

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko – technologická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2024

Bc. Alexandra Lhotská

UNIVERZITA PARDUBICE
Fakulta chemicko – technologická

**Stanovení antimikrobiální aktivity vybraných sulfonamidových
derivátů**

Bc. Alexandra Lhotská

Diplomová práce

2024

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Alexandra Lhotská**
Osobní číslo: **C22373**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Stanovení antimikrobiální aktivity vybraných sulfonamidových derivátů**
Téma práce anglicky: **Determination of Antimicrobial Activity of Selected Sulfonamide Derivatives**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Zpracujte literární rešerši věnující se biologické aktivitě popsaných sulfonamidových derivátů

Experimentální část:

1. Připravte v potřebném množství vybrané sulfonamidové deriváty.
2. U připravených derivátů proveďte stanovení antimikrobiálních aktivit mikrodiluční metodou.
3. Stanovené minimální inhibiční koncentrace porovnejte s účinky běžně používaných antibiotik na bázi sulfonamidů.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Vladimír Pejchal, Ph.D.**
Ústav organické chemie a technologie
Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

LS.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlášení

Prohlašuji:

Tuto práci s názvem Stanovení antimikrobiální aktivity vybraných sulfonamidových derivátů jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10.5.2024

Bc. Alexandra Lhotská

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Vladimíru Pejchalovi, Ph.D. a konzultantce doc. Ing. Marcele Pejchalové, PhD. za cenné rady, věnovaný čas, ochotu a trpělivost při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Ivetě Brožkové, PhD za poskytnuté mikroorganismy. Dále chci poděkovat rodině za podporu během celé doby studia.

V Pardubicích dne 10.5.2024

Bc. Alexandra Lhotská

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá v teoretické části sulfonamidy a antimikrobiální rezistencí a problémy s ní spojené. Praktická část se skládá ze syntézy sulfonamidových derivátů. Poté jsou jednotlivé deriváty testovány, zda jsou schopny inhibovat růst různých mikroorganismů a v jaké minimální koncentraci. Mikrobiologická část se řídí normou ČSN EN ISO 20776–1 ED. 2.

KLÍČOVÁ SLOVA

sulfonamidy, sulfonamidové deriváty, antimikrobiální rezistence, minimální inhibiční koncentrace, MIC

TITLE

Determination of Antimicrobial Activity of Selected Sulfonamide Derivates

ANNOTATION

The theoretical part of this thesis deals with sulfonamides and antimicrobial resistance and the problems associated with it. The practical part consists of the synthesis of sulfonamide derivatives. The individual derivatives are tested for their ability to inhibit the growth of various microorganisms and at what minimum concentration. The microbiological part is governed by the standard ČSN EN ISO 20776–1 ED. 2.

KEYWORDS

sulfonamides, sulfonamide derivatives, antimicrobial resistance, minimum inhibitory concentrations, MIC

OBSAH

| | |
|--|----|
| OBSAH | 8 |
| SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK | 11 |
| SEZNAM ILUSTRACÍ | 12 |
| SEZNAM GRAFŮ | 13 |
| SEZNAM TABULEK | 14 |
| SEZNAM REAKČNÍCH SCHÉMAT | 15 |
| ÚVOD | 16 |
| TEORETICKÁ ČÁST | 17 |
| 1 Sulfonamidy | 17 |
| 1.1 Historie | 17 |
| 1.2 Struktura | 17 |
| 1.3 Biologická aktivita | 18 |
| 1.3.1 Antibakteriální aktivita | 18 |
| 1.3.1.1 Využívaná sulfonamidová antibiotika | 19 |
| 1.3.2 Léčba nádorových onemocnění | 20 |
| 1.3.3 Léčba Alzheimerovy choroby | 21 |
| 1.3.4 Léčba diabetu | 22 |
| 1.3.5 Protizánětlivé účinky | 22 |
| 1.3.6 Léčba revmatoidní artritidy | 22 |
| 1.4 Syntéza | 23 |
| 2 Antimikrobiální rezistence | 25 |
| 2.1 Rozdělení | 27 |
| 2.2 Mechanismus účinku | 30 |
| 2.2.1 Chemické modifikace antibiotik | 30 |
| 2.2.2 Modifikace cíle antibiotik | 31 |
| 2.2.3 Snížení propustnosti vnější bakteriální membrány | 31 |

| | | |
|---------------------|--|----|
| 2.2.4 | Efluxní pumpy | 32 |
| 2.2.5 | Modifikace enzymů aktivující antibiotika | 32 |
| 2.3 | Selhání antibiotik | 32 |
| 2.3.1 | Biofilm | 33 |
| 2.3.2 | Sepse | 34 |
| 2.3.3 | Oslabená imunita pacienta a hostitelská obrana | 34 |
| 2.3.4 | Mikrobiom | 36 |
| 2.4 | Antimikrobiální rezistence na sulfonamidy | 36 |
| 2.5 | Metody sledování rezistence | 37 |
| 2.5.1 | Fenotypové metody | 37 |
| 2.5.2 | Genotypové metody | 40 |
| 2.5.3 | MALDI – TOF MS | 41 |
| 2.6 | Budoucnost | 42 |
| EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | | 45 |
| CÍL PRÁCE | | 45 |
| 3 | Syntéza látek | 45 |
| 4 | Stanovení minimální inhibiční koncentrace | 48 |
| 4.1 | Přístrojové a laboratorní vybavení | 48 |
| 4.2 | Materiál | 48 |
| 4.2.1 | Kultivační půdy a bujóny | 48 |
| 4.2.2 | Reagencie a pracovní roztoky | 50 |
| 4.2.3 | Bakteriální kmeny | 50 |
| 4.2.4 | Antimikrobiální látky | 51 |
| 4.3 | Pracovní postup | 51 |
| 4.4 | Výsledky stanovení MIC | 54 |
| 4.4.1 | 4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid | 54 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.4.2 | 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid | 55 |
| 4.4.3 | 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid | 56 |
| 4.4.4 | 4 - ((3-fluor-4-methylfenyl) sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid | 57 |
| 4.4.5 | 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid | 58 |
| 4.4.6 | 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid | 59 |
| 4.4.7 | 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid | 60 |
| 4.4.8 | 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid | 61 |
| 4.4.9 | Sulfamethoxazol | 62 |
| 4.4.10 | Účinnost derivátů vůči <i>Candida albicans</i> | 63 |
| 4.4.11 | Účinnost derivátů vůči <i>Candida glabrata</i> | 64 |
| 4.4.12 | Účinnost derivátů vůči <i>Candida krusei</i> | 65 |
| 4.4.13 | Účinnost derivátů vůči <i>Candida tropicalis</i> | 66 |
| 4.4.14 | Účinnost derivátů vůči <i>Enterococcus faecalis</i> | 67 |
| 4.4.15 | Účinnost derivátů vůči <i>VRE</i> | 68 |
| 4.4.16 | Účinnost derivátů vůči <i>Escherichia coli</i> | 69 |
| 4.4.17 | Účinnost derivátů vůči <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 70 |
| 4.4.18 | Účinnost derivátů vůči <i>Staphylococcus aureus</i> | 71 |
| | DISKUSE | 72 |
| | ZÁVĚR | 79 |
| | POUŽITÁ LITERATURA | 80 |

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

| | |
|---------|---|
| ACh | acetylcholin |
| AD | Alzheimerova choroba |
| AMK | aminokyseliny |
| AMR | antimikrobiální rezistence |
| ATB | antibiotikum |
| AST | testování antimikrobiální citlivosti |
| CCM | Česká sbírka mikroorganismů |
| CFU | jednotky tvořící kolonie |
| ChEs | cholinesterasa |
| CM | cytoplazmatická membrána |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| IL | interleukin |
| KATP | ATP – senzitivní draslíkový kanál |
| LPS | lipopolysacharid |
| MBC | minimální baktericidní koncentrace |
| MIC | minimální inhibiční koncentrace |
| NFT | neurofibrální klubko |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| PEG 400 | polyethylenglykol 400 |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| VRE | vankomycin rezistentní <i>Enterococcus faecalis</i> |

SEZNAM ILUSTRACÍ

| | |
|---|----|
| Obrázek 1 - schéma primární, sekundární a terciální struktury sulfonamidů..... | 18 |
| Obrázek 2 - schéma mechanismu působení sulfonamidů..... | 19 |
| Obrázek 3 - schéma obecné přípravy sulfonamidů | 23 |
| Obrázek 4 - schéma syntézy sulfonamidů v průtokovém systému..... | 24 |
| Obrázek 5 - schéma elektrochemické syntézy sulfonamidů v průtokovém systému ... | 25 |
| Obrázek 6 - rozdíly mezi buněčnými obaly gramnegativní a grampozitivní bakterie . | 27 |
| Obrázek 7 - schéma makrodiluční bujónové metody | 38 |
| Obrázek 8 - disková difuzní metoda..... | 39 |
| Obrázek 9 – E-test | 39 |
| Obrázek 10 - určení prioritních patogenů antimikrobiální rezistence WHO..... | 43 |
| Obrázek 11 - schéma základní používané mikrotitrační destičky | 53 |

SEZNAM GRAFŮ

| | |
|---|----|
| Graf 1 - účinnost sulfonamidových derivátů vůči <i>Candida albicans</i> | 63 |
| Graf 2 - účinnost sulfonamidových derivátů vůči <i>Candida glabrata</i> | 64 |
| Graf 3- účinnost sulfonamidových derivátů vůči <i>Candida krusei</i> | 65 |
| Graf 4 - účinnost sulfonamidových derivátů vůči <i>Candida tropicalis</i> | 66 |
| Graf 5 - účinnost sulfonamidových derivátů vůči <i>Enterococcus faecalis</i> | 67 |
| Graf 6 - účinnost sulfonamidových derivátů vůči VRE..... | 68 |
| Graf 7 - účinnost sulfonamidových derivátů vůči <i>Escherichia coli</i> | 69 |
| Graf 8 - účinnost sulfonamidových derivátů vůči <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 70 |
| Graf 9 - účinnost testovaných derivátů vůči <i>Staphylococcus aureus</i> | 71 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| Tabulka 1 - přehled navázaných substituentů na jednotlivých sulfonamidových derivátech | 47 |
| Tabulka 2 - účinnost 4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu | 54 |
| Tabulka 3 - účinnost 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu..... | 55 |
| Tabulka 4 - účinnost 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu..... | 56 |
| Tabulka 5 - účinnost 4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu..... | 57 |
| Tabulka 6 - účinnost 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu..... | 58 |
| Tabulka 7 - účinnost 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu..... | 59 |
| Tabulka 8 - účinnost 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu..... | 60 |
| Tabulka 9 - účinnost 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu..... | 61 |
| Tabulka 10 - účinnost sulfomethoxazolu | 62 |

SEZNAM REAKČNÍCH SCHÉMAT

| | |
|--|----|
| Schéma 1 - reakční schéma syntézy sulfonamidových derivátů | 46 |
| Schéma 2 - 4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid | 54 |
| Schéma 3 - 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid | 55 |
| Schéma 4 - 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4- (morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid..... | 56 |
| Schéma 5 - 4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4- (morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid..... | 57 |
| Schéma 6 - 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4- (morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid..... | 58 |
| Schéma 7 - 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid | 59 |
| Schéma 8 -4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid | 60 |
| Schéma 9 - 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid | 61 |
| Schéma 10 – sulfomethoxazol..... | 62 |
| Schéma 11 – vzorec studovaných sulfonamidových derivátů bez zabudované 4 – aminobenzoové kyseliny | 72 |
| Schéma 12 – vzorec studovaných sulfonamidů se zabudovanou 4 – aminobenzoovou kyselinou..... | 73 |

ÚVOD

Každé úspěšné používání nového léku je ohroženo možným rozvojem tolerance nebo až dokonce rezistence vůči dané látce, a to již od okamžiku jejího prvního podání. Toto platí jak pro látky, které se používají při léčbě bakteriálních, plísňových, parazitárních a virových infekcí, ale také při léčbě chronických onemocnění jako je rakovina nebo diabetes mellitus. Za rezistenci je zodpovědná celá řada biochemických a fyziologických mechanismů.

Konkrétním příkladem jsou antimikrobiální látky, které byly považovány za jeden ze zázračných objevů 20. století. Vývoj antibiotik způsobil revoluci v léčbě bakteriálních infekcí a zachránil spoustu životů.

Vznik a rozvoj antimikrobiální rezistence je alarmující. Lékaři a experti varují před návratem předantibiotického období. Databáze uvádí u bakterií existenci více než 20 000 potenciálních genů rezistence. Většina mezinárodních, národních i lokálních organizací si tento závažný problém uvědomuje. Bylo předloženo mnoho doporučení a zpráv, které byly bezvýsledné.

Proto je důležité, aby dvě hlavní části výzkumu pokračovaly nejenom na akademické půdě, ale i ve farmaceutickém průmyslu. První částí je pochopení genetického základu, vzniku a mechanismů antimikrobiální rezistence. Druhou pak neustálý vývoj nových antibiotik a chemoterapeutik nebo i dalších látek s antimikrobiálním účinkem.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Sulfonamidy

1.1 Historie

První zmínka o sulfonamidech jako antibakteriálních látkách byla zaznamenána v roce 1936 vědcem Gerhardem Domagkem, který objevil, že průmyslově vyráběné barvivo nesoucí název Prontosil dokáže vyléčit infekce u myší (Dineshkumar, et al., 2018). Následně tímto barvivem léčil i svou těžce nemocnou dceru, protože její streptokoková infekce neodpovídala na žádnou léčbu (Dineshkumar, et. al., 2018; Yousef, et. al., 2018).

Stejného roku Ernest Fourneau objevil prontosilovou dráhu v lidském těle, která přeměňuje toto barvivo na sulfanilamid, který je účinnou antimikrobiální látkou (Yousef, et. al., 2018).

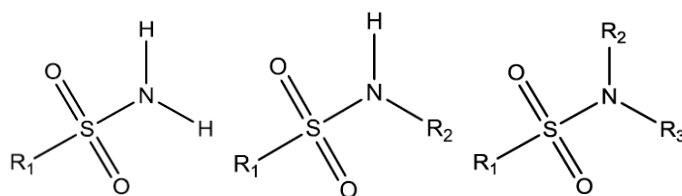
Díky těmto objevům začaly vznikat nové antibakteriální léky odvozené z této chemické struktury. Příkladem může být sulfapyridin proti pneumonii, který byl objeven v roce 1938, nebo sulfacetamid proti infekcím močových cest, jehož objevení se datuje roku 1941 (Yousef, et. al., 2018).

Sulfonamidy se nakonec staly velmi využívanou skupinou antibiotik. V klinické praxi se začaly využívat roku 1968 (Dineshkumar, et. al., 2018). Pro klinická použití se využívá přes 30 léčiv zahrnující léky jako jsou antimykotika (Ezabadi, et. al., 2008), antihypertenziva, antibiotika (ATB), protizánětlivé léky, inhibitory karboanhydras a další (Dineshkumar, et. al., 2018; Kolaczek, et. al., 2014). Sulfonamidy jsou také účinnou složkou léků, které pomáhají v léčbě revmatoidní artritidy (Levin, et. al., 2002), mužské erektilní dysfunkce (Kim, et. al., 2001), obezity (Hu, et al., 2001), akutního dekompenzovaného srdečního selhání (Kemp – Harper, et al., 2016), močových, střevních a očních infekcí. Novější deriváty jsou využívány v léčbě nádorových onemocnění a Alzheimerovy choroby (Kolaczek, et. a., 2014).

1.2 Struktura

Sulfonamidy jsou sloučeniny obsahující skupinu SO_2NH_2 . Podle substituce dusíku je můžeme klasifikovat jako primární, sekundární a terciární. Tyto jednotlivé struktury můžeme vidět na obrázku 1 (z levé strany primární, sekundární a terciální sulfonamid) Jednotlivá R na

obrázku znázorňují substituenty, které mohou být alkylem, arylem, vodíkem, nebo jakýmkoliv dalším substituentem (Dineshkumar, et. al., 2018).



Obrázek 1 - schéma primární, sekundární a terciální struktury sulfonamidů

převzato z: (Dineshkumar, et al., 2018)

1.3 Biologická aktivita

Společné chemické struktury přítomné v sulfonamidových derivátech jsou spojeny s velkým množstvím biologických aktivit. Biologická aktivita jednotlivých sulfonamidů je závislá na navázaných substituentech. A to tak, že pokud je na obecnou strukturu navázán aromatický amin, tak má látka antibakteriální účinky. Při absenci tohoto aminu látky nevykazují antibakteriální účinky. Navíc jsou sulfonamidy a jejich deriváty obecně stabilní, snadno připravitelné a biologicky dostupné, což může do značné míry vysvětlit velké množství léčiv obsahující tyto chemické struktury (Supuran, 2017).

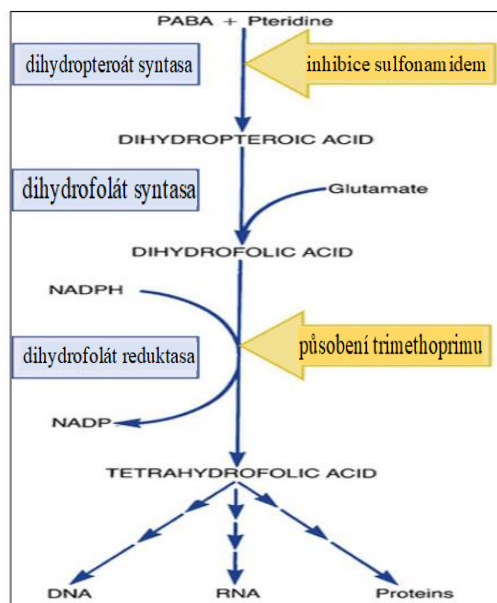
1.3.1 Antibakteriální aktivita

Bakterie využívají kyselinu listovou jako jednu ze základních buněčných složek. Její syntéza je založena na přeměně kyseliny p – aminobenzoové (PABA) pomocí enzymu dihydropteroát syntasy na kyselinu listovou. Kyselina listová je následně přeměňována pomocí dihydrofolát reduktasy na její aktivní formu kyselinu folinovou. V této aktivní formě se kyselina účastní buněčného cyklu a dalších buněčných pochodů (Christensen, 2021).

Při léčbě sulfonamidy se využívá jejich strukturní podobnosti s kyselinaou p – aminobenzoovou. Sulfonamidy kompetitivně inhibují reakci katalyzovanou dihydropteroát syntasou (obr. 2) a nedochází tak ke vzniku kyseliny listové (Christensen, 2021; Hassanein, 2019).

Tato inhibice enzymů má za následek inhibici biogeneze purinových bází, které jsou stavebními kameny nukleových kyselin. To vede k narušení replikace deoxyribonukleové kyseliny (DNA), syntézy proteinů, schopnosti buňky se replikovat a následné buněčné smrti (Hassanein, 2019).

Sulfonamidová antibiotika jsou důležitou třídou antibiotik. Účinně působí proti grampozitivním bakteriím a části gramnegativních bakterií. Mezi citlivé gramnegativní bakterie patří druhy *Klebsiella*, *Salmonella*, *Neisseria*, *Shigella*, *Escherichia coli* a *Enterobacter*. Sulfonamidy se využívají k léčbě angíny, septikémie, meningokokové meningitidy, bacilární úplavice, infekcí močových cest a dalších onemocnění. Dalším důvodem využívání sulfonamidů jako antibiotik je to, že výrazně neovlivňují antigenní vlastnosti infekčního organismu ani tvorbu specifických protilátek (Ovung, et. al., 2021)



Obrázek 2 - schéma mechanismu působení sulfonamidů

převzato a upraveno z: (Dineshkumar, et al., 2018)

PABA = kyselina p – aminobenzoová

dihydropteroic acid = kyselina dihydropterová (meziprodukt)

dihydrofolic acid = kyselina dihydrofolistová (derivát kys.listové)

tetrahydrofolic acid = kyselina folinová

1.3.1.1 Využívaná sulfonamidová antibiotika

Sulfomethoxazol je součástí využívaného ATB Cotrimoxazol. Cotrimoxazol obsahuje kromě sulfonamidu také trimethoprim. Cotrimoxazol se užívá proti infekcím, které jsou způsobené mikroorganismy citlivými na trimethoprim a sulfomethoxazol. Mezi tyto infekce se řadí: infekce horních a dolních dýchacích cest, zápal plic, infekce ušní, krční a nosní, dále infekce ledvin a močových cest, infekce pohlavních orgánů, trávicího traktu atd. Sulfomethoxazol se vyskytuje jako účinná látka v dalších léčivých přípravcích, a to v Biseptolu a Sumetrolimu (Sulfomethoxazol, 2024).

Sulfadiazin je sulfonamidový derivát, který se prodává pod komerčním názvem Ialugen plus. Lék obsahuje sulfadiazin ve formě stříbrné soli a hyaluronát sodný. Ve 100 g krému se

nachází 1 g sulfadiazinu. Sulfadiazin účinkuje proti mikroorganismům, které mohou kontaminovat popáleninové rány. Mezi tyto mikroorganismy patří *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans*. Přípravek je určený pro léčbu lokálních poranění (Ialugen plus, 2019).

Posledním klinicky využívaným sulfonamidovým ATB je sulfacetamid. Samotný sulfacetamid má nežádoucí vedlejší účinky (Sulfacetamide, 2024), a proto je využíván ve formě monohydrátu sulfacetamidu sodného. Je účinný proti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* a další (Sulphacetamide polpharma, 2020).

1.3.2 Léčba nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění jsou jedním z hlavních důvodů úmrtí na světě. V celosvětovém měření si vyžádají více než 7 milionů životů ročně. V momentální době žádné léky ani postupy nenabízejí úplnou kontrolu nad léčbou rakoviny. Využívané léky se vyznačují svými pozitivními účinky na léčbu, ale i svou významnou toxicitou. Léčba sice ničí nádorové buňky, ale zároveň často má vedlejší a nežádoucí účinky jako je nevolnost, vypadávání vlasů a oslabená funkce imunitního systému (Babalola, et. al., 2024). Mezi přesvědčivé argumenty pro vývoj nových způsobů léčby rakoviny patří genotoxicita a vznikající rezistence. Vznik rezistence je tak významný, že dochází k nepřetržitému vývoji dalších látek s protinádorovou aktivitou, vysokou účinností a nízkou toxicitou (Babalola, et. al., 2024; Schirmacher, 2018).

Léčba se historicky vyvíjela. Primární možností bylo chirurgické odstranění nádoru. Následoval rozvoj radiační terapie, chemoterapie a biologické léčby. I přes dostupnost těchto léčebných postupů studie ukazují, že sulfonamidové deriváty mohou být slibnou terapií. Tato terapie může potenciálně cílit na rakovinné buňky účinněji a s menšími nežádoucími účinky (Schirmacher, 2018; Wan, et. al., 2021).

Příkladem je rakovina prsu, která patří mezi závažné malignity. Toto onemocnění ohrožuje životy žen různých věkových skupin po celém světě. Většina těchto nádorů je u postmenopauzálních žen podporována vysokými koncentracemi estrogenů. Estrogeny jsou steroidní pohlavní hormony, které jsou syntetizovány z androgenů pomocí enzymu aromatasy (Pingaew, et. al., 2015). Inhibice aromatasy a tím snížení hladiny estrogenů je účinnou strategií pro léčbu rakoviny prsu. Sulfonamidy vykazují signifikantní inhibiční aktivitu aromatasy, aniž by působily na zdravé buňky cytotoxicky. Bylo zjištěno, že inhibitory aromatasy také mají méně vedlejších účinků na dělohu a cévy (Palmieri, et. al., 2014; Pingaew, et. al., 2015).

Karboanhydrasy pomáhají nádorovým buňkám k adaptaci na nádorové mikroprostředí a k proliferaci nezávislé na růstových faktorech. Díky inhibici tohoto enzymu pomocí

sulfonamidových derivátů lze zabránit adaptaci a proliferaci a zároveň navodit apoptózu (Wan, et. al., 2021).

Mitochondriálně zprostředkovaná apoptóza hraje významnou roli v rozvoji nádorových onemocnění. Skupina proteinů Bcl – 2 má důležitou regulační funkci. Podle jejich struktury a funkce je můžeme rozdělit na proapoptotické proteiny jako jsou Bax, Bak a antiapoptotické proteiny jako například protein Bcl – 2. Pokud dojde ke zvýšené expresi antiapoptických proteinů, získávají tím nádorové buňky odolnost vůči chemoterapii. Proto jsou tyto proteiny považovány za budoucí cíl léčby (Wan, et. al., 2021).

1.3.3 Léčba Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba (AD) je jednou z nejčastějších neurodegenerativních poruch centrálního nervového systému. AD je charakterizována několika patologickými procesy jejichž hlavními rysy jsou: akumulace a agregace abnormálních extracelulárních depozit amyloid – beta peptidu a intracelulárních depozit nazývaných neurofibrální klubka (NFT). NFT jsou složena z hyperfosforylovaného tau proteinu. Akumulace těchto proteinů a následná tvorba senilních plaků je spojená s patogenezí (Dakhlaoui, et. al., 2023). Dochází k hyperfosforylaci tau proteinu při nerovnováze mezi fosforylací a defosforylací, které jsou regulovány kinasami a fosfatasami (Liu, et. al., 2020). To následně vede ke vzniku NFT a neurální toxicitě, která má za následek progresivní ztrátu cholinergních neuronů, poruchy paměti a kognitivních funkcí. To vše je spojené se sníženou koncentrací neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) a jeho nadměrné degradaci (Dakhlaoui, et. al., 2023).

ACh je hydrolizován cholinesterasami (ChEs) na cholin a kyselinu octovou. Obratlovci mají dva druhy ChEs a to acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu. Acetylcholinesterasa je zodpovědná za hydrolýzu ACh v cholinergních mozkových synapsích a nervosvalových spojích. Butyrylcholinesterasa má nejspíše pouze podpůrnou roli (Dakhlaoui, et. al., 2023).

Bohužel dosud nebyly objeveny léky bez vedlejších účinků. Jednou z nejznámějších metod pro léčbu AD je inhibice ChEs. Tato inhibice vede k navýšení koncentrace ACh a tím ke zlepšení kognitivních funkcí. Navzdory významnému vývoji v této oblasti pacienti stále trpí nežádoucími účinky. V různých studiích se syntetizují a neustále testují nové deriváty mající signifikantní inhibiční úroveň a dají se považovat za slibné inhibitory ChEs bez vedlejších účinků (Ganeshpurkar, et. al., 2022; Girisha, et. al., 2009; Yamali, et. al., 2020).

1.3.4 Léčba diabetu

Mezi hypoglykemika můžeme zařadit sulfonylmočovinu, která obsahuje sulfonamidovou funkční skupinu. Jsou to léky, které se široce využívají k léčbě diabetu 2. typu. Stimulují sekreci inzulínu z β – buněk pankreatu. Jejich hlavním cílem působení je ATP – senzitivní draslíkový kanál (KATP), který hraje hlavní roli při kontrole membránového potenciálu β – buněk. Po inhibici KATP kanálu glukózou nebo sulfonylmočovinou dochází k depolarizaci membrány β – buněk pankreatu. Po depolarizaci dochází k otevření napěťově řízených Ca^{2+} kanálů, což vede ke zvýšení koncentrace intracelulárního Ca^{2+} v buňkách pankreatu. Zvýšení koncentrace intracelulárního Ca^{2+} stimuluje exocytózu sekrečních granul, které obsahují inzulín. Výsledkem je zvýšení hladiny inzulínu v krvi (Proks, et. al., 2002).

KATP kanály se ve velkém množství nacházejí v několika dalších typech buněk. A to v srdečním, hladkém a kosterním svalstvu a v některých mozkových neuronech. V reakci na metabolický stres dochází ve všech těchto tkáních k otevření KATP kanálů. Následuje inhibice elektrické aktivity. Výsledkem bývá srdeční nebo mozková ischemie. Tyto kanály jsou také důležité pro neuronální regulaci homeostázy glukózy. Dále pro regulaci záchvatů a pro kontrolu tonusu hladkého svalstva cév (Proks, et. al., 2002).

1.3.5 Protizánětlivé účinky

Nesteroidní protizánětlivé léky jsou široce používány při léčbě zánětlivých onemocnění a patří mezi nejčastěji využívané léky na světě. Tyto léky inhibují izoenzymy cyklooxygenasy, které přeměňují kyselinu arachidonovou na prostaglandiny. Prostaglandiny jsou důležité mediátory zánětu. Při inhibici následně dochází k ústupu zánětu a snížení edému (Supuran, et. al., 2019).

1.3.6 Léčba revmatoidní artritidy

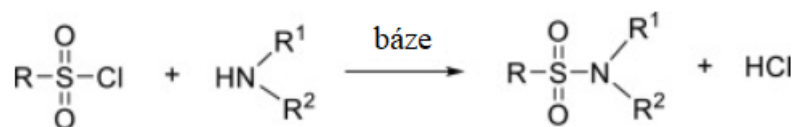
Sulfasalazin je léčivo používané k léčbě revmatoidní artritidy. Podrobný popis jeho mechanismu účinku není zcela objasněn, stejně jako imunologické a patologické mechanismy, které se podílejí na vzniku revmatoidní artritidy. Mezi prokázané účinky patří inhibice uvolňování cytokinů (konkrétně interleukinu (IL) IL – 1, IL – 2, IL – 6, IL – 12, a tumor necrosis factor α) a inhibice produkce IgM a IgG. Studie ukazují, že zlepšený stav pacienta koresponduje se sníženými hodnotami těchto molekul. Jeho dalším účinkem je inhibice chemotaxe zánětlivých buněk a snižuje produkci superoxidu a proteolytických enzymů (Plosker, et. al., 2012)

1.4 Syntéza

Sulfonamidy jsou důležitou chemickou strukturou ve farmaceutickém i agrochemickém průmyslu. Proto jsou neustále vyvíjeny nové postupy a metody pro jejich syntézu.

Sulfonamidy se obecně připravují nukleofilní reakcí aminosloučenin se sulfonylchloridy za přítomnosti báze. Jako vedlejší produkt vzniká kyselina chlorovodíková. Obecný postup lze vidět na obrázku 3. Výhodou tohoto postupu je dobrá reaktivita a jednoduchost (Mondal, et al.,2020).

Tento postup má nevýhody. Při reakci vzniká HCl jako vedlejší produkt a je zapotřebí dalších organických amidových bazí k jejímu vycytávání. Dalšími nevýhodami jsou vysoké teploty (potřebné pro méně reaktivní substráty) a pracné čištění (při vzniku nežádoucích vedlejších produktů) (Mondal, et al.,2020). Poslední nevýhodou je používání sulfonylchloridů. Tyto látky jsou nestabilní, toxické a nejsou běžně dostupné (Gioiello, et al.,2013). K syntéze sulfonamidů je také možné využít thioly (nepříjemný zápach) místo sulfonylchloridů (Vicente, et al., 2020).



Obrázek 3 - schéma obecné přípravy sulfonamidů

převzato a upraveno z: (Mondal, et al., 2020)

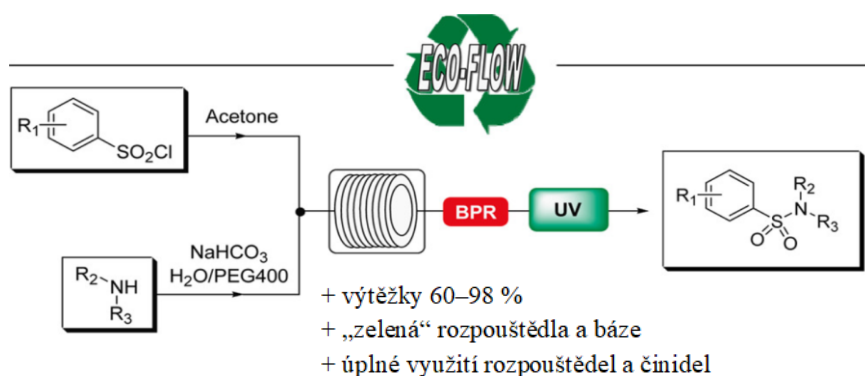
Většina přístupů v přímé syntéze sulfonamidů využívá toxické, nestabilní výchozí látky a rozpouštědla (Eid, et al., 2018).

Ekologickou možností pro přímou syntézu sulfonamidů je reakce nitroarenů (zdroj dusíku) a solí siřičitanů sodného (zdroj síry). Tyto výchozí látky jsou ve stechiometrickém poměru. Reakce probíhá ve vodě, ve které je rozpuštěn NaHSO₃. Dalšími podmínkami jsou: teplota 60°C a doba trvání 3 hodiny. Výsledné produkty nejsou ve vodě rozpustné. To umožňuje snadnou separaci výsledných produktů pomocí filtrace. Díky tomu, jakým způsobem je metoda poskládána, není potřeba k separaci jednotlivých sulfonamidů využít organická rozpouštědla ani chromatografii. Výsledné produkty mají vysokou čistotu a dobré výtěžky (Eid, et al., 2018).

Dalším příkladem je syntéza sulfonamidů v průtokovém systému. V reakci reaguje amid a sulfonylchlorid za přítomnosti NaHCO₃. NaHCO₃ je rozpuštěný ve směsi vody, acetonu a polyethylenglykolu 400 (PEG 400) v poměru 1:2:1. PEG 400 se do směsi přidává jako organické rozpouštědlo pro správné fungování průtokového systému (Gioiello, et al.,2013).

Průtokový systém využívá průtokový mezoreaktor s dvousmyčkovým vstřikovacím systémem, dvě čerpadla, dva zásobníky, reaktor, regulátor tlaku, UV detektor a sběrač frakcí (Gioiello, et al., 2013).

Tato metoda má relativně vysoké výtěžky syntetizovaných sulfonamidů. Sulfonamidy vznikají s čistotou přesahující 95 %. Po syntéze není potřeba další čištění výsledných produktů. Na obrázku číslo 4 můžeme vidět schéma této metody (Gioiello, et al., 2013).



Obrázek 4 - schéma syntézy sulfonamidů v průtokovém systému

převzato a upraveno z: (Gioiello, et al., 2013)

Syntéza sulfonamidů může probíhat pomocí tzv. přechodných kovů, jako je Pd, Rh, Cu, Ni a Fe. Tyto kovy slouží jako katalyzátory k překonání problémů klasické syntézy (Mondal, et al., 2020).

Komplexy s Pd mají vyšší chemickou stabilitu, a proto se využívají jako katalyzátory při oxidačních reakcích. Syntéza sulfonamidů probíhá tak, že se (hetero)arylhálogenid přeměňuje na sulfinátový meziprodukt. Sulfinátový meziprodukt následně reaguje s aminem za vzniku sulfonamidu. Konkrétním příkladem je syntéza významného sulfonamidu – sildenafilu. Sildenafil je lék na erektilní dysfunkci prodáváný pod komerčním názvem Viagra (Shavnya, et al., 2013).

Cu se využívá při syntéze sulfonamidů, které vznikají reakcí siřičitanů sodných a aminů. Reakce probíhá v roztoku dimethylsulfoxidu (oxidační činidlo), ve kterém je rozpuštěn bromid měďnatý (katalyzátor). Tato metoda má dobré výtěžky, které mohou dosahovat až 90 % (Tang, et al., 2013). Cu je využívána jako katalyzátor i v dalších syntézách. V těchto syntézách se využívá ve formě CuI_2 (Deng, et al., 2005) nebo CuO (Tan, et al., 2014).

Další možností pro syntézu sulfonamidů jsou metody elektrochemické. Jednotlivé metody mají několik různých modifikací. Mají taky několik společných znaků: 1. využití méně toxických látek, 2. jsou ekologičtější, 3. mají relativně vysoké výtěžky, 4. vzniklé sulfonamidy

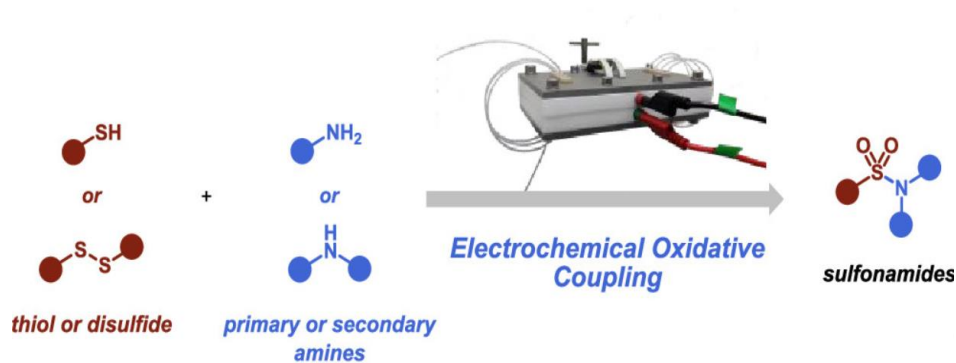
mají vysokou čistotu (hodnoty mohou dostahovat až 95 %) (Vicente, et al., 2020; Amri et al., 2021).

Příkladem je syntéza sulfonamidů na grafitové práškové makroelektrodě. Tato syntéza probíhá v baňce. V baňce se nachází dvě elektrody (grafitová katoda a makroelektroda z grafitového prášku – anoda), filtrační papír a vodný roztok (Vicente, et al., 2020).

Syntéza sulfonamidů probíhá na bázi elektrochemické oxidace sodných solí arylsulfonových kyselin s aminy. Samotná elektrolyza nevyžaduje žádné další katalyzátory. Po proběhnutí elektrolyzy se produkty extrahují z grafitového prášku s malým množstvím rozpouštědla (Vicente, et al., 2020).

Tato metoda syntézy sulfonamidů je jednoduchá, rychlá a efektivní. Lze ji využít pro syntézu jednoduchých i složitějších sulfonamidů (Vicente, et al., 2020).

Elektrochemická syntéza sulfonamidů byla přenesena a optimalizována do tzv. průtokového systému. Pomocí tohoto systému je možné syntetizovat sulfonamidy za pouhých 5 minut bez použití dalších činidel nebo katalyzátorů. Dochází zde k reakci mezi primárními nebo sekundárními aminy s thioley na anodě. Namísto thiolů lze využít i disulfidy. Na katodě vzniká jako vedlejší produkt vodík. Tato metoda má střední až dobré výtěžky. Na obrázku číslo 5 můžeme vidět schéma této metody (Laudadio, et al., 2019).



Obrázek 5 - schéma elektrochemické syntézy sulfonamidů v průtokovém systému

převzato z: (Laudadio, et al., 2019)

2 Antimikrobiální rezistence

Mikroorganismy můžeme podle působení na člověka rozdělit na prospěšné komenzální bakterie a potenciálně smrtelné patogeny. Lidé se během svého života setkají se spoustou mikroorganismů. To, zda člověk onemocní, je souhra několika faktorů. Tyto faktory jsou: souhra mezi reakcemi hostitele (funkční imunitní systém), komenzálních bakterií

a potencionálními patogeny. K infekcím dochází tehdy, když se patogenní mikroorganismy množí, což následně způsobuje poškození buněk, tkání a spouští reakci imunitního systému (Libertucci , et al., 2018).

Objev ATB způsobil revoluci v oblasti medicíny. Došlo k výraznému zlepšení kvality života, prodloužení jeho délky a k pokroku v léčbě a terapiích. Zároveň zajistil bezpečnost potravin a celkově zlepšil veřejné zdraví (Hutchings , et al., 2019). ATB lze považovat za nejuspěšnější léky, které se za posledních 100 let používaly. Prvními ATB byly synteticky připravené chemické látky, zejména arzény, jako je Salvarsan objevený Ehrlichem na přelomu 20.století. Následovalo objevení sulfonamidů a objev a rozvoj penicilinu ve 40. letech 20. století. Po těchto objevech se vývoj ATB obrátil k přírodním zdrojům jako bohatému zdroji ATB. Většina nově syntetizovaných ATB, které se v současnosti využívají v klinické praxi obsahují právě jednu z těchto chemických struktur (Wright, 2011).

Navzdory úspěchu jsou pravděpodobně objevy nových ATB za svým vrcholem a léčba se může pomalu vracet do předantibiotického období. Jedním z mnoha důvodů je skutečnost, že všechna ATB podléhají postupem času rezistenci. Na rozdíl od jiných skupin léčiv mají ATB omezenou životnost (Wright, 2011).

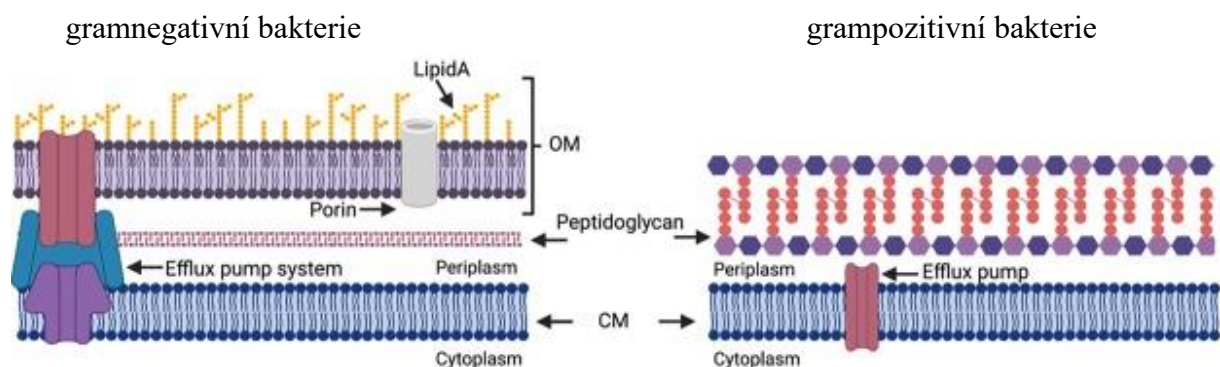
Antimikrobiální rezistence (AMR) je definována jako rezistence mikroorganismů vůči antimikrobiální látce, na kterou byly mikroorganismy původně citlivé. Ačkoliv je AMR přirozený a evoluční jev, tak je urychlován nesprávným používáním ATB (Fuente-Nunez, et al., 2023). Celosvětově se počet rezistentních bakterií zvyšuje. Existují však výjimky, kde se daří udržovat nízký počet rezistentních bakterií. Příkladem mohou být země Skandinávie. (Carlet, et al., 2014).

Již v roce 2014 světová zdravotnická organizace popsala AMR jako jeden z nejzávažnějších problémů naší doby (Carlet, et al., 2014). Odhaduje se, že AMR ročně způsobí až 700 000 úmrtí a do roku 2050 by toto číslo mohlo vzrůst až na 10 milionů úmrtí ročně (Christaki, et al., 2019). Tento problém má hned několik důvodů. Nedostatečný vývoj nových ATB, nárůst AMR a nedostatek léčebných postupů. Dále vysoká spotřeba ATB u pacientů jak v nemocnicích, tak v běžné populaci, tak i u zvířat (Carlet, et al., 2014). Vzhledem k tomuto používání až zneužívání ATB a s nástupem cenově dostupného globálního cestování se AMR rychle šíří mikrobiálními populacemi napříč světem. Toto šíření je také způsobené tím, že mnohé prvky rezistence se snadno přenášejí jak vertikálně, tak horizontálně. Výsledkem je, že AMR je nevyhnutelná (Wright, 2011).

2.1 Rozdělení

AMR můžeme rozdělit na: vrozenou, získanou a adaptivní (Christaki, et al., 2019).

Vrozená AMR je definována, jako rezistence, která je dána vrozenými vlastnostmi bakterie (Christaki, et al., 2019). Příkladem této rezistence jsou strukturální rozdíly mezi buněčnými obaly grampozitivních a gramnegativních bakterií, které hrají významnou roli v reakci na jednotlivá ATB (Melander, et al., 2023). Obal grampozitivních bakterií se skládá ze symetrické fosfolipidové dvojvrstvy neboli cytoplazmatické membrány (CM), která je obklopená buněčnou stěnou tvořenou vrstvami peptidoglykanu. Mezi CM a buněčnou stěnou se nachází periplazmatický prostor (Malanovic, et al., 2016). Gramnegativní bakterie mají stejně jako grampozitivní CM a buněčnou stěnu, která se liší v tloušťce. U grampozitivních bakterií můžeme pozorovat tloušťku buněčné stěny v rozmezí 30–100 nm, oproti tomu tloušťka buněčné stěny gramnegativních bakterií je pouze v jednotkách nanometrů. Hlavním rozdílem je přítomnost vnější membrány u gramnegativních bakterií. Tento rozdíl hraje významnou roli v AMR. Vnější membrána se skládá z asymetrické fosfolipidové dvojvrstvy, ve které jsou ukotveny glykolipidy, a to především lipopolysacharid (LPS). LPS se obvykle skládá z hydrofobní domény tzv. lipid A, jádra z oligosacharidu a distálního polysacharidu neboli O – antigenu. Většina proteinů, které se nacházejí ve vnější membráně jsou lipoproteiny, které jsou ukotveny ve fosfolipidové dvojvrstvě. Dalšími proteiny jsou integrální transmembránové β -barrel proteiny, známé jako poriny, které přispívají ke stabilitě membrány a zprostředkovávají příjem malých molekul přes vnější membránu. Tyto rozdíly mezi jednotlivými buněčnými obaly můžeme vidět na obrázku 6 (Melander, et al., 2023).



Obrázek 6 - rozdíly mezi buněčnými obaly gramnegativní a grampozitivní bakterie

převzato a upraveno z: (Melander, et al., 2023)

CM = cytoplazmatická membrána, OM = vnější membrána

Získaná AMR je definována jako rezistence, která se projeví u bakterií, které byly dříve na dané ATB citlivé. Bakterie získá mechanismus rezistence mutací nebo získáním nového genetického materiálu z exogenního zdroje. Tento proces se nazývá horizontální přenos genů. K tomuto přenosu může dojít třemi hlavními mechanismy a to: transformací, transdukcí anebo konjugací (Christaki, et al., 2019). Získávání cizorodého materiálu pomocí horizontálního přenosu je jednou z nejdůležitějších hnacích sil bakteriální evoluce a je často zodpovědný za vývoj AMR. Většina antimikrobiálních látek využívaných v klinické praxi jsou látky, které se přirozeně vyskytují v životním prostředí. Bakterie nacházející se v tomto prostředí mají geneticky zakódované mechanismy rezistence, které se mohou přenést na klinicky významné bakterie. Díky horizontálnímu přenosu dochází k rozvoji a šíření AMR k často využívaným ATB v klinické praxi (Munita, et al., 2016).

Transformace je forma genetické rekombinace, při které je volná DNA přijímána buňkami z okolního prostředí přes buněčnou membránu. Následně dochází k jejímu začlenění do chromozomu. U transformace dochází k přenosu malých fragmentů DNA, které mají přibližnou velikost 10 genů. Fragmenty o větším počtu genů by mohly být degradovány pomocí enzymů (Christaki, et al., 2019). U transformace nedochází k buněčnému kontaktu. Příjemce přijímá genetický materiál z okolního prostředí, který se nejdříve přichytí na buněčnou stěnu. Poté dochází k proniknutí do buňky pomocí transmembránových přenašečů a na závěr dochází k inkorporaci do vlastní DNA bakterie (Moralez, et al., 2021).

Aby mohlo dojít k transformaci, musí být buňka nejprve ve stavu kompetence. Kompetence buňky je určena úrovní exprese specifických genů, které obvykle řídí transformační procesy. Kompetence je také závislá na environmentálních podnětech (Moralez, et al., 2021). K tomu, aby mohla transformace proběhnout, je potřeba volná DNA, rozvoj kompetence, příjem a stabilní integrace zachycené DNA. Příjem DNA může sloužit jako zdroj živin, k opravě DNA, jako zdroj genetických inovací, ale také jako zdroj AMR (Heuer, et al., 2007). Mezi přirozeně transformované bakterie patří *Acinetobacter speicies* ADP1, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas stutzeri*, *Ralstonia solanacearum* a *Haemophilus. influenzae* (Juhas, et al., 2009).

Transdukce je mechanismus získávání genetické informace, při kterém může být nevirová DNA přenesena z hostitelské bakterie (dárce) na nového hostitele (příjemce). Transdukce je zprostředkována prostřednictvím infekčních nebo neinfekčních virových částic (Heuer, et al., 2007). Viry jsou hlavním vektorem transdukce. Dále mohou být využívány i rezidentní bakteriofágy. Tyto bakteriofágy převezmou genetickou informaci z hostitelské buňky a začlení ji do své kapsidy označované jako defektní profág. Následně pak mohou

infikovat jinou bakteriální buňku, čímž účinně přenesou genetickou informaci (Moralez, et al., 2021). Vnesená DNA může být integrována do genomu příjemce. Většina bakteriofágů infikuje pouze úzký okruh hostitelů. Tento mechanismus přenosu má několik výhod: transdukující fágy jsou schopny odolávat vnějšímu prostředí, nevyžaduje kontakt mezi buňkami a DNA je uvnitř fága chráněná (Heuer, et al., 2007). Mezi transdukované bakterie patří *Staphylococcus aureus*, *Yersinia pseudotuberculosis* nebo mořské sinice *Prochlorococcus* (Juhas, et al., 2009).

Konjugace je proces, při kterém se molekula DNA přenáší z dárce do fyzicky připojeného příjemce prostřednictvím tzv. konjugačního aparátu. K přenosu DNA dochází ve formě plazmidu nebo konjugačního transpozomu (Heuer, et al., 2007).

Konjugační aparát se u gramnegativních bakterií skládá z přenosového kanálu překlenující buněčný obal. Přenosový kanál je spojen s trubicovitou strukturou zvanou pilus. U grampozitivních bakterií se přenosový kanál spojuje s povrchovými adhesiny (Juhas, et al., 2009). Přenos pomocí konjugace je zahájen, když dojde k naříznutí a následnému odvinutí jednoho vlákna DNA. Následuje syntéza kopie vlákna, která je přenesena do příjemce. V příjemci dochází k syntéze komplementárního vlákna. Po přenosu je příjemce označován jako transkonjugant (Moralez, et al., 2021). Mezi konjugované bakterie patří *Agrobacterium tumefaciens*, *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii*, *Haemophilus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella enterica* sérovar Typhi a další (Juhas, et al., 2009).

Kromě vrozené a získané AMR se u bakterií začala vyskytovat také tzv. adaptivní rezistence (Lee, 2019). Můžeme ji definovat jako dočasné zvýšení schopnosti bakterie přežít působení ATB. Po vystavení antimikrobiálnímu prostředí dojde ke změnám v genové nebo proteinové expresi. Tato AMR se od předcházejících dvou výrazně liší. Vrozená a získaná AMR se vyznačují ireverzibilním fenotypem, nejsou závislé na přítomnosti ATB nebo prostředí, které mikroorganismy obklopuje (Fernández, et al., 2011). Adaptivní rezistence je vyvolaná k jednomu nebo i více ATB pomocí specifického signálu, je podmíněná, nestabilní a přechodná. Po odstranění signálu se zpravidla rezistence vrací do původního stavu (Lee, 2019).

I přes komplikovanost této rezistence je pro mikroorganismy výhodná. Jsou díky ní schopni ušetřit náklady na genetickou modifikaci a rychleji reagovat na působení ATB (Lee, 2019). Kromě ATB mohou tuto adaptivní rezistenci vyvolat i další signály. Patří mezi ně enviromentální podněty jako je hodnota pH, stres, hladiny iontů, růstový stav (Fernández, et al., 2011).

Fenomén adaptivní rezistence může být zodpovědný za rozdíly, které jsou pozorované při porovnávání účinnosti ATB *in vitro* a *in vivo*. Může se podílet na selhání léčby pomocí ATB.

Zvýšení rezistence v reakci na podněty z prostředí se navíc nemusí zcela vrátit do původního stavu po odstranění podnětu. To může vést k postupnému zvyšování minimální inhibiční koncentrace (MIC) v průběhu času (Fernández, et al., 2011).

2.2 Mechanismus účinku

Bakterie si postupem času vyvinuly důmyslné mechanismy rezistence, aby se vyhnuly účinnému působení ATB. Tento proces pravděpodobně probíhal po miliony let evoluce. AMR vůči jedné třídě ATB může být obvykle dosažena více biochemickými cestami. Jedna bakteriální buňka může být schopna použít celou řadu mechanismů rezistence, aby přežila působení ATB. Jednotlivé mechanismy rezistence mohou koexistovat v daném okamžiku u téže bakterie. To má aditivní účinek a zvyšuje se úroveň rezistence (Munita, et al., 2016). Všechny tyto mechanismy rezistence jsou klinicky významné a většina ATB podléhá několika mechanismům (Wright, 2011). Zdá se však, že u většiny mikrobiálních druhů se vyvinula preference určitých mechanismů rezistence před jinými (Munita, et al., 2016).

2.2.1 Chemické modifikace antibiotik

Chemická modifikace ATB katalyzovaná enzymy je hlavním mechanismem rezistence (Pascale, et al., 2010). Vyskytuje se jak u gramnegativních, tak i u grampozitivních bakterií (Munita, et al., 2016). Od roku 1940 (objev peniciliny) byly identifikovány tisíce enzymů schopných modifikovat nebo dokonce i degradovat ATB. Tato kovalentní modifikace ATB zabraňuje působení na jeho cíl a tím dochází k jeho zneškodnění (Pascale, et al., 2010).

Bylo popsáno mnoho typů modifikujících enzymů a nejčastější biochemické reakce, které vedou k modifikaci ATB. Mezi tyto biochemické reakce patří: acetylace (modifikuje aminoglykosidy, chloramfenikol, streptograminy), fosforylace (modifikuje aminoglykosidy a chloramfenikol) a adenylace (modifikuje aminoglykosidy a linkosamidy) (Munita, et al., 2016). Tento mechanismus AMR je pravděpodobně nejúčinnějším opatřením. Evoluce takto vysoce účinných katalyzátorů je důkazem silného a trvalého selekčního tlaku působením ATB (Wright, 2011).

Příkladem takových enzymů mohou být β – laktamasy. Tyto enzymy jsou schopny rozložit hlavní strukturu β – laktamových ATB (tzv. β – laktamový kruh). Jsou známy dva odlišné mechanismy, které se na rozkladu podílejí. Prvním je tvorba kovalentního enzymového meziprojektu s následnou hydrolýzou. Druhým je aktivace nukleofilní molekuly vody kovem. Narušení hlavní struktury vede k poškození schopnosti ATB vázat se na cílové proteiny v buněčné membráně. Tento typ rezistence využívají například *Staphylococcus aureus*,

Enterococcus faecalis, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter spp.* a *Pseudomonas spp.* (Wright, 2011).

2.2.2 Modifikace cíle antibiotik

Dalším typem AMR je modifikace cílového místa působení. K modifikaci cílového místa může dojít několika způsoby. Pomocí bodových mutací v genech, které kódují cílové místo. Dále v enzymatických změnách vazebného místa nebo dochází k jeho nahrazení. Bez ohledu, jakým způsobem je cílové místo změněno, je výsledek AMR stejný. Dojde ke snížení afinity ATB k cílovému místu (Munita, et al., 2016).

Příkladem je rozvoj rezistence na rifampicin. Toto ATB blokuje bakteriální transkripci tak, že inhibuje DNA – dependentní RNA polymerasu. Je to komplexní enzym s $\alpha 2\beta\beta'\sigma$ strukturní podjednotkou. Rifampicin se pomocí vazebného místa váže na β podjednotku RNA polymerasy. Po navázání molekuly dojde k přerušení transkripce. Konkrétně dochází k blokaci místa, kde vzniká RNA (Campbell, et al., 2001).

Bylo prokázáno, že rezistence k rifampicinu vzniká jednostupňovými bodovými mutacemi, které vedou k záměnám aminokyselin (AMK). Díky záměnám AMK dochází ke strukturním změnám RNA polymerasy, které vedou ke snížení afinity ATB k polymerase. Další výhodou této mutace je snížení katalytické aktivity a pokračování transkripce (Flosset et al., 2005).

Náhrada cílového místa je typ AMR, při které jsou bakterie schopny vyvinout nové struktury. Tyto struktury plní podobné biochemické funkce jako struktury původní. Jejich hlavním rozdílem je, že nejsou inhibovány ATB. Mezi nejvýznamnější klinické příklady patří rezistence vůči meticilinu u *Staphylococcus aureus* v důsledku získání exogenního proteinu vázající penicilin. Dalším příkladem je rezistence rodu *Enterococcus* na vankomycin. K této rezistenci dochází při modifikaci peptidoglykanu (Munita, et al., 2016).

2.2.3 Snížení propustnosti vnější bakteriální membrány

Vnější membrána gramnegativních bakterií propouští mnoho látek včetně ATB. Nízká propustnost této membrány pro ATB je z velké části brána jako vrozená AMR. Pokud dojde ke změnám v propustnosti vnější membrány, může dojít k postupnému rozvoji získané AMR (Christaki, et al., 2019).

Přes vnější membránu mohou procházet hydrofilní ATB pomocí porinů (příkladem takových ATB jsou β – laktamy, tetracykliny a chloramfenikol). Počet a typ porinů, které jsou

exprimovány na vnější membráně, ovlivňuje vstup hydrofilních ATB. Tím se snižuje citlivost na dané ATB (Fernández, et al., 2012)

Mutace, které ovlivňují expresi nebo funkci porinů, mohou vést k získané AMR. Tyto mutace mohou mít různé účinky. Ty se projevují jako změna velikosti porinů, změna vodivosti porinů nebo snížená exprese porinů na vnější membráně. Tyto změny obecně vedou k nízké úrovni rezistence. V kombinaci s dalšími mechanismy rezistence je mechanismus této rezistence zesílen. Snížené vstřebávání ATB zvyšuje účinek dalších existujících mechanismů rezistence v mikroorganismu (Fernández, et al., 2012).

2.2.4 Efluxní pumpy

Efluxní pumpy jsou komplexní bakteriální systémy, které jsou přítomné na cytoplazmatické membráně. Jsou schopny odčerpávat toxické molekuly z buňky. První efluxní pumpa byla popsána u *Eshericia coli* v roce 1980. Byla kódována plazmidem a byla schopna čerpat tetracyklin z bakteriální buňky (Christaki, et al., 2019). Od té doby bylo charakterizováno několik tříd efluxních pump jak u grampozitivních, tak i u gramnegativních patogenů. Tyto pumpy mohou mít úzkou nebo širokou substrátovou specifitu. Široká substrátová specifita se obvykle vyskytuje u multirezistentních bakterií (Poole, 2005).

2.2.5 Modifikace enzymů aktivující antibiotika

Příkladem tohoto mechanismu rezistence je rezistence na nitrofurantoin. Aby mohlo toto ATB působit je nutné jej aktivovat pomocí bakteriálních reduktas. Po aktivaci vznikají toxické meziproducty (Christaki, et al., 20019).

Hlavním mechanismem rezistence je mutace v genech pro enzym nazývaný nitroreduktasa. Díky tomu nedochází k aktivaci nitrofurantoinu a vzniku toxických meziproductů (Christaki, et el., 2019).

2.3 Selhání antibiotik

Selhání ATB lze definovat jako situaci, při které mikroorganismy přežijí antibiotickou léčbu a u pacienta přetrvávají klinické příznaky infekce (Haney, et al., 2022) nebo dochází ke zhoršení klinického stavu pacienta (Fuente-Nunez, et al., 2023). AMR lze považovat za jednu ze situací, kdy ATB selhávají. Existují však další situace, při kterých dochází k selhání ATB. K selhání může dojít i v případě, že neexistuje geneticky zakódovaný mechanismus rezistence (Haney, et el., 2022). Mezi významné faktory selhání ATB patří tvorba biofilmu a nesprávná

reakce imunitního systému hostitele (Fuente-Nunez, et al., 2023). Selhání ATB se již v klinické praxi vyskytují a lékaři mají omezené možnosti léčby (Haney, et al., 2022).

2.3.1 Biofilm

Biofilmy jsou tvořeny bakteriemi. Je to struktura, která bakteriím slouží k adhezenci, komunikaci a ochraně. Dále může být biofilm faktorem patogenity a virulence. Z klinického hlediska jsou biofilmy velkým problémem, protože jsou příčinou 60 % chronických infekcí (Haney, et al., 2022).

V přírodě jsou biofilmy všudypřítomné. Představují nejběžnější strukturované bakteriální mikroprostředí. Biofilmy je velmi obtížné vymýt v jakémkoliv prostředí. Mezi tato prostředí můžeme řadit průmyslové výroby, ale i klinická pracoviště v nemocnicích apod. Bakterie v biofilmech vykazují sníženou citlivost k ATB a jsou schopny odolávat mnohem vyšším koncentracím léčiv (Vega, et al., 2014).

K samotné rezistenci přispívá také prostorová organizace a složení biofilmu. Nachází se v něm exopolysacharid a extracelulární DNA. V biofilmu mohou fungovat jako bariéra pro difuzi a tím bránit léčivům v přístupu k buňkám. Účinnost této bariéry se u jednotlivých ATB liší. Velké molekuly, kladně nabitě aminoglykosidy a antimikrobiální peptidy v biofilmech difundují špatně. Chinolony a β – laktamy se s největší pravděpodobností pohybují volně (Vega, et al., 2014).

Bakteriální biofilmy vznikají v 5 fázích: 1. přichycení volně pohybujících se buněk na povrch, 2. nevratné uchycení na povrch a tvorba ochranné polymerní extracelulární matrix, 3. tvorba shluků buněk usazených v matrix biofilmu, 4. proliferace a znání kolonií, 5. oddělení a disperze některých bakteriálních buněk umožňující tvorbu nových ložisek biofilmu (Fuente – Nunez, et al., 2023)

Průběh tvorby biofilmu řídí stovky genů. To vede k významným změnám růstového stavu a buněčného metabolismu. Pokud se bakterie z biofilmu uvolní, může dojít k návratu původní citlivosti na ATB (Fuente-Nunez, et al., 2023).

Mezi běžné infekce, které jsou spojené s biofilmy u lidí patří: infekce kůže a měkkých tkání, infekce spojené s katétry a zubní plak (Holá, 2012). Mezi nejzávažnější klinické stavy patří infekce implantovaných zařízení nebo protetik (Haney, et al., 2022), endokarditida (Cahill, et al., 2016) a plicní infekce u pacientů, kteří trpí cystickou fibrózou (Lyczak, et al., 2002). Neexistuje žádná schválená léčba biofilmu. Využívají se vysoké dávky nebo kombinace ATB. Léčba často selhává, a proto je potřeba využívat i invazivní postupy, jako je chirurgický debridement (Haney, et al., 2022).

2.3.2 Sepse

Sepse je závažný a život ohrožující stav charakterizovaný nekontrolovatelnou reakcí hostitele na infekci (Vincent, et al., 2013). Nejzávažnější případy sepse se vyznačují multiorgánovou dysfunkcí. Sepse vzniká jako reakce na infekci, která bývá obvykle bakteriálního původu. Sepse může být také způsobena plísněmi nebo viry. Základním nástrojem k léčbě sepse je podávání ATB. Ty jsou však často neúspěšná (Haney, et al., 2022).

Opožděné podání ATB je přímo spojeno s progresí onemocnění. Včasné zahájení léčby je velmi důležité. Každá hodina, kdy není podána antibiotická léčba má za následek zvýšení pravděpodobnosti úmrtí o 7,6 %. Ačkoliv se ATB běžně používají v léčbě sepse, jejich účinnost při eliminaci infekce je značně omezená. Výsledkem je vysoká úmrtnost (23–25 %) anebo následky po prodělaném závažném, septickém onemocnění (Martínez, et al., 2020).

Dlouhodobá nebo nevhodná expozice ATB může vést ke komplikacím. Mezi komplikace řadíme rozvoj rezistentních nebo perzistujících bakteriálních infekcí. Používání silných ATB navíc nese riziko nežádoucích vedlejších účinků, včetně toxicity léků. Proto, i když léčba ATB nabízí zjevné výhody, tak je nutné pečlivě zvážit její účinnost a potenciální nevýhody. Selhání ATB při léčbě sepse je bohužel často spojeno se zpožděným zahájením antibiotické léčby. Toto zpoždění je dáno otázkou, zda pacient sepsi skutečně má, protože časné klinické příznaky bývají zcela nespecifické (Fuente-Nunez, et al., 2023).

Epidemiologické studie ukazují, že o úspěchu antimikrobiální léčby u sepse rozhodují také faktory jako je věk pacienta, index tělesné hmotnosti a přítomnost dalších onemocnění. Proto celkový zdravotní, fyziologický stav a imunitní odpověď hostitele hrají významnou roli v účinnosti ATB (Im, et al., 2022).

2.3.3 Oslabená imunita pacienta a hostitelská obrana

Obranný systém hostitele je komplexní síť mechanismů, které pacienta chrání před působením patogenních mikroorganismů. Patří mezi ně fyzikální bariéry (kůže, žaludeční kyselina a mukociliární clearance), nespecifická imunita (např. fagocytující buňky, komplement) a adaptivní imunita (T – a B – lymfocyty, protilátky a cytokiny). Při narušení některé z těchto složek obranného systému se zvyšuje náchylnost pacienta k patogenům. To může následně vést k častým a opakovaným infekcím (Nicholson, 2016).

Pacienti s poruchou imunity nebo s poškozenou fyzikální bariérou tvoří značnou část populace. Jsou to pacienti z různých prostředí a s různými zdravotními potížemi (Harpaz, et al., 2016). Mnozí z těchto pacientů vedou normální život. Jejich imunitní systém je však oslaben.

Pokud tito pacienti onemocní, mají vyšší pravděpodobnost vzniku závažných komplikací nebo dokonce úmrtí. Mezi další rizikové skupiny patří předčasně narozené děti a straší lidé (Fuente-Nunez, et al, 2023).

U imunokompromitovaných pacientů je mnohem větší výskyt opakovaných infekcí. Mohou vznikat na základě genetických mutací nebo faktorů vnějšího prostředí. Imunokompromitované pacienty můžeme rozdělit do dvou kategorií (Morelli, et al.,2022).

U primárních deficiencí je funkce imunitního systému změněna v důsledku genetické mutace. Jedinci se sekundárními imunodeficiencemi mohou být postiženi jiným onemocněním (např. cystická fibróza, astma, zánětlivé střevní onemocnění, cukrovka apod.) nebo mohou podstupovat imunosupresivní léčbu (např. u nádorových onemocnění a transplantací). Tyto stavy ovlivňují imunitní systém hostitele (Haney, et al., 2022; Morelli, et al., 2022). U těchto pacientů je antibiotická léčba a agresivní terapie nezbytná, aby se zabránilo dlouhodobým komplikacím spojených s chronickou infekcí (Fuente-Nunez, et al.,2023).

Aby mohlo dojít k odstranění infekce, je nutná spolupráce imunitního systému s ATB. Při dysfunkčním imunitním systému tato spolupráce selhává a je potřeba hledat účinnou terapii. Zároveň specifické nedostatky v imunitním systému každého pacienta přispívají různým způsobem k náchylnosti hostitele k různým patogenům (Fuente-Nunez, et al., 2023).

Primární imunodeficiencie se obvykle dědí autosomálně recesivně nebo jsou vázané na chromozom X. Tyto poruchy jsou často kategorizovány na základě specifických kompartmentů imunitního systému. Bývá narušena funkčnost protilátek, imunita zprostředkovaná buňkami, komplementu nebo fagocytů. Základem pro podezření na primární imunodeficienci jsou opakující se infekce. Úspěšnost léčby pomocí ATB je u těchto pacientů přinejmenším přechodná. Pacienti jsou citliví vůči široké škále infekcí a příznaky se obvykle projeví během prvního měsíce života. Navzdory antibiotické léčbě většina těchto jedinců podlehně infekcím během prvního roku života (Fuente-Nunez, et al., 2023).

Sekundární imunodeficiencie jsou získané stavy vznikající v důsledku působení různých vnějších faktorů. Výsledkem bývá rakovina (př. leukémie, lymfom), autoimunitní nebo metabolické onemocnění (př. AIDS, lupus, diabetes mellitus), podvýživa. Dalšími stavy sekundární imunodeficiencie jsou chemoterapie, chirurgické zákroky (př. transplantace) nebo přirozený proces stárnutí (př. imunosenescence). Každý z těchto stavů má odlišný imunitní profil a vyžaduje intenzivní antibiotickou léčbu. Léčba nemusí být vždy úspěšná, ať už se jedná o prevenci nebo léčbu bakteriálních infekcí (Szepanowski, et al., 2021).

2.3.4 Mikrobiom

V posledních letech došlo k pokroku ve výzkumu mikrobiomu. V jeho vnímání v rámci lidské mikroflóry, pochopení jeho funkčních rolí a interakcí s hostitelem a jeho vlivu na něj. Tento posun umožňuje hlubší zkoumání dynamiky vztahů mezi hostitelem a mikrobiomem (Gao, et al., 2023).

Obrovská složitost mikrobiomu vytvořila výzvy, které bude nutné nejprve prozkoumat. Již teď je ale jasné, že podávání např. probiotik může mít podstatný vliv na náchylnost hostitele k infekcím. Podávání intenzivní a dlouhodobé antibiotické léčby má velký dopad na mikrobiom pacienta. Může dojít k narušení složení mikrobiomu, ohrozit jeho prospěšné funkce v organismu, způsobit imunitní dysbiózu a podpořit vznik kmenů rezistentních na ATB (Patangia, et al., 2022).

Příkladem takového poškození mikrobiomu je výskyt průjmů u pacientů, kteří jsou nebo byli léčeni ATB. Tento průjem může vést ke kolonizaci oportunních patogenů jako je *Clostridium difficile*, které způsobuje zánět střeva, horečku a bolesti břicha. U zdravých jedinců se *Clostridium difficile* vyskytuje v malém množství ve střevě. Pokud ATB naruší střevní mikrobiom, tak může dojít k namnožení *Clostridium difficile* a jeho následné dominanci ve střevním prostředí (Theriot, et al., 2014).

2.4 Antimikrobiální rezistence na sulfonamidy

Sulfonamidy a jejich deriváty jsou syntetické látky, které působí jako bakteriostatické inhibitory bakteriální biosyntézy kyseliny tetrahydrofolové. Kyselina tetrahydrofolová je nezbytným kofaktorem pro syntézu nukleových kyselin a proteinů. Bakteriální rezistence na sulfonamidy je výsledkem chromozomálních bodových mutací v genu *dhps*. Tento gen kóduje dihydropteroát syntasu. Výsledkem je zvýšený počet enzymů, které musí sulfonamid inhibovat. Další možností je získání plazmidových sul genů, které kódují rezistentní dihydropteroát syntasu (Cattoir, 2016). Dalším způsobem rezistence je zvýšená produkce kyseliny p – aminobenzoové, která je schopna konkurovat sulfonamidům ve vazbě na aktivní místo. Tyto mechanismy mohou být přítomny samostatně nebo v kombinaci. Pokud jsou mechanismy v kombinaci, může vznikat vysoká úroveň AMR na sulfonamidy. Mezi druhy, které jsou rezistentní vůči sulfonamidům, patří *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter jejuni*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* a *Escherichia coli* (Wiedemann, et al., 2014).

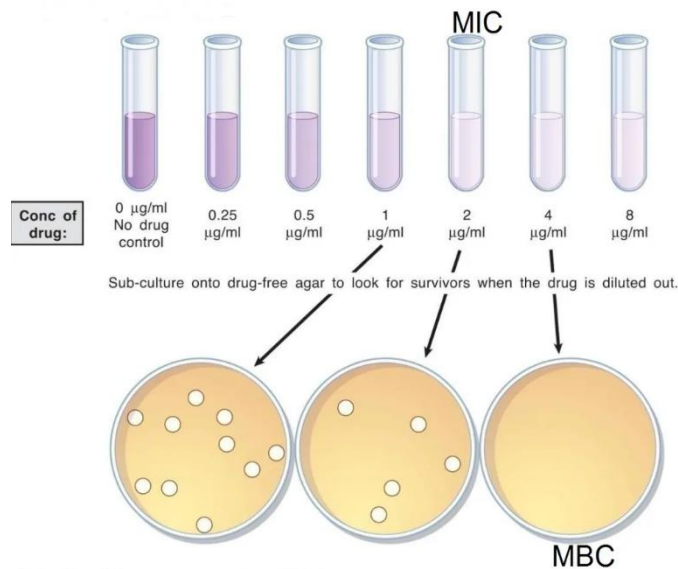
2.5 Metody sledování rezistence

Podání vhodné antibiotické terapie u bakteriálních infekcí vyžaduje mikrobiologickou diagnostiku. Diagnostika spočívá v identifikaci původce infekce a jeho profilu rezistence. V klinické praxi tento proces může trvat až 72 hodin a na základě jeho výsledku je zvolena vhodná léčba (Pulido, et al., 2013). V klinických mikrobiologických laboratořích se testuje antimikrobiální citlivost (AST) bakteriálních patogenů. Dále se stanovuje možná rezistence na ATB. Metody pro zjišťování AMR můžeme rozdělit do 3 skupin a to na fenotypové metody, genotypové metody a tzv. MALDI TOF MS (Benková, et al., 2020).

2.5.1 Fenotypové metody

I přes vývoj moderních diagnostických nástrojů v laboratořích klinické mikrobiologie zůstávají v praxi fenotypové metody. Tyto metody jsou založené na měření růstu mikroorganismů v přítomnosti testovaných ATB (Benková, et al., 2020).

Makrodiluční bujónová metoda je jedna z nejstarších metod, která byla využívána pro určování MIC. Využívají se zkumavky obsahující bujón, do kterého je přidáno známé množství bakterií. Dále je do zkumavek přidáno ATB v určitém koncentračním rozsahu (nejčastěji ve dvojkovém ředění). Následuje inkubace za vhodných podmínek po dobu 24 hodin. Poté se odečítá zákal a stanoví se MIC. Dále pomocí této metody můžeme určit minimální baktericidní koncentraci (MBC). MBC zjistíme tak, že se médium ze zkumavek vyočkuje na Petriho misku, která se následně nechá inkubovat po dobu 24 hodin za vhodných podmínek. Následuje odečet a počítání kolonií. Výhodou této metody je její univerzálnost, ovšem v praxi je již nahrazena jinými metodami. Schéma této metody můžeme vidět na obrázku 7 (Schumacher, et al, 2018, Tankeshwar, 2023).



Obrázek 7 - schéma makrodiluční bujónové metody

převzato z: (Tankeshwar, 2023)

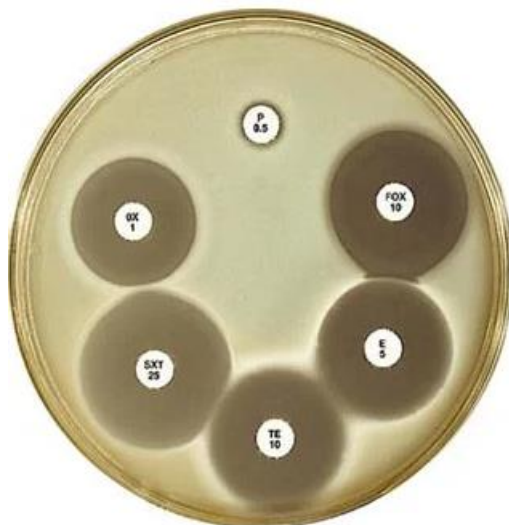
MIC = minimální inhibiční koncentrace

MBC = minimální baktericidní koncentrace

První metodou je disková difuzní metoda, kterou můžeme vidět na obrázku 8. Tato metoda je rutinní v klinických laboratořích. Jejimi hlavními výhodami jsou jednoduchost, reprodukovatelnost, snadná modifikace antimikrobiálních disků, možnost použití jako screeningového testu proti mnoha bakteriím a nízká cena (Matuschek, et al., 2013).

Prakticky se tato metoda provádí tak, že se na Mueller – Hinton agar naočkuje inokulum testovaného mikroorganismu. Zákal inokula odpovídá přesně dané hodnotě zákalové stupnice podle McFarlanda. Na naočkovaný povrch agarů se umístí antibiotické disky. Jednotlivé disky obsahují přesně danou koncentraci testované látky. Následuje inkubace za vhodných podmínek. Obvykle 16–24 hodin při teplotě 35–37 °C (Matuschek, et al., 2013). Po inkubaci se provádí odečet. Odečtou se průměry inhibičních zón kolem jednotlivých antibiotických disků. Podle výsledků se určí, zda se jedná o mikroorganismus, který je na danou látku citlivý nebo rezistentní (Reller, et al., 2009).

Tato metoda není vhodná pro stanovení MIC, protože není možné kvantifikovat množství antimikrobiálního činidla, které difundovalo do agaru (Nijs, et al., 2003).



Obrázek 8 - disková difuzní metoda

převzato z: (Aryal, 2022)

Antimikrobiální gradientní metoda kombinuje principy ředící a difúzní metody pro určení MIC. Nejznámější komerčně dostupným testem je E-test (Balouiri, et al., 2016).

V praxi se plotna naočkuje po celém povrchu testovaným mikroorganismem. Na povrch se následně položí testovací proužek, který je napuštěný testovanou antimikrobiální látkou. Antimikrobiální látka je na proužek nanесena ve zvyšujícím se koncentračním gradientu. Následuje inkubace za vhodných podmínek a poté dochází k odečtu a stanovení MIC. MIC se určuje v průsečíku proužku a inhibiční zóny, která má tvar elipsy nebo slzy. E-test můžeme vidět na obrázku 9 (Benková, et al., 2020.)



Obrázek 9 – E-test

převzato z: (Aryal, 2022)

Mikrodiluční bujónová metoda je jednou z nejzákladnějších metod AST. Tato metoda se provádí s využitím mikrotitračních destiček, které obvykle obsahují 96 jamek (Reller, et al., 2009).

Nejprve se připraví inokulum se zákalem 0,5 podle McFarlandovy stupnice, aby bylo dosaženo antimikrobiální koncentrace $1-5 \cdot 10^5$ CUF/ml (jednotky tvořící kolonie/ml). Část suspenze (100 μ l) se převede do bujónu a z něj se následně odebere 50 μ l, které se napipetují do mikrotitrační destičky (Balouiri, et al., 2016)

Testovaná antimikrobiální látka se připraví dvojkovým ředěním a přidá se 100 μ l látky do jamek. Obsah v jamkách se promíchá a destička se inkubuje za vhodných podmínek. Podmínky se volí podle testovaného mikroorganismu. Po inkubaci se určí hodnota MIC vizuálně nebo pomocí zobrazovacího zařízení. Mezi výhody této metody patří její reprodukovatelnost, malé množství potřebného vzorku a nízké náklady (Benková, et al., 2020).

Automatizované systémy pro bakteriální identifikaci a AST jsou velice využívány v klinických laboratořích. Cílem automatizace je snížení nákladů, rychlejší hlášení výsledků, zkrácení doby zpracování, sledování rezistentních vzorků a pomoc v diagnostice a léčbě infekčních onemocnění (Benková, a další, 2020). Použití přístrojového vybavení může standardizovat odečet a často poskytuje výsledky v kratším čase než manuální metody. A to díky tomu, že jsou citlivé optické detekční systémy schopny detekovat i jemné změny v růstu bakterií (Reller, et al., 2009).

Jako příklad takového analyzátoru může být systém VITEK 2. Využívá kompaktní plastové reagenční karty, které obsahují mikro litrové množství ATB a testovaných medií. Využívá opakované turbidimetrické monitorování růstu bakterií během zkrácené inkubační doby. Přístroj lze nakonfigurovat pro 30 až 240 simultánních testů a karty citlivosti umožňují získat výsledek v průběhu 4 až 10 hodin (Reller, et al., 2009). Systém VITEK 2 nabízí: 1. více než 2000 popsaných fenotypů mikroorganismů, 2. zjištěno více než 99 organismů, 3. zjištěno více než 100 mechanismů rezistence, 4. nízkou míru chybovosti v identifikaci mikroorganismů a spoustu dalších (Biomriueux, 2024).

2.5.2 Genotypové metody

Tyto metody přímo detekují specifické geny rezistence, mutace a expresi těchto genů. Původně byly vyvinuty jako doplněk fenotypových metod. V dnešní době ale začínají pomalu převládat. Výsledky jejich testů jsou k dispozici během jedné až několika hodin (Gajic, et al., 2022). Genotypové metody, které jsou využívány pro detekci AMR jsou rychlejší, přesnější, citlivější, vysoce senzitivní a specifické. U genotypových metod nejsou potřeba tak dlouhé

kultivace mikroorganismů jako u metod fenotypových (Šolcová, et al., 2023). Nevýhodou těchto metod je to, že nejsou schopny definovat hodnoty MIC. Musí být validovány na základě fenotypových údajů, rozsáhlé databáze markerů rezistence a inovativní bioinformatické metodiky jsou nutností (Gajic, et al., 2022).

Techniky založené na polymerázové řetězové reakci (PCR) se spoléhají na sekvenčně specifickou amplifikaci nukleových kyselin. S přibývajícím znalostmi o genetickém základu AMR byly vyvinuty postupy založené na PCR. Detekuje se přítomnost genetických determinant rezistence na různá ATB. Jedním z příkladů může být použití PCR k identifikaci *Staphylococcus aureus* rezistentního vůči meticilinu prostřednictvím detekce genu *mecA*. PCR má všechny výhody, které již byly zmiňovány. Hlavním omezením toho přístupu je, že přítomnost genů rezistence nemusí vždy korelovat s fenotypovým projevem rezistence. Dále PCR není schopno detekovat nové nebo necharakterizované mechanismy rezistence, u nichž není znám genetický základ (Pulido, et al., 2013).

PCR v reálném čase využívá možnosti kvantifikace počtu specifických kopií nukleové kyseliny ve vzorku pro měření růstu bakterií v přítomnosti testovaného ATB (Benková, et al., 2020). Oproti klasické PCR nabízí real time PCR několik výhod, včetně měření dat v reálném čase, vyšší citlivost, snížení rizika přenosu kontaminace a částečné nebo plné automatizaci. Nevýhodou ovšem zůstává potřeba kultivace a to, že systém nemůže poskytnout informace o mechanismu rezistence (Gajic, et al., 2022)

Microarray neboli mikročipy jsou schopny identifikovat přítomnost specifických sekvencí nukleových kyselin pomocí komplementárních oligonukleotidů. Díky tomu, že je možné tyto oligonukleotidy sestavit na pevné nosiče ve velmi těsné blízkosti, má tato metoda schopnost detekovat mnoho (tj. tisíce) sekvencí v jediném testu. Z tohoto důvodu lze vytvořit čipy se schopností detekovat širokou škálu genů rezistence, mnoho různých mechanismů rezistence nebo variant jednoho mechanismu přítomných v bakteriálních izolátech (Pulido, et al., 2013). Příkladem je systém Verigene, který vyvinul multiplexní molekulární testy založené na mikročipech pro diagnostiku 12 gramozitivních a 9 gramnegativních bakterií spolu s jejich přidruženými geny rezistence. Dalším příkladem je mikročip společnosti Check – Points, pro detekci klinicky nejrozšířenějších ESBL kmenů a kmenů rezistentní na karbapenemasy (Gajic, et al., 2022).

2.5.3 MALDI – TOF MS

Hmotnostní spektrometrie MALDI – TOF byla původně zavedena do klinických mikrobiologických laboratoří pro identifikaci patogenů a až následně se začala využívat pro

detekci AMR (Pulido, et al., 2013). Obecně prvním krokem identifikace je kokrytalizace, při které vzniká krystal smícháním mikrobiálního vzorku a matrice na povrchu kovové destičky. Tato směs se nechá zaschnout při pokojové teplotě. Následně dojde k vložení destičky do přístroje, kde probíhá samotná detekce. Laserové paprsky desorbují ribozomální proteiny bakterií nebo kvasinek, což přispívá k ionizaci proteinů. Molekulová hmotnost a náboj určují dobu letu desorbovaných částic. Doba letu se měří pomocí detektoru na konci vakuové trubice. Vygenerované hmotnostní spektrum se pomocí algoritmů porovnává s referenčními spektry v databázi. Výsledné spektrum je jedinečné pro jednotlivé druhy. Tato technika byla úspěšně využita i při detekci specifických mechanismů AMR. Například aktivity enzymů inaktivující ATB pomocí kvantifikace enzymových aktivit. Také k přímé detekci genů, které indikují AMR. Toto hodnocení je však možné pouze pro některé druhy ATB. Jako možný postup se jeví semikvantitativní metoda MALDI Biotyper, která měří relativní rychlost růstu mikroorganismů vystavených působení ATB ve srovnání s růstem mikroorganismů, na které žádné ATB nepůsobí (Benková, et al., 2020).

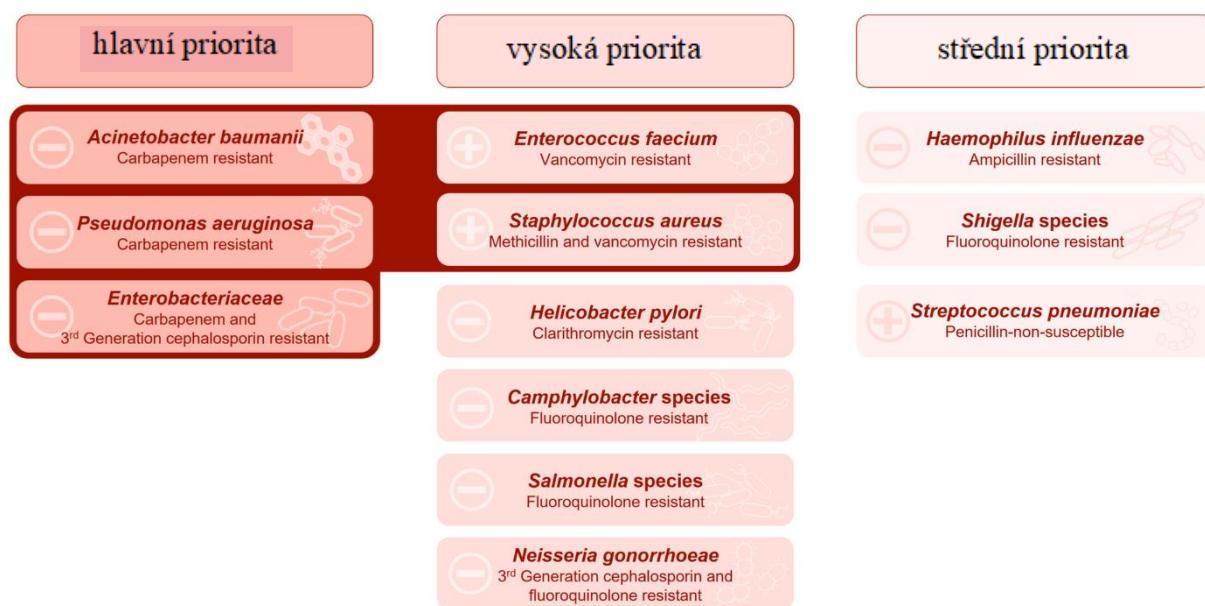
2.6 Budoucnost

Je jasné, že AMR je nevyhnutelná. Jsou zde tedy nějaké kroky, které lze podniknout, aby se tomuto procesu zabránilo nebo by ho alespoň oddálilo? V průběhu let bylo erudovanými odborníky a všemi významnými mezinárodními organizacemi navrženo několik řešení. Mezi tyto návrhy patří přísná kontrola používání ATB lidmi, výdej ATB na lékařský předpis, kontrolované používání v chovu zvířat. I přes všechna tato opatření by AMR úplně nezmizela. Pokud by došlo k zavedení dobře promyšlených opatření, a vývoji nových ATB, bylo by možné očekávat významné a trvalé zlepšení léčby infekčních onemocnění (Davies, et al., 2010).

Historie ATB nám ukazuje, jak zásadní a zranitelné jsou tyto zdroje v lékařské praxi. Tlak rezistence v kombinaci s nedostatečnými inovacemi a určitým odhodláním vyvíjet terapie nové generace představuje pro moderní medicínu existenční hrozbu (Cook, et al., 2022). Navzdory růstu AMR a rostoucímu povědomí o ní klesá vývoj nových ATB. Důvodů je několik, ale souvisejí se současným zaměřením farmaceutického průmyslu na léky proti neinfekčním onemocněním jako je rakovina nebo kardiovaskulární onemocnění. Ve výzkumu a preklinických studiích existují nové léčebné strategie a látky, které by mohly v budoucnosti nabídnout možnost léčby (Huemer, et al., 2020).

V roce 2023 Světová zdravotnická organizace (WHO) vyzvala ke sběru dat o antibakteriálních látkách v preklinickém vývoji, které jsou relevantní pro AMR. A taky o látkách, které by mohly být účinné vůči patogenům na obrázku 10. Do sběru dat mohou být

zahrnuty přípravky které jsou: 1. přímo nebo nepřímo působící nízkomolekulární antibakteriální látky, 2. antivirové látky, 3. látky, které narušují biofilm, 4. látky, které zlepšují aktivitu stávajících ATB, 4. velké molekuly (přírodní produkty, jako např. antimikrobiální peptidy, nebo biologické produkty jako jsou např. protilátky, bakteriofágy), 5. látky modifikující mikrobiom, 6. imunomodulátory, 7. znovu použitá neantibiotika, 8. ATB původně využívané pro zvířata s modifikací na využití pro člověka, 9. dekolonizační činitelé, 10. kombinované terapeutika (WHO, 2023). Na obrázku 10 můžeme vidět patogeny, u kterých je nutno v nejbližší době nalézt účinnou léčbu.



Obrázek 10 - určení prioritních patogenů antimikrobiální rezistence WHO

převzato a upraveno z: (Walesh, et al., 2022)

+ (grampozitivní bakterie), - (gramnegativní bakterie)

V roce 2017 vytvořila Evropská Komise tzv. Evropský akční plán „Jedno zdraví“ proti antibakteriální rezistenci, ve kterém je uvedeno více než 70 opatření, jejichž vývoj je pravidelně sledován (Antimicrobial resistance, 2019, A European One Health Action plan against AMR, 2017) Evropská unie má několik cílů pro snížení AMR. Do roku 2030 by mělo dojít ke snížení celkové spotřeby ATB o 20 %, přičemž alespoň 65 % využívaných ATB by měla tvořit základní, úzkospektrá ATB. Celková incidence infekcí krevního řečiště, které jsou způsobeny AMR, by měla klesnout. Konkrétně u *Staphylococcus aureus* rezistentní na meticilin o 15 %, u *Escherichia coli* rezistentní k cefalosporinů třetí generace o 10 % a u *Klebsiella pneumoniae* rezistentní ke karbapenemům o 5 % (Antimikrobiální rezistence, 2023)

V České republice se očekává do roku 2030 snížení celkové spotřeby ATB o 9 %. Snížení incidence infekcí krevního řečiště způsobených meticilin rezistentním *Staphylococcus*

aureus o 6 %, u *Escherichia coli* rezistentní k cefalosporinů třetí generace o 5 % a u *Klebsiella pneumoniae* rezistentní ke karbapenemům o 2 % (Doporučení rady, 2023)

Otázkou tedy je, zda je možné tyto cíle v České republice naplnit. Mezi lety 2019 a 2022 se v Evropě podařilo snížit spotřebu ATB o 2,5 %. Oproti tomu v ČR naopak spotřeba stoupla o 1 %. Situace, která se týká výpadků penicilinu, mohla způsobit navýšení spotřeby širokospektrých ATB. Nejsou ale jedinou příčinou, která vede k nadužívání širokospektrých ATB (Žemličková, 2023).

Pozitivním faktorem je, že v roce 2022 došlo v ČR ke snížení incidence infekcí krevního řečiště způsobených meticilin rezistentním *Staphylococcus aureus* (-29,7 %) a *Escherichia coli* rezistentní k cefalosporinům třetí generace (-4,7 %). Na druhou stranu došlo k prudkému nárůstu infekcí, které jsou způsobeny *Klebsiella pneumoniae* rezistentní ke karbapenemům (+156 %). Tyto trendy byly popsány i ve státech Evropské unie. Rezistence ke karbapenemům je alarmující. Léčba těchto infekcí je omezená a opírá se o látky, které mají řadu nežádoucích účinků nebo o nová ATB, jejichž dostupnost je limitována. Všechny tyto informace nám ukazují, že je potřeba dalšího úsilí o zlepšení prevence, kontroly infekcí ve zdravotnických zařízeních a o snahu ve vývoji nových a inovativních ATB napříč světem (Žemličková, 2023).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

CÍL PRÁCE

Prvním cílem této diplomové práce bylo syntetizovat vybrané sulfonamidové deriváty a následně je charakterizovat.

Druhým cílem bylo provést testování zaměřené na jejich potenciální antibakteriální účinky k vybraným mikroorganismům pomocí mikrodiluční metody. Byla stanovena minimální inhibiční koncentrace podle normy ČSN EN ISO 20776–1 ED. 2

Poslední částí je zhodnocení účinnosti syntetizovaných derivátů a jejich porovnání s klinicky využívanými sulfonamidovými ATB

3 Syntéza látek

Testované sulfonamidy byly připravené čtyřstupňovou syntézou, která byla vyvinuta na Ústavu organické chemie a technologie v rámci diplomové práce (Nevyhoštěná, 2022). V prvním reakčním stupni reagovala kyselina 4-aminobenzoová ve formě draselné soli s vybranými substituovanými aromatickými sulfochloridy za vzniku příslušných sulfonamidových derivátů 4-aminobenzoové kyseliny. Tyto kyseliny byly v dalším reakčním stupni převedeny reakcí s thionylchloridem na chloridy. Takto připravené chloridy reagovaly ve třetím reakčním stupni s 4-(morfolin-1-ylmethyl)anilinem za vzniku konečných produktů ve formě báze. Tyto látky byly v posledním reakčním stupni převedeny reakcí s kyselinou chlorovodíkovou na hydrochloridovou sůl. Celková syntéza je zobrazena v reakčním schématu č. 1. Struktura jednotlivých meziproductů a konečných produktů byla ověřena pomocí NMR spektrometrie a čistota byla kontrolována pomocí elementární analýzy.

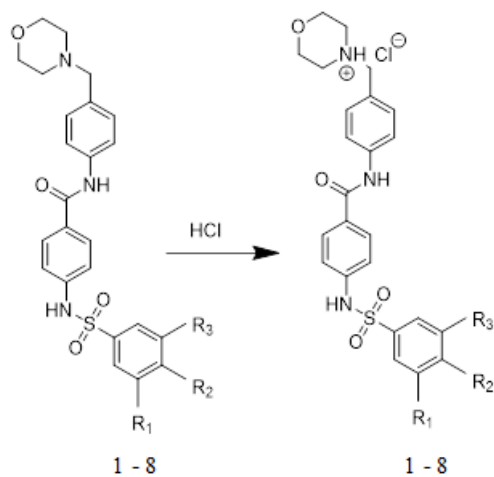
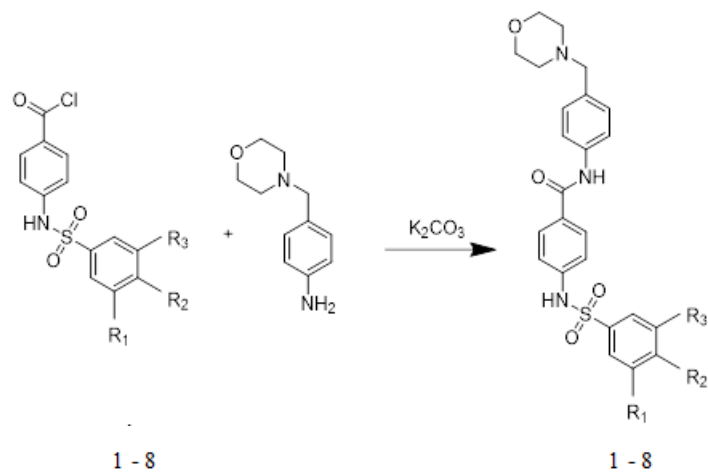
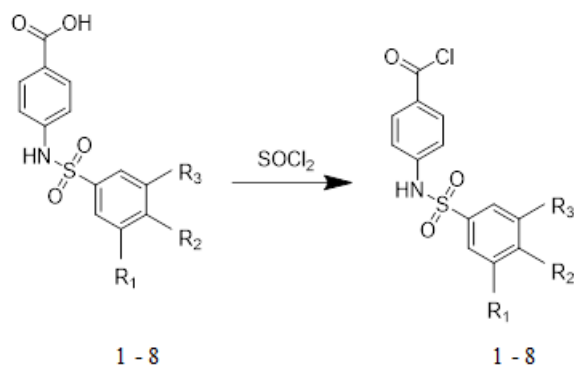
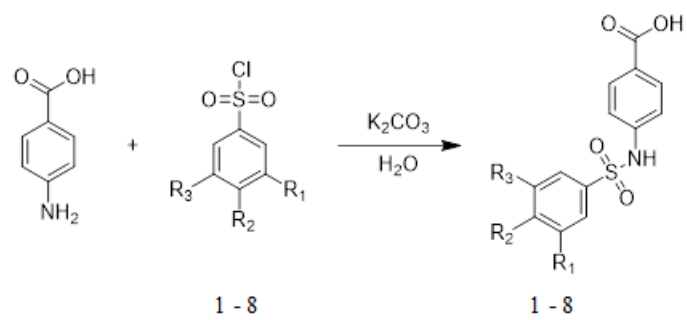


Schéma 1 - reakční schéma syntézy sulfonamidových derivátů

Tabulka 1 - přehled navázaných substituentů na jednotlivých sulfonamidových derivátech

| Číslo sulfonamidového derivátu | R₁ | R₂ | R₃ |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1 | H | H | H |
| 2 | H | CH ₃ | H |
| 3 | CH ₃ | H | CH ₃ |
| 4 | F | H | F |
| 5 | F | H | H |
| 6 | Cl | H | Cl |
| 7 | Cl | H | H |
| 8 | F | CH ₃ | H |

4 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

4.1 Přístrojové a laboratorní vybavení

Přístroje:

- Analytické váhy (KERN, Německo)
- Autokláv STERIMAT 5104.2 (BMT, ČR)
- Autokláv STERILAB (BMT, ČR)
- Denzitometr (BioSan, ČR)
- Chladnička IIS 3966 (Gorenje, Slovinsko)
- Chladnička (Liebherr, Německo)
- Počítačka kolonií LBK, 2002 (eCount, USA)
- Termostat (POL – EKO – APARATURA SP. J., Polsko)
- Vortex (BioTech, ČR)

Laboratorní pomůcky:

- Erlenmayerovy baňky o objemu 300 ml nebo 500 ml
- Skleněné láhve se šroubovacím uzávěrem 250 ml nebo 500 ml
- Petriho misky – plastové
- Skleněné zkumavky, kovová víčka, stojany, zkumavky typu Eppendorf 1,5 a 2,5 ml, plastové zkumavky se šroubovacím uzávěrem
- Jednokanálové pipety v rozmezí objemu: 2–20 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl, 1 - 10 ml, plastové špičky na pipety (Eppendorf)
- Kahan, jednorázové sterilní očkovací kličky, černá podložka, plastové mikrotitrační destičky

4.2 Materiál

4.2.1 Kultivační půdy a bujóny

Muller Hinton agar (38 g/1000 ml), HiMedia laboratories, kód produktu M173 – 500G

| | | |
|-----------------|---------------------------|----------|
| <i>Složení:</i> | hovězí masová infuse | 300 g/l |
| | kyselý hydrolyzát kaseinu | 17,5 g/l |
| | škrob | 1,5 g/l |
| | agar | 17 g/l |

Příprava: Dle pokynů od výrobce bylo naváženo 38 g dehydratovaného média do 1000 ml destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,3 \pm 0,1$. Po zchladnutí na přibližně 45 °C se směs promíchá a rozlívá do sterilních Petriho misek. Po ztuhnutí a vychladnutí půdy se misky uchovávají v chladničkách při 2 - 8 °C.

Krevní agar (21,25 g/ 500 ml), Sigma – Aldrich, kód produktu B1676 – 500G

| | | |
|-----------------|--------------------|-------------------------------|
| <i>Složení:</i> | pepton s proteasou | 15 g/l |
| | jaterní extrakt | 2,5 g/l |
| | extrakt z kvasnic | 5 g/l |
| | chlorid sodný | 15 g/l |
| | beraní krev | 10 % z celkového objemu média |

Příprava: Dle pokynů od výrobce bylo naváženo 21,25 g dehydratovaného média do 500 ml destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,4 \pm 0,2$. Po zchladnutí na přibližně 45 °C se směs promíchá a přidá se k ní vypočítaný objem beraní krve – 10 % z celkového objemu média. Následně se rozlívá do sterilních Petriho misek. Po ztuhnutí a vychladnutí půdy se misky uchovávají v chladničkách při 2 - 8 °C.

Malt agar (45 g/ 1000ml), HiMedia Laboratories, kód produktu M253 – 500G

| | | |
|-----------------|-----------------|--------|
| <i>Složení:</i> | sladový extrakt | 30 g/l |
| | agar | 15 g/l |

Příprava: Dle pokynů od výrobce bylo naváženo 45 g dehydratovaného média do 1000 ml destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 118 °C po dobu 15 minut. Výsledné pH při 25 °C bylo $5,5 \pm 0,2$. Po zchladnutí na přibližně 45 °C se směs promíchá a rozlívá do sterilních Petriho misek. Po ztuhnutí a vychladnutí půdy se misky uchovávají v chladničkách při 2 - 8 °C.

Muller Hinton bujón (21 g/ 1000 ml), HiMedia Laboratories, kód produktu M391 – 500G

| | | |
|-----------------|----------------------|---------|
| <i>Složení:</i> | hovězí masová infuze | 300 g/l |
|-----------------|----------------------|---------|

| | |
|--------------------------------|---------|
| enzymatický hydrolyzát kaseinu | 15 g/l |
| škrob | 1,5 g/l |

Příprava: Dle pokynů od výrobce bylo naváženo 21 g dehydratovaného média do 1000 ml destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,4 \pm 0,2$. Po vychladnutí se láhve uchovávají v chladničkách při 2 - 8 °C.

4.2.2 Reagencie a pracovní roztoky

Fyziologický roztok (8,5 g / 1000 ml)

| | | |
|-----------------|------------------|---------|
| <i>Složení:</i> | chlorid sodný | 8,5 g/l |
| | destilovaná voda | 1000 ml |

Příprava: Dle pokynů od výrobce bylo naváženo 8,5 g dehydratovaného média do 1000 ml destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí se láhve uchovávají v chladničkách při 2 - 8 °C.

Sterilní destilovaná voda

| | | |
|-----------------|------------------|---------|
| <i>Složení:</i> | destilovaná voda | 1000 ml |
|-----------------|------------------|---------|

Příprava: Do uzavíratelné lahve bylo napuštěno požadované množství destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí se láhve uchovávají v chladničkách při 2 - 8 °C.

4.2.3 Bakteriální kmeny

- *Candida albicans* – CCM 8215
- *Candida glabrata* – CCM 8270
- *Candida krusei* – CCM 8271
- *Candida tropicalis* – CCM 8223
- *Enterococcus faecalis* – CCM 4224
- *Enterococcus faecalis* – vankomycin rezistentní (VRE) – izolát z rány pacienta ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové
- *Escherchia Coli* – CCM 3954
- *Pseudomonas aeruginosa* – CCM 3955
- *Staphylococcus aureus* – CCM 2022

Všechny použité mikroorganismy (kromě *VRE*) pocházejí z České sbírky mikroorganismů (CCM). Inkubační teplota mikroorganismů byla 37 °C ±1 °C a doba inkubace byla 24 hodin. Zásobní kultury byly přeočkovány jednou za 2 týdny.

4.2.4 Antimikrobiální látky

- 4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- sulfomethoxazol

4.3 Pracovní postup

Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace vybraných sulfonamidů byla následována norma ČSN EN ISO 20776–1 ED. 2.

Před samotným testováním byly vykultivovány 24hodinové kultury. Jednotlivé bakteriální kultury byly naočkovány na určené půdy pro dobrý růst. *Candidy* na Malt agar, *VRE* na krevní agar a zbylé mikroorganismy na MullerHinton agar. Následně byly jednotlivé mikroorganismy inkubovány při 36 °C ± 1 °C po dobu 20–24 hodin.

Po inkubaci byl připraven zákal dle McFarlandovy zákalové stupnice o hodnotě 0,5 ve fyziologickém roztoku o objemu ±5 ml. Hodnota 0,5 odpovídá antimikrobiální koncentraci 1–5 * 10⁵ CFU/ml. Následně bylo 100 µl přeneseno do 9,9 ml Muller Hinton bujónu a promícháno pomocí vortexu. Z bujónu bylo přeneseno 50 µl do jamky mikrotitrační destičky.

Pro jednotlivé sulfonamidové deriváty byl připraven zásobní roztok o koncentraci 32mg/l navážením potřebného množství, které bylo rozpuštěno ve vypočítaném objemu sterilizované vody.

Ze zásobního roztoku byla připravena dvojkovým ředěním koncentrační řada o hodnotách 16, 8, 4, 2, 1 mg/l objemu 2000 μ l. Při detekci MIC = 1 mg/l byly připraveny další koncentrace a to 0,5 a 0,25 mg/l o objemu 2000 μ l.

Používanou mikrotitrační destičku můžeme vidět na obrázku 11.

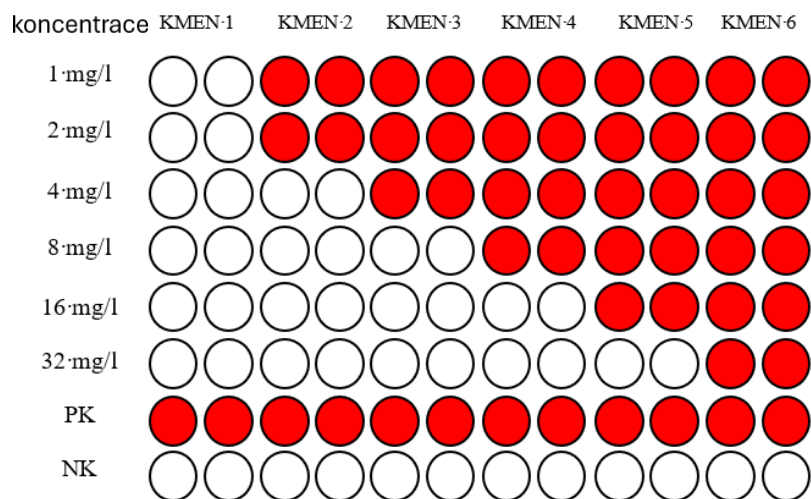
Všechny roztoky byly promíchány. Poté bylo do každé jamky mikrotitrační destičky přidáno 100 μ l daného sulfonamidového derivátu o určité koncentraci a promícháno s bujónem pomocí pipety.

Do mikrotitrační destičky byla také dána pozitivní kontrola (100 μ l bujónu s kulturou) a negativní kontrola (čistý bujón).

Mikrotitrační destička byla kultivována po dobu 24 hodin při 36°C \pm 1 °C. Po inkubaci byl proveden odečet MIC. Jednotlivé sulfonamidové deriváty byly vždy testovány v dubletu ve 3 opakováních.

Z jamky, kde byla určena MIC byl pomocí kličky vyočkován na Petriho misku obsah jamky a miska se nechala kultivovat po dobu 24 až 48 hodin při 36°C \pm 1 °C. Po kultivaci byly spočítány kolonie a určeno, zda MIC odpovídá MBC.

Z pozitivní kontroly bylo odebráno 10 μ l a smícháno s 10 ml fyziologického roztoku a promícháno. Z tohoto roztoku bylo 100 μ l přeneseno na Muller Hinton agar a kultivováno při 24 hodin při 37°C. Po inkubaci byly spočítány kolonie pro kontrolu správného růstu.



Obrázek 11 - schéma základní používané mikrotitrační destičky

vytvořeno autor

PK = pozitivní kontrola, NK = negativní kontrola

červená = nárůst kolonií ve formě zákalu, bílá = bez nárůstu kolonií – bez zákalu

příklad odečtu: KMEN 1: MIC = 1mg/l, KMEN 6: MIC > 32mg/l

4.4 Výsledky stanovení MIC

4.4.1 4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

Tabulka 2 - účinnost 4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu

| Mikroorganismus | MIC (mg/l) |
|---|---------------|
| <i>Candida albicans</i> (CCM 8215) | MIC > 32mg/l |
| <i>Candida glabrata</i> (CCM 8270) | MIC = 1mg/l |
| <i>Candida krusei</i> (CCM 8271) | MIC = 1mg/l |
| <i>Candida tropicalis</i> (CCM 8223) | MIC = 32mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 4224) | MIC = 1mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (VRE) (izolát) | MIC = 1mg/l |
| <i>Escherichia coli</i> (CCM 3954) | MIC > 32mg/l |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955) | MIC > 32 mg/l |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 2022) | MIC > 32 mg/l |

4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid (schéma 2) inhibuje růst *Candida glabrata*, *Candida Krusei* a *Enterococcus faecalis* a VRE v MIC = 1mg/l. Dále inhibuje růst *Candida tropicalis* při MIC = 32 mg/l. U ostatních testovaných mikroorganismů je MIC > 32 mg/l.

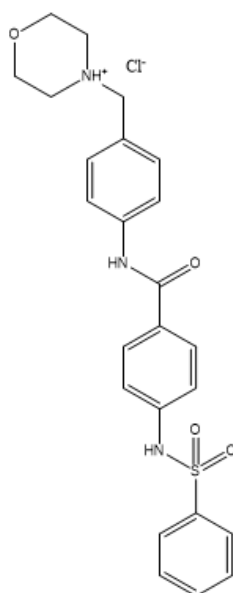


Schéma 2 - 4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

4.4.2 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

Tabulka 3 - účinnost 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu

| Mikroorganismus | MIC (mg/l) |
|---|--------------|
| <i>Candida albicans</i> (CCM 8215) | MIC > 32mg/l |
| <i>Candida glabrata</i> (CCM 8270) | MIC = 1mg/l |
| <i>Candida krusei</i> (CCM 8271) | MIC = 1mg/l |
| <i>Candida tropicalis</i> (CCM 8223) | MIC > 32mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 4224) | MIC = 1mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (VRE) (izolát) | MIC = 1mg/l |
| <i>Escherichia coli</i> (CCM 3954) | MIC > 32mg/l |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955) | MIC > 32mg/l |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 2022) | MIC > 32mg/l |

4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid (schéma 3) inhibuje růst *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecalis* (VRE) v MIC = 1mg/l. U ostatních testovaných mikroorganismů je MIC > 32mg/l.

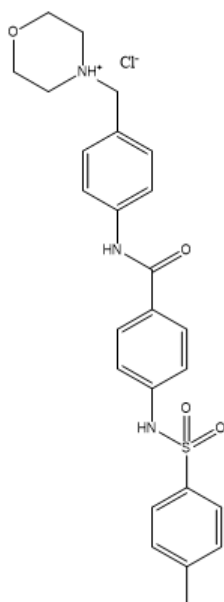


Schéma 3 - 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

4.4.3 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

Tabulka 4 - účinnost 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu

| Mikroorganismus | MIC (mg/l) |
|---|---------------|
| <i>Candida albicans</i> (CCM 8215) | MIC > 32 mg/l |
| <i>Candida glabrata</i> (CCM 8270) | MIC = 1mg/l |
| <i>Candida krusei</i> (CCM 8271) | MIC = 4mg/l |
| <i>Candida tropicalis</i> (CCM 8223) | MIC > 32mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 4224) | MIC = 1mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (VRE) (izolát) | MIC = 1mg/l |
| <i>Escherichia coli</i> (CCM 3954) | MIC > 32mg/l |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955) | MIC > 32mg/l |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 2022) | MIC > 32mg/l |

4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid (schéma 4) inhibuje růst *Candida glabrata*, *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecalis* (VRE) v MIC = 1mg/l. Růst *Candida krusei* je inhibován v MIC = 4mg/l. U ostatních testovaných mikroorganismů je MIC > 32mg/l.

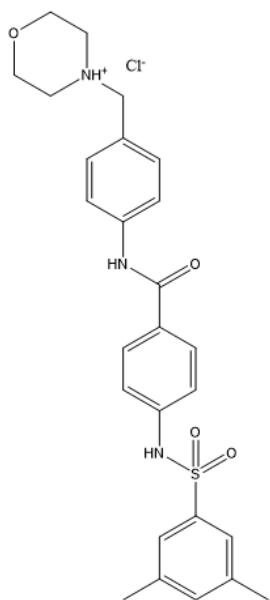


Schéma 4 - 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

4.4.4 4 - ((3-fluor-4-methylfenyl) sulfonamido)-N- (4- (merfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

Tabulka 5 - účinnost 4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4- (merfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu

| Mikroorganismus | MIC (mg/l) |
|---|--------------|
| <i>Candida albicans</i> (CCM 8215) | MIC > 32mg/l |
| <i>Candida glabrata</i> (CCM 8270) | MIC = 1mg/l |
| <i>Candida krusei</i> (CCM 8271) | MIC = 1mg/l |
| <i>Candida tropicalis</i> (CCM 8223) | MIC > 32mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 4224) | MIC = 32mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (VRE) (izolát) | MIC = 1mg/l |
| <i>Escherichia coli</i> (CCM 3954) | MIC > 32mg/l |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955) | MIC > 32mg/l |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 2022) | MIC > 32mg/l |

4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4- (merfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid (schéma 5) inhibuje růst *Candida glabrata*, *Candida krusei* a *Enterococcus faecalis* (VRE) v MIC = 1mg/l. *Enterococcus faecalis* je inhibován v MIC = 32mg/l. U ostatních testovaných mikroorganismů je MIC > 32mg/l.

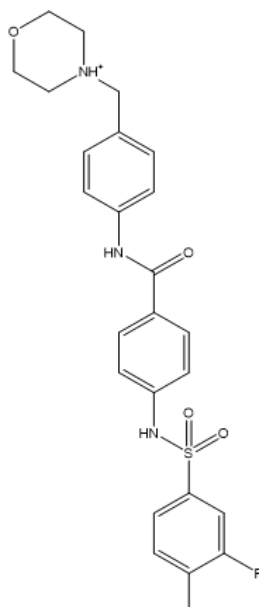


Schéma 5 - 4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4- (merfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

4.4.5 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

Tabulka 6 - účinnost 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu

| Mikroorganismus | MIC (mg/l) |
|---|--------------|
| <i>Candida albicans</i> (CCM 8215) | MIC > 32mg/l |
| <i>Candida glabrata</i> (CCM 8270) | MIC > 32mg/l |
| <i>Candida krusei</i> (CCM 8271) | MIC > 32mg/l |
| <i>Candida tropicalis</i> (CCM 8223) | MIC = 32mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 4224) | MIC > 32mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (VRE) (izolát) | MIC > 32mg/l |
| <i>Escherichia coli</i> (CCM 3954) | MIC > 32mg/l |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955) | MIC > 32mg/l |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 2022) | MIC > 32mg/l |

4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid (schéma 6) inhibuje růst pouze u *Candida tropicalis* a to v MIC = 32mg/l. U ostatních testovaných mikroorganismů je MIC > 32mg/l.

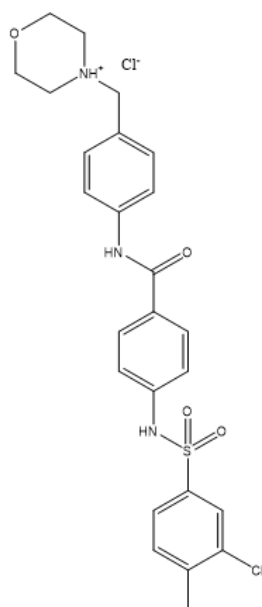


Schéma 6 - 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

4.4.6 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

Tabulka 7 - účinnost 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu

| Mikroorganismus | MIC (mg/l) |
|---|--------------|
| <i>Candida albicans</i> (CCM 8215) | MIC = 16mg/l |
| <i>Candida glabrata</i> (CCM 8270) | MIC = 1mg/l |
| <i>Candida krusei</i> (CCM 8271) | MIC > 32mg/l |
| <i>Candida tropicalis</i> (CCM 8223) | MIC > 32mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 4224) | MIC > 32mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (VRE) (izolát) | MIC = 1mg/l |
| <i>Escherichia coli</i> (CCM 3954) | MIC > 32mg/l |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955) | MIC > 32mg/l |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 2022) | MIC > 32mg/l |

4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid (schéma 7) inhibuje růst *Candida glabrata* a *Enterococcus faecalis* (VRE) v MIC = 1mg/l. U *Candida albicans* je MIC = 16mg/l. U ostatních testovaných mikroorganismů je MIC >

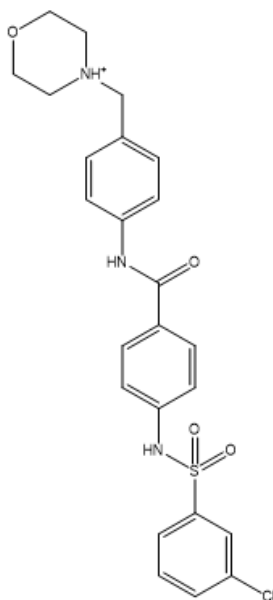


Schéma 7 - 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

32mg/l.

4.4.7 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

Tabulka 8 - účinnost 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu

| Mikroorganismus | MIC (mg/l) |
|---|--------------|
| <i>Candida albicans</i> (CCM 8215) | MIC > 32mg/l |
| <i>Candida glabrata</i> (CCM 8270) | MIC = 4mg/l |
| <i>Candida krusei</i> (CCM 8271) | MIC > 32mg/l |
| <i>Candida tropicalis</i> (CCM 8223) | MIC > 32mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 4224) | MIC = 8mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (VRE) (izolát) | MIC = 1mg/l |
| <i>Escherichia coli</i> (CCM 3954) | MIC > 32mg/l |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955) | MIC > 32mg/l |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 2022) | MIC > 32mg/l |

4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid (schéma 8) inhibuje růst *Enterococcus faecalis* (VRE) v MIC = 1mg/l. *Candida glabrata* je inhibována v MIC = 4mg/l a *Enterococcus faecalis* je inhibován v MIC = 8mg/l. U ostatních testovaných mikroorganismů je MIC > 32mg/l.

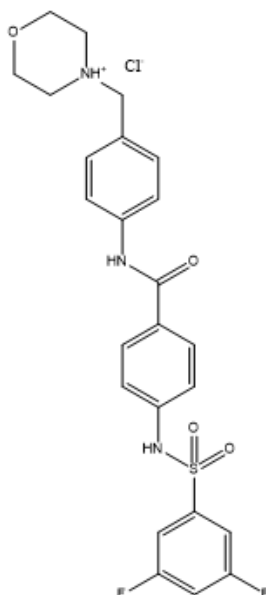


Schéma 8 -4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

4.4.8 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

Tabulka 9 - účinnost 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochloridu

| Mikroorganismus | MIC (mg/l) |
|---|--------------|
| <i>Candida albicans</i> (CCM 8215) | MIC > 32mg/l |
| <i>Candida glabrata</i> (CCM 8270) | MIC > 32mg/l |
| <i>Candida krusei</i> (CCM 8271) | MIC = 16mg/l |
| <i>Candida tropicalis</i> (CCM 8223) | MIC > 32mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 4224) | MIC = 1mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (VRE) (izolát) | MIC = 1mg/l |
| <i>Escherichia Coli</i> (CCM 3954) | MIC > 32mg/l |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955) | MIC > 32mg/l |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 2022) | MIC > 32mg/l |

4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid (schéma 9) inhibuje růst *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecalis* (VRE) v MIC = 1mg/l. *Candida krusei* je inhibována v MIC = 16mg/l. U ostatních testovaných mikroorganismů je MIC > 32mg/l.

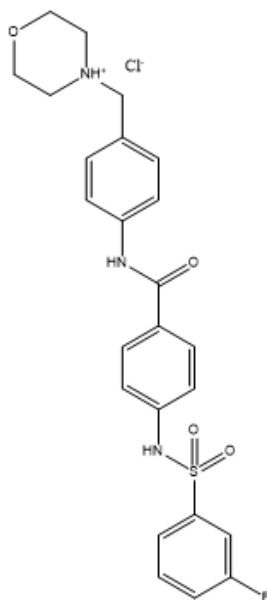


Schéma 9 - 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid

4.4.9 Sulfamethoxazol

Tabulka 10 - účinnost sulfomethoxazolu

| Mikroorganismus | MIC (mg/l) |
|---|--------------|
| <i>Candida albicans</i> (CCM 8215) | MIC > 32mg/l |
| <i>Candida glabrata</i> (CCM 8270) | MIC > 32mg/l |
| <i>Candida krusei</i> (CCM 8271) | MIC > 32mg/l |
| <i>Candida tropicalis</i> (CCM 8223) | MIC > 32mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (CCM 4224) | MIC = 1mg/l |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (VRE) (izolát) | MIC = 1mg/l |
| <i>Escherichia coli</i> (CCM 3954) | MIC = 32mg/l |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCM 3955) | MIC = 16mg/l |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (CCM 2022) | MIC > 32mg/l |

Sulfomethoxazol (schéma 10) inhibuje růst *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecalis* (VRE) při MIC = 1mg/l. *Pseudomonas aeruginosa* je inhibována při MIC = 16mg/l a *Escherichia coli* při MIC = 32mg/l. U ostatních testovaných mikroorganismů je MIC > 32mg/l.

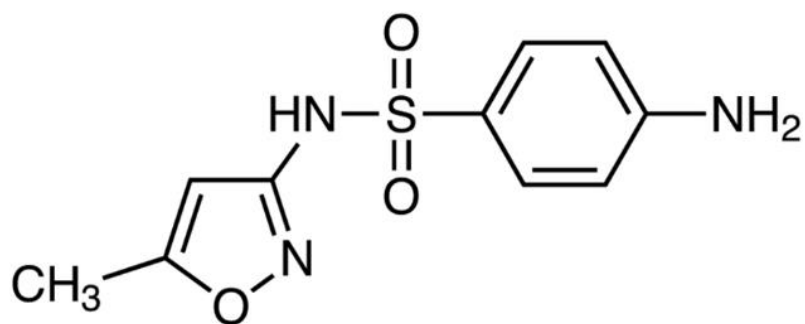
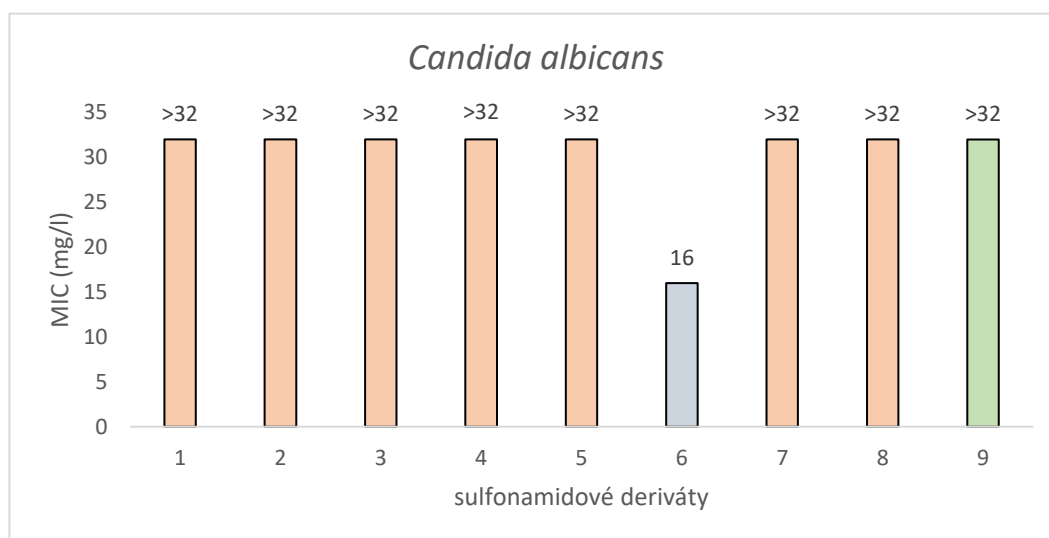


Schéma 10 – sulfomethoxazol

převzato z: (TCI chemicals)

4.4.10 Účinnost derivátů vůči *Candida albicans*



Graf 1 - účinnost sulfonamidových derivátů vůči *Candida albicans*

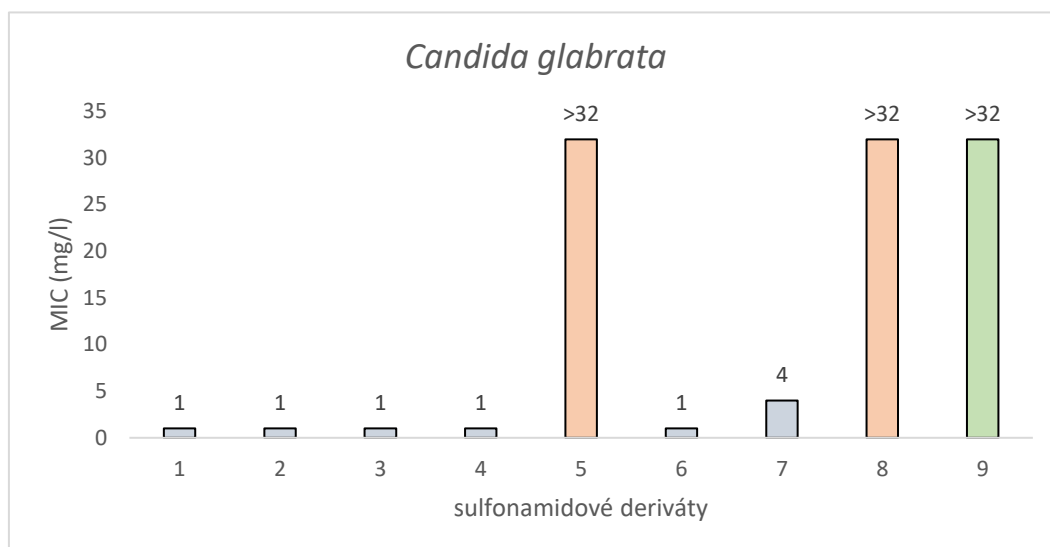
- účinná koncentrace, ■ MIC > 32mg/l (> než testovaný rozsah koncentrací)
- sulfomethoxazol (porovnání s klinicky používaným ATB)

Testované sulfonamidové deriváty nejsou schopny v testovaném koncentračním rozsahu inhibovat růst *Candida albicans* až na 1 výjimku. Výjimku tvoří derivát č. 6 (4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid), který inhibuje růst této kvasinky v MIC = 16mg/l. Sulfomethoxazol neinhibuje růst *Candida albicans*.

LEGENDA:

- 1 = 4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 2 = 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 3 = 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 4 = 4 - ((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4- (merfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 5 = 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 6 = 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 7 = 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 8 = 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 9 = sulfomethoxazol

4.4.11 Účinnost derivátů vůči *Candida glabrata*



Graf 2 - účinnost sulfonamidových derivátů vůči *Candida glabrata*

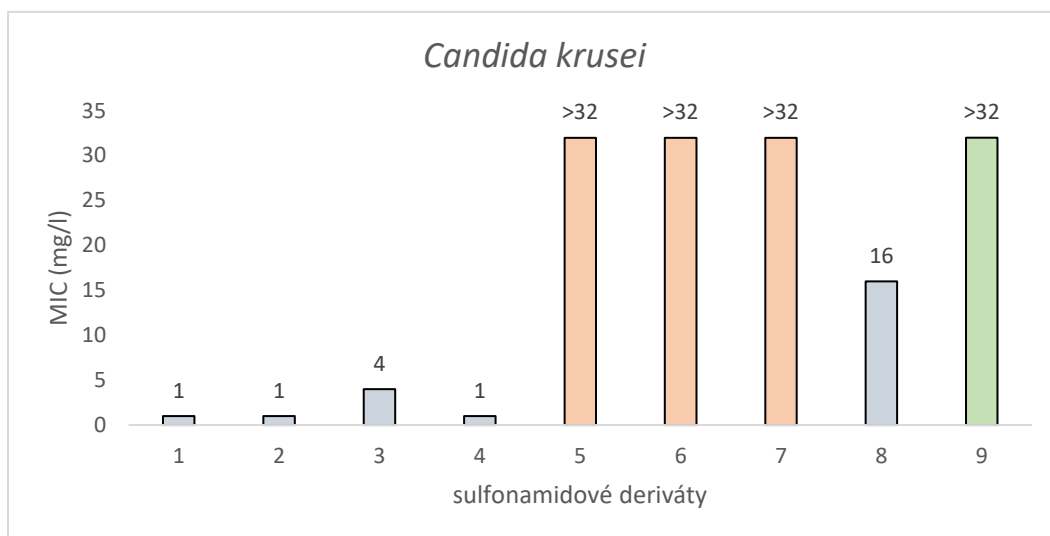
- účinná koncentrace,
- MIC > 32mg/l (> než testovaný rozsah koncentrací)
- sulfomethoxazol (porovnání s klinicky používaným ATB)

5 testovaných sulfonamidových derivátů bylo schopno inhibovat růst *Candida glabrata* v MIC = 1mg/l. Derivát č. 7 (4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) inhiboval tuto bakterii v MIC = 4mg/l. Sulfomethoxazol neinhibuje růst *Candida glabrata*.

LEGENDA:

- 1 = 4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 2 = 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 3 = 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 4 = 4 - ((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4- (merfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 5 = 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 6 = 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 7 = 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 8 = 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 9 = sulfomethoxazol

4.4.12 Účinnost derivátů vůči *Candida krusei*



Graf 3- účinnost sulfonamidových derivátů vůči *Candida krusei*

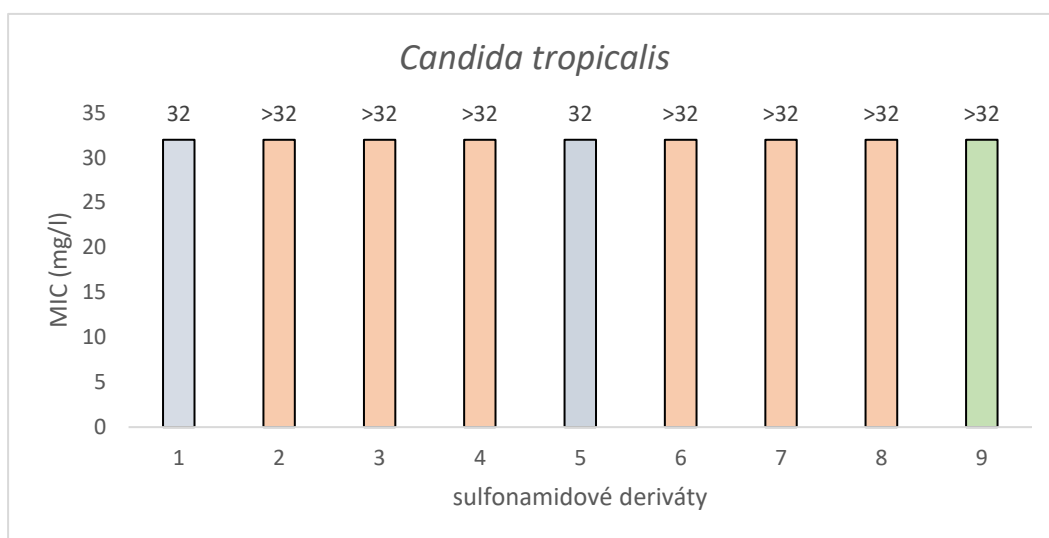
- účinná koncentrace, ■ MIC > 32mg/l (> než testovaný rozsah koncentrací)
■ sulfomethoxazol (porovnání s klinicky používaným ATB)

Růst *Candida krusei* je inhibován 5 testovanými deriváty. Deriváty číslo 1, 2 a 4 inhibují růst v MIC = 1mg/l. Derivát číslo 3 inhibuje růst v MIC = 4mg/l a derivát číslo 8 v MIC = 4mg/l. Sulfomethoxazol neinhibuje růst *Candida krusei*.

LEGENDA:

- 1 = 4-(fenylosulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
2 = 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
3 = 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
4 = 4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
5 = 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
6 = 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
7 = 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
8 = 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
9 = sulfomethoxazol

4.4.13 Účinnost derivátů vůči *Candida tropicalis*



Graf 4 - účinnost sulfonamidových derivátů vůči *Candida tropicalis*

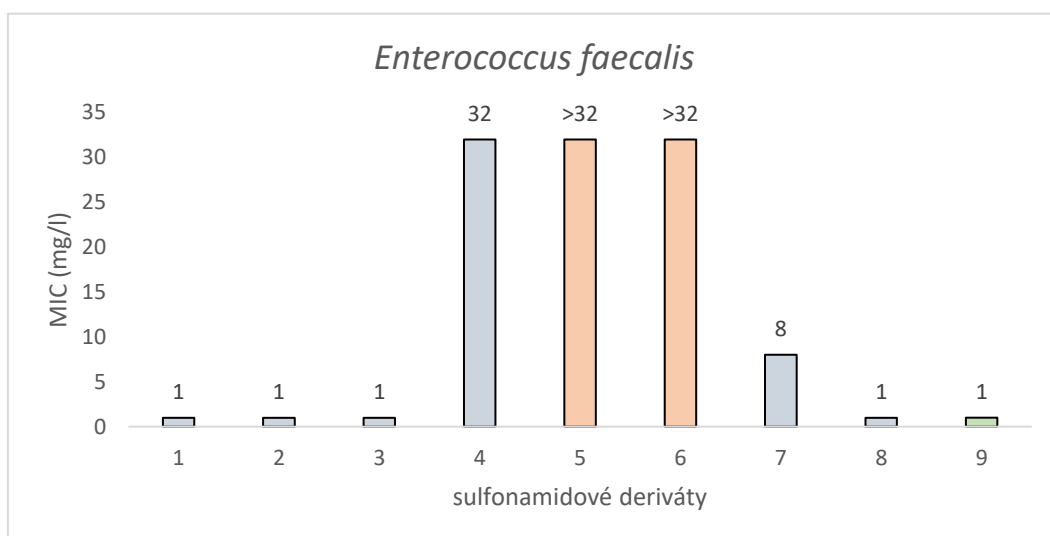
- účinná koncentrace, ■ MIC > 32mg/l (> než testovaný rozsah koncentrací)
■ sulfomethoxazol (porovnání s klinicky používaným ATB)

Růst *Candida tropicalis* je inhibován pouze deriváty 1 a 5 a to v MIC = 32mg/l. Ostatní testované deriváty nejsou schopny inhibovat růst v testovaném koncentračním rozsahu. Sulfomethoxazol neinhibuje růst *Candida tropicalis*.

LEGENDA:

- 1 = 4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
2 = 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
3 = 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
4 = 4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
5 = 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
6 = 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
7 = 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
8 = 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
9 = sulfomethoxazol

4.4.14 Účinnost derivátů vůči *Enterococcus faecalis*



Graf 5 - účinnost sulfonamidových derivátů vůči *Enterococcus faecalis*

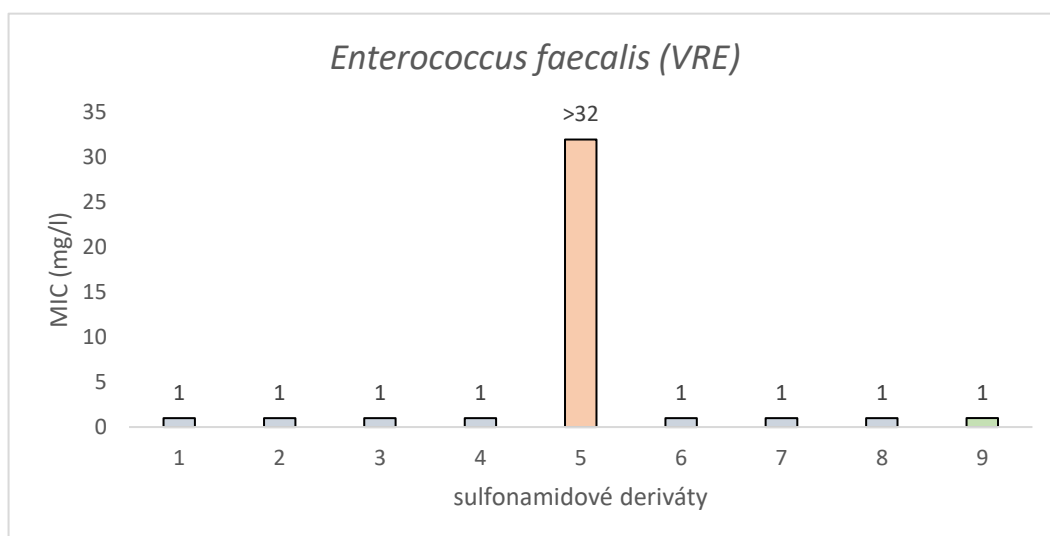
- účinná koncentrace, ■ MIC > 32mg/l (> než testovaný rozsah koncentrací)
- sulfomethoxazol (porovnání s klinicky používaným ATB)

4 testované deriváty inhibují růst *Enterococcus faecalis* v MIC = 1mg/l stejně jako sulfomethoxazol. Dále derivát číslo 7 inhibuje růst v MIC = 8mg/l a derivát číslo 4 inhibuje růst v MIC = 32mg/l

LEGENDA:

- 1 = 4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 2 = 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 3 = 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 4 = 4 - ((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4- (merfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 5 = 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 6 = 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 7 = 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 8 = 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 9 = sulfomethoxazol

4.4.15 Účinnost derivátů vůči VRE



Graf 6 - účinnost sulfonamidových derivátů vůči VRE

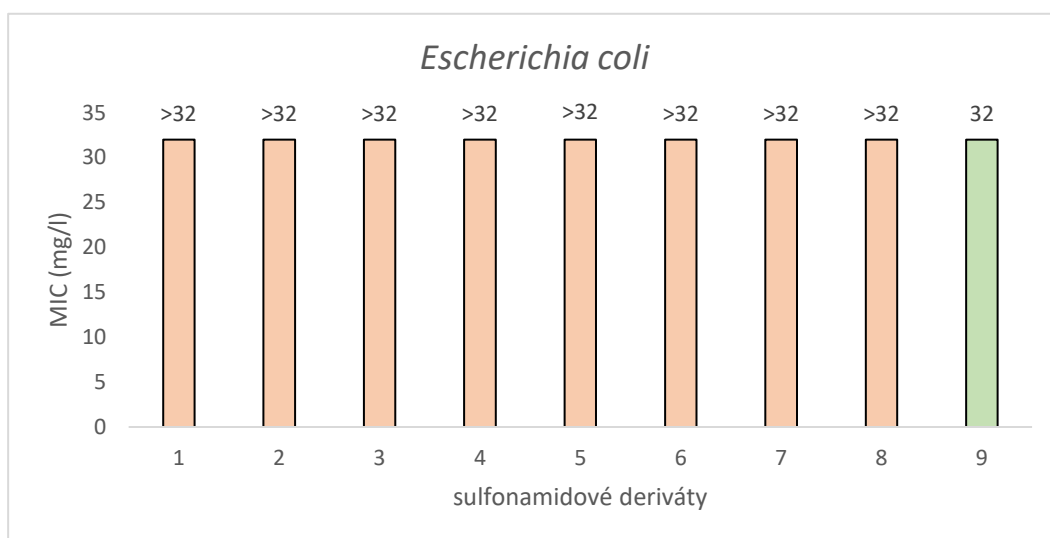
- účinná koncentrace, MIC > 32mg/l (> než testovaný rozsah koncentrací)
- sulfomethoxazol (porovnání s klinicky používaným ATB)

Růst VRE je inhibován 7 testovanými deriváty v MIC = 1mg/l stejně tak i sulfomethoxazolem. Pouze derivát číslo 5 v testovaném rozsahu neinhibuje růst VRE.

LEGENDA:

- 1 = 4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 2 = 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 3 = 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 4 = 4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 5 = 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 6 = 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 7 = 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 8 = 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 9 = sulfomethoxazol

4.4.16 Účinnost derivátů vůči *Escherichia coli*



Graf 7 - účinnost sulfonamidových derivátů vůči *Escherichia coli*

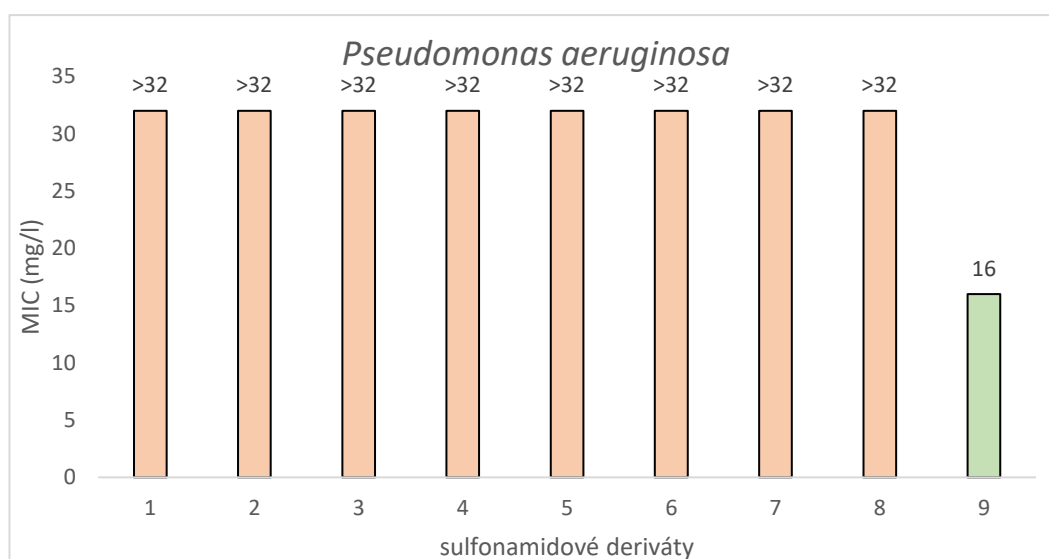
- účinná koncentrace, ■ MIC > 32mg/l (> než testovaný rozsah koncentrací)
■ sulfomethoxazol (porovnání s klinicky používaným ATB)

Růst *Escherichia coli* neinhibuje ani jeden z testovaných derivátů v testovaném koncentračním rozsahu. Sulfomethoxazol inhibuje růst *Escherichia coli* v MIC = 32mg/l

LEGENDA:

- 1 = 4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 2 = 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 3 = 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 4 = 4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 5 = 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 6 = 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 7 = 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 8 = 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 9 = sulfomethoxazol

4.4.17 Účinnost derivátů vůči *Pseudomonas aeruginosa*



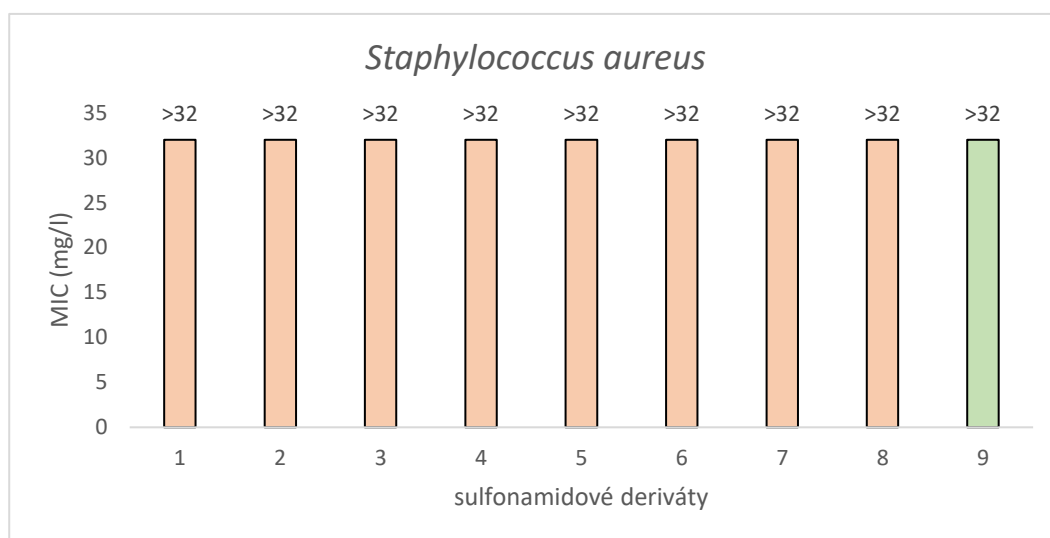
Graf 8 - účinnost sulfonamidových derivátů vůči *Pseudomonas aeruginosa*
■ účinná koncentrace, ■ MIC > 32mg/l (> než testovaný rozsah koncentrací)
■ sulfomethoxazol (porovnání s klinicky používaným ATB)

Růst *Pseudomonas aeruginosa* neinhiboval žádný z testovaných derivátů v testovaném koncentračním rozsahu. Sulfomethoxazol inhibuje růst *Pseudomonas aeruginosa* v MIC = 16mg/l.

LEGENDA:

- 1 = 4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 2 = 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 3 = 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 4 = 4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 5 = 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 6 = 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 7 = 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 8 = 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
- 9 = sulfomethoxazol

4.4.18 Účinnost derivátů vůči *Staphylococcus aureus*



Graf 9 - účinnost testovaných derivátů vůči *Staphylococcus aureus*

- účinná koncentrace, ■ MIC > 32mg/l (> než testovaný rozsah koncentrací)
■ sulfomethoxazol (porovnání s klinicky používaným ATB)

Růst *Staphylococcus aureus* není inhibován v testovaném koncentračním rozsahu žádným testovaným derivátem ani sulfomethoxazolem.

LEGENDA:

- 1 = 4-(fenylosulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
2 = 4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
3 = 4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
4 = 4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
5 = 4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
6 = 4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
7 = 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
8 = 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid
9 = sulfomethoxazol

DISKUSE

Tato diplomová práce navazuje na výzkum biologicky aktivních sulfonamidových derivátů na bázi morpholinomethylfenylbenzen sulfonamidů, které jsou vyvíjeny na Ústavu organické chemie a technologie na Fakultě chemicko – technologické Univerzity Pardubice. V roce 2021 byla v rámci diplomové práce studována antimikrobiální aktivita substituovaných morpholinomethylfenylbenzen sulfonamidů, jejichž struktura je uvedena na schématu číslo 11. V této studii byla stanovena nízká antimikrobiální aktivita v porovnání s komerčně dostupnými antibiotiky testované na vybrané gramnegativní a grampozitivní bakterie a také na kvasinky. Testované látky byly navíc málo rozpustné ve vodě, a proto bylo nutné testované deriváty rozpouštět v dimethylfulfoxidu (Franko, 2021).

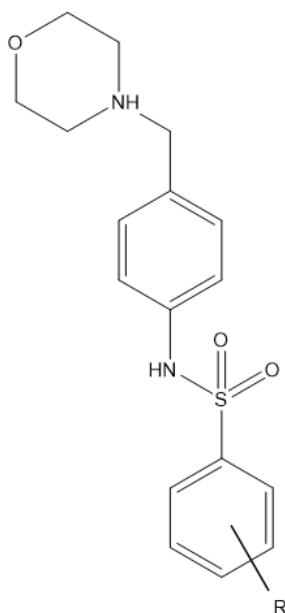


Schéma 11 – vzorec studovaných sulfonamidových derivátů bez zabudované 4 – aminobenzoové kyseliny

převzato z: (Franko, 2021)

R: H, 4-CH₃, 3,5-(CH₃)₂, 3-F-4-CH₃, 3-Cl-4-CH₃, 3-F, 3-Cl, 3,5-F₂

V této diplomové práci bylo studováno 8 sulfonamidových morpholinomethylfenylbenzenových derivátů, které ve své struktuře mají zabudovanou kyselinu 4 – aminobenzoovou a byly připraveny ve formě ve vodě rozpustné hydrogenuchloridové soli. Tato struktura je uvedena schématu číslo 12. Příprava těchto sulfonamidových derivátů ve formě hydrogenuchloridové soli zajistila, že testované deriváty byly velmi dobře rozpustné ve vodě a nebylo již při stanovování MIC mikrodiluční metodou nutné použít dimethylsulfoxid. Nově syntetizované deriváty tak vykazovaly podstatně lepší možnosti pro *in vitro* testování a také možné potenciální použití v klinické praxi. (Franko, 2021).

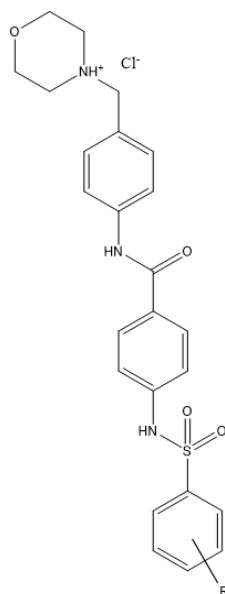


Schéma 12 – vzorec studovaných sulfonamidů se zabudovanou 4 – aminobenzoovou kyselinou

R: H, 4-CH₃, 3,5-(CH₃)₂, 3-F-4-CH₃, 3-Cl-4-CH₃, 3-F, 3-Cl, 3,5-F₂

V obou diplomových pracích jsou zastoupeny jednotlivé skupiny mikroorganismů podobně. Společnými testovanými mikroorganismy jsou *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Růst *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* nebyl inhibován žádným z testovaných derivátů v MIC, která by měla potenciální využití v klinické praxi. V inhibici růstu *Enterococcus faecalis* byla u těchto derivátů stanovena výrazně účinnější vyšší inhibiční účinnost než u derivátů studovaných v diplomové práci Franko (2021)

Pro porovnání účinnosti vůči ostatním mikroorganismům by bylo zapotřebí dalšího testování. Obecně lze však konstatovat, že změnou struktury morpholinomethylfenylbenzenových sulfonamidových derivátů došlo k výraznému zvýšení inhibiční aktivity vůči testovaným kmenům.

Všechny syntetizované deriváty byly podrobeny testování podle normy ČSN EN ISO 20776–1 ED. 2.

Jednotlivé deriváty se svou účinností lišily. Nejčastěji byly deriváty schopny inhibovat růst druhu *Enterococcus* a některých kmenů rodu *Candida*, a to i v koncentracích 1mg/l.

Nejúčinnější z hlediska největšího množství inhibovaných mikroorganismů je derivát s číslem 1 (4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid). Tento derivát inhibuje růst 5 mikroorganismů, z toho 4 jsou inhibovány v MIC = 1mg/l. Inhibované mikroorganismy jsou kvasinky *Candida glabrata* a *Candida krusei* a grampozitivní bakterie

Enterococcus faecalis a *Enterococcus faecalis* rezistentní na vankomycin. Posledním inhibovaným mikroorganismem je *Candida tropicalis*, jejíž růst je inhibován v MIC = 32mg/l.

Druhým nejúčinnějším derivátem je derivát s číslem 2 (4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid). Derivát inhibuje růst 4 mikroorganismů v MIC = 1mg/l. Jedná se o *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Enterococcus faecalis* a vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis*.

Deriváty číslo 3 (4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid), 4 (4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(merfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid), 6 (4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) a 8 (4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) jsou schopny inhibovat růst vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis* v MIC = 1 mg/l. Jednotlivé deriváty se liší ve schopnosti inhibovat růst dalších mikroorganismů. Derivát číslo 3 (4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) je schopen inhibovat růst *Enterococcus faecalis* a *Candida glabrata* v MIC = 1 mg/l, dále inhibuje růst *Candida krusei* v MIC = 4 mg/l.

Deriváty číslo 4 (4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(merfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) a 6 (4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) jsou schopny inhibovat růst *Candida glabrata* v MIC = 1 mg/l. Derivát 4 (4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(merfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) dále inhibuje při této koncentraci růst *Candida krusei*. Derivát číslo 8 (4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) při této koncentraci inhibuje růst *Enterococcus faecalis*.

Derivát číslo 8 (4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) dále inhibuje růst *Candida krusei* v MIC = 16 mg/l. Derivát číslo 6 (4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) inhibuje růst *Candida albicans* v MIC = 16 mg/l.

Posledním účinným derivátem je derivát číslo 7 (4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid). Tento derivát inhibuje růst 3 mikroorganismů. V MIC = 1 mg/l inhibuje růst vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis*, v MIC = 4mg/l inhibuje růst *Candida glabrata* a v MIC = 8 mg/l inhibuje růst *Enterococcus faecalis*.

Nejméně účinný derivát je číslo 5 (4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid). Tento derivát byl schopen inhibovat růst

Candida tropicalis v MIC = 32mg/l. I přes zjištěnou inhibici nemá tento derivát potenciál na využití v klinické praxi vzhledem k vysoké koncentraci, ve které byl účinný.

Mikroorganismy *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* nebyly pomocí syntetizovaných derivátů v použitém koncentračním rozsahu inhibovány až na 2 výjimky. Deriváty číslo 1 (4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) a 5 (4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) inhibovaly růst *Candida tropicalis* v MIC = 32 mg/l. Derivát číslo 6 (4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) je schopen inhibovat růst *Candida albicans* v MIC = 16 mg/l.

U jednotlivých derivátů byla také stanovena MBC, která odpovídala MIC.

K porovnání účinku byl využit sulfomethoxazol, který je součástí využívaných ATB Cotrimoxazol, Biseptol a Sumetrolim (Sulfomethoxazol, 2024).

Samotný sulfomethoxazol je schopen inhibovat růst grampozitivních bakterií vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecalis* v MIC = 1mg/l a gramnegativních bakterií *Pseudomonas aeruginosa* v MIC = 16mg/l a *Escherichia coli* v MIC = 32mg/l.

Sulfomethoxazol je účinnější při inhibici růstu gramnegativních baterií *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* než testované deriváty.

Deriváty 1 (4-(fenylsulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid), 2 (4-((4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid), 3 (4-((3,5-dimethylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) a 8 (4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) jsou schopny inhibovat růst vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecalis* stejně účinně jako sulfomethoxazol v MIC = 1 mg/l. Deriváty 4 (4-((3-fluor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid), 6 (4-((3-chlorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) a 7 (4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid) jsou stejně jako sulfomethoxazol schopny inhibovat růst vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis* v MIC = 1 mg/l. Bylo ověřeno, že všechny deriváty (krom derivátu číslo 5 (4-((3-chlor-4-methylfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid hydrochlorid)) jsou schopny stejně účinně působit proti vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis* jako sulfomethoxazol.

Sulfomethoxazol není schopen inhibovat růst kmenů rodu *Candida*. V porovnání jsou všechny deriváty účinnější než sulfomethoxazol. Všechny deriváty jsou schopny inhibovat růst alespoň jednoho zástupce rodu *Candida*.

Výběr vhodné terapie enterokokových infekcí má zásadní význam při léčbě pacienta. Porovnat můžeme účinnost používaných ATB v klinické praxi s testovanými deriváty. Pro léčbu enterokokových infekcí se využívají β – laktamová ATB (ampicilin a penicilin (Pfaller, 2016)). Pokud je při testování určená MIC ≥ 16 mg/l, tak jsou mikroorganismy považovány za rezistentní k β – laktamovým ATB (Conceição,2012). Do této koncentrace se vešlo 5 z 8 testovaných derivátů. Můžeme tedy pozorovat podobnou účinnost. V minulosti se k léčbě využívaly také aminoglykosidy. Zde se ovšem u enterokoků vyvinula výrazná rezistence. Proto nelze tyto ATB s testovanými deriváty porovnat (Khan, et al., 2022).

Vankomycin byl lékem první volby pro léčbu infekcí, které byly způsobené enterokokem rezistentním na aminoglykosidy nebo u pacientů s těžkou alergií na β – laktamy. Poté došlo ke vzniku a rozšíření vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis* (Khan, et al. 2022, Hegstad, et al. 2014). Pozitivním zjištěním je, že testované deriváty byly schopny inhibovat růst vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis*. 7 z 8 derivátů bylo účinných v MIC = 1mg/l. Prvotní *in vitro* testování ukazuje, že by tyto deriváty mohly být dále testovány proti infekcím, které jsou způsobené vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis*.

K léčbě kandidóz se nejčastěji využívá samotný flukonazol nebo v kombinaci s dalšími antimykotiky. U flukonazolu je stanovená hraniční hodnota MIC ≤ 64 mg/l. Pokud dojde k jejímu překročení, jsou kvasinky považovány za rezistentní (Pánková, 2013, Pfaller, et al.,2006). Testované deriváty u některých kmenů candid účinnější než flukonazol. Jejich MIC se pohybuje v nižších koncentracích než 64mg/l.

V roce 2017 výzkumná skupina Martina Krátkého z Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové syntetizovala Schiffovy báze sulfadiazinu. Následně byly zkoumány jejich antibakteriální účinky. Výsledky ukázaly, že účinnost proti gramnegativním bakteriím je minimální. Obdobného výsledku bylo dosaženo i u připravených sulfonamidových derivátů. Schiffovy báze byly účinnější než testované sulfonamidové deriváty v inhibici růstu *Staphylococcus aureus*. Na druhou stranu růst *Enterococcus faecalis* byl inhibován připravenými deriváty s větší účinností. Dále byla testována antifungální aktivita proti *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* a *Candida tropicalis*. Z porovnání se dá konstatovat, že u nově syntetizovaných derivátů byla stanovena daleko vyšší účinnost než u Schiffových bází sulfadiazinu, jejichž hodnoty MIC byly vysoké a nemají potenciální uplatnění v klinické praxi (Krátký, 2017).

Samotný sulfathiazol patřil mezi ATB, která byla využívána k léčbě infekcí způsobených *Staphylococcus aureus* nebo *Pseudomonas aeruginosa*. Kvůli rezistenci a nežádoucím účinkům se od jeho užívání ustoupilo (Nunes, et al., 2015). K porovnání účinku s testovanými deriváty byly vybrány Schiffovy báze sulfathiazolu, které syntetizoval Mondal et al (2015). Schiffovy báze byly testovány, zda jsou účinné proti *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. Účinné koncentrace odpovídaly hodnotám 68 mg/l nebo 128 mg/l. Přestože nebyly sulfonamidové deriváty testovány v těchto koncentracích, výsledek je stejný. Ani jedny z testovaných sulfonamidových derivátů nemají potenciální využití v klinické praxi vůči těmto bakteriím (Mondal, et al., 2015).

V roce 2014 na Annaba University Boufas et al. syntetizovali sulfonamidové deriváty – karboxylsulfamidy. Tyto deriváty byly testovány, zda jsou schopny inhibovat růst *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Syntetizované deriváty byly účinnější než testované derivát v této diplomové práci, protože byly schopny inhibovat růst těchto bakterií v MIC = 16mg/l (Boufas, et al., 2014).

Na University of Campinas Oliveira et al. syntetizovali sulfonamidové deriváty na bázi komplexu stříbra se sulfadoxin – salicylaldehydovou Schiffovou bází. Tyto deriváty byly testovány *in vitro* mikrodiluční metodou. Společné testované mikroorganismy jsou *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans*. MIC těchto derivátů byly v průměru vyšší než 200 mg/l. Pro vysoké hodnoty MIC nejsou testované deriváty schopny inhibovat tyto mikroorganismy v koncentraci, která by mohla být využita v klinické praxi (Oliveira, et al., 2022).

Výzkumná skupina Szafranski, et al. z Lékařské univerzity v Gdaňsku syntetizovala sulfonamidové deriváty, u kterých byla testována antifungální aktivita. Konkrétně se jedná o N-(5-amino-1H-1,2,4-triazol-3-yl)pyridin-3-sulfonamidové deriváty. K testování byly využity *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* atd. MIC zpravidla převyšovaly hodnoty 50 mg/l. Výjimku tvoří inhibice růstu *Candida albicans*, jejíž růst byly deriváty schopny inhibovat v MIC = 6,2 nebo 12,5 mg/l. V porovnání se zde testovanými deriváty byly v inhibici růstu *Candida albicans* tyto deriváty účinnější. V inhibici růstu *Candida glabrata* a *Candida krusei* ale byly zde testované deriváty účinnější. V inhibici růstu *Candida tropicalis* jsou všechny deriváty neúčinné (Szafranski, et al., 2017).

Namba et al. z Okayama University testovali účinnost syntetizovaných sulfonamidových derivátů s chemickou strukturou na bázi benzensulfonanilidů vůči vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis*. Testované deriváty se podle účinnosti dají rozdělit na 2 skupiny. První skupina derivátů má hodnoty MIC výrazně vyšší než 30 mg/l.

Deriváty v druhé skupině jsou schopny inhibovat růst vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis* nejčastěji v MIC = 7,8mg/l. 2 deriváty byly schopny inhibovat růst vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis* v MIC = 1 mg/l. Tyto deriváty by bylo možné využít v klinické praxi. V porovnání počtu derivátů, které byly schopny inhibovat růst vankomycin rezistentní *Enterococcus faecalis* v MIC = 1mg/l, jsou mnou testované deriváty účinnější (Namba, et al., 2008).

V roce 2012 výzkumná skupina Martina Krátkého z Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy z Hradce Králové syntetizovala a testovala sulfonamidové deriváty obsahující v chemické struktuře 5-chlor-2-hydroxybenzaldehyd nebo 5-chlor-2-hydroxybenzoovou kyselinu. Deriváty byly testovány, zda jsou schopny inhibovat růst *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* a *Candida tropicalis*. Testované deriváty měly téměř nulovou antifungální aktivitu. Připravené testované sulfonamidové deriváty byly účinnější, protože jsou schopny inhibovat růst *Candida glabrata* a *Candida krusei* (Krátký, 2012).

Basanagouda et al. z Karnatak University syntetizovali sulfonamidové deriváty obsahující v chemické struktuře 4 – azidomethylkumarin. Následně byly tyto deriváty testovány na antimikrobiální aktivity. Mezi testované grampozitivní bakterie patří *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. Testované deriváty měly podobnou účinnost jako testované sulfonamidové deriváty v této při inhibici růstu *Enterococcus faecalis*. V inhibici růstu *Staphylococcus aureus* byly deriváty účinnější (MIC se až na výjimky pohybovaly v rozmezí 1–16 mg/l) než námi testované deriváty. Mezi testované gramnegativní bakterie patří *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. V inhibici růst *Escherichia coli* ani jedny z testovaných derivátů nebyly účinné. V inhibici růst *Pseudomonas aeruginosa* byly v této práci testované deriváty méně účinné (Basanagouda, et al., 2010).

ZÁVĚR

Světová zdravotnická organizace již v roce 2014 označila antimikrobiální rezistenci jako jeden z nejzávažnějších problémů dnešní doby. Rozvoj rezistence je neustále na vzestupu, a proto je potřeba jej řešit.

Bylo připraveno 8 sulfonamidových derivátů, které byly následně testovány jako potencionální antibiotika podle normy ČSN EN ISO 20776–1 ED. 2. (stanovení antimikrobiální aktivity). NMR spektrometrie a elementární analýza byly provedeny na Ústavu organické chemie a technologie.

V experimentální části byla testována minimální inhibiční koncentrace jednotlivých derivátů. Bylo využito 9 mikroorganismů.

Nejúčinnějším derivátem je 4 - (fenylsulfoamido) - N - (4 - (morfolinomethyl)fenyl) benzamid hydrochlorid, který inhiboval růst 4 mikroorganismů v MIC = 1 mg/l. Konkrétně se jedná o *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Enterococcus faecalis* a vankomycin rezistentí *Enterococcus faecalis*. Dále je schopen inhibovat růst *Candida tropicalis* v MIC = 32 mg/l.

Naopak nejméně účinným derivátem je 4 - ((3 - chlor - 4 - methylfenyl) sulfonamido) - N - (4 - (morfolinomethyl)fenyl) benzamid hydrochlorid, který inhiboval pouze *Candida tropicalis* ve vysoké MIC, která se rovná 32 mg/l.

Pro potenciální zavedení těchto derivátů do klinické praxe vede dlouhá cesta a je zapotřebí dalšího testování. Výhodou těchto derivátů pro *in vitro* testování je jejich rozpustnost ve vodě. Některé testy jsou již prováděny na Katedře fyzikální chemie fakulty chemicko – technologické Univerzity Pardubice.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Amri, N. a Wirth, T. Recent Advances in the Electrochemical Synthesis of Organosulfur Compounds.. *The Chemical Record*. 2021, vol. **21**(9), s. 2526-2537
2. Antimicrobial Resistance, Tackling the Burden in the European Union OECD/ECDC, *European Commissions*, 2019
3. Antimikrobiální rezistence, Usnesení Evropského parlamentu ze dne 1.4.2023 o opatřeních EU v boji proti rezistenci vůči antimikrobiálním látkám (2023/2703(RSP)), P9_TA (2023)0220, *Evropský parlament*, 2023
4. A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance, *European Commissions*, 2017
5. Aryal, S., Antimicrobial Susceptibility Testing (AST) – Types and Limitations, *Microbe Notes*, 2022
6. Babalola, I. T. a Suleiman, G. Design, synthesis, and molecular docking studies of N-substituted sulfonamides as potential anticancer therapeutics. *Journal of Taibah University Medical Sciences*. 2024, vol. **19**(1), s. 175-183
7. Balouiri, M.; Sadiki, M. a Ibnsouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016, vol. **6**(2), s. 71-79
8. Basanagouda, M., Shivashankar, K., Kulkarni, M. V., et al., Synthesis and antimicrobial studies on novel sulfonamides containing 4 – azidomethyl coumarin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, vol. **45**(3), s. 1151–1157
9. Benková, M.; Soukup, O. a Marek, J. Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *Journal of Applied Microbiology*. 2020, vol. **129**(4), s. 806-822
10. Biomérieux., VITEK 2, Healthcare, Systém brochure, staženo leden 2024.
11. Boufas, W., Dupont, N., Berredjem, M., Synthesis and antibacterial activity of sulfonamides. SAR and DFT studies. *Journal of molecular Structure*, vol. **1074**(1), s. 180-185.
12. Cahill, T. J. a Prendergast, B. D. Infective endocarditis. *The Lancet*. 2016, vol. **387**(10021), s. 882-893.
13. Campbell, E. A.; Korzheva, N.; Mustaev, A.; Murakami, K.; et al. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell*. 2001, vol. **104**(6), s. 901-912.

14. Carlet, J.; Pulcini, C. a Piddock, L.J.V. Antibiotic resistance: a geopolitical issue. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014, vol. **20**(10), s. 949-953
15. Cattoir, V.: Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Europe PMC*, 2016. vol **1**(1)
16. Conceição, N.; De Oliviera, C. da C. H. B.; Da Ssilva, L.E. P.; et al. Ampicillin Susceptibility Can Predict In Vitro Susceptibility of Penicillin-Resistant, Ampicillin-Susceptible *Enterococcus faecalis* Isolates to Amoxicillin but Not to Imipenem and Piperacillin. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012, vol. **50**(11), s. 3729-3731
17. ČSN EN ISO 20776–1 ED.2 (857006); Zkoušení citlivosti původců infekcí a hodnocení účinnosti prostředků pro stanovení antimikrobiální citlivosti – Část 1: referenční metody mikroředění v tekuté půdě pro zkoušení aktivity antimikrobiálních činidel *in vitro* proti rychle rostoucím aerobním bakteriím způsobující infekční nemoci. Český normalizační institut, vydáno leden 2021
18. Dakhlaoui, I.; Bernard, P. J.; Pietrzak, D.; et al. Exploring the Potential of Sulfonamide-Dihydropyridine Hybrids as Multitargeted Ligands for Alzheimer's Disease Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, vol. **24**(11)
19. Davies, J. a Davies, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010, vol. **74**(3), s. 417-433
20. Deng, W.; Liu, L.; Zhang, C.; et al. Copper-catalyzed cross-coupling of sulfonamides with aryl iodides and bromides facilitated by amino acid ligands. *Tetrahedron Letters*. 2005, vol. **46**(43), s. 7295-7298
21. Dineshkumar, S. a Thirunarayanan, G., Antimicrobial Activities of Some Mesalazine Sulfonamides. *Der Pharma Chemica*. 2018, vol. **10**(10), s. 176–181
22. De La Fuente-Nunez, C.; Cesaro, A. a Hancock, R. E.W. Antibiotic failure: Beyond antimicrobial resistance. *Drug Resistance Updates*. 2023, vol. **71**(1)
23. Doporučení rady o posílení opatření EU pro boj proti antimikrobiální rezistenci v rámci přístupu „jedno zdraví“, *Úřední věstník Evropské unie*, z 22.6.2023
24. Eid, N.; Karamé, I. a Andrioletti, B. Straightforward and Sustainable Synthesis of Sulfonamides in Water under Mild Conditions. *European Journal of Organic Chemistry*. 2018, vol. **2018**(36), s. 5016-5022
25. Ezabadi, I. R.; Camoutsis, C.; Zoumpoulakis, P.; et al. Sulfonamide-1,2,4-triazole derivatives as antifungal and antibacterial agents: Synthesis, biological evaluation, lipophilicity, and conformational studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2008, vol. **16**(3) s. 1150-1161

26. Fernández, L.; Breidenstein, E. B.M. a Hancock, R. E.W. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates*. 2011, vol. **14**(1), s. 1-21
27. Fernández, L. a Hancock, R. E. W. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012, vol. **25**(4), s. 661-681
28. Floss, H. G. a Yu, T. W. Rifamycin Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis. *Chemical Reviews*. 2005, vol. **105**(2), s. 621-632
29. Franko, B., Antimikrobiální účinek nově syntetizovaných sulfonamidů, *diplomová práce*, 2021, fakulta chemicko – technologická, Univerzita Pardubice
30. Gajic, I.; Kabic, J.; Kekic, D.; et al. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics*. 2022, vol. **11**(4)
31. Ganeshpurkar, A.; Singh, R.; Kumar, D.; et al. Identification of sulfonamide based butyrylcholinesterase inhibitors through scaffold hopping approach. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022, vol. **203** (1), s. 195-211
32. Gao, Y.; Li, D. a Liu, Y.X. Microbiome research outlook: past, present, and future. *Protein & Cell*. 2023, vol.**14**(10), s. 709-712
33. Gioiello, A.; Rosatelli, E.; Teofrasti, M.; et al. Building a Sulfonamide Library by Eco-Friendly Flow Synthesis. *ACS Combinatorial Science*. 2013, vol. **15**(5), s. 235-239
34. Girisha, H.R.; Narendra S. CH., J.N.; Boppana, S.; et al. Active site directed docking studies: Synthesis and pharmacological evaluation of cis-2,6-dimethyl piperidine sulfonamides as inhibitors of acetylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009, vol. **44**(10), s. 4057-4062
35. Haney, E. F. a Hancock, R. E. W. Addressing Antibiotic Failure—Beyond Genetically Encoded Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Drug Discovery*. 2022, vol. **2**(1)
36. Harpaz, R.; Dahl, R. M. a Dooling, K. L. Prevalence of Immunosuppression Among US Adults, 2013. *JAMA*. 2016, vol. **316**(23). s. 2547-2548
37. Hassanein, M. M. Sulfonamides: far from obsolete. *International Journal of Contemporary Pediatrics*. 2019, vol. **6**(6), s. 2740-2745
38. Hegstad, K.; Giske, Ch.G.; Haldorsen, B.; et al. Performance of the EUCAST Disk Diffusion Method, the CLSI Agar Screen Method, and the Vitek 2 Automated Antimicrobial Susceptibility Testing System for Detection of Clinical Isolates of Enterococci with Low – and Medium-Level VanB-Type Vancomycin Resistance: a Multicenter Study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014, vol. **52**(5), s. 1582-1589

39. Heuer, H. a Smalla, K. Horizontal gene transfer between bacteria. *Environmental Biosafety Research*. 2007, vol. **6**(1-2), s. 3-13.
40. Holá, V. Mikrobiální biofilmy 3. Biofilmová společenstva lidského těla a biofilmové infekce. *Živa*. 2012. vol. **6**(1), str. 271
41. Hu, B.; Ellingboe, J.; Han, S.; et al. Novel (4 – Piperidin-1-yl) -phenyl Sulfonamides as Potent and Selective Human β_3 Agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2001, vol. **9**(8), s. 2045-2059
42. Huemer, M.; Mairpady S. S.; Brugger, S. D. a et al. Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO reports*. 2020, vol. **21**(12)
43. Hutchings, M. I; Truman, A. W a Wilkinson, B. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*. 2019, vol. **51**(1), s. 72-80
44. Christaki, E.; Marcou, M. a Tofarides, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*. 2020, vol. **88**(1), s. 26-40
45. Christensen, S. B. Drugs That Changed Society: History and Current Status of the Early Antibiotics. *Molecules*. 2021, vol. **26**(19)
46. Ialugen plus, *Lékarna.cz*, Příbalová informace: Informace pro uživatele, 2019
47. Im, Y.; Kang, D.; Ko, R. E.; et al. Time-to-antibiotics and clinical outcomes in patients with sepsis and septic shock: a prospective nationwide multicenter cohort study. *Critical Care*. 2022, roč. **26**(1)
48. Juhas, M.; Van Der Meer, J. R.; Gaillard, M.; et al. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*. 2009, vol. **33**(2), s. 376-393
49. Kemp-Harper, B.K.; Horowitz, J. D. a Ritchie, R. H. Therapeutic Potential of Nitroxyl (HNO) Donors in the Management of Acute Decompensated Heart Failure. *Drugs*. 2016, vol. **76**(14), s. 1337-1348
50. Khan, A.; Miller, W. R.; Axell-House, D.; et al. Antimicrobial Susceptibility Testing for Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 2022, vol. **60**(9), s. e00843-21.
51. Kim, D.-K.; Lee, J. Y.; Lee, N.; et al. Synthesis and phosphodiesterase inhibitory activity of new sildenafil analogues containing a carboxylic acid group in the 5'-sulfonamide moiety of a phenyl ring. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2001, vol. **9**(11), s. 3013-3021

52. Kolaczek, A.; Fusiarz, I.; Lawecka J. a et al. Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives: A brief review. *ResearchGate*. 2014. vol. **68**(7). s. 620 – 628
53. Krátký, M.; Dzurková, M.; Janoušek, J.; et al. Sulfadiazine Salicylaldehyde-Based Schiff Bases: Synthesis, Antimicrobial Activity and Cytotoxicity. *Molecules*. 2017, vol **22**(9).
54. Krátký, M., Vinišová, J., Volková, M., et al., Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, vol**50**(1), s 433- 440
55. Laudadio, G.; Bampoutsis, E.; Schotten, C.; et al. Sulfonamide Synthesis through Electrochemical Oxidative Coupling of Amines and Thiols. *Journal of the American Chemical Society*. 2019, vol. **141**(14), s. 5664-5668.
56. Lee, J.H. Perspectives towards antibiotic resistance: from molecules to population. *Journal of Microbiology*. 2019, vol. **57**(3), s. 181-184
57. Levin, J.I; Chen, J.M; Du, M.T; et al. Anthranilate sulfonamide hydroxamate TACE inhibitors. Part 2: SAR of the acetylenic P1' group. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2002, vol. **12**(8), s. 1199-1202.
58. Libertucci, J. a Young, V. B. The role of the microbiota in infectious diseases. *Nature Microbiology*. 2019, vol. **4**(1), s. 35-45.
59. Liu, M.; Dexheimer, T.; Sui, D.; et al. Hyperphosphorylated tau aggregation and cytotoxicity modulators screen identified prescription drugs linked to Alzheimer's disease and cognitive functions. *Scientific Reports*. 2020, vol. **10**(1)
60. Lyczak, J. B.; Cannon, C. L. a Pier, G. B. Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, vol. **15**(2), s. 194-222
61. Malanovic, N. a Lohner, K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2016, vol. **1858**(5), s. 936-946.
62. Martínez, M. L.; Plata – Menchaca, E. P.; Ruiz-Rodríguez, J. C. a et al. An approach to antibiotic treatment in patients with sepsis. *Journal of Thoracic Disease*. 2020, vol.**12**(3), s.1007-1021.
63. Matushek, E.; Brown, D.F.J. a Kahlemeter, G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014, vol. **20**(4), s. O255-O266

64. Melander, R. J.; Mattingly, A. E.; Nemeth, A. M. a et al. Overcoming intrinsic resistance in gram-negative bacteria using small molecule adjuvants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2023, vol. **80**(1).
65. Mondal, S. a Malakar, S. Synthesis of sulfonamide and their synthetic and therapeutic applications: Recent advances. *Tetrahedron*. 2020, vol. **76**(48).
66. Mondal, S.; Mandal, S. M.; Mondal, T. K. et al. Structural characterization of new Schiff bases of sulfamethoxazole and sulfathiazole, their antibacterial activity and docking computation with DHPS protein structure. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015, vol **150**(1), s. 268-279
67. Morales, J.; Szenkiel, K.; Hamilton, K.; et al. Quantitative analysis of horizontal gene transfer in complex systems. *Current Opinion in Microbiology*. 2021, vol. **62**(1), s. 103-109
68. Morelli, T.; Fujita, K.; Redelman-sidi, G. a et al. Infections due to dysregulated immunity: an emerging complication of cancer immunotherapy. *Thorax*. 2022, vol.**77**(3), s. 304-311.
69. Munita, J. M.; Arias, C. A.; Kudva, I. T. a et al. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*. 2016, vol. **4**(2)
70. Namba, K., Zheng, X., Motoshima, K., et al., Desing and synthesis of benzensulfonamides active against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin – resistant *Enterococcus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.2008, vol**16**(11), s 6131–6144
71. Nevyhoštěná, M.: Syntéza biologicky aktivních sulfonamidových derivátů jako potenciálních léčiv Alzheimerovy nemoci, *diplomová práce*, 2022
72. Nijs, A.; Cartuyvels, R.; Mewis, A.; et al. Comparison and Evaluation of Osiris and Sirscan 2000 Antimicrobial Susceptibility Systems in the Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, vol. **41**(8), s. 3627-3630
73. Nicholson, L. B. The immune system. *Essays in Biochemistry*. 2016, vol. **60**(3), s. 275-301
74. Nunez Bormio, J. H.; De Paiva, R.E.F.; Cuin, A.; et al. Silver complexes with sulfathiazole and sulfamethoxazole: Synthesis, spectroscopic characterization, crystal structure and antibacterial assays. *Polyhedron*. 2015, vol **85**(1), s. 437-444.
75. Oliveira, I S., Manzano, C. M., Nakahata, D. H., et al., Antibacterial and antifungal activities in vitro of novel silver (I) complex with sulfadoxine – salicylaldehyde Schiff base. *Polyhedron*, 2022. vol**115**(1)

76. Ovung, A. a Bhattacharyya, J. Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical Reviews*. 2021, vol. **13**(2), s. 259-272.
77. Palmieri, C.; Patten, D.K.; Januszewski, A.; et al. Breast cancer: Current and future endocrine therapies. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014, vol. **382**(1), s. 695-723
78. Pascale, G. a Wright, G. D. Antibiotic Resistance by Enzyme Inactivation: From Mechanisms to Solutions. *ChemBioChem*. 2010, vol. **11**(10), s. 1325-1334
79. Pánková, R., Povrchové kandidózy a možnosti léčby. *Dermatologie pro praxi*, 2013, vol 7(4), s 166–169
80. Patangia, D. V.; Anthony R., C.; Dempsey, E.; et al. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *MicrobiologyOpen*. 2022, vol. **11**(1)
81. Pfaller, M. A; Cormican, M.; Flamm, R. K; et al. Temporal and Geographic Variation in Antimicrobial Susceptibility and Resistance Patterns of Enterococci: Results From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–2016. *Open Forum Infectious Diseases*. 2019, vol. **6**(1) č. Supplement_1, s. S54-S62
82. Pfaller, M. A.; Diekema, D. J. a Sheehan, D. J. Interpretive Breakpoints for Fluconazole and Candida Revisited: a Blueprint for the Future of Antifungal Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006, vol. **19**(2), s. 435-447
83. Pingaew, R.; Prachayasittikul, V.; Mandi, P.; et al. Synthesis and molecular docking of 1,2,3-triazole-based sulfonamides as aromatase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2015, vol. **23**(13), s. 3472-3480
84. Plosker, G. L a Croom, K.F. Sulfasalazine. *Drugs*. 2005, vol. **65**(13), s. 1825-1849
85. Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005, vol. **56**(1) s. 20-51.
86. Pulido, M. R.; Garcia-Quintanilla, M.; Martin-Pena, R.; et al. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013, vol. **68**(12), s. 2710-2717
87. Reller, L.; Weinstein, M.; JORGENSEN, James H. a et al. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2009, vol. **49**(11) s. 1749-1755
88. Roberts, M. C. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*. 2008, vol. **282**(2) s. 147-159

89. Shavnya, A.; Coffey, S. B.; Smith, A. C. a et al. Palladium-Catalyzed Sulfonation of Aryl and Heteroaryl Halides: Direct Access to Sulfones and Sulfonamides. *Organic Letters*. 2013, vol. **15**(24), s. 6226-6229
90. Schirrmacer, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International Journal of Oncology*. 2018, vol. **54**(2) s. 407-419
91. Schumacher, A., Vranken, T., Malhotra, A., et al., In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue – engineered, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2018, vol. **37** (1), s. 187–208.
92. Supuran, C.T.; El – Sherbeny, M.A.; Angeli, A.; et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of sulfonamides and carboxylates incorporating trimellitimides: Dual cyclooxygenase/carbonic anhydrase inhibitory actions. *Bioorganic Chemistry*. 2019, vol. **84**(1), s. 260-268
93. Supuran, Cl. Special Issue: Sulfonamides. *Molecules*. 2017, vol. **22** (10). s. 1642
94. Sulfabenzamide. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 5319, Sulfabenzamide" *PubChem*.
95. Sulfacetamide. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 5320, Sulfacetamide" *PubChem*
96. Sulphacetamide Polpharma, SÚKL, přehled léčiv, Příbalová informace: Souhrn údajů o přípravku, 2020
97. Sulfaphenazol. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 5335, Sulfaphenazole" *PubChem*
98. Sulfathiazol. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 5340, Sulfathiazole" *PubChem*
99. Sulfomethoxazol, SÚKL, Přehled léčiv. Léčiva dle registračního čísla. Vygenerovaný seznam. Aktualizováno 2024.
100. Szafranski, K., Sławiński, J., Kędzia, A., et al., Syntheses of Novel 4 – Substituted N –(5-amino-1H-1,2,4 – triazol – 3 – yl)pyridine – 3 – sulfonamide Derivatives with Potential Antifungal Activity. *Molecules*. 2017, vol**22**(11)
101. Szepanowski, F.; Warnke, C.; Meyer zu Horste, G.; et al. Secondary Immunodeficiency and Risk of Infection Following Immune Therapies in Neurology. *CNS Drugs*. 2021, vol. **35**(11), s. 1173-1188.
102. Šolcová, M. a Purkrťová, S. Application of Modern Methods for the Determination of Antibiotic Resistance. *Chemické listy*. 2023, vol. **117**(6), s. 358-364

103. Tan, B. Y.-H.; Teo, Y.-C. a Seow, A.-H. Low Catalyst Loadings for Ligand-Free Copper(I)-Oxide-Catalyzed N – Arylation of Methanesulfonamide in Water. *European Journal of Organic Chemistry*. 2014, vol. **2014**(7), s. 1541-1546
104. Tankeshwar, A., Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC), *Microbe online*, vol. **1**, 2024
105. Tang, X.; Huang, L.; Qi, C. et al. Copper-catalyzed sulfonamides formation from sodium sulfinates and amines. *Chemical Communications*. 2013, vol. **49**(54)
106. TCI chemicals, Sulfomethoxazole, Product number: S0361, CAS RN: 723 – 46 - 6
107. Tejkalová, R., Antimikrobiální terapie 7, sulfonamidy, nitrofurantoin, IMC, *Prezentace*, Antibiotické středisko FNUSA, 2011
108. Theriot, C. M.; Koenigsnecht, M. J.; Carlson, P. E.; et al. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nature Communications*. 2014, vol. **5**(1)
109. Vega, N. M. a Gore, J. Collective antibiotic resistance: mechanisms and implications. *Current Opinion in Microbiology*. 2014, vol. **21**(1), s. 28-34
110. Vencent, J.-L.; Opal, S. M; Marshall, J. C a et al. Sepsis definitions: time for change. *The Lancet*. 2013, vol. **381**, (9868), s. 774-775
111. Vicente, D. A.; Galdino, D.; Navarro, M a et al. Electrochemical synthesis of sulfonamides in a graphite powder macroelectrode. *Green Chemistry*. 2020, roč. 22, č. 16, s. 5262-5266
112. Walesh, S.; Berkelbach, J.; Jézéquel, G.; et al. Fighting antibiotic resistance—strategies and (pre)clinical developments to find new antibacterials. *EMBO reports*. 2023, vol. **24**(1)
113. Wan, Y.; Fang, G.; Chen, H.; et al. Sulfonamide derivatives as potential anti-cancer agents and their SARs elucidation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021, vol. **226**(1)
114. WHO. WHO 2023 data call is now open for antibacterials in the preclinical development pipeline. Developers of traditional and nontraditional agents inteded against pathogens on the WHO BPPL and against other medically important pathogens are encouraged to submit their data. *World Health Organization*, 2023
115. Wiedmann, B.; Heisig, A. a Heisig, P. Uncomplicated Urinary Tract Infections and Antibiotic Resistance—Epidemiological and Mechanistic Aspects. *Antibiotics*. 2014, vol. **3**(3) s. 341-352

116. Wright, G. D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chemical Communications*, 2011, vol.47 (14), s. 4055–4061,
117. Yamali, C.; Gel, H. I.; Kazaz, C.; et al. Synthesis, structure elucidation, and in vitro pharmacological evaluation of novel polyfluoro substituted pyrazoline type sulfonamides as multi-target agents for inhibition of acetylcholinesterase and carbonic anhydrase I and II enzymes. *Bioorganic Chemistry*. 2020, vol. 96(1)
118. Yousef, F.; Oussama M.; Jehad H. Sulfonamides: Historical Discovery Development (Structure – Activity Relationship Notes). *Jurnal of In – vitro In – vivo In – sicico*, 2018, vol.1(1), s. 1-15
119. Žemličková H. Cíle pro snížení antibiotické rezistence. Jak jich do roku 2030 dosáhnout?. Státní zdravotní ústav. 2023

