

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Zjišťování antimikrobiální aktivity vybraných komplexů  
přechodných kovů

Bc. Olga Smolíková

Diplomová práce

2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Olga Smolíková**  
Osobní číslo: **C17454**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Zjišťování antimikrobiální aktivity vybraných komplexů přechodných kovů**  
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 :

- 1) Zpracujte literární rešerši věnující se biologické aktivitě komplexů přechodných kovů.
- 2) Popište metody zjišťování antimikrobiálních aktivit chemických sloučenin
- 3) Mikrodiluční agarovou metodou otestujte antimikrobiální aktivitu skupiny těchto komplexů. Jako modelové organismy použijte sbírkové kultury gram pozitivních a gram negativních bakterií.
- 4) U sloučeniny s nejlepšími antimikrobiálními účinky porovnejte dosažené hodnoty minimálních inhibičních koncentrací s účinky běžně používaných antibiotik.
- 5) Zjištěné účinky kriticky zhodnoťte v diskusi.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:


Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **prof. Ing. Jaromír Vinklárek, Dr.**  
Katedra obecné a anorganické chemie

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 7. 5. 2019

.....  
Bc. Olga Smolíková

#### Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat paní doc. Ing. Marcele Pejchalové, Ph.D. za cenné rady, vstřícnost, trpělivost, věnovaný čas a odborné vedení v průběhu experimentů i při zpracování diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat prof. Ing. Jaromíru Vinklárkovi, Dr. za poskytnuté rady a ochotu při konzultacích. Poděkování patří také Bc. Ingrid Galgaňákové a Bc. Haně Odehnalové za poskytnuté materiály. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Katedry obecné a anorganické chemie za poskytnuté látky.

Zároveň bych také ráda poděkovala celé mé rodině za trpělivost a podporu, která mi byla poskytována v průběhu celého studia.

## **ANOTACE**

Diplomová práce je věnována studiu antimikrobiální aktivity sedmnácti vybraných komplexů přechodných kovů. Testování byly podrobeny grampozitivní i gramnegativní bakterie. Teoretická část se zabývá možnými variantami testování antimikrobiální aktivity a dále je zaměřena na potenciální využití daných komplexů přechodných kovů v medicíně. Praktická část je zaměřena na studium účinků komplexů přechodných kovů na vybrané bakteriální kmeny prostřednictvím mikrodiluční agarové metody.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

antimikrobiální účinky, minimální inhibiční koncentrace, komplexy přechodných kovů, mikrodiluční agarová metoda

## **TITLE**

Determination of antimicrobial activity of selected transition metal complexes

## **ANOTATION**

The thesis deals with the study of antimicrobial activity of seventeen selected transition metal complexes. Grampositive and gramnegative bacteria were subjected to the testing. The theoretical part deals with possible variants of testing of antimicrobial activity and it is also focused on the potential use of given transition metal complexes in medicine. The practical part is aimed at studying the effects of transition metal complexes on selected bacterial strains through microdilution agar method.

## **KEY WORDS**

antimicrobial effects, minimal inhibiting concentration, transition metal complexes, microdilution agar method

# OBSAH

ÚVOD .....	11
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Antimikrobiální citlivost .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Účinek antimikrobiálních látek.....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Mechanismus účinku antimikrobiálních látek .....	13
<b>1.3 Antimikrobiální rezistence.....</b>	<b>13</b>
1.3.1 Genetická podstata vzniku rezistence .....	15
1.3.2 Mechanismy rezistence .....	16
<b>1.4 Metody testování.....</b>	<b>19</b>
1.4.1 Bujónové diluční testy .....	20
1.4.2 Gradientová difúzní metoda.....	20
1.4.3 Disková difúzní metoda .....	22
1.4.4 Mikrodiluční metoda.....	23
<b>1.5 Laboratorní interpretace výsledku vyšetření citlivosti .....</b>	<b>25</b>
<b>1.6 Testované kmeny bakterií.....</b>	<b>25</b>
1.6.1 Rod <i>Staphylococcus</i> .....	25
1.6.2 Rod <i>Escherichia</i> .....	26
1.6.3 Rod <i>Enterococcus</i> .....	29
1.6.4 Rod <i>Pseudomonas</i> .....	30
1.6.5 Rod <i>Listeria</i> .....	30
1.6.6 Rod <i>Bacillus</i> .....	31
1.6.7 Rod <i>Salmonella</i> .....	32
1.6.8 Rod <i>Candida</i> .....	32
<b>1.7 Potenciál komplexů přechodných kovů v medicíně.....</b>	<b>33</b>
1.7.1 <i>Cis</i> -platina.....	35
1.7.2 Molybden .....	36

1.7.3	Vanad .....	38
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>39</b>
2.1	Testované mikroorganismy .....	39
2.2	Laboratorní pomůcky .....	40
2.2.1	Sterilní jednorázové plastové pomůcky .....	40
2.2.2	Skleněné a ostatní pomůcky .....	40
2.3	Přístroje a zařízení laboratoře.....	40
2.4	Chemikálie.....	41
2.5	Kultivační média a pracovní roztoky.....	41
2.6	Testované komplexy přechodných kovů.....	42
2.7	Příprava mikrobiální suspenze.....	45
2.8	Mikrodiluční agarová metoda .....	45
2.9	Negativní barvení bakterií .....	46
<b>3</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>47</b>
3.1	Stanovení antimikrobiální aktivity mikrodiluční agarovou metodou .....	48
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>65</b>
	<b>ZDROJE OBRÁZKŮ.....</b>	<b>73</b>



# SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1</b> Časová křivka citlivosti, tolerance a perzistence .....	17
<b>Obrázek 2</b> E-test, gradientová difúzní metoda .....	21
<b>Obrázek 3</b> Schematické zobrazení inhibiční zóny E-testu .....	21
<b>Obrázek 4</b> Disková difúzní metoda .....	22
<b>Obrázek 5</b> Mikrodiluční agarová metoda .....	24
<b>Obrázek 6</b> Strukturní vzorec <i>cis</i> -platiny .....	35
<b>Obrázek 7</b> Kofaktor molybdenu (Moco).....	37
<b>Obrázek 8</b> Kontrolní preparát, obsahující bakterie v M-H agaru .....	57
<b>Obrázek 9</b> Vliv látky VONS5 na <i>E. coli</i> CCM 4517 .....	57
<b>Obrázek 10</b> Vliv látky VONS5 na <i>E. coli</i> CCM 3954 .....	57
<b>Obrázek 11</b> Vliv látky VONS5 na <i>E. coli</i> CCM 2024 .....	58
<b>Obrázek 12</b> Vliv látky MoS3 na <i>E. coli</i> CCM 4517 .....	58
<b>Obrázek 13</b> Vliv látky MoS3 na <i>E. coli</i> CCM 2024 .....	59
<b>Obrázek 14</b> Vliv látky MoS3 na <i>E. coli</i> CCM 3954 .....	59
<b>Obrázek 15</b> Vliv látky MoS4 na <i>E. coli</i> CCM 4517 .....	60
<b>Obrázek 16</b> Vliv látky MoS4 na <i>E. coli</i> CCM 3954 .....	60
<b>Obrázek 17</b> Vliv látky MoS4 na <i>E. coli</i> CCM 2024 .....	60
<b>Schéma 1</b> Koncentrační řada .....	45
<b>Schéma 2</b> Příprava mikrotitrační destičky .....	46
<b>Tabulka 1</b> Testované sloučeniny.....	43
<b>Tabulka 2</b> MIC látek označených NaS, MnO <sub>6</sub> .....	46
<b>Tabulka 3</b> MIC látek označených VONS1, VONS2 a VO (acac) <sub>2</sub> .....	49
<b>Tabulka 4</b> MIC látek označených VONS3 a VONS4 .....	50
<b>Tabulka 5</b> MIC látek označených MoS2 a MoS5 .....	51
<b>Tabulka 6</b> MIC vanadyl sulfátu.....	52
<b>Tabulka 7</b> MIC sloučenin Co-DETA a Zn-DETA .....	53
<b>Tabulka 8</b> MIC sloučenin Cu-DETA a Mn-TETA .....	54
<b>Tabulka 9</b> MIC sloučenin MoS3, MoS4 a VONS5 .....	55
<b>Tabulka 10</b> Hodnoty MIC ampicilinu, erytromycinu a penicilinu .....	61
<b>Tabulka 11</b> Hodnoty MIC amoxicilinu, tetracyclinu a clindamycinu.....	62

## SEZNAM ZKRATEK

BFP	svazky formující pili
CFU	jednotky tvořící kolonie
CLSI	Institut pro klinické a laboratorní standardy
EHEC	enterohemoragické <i>Escheria coli</i>
EIEC	enteroinvazivní <i>Escheria coli</i>
EPEC	enteropatogenní <i>Escheria coli</i>
ESBL	širokospektré $\beta$ -laktamázy
ETEC	enterotoxinogenní <i>Escheria coli</i>
EUCAST	Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti
HUS	hemolyticko-uremický syndrom
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MDR	mnohočetná rezistence
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicillin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NTS	netyfoidní salmonela
STEC	Shiga-like toxigenní <i>Escheria coli</i>
VT	verotoxin

## ÚVOD

Antimikrobiální rezistence je v současnosti často diskutovaným tématem, neboť neustále dochází k jejímu nárůstu. Mezi hlavní důvody výskytu rezistence lze zařadit nadměrné užívání antibiotik a jejich zneužívání v humánní i veterinární medicíně. Za velmi nebezpečné je také považována aplikace antibiotik ve velkochovech jako prevence před vznikem infekce nebo se v některých případech přidávají do zvířecích krmiv. Tímto způsobem se dostávají antimikrobiální látky do přírody, kde se mohou poprvé setkat s danými mikroorganismy. Mikroorganismy si tak postupně různými mechanismy budují určitý stupeň rezistence.

U mikroorganismů se objevují různé mechanismy, kterými se snaží snížit účinek antimikrobiálních látek, čímž se z nich stává jedna z nejvýznamnějších globálních hrozeb pro lidské zdraví. Proto je kladen velký důraz na vývoj nových antimikrobiálních látek, které by se staly účinnými i proti rezistentním mikroorganismům. V posledních letech se v rámci výzkumu dostávají do popředí sloučeniny kovů vzhledem k jejich unikátním chemickým a farmakologickým vlastnostem. Komplexy kovů začínají nahrazovat určité organické sloučeniny v oblasti terapie různých infekcí i u diagnostických metod. Sloučeniny kovů jsou proto podrobovány neustálým výzkumem vzhledem k jejich různým mechanismům působení a také proto, že jejich účinky nejsou prozatím příliš detailně popsány.

Diplomová práce je zaměřena na studium antimikrobiální aktivity vybraných komplexů přechodných kovů. Byly zvoleny sloučeniny přechodných kovů – vanadu, molybdenu, mědi, zinku, kobaltu a manganu. V rámci testování antimikrobiální aktivity byly mikrodiluční agarovou metodou stanoveny hodnoty minimální inhibiční koncentrace daných látek. Získané hodnoty byly vzápětí porovnávány s hodnotami minimální inhibiční koncentrace běžně používaných antibiotik.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Antimikrobiální citlivost

Testování antimikrobiální citlivosti u významných bakteriálních izolátů má v současné době v klinické mikrobiologické laboratoři velmi důležitou roli. Cílem takového testování je potvrzení citlivosti u vybraných empirických antimikrobiálních látek nebo detekce možné rezistence vůči určitým lékům, resp. látkám u běžných patogenů. Testy antimikrobiální citlivosti jednotlivých izolátů jsou obzvláště důležité u druhů, u kterých se mohou objevit získané mechanismy rezistence. (Jorgensen, Ferraro, 2009) Testování citlivosti je indikováno u jakéhokoliv mikroorganismu, který se podílí na vzniku infekčního procesu a je proto nutno k léčbě zahájení antimikrobiální terapie. Testy citlivosti jsou důležité v oblasti epidemiologie z důvodu rezistence a také mají velký význam ve výzkumu nových antimikrobiálních látek. (CLSI, 2012)

Vývoj a zdokonalování přesných a efektivních metod pro testování antimikrobiální citlivosti jsou podstatné pro lidské zdraví. Informace o antimikrobiální citlivosti u daných patogenů mohou výrazně snížit morbiditu a mortalitu, náklady na léčbu a dobu hospitalizace pacientů. (Ataee et al., 2012) Aby mohly být antimikrobiální látky použity jako léčiva, musí zabíjet nebo alespoň inhibovat mikroorganismy v dávkách, které ještě nepoškozují makroorganismus. Antimikrobiální léčiva musí být selektivně toxická pro mikroorganismy. (Votava, 2005)

## 1.2 Účinek antimikrobiálních látek

Pojmem antimikrobiální látky jsou označována léčiva využívaná k profylaxi a k terapii infekčních onemocnění. V praxi se rozlišují látky s účinkem mikrobicidním a mikrobistatickým. Rozdíl mezi látkami s těmito účinky závisí na druhu látky a její koncentraci a na druhu mikroorganismu. O účinnosti antimikrobiálních látek podávají informaci dvě laboratorní hodnoty – minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC). (Votava, 2005)

Minimální inhibiční koncentrace je nejnižší koncentrace dané látky, která zabraňuje růstu příslušného mikroorganismu. V případě minimální baktericidní koncentrace se jedná o nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která v průběhu 24 hodin usmrtí 99,9 % původní populace bakterií. Pro baktericidní látky je typické, že hodnoty MBC jsou několikrát vyšší než hodnoty MIC. Ovšem některé bakteriostatické

látky mohou mikroorganismy zabít až v koncentracích mnohonásobně vyšších než MIC. (Votava, 2005)

Baktericidní látky usmrcují mikrobiální buňku, působí ireverzibilně a rychleji. Jejich klinický účinek se dostavuje do 48 hodin. Používají se při léčbě závažných klinických stavů a při snížené obranyschopnosti nemocného. Bakteriostatické látky pouze reverzibilně zastavují růst a množení mikroorganismů. Klinický efekt je možné pozorovat do 3–4 dnů. Po jejich vysazení se mikroorganismy mohou opět začít množit, neboť jejich likvidace je závislá na nástrojích odolnosti hostitele. (Votava, 2005)

### **1.2.1 Mechanismus účinku antimikrobiálních látek**

Antimikrobiální látky jsou běžně používány při léčbě bakteriálních, kvasinkových a parazitárních infekcí. Většinu takových látek je možné rozdělit do několika skupin na základě jejich mechanismu působení. Hlavními cíli antibakteriálního účinku jsou: syntéza buněčné stěny a syntéza proteinů a nukleových kyselin, funkce buněčné membrány a antimetabolity působící na základě kompetitivní inhibice. (Ali et al., 2018)

Omezený počet zásahových míst je příčinou snadného vzniku rezistence u původně přirozeně citlivých buněk. Následkem jsou omezené možnosti vývoje nových antibiotik. (Bednář et al., 1996)

## **1.3 Antimikrobiální rezistence**

Během celé historie dochází k neustálému střetu mezi lidmi a mikroorganismy vyvolávající různé infekce. Nejvýznamnější pokroky ve vývoji antibakteriálních látek byly učiněny v průběhu 20. století. V případě bakteriálních infekcí byl zaznamenán úspěch na počátku čtyřicátých let 20. století, kdy se objevil penicilin. (Tenover, 2006) Penicilin byl objeven vzhledem ke svým účinkům na *Staphylococcus aureus*. Ovšem již krátce po jeho objevení se začaly vyskytovat kmeny rezistentní k penicilinu, které získaly rezistenci přenosem plasmidů se schopností tvorby penicilinasy. V současné době již na více než 90 % kmenů tohoto druhu penicilin neúčinkuje. (Julák, 2006)

Nicméně, se vzrůstajícím vývojem antibakteriálních látek jsou u bakterií zaznamenávány různé formy rezistence vůči daným látkám. Se zvyšujícím se používáním antimikrobiálních látek se rovněž zvyšuje úroveň a komplexita mechanismů rezistence bakteriálních patogenů. (Tenover, 2006) Rezistence vůči antimikrobiálním látkám je často považována za vlastnost získanou citlivými mikroorganismy, jejíž podstatou je

horizontální přenos nových genů nebo výskyt spontánních mutací genů uvnitř chromozomů. (Cox, Wright, 2013)

Rezistence je spojována s vysokou pravděpodobností neúspěchu provedené terapie, zatímco citlivost je spojena s větší pravděpodobností terapeutického úspěchu. U izolátů se střední citlivostí je terapeutický účinek nejistý. (Wiegand, Hilpert, Hancock, 2008) Zneužívání antibiotik přispívá k nárůstu výskytu rezistentních genotypů. (Jeukens et al., 2019) Rezistence vůči antimikrobiálním látkám způsobuje na celém světě každý rok úmrtí přibližně 70 000 lidí. Experti předpokládají, že se toto číslo bude i během následujících let neustále zvyšovat, dokud nedojde k objevu účinnějších látek a následně i ke snížení dané rezistence. (Sobotta et al., 2018)

U některých bakterií se lze setkat s vrozenou rezistencí vůči určitým antimikrobiálním látkám. (Tenover, 2006) Jedná se o znak vyskytující se v rámci genomu bakteriálního druhu. Je nezávislý vůči antibiotickému selekčnímu tlaku a horizontálnímu přenosu genů. Typickým příkladem vrozené rezistence je multirezistentní genotyp gramnegativních bakterií, které nejsou citlivé vůči mnoha klinicky účinným antibiotikům užívaným proti grampozitivním bakteriím. Molekulární podstata této rezistence spočívá v přítomnosti gramnegativní vnější membrány, která je pro mnoho molekul nepropustná. (Cow, Wright, 2013)

Podstatnější je ovšem studium rezistence získané. V takových případech se původně vnímavé populace bakterií stávají odolnými na dané látky a pod vlivem takového činidla dochází k jejich rozmnožení. Pokud jsou pacientům podávány dlouhodobě antibiotika, jako jsou vankomycin nebo linezolid, může to vést k rozvoji nízkého stupně rezistence mikroorganismů k daným látkám. Jelikož jsou hodnoty stupně rezistence tak nízké, nemusí být vždy detekovatelné rutinními citlivostními metodami testování dostupnými v nemocničních laboratořích. (Tenover, 2006)

K rezistenci bakterií přispívají změny životního prostředí, jako je záření nebo změny pH. Je ovšem důležité zohlednit vnitřní rezistenci, která se u bakterií může přirozeně vyskytnout. Vnitřní rezistence využívá enzymů likvidující léčiva nebo zabraňující intracelulární vazbě látky v cílovém organismu. (Ali et al., 2018)

Získání rezistence a určitých vlastností virulence může poskytnout jistý přínos k přežití mikroorganismů. Tato situace může vést k ekologickým změnám, a především k dominanci virulentních rezistentních bakterií. (Derakhshan et al., 2018)

Vzniklé rezistentní kmeny jsou schopny přežít v přítomnosti antimikrobiální látky a vlivem selekčního tlaku dané látky brzy přerůstají vnímavou populaci. V prostředí nemocnice se rezistentní kmeny rozšiřují i mezi ostatní pacienty. (Votava, 2005)

### 1.3.1 Genetická podstata vzniku rezistence

U běžně citlivých populací bakterií dochází k rezistenci vůči antimikrobiálním látkám skrze mutaci a selekci, nebo genetickou informaci kódující rezistenci přenosem z jiné bakterie. Poslední zmiňovaná situace nastává prostřednictvím jednoho z několika genetických mechanismů, zahrnující transformaci, konjugaci nebo transdukcii. Vlivem těchto genetických mechanismů se bakterie stávají rezistentní vůči několika třídám antimikrobiálních látek. Takové případy bakterií s mnohočetnou rezistencí představují závažný problém v nemocnicích a ostatních zdravotnických zařízeních, kde se lze s jejich výskytem nejčastěji setkat. (Tenover, 2006)

Genetickým podkladem vzniku rezistence je mutace nebo přenos genu pro rezistenci prostřednictvím plasmidu nebo transpozonu. Rezistenci může bakteriální kmen získat i přenosem pomocí plasmidu, obsahujícího gen kódující např. beta-laktamasu. Lze se setkat i s tzv. promiskuitními plasmidy schopnými překonávat mezidruhovou bariéru a přenášet rezistenci například z *E. coli* na ostatní enterokoky, gonokoky nebo hemofily. (Votava, 2005)

Spontánní mutace mohou vznikat několika způsoby. Jedná se o změnu cílového proteinu, ke kterému se modifikací nebo eliminací vazebného místa váže antimikrobiální činidlo (např. změna proteinu vázající penicilin u pneumokoků vede k rezistenci na penicilin). Dalším způsobem je zvýšení produkce enzymů inaktivujících danou látku (např. ribozomální methyláza u stafylokoků). K dalším možnostem vzniku mutace patří změna vnějšího membránového proteinového kanálu, u kterého je vyžadován vstup účinné látky do buňky (např. *OmpF* u *E. coli*) a pumpy ovlivňující vylučování látky z buňky (např. vylučování fluorochinolonů u *Staphylococcus aureus*). (Tenover, 2006)

Získaná rezistence, která se vyvine na základě chromozomální mutace nebo selekce, bývá označovaná termínem vertikální evoluce. Termín horizontální evoluce je používán při přenosu genetického materiálu z jiného rezistentního mikroorganismu. (Tenover, 2006) Jsou popisovány tři typy horizontálního genového přenosu: gen kódující rezistenci bývá asociován s mobilními genetickými elementy (mobilní introny), ztráta syntézy místa inserce u hostitele a získání genu kódující rezistenci prostřednictvím genetického přenosu. (Ali et al., 2018)

V rámci mechanismů výměny genetického materiálu usnadňují transpozony přenos a inkorporaci získaných genů kódující rezistenci do genomu nebo plasmidu hostitele. (Tenover, 2006) Transpozony jsou schopné se integrovat do chromozomů i plasmidů. (Votava, 2005) Integrony, typ transpononu, mohou být přeneseny na jiné bakterie, což umožňuje vývoj bakterií v důsledku získání nových genů. (Ali et al., 2018)

Mutace společně s mechanismy přenosu genetické informace umožňují mnoha bakteriálním druhům se rychle adaptovat na zavedení antimikrobiální látky do jejich prostředí. I jediná mutace v klíčovém bakteriálním genu může mírně snížit citlivost hostitelské bakterie k dané látce. Tato změna nezpůsobí větší problémy pro přežití organismu, dokud nevznikne další mutace vedoucí k úplné rezistenci vůči antimikrobiálním látkám. (Tenover, 2006) V případě rezistence na streptomycin je dostačující pouze jediná změna ribosomálního proteinu, zatímco ke změně tzv. penicilinvázajících proteinů u pneumokoků rezistentních na penicilin je nutné několik mutací. (Votava, 2005)

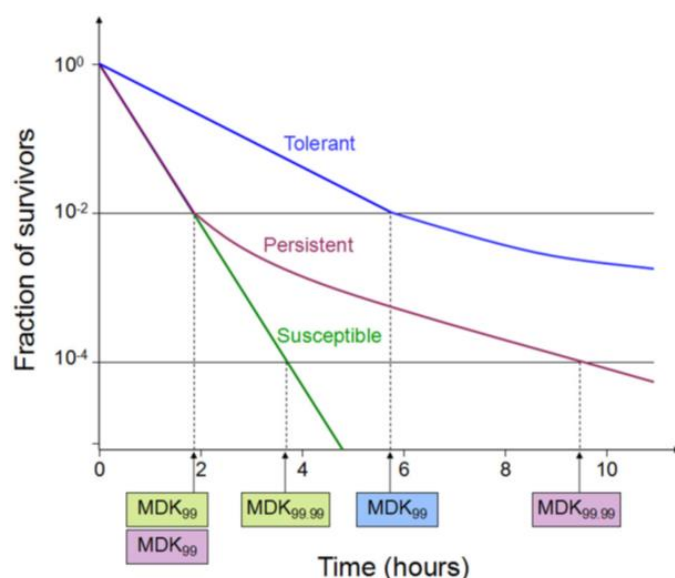
### 1.3.2 Mechanismy rezistence

Bakterie mohou projevovat rezistenci prostřednictvím mnoha mechanismů. Několik mechanismů antimikrobiální rezistence je rozptýleno mezi různými bakteriálními druhy. Jeden z mechanismů spočívá v tom, že organismus může získat geny, jako jsou  $\beta$ -laktamázy, které zničí antimikrobiální látku dříve, než začne vykazovat jistý účinek. Dále mohou mít bakterie efluxní pumpy, které vytlačují antimikrobiální činidlo z buňky, aniž by dosáhlo svého cíle a mohlo tak účinkovat. U bakterií se také mohou vyskytovat geny ovlivňující metabolické dráhy, jenž následně produkují pozměněné bakteriální buněčné stěny bez vazebného místa pro danou antimikrobiální látku. V některých případech se objevují i mutace, které omezují přístup antimikrobiálních látek k intracelulárnímu cílovému místu prostřednictvím „downregulace“ porinových genů. (Tenover, 2006)

U většiny grampozitivních bakterií lze najít protein *divIVA*, který se podílí na buněčném dělení, biosyntéze peptidoglykanu a sporulaci. V souvislosti s proteinem *divIVA* byla objevena určitá funkce i v případě patobiologie, virulence, rezistence vůči antibiotikům. Mohl by také tvořit potenciální cíl proti rezistentním kmenům *Enterococcus faecalis* a *Listeria monocytogenes*. (Sharma, Khan, 2018)



V některých případech se lze setkat s tzv. perzistencí, která se vyskytuje u bakteriální populace (klasicky < 1 %) přežívající dávku antibiotik. (obrázek 1) Heterogenní reakce se opakuje při vystavení vlivu stejného antibiotika. (Lewis, 2007) Perzistence představuje stav, kdy se uvnitř bakteriální populace vyštěpí několik buněk, které sníží metabolickou aktivitu a přechází do dormantního stavu. (Li et al., 2017) Kvantifikace perzistence není jednoduchá, neboť se týká pouze několika buněk. Výskyt perzistorů se zjišťuje pomocí růstových křivek bakteriální populace. Je nutné stanovit hodnotu  $MDK_{99,99}$ , která odpovídá času potřebnému k usmrcení 99,99 % bakterií. (Beneš, 2018)



Obrázek 1 Časová křivka citlivosti, tolerance a perzistence.  
 $MDK_{99}$  – minimální doba pro usmrcení 99 % bakteriálních buněk.  
 $MDK_{99,99}$  – minimální doba pro usmrcení 99,99 % bakteriálních buněk.

Odolnost bakterií vůči hostitelskému imunitnímu systému a vůči antibiotikům se rapidně zvyšuje v případě vzniku biofilmu, čímž jsou schopny odolávat běžným dávkám antibiotik. (Croes et al., 2018) Jedním z důvodů je, že vyšší koncentrace buněk v periferních částech biofilmu způsobí inaktivaci antimikrobiálních látek. K inaktivaci dochází vlivem nedostatečné difúze některých antimikrobiálních látek do biofilmu. Další příčinou je obsah heterogenní buněčné populace v biofilmu. Tato heterogenita zahrnuje perzistory. Jedná se o frakci buněk, která je rezistentní vůči vysokým koncentracím antimikrobiálních látek. (Lewis et al., 2002)

Tvorba biofilmu je v životním cyklu mikroorganismů velmi důležitým prvkem. Biofilm chrání bakterie před působením různých podnětů – fluktuace pH, vysušení, fyzický stres a právě působení antibiotik. Nicméně, v klinické praxi se výskyt biofilmu

stává hlavním problémem při aplikaci antibiotik. Vlivem takového obranného mechanismu jsou bakterie multirezistentní a stávají se z nich následně extrémně odolné kmeny. (Sharma, Khan, 2018)

### **1.3.2.1 Propustnost vnější membrány**

Cytoplazmatická membrána představuje u bakterií rozhraní mezi vnějším prostředím a vnitřním prostředím buňky. Snížením permeability membrány se také sníží fluidita, což má za následek škodlivé účinky na strukturu a aktivitu mnoha proteinů přítomných v lipidové dvojvrstvě membrány. Některé bakterie si ovšem vytváří další vnější struktury, které slouží jako bariéra propustnosti, jež zpomaluje potenciálně toxické látky. Peptidoglykan gram pozitivních bakterií má velkou prahovou permeabilitu, je propustná pro molekuly 30-57 kDa. Malé molekuly mohou snadno pronikat, což je podstata vnitřní citlivosti gram pozitivních bakterií k různým antibiotikům. Gramnegativní bakterie nejsou k mnoha antibiotikům citlivé vlivem přítomnosti mnohem jemnějšího molekulárního síta, které obklopuje relativně tenká vrstva peptidoglykanu. (Cox, Wright, 2013)

K dalším mechanismům umožňujícím vycytávání důležitých živin se řadí proteiny patřící do třídy porinů. Poriny patří k proteinům, které vytvářejí nespecifické difúzní kanály. Přítomnost těchto kanálů omezuje přísun antibiotik a přispívá u mnoha organismů ke vzniku vnitřní antimikrobiální rezistence. Poriny zpomalují příliv léků vlivem různých mechanismů, zahrnujících např. velikostní limitaci a hydrofobicitu. (Cox, Wright, 2013)

### **1.3.2.2 Efluxní pumpy**

Efluxní pumpy jsou velmi rozšířené a vyskytují se v chromozomu všech organismů. Jsou přítomné i u organismů neprodukující antibiotika, což naznačuje, že se vyvinuly pro jiné účely než vyvarovat se antibiotikům. První případ antibiotické rezistence zprostředkované efluxní pumpou bylo zaznamenáno v roce 1970 u tetracyklinu. (Cox, Wright, 2013)

Efluxní pumpy mohou být buď substrátově specifická a exportovat pouze jedinou molekulu, nebo mohou být širokospektrá a exportovat strukturálně odlišné třídy molekul. Obvykle efluxní pumpy transportují více než jednu molekulu a často také exportují toxické molekuly vyprodukované hostitelem. (Cox, Wright, 2013)

## 1.4 Metody testování

Mikrobiologické laboratoře mají v případě testování citlivosti bakterií na určité antimikrobiální látky možnost si vybrat mezi metodami prováděnými instrumentálně nebo manuálně. (Ataee et al., 2012)

U izolovaných kolonií, které by mohly vykazovat určitou patogenitu, by měly být provedeny testy citlivosti. Takové kolonie by měly být získány z primárního agaru. Postupy identifikace jsou většinou prováděny ve stejný čas. Směsi různých mikroorganismů by neměly být testovány na stejné destičce pro daný citlivostní test. Pokud není zcela jasná příčina infekce nebo se v klinickém vzorku nachází normální flóra nebo směs mikroorganismů, testování citlivosti je většinou zbytečné, neboť výsledky mohou být poté zavádějící. (CLSI, 2012)

Nejčastěji používané metody ke zjištění minimální inhibiční koncentrace antimikrobiálních látek (MIC), bakteriostatické a baktericidní aktivity jsou agarová a bujónová diluční metoda. Diluční metody jsou považovány za referenční metody při testování citlivosti in vitro a rovněž jsou používány při hodnocení jiných prováděných metod testování. (Wiegand, Hilpert, Hancock, 2008) Současné testy citlivosti antimikrobiálních látek poskytují důležité informace o koncentraci a typu antibiotika, které může být použito pro daný bakteriální kmen. Jistou nevýhodou je dlouhá inkubační doba a nízké hodnoty přesnosti mezi jednotlivými typy testů. (Heller, Spence, 2019)

V případě agarové diluční metody jsou roztoky s definovaným množstvím bakteriálních buněk umístěny přímo na živné médium, které již obsahuje různé koncentrace antibiotik. Po inkubaci je přítomnost bakterií indikovaná nárůstem jednotlivých kolonií. Bujónová diluční metoda využívá tekuté růstové médium obsahující geometricky rostoucí koncentrace antimikrobiálního činidla, které je inokulováno s daným počtem bakteriálních buněk. Po inkubaci je nárůst bakterií signalizován zákalem nebo sedimentem. U obou metod je MIC definovaná jako nejnižší možná koncentrace antimikrobiální látky (v mg/l), která zabraňuje viditelnému růstu mikroorganismů za definovaných podmínek. Právě MIC lze u dilučních metod považovat za kvantitativní parametr při stanovení antimikrobiální citlivosti. (Wiegand, Hilpert, Hancock, 2008) Nicméně, MIC nepředstavuje absolutní hodnotu. (CLSI, 2012)

V klinické praxi se tento in vitro parametr používá ke klasifikaci testovaného mikroorganismu jako klinicky citlivého, středně citlivého anebo rezistentního vzhledem k testované látce. Break-pointy (hraniční hodnoty MIC) jsou odvozeny z mikrobiologické

a klinické praxe a mohou se lišit vzhledem ke konkrétnímu zkoumanému druhu nebo ke konkrétní zkoumané antimikrobiální látce. Prvky, které tyto break-pointy definují, jsou MIC distribuce příslušných druhů, farmakodynamika a farmakokinetika určitých antimikrobiálních látek a výsledná klinická data. (Wiegand, Hilpert, Hancock, 2008)

#### **1.4.1 Bujónové diluční testy**

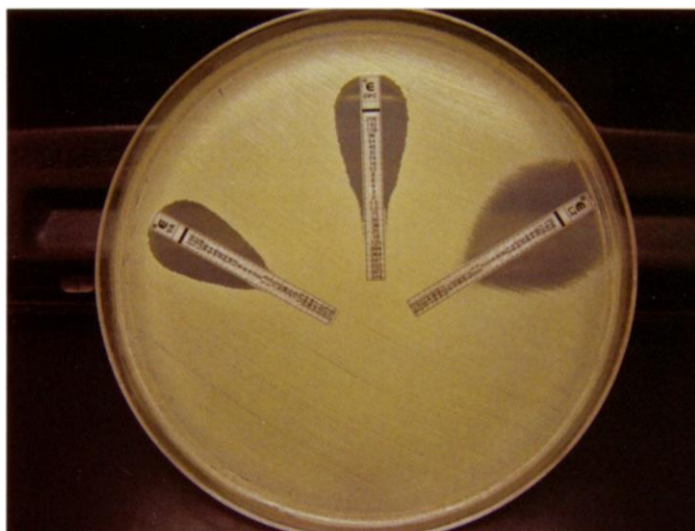
Jedna z nejčastěji používaných metod na testování antimikrobiální citlivosti byla zkumavková diluční metoda. Tato metoda zahrnuje přípravu antimikrobiálních látek dvojkovým ředěním v tekutém růstovém médiu. Následně dochází k inokulaci bakteriální suspenze a inkubaci. Po inkubaci je hodnocen růst bakterií na základě vzniku zákalu. (Jorgensen, Ferraro, 2009) Růst bakterií se odečítá proti kontrole. MIC je v první nezakalené jamce, tj. v jamce bez viditelného růstu. (Bednář et al., 1996)

Výhodou této techniky byla generace kvantitativního výsledku v podobě MIC. Mezi značné nevýhody makrodiluční metody se řadí velké množství činidel, manuální úkony přípravy roztoků pro každý test a riziko možnosti vzniku chyb při přípravě roztoků antimikrobiálních látek. (Jorgensen, Ferraro, 2009)

Pro jedno antibiotikum se používá osm koncentrací dosažených dvojnásobným ředěním základního roztoku antibiotika. Koncentrace antibiotik se vybírají tak, aby kolem čtvrté jamky byla hraniční koncentrace pro citlivost. (Jorgensen, Ferraro, 2009)

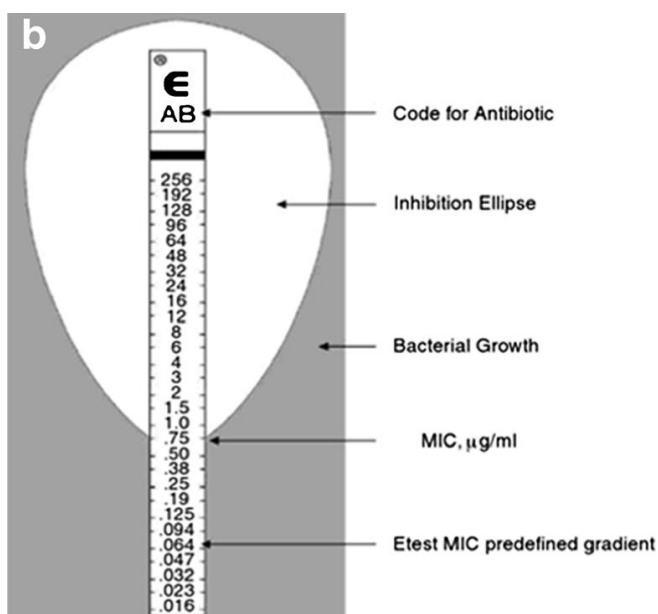
#### **1.4.2 Gradientová difúzní metoda**

Pro určení antimikrobiální citlivosti gradientovou difúzní metodou je používán princip stanovení antimikrobiálního koncentračního gradientu v agarovém médiu. (obrázek 2) (Jorgensen, Ferraro, 2009)



Obrázek 2 E-test, gradientová difúzní metoda

Komerčně dostupná verze testu je tzv. E-test. Test je prováděn na tenkých plastových stripech, které jsou napuštěny rostoucími koncentracemi antimikrobiálních látek a na povrchu jsou označeny stupnicí pro odečet koncentrace. Na agarovou plotnu lze umístit radiálně 5–6 proužků. Po inkubaci je MIC odečítána jako průsečík oblasti inhibice dané látky ve tvaru elipsy s testovacím proužkem v místě udávajícím hodnotu MIC. (obrázek 3) Využití této metody je výhodné v případě, kdy je buď třeba stanovení MIC pouze jedné nebo dvou látek, nebo když je testován mikroorganismus požadující obohacené živné médium nebo specifické inkubační podmínky. (Jorgensen, Ferraro, 2009)

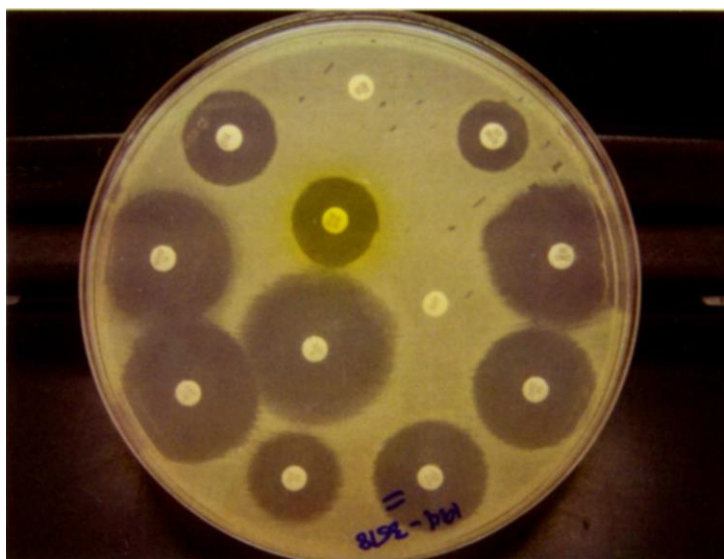


Obrázek 3 Schematické zobrazení inhibiční zóny E-testu

E-test má ve srovnání s diskovou difúzní metodou několik výhod. Vytvořený gradient je stabilní po dobu 20 hodin, což je příznivé pro velké množství patogenů – od rychle rostoucích aerobních bakterií až po pomalu rostoucí anaerobní bakterie. E-test může být použit k nalezení heterogenní rezistence nebo bakteriálních kmenů, které vytváří jak citlivé, tak i rezistentní kolonie. (Schumacher et al., 2018) E-test podává v porovnání s diskovou difúzní metodou více kvantitativní výsledky a poskytuje kvalitnější mezilaboratorní přesnost. (Heller, Spence, 2019)

### 1.4.3 Disková difúzní metoda

Disková difúzní metoda využívá difúze antibiotika napříč agarem za účelem vytvoření gradientu snižující se koncentrace antibiotika, přičemž vzdálenost od zdroje působení antibiotika se zvyšuje. (obrázek 4) Vzdálenost růstu bakterie od zdroje antibiotika určuje citlivost bakterie k danému antibiotiku. (Heller, Spence, 2019)



Obrázek 4 Disková difúzní metoda

Testování citlivosti diskovou difúzní metodou je metoda jednoduchá, praktická a dobře standardizovaná. Provádí se aplikací inokula (o hustotě  $1-2 \times 10^8$  CFU/ml) na plotnu s Mueller Hinton agarem. Na povrch agaru s inokulem se umístí až 12 komerčně připravených disků, které jsou impregnované určitou koncentrací antimikrobiální látky. Dále probíhá 16–24 hodinová inkubace při 35 °C. Po inkubaci se hodnotí velikost zóny inhibice růstu bakterií kolem každého disku. Průměr inhibiční zóny souvisí s citlivostí izolátu a rychlostí difúze dané látky agarovým médiem. (Jorgensen, Ferraro, 2009) Dále

je průměr inhibiční zóny závislý na množství antimikrobiální látky. Proto je nutné účinnost disků průběžně kontrolovat. (Votava, 2001)

Výsledky diskové difúzní metody jsou převážně kvalitativní (zdali je testovaný mikroorganismus k dané látce citlivý nebo rezistentní). Ovšem existují některé systémy čtení zón, které vypočítají a určí hodnotu MIC nějakých bakterií nebo léčiv porovnáním velikostí zón se standardními křivkami daného druhu a léku, které jsou uloženy v algoritmu. (Jorgensen, Ferraro, 2009) Přístroj Bacmed firmy Aspiag slouží právě k automatickému odečítání inhibičních zón a hodnocení break-pointů pro diskovou difúzní metodu. Systém umožňuje definici více sad break-pointů s přiřazením priority. Následná interpretace je založena na standardech EUCAST, CLSI a na uživatelsky definovaných sadách breakpointů. (<http://www.aspiag.cz/BacmedAST.htm>) Tento test je také závislý na vhodné difúzi. Rozhodujícím faktorem pro použití této metody je molekulová hmotnost dané antimikrobiální látky. Nesprávné výsledky mohou způsobovat nedokonalosti a nerovnosti agarových ploten, což následně ovlivňuje difúzi. (Schumacher et al., 2018)

Hlavní výhodou diskové difúzní metody je jednoduchost v provedení testu, neboť nevyžaduje žádné speciální vybavení, a flexibilita při výběru disků pro testování. Mezi další výhodou lze řadit i to, že poskytnuté výsledky jsou snadno interpretované všemi lékaři. Nevýhodou této metody je nedostatek mechanizace a automatizace testu. (Jorgensen, Ferraro, 2009)

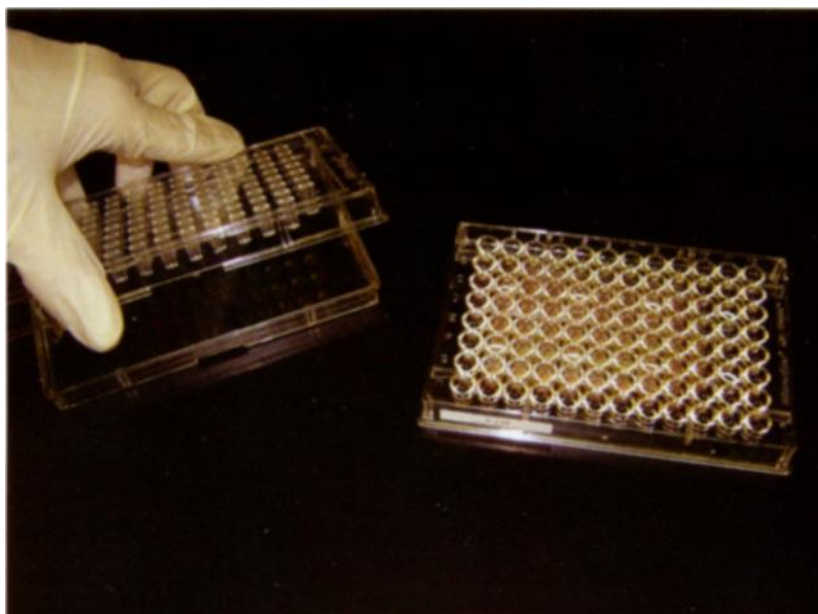
Diskovou difúzní metodou nemohou být testovány všechny pomalu rostoucí bakterie nebo bakterie náročné na kultivaci. Test byl standardizován pro testování streptokoků, *Haemophilus influenzae* a *Neisseria meningitidis* pomocí specializovaných médií, inkubačních podmínek a specifických kritérií na interpretaci velikosti zóny. (Jorgensen, Ferraro, 2009)

#### **1.4.4 Mikrodiluční metoda**

Mikrodiluční metoda se využívá ve většině případů ke stanovení MIC. Jedná se o nejběžnější metodu, která zahrnuje ředění antibiotik v růstovém médiu za účelem vytvoření série roztoků antibiotik, které mají klesající tendenci koncentrace. Pro daný bakteriální kmen mohou být tímto testem stanoveny typy a koncentrace antibiotik. Bakterie jsou inokulovány v roztoku živného média s antibiotikem a nechávají se inkubovat do následujícího dne. (Heller, Spence, 2019)

Postupným vývojem se stala praktičtější a oblíbenější právě metoda mikrodiluční. Mikrodiluční metody bylo dosaženo miniaturizací a mechanizací testu použitím malých jednorázových plastových mikrotitračních destiček. Za výhody této metody lze považovat získání hodnot MIC, reprodukovatelnost a úsporu činidel a prostoru, k čemuž dochází vlivem miniaturizace testu. Mikrodiluční metoda bývá přizpůsobena k testování velkého počtu vzorků nebo ke kolorimetrickým odečtům. Nicméně musí být vždy dodržena inkubační doba potřebná k nárůstu mikroorganismů trvající 24–48 hodin. (Heller, Spence, 2019)

Hlavní nevýhodou testu je nemožnost změny výběru daných látek, neboť tyto látky jsou dostupné ve standardních komerčních setech. (obrázek 5) (Jorgensen, Ferraro, 2009) Finální objem testu definuje, zda se jedná o metodu makrodiluční nebo mikrodiluční. V případě makrodiluční metody je použit celkový objem 2 ml, u mikrodiluční metody prováděné v mikrotitrační destičce je hodnota objemu nižší než 500  $\mu$ l. (Wiegand, Hilpert, Hancock, 2008)



*Obrázek 5 Mikrodiluční agarová metoda*

Primární výhodou této metody je možnost získání kvantitativních hodnot MIC, ale také hodnoty minimální baktericidní koncentrace. Tato metoda je standardizována CLSI pro aerobní druhy mikroorganismů. Mikrodiluční bujónová metoda patří vzhledem k diagnostickým účelům mezi spolehlivé a standardizované metody. Jedná se ale o časově náročnější proces při rozsáhlejších experimentálních procesech, neboť každý roztok daného antibiotika musí být připravován ručně. (Schumacher et al., 2018)



V případě agarové mikrodiluční metody byl zaznamenán pokrok tím, že bylo použito chromogenní agarové médium, které umožňuje časnější detekci mikroorganismů. Důvodem je brzká viditelná barevná reakce během 18–24 hodin v případě citlivých kmenů. Dále je tato metoda využívána u kultur obsahujících více druhů bakterií, u rezistentních bakterií a při rozlišení do kmenu a druhu. (Schumacher et al., 2018)

## **1.5 Laboratorní interpretace výsledku vyšetření citlivosti**

Za předpokladu získání kvalitativních výsledků je výsledek vyjadřován třemi způsoby, může být označen jako: „citlivý“, „středně citlivý“ nebo „rezistentní“. Vše je posuzováno na základě velikosti inhibiční zóny nebo hodnotě MIC. Pro správné posouzení citlivosti jsou k dispozici standardizované hodnoty mnoha bakteriálních druhů. (Schumacher et al., 2018) Zda-li je testovaný mikroorganismus citlivý nebo rezistentní, o tom vypovídá hodnota „break-pointu“. Pokud je hodnota koncentrace nižší, než je hodnota break-pointu, jedná se o bakteriální izolát citlivý k dané antimikrobiální látce. (Melter, Malmgren, 2014)

## **1.6 Testované kmeny bakterií**

### **1.6.1 Rod *Staphylococcus***

Stafylokoky jsou charakterizovány jako grampozitivní, nesporeující a nepohyblivé bakterie. V zevním prostředí poměrně dobře přežívají, převážně v přítomnosti bílkovin odolávají vyschnutí, zahřátí na 55 °C. Jsou schopny tolerovat vysoké koncentrace solí až do obsahu 10 % NaCl. (Sedláček, 2007)

Stafylokoky jsou zodpovědné za spoustu lékařských komplikací zahrnující kožní infekce a infekce měkkých tkání, infekce v místě chirurgického zákroku, endokarditidu a nozokomiální infekce. Rostoucí počet těchto infekcí souvisí s neustálým vývojem medicíny, do kterého lze řadit používání kloubních implantátů, imunosupresiv a katetrů. (Casey et al., 2007)

V praxi je většina druhů a poddruhů stafylokoků rozdělována na základě jejich schopnosti koagulovat plasmu, na stafylokoky koaguláza pozitivní a koaguláza negativní. Volná koaguláza reaguje s plasmatickým faktorem za vzniku stafylothrombinu. Stafylothrombin katalyzuje přeměnu fibrinogenu na fibrin. V důsledku tvorby fibrinu probíhají stafylokokové infekce formou ohraničených ložisek, abscesů. (Votava, 2003)

Vázaná koaguláza neboli clumping faktor mění fibrinogen na fibrin, čímž dojde ke shlukování stafylokokových buněk. (Votava, 2010)

Koaguláza negativní stafylokoky jsou hlavní příčinou infekcí krevního oběhu v důsledku zavedení centrálního žilního katetru. Infekce močových cest u mladých žen jsou způsobené *Staphylococcus saprophyticus*, ovšem zřídka je považován za příčinu bakteriurií u hospitalizovaných pacientů. (Casey et al., 2007) I přes to byly koaguláza negativní stafylokoky mnoho let považovány za nepatogenní. (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2012) Mezi důležité a běžně se vyskytující složky mikroflóry lidské pokožky se řadí *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus hominis*, které jsou také spojovány s klinicky významnými nozokomiálními infekcemi. (Zhou et al., 2012) Počet nozokomiálních onemocnění způsobených právě koaguláza negativními stafylokoky se neustále zvyšuje. Mnoho těchto stafylokoků je již rezistentní na methicillin. Zvyšující se rezistence u některých stafylokoků je částečně způsobena používáním širokospektrých antibiotik. (Casey et al., 2007)

Koaguláza pozitivní *Staphylococcus aureus* je hlavní příčinou mnoha závažných nozokomiálních a komunitních infekcí. Způsobuje také infekce kostí a kloubů, jako je akutní a vertebrální osteomyelitida, ke kterým často dochází během operace v důsledku kontaminace. *S. aureus* je přenášen významným podílem lidské populace a způsobuje velké množství onemocnění s různým stupněm komplikací, které se odvíjí od místa infekce a citlivosti daného kmene. Jeho patogenita se odráží ve schopnosti produkce různých toxinů a rozvoji antimikrobiální rezistence. (Casey et al., 2007) Léčba takových infekcí je velmi náročná kvůli častému výskytu kmenů rezistentních vůči antimikrobiálním látkám, jako je např. methicillin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA). Mimo to je *Staphylococcus aureus* součástí biofilmu v místech infekce. Takové infekce nereagují na léčbu antibiotiky a stávají se z nich chronické infekce, pro které je pak potřebná účinnější léčba. (Coenye et al., 2017)

### **1.6.2 Rod *Escherichia***

*Escherichia coli* se řadí mezi gramnegativní bakterie, které mají tvar tyčinky. (Raeispour, Ranjbar, 2018) *E. coli* je běžnou součástí střevní mikroflóry zdravých jedinců. O *E. coli* lze hovořit jako o komenzálovi, částečně saprofytovi a také symbiontovi, protože svým působením znemožňuje průnik patogenů vlivem produkce kolicinů a také se podílí na tvorbě některých vitaminů. (Votava, 2003)

*E. coli* se také řadí mezi podmíněně patogenní mikroorganismy, jenž způsobují chorobné stavy. Pokud se u bakteriálního kmene vyskytnou specifické faktory virulence, může způsobovat infekce i ve střevech. (Votava, 2003) Patogenní kmeny *Escheria coli* mají potenciál způsobovat širokou škálu infekčních onemocnění, zahrnující novorozeneckou meningitidu, infekce střevního a močového traktu. (Derakhshan et al., 2018) U infekcí močového systému mají významnou roli faktory virulence. Mezi faktory virulence lze zařadit aerobactin, P-fimbrie, hemolysin, afimbriální adhezín I, cytotoxický nekrotizující faktor I, adheziny a fimbrie. (Raeispour, Ranjbar, 2018)

Patogenita *E. coli* je podmíněna přítomností adhezivních fimbrií a produkcí toxinů. Dané kmeny vyvolávají různými mechanismy různá onemocnění, podle nichž je lze rozlišit do několika kategorií: enterotoxigenní (ETEC), enteropatogenní (EPEC), enteroinvazivní (EIEC) a enterohemoragické (EHEC) *Escheria coli*. Enterotoxigenní kmeny jsou charakterizovány produkcí proteinových enterotoxinů. Produkce enterotoxinů je kódovaná na plasmidech. Jsou rozlišovány dvě skupiny enterotoxinů: termostabilní nízkomolekulární enterotoxiny typu ST a termolabilní enterotoxiny typu LT, které mají větší molekulovou hmotnost a jsou imunogenní. Enteropatogenní kmeny jsou schopny pevné vazby na povrch buněk epitelu tlustého střeva prostřednictvím antigenních adhezínů zvaných bundleforming pilus (BFP). Neprodukují enterotoxiny a zřejmě nepronikají do buněk. V buňkách ale vyvolávají charakteristické změny, převážně ztrátu mikrovilí. (Julák, 2006) V několika studiích bylo prokázáno několik efektorových molekul, které jsou sekrečním systémem III. typu transportovány skrze bakteriální buněčnou stěnu a následně jsou inkorporovány do eukaryotní buňky. (Votava, 2003) Enteroinvazivní kmeny (nazývané též Shiga-like, označované STEC) se v mnoha směrech podobají shigellám. Nemají H-antigeny, jsou nepohyblivé a podobnost mají i v rámci mechanismu a průběhu onemocnění. Onemocnění nastává po průniku bakterií do buněk. Enterohemoragické kmeny se řadí z uvedených *Escheria coli* k nejnebezpečnějším. Příčina takového nebezpečí spočívá v produkci Vero-toxinu (VT), který je podobný shigellovému toxinu a působí cytotoxicky na Vero buňky. Bakterie adherují na epitelové buňky tlustého střeva, do kterého invadují poměrně rychle a vyvolávají akutní zánětlivou reakci s destrukcí tkáně. Bakterie často pronikají do hlubších tkání a krevního oběhu, což vede ke vzniku hemolyticko-uremického syndromu (HUS). (Julák, 2006)

K vyvolání hemolyticko-uremického syndromu stačí velmi nízká infekční dávka. Udává se, že je dostačující pouze deset bakterií. (Votava, 2003) Hemolyticko-uremický syndrom je trombotická mikroangiopatie charakterizovaná třemi hlavními symptomy:

neimunní hemolytická anémie s fragmentocyty, trombocytopenie a akutní poškození ledvin. Nejčastější příčinou HUS je Shiga toxin produkovaný *E. coli*. Ve většině zemí je onemocnění způsobeno *E. coli* O157:H7. Kmeny STEC produkují dva virulentní typy Shiga toxinu, Stx-1 a Stx-2, přičemž druhý jmenovaný je více toxický a bývá často asociován s progresí k HUS. Ačkoliv oba toxiny se objevují u infekcí vyvolaných kmeny STEC. (Balgradean et al., 2019) Infekce vyvolané STEC kmeny mívají různé projevy: od gastrointestinálních infekcí bez systémových komplikací až po agresivní formu s neurologickými problémy, která představuje mortalitu u 1–4 % případů během akutní fáze. Několik výzkumů v posledních desetiletích prokázalo, že zejména zánětlivé reakce přispívají k patogenezi onemocnění. (Exeni et al., 2018)

Mezi infekcemi spojenými s *E. coli* je pozorován navyšující se výskyt antimikrobiální rezistence. (Bayani et al., 2018) Infekce močových cest patří k nejčastějším bakteriálním infekcím. Vyžadují vysoké náklady na léčbu a v mnoha případech mohou vést až ke smrti. Touto infekcí jsou častěji postiženy ženy, kdy v 90 % případů u mladých žen je příčinou právě *E. coli*. (Raeispour, Ranjbar, 2018) U pacientů trpících onemocněním močového systému, které je způsobeno *E. coli*, byla prokázána zvýšená rezistence na určitá antibiotika, především ampicilin a ciprofloxacin. (Bayani et al., 2018)

V posledním desetiletí se rapidně zvyšuje prevalence multirezistentních kmenů *Enterobacteriaceae*, převážně kmenů produkující  $\beta$ -laktamázu širokého spektra (ESBL). Jejich šíření je závislé na bakteriální konjugaci, při které jsou přenášeny plazmidy nesoucí geny ESBL. (Surgers et al., 2019) Rezistence vůči  $\beta$ -laktamům je velice závažný problém, neboť tato léčiva jsou prokázána jako bezpečná a účinná, ale v důsledku antimikrobiální rezistence ztrácejí svůj účinek. *E. coli* kódující ESBL jsou rezistentní k více než jedné třídě antimikrobiálních látek, čímž se stávají multirezistentní a představují tak vážný problém ve zdravotnických zařízeních. (Rahman et al., 2018)

Jako jedna z mála enterobakterií není *E. coli* primárně rezistentní k ampicilinu. I přesto počet rezistentních kmenů neustále narůstá. (Votava, 2005) Léčba těmito antibiotiky je aplikovaná u extraintestinálních infekcí. Ovšem vzhledem k časté získané rezistenci je vždy nutné vyšetření citlivosti. (Julák, 2006)

### 1.6.3 Rod *Enterococcus*

Bakterie rodu *Enterococcus* se řadí mezi grampozitivní bakterie. Nevytvářejí pouzdra a některé druhy jsou pohyblivé nevýraznými bičíky. Ve většině případů rostou jak při 10 °C, tak i při 45 °C. Taktéž je jejich růst zaznamenán v přítomnosti 6,5 % NaCl nebo 40 % žluče v médiu a při pH 9,6. Někdy jsou označovány souhrnným termínem „mléčné koky“. (Sedláček, 2007)

Jedná se o komenzály lidského gastrointestinálního traktu, kůže, horních cest dýchacích a ústní dutiny. Tyto organismy jsou hlavní příčinou vzniku nozokomiálních infekcí, především kvůli potenciálu k získané antimikrobiální rezistenci. *Enterococcus faecalis* bývá často detekován ve vzorcích spojivkového vaku u starších pacientů. (Todokoro et al., 2018) *Enterococcus faecalis* je častou příčinou u 80 až 90 % případů enterokokových infekcí, jako jsou infekce močového traktu, endokarditida, bakteriémie a infekce v místě chirurgického zákroku. (Sharma, Khan, 2018)

Během normálního růstu může *Enterococcus* produkovat přirozená antibiotika a zlepšovat střevní flóru. Ovšem to také způsobuje různé infekce – endokarditida, sepe, infekce chirurgických ran a infekce močových cest, infekce ohrožující život novorozenců i in utero. (Wang et al., 2018)

I přes to, že nejsou u enterokoků zaznamenány téměř žádné faktory virulence, jedná se o původce stále častějších nosokomiálních infekcí. Léčba takových infekcí je velmi problematická, neboť je způsobena snadným přenosem rezistence na antibiotika. (Julák, 2006) Enterokoky jsou odolné vůči velkému množství antimikrobiálních látek. Vzhledem k četnému výskytu antimikrobiální rezistence se vyvíjejí v oportunní patogeny. (Gao et al., 2018) Jejich schopnost získání různých adaptivních znaků a přenos rezistence na patogenní druhy činí tuto skupinu velmi závažným zdravotním problémem. (Werner et al., 2013)

V posledních letech vzrůstá prevalence vankomycin-rezistentních enterokoků (VRE) a představují tak závažnou hrozbu pro lidské zdraví, neboť se stávají odolnějšími vůči současně podávaným léčivům. (Davido et al., 2018) Obvykle se VRE vyskytují u pacientů, kteří jsou těžce nemocní, vystavení dlouhodobému působení antimikrobiálních látek nebo jsou dlouhodobě hospitalizováni. Kolonizace může trvat po dobu několika týdnů až let. Klinické důsledky infekcí způsobené VRE zahrnují omezenou dostupnost antimikrobiální terapie vůči VRE a schopnost VRE přenášet genetickou informaci pro rezistenci proti vankomycinu na ostatní patogeny. (Axelrad et al., 2018)

Nejběžnějším genem kódujícím rezistenci je VanA, začínají ale převládat klony VanB. (Vehreschild et al., 2019)

#### **1.6.4 Rod *Pseudomonas***

Jedná se o gramnegativní bakterie, které mají schopnost pohybu. (Khan et al., 2018) Toleruje vysoké koncentrace solí, odolává účinkům dezinfekčních prostředků, většinou antibiotik a též je schopna růstu i při chladničkových teplotách. Většina kmenů tvoří pigmenty – zejména modrozelený pyocyanin (methylhydrofenazin) oxidující spontánně na  $\alpha$ -oxyfenazin, a žlutý fluorescein. Kultury se vyznačují charakteristickým zápachem, který je přirovnáván k vůni ovoce nebo květů jasmínu. (Julák, 2006)

Oportunní patogen *Pseudomonas aeruginosa* je známý svou pozoruhodnou adaptací na různá prostředí. S různými metabolickými dráhami a množstvím patogenních mechanismů je schopen růst v prostředí pod vlivem různých podmínek, např. na lékařském vybavení, ve vodních systémech, ve ventilátorech, a dokonce i v přítomnosti dezinfekčních prostředků. (Subdedi et al., 2018)

*Pseudomonas aeruginosa* jsou hojně zastoupeny v životním prostředí. Taktéž se podílí na procesu tvorby biofilmu. (Khan et al., 2018) Jejich relativně velký genom kóduje enzymy pro vznik efluxních pump, které zapříčiní vznik rezistence mikroorganismu k určitým antimikrobiálním látkám, např. penicilin, chlorin, glutaraldehyd atd. Extracelulární polymery obsažené v biofilmu inhibují difúzi antimikrobiálních látek. Sesilní buňky mohou zpomalit jejich metabolismus za účelem snížení příjmu antimikrobiálních látek. Existují případy biofilmů smíšených kultur, které vytvářejí perzistující buňky, aby byly schopny přežít antimikrobiální ataky. (Liu et al., 2018)

*Pseudomonas aeruginosa* má vrozenou rezistenci vůči několika třídám antimikrobiálních látek. Molekulární mechanismy rezistence spočívají v zabránění přístupu k cíli, zvýšení efluxu, změně antibiotických cílů vlivem mutace, přímé modifikaci antibiotik. I u citlivých kmenů *P. aeruginosa* se vyskytuje značná obrana díky vlastní antimikrobiální rezistenci. (Jeukens et al., 2019)

#### **1.6.5 Rod *Listeria***

Listerie jsou krátké grampozitivní tyčinky se zaoblenými konci. Při kultivaci při teplotě 20–25 °C jsou pohyblivé několika peritrichálními bičičky. (Sedláček, 2007) Jejich charakteristickou vlastností je pohyblivost: 1–4 bičičky umožňující pohyb s přemety

a rotací. Povrchové struktury jsou bohaté na volné i vázané lipidy. Virulence listerií je vázaná na produkci hemolysinů. (Bednář et al., 1996)

Listerie jako podmíněně patogenní bakterie mohou způsobovat infekce zažívacího traktu po konzumaci kontaminovaných potravin. Listerie pronikají do buněk střevního epitelu, odkud se šíří dále v podobě makrofágů. (Julák, 2006) Spousta druhů zvířat patří mezi asymptomatické přenašeče *Listeria monocytogenes*. Toto přenašečství způsobuje dlouhodobé vylučování *L. monocytogenes*, což vede k následné kontaminaci životního prostředí a potravin. Pouze *Listeria monocytogenes* a *Listeria ivanovii* z celého rodu je patogenní pro člověka. (Legendre et al., 2017) Je schopna přežívat ve velmi nízkých teplotách okolo 4 °C, toleruje nízké pH, nízkou aktivitu vody a vysoké koncentrace solí. (Haubert et al., 2018)

*Listeria monocytogenes* způsobuje onemocnění nazývané listerióza. Ve většině případů se listerióza vyskytuje sporadicky. Listeriíza může vést ke vzniku závažných onemocnění, jako je meningitida, septikémie nebo encefalitida. V případě těhotenství způsobuje spontánní potraty nebo předčasné porody. (Legendre et al., 2017) Hlavním zdrojem listeriózy je kontaminovaná potrava. Přenos vzájemně mezi lidmi se objevuje velmi vzácně. (Skowron et al., 2018)

Většina kmenů *Listeria monocytogenes* je citlivá na většinu antibiotik používaných v klinické léčbě. Ovšem zvýšení antimikrobiální rezistence souvisí s přítomností mobilních genetických elementů, konkrétně plazmidů a transpozonů. (Haubert et al., 2018)

Geny rezistence jsou přenášeny mezi *Listeria monocytogenes* a ostatními grampozitivními i gramnegativními bakteriemi. Proto je důležité sledovat prevalenci a přenos rezistentních kmenů *Listeria monocytogenes*. (Sosnowski et al., 2019)

### **1.6.6 Rod *Bacillus***

Do rodu *Bacillus* se řadí aerobní sporulující grampozitivní tyčky se zakulacenými nebo čtvercovitými konci. Jeho zástupci se vyskytují ubikvitěrně v přírodě, prachu, vodě, zvířatech, rostlinách i hmyzu. Většina jich je nepatogenní, výjimku tvoří *Bacillus anthracis*, zčásti *Bacillus cereus*. Společným znakem bacilů je tvorba endospor, které jsou oválné nebo kulaté a jsou velmi rezistentní k mnoha nepříznivým podmínkám. (Sedláček, 2007)

*Bacillus cereus* způsobuje dva typy gastrointestinálních onemocnění zahrnující průjem a zvracení po konzumaci kontaminovaných potravin, které obsahují více než

$10^4$ – $10^5$  spor nebo vegetativních buněk *B. cereus* na gram. Patogenita *Bacillus cereus* je způsobena produkcí různých toxinů. Průjem je spojován s řadou enterotoxinů – hemolysin BL, nehemolytický enterotoxin, cytotoxin K a enterotoxin FM. (Gao et al., 2018)

Vznik rezistentních kmenů *Bacillus cereus* vede k selhání antibiotické léčby, což je podmíněno zneužíváním antibiotik nebo získáním genů rezistence skrze horizontální přenos genů. (Gao et al., 2018)

### **1.6.7 Rod *Salmonella***

Salmonely jsou gramnegativní rovné tyčinky, které jsou většinou pohyblivé prostřednictvím peritrichálních bičků. Vyskytují se jako patogenní organismy pro člověka i pro mnohá zvířata. (Sedláček, 2007) Salmonely jsou klasifikovány do více než 50 séro skupin na základě O antigenu. Jednotlivé skupiny se vzájemně liší virulencí a stupněm antimikrobiální rezistence. (Lo et al., 2018)

Netyfoidní salmonely (NTS) způsobují akutní gastroenteritidu. Mohou také zapříčinit vznik invazivních infekcí u imunokompromitovaných nebo oslabených jedinců. Antimikrobiální terapie je indikována u extraintestinálních infekcí a u imunokompromitovaných pacientů, není doporučovaná v případě akutní nekomplikované gastroenteritidy. (Lo et al., 2018)

U NTS, vyskytující se u dětí, byla zjištěna vysoká rezistence vůči běžným antibiotikům. Jako léky první linie se používají širokospektré cefalosporiny. Nicméně rezistence vůči těmto látkám v posledních letech celosvětově vzrostla. (Lo et al., 2018)

I v případě kmenu *Salmonella* dochází k celosvětovému vzrůstu antimikrobiální rezistence, zejména u MDR (mnohočetná rezistence) kmenů *Salmonella*. Jeden z nejdůležitějších důvodů vzniku rezistence u *Salmonella* je zneužívání antimikrobiálních látek při výrobě živočišných produktů. Tato rezistence je na lidskou populaci přenášena právě prostřednictvím živočišných výrobků, které představují určitý stupeň ohrožení veřejného zdraví. (Zhu et al., 2017)

### **1.6.8 Rod *Candida***

*Candida albicans* patří mezi lidské komenzální organismy a je přítomna v gastrointestinálním traktu, ústní a vaginální sliznici většiny zdravých jedinců. V některých případech se může chovat jako oportunní patogen, což podmiňuje vznik symptomatických infekcí sliznic. *Candida albicans* je charakterizována několika



vývojovými typy buněk, zahrnující formy kvasinek a vláknité formy (pseudohyfy a hyfy). Filamenta se od buněk ve formě kvasinek liší buněčnou strukturou, proteiny buněčné stěny, transkripcí a interakcí s imunitním systémem. Schopnost přecházet mezi jednotlivými formami je velmi ovlivněna jejich virulencí. Prostřednictvím ex vivo modelů kandidózy bylo zjištěno, že *Candida albicans* ve formě hyf způsobuje rozsáhlejší poškození tkání než ve formě kvasinek. Takové poškození je dáno schopností adherovat k epiteliálním povrchům, tvorby biofilmu, vyvolat produkci prozánětlivých cytokinů a vyhýbání se apoptóze. Mezi několika mechanismy hraje důležitou roli u *Candida albicans* v adhezi k inertním povrchům hydrofobicita povrchu buněk. Tato adhezí schopnost tvoří hlavní predispozici ke vzniku perorální infekce. (Ardizzoni et al., 2018)

*C. albicans* se projevuje jako potenciálně patogenní houba. Je schopna být úspěšným komenzálem u zdravého hostitele. Za určitých okolností dochází ke vzniku a narůstání virulence, což se projevuje invazí houby do tkání. Variabilita virulence je způsobena plasticitou genomu, jenž umožňuje rychlé změny vlastností kmene. (Bednář et al., 1996)

## 1.7 Potenciál komplexů přechodných kovů v medicíně

V oblasti medicíny nabývají na významu sloučeniny obsahující přechodný kov. Jedná se o sloučeniny, které mají slibné antiproliferativní účinky u velkého množství tumorů. Neustále se objevuje zvyšující se zájem o návrhy léků, které by mohly být v případě nádoru selektivně aktivovány buněčnými procesy nebo řízenou externí aktivací. Protinádorové léky založené na bázi kovu je možné rozdělit na klasická a neklasická chemoterapeutika. (van Rijt, Sadler, 2009)

V oblasti biologie vzrostl během minulého století význam iontů kovů a jejich komplexů, proto je třeba neustále nových studií, které se zabývají podrobnou strukturou a složením těchto sloučenin. Ionty kovů mohou vytvářet různé komplexy s proteiny, s buněčnými složkami o vysoké molekulové hmotnosti nebo s malými molekulami metabolitů o nízké molekulové hmotnosti. (Crans et al., 2013) Kovy mají také důležitou roli v řadě diagnostických technik. V rámci molekulárního zobrazení jsou kovy využívány ke zvýšení kontrastu na subcelulární úrovni. (Crans, Meade, 2013)

Komplexní sloučeniny nabízejí určité využití při vývoji nových protirakovinných látek. Jejich vlastnosti mají jisté odlišnosti od čistě organických sloučenin. (van Rijt, Sadler, 2009) Metabolismus organických léčiv zahrnuje tvorbu CO<sub>2</sub> a předvídatelný

rozklad produktů na bázi uhlíku. Oproti tomu léčiva obsahující kov vytvářejí proměnlivé sloučeniny kovu vzniklé hydrolyzou nebo redoxní reakcí původního komplexu kovu. Jedná se o velmi důležitou skutečnost, neboť metabolismus původního komplexu může vést k jiným aktivním materiálům obsahujícím kov. Takové materiály mohou vykazovat vysokou perzistenci, rozdíly v lokalizaci buněk a orgánů a také mají určitý potenciál ovlivnit jiné cílové motivy. (Crans, Meade, 2013)

Organokovové sloučeniny s přechodným kovem s biologickou aktivitou byly zavedeny jako nová potenciální terapeutika proti nádorům, HIV a malárii. Také se objevilo jejich využití v klinické praxi jako radiofarmaka a taktéž jako antibiotika. Organokovové sloučeniny mají značný potenciál při léčbě mnoha závažných onemocnění, která jsou v současné době obtížně kontrolovatelná nebo jsou nevléčitelná. (Hartinger, Dyson, 2008)

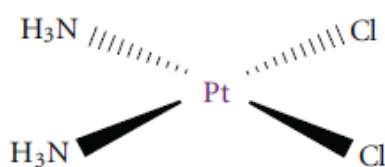
U známých organických antibiotik, jako jsou penicilin, cefalosporin nebo rifamycin, odvozených od ferrocenu je pozorována skutečnost, že u rezistentních mikroorganismů dochází vlivem působení ferrocenu k obnovení aktivity těchto léčiv. I taková jednoduchá modifikace umožní vstup léčiva do organismu, což způsobí následně smrt mikroorganismu. Nemodifikované léky již takto nefungují z důvodu, že je zablokovan jejich příjem, anebo dochází k jejich rychlému vylučování. (Hartinger, Dyson, 2008) V současné době jsou již prozkoumávány různé alternativy k antibiotikům. Jedná se zejména o anorganická antibakteriální činidla nebo antimikrobiální peptidy, které vzhledem k jejich širokospektrální baktericidní aktivitě získávají určitý potenciál jako možná léčiva. (Croes et al., 2018)

U derivátů vanadocenu byla zjištěna anti-HIV aktivita bez přítomnosti toxicity. Tyto deriváty jsou strukturně podobné titanocenu dichloridu, ovšem s tím rozdílem, že skupiny chloru jsou nahrazeny chelatačními ligandy. (Hartinger, Dyson, 2008)

Transport léků obsahující kov k jejich cílům představuje jeden z největších cílů v rámci chemoterapie nádorů. Takové léčivo musí být dostatečně reaktivní vzhledem k biologickému cíli, ale ne tak reaktivní, aby nedošlo k deaktivaci biomolekul. Aktivace prekurzorů je realizována prostřednictvím fotochemického procesu, oxidací nebo redukcí kovu nebo ligandu, anebo substitucí ligandu. Výhoda použití světla jako vnějšího stimulu spočívá v minimalizaci vedlejších efektů. (van Rijt, Sadler, 2009)

### 1.7.1 *Cis-platina*

V medicíně v oblasti léčby nádorů byl zaznamenán určitý pokrok u sloučenin platiny, konkrétně se jedná o *cis*-diamindichloroplatinatý komplex a *cis*-platina (*cis*-DDP). (obrázek 6) První studie o cytotoxicitě byly provedeny v roce 1965 Barnettem Rösenbergem. Cytotoxický účinek, pozorovaný u kultury *Escheria coli* a vyvolaný elektrickým polem, byl vyvolán tvorbou *cis*-platiny a jejích odpovídajících analog prostřednictvím elektrochemických reakcí na platinových elektrodách. (Fuertes et al., 2003)



Obrázek 6 Strukturální vzorec *cis*-platiny

Studie provedená v roce 1969 prokázala protinádorové vlastnosti *cis*-platiny. Vzhledem k následnému klinickému vývoji *cis*-platiny a karboplatiny patří tyto látky mezi nejpoužívanější léky v léčbě nádorů. (Fuertes et al., 2003) *Cis*-platina je vysoce účinná při léčbě karcinomu vaječníků, varlat, močového měchýře a plic. Bylo zjištěno, že *cis*-platina vyvolává řadu závažných vedlejších účinků, jako jsou nefrotoxicita, neurotoxicita, ototoxicita, nauzea a zvracení. (Gómez-Ruiz et al., 2012)

V případě chemické reaktivity, *cis*-platina může ovlivňovat buněčnou fyziologii prostřednictvím interakce s molekulami buněčné membrány. Je známo, že DNA představuje hlavní cíl pro *cis*-platinu, neboť 75–85 % koncentrace *cis*-platiny se váže na nukleofilní místa intracelulárních částí, jako jsou peptidy obsahující thiol, proteiny, replikační enzymy a RNA. Konkrétní vazební místo představuje N7 guaninu, v menší míře vzniká vazba i s adeninem. Vazba *cis*-platiny na DNA je ireverzibilní. Tato vazba poskytuje vysvětlení rezistence k *cis*-platině, ale taktéž její vysokou toxicitu. Předpokladem vzniku vazby mezi *cis*-platinou a DNA spočívá v hydrataci platiny, což je umožněno nízkou koncentrací chloridových iontů uvnitř buněk. *Cis*-platina také přímo interaguje s telomerázou. (Gómez-Ruiz et al., 2012)

Přítomnost DNA-*cis*-platinových aduktů je schopna výrazně změnit funkci jaderných proteinů nezbytných pro transkripci savčích genů. Reakce na *cis*-platinu je

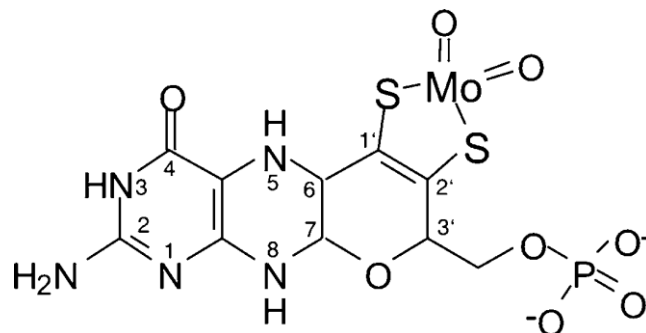
definovaná jako buněčná specifita. Byly objeveny změny i u mnoha významných signalizačních kaskád, např. proliferace a diferenciacie buněk, buněčná smrt. K rezistenci na cis-platinu může docházet na několika úrovních. Jedna z možností je buněčné vychytávání léčiva interakcí s proteinem nebo DNA, dále se jedná o aktivaci určitých signálů, které vedou k buněčné smrti. (Gómez-Ruiz et al., 2012)

### 1.7.2 Molybden

Molybden je základní prvek rostlin, zvířat i mikroorganismů. Molybden se řadí do skupiny stopových prvků, které jsou nezbytné pro správný metabolismus. Ovšem je prospěšný jen při malém množství. Ve větších dávkách může mít toxické účinky. (Terpilowska et al., 2018) Je ale také důležité zmínit, že jeho nedostatek se může pro organismus stát fatální záležitostí. V takovém případě může dojít až k úmrtí. (Mendel, 2005) Jedná se o prvek, který je součástí aktivních míst mnoha metaloenzymů. (Terpilowska et al., 2018)

První biologická funkce molybdenu byla objevena v roce 1930, kdy bylo prokázáno, že působí jako katalyzátor fixace dusíku u *Azotobacter chroococcum*. O několik let později bylo uvedeno, že má také určitou úlohu u metabolismu lidí a zvířat. (Iobbi-Nivol, Leimkübler, 2012) Molybden je důležitý prvek pro nižší i vyšší organismy. (Mendel, 2005)

Molybden je v biologických systémech neaktivní, dokud nevytvoří komplex se speciálním kofaktorem. S výjimkou bakteriální nitrogenázy je molybden vázán na tricyklický pterin, označovaný také jako molybdenový kofaktor (Moco), který se váže k různým apoproteinům. (obrázek 7) (Mendel, 2005) Je známo, že jedinými organismy, které neobsahují molybdenový kofaktor, je *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe*. (Mendel, 2009) Bylo popsáno více než 50 enzymů obsahujících molybden, přičemž většina z nich se vyskytuje právě u bakterií. V případě eukaryotních organismů bylo nalezeno pouze šest enzymů. (Mendel, Bittner, 2006)



Obrázek 7 Kofaktor molybdenu (Moco)

Molybden má jako katalytické centrum enzymu jistou katalytickou „univerzálnost“, která má v biologických systémech jistou prospěšnost. Za fyziologických podmínek je v rozsahu oxidačního stavu VI a IV redox-aktivní. Může se vyskytovat v širokém rozmezí redoxního potenciálu. (Mendel, 2005)

Organismy získávají molybden ve formě molybdenového aniontu. V přítomnosti ostatních aniontů je nutná přítomnost specifických transportních systémů. V případě bakterií se jedná o vysoce afinitní transportéry složené ze tří bílkovinných složek, které ke své činnosti vyžadují hydrolyzu ATP. Po jeho vychytání do buňky je molybden izolován do místa, kde dochází k zisku biologické aktivity. (Mendel, 2005)

V případě *E. coli* byly popsány tři transportní systémy: ModABC systém s vysokou afinitou, CysPTWA síranová/thiosíranová permeáza s nízkou afinitou a nespecifický transportní systém s nízkou účinností, který vyžaduje vysoké koncentrace molybdenanu a také kromě molybdenanu transportuje i selenan, nebo síran. (Mendel, 2005)

Ve studii provedené Köpfem a Köpf-Maierem byly zaznamenány určité důkazy o potenciálu použití derivátů molybdocen dichloridu jako protinádorového činidla. V posledních letech probíhaly rozsáhlé výzkumy, které potvrdily protinádorové vlastnosti molybdocenu. (Gómez-Ruiz et al., 2012)

U rostlin a zvířat je velmi obtížné dosáhnout nedostatku molybdenu, neboť se jedná o hojně zastoupený stopový prvek v rámci potravy. Nicméně, genetická deficiencie molybdenu je známa již tři desetiletí a může být způsobena dvěma typy mutace. V prvním případě se jedná o mutaci v biosyntéze molybdenového kofaktoru, která vede k jeho nedostatku a následně k pleiotropní ztrátě nebo redukci aktivit všech enzymů obsahující molybden. Druhý typ mutace je charakterizován ztrátou nebo snížením činnosti pouze jednoho konkrétního enzymu s molybdenem. (Mendel, 2009)

### 1.7.3 Vanad

Vanad se řadí u živých organismů mezi stopové prvky, který má potenciálně zásadní roli. Jedná se o slibné antidiabetické vlastnosti a mohl by se proto využít jako terapeutikum. Ovšem společnou vlastností mnoha stopových prvků je určitý stupeň toxicity ve velkém množství, přičemž je některými odborníky považován za jeden z podstatných prvků pro lidský organismus. (Crans et al., 2013) Sloučeniny vanadu vykazují mitogenní účinky, metabolické účinky a stimulační/inhibiční účinky na buněčnou diferenciaci. (Pessoa et al., 2015)

Vanad je také kofaktorem několika enzymů zahrnující haloperoxidázy a nitrogenázy a silně interaguje s enzymy obsahující vanad, které lze nalézt u *Ascidacea*. (Crans et al., 2013) Deriváty vanadu mají účinky na aktivitu mnoha enzymů, převážně těch, které souvisejí s reakcemi fosfátu. Vanad inhibuje ATPázy s různou účinností a také inhibuje určité fosfatázy – alkalická, kyselá a protein-tyrosin fosfatáza. K dalším enzymům inhibovaným vanadem patří ribonukleázy, fosfodiesterázy, glukóza-6-fosfatáza a fosfoglukomutáza. (Pessoa et al., 2015)

Některé sloučeniny vanadu mohou interagovat s DNA. Byly provedeny studie zabývající se několika formami vanadu, zejména sloučenin komplexů vanadu s peroxidovou skupinou, které mohou určitým způsobem štěpit DNA. U komplexů vanadu s peroxidovou skupinou, podávaných při léčbě perorálně, se lze také setkat s vysokou toxicitou. I když měly tyto sloučeniny velký příslib jako vhodná léčiva ve studiích buněčných kultur, bylo od nich v důsledku toxicity upuštěno. (Crans et al., 2013)

V preklinických studiích v rámci nádorových buněčných linií byl rozsáhle studován vanadocen dichlorid. V přímém srovnání s titanocenem dichloridem byla u vanadocenu zaznamenána vyšší in vitro aktivita. Nicméně, charakterizace těchto sloučenin a jejich biologicky aktivních druhů je obtížnější, což je způsobeno paramagnetickou povahou vanadu. Důsledkem této vlastnosti je nemožnost použití metody klasické magnetické rezonance. Nutnost použití rentgenové krystalografie a elektronové paramagnetické (spinové) rezonance zpomaluje jejich analýzu a pokroky ve studiu těchto sloučenin. (Gómez-Ruiz et al., 2012)

V posledních deseti až patnácti letech byl zaznamenán exponenciální nárůst v oblasti výzkumu vanadu jako potenciálního terapeutického prostředku. (Pessoa et al., 2015)

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem práce bylo zjistit antimikrobiální aktivitu vybraných komplexů přechodných kovů na dále uvedených mikroorganismech.

### 2.1 Testované mikroorganismy

K testování bylo použito celkem 11 mikroorganismů, z čehož bylo 10 bakterií a jedna kvasinka. V případě kmene *MRSA* se jednalo o klinický izolát z Nemocnice Pardubice. Ostatní níže jmenované testované mikroorganismy byly poskytnuty se Sbírkou Katedry biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice:

<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 4227
<i>Escheria coli</i>	CCM 3954
<i>Escheria coli</i>	CCM 2024
<i>Escheria coli</i>	CCM 4517
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 2497
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 1960
<i>Salmonella</i> Enteritidis	CCM 4420
<i>Bacillus cereus</i>	CCM 99
<i>Listeria monocytogenes</i>	CCM 4699
<i>Candida albicans</i>	CCM 8186
<i>MRSA</i>	klinický izolát; Nemocnice Pardubice

Uvedené bakteriální kmeny byly kultivovány na Mueller Hintonově agaru. Inkubace probíhala za aerobních podmínek při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Kvasinka *Candida albicans* byla kultivována na Sabouraudově dextrózovém agaru. Následná inkubace proběhla za aerobních podmínek při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Všechny uvedené mikroorganismy byly uchovávány v ledničce a každý týden bylo provedeno přeočkování na příslušné živné médium.

## 2.2 Laboratorní pomůcky

### 2.2.1 Sterilní jednorázové plastové pomůcky

Mikrotitrační destičky

Mikrozkumavky (typ Eppendorf)

Očkovací kličky

Petriho misky

Špičky

Zkumavky

### 2.2.2 Skleněné a ostatní pomůcky

Automatické mikropipety Eppendorf

Laboratorní sklo (Erlenmeyerovy baňky, kádinky, odměrný válec)

Mikroskopická krycí a podložní sklíčka

Navažovací lodička, kopist, oboustranná lžička

Skleněné pipety

Stojan na zkumavky

Zkumavky

## 2.3 Přístroje a zařízení laboratoře

Analytické váhy KERN 444 a 445

Kern, Německo

Autokláv PS 20 A

BMT, ČR

Biologický termostat

POL EKO, Polsko

Denzitometr McFarland typu DEN-1

BIOSAN, Litva

Fluorescenční mikroskop Nikon ECLIPSE 80i

Nikon, Japonsko

Chladnička

Liebherr Comfort, Německo

Laboratorní mikroskop Olympus BX41

Olympus Corporation, Japonsko

Plynový kahan

VWR International, Česká republika

Vodní lázeň s termostatem Julabo ED-5M/B

Julabo, Německo

Vortex V-1 plus

BIOSAN, Litva



## 2.4 Chemikálie

Dimethylsulfoxid, DMSO, > 98 %

PENTA

## 2.5 Kultivační média a pracovní roztoky

### Fyziologický roztok

*Složení:* chlorid sodný            8,5 g  
                  destilovaná voda        1000 ml

*Příprava:* 4,25 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 500 ml destilované vody. Roztok byl sterilizován při 121 °C po dobu patnácti minut v autoklávu. Následně byl roztok skladován při chladničkové teplotě.

### Mueller Hinton agar, HiMedia Laboratories Indie

*Složení:* hovězí masová infúze        2 g/l  
                  kaseinový hydrolyzát            17,5 g/l  
                  škrob                                1,5 g/l  
                  agar                                    17 g/l

*Příprava:* 38 g základu bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a poté bylo sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu patnácti minut. Po vytemperování na 45-50 °C byl agar asepticky rozlit do Petriho misek. Půdy byly po vychladnutí skladovány při chladničkové teplotě. pH připraveného média odpovídalo při 25 °C hodnotě  $7,3 \pm 0,2$ .

### Mueller Hinton bujón, HiMedia Laboratories Indie

*Složení:* hovězí infúze                    2 g/l  
                  kaseinový hydrolyzát            17,5 g/l  
                  škrob                                1,5 g/l

*Příprava:* 21 g základu bylo rozmícháno v 1000 ml destilované vody a následně sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu patnácti minut. Připravený bujón byl vychlazen a jeho pH bylo při 25 °C  $7,3 \pm 0,1$ .

### **Sabouraud Dextrose agar, HiMedia Laboratories Indie**

<i>Složení:</i> glukóza	40 g/l
mykologický pepton	10 g/l
agar	15 g/l

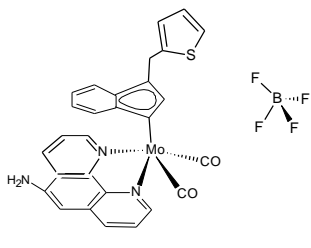
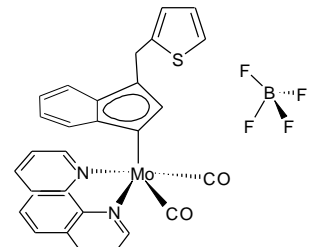
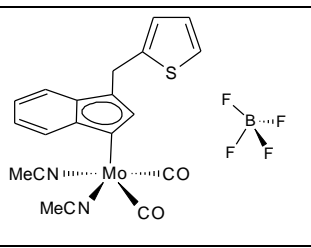
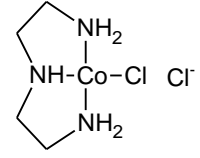
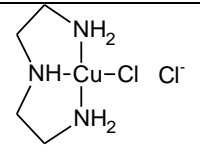
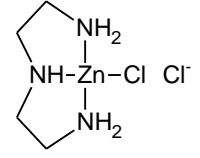
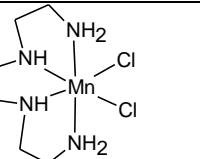
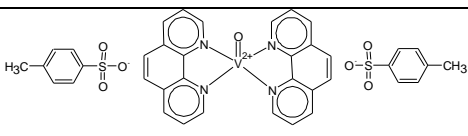
*Příprava:* 65 g směsi bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a poté sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu patnácti minut. Po sterilizaci byl agar ochlazen na 45-50 °C a asepticky rozlit do Petriho misek. Půdy byly po vychladnutí skladovány při chladničkové teplotě. pH připraveného média odpovídalo při 25 °C hodnotě  $5,6 \pm 0,2$ .

## **2.6 Testované komplexy přechodných kovů**

V diplomové práci bylo vybráno k testování antimikrobiálních vlastností sedmnáct různých komplexů přechodných kovů (viz. tabulka č. 1). Sloučeniny byly syntetizovány na Katedře obecné a anorganické chemie.

Tabulka 1 Testované sloučeniny

Označení	Strukturní vzorec	Sumární vzorec	Mr [g/mol]	Rozpustnost
VO (acac) <sub>2</sub>		OV(C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	265,2	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input type="checkbox"/>
NaS		C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NNaS <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	225,3	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input type="checkbox"/>
MnO6		C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub> Mn	352,3	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input type="checkbox"/>
VONS1		OV(C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NS <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	363,5	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input type="checkbox"/>
VONS2		OV(C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> NS <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	571,9	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input type="checkbox"/>
VONS3		OV(C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NOS <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	391,5	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input type="checkbox"/>
VONS4		OV(C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> NS <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	387,5	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input type="checkbox"/>
VOSO <sub>4</sub>		OVSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	253,1	DMSO: <input type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input checked="" type="checkbox"/>
MoS2		C <sub>40</sub> H <sub>27</sub> O <sub>2</sub> SMoN <sub>2</sub> BF <sub>4</sub>	769,5	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input type="checkbox"/>

MoS3		$C_{28}H_{20}N_3O_2SMoBF_4$	645,9	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input checked="" type="checkbox"/>
MoS4		$C_{28}H_{19}N_2O_2SMoBF_4$	630,3	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input checked="" type="checkbox"/>
MoS5		$C_{20}H_{17}N_2O_2SMoBF_4$	532,2	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input checked="" type="checkbox"/>
Co-DETA		$C_4H_{12}N_3CoCl_2$	233	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input checked="" type="checkbox"/>
Cu-DETA		$C_4H_{12}N_3CuCl_2$	237,6	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input checked="" type="checkbox"/>
Zn-DETA		$C_4H_{12}N_3ZnCl_2$	239,5	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input checked="" type="checkbox"/>
Mn-TETA		$C_6H_{18}N_4MnCl_2$	272,1	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input checked="" type="checkbox"/>
VONS5		$OV(C_{19}H_{15}N_2SO_3)_2$	769,7	DMSO: <input checked="" type="checkbox"/> H <sub>2</sub> O: <input checked="" type="checkbox"/>

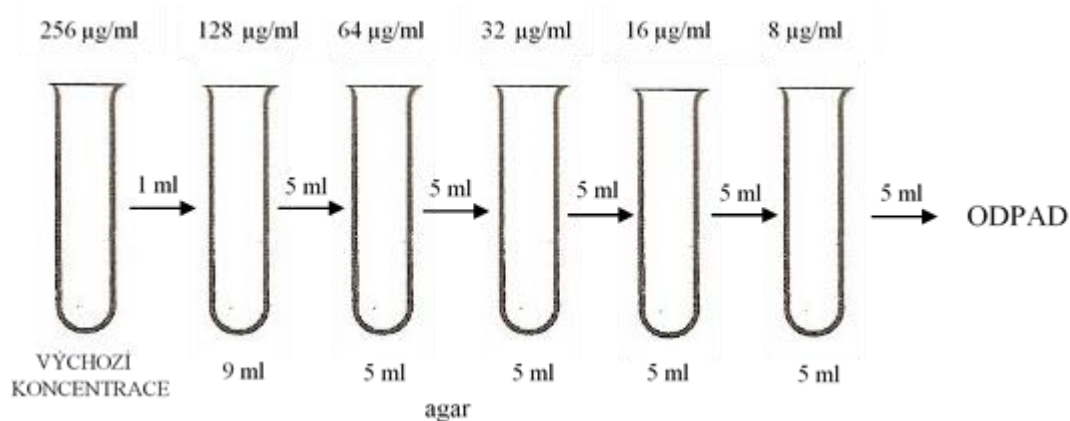
## 2.7 Příprava mikrobiální suspenze

Pro testování vybraných komplexů přechodných kovů byla připravena suspenze testovaných mikroorganismů. Suspenze měla hustotu  $3 \cdot 10^8$  CFU/ml, což odpovídá stupni 1 McFarlandovy zákalové stupnice. Pro přípravu mikrobiální suspenze byl použit fyziologický roztok a 24hodinová bakteriální kultura.

## 2.8 Mikrodiluční agarová metoda

Pro testování vybraných antimikrobiálních látek byla použita mikrodiluční agarová metoda. Byla připravena koncentrační řada, jenž započala koncentrací  $256 \mu\text{g/ml}$ . Výchozí koncentrace  $256 \mu\text{g/ml}$  byla připravena rozpuštěním  $0,0256 \text{ g}$  testované látky v  $10 \text{ ml}$  rozpouštědla DMSO.

Koncentrační řada zahrnovala výchozí koncentraci  $256 \mu\text{g/ml}$  a následné zkumavky byly naředěny na poloviční koncentraci z předchozí zkumavky.  $1 \text{ ml}$  roztoku DMSO s testovanou látkou byl ve zkumavce smíchán s  $9 \text{ ml}$  agaru daného živného média. Živné médium bylo umístěno ve vodní lázni a udržováno tak při teplotě  $45\text{--}50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Následně bylo z připravené suspenze odebráno  $5 \text{ ml}$  a napipetováno do zkumavky obsahující  $5 \text{ ml}$  živného média.  $100 \mu\text{l}$  smíchané suspenze o požadované koncentraci bylo poté rozpipetováno do jamek mikrotitrační destičky.



*Schéma 1 Koncentrační řada*

Na ztuhlou směs v jamkách mikrotitrační destičky byly napipetovány  $2 \mu\text{l}$  mikrobiální suspenze o hustotě buněk  $3 \cdot 10^8$  CFU/ml. Účinky vybraných látek byly testovány pro každou bakterii v dubletu. Mikrotitrační destička byla inkubována

v aerobních podmínkách při 37 °C po dobu 24 hodin. Po inkubaci byla destička vyhodnocena tím způsobem, že bylo zjišťováno, ve kterých jamkách se objevil zákal značící růst daného mikroorganismu a které jamky jsou již bez zákalu. Všechny získané výsledky byly porovnávány vůči kontrole.

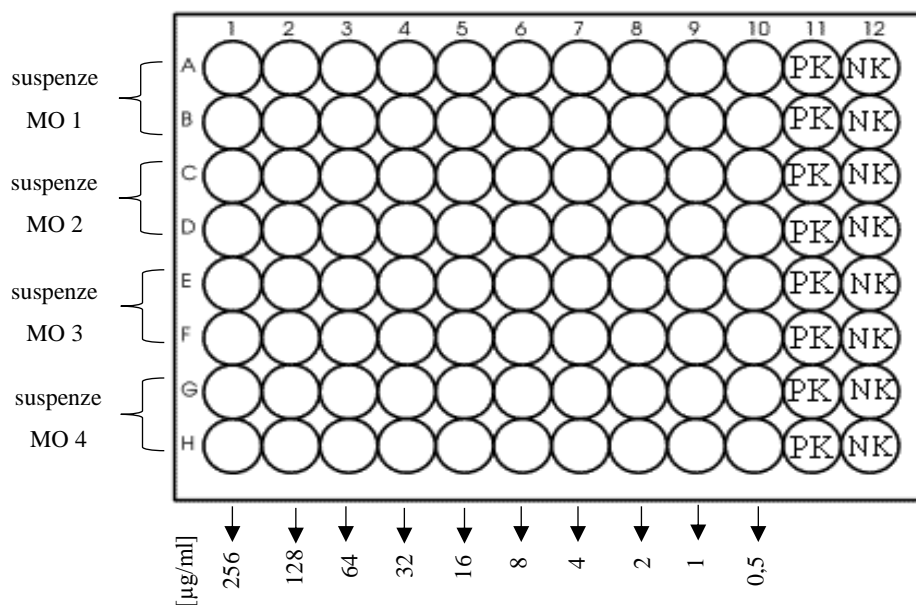


Schéma 2 Příprava mikrotitrační destičky

PK ... pozitivní kontrola (Mueller Hinton agar + mikrobiální suspenze)

NK ... negativní kontrola (Mueller Hinton agar + testovaná látka)

## 2.9 Negativní barvení bakterií

Na čisté podložní sklo byla napipetována kapka roztoku konžské červeně. Z jamky mikrotitrační destičky byla sterilní inokulační kličkou asepticky odebrána kultura bakterií a poté rozmíchána v kapce konžské červeně. Druhé čisté podložní sklo bylo přiloženo ke kapce v úhlu 45° a bylo jím taženo po prvním podložním skle tak, že barvivo se hrnulo před pohybujícím se sklem po celé ploše prvního skla, na níž se vytvořil souvislý povlak. Podložní sklo s negativně obarveným preparátem se nechalo na vzduchu oschnout. Následně byl suchý preparát vystaven parám 36 % HCl. Sklíčko se nechalo zaschnout a preparát byl poté fluorescenčním mikroskopem pod imerzním objektivem (zvětšení 10x100). Byla hodnocena velikost bakteriálních buněk.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Kovy jsou pro život mikroorganismů velice důležité, neboť jsou strukturní součástí biomolekul, kde slouží jako kofaktory v rámci oxidačně-redukčních reakcí. Nicméně, pokud jsou jejich intracelulární koncentrace vysoké, stávají se pro daný mikroorganismus toxickými. Ionty kovů mohou snadno vstupovat do mikrobiálních buněk a akumulovat se až na toxické hladiny před detoxikací prostřednictvím oxidace, redukce nebo komplexace. Proto jsou vyžadovány různé homeostatické systémy, které udržují uvnitř buňky optimální koncentraci kovů. (Ranawat, Rawat, 2017)

Sloučeniny kovů jsou již při nízkých koncentracích velmi aktivní vůči různým mikroorganismům. Jejich výhoda oproti organickým sloučeninám spočívá v zachování jejich aktivity i v případě multirezistentních bakterií, neboť jsou schopné rozrušit bakteriální biofilmy. Mechanismus biologického účinku těchto sloučenin je komplexní, zahrnující tvorbu radikálů (reaktivních forem kyslíku), inhibice buněčných enzymů vazbou na specifické aminokyselinové zbytky, narušení normální funkce buněčné membrány v souvislosti se zvýšenou peroxidací lipidů. (Riegel-Futyra et al., 2017)

V posledních letech dochází k neustálému nárůstu rezistence vůči mnoha antimikrobiálním látkám. Proto je potřeba věnovat se výzkumu látek, které by měly potencionální antimikrobiální účinek na dané mikroorganismy. Takový účinek je připisován právě i sloučeninám kovů, jejichž testování se stává velmi rozšířené.

Cílem diplomové práce bylo zjistit antimikrobiální aktivitu vybraných komplexů přechodných kovů. V diplomové práci bylo otestováno sedmnáct vybraných sloučenin. Byly vybrány sloučeniny obsahující vanad/vanadylovou skupinu, komplexy s manganem, zinkem, mědí, kobaltem a sloučeniny obsahující molybden. Testování proběhlo na grampozitivních (*Staphylococcus aureus* CCM 4227, *Enterococcus faecalis* CCM 2497, *MRSA*) i gramnegativních bakteriích (*Escheria coli* CCM 3954, *Escheria coli* CCM 2024, *Escheria coli* CCM 4517, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960, *Bacillus cereus* CCM 99, *Salmonella* Enteritidis CCM 4420, *Listeria monocytogenes* CCM 4699). *Candida albicans* CCM 8186 byla použita k testování antimykotických vlastností určitých sloučenin.

K veškerému testování antimikrobiální aktivity daných komplexů přechodných kovů byla použita mikrodiluční agarová metoda. Mikrodiluční agarovou metodou byly stanoveny hodnoty minimálních inhibičních koncentrací jednotlivých látek. U vybraných látek, u kterých byly zaznamenány nižší hodnoty MIC, byly poté zhotoveny

mikroskopické preparáty. U těchto mikroskopických preparátů bylo provedeno negativní barvení konžskou červení, čímž mohla být následně změřena velikost jednotlivých bakteriálních buněk.

### 3.1 Stanovení antimikrobiální aktivity mikrodiluční agarovou metodou

Antimikrobiální aktivita diethyldithiokarbamátu sodného (označený NaS) a tris-(acetylacetonáto)manganitého komplexu (označený MnO6) je uvedena v tabulce č. 2

Tabulka 2 MIC látek označených NaS, MnO6

Testované bakterie	Hodnoty MIC testovaných látek [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
	NaS	MnO6
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4227)	256	> 256
<i>E.coli</i> (CCM 3954)	256	> 256
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 2497)	> 256	> 256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 1960)	256	256

V obou případech bylo dosaženo vysokých hodnot MIC u testovaných mikroorganismů. V případě diethyldithiokarbamátu sodného byla MIC u *Enterococcus faecalis* větší než 256  $\mu\text{g/ml}$ . U ostatních testovaných bakterií odpovídala MIC hodnotě 256  $\mu\text{g/ml}$ . Antimikrobiální aktivita tris-(acetylacetonáto)manganitého komplexu byla u *Staphylococcus aureus*, *E.coli* a *Enterococcus faecalis* poměrně nízká, neboť převyšovala hodnotu 256  $\mu\text{g/ml}$ . U *Pseudomonas aeruginosa* byla MIC 256  $\mu\text{g/ml}$ .



**Antimikrobiální aktivita vanadyl diethyldithiokarbamátového komplexu (označený VONS1), vanadyl dihexyldithiokarbamátového komplexu (označený VONS2) a vanadyl acetylacetonátu (označený VO (acac)<sub>2</sub>) je uvedena v tabulce č. 3**

Tabulka 3 MIC látek označených VONS1, VONS2 a VO (acac)<sub>2</sub>

Testované bakterie	Hodnoty MIC testovaných látek [μg/ml]		
	VONS1	VONS2	VO (acac) <sub>2</sub>
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4227)	128	> 256	256
<i>E.coli</i> (CCM 3954)	256	256	256
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 2497)	256	256	> 256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 1960)	256	256	256

Růst u *Staphylococcus aureus* byl inhibován při koncentraci 128 μg/ml. U vanadyldihexyldithiokarbamátového komplexu byla MIC u *Staphylococcus aureus* vyšší než 256 μg/ml. Ostatní bakterie měly potlačený růst při koncentraci 256 μg/ml. 256 μg/ml byla odpovídající MIC i v případě vanadyl diethyldithiokarbamátového komplexu u bakterií *E. coli*, *Enterococcus faecalis* a *Pseudomonas aeruginosa*. Stejně hodnoty MIC byly zaznamenány i v případě vanadyl acetylacetonátu při testování u *Staphylococcus aureus*, *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. U *Enterococcus faecalis* nebyla zaznamenána přesná hodnota MIC, neboť jeho růst nebyl potlačen ani při nejvyšší testované koncentraci 256 μg/ml.

**Antimikrobiální aktivita vanadyl morfolindithiokarbamátového komplexu (označený VONS3) a vanadyl piperidindithiokarbamátového komplexu (označený VONS4) je uvedena v tabulce č. 4**

*Tabulka 4 MIC látek označených VONS3 a VONS4*

Testované bakterie	Hodnoty MIC testovaných látek [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
	VONS3	VONS4
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4227)	256	> 256
<i>E.coli</i> (CCM 3954)	256	256
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 2497)	256	> 256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 1960)	256	256

Při testování sloučenin vanadyl morfolindithiokarbamátového komplexu a vanadyl piperidindithiokarbamátového komplexu odpovídaly MIC vysokým hodnotám. MIC vanadyl morfolindithiokarbamátového komplexu odpovídala hodnotě 256  $\mu\text{g/ml}$  u daných testovaných bakterií – *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* i *Pseudomonas aeruginosa*. V případě vanadyl piperidindithiokarbamátového komplexu byla MIC u *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis* vyšší než 256  $\mu\text{g/ml}$ . U *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa* byl jejich růst pod vlivem vanadyl piperidindithiokarbamátového komplexu potlačen při koncentraci 256  $\mu\text{g/ml}$ .

## Antimikrobiální aktivita látek označené MoS2 a MoS5 je uvedena v tabulce č. 5

Tabulka 5 MIC látek označených MoS2 a MoS5

Testované bakterie	Hodnoty MIC testovaných látek [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
	MoS2	MoS5
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4227)	64	> 256
<i>E.coli</i> (CCM 3954)	128	256
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 2497)	128	> 256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 1960)	128	256

U látky označené MoS5 byla MIC vyšší než 256  $\mu\text{g/ml}$  u *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. U *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa* byl potlačen růst při 256  $\mu\text{g/ml}$ . V případě látky označené MoS2 byla MIC u *E. coli*, *Enterococcus faecalis* a *Pseudomonas aeruginosa* 128  $\mu\text{g/ml}$ . Nejnižších hodnot MIC bylo dosaženo během testování látky označené MoS2 při vlivu na *Staphylococcus aureus*, neboť její MIC byla rovna 64  $\mu\text{g/ml}$ .

## Antimikrobiální aktivita vanadyl sulfátu (označený VOSO<sub>4</sub>) je uvedena v tabulce

### č. 6

Tabulka 6 MIC vanadylsulfátu

Testované bakterie	Hodnoty MIC testované látky [µg/ml]
	VOSO <sub>4</sub>
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4227)	> 256
<i>E.coli</i> (CCM 3954)	256
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 2497)	> 256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 1960)	> 256
<i>Salmonella</i> Enteritidis (CCM 4420)	> 256
<i>Bacillus cereus</i> (CCM 99)	> 256
<i>Listeria monocytogenes</i> (CCM 4699)	> 256
MRSA	> 256

Vanad se řadí mezi stopové prvky, které lidské tělo v nízkých dávkách potřebuje ke správnému fungování. Je také součástí některých enzymů, které jsou nezbytné pro funkci mikroorganismů. Soli vanadu procházejí mnoha výzkumy a jsou zkoumány jejich účinky. Vanadylsulfát lze užívat jako součást potravinového doplňku. Je hojně využíván sportovci, zabývajícími se posilováním, jako anabolický a ergogenní prostředek, i když nejsou doposud přesně známy účinky působení vanadylsulfátu. Anabolické a ergogenní účinky byly potvrzeny několika studiemi na zvířatech. Vanadyl sulfát zvyšuje transport glukózy a je inkorporován do glykogenu ve svalech a játrech. (Fawcett et al., 1996)

Některé výzkumy dokazují, že vanadyl sulfát je schopen inhibovat proteintyrozinfosfatázy. Vanadyl sulfát patří mezi skupinu látek, které mají účinek podobný inzulinu. U vanadyl sulfátu se předpokládá, že reguluje u osob nalačno hladinu cukru v krvi a zlepšuje citlivost receptoru na inzulin. Na základě dostupných výzkumů lze vanadyl sulfát považovat za účinný prostředek při léčbě diabetu mellitu 2. typu. Vanadyl sulfát je až desetkrát méně toxický než vanadát. (Poucheret et al., 1998) S přítomností vanadyl sulfátu dochází také ke snížení produkce cholesterolu.

Během testování vanadyl sulfátu na *Staphylococcus aureus* CCM 4227, *Enterococcus faecalis* CCM 2497, *Escheria coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960 nebyly zaznamenány žádné inhibiční účinky. Vanadyl sulfát byl také testován na patogenních bakteriích, konkrétně *Salmonella* Enteritidis, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* a *MRSA*. Rovněž u těchto bakterií byla prokázána odolnost vůči testované látce i v těch nejvyšších koncentracích.

**Antimikrobiální aktivita chloridu chlorodiethyltriaminokobaltnatého (označený Co-DETA) a chloridu chlorodiethyltriaminozinečnatého (označený Zn-DETA) je uvedena v tabulce č. 7**

Tabulka 7 MIC sloučenin Co-DETA a Zn-DETA

Testované bakterie	Hodnoty MIC testovaných látek [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
	Co-DETA	Zn-DETA
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4227)	> 256	> 256
<i>E.coli</i> (CCM 3954)	256	256
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 2497)	> 256	> 256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 1960)	256	256
<i>Candida albicans</i> (CCM 8186)	128	128

Při testování antimikrobiálního vlivu Co-DETA na *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis* dosahovaly MIC vyšších hodnot, konkrétně byly vyšší než 256  $\mu\text{g/ml}$ . *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa* byla MIC 256  $\mu\text{g/ml}$ . U látky označené Zn-DETA dosahovala hodnot vyšších než 256  $\mu\text{g/ml}$  u *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. U *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa* byla MIC rovna 256  $\mu\text{g/ml}$ .

Vysoké hodnoty MIC u těchto sloučenin je možné vysvětlit několika důvody. Jedním z nich je, že v zemědělství jsou často využívána krmiva obsahující zinek a měď. Dále se vyskytují rezidua antibiotik i sloučenin těžkých kovů v mořských sedimentech, které jsou potenciálním rezervoárem rezistentních kmenů bakterií. Dochází tak k častému vystavování mikroorganismů účinkům jednotlivých látek. Je proto možné, že se u mikroorganismů vyvinul určitý stupeň rezistence. Nicméně sloučeniny těžkých kovů

jsou v porovnání s antibiotiky stabilnější a odolnější vůči degradaci. (Vignaroli et al., 2018)

**Antimikrobiální aktivita chloridu chlorodiethyltriaminoměďnatého (označený Cu-DETA) a chloridu chlorotriethyltetraaminomanganatého (označený Mn-TETA) je uvedena v tabulce č. 8**

Tabulka 8 MIC sloučenin Cu-DETA a Mn-TETA

Testované bakterie	Hodnoty MIC testovaných látek [μg/ml]	
	Cu-DETA	Mn-TETA
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4227)	> 256	> 256
<i>E.coli</i> (CCM 3954)	256	> 256
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 2497)	> 256	> 256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 1960)	256	256
<i>Candida albicans</i> (CCM 8186)	256	256

Testováním sloučeniny označené Cu-DETA u *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* byla zaznamenána MIC vyšší než 256 μg/ml. U ostatních testovaných mikroorganismů, uvedených v tabulce č.7, byla MIC rovna 256 μg/ml. Dále byla testována látka označená Mn-TETA, která konkrétně u *Staphylococcus aureus*, *E. coli* a *Enterococcus faecalis* ani při koncentraci 256 μg/ml nevykazovala žádné inhibiční účinky. U *Pseudomonas aeruginosa* byl růst potlačen právě při koncentraci 256 μg/ml.

Antimikrobiální vlastnosti mědi a zinku jsou účinné při snižování antimikrobiálního růstu. Ačkoliv pouze několik studií uvedlo antifungální vlastnosti nanočástic mědi, vědci doporučují využití těchto nanočástic v podobě dezinfekčních a antimikrobiálních látek. Yoon et al., se zabýval antimikrobiálními účinky nanočástic mědi a stříbra při použití na kmeny *Escheria coli* a *Bacillus subtilis*. Nanočástice mědi prokazovaly výraznější antimikrobiální účinky v porovnání s nanočásticemi stříbra. Výhoda těchto nanočástic spočívá v tom, že se jedná o běžná chemická antifungální činidla. (Ghasemian et al., 2012)

Baktericidní účinek nanočástic kovů je připisován jejich malé velikosti a vysokému poměru povrchu vůči objemu, který jim umožňuje úzce interagovat s mikrobiálními membránami. (Ramyaidevi et al., 2012)

*Candida albicans* CCM 8186 byla vystavena účinkům čtyř látek označených Cu-DETA, Co-DETA, Mn-TETA a Zn-DETA. V případě látek Cu-DETA a Mn-TETA bylo dosaženo MIC při koncentraci 256 µg/ml. Vzhledem ke zbylým dvěma látkám, Co-DETA a Zn-DETA, se *Candida albicans* jevila méně odolnější, neboť MIC dosáhla hodnoty 128 µg/ml.

**Antimikrobiální aktivita látek označené MoS3 a MoS4 a vanadylového komplexu s fenanthrolinem (označený VONS5) je uvedena v tabulce č. 9**

Tabulka 9 MIC sloučenin MoS3, MoS4 a VONS5

Testované bakterie	Hodnoty MIC testovaných látek [µg/ml]		
	VONS5	MoS3	MoS4
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4227)	> 256	128	256
<i>E. coli</i> (CCM 3954)	16	32	64
<i>E. coli</i> (CCM 4517)	16	64	64
<i>E. coli</i> (CCM 2024)	16	64	64
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 2497)	> 256	256	256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 1960)	128	128	256

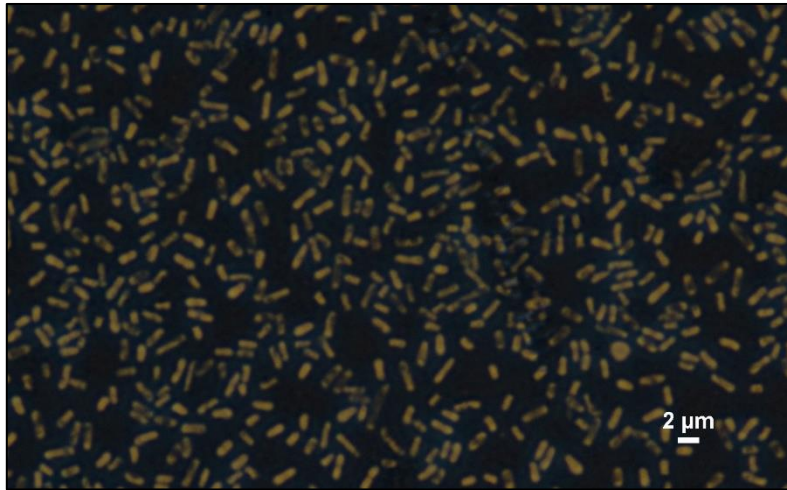
Nejvyšší citlivost bakterií byla zaznamenána při testování vanadylového komplexu s fenanthrolinem a látek označených MoS3 a MoS4. Vyšší hodnoty MIC byly prokázány při testování vanadylového komplexu s fenanthrolinem na bakterie *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. V těchto případech byly MIC vyšší než 256 µg/ml. *Pseudomonas aeruginosa* měla potlačený růst při koncentraci 128 µg/ml. U látky označené MoS3 byla MIC u *Enterococcus faecalis* 256 µg/ml. Inhibice růstu u *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* byla zaznamenána při koncentraci 128 µg/ml. Pod vlivem látky označené MoS4 byl růst kmenů *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Pseudomonas aeruginosa* inhibován při koncentraci 256 µg/ml.

Jelikož tyto látky vykazovaly nižší hodnoty MIC u *Escheria coli* CCM 3954, byly k dalšímu testování vybrány ještě další dva kmeny *E. coli*, konkrétně se jednalo o *E. coli* CCM 2024 a CCM 4517. V případě vanadylového komplexu s fenanthrolinem bylo všemi třemi druhy *Escheria coli* dosaženo MIC při 16 µg/ml. Při testování látky označené MoS4 byla aktivita všech kmenů *E. coli* inhibována při koncentraci 64 µg/ml. U látky označené MoS3 se hodnoty MIC mezi jednotlivými kmeny mírně lišily. *Escheria coli* CCM 4517 a CCM 2024 měla MIC při koncentraci 64 µg/ml. U *Escheria coli* CCM 3954 bylo dosaženo již výše zmíněné nižší hodnoty MIC. Jednalo se o MIC 32 µg/ml.

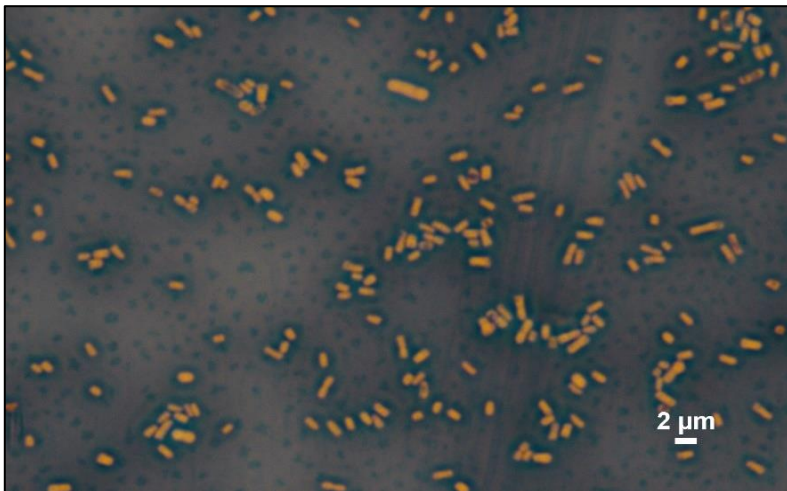
V současnosti je vanad podroben mnoha výzkumům a často jsou jeho vlastnosti srovnávány se sloučeninou *cis*-platina. (Köpf-Maier, Krahl, 1983) Při výzkumech možných účinků elektrického pole na růst bakterií bylo pozorováno, že *Escheria coli* vytvářela až 300x delší filamenta oproti normálním buňkám. Následné zkoumání prokázalo, že za tento fenomén jsou zodpovědné přítomné komplexy platiny. (Rosenberg et al., 1967)

U látek označených VONS5, MoS3 a MOS4 byly vyhotoveny mikroskopické preparáty. Bylo zjišťováno, zdali mají kromě baktericidního účinku na *Escheria coli* i jiné vlivy, zejména na strukturu a povahu buněk. Byly zhotoveny preparáty z buněk při koncentraci testované látky, která ještě neinhibovala bakteriální růst. Tyto preparáty byly porovnávány s kontrolním preparátem, který se lišil v absenci testované látky. (obrázek 8) Následně bylo zjištěno, že u buněk všech tří kmenů *E. coli* došlo k prodloužení buněk. (obrázek 9, 10, 11) Nejednalo se ovšem o tak výrazné prodloužení, jako tomu bývá právě u sloučeniny platiny. Na fotografii *E. coli* pod vlivem testované látky lze také vidět úbytek bakteriální populace.





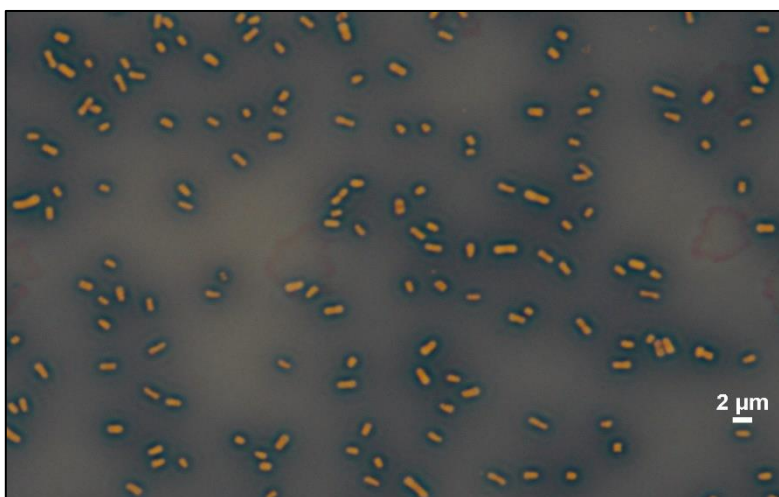
Obrázek 8 Kontrolní preparát, obsahující bakterie v M-H agaru



Obrázek 9 Vliv látky VONS5 na *E. coli* CCM 4517

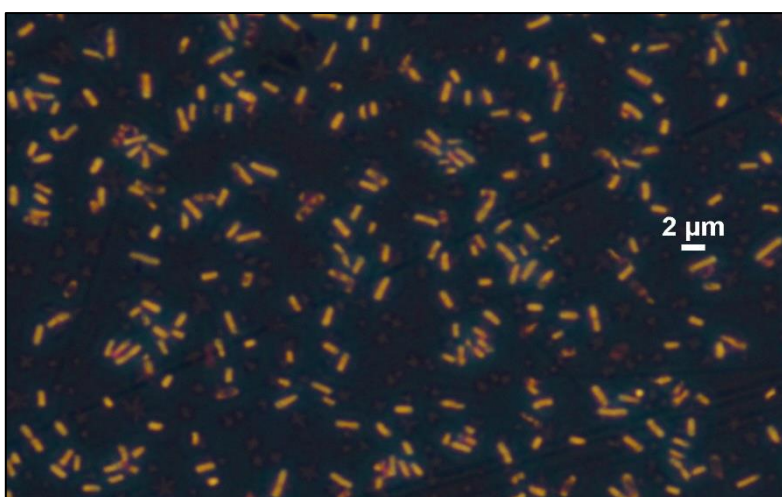


Obrázek 10 Vliv látky VONS5 na *E. coli* CCM 3954

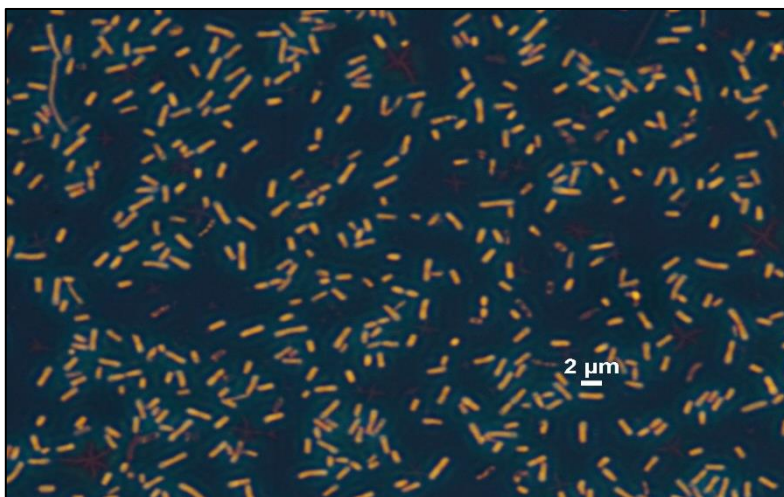


Obrázek 11 Vliv látky VONS5 na *E. coli* CCM 2024

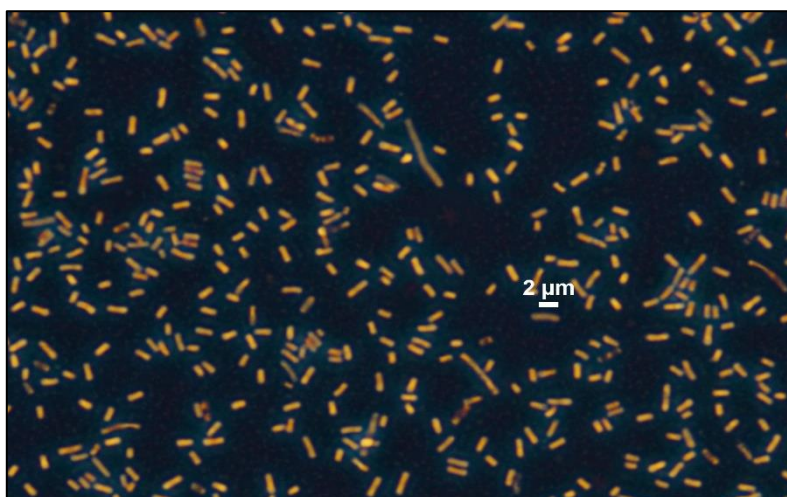
Stejnému mikroskopickému pozorování byla podrobena i bakteriální kultura ovlivněná látkou MoS<sub>3</sub>. Hodnoty MIC byly vyšší než při testování vanadylového komplexu s fenanthrolinem, konkrétně 64 μg/ml, popřípadě 32 μg/ml. Při pozorování preparátu v mikroskopu bylo zjištěno, že buňky *E. coli* všech tří kmenů podléhají pod vlivem testované látky určitým změnám. (obrázek 12, 13, 14) Hlavní pozorovaná změna byla značné prodloužení jednotlivých buněk.



Obrázek 12 Vliv látky MoS<sub>3</sub> na *E. coli* CCM 4517

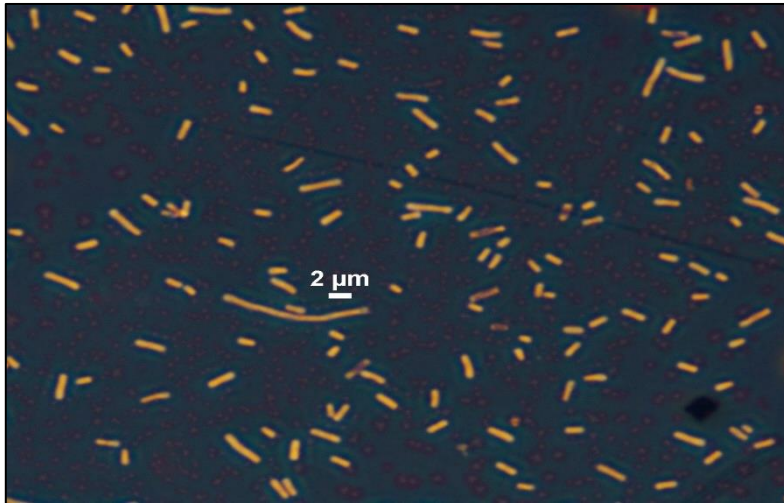


Obrázek 13 Vliv látky MoS3 na *E. coli* CCM 2024

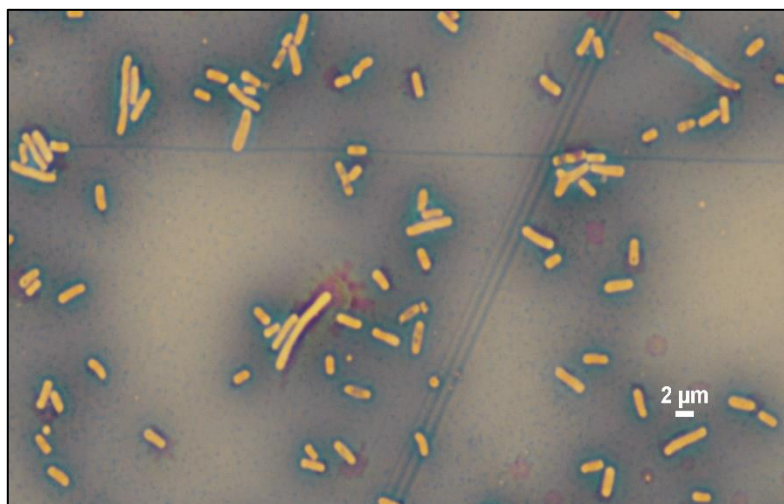


Obrázek 14 Vliv látky MoS3 na *E. coli* CCM 3954

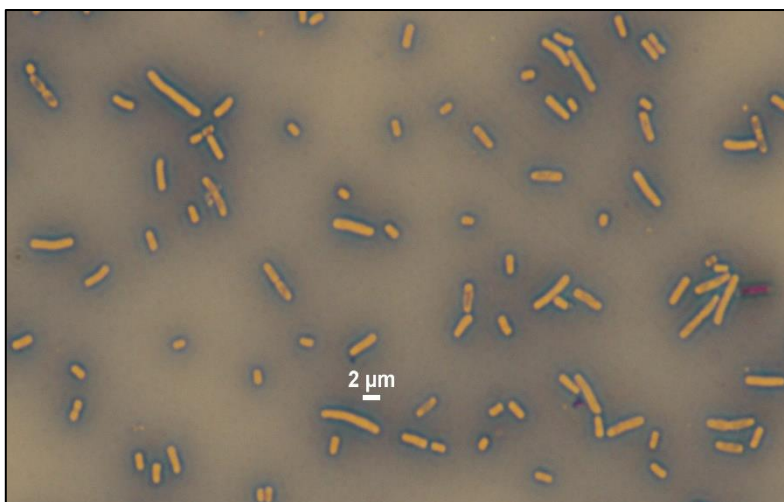
Jelikož byly zaznamenány nižší hodnoty MIC v případě *Escheria coli* (všechny tři kmeny) i u testované látky označené MoS4, byly opět zhotoveny preparáty těchto mikroorganismů. Při pozorování všech preparátů v mikroskopu byla opět možnost zahlédnout prodloužené buňky. Ve všech případech proběhlo srovnání vůči kontrolnímu preparátu.



Obrázek 15 Vliv látky MoS<sub>4</sub> na *E. coli* CCM 4517



Obrázek 16 Vliv látky MoS<sub>4</sub> na *E. coli* CCM 3954



Obrázek 17 Vliv látky MoS<sub>4</sub> na *E. coli* CCM 2024

Získané hodnoty MIC jednotlivých komplexů přechodných kovů byly následně porovnávány s hodnotami MIC vybraných antibiotik. Antimikrobiální aktivita antibiotik byla stanovena mikrodiluční agarovou metodou, stejným způsobem jako v případě komplexů přechodných kovů. K testování bylo použito šest různých antibiotik: ampicilin, amoxicilin, clindamycin, erytromycin, penicilin a tetracyclin. Stanovené hodnoty MIC antibiotik jsou uvedeny v tabulce č. 10 a 11.

Tabulka 10 Hodnoty MIC ampicilinu, erytromycinu a penicilinu

Testované bakterie	Hodnoty MIC antibiotik [μg/ml]		
	ampicilin	erytromycin	penicilin
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4227)	0,25	0,25	0,06
<i>E.coli</i> (CCM 3954)	16	32	> 8
<i>E.coli</i> (CCM 4517)	8	64	> 8
<i>E.coli</i> (CCM 2024)	8	64	> 8
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 2497)	4	16	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 1960)	> 64	64	> 8
<i>Salmonella</i> Enteritidis (CCM 4420)	> 64	128	> 8
<i>Bacillus cereus</i> (CCM 99)	> 64	128	> 8
<i>Listeria monocytogenes</i> (CCM 4699)	> 64	128	> 8
MRSA	> 64	128	> 8

Tabulka 11 Hodnoty MIC amoxicilinu, tetracyclinu, clindamycinu

Testované bakterie	Hodnoty MIC antibiotik [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
	amoxicilin	tetracyclin	clindamycin
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 4227)	> 512	16	> 32
<i>E.coli</i> (CCM 3954)	> 512	8	> 32
<i>E.coli</i> (CCM 4517)	> 512	16	> 32
<i>E.coli</i> (CCM 2024)	> 512	16	> 32
<i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 2497)	> 512	16	> 32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 1960)	> 512	> 16	> 32
<i>Salmonella</i> Enteritidis (CCM 4420)	> 512	8	> 32
<i>Bacillus cereus</i> (CCM 99)	> 512	8	> 32
<i>Listeria monocytogenes</i> (CCM 4699)	> 512	> 16	> 32
MRSA	> 512	> 16	> 32

Ze stanovených hodnot MIC lze usuzovat, že antimikrobiální aktivita vybraných komplexů přechodných kovů u testovaných bakteriálních kmenů dosahovala nízkých hodnot. Při srovnání těchto hodnot MIC s hodnotami MIC vybraných antibiotik je zřejmé, že antimikrobiální aktivita antibiotik je ještě mnohonásobně nižší.

Stanovené hodnoty MIC antibiotik, uvedené v tabulce č. 10 a 11, byly taktéž porovnány s publikovanými hodnotami. (Ge et al., 2017) (Delgado-Valverde et al., 2017) (Chalmers et al., 2010) Ve většině případů bylo dosaženo stejných, nebo alespoň přibližných hodnot. Větší odchylky byly zaznamenány při testování amoxicilinu. Vůči publikovaným hodnotám byly stanovené hodnoty několikanásobně vyšší. Příčina může spočívat v tom, že byl testován účinek samotného amoxicilinu. (Delgado-Valverde et al., 2017) Pokud by byl testován amoxicilin v kombinaci s kyselinou klavulanovou, je pravděpodobné, že by bylo dosaženo lepšího účinku a tím i nižších hodnot MIC.

Stanovené minimální inhibiční koncentrace komplexů přechodných kovů, jak již bylo zmíněno, nelze příliš srovnávat s hodnotami antibiotik. Hodnotám MIC antibiotik se

přiblížily sloučeniny označené MoS3, MoS4 a vanadylový komplex s fenanthrolinem u *Escheria coli*.

## 4 ZÁVĚR

- Cílem diplomové práce bylo stanovení antimikrobiální aktivity vybraných komplexů přechodných kovů. Jednalo se o sloučeniny vanadu, molybdenu, manganu, chromu, zinku a mědi. Testování bylo provedeno mikrodiluční agarovou metodou a byly mu podrobeny grampozitivní i gramnegativní bakterie.
- Antimikrobiální aktivita všech testovaných látek byla poměrně nízká, neboť hodnoty minimální inhibiční koncentrace se pohybovaly kolem 256 µg/ml. Nižší hodnoty MIC byly zaznamenány u látek MoS<sub>3</sub>, MoS<sub>4</sub> a vanadylového komplexu s fenantrolinem. U všech tří látek se lze setkat s přítomností N, N-chelátového fenantrolinu. Antimikrobiální účinek těchto látek se projevil pouze u *Escheria coli* CCM 3954, *Escheria coli* 4517 a *Escheria coli* 2024.
- U kmenů *Escheria coli* CCM 3954, *Escheria coli* 4517 a *Escheria coli* 2024, které byly pod vlivem látek MoS<sub>3</sub>, MoS<sub>4</sub> a vanadylového komplexu s fenantrolinem, byly zhotoveny mikroskopické preparáty. Bylo zjištěno, že působením těchto látek dochází k prodloužení jednotlivých buněk. Tuto vlastnost lze připodobnit účinkům *cis*-platiny na *E. coli*. Účinky *cis*-platiny na *E. coli* již byly ověřeny mnoha výzkumy. (Rosenberg et al., 1967) Je tedy možné mezi testovanými sloučeninami a *cis*-platinou sledovat určitou souvislost.
- Během provedené analýzy vybraných látek nebyla bohužel zjištěna předpokládaná antimikrobiální aktivita. Stanovené hodnoty MIC byly v porovnání s antibiotiky vysoké. Vzhledem k těmto výsledkům by byly významnější výzkumy zaměřené na cytostatickou aktivitu, přičemž některé sloučeniny jsou již takto testovány. Další možnost využití testovaných látek by mohla spočívat v testování jejich účinků, pokud by proběhlo cílené připojení komplexu kovů k stávajícím antibiotikům.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ALI, Junaid, Qasim A. RAFIQ a Elizabeth RATCLIFFE. Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. *Future Science OA*. 2018, **4**(4), 256-266.
2. ATAEI, Ramezan Ali, Ali MEHRABI-TAVANI, Seyed Mohammad Javad HOSSEINI, Khadijeh MORIDI a Mahdi Ghorbananli ZADEGAN. A Method for Antibiotic Susceptibility Testing: Applicable and Accurate. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2012, **5**(1), 341-345.
3. AXELRAD, Jordan E., Benjamin LEBWOHL, Edward CUARESMA, Ken CADWELL, Peter H.R. GREEN a Daniel E. FREEDBERG. Gut colonization with vancomycin-resistant Enterococcus and risk for subsequent enteric infection. *Gut Pathogens*. 2018, **10**, 28-37.
4. BACMED AST. *ASPIAG* [online]. 2019 [cit. 2019-03-14]. Dostupné z: <http://www.aspiag.cz/BacmedAST.htm>
5. BALGRADEAN, Mihaela, Anca CROITORU a Eugene LEIBOVITZ. An outbreak of hemolytic uremic syndrome in southern Romania during 2015e2016: Epidemiologic, clinical, laboratory, microbiologic, therapeutic and outcome characteristics. *Pediatrics and Neonatology*. 2019, **60**, 87-94.
6. BAYANI, Masomeh, Mana BAZIBOROUN, Zahra POORMONTASERI, Mehran SHOKRI a Tahmineh BIAZAR. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of extended spectrum beta lactamases producing Escherichia coli isolated from outpatients with Urinary Tract Infections in Babol, Northern of Iran. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. 2018, **31**(2), 61-64.
7. BEDNÁŘ, Marek, Věra FRAŇKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Triton, 1996. ISBN 80-2380-297-6.
8. BENEŠ, Jiří. *ANTIBIOTIKA: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0636-3.
9. CASEY, A.L., P.A. LAMBERT a T.S.J. ELLIOTT. Staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007, **29**(3), 23-32.
10. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

11. COX, Georgina a Gerard D. WRIGHT. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*. 2013, **303**, 287-292.
12. CRANS, Debbie C. a Thomas J. MEADE. Preface for the Forum on Metals in Medicine and Health: New Opportunities and Approaches to Improving Health. *Inorganic Chemistry*. 2013, **52**, 12181-12183.
13. CRANS, Debbie C., Kellie A. WOLL, Kestutis PRUSINSKAS, Michael D. JOHNSON a Eugenijus NORKUS. Metal Speciation in Health and Medicine Represented by Iron and Vanadium. *Inorganic chemistry*. 2013, **52**(21), 12262-12275.
14. CROES, Michiel, Shiva BAKHSHANDEH, Ingmar VAN HENGEL, et al. Antibacterial and immunogenic behavior of silver coatings on additively manufactured porous titanium. *Acta biomaterialia*. 2018, **81**, 315-327.
15. DAVIDO, Benjamin, Aurore MOUSSIEGT, Aurelién DINH, et al. Germs of thrones – spontaneous decolonization of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE) and Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) in Western Europe: is this myth or reality? *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2018, **7**, 100-108.
16. DELGADO-VALVERDE, Mercedes, Adoración VALIENTE-MENDEZ, Eva TORRES, Benito ALMIRANTE, Silvia GÓMEZ-ZORRILLA, Nuria BORRELL, Ana Isabel ALLER-GARCÍA a Mercedes GURGUI. MIC of amoxicillin/clavulanate according to CLSI and EUCAST: discrepancies and clinical impact in patients with bloodstream infections due to Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017, **72**(5), 1478-1487.
17. DERASHKAN, S., M. POURZARE a D. ROSHANI. Distribution of Virulence Factors According to Antibiotic Susceptibility among Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Infection. *INDIAN JOURNAL OF NEPHROLOGY*. 2018, **28**(3), 191-197.
18. EXENI, Ramon Alfonso, Romina Jimena FERNANDEZ-BRANDO, Adriana Patricia SANTIAGO, Gabriela Alejandra FIORENTINO, Andrea Mariana EXENI, Maria Victoria RAMOS a Marina Sandra PALERMO. Pathogenic role of inflammatory response during Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatric Nephrology*. 2018, **33**, 2057-2071.
19. FAWCETT, J. Paul, Stephen J. FARQUHAR, Robert J. WALKER, Thearoth THOU, Graham LOWE a Ailsa GOULDING. The Effect of Oral Vanadyl Sulfate on Body

- Composition and Performance in Weight-Training Athletes. *International Journal of Sport Nutrition*. 1996, **6**, 382-390.
20. FUERTES, M.A., J. CASTILLA, C. ALONSO a J.M. PERÉZ. Cisplatin Biochemical Mechanism of Action: From Cytotoxicity to Induction of Cell Death Through Interconnections Between Apoptotic and Necrotic Pathways. *Current medicinal chemistry*. 2003, **10**(3), 257-266.
  21. GAO, Tiantian, Yu DING, Qingping WU, et al. Prevalence, Virulence Genes, Antimicrobial Susceptibility, and Genetic Diversity of *Bacillus cereus* Isolated From Pasteurized Milk in China. *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY*. 2018, **9**, 533.
  22. GAO, Wei, Benjamin P HOWDEN a Timothy P STINEAR. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Current Opinion in Microbiology*. 2018, **41**, 76-82.
  23. GE, Beilei, Kelly J. DOMESLE, Qianru YANG, et al. Effects of low concentrations of erythromycin, penicillin, and virginiamycin on bacterial resistance development in vitro. *Scientific Reports*. 2017, **7**, 234-245.
  24. GHASEMIAN, Ehsan, Ali NAGHONI, B. TABARAIE a T. TABARAIE. In vitro susceptibility of filamentous fungi to copper nanoparticles assessed by rapid XTT colorimetry and agar dilution method. *Journal de Mycologie Médicale*. 2012, **22**, 322-328.
  25. GÓMEZ-RUIZ, Santiago, Danijela MAKSIMOVIC-IVANIC, Sanja MIJATOVIC a Goran N. KALUDEROVIC. On the Discovery, Biological Effects, and Use of Cisplatin and Metalloenes in Anticancer Chemotherapy. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2012, **2012**, 1-14.
  26. HARTINGER, Christian G. a Paul J. DYSON. Bioorganometallic chemistry—from teaching paradigms to medicinal applications. *The Royal Society of Chemistry*. 2008, **38**, 391-401.
  27. HAUBERT, Louise, Claudio Eduardo DOS SANTOS CRUXEN, Angela Maria FIORENTINI a Wladimir Padilha DA SILVA. Tetracycline resistance transfer from foodborne *Listeria monocytogenes* to *Enterococcus faecalis* in Minas Frescal cheese. *International Dairy Journal*. 2018, **87**, 11-15.
  28. HELLER, Andrew A. a Dana M. SPENCE. A rapid method for post-antibiotic bacterial susceptibility testing. *PLOS ONE*. 2019, **14**(1), e0210534.
  29. CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, Wioleta, Anna ZADERNOWSKA, Beata NALEPA, Magda SIERPINSKA a Łucja ŁANIEWSKA-TROKENHEIM.

- Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin e Phenotypic and genotypic antibiotic resistance. *Food Microbiology*. 2015, **46**, 222-226.
30. CHALMERS, Gabhan, Gosia K. KOZAK, Elizabeth HILLYER, Richard J. REID-SMITH a Patrick BOERLIN. Low minimum inhibitory concentrations associated with the tetracycline-resistance gene tet(C) in Escherichia coli. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 2010, **74**, 145-148.
  31. IOBBI-NOVIL, Chantal a Silke LEIMKÜHLER. Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in Escherichia coli. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013, **1823**, 1086-1101.
  32. JEUKENS, Julie, Luca FRESCHI, Irena KUKAVICA-IBRULJ, Jean-Guillaume EMOND-RHEAULT, Nicholas P. TUCKER a Roger C. LEVESQUE. Genomics of antibiotic-resistance prediction in Pseudomonas aeruginosa. *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES*. 2019, **1435**(1), 5-17.
  33. JORGENSEN, James H. a Mary Jane FERRARO. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2009, **49**(11), 1749-1755.
  34. JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1270-4.
  35. KHAN, M. Saleem, Zhong LI, Ke YANG, et al. Microbiologically influenced corrosion of titanium caused by aerobic marine bacterium Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Materials Science & Technology*. 2018, **35**, 216-222.
  36. KÖPF-MAIER, Petra a Dieter KRAHL. Tumor inhibition by metallocenes: Ultrastructural localization of titanium and vanadium in treated tumor cells by electron energy loss spectroscopy. *Chemico-Biological Interactions*. 1983, **44**(3), 317-328.
  37. LEGENDRE, Coline, Helene HANNETEL, Anne-Gaelle RANC, Widad BEZZA, Laurence PAGES, Francois VANDENESCH, Anne TRISTAN a Anne DOLEANS-JORDHEIM. Listeria monocytogenes and ocular abscess: an atypical but yet potential association. *INTERNATIONAL OPHTHALMOLOGY*. 2017, **38**(6), 2609-2616.
  38. LEWIS, Kim. Persister cells, dormancy and infectious disease. *NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY*. 2007, **5**(1), 48-56.

39. LEWIS, Kim, Abigail A. SALYERS, Harry W. TABER a Richard G. WAX. *Bacterial Resistance to Antimicrobials*. New York: Marcel Dekker, 2002. ISBN 0-8247-0635-8.
40. LI, Jun, Shuyu XIE, Saeed AHMED, et al. Antimicrobial Activity and Resistance: Influencing Factors. *FRONTIERS IN PHARMACOLOGY*. 2017, **8**, 364.
41. LIU, Jialin, Ru JIA, Enze ZHOU, Ying ZHAO, Wenwem DOU, Dake XU, Ke YANG a Tingyue GU. Antimicrobial Cu-bearing 2205 duplex stainless steel against MIC by nitrate reducing Pseudomonas aeruginosa biofilm. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2018, **132**, 132-138.
42. LO, Hsiao-Yu, Fu-Ping LAI a Yao-Jong YANG. Changes in epidemiology and antimicrobial susceptibility of nontyphoid Salmonella in children in southern Taiwan, 1997-2016. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2018, 1-7.
43. MELTER, Oto a Annika MALMGREN. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Univerzita Karlova. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2545-4.
44. MENDEL, Ralf R. Molybdenum: biological activity and metabolism. *Dalton transactions: an international journal of inorganic chemistry*. 2005, **21**, 3404-3409.
45. MENDEL, Ralf R. a Florian BITTNER. Cell biology of molybdenum. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006, **1763**, 621-635.
46. MENDEL, Ralf R. Cell biology of molybdenum. *BioFactors*. 2009, **35**(5), 429-434.
47. PESSOA, Joao Costa, Susana ETCHEVERRY a Dinorah GAMBINO. Vanadium compounds in medicine. *Coordination Chemistry Reviews*. 2015, **301**, 24-48.
48. POUCHERET, Partick, Subodh VERMA, Marc D. GRYPNPAS a John H. MCNEILL. Vanadium and diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1998, **188**, 73-80.
49. RAHMAN, Sadeeq ur, Shakoor AHMAD a Imad KHAN. Incidence of ESBL-Producing-Escherichia coli in Poultry Farm Environment and Retail Poultry Meat. *Pakistan Veterinary Journal*. 2018, **39**(1), 116-120.
50. RAMYADEVI, Jeyaraman, Kadarkaraithangam JEYASUBRAMANIAN, Arumugam MARIKANI, Govindasamy RAJAKUMAR a Abdul Abdul RAHUMAN. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Materials Letters*. 2012, **71**, 114-116.
51. RANAWAT, Preeti a Seema RAWAT. Metal-tolerant thermophiles: metals as electron donors and acceptors, toxicity, tolerance and industrial applications. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018, **25**, 4105-4133.

52. REGIEL-FUTYRA, Anna, Janusz M. DABROWSKI, Olga MAZURYK, Klaudyna SPIEWAK, Agnieszka KYZIOL, Barbara PUCELIK, Malgorzata BRINDELL a Grazyna STOCHEL. Bioinorganic antimicrobial strategies in the resistance era. *Coordination Chemistry Reviews*. 2017, **351**, 76-117.
53. SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9.
54. SHARMA, Divakar a Asad U. KHAN. Role of cell division protein divIVA in *Enterococcus faecalis* pathogenesis, biofilm and drug resistance: A future perspective by in silico approaches. *Microbial Pathogenesis*. 2018, **125**, 361-365.
55. SCHUMACHER, A., T. VRANKEN, A. MALHOTRA, J.J.C. ARTS a P. HABIBOVIC. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY & INFECTIOUS DISEASES*. 2018, **37**(2), 187-208.
56. SKOWRON, Krzysztof, Joanna KWIECIŃSKA-PIRÓG, Katarzyna GRUDLEWSKA, Agnieszka ŚWIECA, Zbigniew PALUSZAK, Justyna BAUZA-KASZEWSKA, Ewa WAŁECKA-ZACHARSKA a Eugenia GOSPODAREK-KOMKOWSKA. The occurrence, transmission, virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in fish processing plant. *International Journal of Food Microbiology*. 2018, **282**, 71-83.
57. SOBOTTA, Lukasz, Jolanta DLUGASZEWSKA, Mateusz GIERSZEWSKI, Adam TILLO, Marek SIKORSKI, Ewa TYKARSKA, Jadwiga MIELCAREK a Tomasz GOSLINSKI. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* by non-peripherally substituted magnesium phthalocyanines entrapped in lipid vesicles. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 2018, **188**, 100-106.
58. SOSNOWSKI, Maciej, Beata LACHTARA, Kinga WIECZOREK a Jacek OSEK. Antimicrobial resistance and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Poland. *International Journal of Food Microbiology*. 2019, **289**, 1-6.
59. SUBDEDI, Dinesh, Ajay Kumar VIJAY a Mark WILLCOX. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *CLINICAL AND EXPERIMENTAL OPTOMETRY*. 2018, **101**(2), 162-171.
60. SURGERS, Laure, Anders BOYD, Pierre-Marie GIRARD, Guillaume ARLET a Dominique DECREÉ. Biofilm formation by ESBL-producing strains of *Escherichia*

- coli and Klebsiella pneumoniae. *International Journal of Medical Microbiology*. 2019, **309**, 13-18.
61. TENOVER, Fred C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*. 2006, **34**(5), S3-S10.
  62. TERPILOWSKA, Sylwia, Dorota SIWICKA-GIEROBA a Andrzej Krzysztof SIWICKI. Cytotoxicity of iron (III), molybdenum (III), and their mixtures in BALB/3T3 and HepG2 cells. *Journal of veterinary research*. 2018, **62**(4), 527-533.
  63. TODOKORO, Daisuke, Hiroshi EGUCHI, Takashi SUZUKI, et al. *Genetic diversity and persistent colonization of Enterococcus faecalis on ocular surfaces*. 2018, **62**, 699-705.
  64. VAN RIJT, Sabine H. a Peter J. SADLER. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discovery Today*. 2009, **14**(23/24), 1089-1097.
  65. VEHRESCHILD, Maria J.G.T., Miriam HAVERKAMP, Lena M. BIEHL, Sebastian LEMMEN a Gerd FÄTKENHEUR. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): a reason to isolate? *Infection*. 2019, **47**(1), 7-11.
  66. VIGNAROLI, Carla, Sonia PASQUAROLI, Barbara CITTERIO, Andrea Di CESARE, Gianmarco MANGIATERRA, Daniele FATTORINI a Francesca BIAVASCO. Antibiotic and heavy metal resistance in enterococci from coastal marine sediment. *Environmental Pollution*. 2018, **237**, 406-413.
  67. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2001. ISBN 80-902896-2-2.
  68. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.
  69. VOTAVA, Miroslav a kolektiv. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.
  70. WERNER, Guido, Teresa M. COQUE, Charles M.A.P. FRANZ, Elisabeth GROHMANN, Kristin HEGSTAD, Lars JENSEN, Willem VAN SCHAIK a Keith WEAVER. Antibiotic resistant enterococci—Tales of a drug resistance gene trafficker. *International Journal of Medical Microbiology*. 2013, **303**, 360-379.
  71. XU, Jinacheng, Chaoying YAN, Wang LIQIANG a Qi ZHOU. Changes of Antimicrobial Resistance among Coagulase-Negative Staphylococci Isolated in 8 Consecutive Years in the First Bethune Hospital. *Elsevier Science BV*. 2012, **33**, 1190-1193.

72. YOON, Ki-Young, Jeong Hoon BYEON, Jae-Hong PARK a Jungho HWANG. Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment*. 2007, **373**, 572-575.
73. ZHU, Yuanting, Haimei LAI, Likou ZOU, et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in Salmonella strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. *International Journal of Food Microbiology*. 2017, **259**, 43-51.



## ZDROJE OBRÁZKŮ

[obrázek 1] LI, Jun, Shuyu XIE, Saeed AHMED, et al. Antimicrobial Activity and Resistance: Influencing Factors. *FRONTIERS IN PHARMACOLOGY*. 2017, **8**, 364.

[obrázek 2] JORGENSEN, James H. a Mary Jane FERRARO. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2009, **49**(11), 1749-1755.

[obrázek 3] SCHUMACHER, A., T. VRANKEN, A. MALHOTRA, J.J.C. ARTS a P. HABIBOVIC. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY & INFECTIOUS DISEASES*. 2018, **37**(2), 187-208.

[obrázek 4] JORGENSEN, James H. a Mary Jane FERRARO. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2009, **49**(11), 1749-1755.

[obrázek 5] JORGENSEN, James H. a Mary Jane FERRARO. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2009, **49**(11), 1749-1755.

[obrázek 6] GÓMEZ-RUIZ, Santiago, Danijela MAKSIMOVIC-IVANIC, Sanja MIJATOVIC a Goran N. KALUDEROVIC. On the Discovery, Biological Effects, and Use of Cisplatin and Metalloenes in Anticancer Chemotherapy. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2012, **2012**, 1-14.

[obrázek 7] MENDEL, Ralf R. Cell biology of molybdenum. *BioFactors*. 2009, **35**(5), 429-434.