole derivatives as potential antimicrobial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(7), 2938-2942. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.03.019>
75. Tacconelli E., & Cataldo M. A. (2008). Vankomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(2), 99-106. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.08.026>
76. Tenailon O., Skurnik D., Picard B., & Denamur E. (2010). The population genetics of commensal Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 207-217. doi:10.1038/nrmicro2298
77. Tenover F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, 34(5), 3-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.219>
78. Thaker M., Spanogiannopoulos P., & Wright G. D. (2010). The tetracycline resistome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(3), 419-431. doi: <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0172-6>

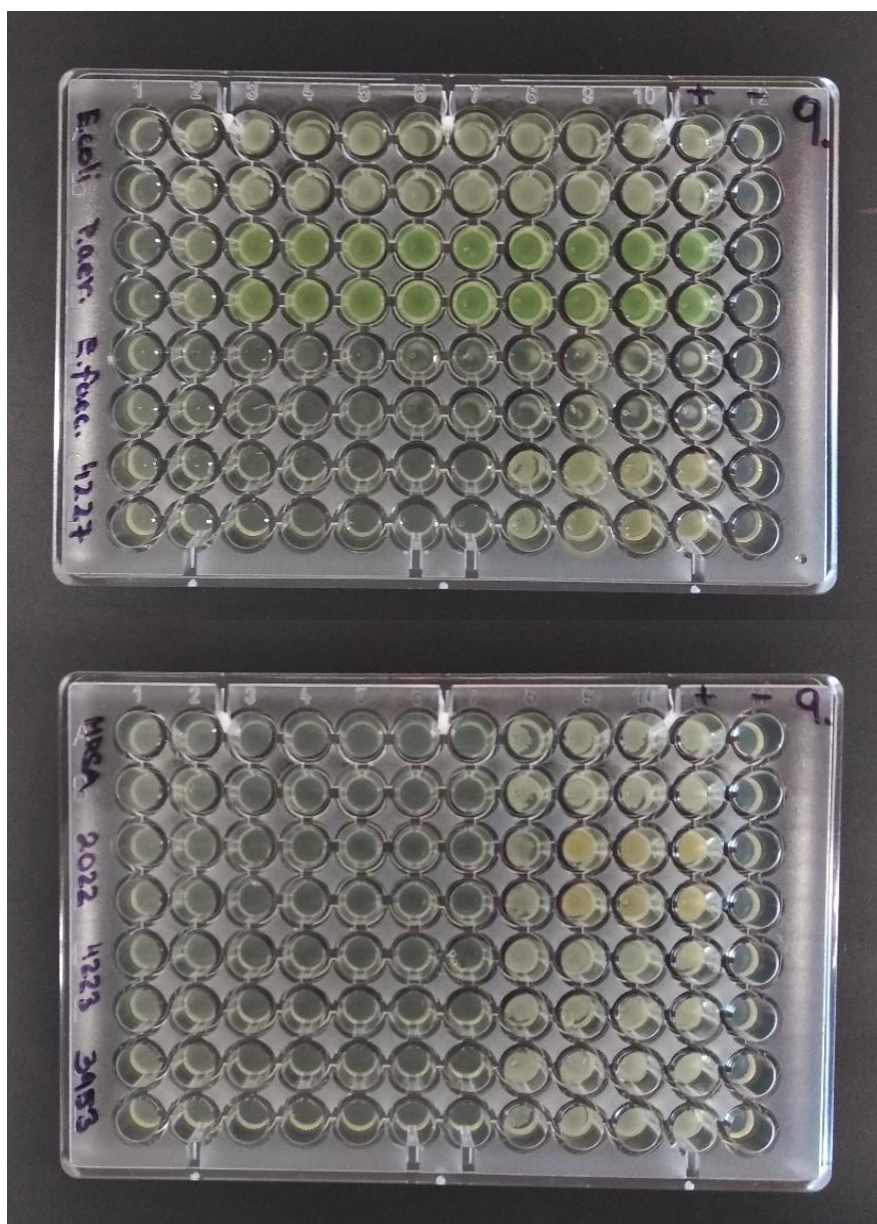
79. Todd P. A., & Benfield P. (1990). Amoxicillin/Clavulanic Acid An Update of its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use. *Drugs*, 39(2), 264-307. doi: <https://doi.org/10.2165/00003495-199039020-00008>
80. Tolika P., Samanidou F., & Papadoyannis N. (2010). An Overview of Chromathographic Analysis of Sulfonamides in Pharmaceutical Preparations and Biological Fluids. *Current Pharmaceutical Analysis*, 6(3), 198-212. doi: <https://doi.org/10.2174/157341210791936803>
81. Velkov, T., Roberts, K. D., Nation, R. L., Thompson, P. E., & Li, J. (2013). Pharmacology of polymyxins: New insights into an 'old' class of antibiotics, *Future Microbiology*, 8(6), 711-24. doi:<http://dx.doi.org/10.2217/fmb.13.39>
82. Vernozy-Rozand C., Mazuy-Cruchaudet C., Bavai C., & Richard Y. (2004). Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 490-494. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01602.x>
83. VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: NEPTUN, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.
84. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: NEPTUN, 2005. ISBN 80-86850-00-5.
85. VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: NEPTUN, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
86. Wang M., Gao M., Mock B. H., Miller K. D., Sledge G. W., Hutchins G. D., & Zheng Q. H. (2006). Synthesis of carbon-11 labeled fluorinated 2-arylbenzothiazoles as novel potential PET cancer imaging agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(24), 8599-8607. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.08.026>

87. Webber M. A., & Piddock L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9-11. doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>
88. Wiegand I., Hilpert K., & Hancock R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-75. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
89. Woodford N., & Ellington M. J. (2007). The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(1), 5-18. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01492.x>
90. Wright G. D. (2003). Mechanisms of resistance to antibiotics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(5), 563-569. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.004>
91. Yadav P. S., Devprakash, & Senthilkumar G. P. (2011). Benzothiazole: Different Methods of Synthesis and Diverse Biological Activities. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 3(1), 01-07. ISSN 0975-248X
92. Yang Ch., Huang Ch., Cheng T., & Lai H. (2015). Inhibitory effect of salinity on the photocatalytic degradation of three sulfonamide antibiotics. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 102, 116-125. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.01.015>
93. ZHOU, & Xuedong a Yuqing LI. *Atlas of oral microbiology: from healthy microflora to disease*. Hangzhou, China: Zhejiang University Press, 2015. ISBN 0128022345.
94. Zouharova M., & Rysanek D. (2008). Multiplex PCR and RPLA Identification of Staphylococcus aureus Enterotoxigenic Strains From Bulk Tank Milk. *Zoonoses and Public Health*, 55, 313-319. doi: [10.1111/j.1863-2378.2008.01134.x](https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01134.x)

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Agarová mikrodiluční metoda - derivát S9	111
Příloha 2 Vyočkování na Mueller-Hinton agar - stanovení MBC derivátu S6.....	112

Příloha 1 Agarová mikrodiluční metoda - derivát S9



Příloha 2 Vyočkování na Mueller-Hinton agar - stanovení MBC derivátu S6

