

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

***IN VITRO* SCREENING POTENCIÁLNÍCH ANTIMYKOBAKTERIÁLNĚ ÚČINNÝCH SLOUČENIN NA RYCHLE ROSTOUCÍCH KMENECH RODU *MYCOBACTERIUM* II**

Bc. Tereza Pchálková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu PharmDr. Ondřeji Jand'ourkovi, Ph.D. za veškeré cenné rady a věnovaný čas při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Janě Vackové za pomoc a spolupráci v laboratoři. Poděkování také patří panu PharmDr. Martinu Juhásovi, Ph.D., paní PharmDr. Martě Kučerové, Ph.D. a paní MSc. Darie Nawrot za poskytnutí testovaných sloučenin. V neposlední bych chtěla poděkovat všem mým nejbližším, kteří mě při studiu podporovali.

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

V Hradci Králové dne:

podpis

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT.....	7
1. ÚVOD.....	8
2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 Mykobakterie.....	10
3.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
3.3 Tuberkulóza.....	14
3.3.1 Epidemiologie tuberkulózy.....	14
3.3.2 Patogeneze a formy TBC.....	17
3.3.3 Klinický obraz.....	19
3.3.4 Imunologický podklad TBC	20
3.3.5 Diagnostika TBC.....	21
3.3.6 Vakcinace.....	29
3.3.7 Léčba	31
3.4 Antituberkulotika.....	32
3.4.1 Antituberkulotika 1. linie.....	33
3.4.2 Antituberkulotika 2. linie.....	38
3.4.3 Nově zavedená antituberkulotika	40
3.4.4 Vývoj nových léčiv	42
3.5 Lékové rezistence	47
3.5.1 Multirezistentní tuberkulóza (MDR-TB).....	48
3.5.2 Rifampicin rezistentní tuberkulóza (RR-TB).....	49
3.5.3 Extenzivně rezistentní tuberkulóza (XDR-TB).....	49
3.5.4 Totálně rezistentní tuberkulóza (TDR-TB).....	49
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	51
4.1 Mikrodiluční bujónová metoda	51
4.2 Testované kmeny	52
4.2.1 <i>Mycobacterium smegmatis</i>	52
4.2.2 <i>Mycobacterium aurum</i>	53
4.3 Testované sloučeniny	53

4.4	Standardy antituberkulotik	66
4.5	Pracovní materiál	67
4.6	Postup testování	68
4.6.1	Příprava látek	68
4.6.2	Příprava roztoků v bujónu.....	69
4.6.3	Příprava destičky	69
4.6.4	Pipetování látek.....	69
4.6.5	Příprava suspenze	70
4.6.6	Inkubace.....	71
4.6.7	Vyhodnocení	71
5.	VÝSLEDKY	74
6.	DISKUSE.....	80
7.	ZÁVĚR.....	88
8.	POUŽITÉ ZKRATKY	89
9.	SEZNAM TABULEK	91
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ	93
11.	POUŽITÁ LITERATURA	94

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách

Autor: Bc. Tereza Pchálková

Vedoucí práce: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Název diplomové práce: *In vitro* screening potenciálních antimykobakteriálně účinných sloučenin na rychle rostoucích kmenech rodu *Mycobacterium* II

Klíčová slova: Mykobakterie, Tuberkulóza, Antituberkulotika, Mikrodiluční bujónová metoda, Minimální inhibiční koncentrace

Cíl: Cílem této práce bylo otestovat *in vitro* antimykobakteriální aktivitu potenciálně účinných sloučenin na rychle rostoucích kmenech rodu *Mycobacterium* (*Mycobacterium smegmatis* a *Mycobacterium aurum*). Dále u testovaných sloučenin v případě aktivity predikovat vztahy mezi strukturou a aktivitou.

Metody: Pro testování byla zvolena mikrodiluční bujónová metoda, pomocí které byla stanovena hodnota minimální inhibiční koncentrace u každé testované sloučeniny. Vyhodnocení probíhalo vizuálně a spektrofotometricky s využitím indikátoru Alamar blue.

Výsledky: Testované látky byly rozděleny dle podobnosti chemické struktury do 10 skupin. Z chemického hlediska se jednalo o deriváty pyrazinu a deriváty pyridinu. Celkově bylo otestováno 79 sloučenin, z nichž 22 vykazovalo významnou antimykobakteriální aktivitu. Nejúčinnější látky byly 5-alkylamino-*N*-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy. Nejméně účinnou skupinou byly aminokyselinami *N*-substituované pyrazin-2-karboxamidy. Nejvýhodnějšími substituenty, které zvyšují antimykobakteriální aktivitu sloučenin, se zdají být chlor, trifluormethylová skupina a případně hydroxy skupina.

Závěr: Vztahy mezi strukturou a aktivitou testovaných sloučenin byly diskutovány.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Specialist on Laboratory Methods

Author: Bc. Tereza Pchálková

Supervisor: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Title of diploma thesis: *In vitro* screening of potential antimycobacterial compounds active against fast growing strains of *Mycobacterium* genus II

Key words: Mycobacteria, Tuberculosis, Antituberculotics, Microdilution broth method, Minimum inhibition concentration

Background: The aim of this diploma thesis has been screening of *in vitro* antimycobacterial activity of novel compounds against fast growing strains of the genus *Mycobacterium* (*Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium aurum*). Another aim has been predicting the structure-activity relationships for tested compounds.

Methods: The technique used for activity determination was microdilution broth method. The value of minimum inhibition concentration for each compound was determined. The evaluation was performed visually and spectrophotometrically using the Alamar blue indicator.

Results: A total of 79 compounds were tested. 22 tested compounds showed significant activity against mycobacteria. The substances were sorted according to the similarity in chemical structure into 10 groups. From a chemical point of view, these were pyrazine and pyridine derivatives. The most antimycobacterial active substances were from the group of 5-alkylamino-*N*-(4-chloro-2-hydroxyphenyl)pyrazine-2-carboxamides. The least active substances were from the group of *N*-substituted pyrazine-2-carboxamide substituted with amino acids. Substituents that were likely to increase antimycobacterial activity of compounds were chlorine, trifluoromethyl and hydroxy group.

Conclusions: The relationships between the structure and activity of the tested compounds were discussed.

1. ÚVOD

Tuberkulóza (TBC) je infekční onemocnění způsobené mykobakteriemi ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex. Celosvětově ročně onemocní TBC okolo 10 miliónů lidí a přes 1 milion jich zemře.

Organizace WHO a OSN se zavázaly ukončit epidemii tuberkulózy vytvořením strategie světa bez tuberkulózy. Cílem strategie je snížit počet úmrtí na TBC o 90 % a incidenci TBC o 85 % do roku 2030, v porovnání s rokem 2015.

Největším problémem léčby TBC je narůstající vznik rezistence na současně užívaná antituberkulotika. Se vznikem rezistence jsou spojeny především genové mutace *M. tuberculosis*. Každý rok se celosvětově objeví nejméně 500 tisíc nových případů multirezistentní TBC. Je to forma TBC rezistentní nejméně ke dvěma nejúčinnějším antituberkulotikům – isoniazidu a rifampicinu. Dále se objevují pacienti s extenzivně rezistentní TBC. Jde o závažný typ rezistence, kdy mykobakterie nejsou citlivé na nejúčinnější antituberkulotika z 1. linie, a navíc nejsou citlivé ani na jedno ze tří intravenózně aplikovaných antituberkulotik 2. linie a jedno z fluorochinolonových antituberkulotik. Nejzávažnějším typem rezistence byla totálně rezistentní tuberkulóza, kdy mykobakterie prokázaly rezistenci *in vitro* na všechna antituberkulotika 1. i 2. linie. Tento typ rezistence díky uvedení bedachilinu a delamanidu do praxe prozatím ztratil význam.

Léčba rezistentních forem TBC je zdlouhavá, finančně nákladná a není dostupná ve všech oblastech světa. Proto dochází k usilovnému vývoji nových léčiv proti TBC. V současné době je 23 nových antituberkulotik v různých fázích klinických studií.

Prvním krokem k objevu nového antituberkulotika je screening antimykobakteriálního působení u neznámých sloučenin na celých bakteriích. Tento základní screening se provádí *in vitro* za předem definovaných podmínek.

Diplomová práce se zabývá testováním antimykobakteriální aktivity potenciálních antituberkulotik na rychle rostoucích kmenech rodu *Mycobacterium* (*M. smegmatis*, *M. aurum*). Potenciálně aktivní sloučeniny jsou testovány pomocí mikrodiluční bujónové metody v mikrotitračních destičkách na základě standardů CLSI a EUCAST.

2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

1. Rešerše odborné literatury na dané téma s využitím relevantních zdrojů.
2. Testování antimykobakteriální aktivity potenciálních antituberkulotik na rychle rostoucích kmenech rodu *Mycobacterium* (*M. smegmatis*, *M. aurum*) pomocí mikrodiluční bujonové metody na základě standardů CLSI a EUCAST.
3. Vyhodnocení vlastních výsledků. Shrnutí a pokus o predikci vztahů mezi strukturou a aktivitou.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 *Mykobakterie*

Rod *Mycobacterium* se řadí do čeledi *Mycobacteriaceae*. Mykobakterie jsou acidorezistentní bakterie, které se od klasických bakterií liší svými netradičními vlastnostmi. Většina z nich velmi pomalu roste na kultivačních půdách, nebarví se běžným barvením dle Grama. Dále bývají citlivé na odlišný typ antimikrobiálních látek, jsou často patogenní (původci lepry a tuberkulózy).

Vznik názvu *Mycobacterium* (houbovitá bakterie) pochází z roku 1886 a je odvozen dle charakteru jejich růstu na povrchu tekuté půdy v povlaku podobného plísním. Ve skutečnosti však mykobakterie nemají s plísněmi nic společného, podobnost jeví s rodem *Corynebacterium*. Mykobakterie a korynebakterie patří fylogeneticky do stejného podřádu *Corynebacterineae*. (Votava, 2003; Greenwood *et al.*, 1999)

Mykobakterie jsou aerobní (i když některé druhy jsou schopny růst v prostředí se sníženým obsahem O₂), nepohyblivé, nesporující, štíhlé tyčky o rozměrech cca 3x3 μm, bez pouzdra. V jejich buněčné stěně se nacházejí voskové lipidy, převážně s dlouhými větvenými řetězci mykolových kyselin. (Votava, 2003; Greenwood *et al.*, 1999; Solovič a Vašáková, 2019)

Stavba jejich buněčné stěny je poměrně složitá a podobá se grampozitivním bakteriím. Obsahuje významnou vrstvu peptidoglykanu a na něj navázaný polysacharid arabinogalaktan a mykolové kyseliny. Hydrofobní vrstva obsahuje lipidy, polypeptidy. Extrakt polypeptidu tzv. PPD (purified protein derivatives) slouží ke zjišťování pozdní přecitlivělosti na antigeny mykobakterií. (Votava, 2003; Greenwood *et al.*, 1999)

Mykobakterie se díky své acidorezistenci barví dle Ziehl-Neelsena, za použití barviva karbolfuchsin, kyselého alkoholu a methylenové modři či malachitové zeleně. Pod mikroskopem pozorujeme červené tyčinky na modrém či zeleném pozadí. (Solovič a Vašáková, 2019)

Kultivace mykobakterií je poměrně složitá. Mají velmi dlouhou generační dobu, a to několik hodin až jeden den. Proto je většina z nich pomalu rostoucí. Kolonie se objevují na půdách za několik dnů až týdnů. Jejich morfologie je rozmanitá. Vzhled kolonie bývá často žlutavý, někdy s drsným povrchem, někdy naopak s hladkým povrchem. Některé rostou na jednoduchých půdách s glycerolem, asparaginem, vejci

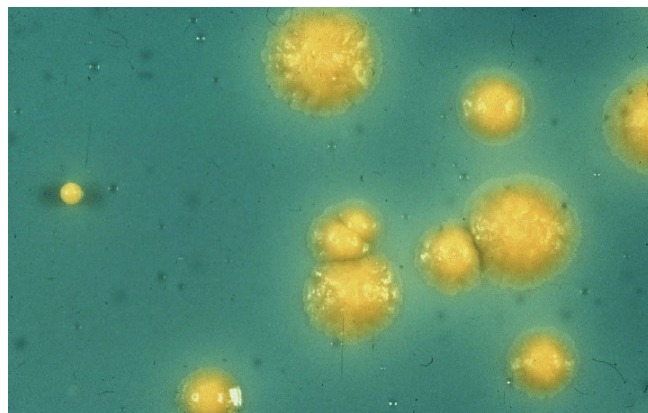
nebo tekuté hovězí půdě. Další pak vyžadují přídavek např. heminu nebo kyseliny pyrohroznové. (Votava, 2003; Greenwood *et al.*, 1999)

Dle patogenity se mykobakterie dělí na obligátně patogenní mykobakterie, způsobující TBC. Zde patří mykobakterie komplexu *M. tuberculosis*. Do *M. tuberculosis* komplexu jsou řazeny mykobakterie *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* a *M. canetti*. (Homolka, 2016)

Ostatní mykobakterie se řadí mezi tzv. netuberkulózní (atypická) mykobakterie (NTM). Mezi NTM klinicky významné mykobakterie řadíme: komplex *M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuium*. A mezi obvykle saprofytické druhy: *M. gordonae*, *M. flavescens*, *M. terrae* komplex, *M. smegmatis*, *M. phlei*. (Solovič a Vašáková, 2019; Votava, 2003)

NTM se dle Runyona dále dělí dle pigmentace do čtyř skupin:

- **Fotochromogenní** – mykobakterie vytváří při expozici na denním světle žluté až oranžovožluté pigmenty. Jejich kolonie bývají zpravidla hladké. (*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*)
- **Skotochromogenní** – mykobakterie produkují oranžovožlutý pigment při světle i ve tmě. (*M. szulgai*, *M. gordonae*)
- **Nechromogenní** – mykobakterie tvoří kolonie bez pigmentace. Kolonie bývají hladké a kruhovitě. (*M. avium* komplex, *M. xenopi*, *M. ulcerans*)
- **Rychle rostoucí** – mykobakterie s rychlým růstem (5-7 dní), tvořící někdy hladké někdy hrubé kolonie s pigmentem i bez. (Solovič a Vašáková, 2019; Votava, 2003)



Obrázek 1 Fotochromogenní mykobakterie – *M. marinum*
Typické fotochromogenní kolonie *M. marinum* vykultivované na pevné Lowenstein-Jensenově půdě.
(Zdroj: Aubry, 2017)

Dle generační doby se mykobakterie dělí na – rychle, pomalu rostoucí, nerostoucí *in vitro*. Jednotlivé skupiny jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 Přehled druhů mykobakterií dle rychlosti růstu (převzato, upraveno Votava, 2003)

Skupina	Druh mykobakterií
Pomalou rostoucí	Komplex <i>M. tuberculosis</i> (<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. canetti</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. mungi</i>)
	Komplex <i>M. avium</i> (<i>M. avium ssp. avium</i> , <i>M. intracellulare</i>)
	<i>M. kansasii</i>
	<i>M. marinum</i>
	<i>M. ulcerans</i>
	<i>M. xenopi</i>
	<i>M. goodii</i>
Rychle rostoucí	<i>M. smegmatis</i>
	<i>M. abscessus</i>
	<i>M. aurum</i>
	<i>M. chelonae</i>
Nerostoucí <i>in vitro</i>	<i>M. leprae</i>

3.2 *Mycobacterium tuberculosis*

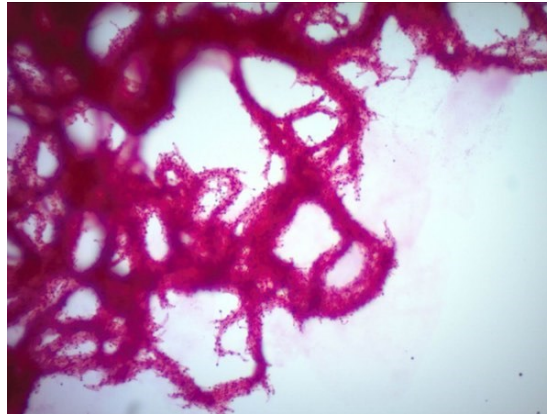
Mycobacterium tuberculosis se řadí do komplexu *Mycobacterium tuberculosis*. Do tohoto komplexu patří také *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti* a *M. microti*. Tyto mykobakterie mají v 99,9 % sekvenčně podobný genom a identické sekvence rRNA. V odlišnosti mykobakterií pak hraje roli preference hostitelů a jejich patogenita. *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti* jsou patogenem člověka, zatímco *M. bovis* má široké spektrum hostitelů. *M. microti* je patogenem hlodavců. (Macela, 2006)

V Botswaně a Zimbabwe byl objeven nový druh mykobakterie řadící se do komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, a to *M. mungi*. *M. mungi* napadá živočicha mangustu žíhanou. (Alexander *et al.*, 2010)

M. tuberculosis patří k významným lidským patogenům. Objevitelem byl Robert Koch v roce 1892. Proto se tento mikrob jinak nazývá Kochův bacil. Původně se vědci domnívali, že *M. tuberculosis* je specializovanou formou *M. bovis*. (Macela, 2006)

Z hlediska morfologie je *M. tuberculosis* štíhlá tyčka s významnou acidorezistencí. V preparátech z klinického materiálu objevujeme shluky tyčinek, tzv. hadovité útvary, připomínající spletené provazce (obr. 2). Tento fenomén, typický pro virulentní kmeny,

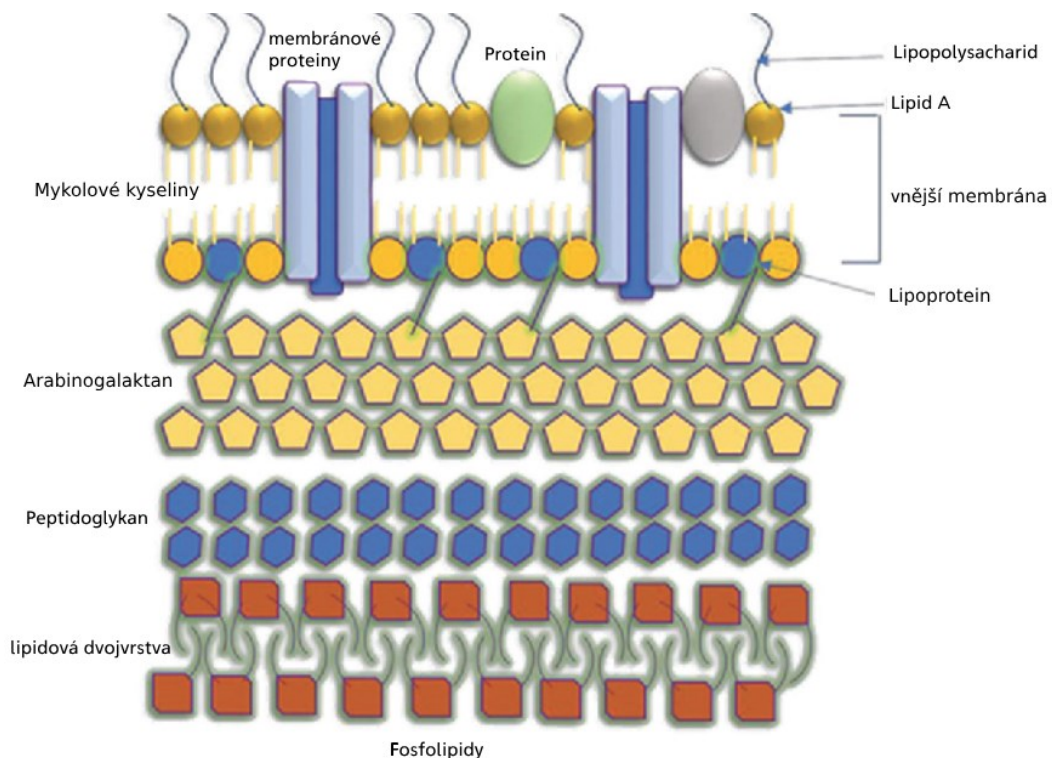
se označuje jako Cord-faktor. Cord-faktor ovlivňuje imunitní odpověď hostitele a tvorbu granulomů. (Votava, 2003)



Obrázek 2 Spletené provazce *M. tuberculosis*, Cord-faktor

M. tuberculosis obarveny dle Ziehl–Neelsena, mikroskopický snímek, 1000x zvětšeno. (Zdroj: Wang, Liu a Shen, 2015)

Charakteristickým rysem *M. tuberculosis* je přítomnost buněčné stěny s velkým množstvím lipidů. Buněčná stěna je silně hydrofobní a je důležitou determinantou pro virulenci *M. tuberculosis*. Součástí buněčné stěny jsou peptidoglykan, arabinogalaktany, mykolové kyseliny, lipoarabinomannan a trehalóza-dimykolát, tzv. Cord-faktor. (Ghazaei, 2018)



Obrázek 3 Buněčná stěna *M. tuberculosis*
(převzato a upraveno: Ghazaei, 2018)

Mykolové kyseliny jsou dlouhé α -alkyl- β -hydroxy mastné kyseliny. Zaujímají až 60 % v celkovém složení buněčné stěny a jsou uspořádány ve formě dvouvrstvy spolu ve spojení s lipidy. Toto spojení funguje jako bariéra propustnosti. Dominantní funkcí mykolových kyselin je fluidita a flexibilita buněčné stěny. Dále svým charakterem významně ovlivňují schopnost mykobakterií přežít a replikovat se uvnitř makrofágů. (Ghazei, 2018)

M. tuberculosis dokáže na neživých předmětech nebo v půdě přežít několik týdnů až měsíců. Lze ji lehce zlikvidovat vysokou teplotou (> 65 °C po dobu 30 minut), UV zářením. Vůči mrazu a vysušení je mykobakterie odolná. Dále ji lze usmrtit běžně používanými dezinfekčními a sterilizačními prostředky jako jsou formaldehyd, ethylenoxid, sloučeniny chloru, ethanol, kyselina peroctová. (Solovič a Vašáková, 2019)

3.3 Tuberkulóza

Tuberkulóza je granulomatózní infekční zánětlivé onemocnění, které zahrnuje veškeré chorobné stavy způsobené mykobakteriemi ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex. Primárně TBC postihuje plicе, ovšem postižen může být jakýkoliv jiný orgán – kůže, kosti, oči, centrální nervový systém, urogenitální systém atd. (Navrátil, 2017) Ve více než 85 % případů se u lidí vyskytuje plicní TBC. Mimoplicní TBC se vyskytuje hlavně u jedinců infikovaných HIV a v zemích s nízkým výskytem TBC. (Ahmad, 2010)

3.3.1 Epidemiologie tuberkulózy

3.3.1.1 Epidemiologie TBC ve světě

Každým rokem na celém světě onemocní tuberkulózou přibližně 10 miliónů lidí. Globálně se počet infikovaných osob odhaduje na 1,7 miliard. Celosvětově se TBC řadí mezi 10 hlavních příčin úmrtí. Zároveň se řadí na přední místa mezi původci infekčních onemocnění způsobujících úmrtí. Poměr onemocnění u mužů a žen je 2:1. Pravděpodobnost nákazy TBC je vyšší u lidí s HIV/AIDS infekcí. Dalším rizikovým faktorem může být diabetes, kouření, alkoholismus, podvýživa, špatné životní podmínky. (WHO, 2019)

Státy s vysokým výskytem TBC:

- **Evropa:** Ukrajina, Rumunsko, Litva, Moldávie, Rusko.
- **Afrika:** všechny státy kromě Egypta, Libye, Komor, Mauricia, Seychel.
- **Asie:** všechny státy kromě Bahrajnu, Íránu, Izraele, Japonska, Jordánska, Kataru, Kuvajtu, Libanonu, Malediv, Ománu, Saudské Arábie, Spojených arabských emirátů, Sýrie a Turecka.
- **Austrálie a Oceánie:** Fidži, Kiribati, Marshallovy ostrovy, Mikronésie, Nauru, Palau, Papua-Nová Guinea, Šalamounovy ostrovy, Tuvalu a Vanuatu.
- **Amerika:** Brazílie, Peru, Bolívie, Haiti, Ekvádor, Paraguay, Venezuela, Panama, Salvador. (Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2019)

Díky včasné diagnostice a léčbě je většina lidí, u nichž se rozvinula TBC, vyléčena a další přenos nákazy je omezen. V roce 2014 se všechny členské země WHO a OSN zavázaly ukončit epidemii TBC vytvořením strategie světa bez tuberkulózy.

Cílem strategie je snížit počet úmrtí na TBC o 90 % a incidenci TBC o 85 % do roku 2030, v porovnání s rokem 2015. (WHO, 2019)

Tabulka 2 Svět bez TBC (zdroj: WHO Global Tuberculosis Report 2019)

Svět bez TBC, strategie WHO				
Cíle pro jednotlivé roky:	2020	2025	2030	2035
% snížení absolutního počtu úmrtí na TBC (porovnání s rokem 2015)	35 %	75 %	90 %	95 %
% snížení míry výskytu TBC (porovnání s rokem 2015)	20 %	50 %	80 %	90 %
% domácností s TBC (míra v roce 2015 neznámá)	0 %	0 %	0 %	0 %

Principy strategie:

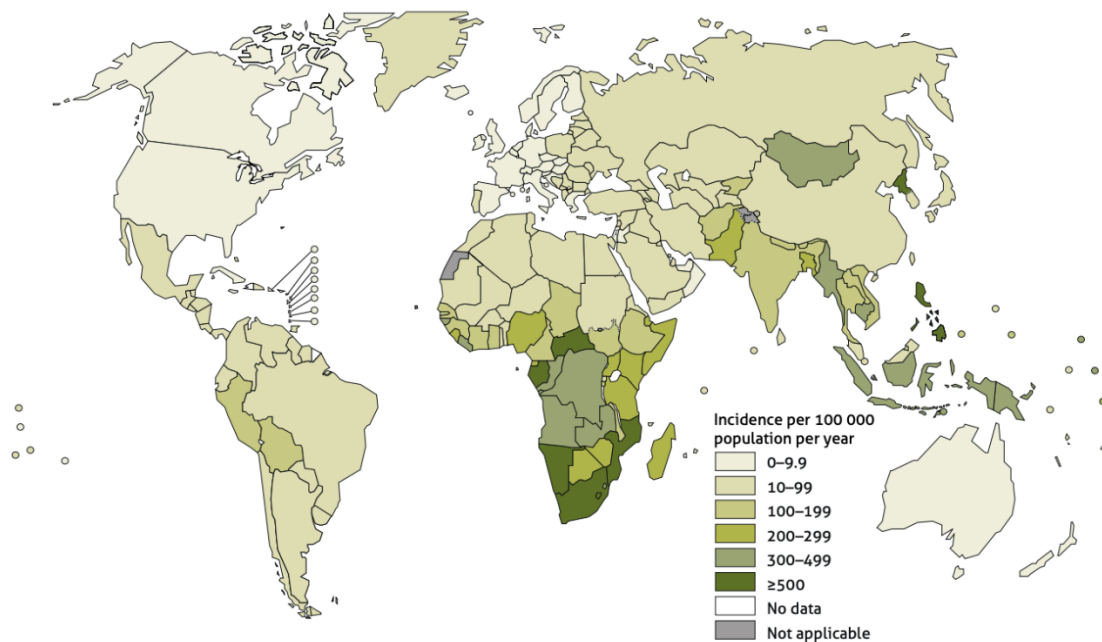
1. Správa státními orgány, zodpovědnost, monitorování a hodnocení
2. Sdružení s občanskými společnostmi a komunitami
3. Ochrana a podpora lidských práv, etika a rovnost
4. Přizpůsobení strategie a cílů na úroveň jednotlivých zemí a celosvětová spolupráce

V současné době se jeví, že většina WHO regionů a zemí s vysokou incidencí TBC není schopna splnit první cíl WHO strategie „Svět bez TBC“ (End TB strategy). Celosvětově průměrná míra poklesu výskytu TBC mezi lety 2000 a 2018 byla 1,6 % ročně. Kumulativní snížení mezi lety 2015 a 2018 bylo 6,3 %, což nejspíš nebude dosahovat 20% snížení míry výskytu TBC mezi lety 2015 a 2020.

WHO od roku 1997 každoročně zveřejňuje globální zprávu o TBC. Účelem reportu je poskytnout komplexní a aktuální hodnocení epidemie TBC a pokroku v reakci na globální, regionální a celostátní úrovni. (WHO, 2019)

V roce 2010 celosvětově TBC onemocnělo 8,8 miliónů lidí. Odhadovaný počet úmrtí byl 1,1 miliónů lidí. HIV pozitivních lidí zemřelo na TBC 350 tisíc. (WHO, 2011) V nejnovější zprávě o TBC je uvedena situace z roku 2018. V roce 2018 celosvětově onemocnělo 10 miliónů lidí. Počet úmrtí je odhadován na 1,2 miliónu lidí. (27% snížení oproti roku 2000) a dalších 251 tisíc úmrtí na TBC u HIV pozitivních lidí. (60% snížení oproti roku 2000). V roce 2018 se u 0,5 miliónu lidí vyskytovala TBC rezistentní na rifampicin (78 % z těchto lidí mělo multirezistentní TBC). Tento typ TBC se objevoval nejčastěji v zemích bývalého Sovětského svazu.

Celosvětový nárůst případů TBC je způsobený spíše lepším hlášením mykobakteriálních infekcí než zvýšeným šířením onemocnění. (WHO, 2019)



Obrázek 4 Odhadovaná incidence TBC v roce 2018
(Zdroj: WHO, Global tuberculosis report 2019)

3.3.1.2 Epidemiologie TBC v ČR

Česká republika patří mezi země s nízkým výskytem TBC. V roce 2018 bylo hlášeno 444 onemocnění TBC. Oproti roku minulému se číslo hlášených případů snížilo o 61. V ČR počet nově nemocných z dlouhodobého hlediska klesá. S ohledem na pohlaví jsou častěji nakaženi muži. Nejčastější věková kategorie pacientů s TBC je 40-64 let. U dětí (0-19 let) bylo v roce 2018 hlášeno 13 případů. Nejvyšší počet nemocných byl zaznamenán v hlavním městě Praze. Vyšší počet hlášených onemocnění byl v kraji Ústeckém, Plzeňském a Středočeském. Nejnižší počet onemocnění byl ve Zlínském a Karlovarském kraji.

Tuberkulóza v ČR tradičně postihuje spíše lidi bez domova, vězně, migranty. Cizinců bylo z celkových 444 hlášených případů 147 osob. Nejvíce nemocných cizinců bylo z Ukrajiny (37), Slovenska (24), Rumunska (16), Vietnamu (12) a Mongolska (9). (ÚZIS, 2018)

3.3.2 Patogeneze a formy TBC

Přenos nákazy bývá nejčastěji inhalační cestou, kdy je zdrojem infekce nakažený člověk. Další cestou přenosu může být přímý kontakt přes kůži. Tato cesta nákazy je typická pro profesionální onemocnění u zdravotnického personálu (např. patologové, chirurgové). (Navrátil, 2017)

Primární TBC

Primární TBC vzniká na základě prvního kontaktu hostitele s mykobakteriemi. Ve většině případů se vyskytuje převážně u dětských pacientů. *M. tuberculosis* proniká do plic inhalační cestou ve formě kapének. Jestliže pronikne až do plicních alveolů, vzniká infekce. Dochází k ingesci mykobakterií alveolárními makrofágy, avšak část mykobakterií se vyskytuje i volně. Lymfatickými uzlinami mykobakterie putují do krevního řečiště.

Prvně bývají osídleny dolní plicní hroty z důvodu dynamiky proudění vzduchu v dýchacích cestách. Mykobakterie mají tendenci množit se v oblasti s nejvyšší kyslíkovou tenzí (plicní hroty, ledviny, růstové zóny dlouhých kostí, mozek).

V místě usídlení se mykobakterie množí a vzniká primární infiltrát. Během dalších několika hodin dochází k jejich šíření lymfatickými cestami do regionálních mízních uzlin a vzniká tzv. primární tuberkulózní komplex. Primární TBC probíhá většinou

latentně (v 90 % případů) a díky rozvinutí buněčné imunity dochází často ke spontánnímu zhojení. Mykobakterie však celoživotně přežívají v lymfatických uzlinách. (Souček, 2011)

Latentní TBC

Latentní TBC je mykobakteriální infekce v organismu hostitele bez známek klinických projevů. Začíná vstupem *M. tuberculosis* do buněk prezentujících antigen v plicních alveolech. Mykobakterie intracelulárně přežívají prostřednictvím několika únikových strategií jako je neutralizace fagozomálního pH, inhibice prezentaci antigenu přes makrofágy a dendritické buňky. To ohroží stimulaci CD4+ T lymfocytů, apoptózu infikovaných makrofágů a autofagii.

Aktivní onemocnění je odvráceno a dochází k latentní infekci. Mykobakterie jsou rezistentní vůči složkám imunitního systému hostitele, protože jsou transformovány do stádia spánku s velmi nízkou až nulovou metabolickou a replikační aktivitou (tzv. dormantní formy *M. tuberculosis*). Během latentní infekce je však stále exprimována sada genů (DosR regulon) spojených s dormancí. Přesná fyzikální a metabolická povaha a umístění perzistentních mykobakterií ve spícím režimu zůstává neznámá. Mykobakterie mohou zůstat spící po celý život hostitele, aniž by způsobovaly aktivní onemocnění. Nebo mohou způsobit onemocnění o několik let nebo dokonce desetiletí později. Riziko rozvoje postprimární TBC je však nejvyšší během prvních dvou let po infekci *M. tuberculosis*. (Ahmad, 2010)

Postprimární TBC

Postprimární (sekundární, dospělý) typ tuberkulózy se vyskytuje u lidí, kteří již prodělali primární TBC. Rozvíjí se superinfekce – vdechnutím nových mykobakterií či reinfekcí – reaktivací infekce ze starého primárního komplexu při celkovém oslabení organismu (alkoholismus, podvýživa, diabetes, imunosupresivní terapie).

Nejčastěji se zánět nachází v plicním hrotu. Vznikne zde ložisko kaseifikační nekrózy (zesýrovatění). Tento zánětlivý proces může poškodit bronchus, díky čemuž se zkapalněný obsah vykašle a TBC se tak může šířit dál. V místě nekrózy vznikne dutina neboli kaverna. Hovoříme o vzniku otevřené kavernózní tuberkulózy. U tohoto typu TBC může zánět poškodit i přilehlou tepnu a pacient umírá na vykrvácení či udušení. Zároveň může docházet i k hemoptýze, tedy vykašlávání krve, což je jeden z příznaků TBC. (Mačák, Mačáková, Dvořáčková, 2012)

Miliární TBC

Jedná se o závažný typ tuberkulózy, při kterém dochází k hematogennímu šíření mykobakterií především do plic, jater, sleziny, ledvin, nadledvin a kostí. Vznikají miliární uzlíky o velikosti do 1 mm. (Homolka, 2016) V minulosti byly miliární TBC zasaženy spíše děti. Vakcinací BCG vakcínou došlo k výraznému snížení miliární TBC v této věkové skupině. V dnešní době přibývá miliární TBC u dospělých, především z důvodu HIV/AIDS koinfekce, imunosupresivní léčby a hemodialýz.

Miliární TBC má široké spektrum nespecifických klinických příznaků jako je slabost, nechutenství, hubnutí, noční pocení, mohou se objevit kožní léze. Určení miliární tuberkulózy bývá velice obtížné. Nejčastěji je diagnostikována na základě RTG vyšetření hrudníku nebo počítačovou tomografií (CT) s vysokým rozlišením, či náhodným průkazem miliárních uzlíků v orgánech dutiny břišní při operacích nebo při pitvách. Tento typ TBC je charakteristický vysokou úmrtností, uváděnou mezi 18 % a 30 %. (Ray *et al.*, 2013)

3.3.3 Klinický obraz

Klinický obraz TBC je velmi variabilní a souvisí s formou onemocnění. Klinické příznaky můžeme rozdělit na celkové a specifické. Mezi celkové příznaky můžeme zařadit zvýšenou únavu, zvýšení tělesné teploty, noční pocení, nechutenství, úbytek tělesné hmotnosti. (Souček, 2011)

Ze specifických příznaků u plicní TBC se objevuje kašel. Ten může být ve formě pokašlávání až záchvatovitého kašle. Na počátku infekce bývá kašel suchý, později přechází ve vlhký. Sputum bývá hlenovité, až hnisavé. Dalším příznakem bývá hemoptýza jako vážný projev aktivní plicní TBC vznikající při poškození cévní stěny. Krev bývá jasně červená. V dnešní době bývá hemoptýza vzácná. (Souček, 2011; Solovič a Vašáková, 2019)

Dyspnoe a bolesti na hrudníku se vyskytují při obstrukci v dýchacích cestách nebo při velkém množství pleurálního výpotku. Cyanóza a paličkovité prsty jsou přítomny při rozsáhlé TBC. (Solovič a Vašáková, 2019)

Část pacientů může být zcela bez příznaků a TBC je u nich diagnostikována náhodným nálezem při rentgenovém vyšetření. (Souček, 2011)

3.3.4 Imunologický podklad TBC

Mykobakterie vstupují do těla hostitele inhalačně ve formě malých kapiček ve vzduchu (aerosolu). Částice jsou dostatečně malé, aby se mohly dostat do dolních dýchacích cest. (Banuls, 2015) Složky mykobakterií jsou rozpoznávány přes receptory imunitního systému hostitele, a to především toll-like receptory (TLR) a C-lektiny. Nejdůležitější povrchové ligandy *M. tuberculosis* interagující s TLR jsou 19 a 27kDa lipoproteiny, 38kDa glykoprotein, glykolipidy a trehalóza dimykolát. Tato interakce spouští obranou kaskádu reakcí hostitele proti infekci, zánětu.

V boji proti *M. tuberculosis* jsou zapojeny makrofágy, dendritické buňky, $\alpha\beta$ -T-lymfocyty (CD4+ a CD8+), CD1+ T-lymfocyty, $\gamma\delta$ -T-lymfocyty, cytotoxické lymfocyty a cytokiny. Nejdůležitější jsou CD4+ T-lymfocyty a cytokin interferon gama. (Solovič a Vašáková, 2019)

Mykobakterie znají způsoby, jak imunitní systém svého hostitele obejít. Dokážou aktivovat transkripční faktor (NF)- κ B a produkovat prozánětlivé cytokiny, chemokiny, oxid dusný. V dolním alveolárním prostoru se předpokládá, že mykobakterie používá maskující lipid fthiocerol dimykokocerozát, aby se chránila před mikrobicidními makrofágy.

Ve vztahu mezi hostitelem a patogenem je důležitá metabolická souhra, která je nezbytná pro virulenci mikroorganismu a progresi onemocnění.

Jakmile se mykobakterie nacházejí ve svém preferovaném prostředí, začínají se replikovat. Také vytváří zprostředkované mechanismy jako sekreční systém typu VII, který indukuje koordinovanou smrt makrofágů a fagocytózu nových makrofágů, což vede k tvorbě granulomů. (Berney a Berney-Meyer, 2017)

Existují nejméně 2 typy granulomů. První klasický kavernózní typ je složen z epiteloidních makrofágů, neutrofilů, a dalších buněk imunitního systému ohraničených pomocí fibroblastů. *M. tuberculosis* perzistuje v centru této nekrotické léze.

Druhý typ granulomu je tvořen hlavně fibroblasty a obsahuje výrazně menší množství makrofágů, přesná lokalizace mykobakterií v těchto granulomech není zcela známá. Tvorba těchto granulomů má za úkol potlačit infekci a růst mykobakterií. (Sovič a Vašáková, 2019)

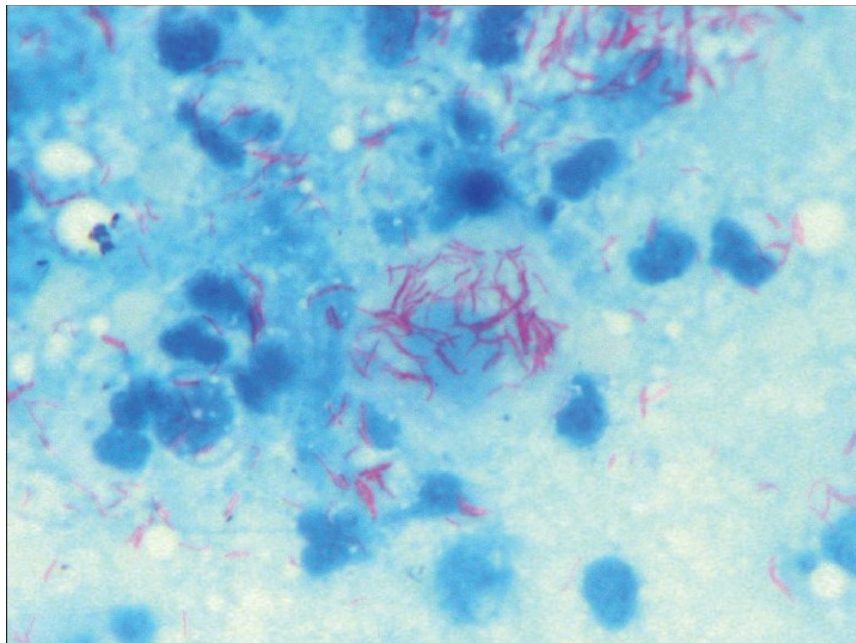
3.3.5 Diagnostika TBC

3.3.5.1 Mikroskopie

Mikroskopie patří mezi základní diagnostické metody. Informuje nás o morfologii a počtu mikroorganismů. Pro pozitivní nález je nutná přítomnost 100 000 mykobakterií na 1 ml sputa. Při pozitivním mikroskopickém vyšetření je pacient již silně infekční. (Solovič a Vašáková, 2019)

3.3.5.1.1 Barvení dle Ziehl-Neelsena

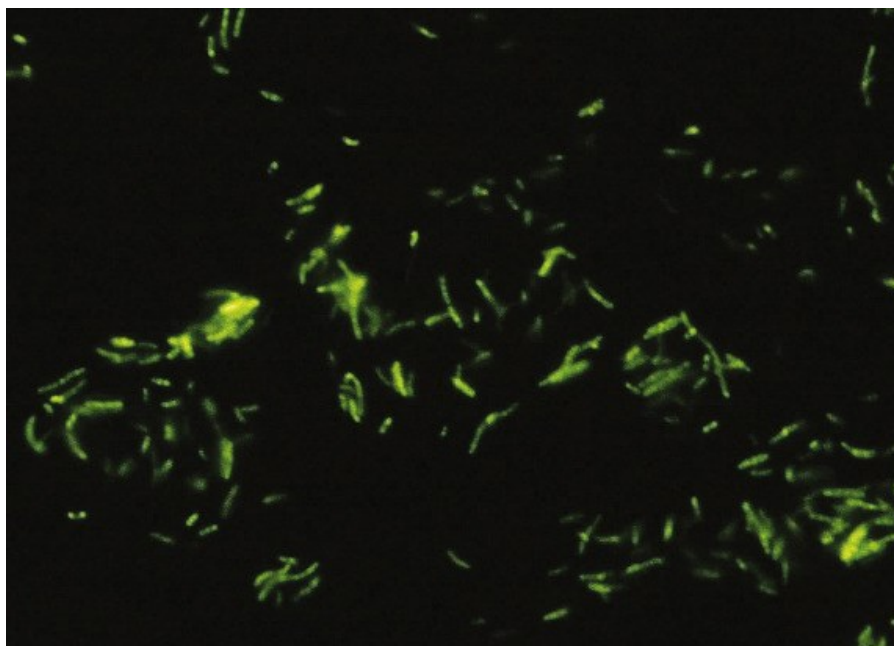
Mykobakterie se díky svým acidorezistentním vlastnostem barví postupem dle Ziehl-Neelsena. Preparát se v prvním kroku fixuje kahanem. Následně se použije karbolfuchsin, který mykobakterie zbarví do červena. Karbolfuchsin je barvivo dobře rozpustné v tucích, a tak snadno proniká do voskové buněčné stěny mykobakterií. Preparát je poté zahříván do výstupu par, aby došlo k lepšímu obarvení. Následuje odbarvení kyselým alkoholem. Mykobakterie zůstávají červené, jelikož je po ochlazení kyselý alkohol není schopný vymýt. V posledním kroku se preparát dobarví kontrastním barvivem malachitovou zelení či metylenovou modří pro dobarvení pozadí. V mikroskopu pozorujeme červené mykobakterie na modrém či zeleném pozadí. (Solovič a Vašáková, 2019; laboratoryinfo.com, 2020)



Obrázek 5 Mykobakterie obarveny dle Ziehl-Neelsena, zvětšení 1000x
Pozorujeme červené tyčky *M. tuberculosis* na modrém pozadí.
(Zdroj: Prasad, 2011)

3.3.5.1.2 Barvení fluorescenční

Druhým typem barvení je barvení fluorescenční. Při této metodě se využívá specifická látka obsahující ve své molekule tzv. fluorochrom, který emituje fluorescenci. Vzorek sputa se fixuje plamenem pomocí kahanu. Poté se barví fluorescenčním barvivem auramin-rhodaminem B, který se váže na mykolové kyseliny ve stěně mykobakterií. Mykobakterie pozorujeme ve fluorescenčním mikroskopu jako svítící tyčky na tmavém pozadí. (Melter a Malmgren, 2014; Solovič a Vašáková, 2019)



Obrázek 6 Mykobakterie ve fluorescenčním mikroskopu, zvětšení 400x
M. tuberculosis ve fluorescenčním mikroskopu pozorujeme jako zářivé zelenožluté tyčky na tmavém pozadí.
(Zdroj: Farver a Jagirdar, 2018)

3.3.5.2 Kultivace

Kultivační vyšetření má větší citlivost a specificitu než mikroskopie. Pro pozitivní výsledek je nutná přítomnost 100 mykobakterií na 1 ml biologického materiálu.

Mykobakterie jsou striktně aerobní a rostou velice pomalu. Generační doba růstu se u *M. tuberculosis* se pohybuje mezi 20-22 hodinami. Kultivace pomalu rostoucích mykobakterií trvá cca 4-9 týdnů, rychle rostoucí mykobakterie jsou vykultivovány do 7 dnů. Mykobakterie se často kultivují ve zkumavkách (šikmé agary), aby během časově náročné kultivace média nevyschla. (Mahon a Lehman, 2019; Melter a Malmgren, 2014)

Vzorek, nejčastěji sputum, se dekontaminuje 2% NaOH. Dále proběhne centrifugace a následuje očkování na vaječná, agarová nebo tekutá média. Mezi

nejpoužívanější vaječná média patří Löwenstein-Jensenova půda s přidatkem selektivních faktorů. Dalšími kultivačními médii mohou být agarová média Middlebrook 7H10 nebo Middlebrook 7H11. Z tekutých médií se využívá Šulova půda nebo Middlebrook 7H9. U těchto tekutých médií je výhodou rychlejší růst mykobakterií a vyšší citlivost. (Mahon a Lehman, 2019; Solovič a Vašáková, 2019)



Obrázek 7 Růst *M. tuberculosis* na Löwenstein-Jensenově půdě

Vzorek sputa je po dekontaminaci naočkován na Löwenstein-Jensenovu půdu a kultivován při 37 °C. Růst kolonií je hodnocen po 4-9 týdnech. *M. tuberculosis* na pevné půdě vytváří bílé či lehce nažloutlé, drsné kolonie s nepravidelným okrajem a drolivou konzistencí.

(Zdroj: Chmelař, 2013)

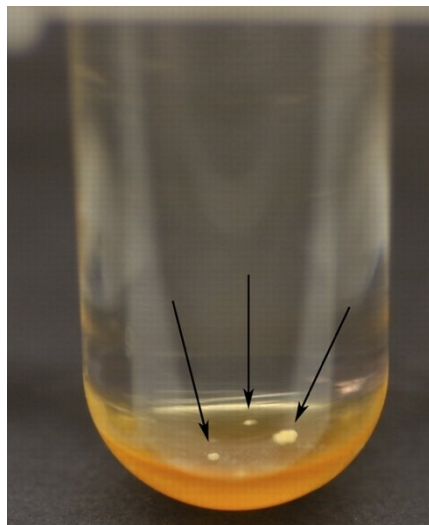
3.3.5.3 Zrychlená kultivace Bactec

Jedná se o plně automatický kultivační systém Bactec 960 MGIT, který pro detekci růstu mykobakterií využívá technologii detekující fluorescenci. Ta vzniká při utilizaci speciálního substrátu životaschopnými mykobakteriemi. Tento přístroj je výrazně citlivější a rychlejší než klasická kultivace. Průměrná doba detekce *M. tuberculosis* v Bactecu byla 13,2 dní, zatímco u klasické kultivace růst kmene trval 33,6 dní. Další výhodou je automatická inkubace a kontinuální monitorování inokulovaného média. Kontrola probíhá každých 60 minut a při pozitivním nálezu je spuštěn alarm. V případě negativního vzorku je po 56 dnech inkubace ukončena a vzorek může být zlikvidován.

V přístroji lze stanovit také citlivost na antituberkulotika. Médiem používaným ve speciálních nádobkách je Middlebrook 7H9. (Záruba a Králová, 2002)



Obrázek 8 Bactec 960 MGIT
Fotografie kultivačního systému.
(Zdroj: selectscience.net)



Obrázek 9 Vykultivované kolonie
M. tuberculosis z *Bactec MGIT 960*
Typický vzhled mykobakteriálních kolonií ve spodní části zkumavky.
(Zdroj: Peňa, 2012)

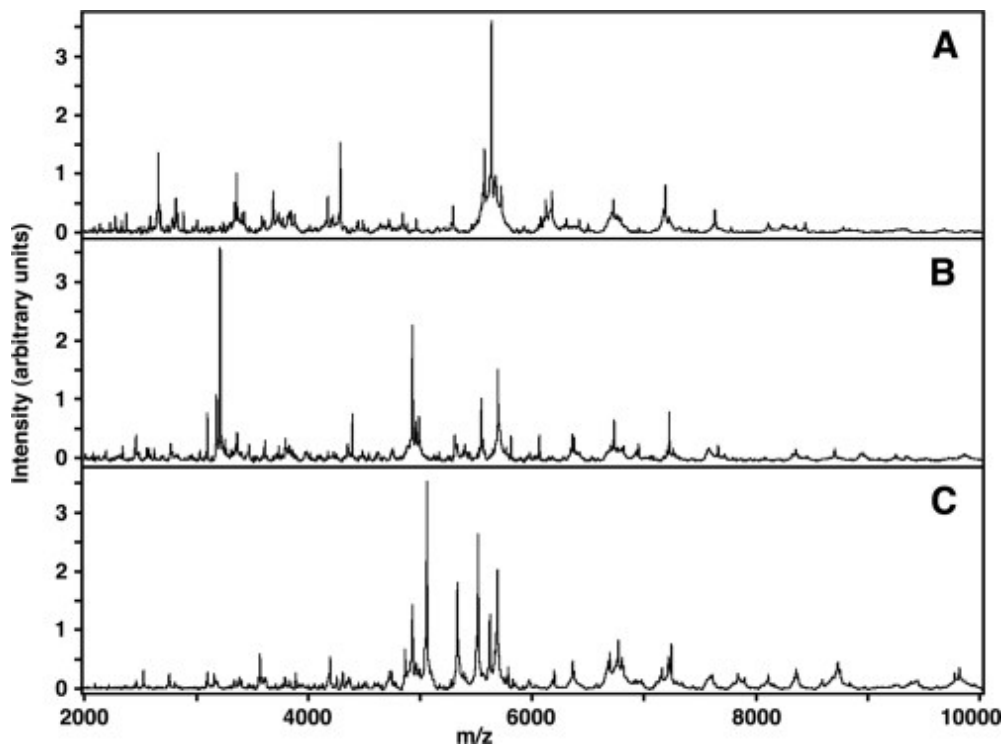
3.3.5.4 Biochemická identifikace

Průkaz ve vzorku probíhá pomocí metabolických enzymů. Je hodnocena pozitivita a negativita daných reakcí dle barevných změn. Ty jsou potom následně porovnány se spektrem známých vlastností mykobakterií. (Melter a Malmgren, 2014)

3.3.5.5 MALDI-TOF

(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight)

Hmotnostní spektrometrie je nejmodernější fenotypovou metodou používanou v mikrobiologii. Je založená na srovnávání hmotnostního spektra nejčastěji proteinů ve vzorku s hmotnostními spektry známých mikroorganismů. Mykobakteriální kolonie se nanesou na pevný nosič s matricí, která absorbuje UV záření. Nejdříve dojde k ionizaci biomolekul. Poté dojde k separaci a následně se měří doba letu (čím větší částice, tím pomalejší let). Nakonec dojde k vytvoření hmotnostního spektra a následného porovnávání s již existujícími spektry daných mikrobů a jeho identifikaci. (Melter a Malmgren, 2014)



Obrázek 10 MALDI spektra A) *M. abscessus*; B) *M. kansasii*; C) *M. tuberculosis*

Ukázka MALDI spektra klinických izolátů kmenů *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. tuberculosis*. Na ose y je zobrazena intenzita signálu (četnost fragmentů, které detekuje detektor), na ose x pak poměr m/z (hmotnost/náboj).

(Zdroj: Saleeb, 2011)

3.3.5.6 Molekulárně genetické metody

Molekulárně genetické metody jsou moderní a velmi citlivé. Jsou založené na detekci jednotlivých úseků nukleových kyselin, které jsou typické pro *M. tuberculosis*. Úseky jsou hledány pomocí specificky značených primerů, které jsou komplementární k začátku hledané části nukleové kyseliny. Poté se nukleová kyselina dosyntetizuje pomocí polymerázy a detekuje se. (Ptáková, 2011)

Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) dochází k amplifikaci DNA mykobakterií, a tím jsme schopni ji ve vzorku identifikovat. Výhodou PCR analýzy je vysoká citlivost a rychlost, kdy máme výsledek v rámci několika hodin. Nevýhodou naopak může být vysoká cena či detekce i neživých mykobakterií. (Melter a Malmgren, 2014; Ptáková, 2011)

Druhým případem molekulárně genetické metody je *Mycobacterium tuberculosis* Direct test (MTD). MTD test spočívá ve specifické amplifikaci ribozomální RNA mykobakterií. (Ptáková, 2011)

3.3.5.7 Citlivost k antituberkulotikům

Testy citlivosti k antituberkulotikům se provádí u každého nově zjištěného případu tuberkulózy. Vyšetřují se hlavní skupiny antituberkulotik (rifampicin, isoniazid, ethambutol, pyrazinamid, streptomycin). Jakmile se objeví rezistence, provádějí se testy citlivosti i na jiná antituberkulotika a další léčiva. (Melter a Malmgren, 2014)

Základním testem citlivosti na antituberkulotika u *M. tuberculosis* je proporční metoda dle Canettiho. Při této metodě se srovnává růst kmene na pevné vaječné půdě, která obsahuje kritickou koncentraci antituberkulotika a růst kmene na pevné vaječné půdě bez antituberkulotika. Určí se poměr, který je vyjádřen v %. (WHO, 2018)

Stanovit citlivost k antituberkulotikům lze také pomocí metody v automatickém metabolickém systému Bactec 960 MGIT. Metoda kapalně kultivace BACTEC MGIT 960 je jedinou metodou doporučenou WHO pro testování citlivosti na pyrazinamid. (WHO, 2018)

Dále se využívají diluční metody. Příkladem je mikrodiluční bujónová metoda, která patří ke kvantitativním metodám stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám. Testování probíhá v mikrotitrační destičce a slouží ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Hodnota MIC je klasifikována jako nejnižší koncentrace v $\mu\text{g/ml}$ testované látky v bujónu, která viditelně inhibuje růst mykobakterií. *Breakpoint* (hraniční bod) v $\mu\text{g/ml}$ kategorizuje, zda je mikroorganismus citlivý či rezistentní. (Melter a Malmgren, 2014, WHO, 2018)

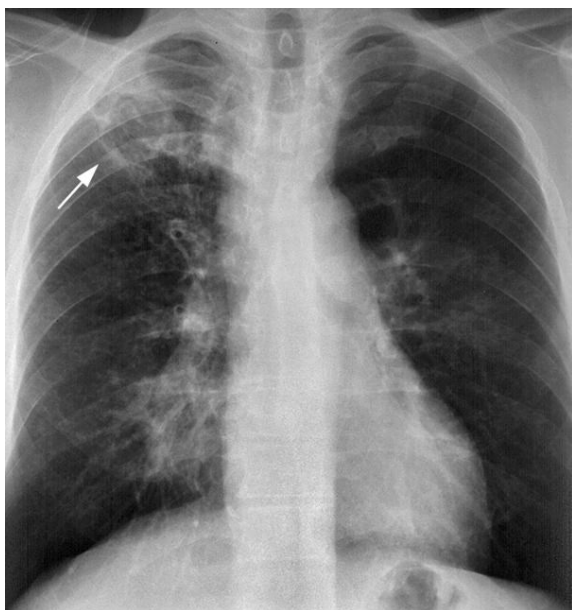


Obrázek 11 Mikrotitrační destičky využívané při testování mikrodiluční bujónovou metodou

(Zdroj: gamedium.cz)

3.3.5.8 Zobrazovací metody

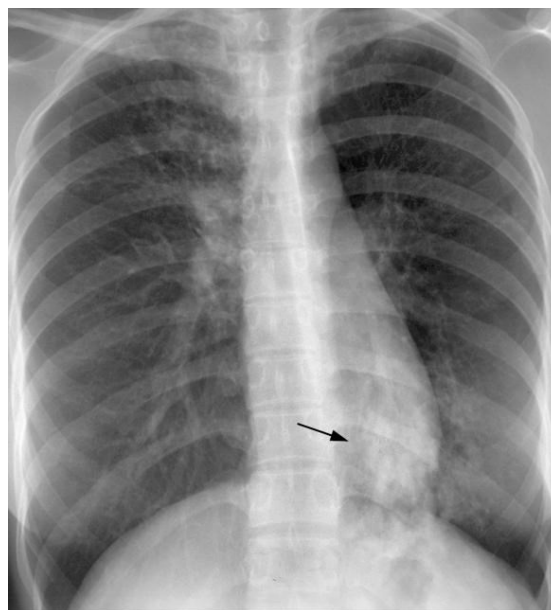
Rentgenové vyšetření (RTG) plic je základním vyšetřením u plicní TBC. Provádí se zadopřední skiagram hrudníku doplněný o boční projekci. RTG nález u TBC bývá charakteristický. Při podezření na mimoplicní TBC se provede zobrazení počítačovou tomografií (CT) či magnetickou rezonancí ostatních orgánů a tkání. (Solovič a Vašáková, 2019)



Obrázek 12 RTG hrudíku (A)

RTG hrudníku ukazuje na pravé straně lymfadenopatii, kavitární neprůhlednost v pravém horním laloku a fokální konsolidaci. U pacienta potvrzena primární progresivní TBC.

(Zdroj: Catanzano, 2016)



Obrázek 13 RTG hrudníku (B)

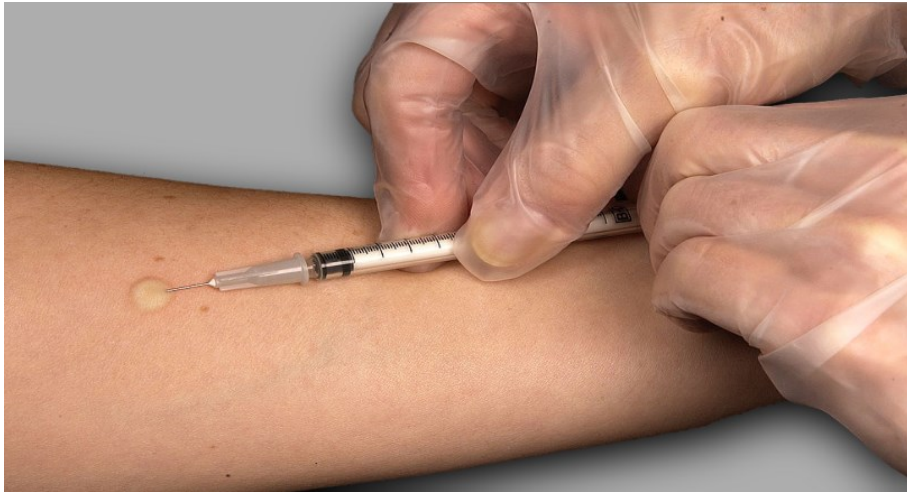
RTG plic pacienta s primární plicní TBC. V levém dolním laloku šipka ukazuje ložiskový stín způsobený TBC.

(Zdroj: Catanzano, 2016)

3.3.5.9 Tuberkulinový test

Tuberkulinový kožní test (Mantoux test) je založený na reakci imunitního systému, která je zprostředkována T lymfocyty. Test se provádí pomocí intradermální aplikace tuberkulinového proteinového antigenu (Mantoux II, 2 jednotky proteinu) do dorsální strany předloktí. Po 48-72 hodinách dochází k odečtení testu, kdy se měří průměr zóny indurace. Při pozitivním výsledku vzniká kromě kožní indurace i erytém, ale ten není pro výsledek testu důležitý. Pozitivní reakce (indurace nad 6 mm) se objevuje u lidí očkovaných či s postinfekčním nálezem. Nadměrná reakce by mohla svědčit pro aktivní infekci. Negativní reakce (indurace pod 5 mm) je obvykle u jedince, který se s tuberkulózou ještě nesešel či u jedince u něhož očkování nevyvolalo dostatečnou

odpověď. V druhém případě pak může být indikováno přeočkování. Nevýhodou testu je relativně nízká specifita, test postrádá senzitivitu u jedinců s imunosupresí (u HIV infekce) a vyžaduje dvě návštěvy klinického pracoviště. Tuberkulinový test je postupně nahrazován IGRA testy. (Souček, 2011; WHO, 2019)



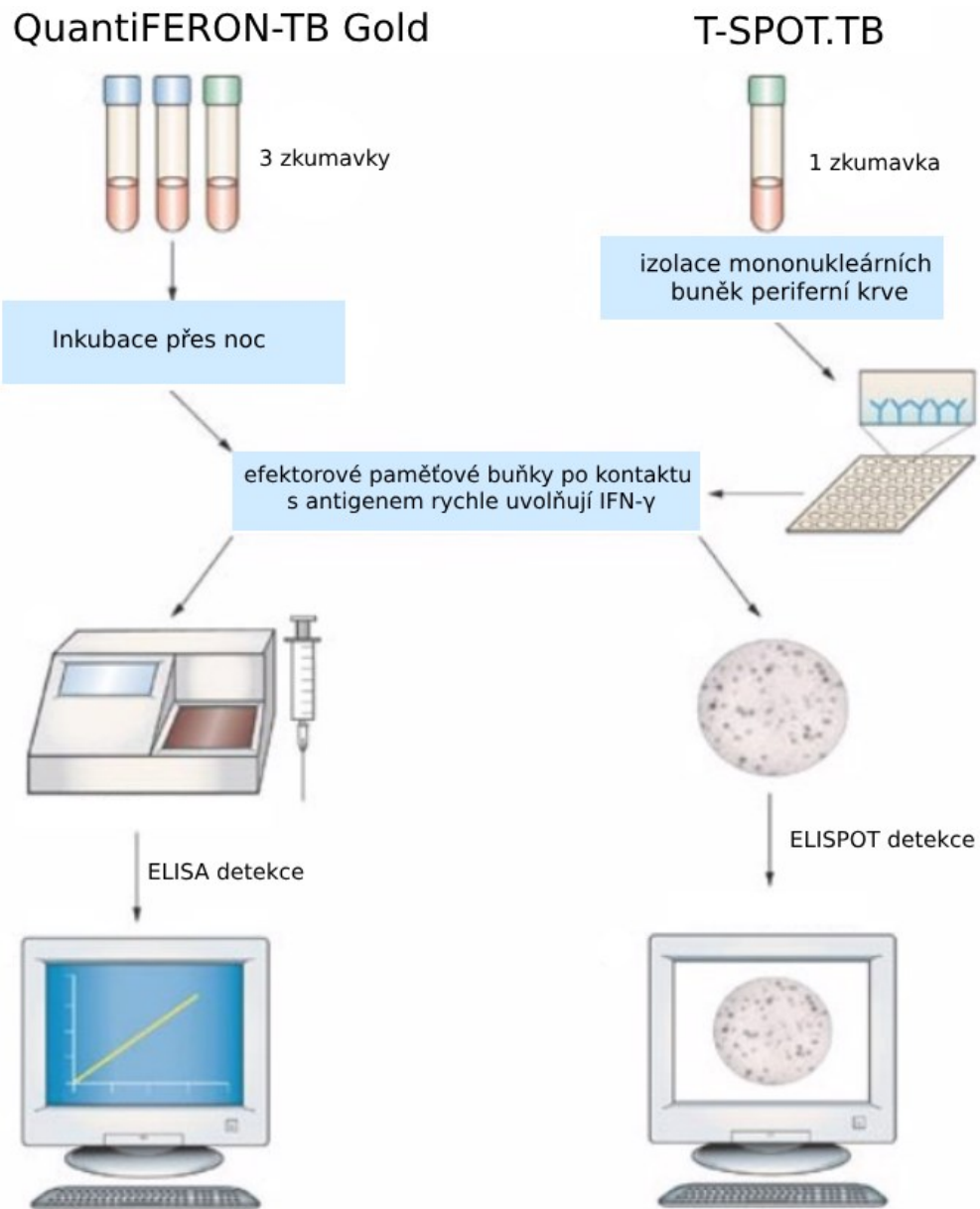
Obrázek 14 Aplikace tuberkulinu do dorsální strany předloktí
(Zdroj: Giri, 2019)

3.3.5.10 IGRA testy

IGRA (Interferon Gamma Release Assay) testy patří mezi nepřímé metody pro stanovení *M. tuberculosis* na základě produkce interferonu gama (IFN- γ). Patří mezi ně testy QuantiFERON-TB Gold a T-SPOT.TB. (Ptáková, 2011)

QuantiFERON-TB Gold test je metoda velice významná pro diagnostiku latentní i aktivní TBC. Jako vzorek se využívá krev pacienta odebraná do tří zkumavek. V první zkumavce jsou antigeny *M. tuberculosis*, v druhé je mitogen jako pozitivní kontrola a třetí je negativní kontrola s fyziologickým roztokem. Hodnotí se uvolňování IFN- γ produkovaného T-lymfocyty po stimulaci specifickými antigeny *M. tuberculosis*. Po inkubaci jsou vzorky analyzovány pomocí ELISA metody. (Ptáková, 2011; Solovič a Vašáková, 2019)

Metoda T-SPOT.TB využívá podobného principu jako QuantiFERON-TB Gold test, avšak liší se v provedení. Z odebrané krve se vyseparují lymfocyty, které se následně inkubují s antigeny. Metodou ELISPOT se zjišťuje počet buněk, které produkují IFN- γ . (Ptáková, 2011; Solovič a Vašáková, 2019)



Obrázek 15 Porovnání testů *Quantiferon-TB Gold* a *T-SPOT.TB*
(převzato a upraveno: Martinek *et al.*)

3.3.6 Vakcinace

Jedinou dostupnou vakcínou proti TBC je BCG (Bacillus Calmette-Guérin) vakcína vyrobená z atenuovaného kmene *Mycobacterium bovis*, který již ztratil svou virulenci. BCG vakcína se aplikuje intradermálně do vnější 1/3 horní části levé paže. (Banuls *et al.*, 2015)

BCG vakcína je nejúčinnější zpravidla v prevenci hematogenního šíření *M. tuberculosis*. Má protektivní účinek proti TBC meningitidě a šíření TBC u dětí.

Nezabrání však primární infekci a co je nutné brát v potaz, nezabrání reaktivaci latentní TBC. Účinek BCG vakcíny je proto omezený. (WHO, BCG vaccine)

WHO vydala v roce 1995 prohlášení, ve kterém nedoporučuje revakcinaci BCG vakcínou na základě velkého počtu studií, které neprokázaly efekt revakcinace. Dále také nedoporučuje provádění tuberkulinového testu za účelem rozhodnout o tom, zda je revakcinace nutná. (Solovič a Vašáková, 2019)

3.3.6.1 Vakcinace v ČR

V České republice se od roku 2010 proti TBC plošně neočkuje a rovněž je zrušena revakcinace, která probíhala okolo 12. roku dítěte. Kalmetizace se povinně provádí pouze u dětí z rizikových skupin. Důvodem k očkování dítěte je situace, kdy člen domácnosti, v níž dítě žije, měl nebo má aktivní TBC. Další indikací může být dítě narozené nebo souvisle žijící déle než 3 měsíce ve státě s vysokým rizikem TBC (více jak 40 případů na 100 000 obyvatel). (Vyhláška MZ ČR, 2010)

Zpravidla rodič dítěte vyplňuje na novorozeneckém oddělení dotazník k definici rizika tuberkulózy a nutnost očkování posuzuje lékař. Je-li očkování nutné, očkuje se dítě starší 6 týdnů. Před očkováním je třeba nutno provést tuberkulinový test, očkuje se v případě negativního výsledku. (SZÚ, 2019; kalmetizace poliklinika Děčín; Vyhláška MZ ČR, 2010)

3.3.6.2 Vakcinace ve světě

Politika očkování BCG vakcínou se v různých zemích významně liší. Země proto můžeme rozdělit do čtyř skupin.

Do první skupiny patří především rozvojové země s nejvyšší incidencí TBC. Zde řadíme země Afriky, Asie, některé země Jižní Ameriky, evropské země s vysokou incidencí nemoci. Plošně a jednorázově očkují všechny novorozence.

Druhou skupinou jsou země, které mají nízkou incidenci onemocnění. Děti očkují v předškolním a školním věku. Tímto způsobem v minulosti probíhalo očkování ve Velké Británii, Řecku a na Maltě.

Třetí skupinu tvoří země, které stále provádějí revakcinaci. Takto postupují např. v Rusku.

Poslední čtvrtou skupinu tvoří země, které BCG vakcínu vůbec nepoužívají či očkují pouze rizikové skupiny obyvatel. Sem patří země jako USA, Kanada, Austrálie, Nový Zéland a většina evropských zemí s nízkou incidencí TBC, včetně ČR. (Solovič a Vašáková, 2019)

3.3.6.3 Nové vakcíny ve vývoji

V současné době je ve výzkumu asi 14 potenciálních vakcín proti TBC. Většina nových vakcín je navržena tak, aby indukovaly buněčné i humorální složky imunitního systému. (WHO, 2019)

Existují tři různé přístupy ve vývoji nových vakcín. Prvním z nich je vývoj vylepšené verze již existující BCG vakcíny, která by zahrnovala bezpečné, dlouhodobě působící, rekombinantní kmeny BCG. Příkladem rekombinantní BCG vakcíny je VPM1002, která se momentálně nachází ve III. fázi testování. Druhým typem je vakcína MTBVAC, která obsahuje geneticky atenuovaný živý kmen *M. tuberculosis*. Ta se momentálně nachází ve IIb. fázi testování. Jiné vakcíny ve vývoji využívají lyofilizované formy buněčné stěny či extrakt *M. tuberculosis* (AEC/BC02, RUTI, DAR-901, MIP/Immuvac).

Druhým přístupem je strategie, ve které by se nová vakcína podávala později jako posilovací dávka. Tímto typem jsou vakcíny obsahující oslabené virové vektory, produkující jeden či několik proteinů mykobakterií. (Ad5 Ag85A, TB/FLU-04L, ChAdOx185A). Další skupinou jsou vakcíny složené z proteinu a adjuvans (H56:IC31, M72/AS01E, ID93 + GLA-SE).

Třetím přístupem je vývoj imunoterapeutických vakcín, které vedou ke zkrácení doby léčby tuberkulózy. Patří zde vakcína z tepelně usmrceného kmenu *M. vaccae*, která je nyní ve III. fázi testování. (Ahsan, 2015; WHO, 2019)

3.3.7 Léčba

Léčba tuberkulózy je velice náročná a vyžaduje včasnou a přesnou diagnostiku, testování citlivosti na antituberkulotika a následně vybrání správného léčebného režimu. V dnešní době dochází k usilovnému vývoji nových léčiv proti TBC a snaha o kratší léčebné režimy. Proto dochází k značnému navýšení investic do těchto výzkumů. (Yuan *et al*, 2018)

3.3.7.1 Léčebné režimy

Léčebné režimy TBC se skládají vždy z iniciální a pokračovací fáze. Doba léčby citlivých kmenů trvá 6-12 měsíců. Režimy léčby závisí na tom, zdali se jedná o nově vzniklé onemocnění, recidivu TBC, nebo o multirezistentní formu. U multirezistentních kmenů se doba léčby prodlužuje až na 20 měsíců.

Standardizovaný režim pro nové pacienty s tuberkulózou spočívá v denním podávání čtyřkombinace antituberkulotik isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol (HRZE) za účelem debacilizace. Tato iniciální fáze trvá nejčastěji 2 měsíce. Poté, v pokračovací fázi, se denně podává dvojkombinace HR (isoniazid a rifampicin) po dobu nejčastěji 4 měsíců. U rozsáhlé formy infekce se část mykobakterií vyskytuje v granulomech, abscesech či kavitách, a proto jsou pro antituberkulotika nedostupné. Léčba nemá 100% účinek a mohou se objevovat recidivy onemocnění.

U pacientů už v minulosti léčených antituberkulotiky se při recidivě onemocnění začíná s iniciální fází. Podává se kombinace HRZES (isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol, streptomycin) po dobu dvou měsíců, poté jeden měsíc HRZE. V pokračovací fázi se využívá HRE (isoniazid, rifampicin, ethambutol).

Při multirezistentní formě TBC se volí speciální režimy léčby bez isoniazidu a rifampicinu. Jednou z možností dle WHO je podávání pětikombinace linezolidu, moxifloxacinu, bedachilinu, cykloserinu a klofaziminu po dobu 6 měsíců následované podáváním trojkombinace moxifloxacinu, cykloserinu a klofaziminu po dobu 14 měsíců. (Wallenfels, Vašáková, Solovič, 2018)

3.4 Antituberkulotika

Antituberkulotika (AT) jsou specifickou skupinou léčiv využívající se k léčbě TBC. Používají se v různých kombinacích za různých okolností. AT 1. linie jsou podávána většinou novým pacientům, kteří s největší pravděpodobností nemají multirezistentní formu *M. tuberculosis*. Na druhé straně léčiva 2. linie se používají hlavně při rezistenci mykobakterií na léčiva 1. linie. V dnešní době se začaly vyvíjet nové léky proti TBC, ale většina je zatím ve fázi výzkumu a testování.

Tuberkulóza se léčí v akutní fázi při aktivním onemocnění. Výjimkou je léčba latentní TBC. Jeden lék by neměl být užíván nikdy samostatně. Vždy se musí užívat

v kombinaci z důvodu předcházení možné rezistence. V dnešní době se kombinace léčivých látek objevuje v jedné tabletě (FDC, fixed-dose combination). (tbfacts.org)

V doporučení WHO Model List of Essential Medicines 2019 je uvedeno několik typů přípravků FDC. První je kombinace čtyř AT (ethambutol + isoniazid + pyrazinamid + rifampicin), trojkombinace AT (ethambutol + isoniazid + rifampicin) nebo (isoniazid + pyrazinamid + rifampicin), či dvojkombinace AT (isoniazid + rifampicin). Při léčbě multirezistentní TBC se může využít FDC přípravek, který obsahuje amoxicilin a kyselinu klavulanovou. (WHO, 2019)

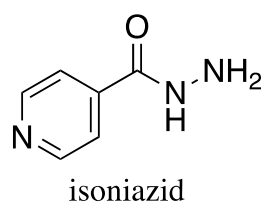
3.4.1 Antituberkulóza 1. linie

K léčivům 1. linie patří pět AT: isoniazid (INH; H), pyrazinamid (PZA; Z), ethambutol (EMB; E), rifampicin (RFM; R), streptomycin (STM; S). Tato AT se volí jako lék první volby u nových pacientů, kdy ještě nebyla stanovena citlivost kmene na AT. Za nejúčinnější z nich se považují INH a RFM. (Martínková, 2018)

Důvodem rezistence mykobakterií k AT 1. linie bývá nejčastěji vznik bodových mutací, inzercí či delecí. (Marques *et al.*, 2013)

Isoniazid

Hydrazid kyseliny isonikotinové



isoniazid

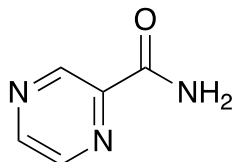
Isoniazid patří mezi nejúčinnější antituberkulóza. Byl představen světu v roce 1952 a již více než 60 let se podílí na léčbě TBC. (Schaaf, 2009)

Působí selektivně a baktericidně na extra i intracelulárně uložené mykobakterie. Jeho mechanismus účinku spočívá v inhibici stavby buněčné stěny. Zasahuje do syntézy kyseliny mykolové. Jako malá, ve vodě rozpustná molekula, se velmi dobře a rychle resorbuje v GIT. Metabolizace probíhá v játrech pomocí acetylace. Možným nežádoucím účinkem může být hepatotoxicita, neurotoxicita, únava, porucha CNS (závratě, porucha paměti), astma, exantém. (Rozsypal, 2011; Pubchem 2019; Solovič a Vašáková, 2019)

Dávkování je 100-300 mg ve formě tablety, 50 mg/5 ml perorální tekutiny, 100 mg dispergovatelné tablety. (WHO, 2019)

Pyrazinamid

Derivát kyseliny pyrazinkarboxylové



pyrazinamid

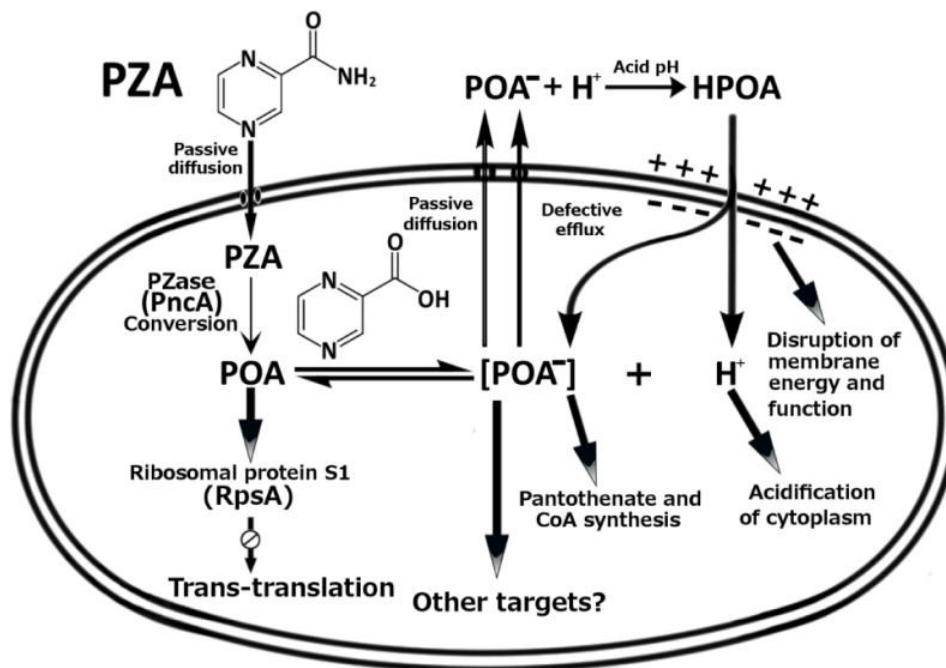
Pyrazinamid (PZA) funguje jako prekurzor, který je aktivován na aktivní kyselinu pyrazinkarboxylovou (POA) pomocí enzymu pyrazinamidázy. PZA, jako jedno z mála antituberkulotik, je schopen inhibovat růst mykobakterií v dormantní fázi (nereplikujících se uvnitř makrofágů, kde je kyslejší prostředí). Je účinný při léčbě latentní formy TBC. (Somoskovi, Parsons, Salfinger, 2001)

O mechanismu účinku PZA se vedou spory a je k dispozici několik teorií.

První, klasická teorie účinku PZA, je založená na přerušení membránového transportu. PZA přechází do mykobakteriální buňky pomocí pasivní difúze. Uvnitř mykobakterie proběhne konverze PZA na účinnou látku kyselinu pyrazinkarboxylovou. POA je vyloučena slabou efluxní pumpou pomocí pasivní či aktivní difúze zpět do makrofágu. Nicméně v kyselém extracelulárním prostředí dochází k protonizaci pyrazinových iontů a ty se zpět dostávají do mykobakteriální cytoplazmy. Dochází k akumulaci těchto iontů uvnitř. Akumulace má za následek poruchu membránových transportních mechanismů a v konečném důsledku poškození celé buňky. (Palomino a Martin, 2014; Zhang *et al.*, 2013)

Míra aktivity PZA silně souvisí s pH mikroprostředí mykobakterií, přičemž aktivita PZA se zvyšuje s nižším pH. Baktericidní aktivita je největší, když jsou mykobakteriální energetické zdroje na nízké úrovni.

Další studie navrhly nový mechanismus účinku, kde PZA narušuje biosyntézu mastných kyselin a metabolismus fosfátu jako kompetitivní inhibitor. Soutěží s NADPH o vazebné místo FAS I (syntáza mastných kyselin I). Studie FAS-I jako možného cíle PZA jsou sporné, jelikož byly použity extrémně vysoké koncentrace PZA, které jsou nad fyziologickými koncentracemi. (Zhang *et al.*, 2013)



Obrázek 16 Mechanismus účinku PZA
(Zdroj: Zhang *et al.*, 2013)

Později byl identifikován další mechanismus účinku, kde PZA inhibuje *trans*-translaci. U mykobakterií má PZA za cíl ribozomální protein S1 (RpsA) zapojený do *trans*-translace. *Trans*-translace je důležitou kontrolní součástí u bakterií. Zajišťuje, že proteiny jsou syntetizovány navzdory transkripčním chybám jako je poškození mRNA, translační posuny tripletů atd. *Trans*-translace je důležitý proces pro přežití mykobakterií. (Zhang *et al.*, 2013; Keiler, 2008)

V posledních studiích byl identifikován nový gen *panD* kódující aspartát dekarboxylázu. Gen se podílí na syntéze β-alaninu, který je prekurzorem biosyntézy panthotenátu a koenzymu A. Je pravděpodobné, že gen *panD* je cílem PZA, a že vazba POA na *panD* by mohla inhibovat syntézu panthotenátu a koenzymu A, což způsobuje poruchu metabolismu mykobakterií. (Zhang *et al.*, 2013)

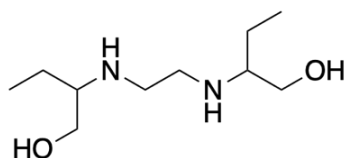
Z farmakologické hlediska se PZA resorbuje velmi dobře. Metabolizace probíhá v játrech, vylučuje se ledvinami. Mezi jeho nežádoucí účinky patří hepatotoxicita, dna (díky snížení tubulární sekrece kyseliny močové), potíže s trávením, závratě, erytém. (Rozsypal, 2011; Pubchem)

Při použití spolu s RFM se doba léčby zkrátí z 1 roku na 6 měsíců.

Dávkování je 400 mg ve formě tablety, 30 mg/ml perorální tekutiny, 150 mg dispergovatelné tablety. (WHO, 2019)

Ethambutol

Dusíkatý alkohol



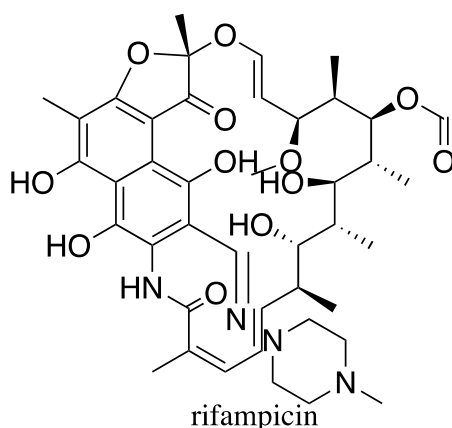
ethambutol

Ethambutol působí baktericidně. Narušuje biosyntézu arabinogalaktanu, hlavního polysacharidu mykobakteriální buněčné stěny. Působí na intracelulárně uložené mykobakterie. Jeho resorpce je dobrá, váže se na erythrocyty, je rychle distribuován, vylučuje se ledvinami. Nežádoucími účinky mohou být retrobulbární neuritida s poruchami vidění a poruchami barvocitu, trávicí problémy, bolesti hlavy, alergie, leukopenie. (Rozsypal 2011; Pubchem)

Dávkování je 100-400 mg ve formě tablety, 25 mg/ml perorální tekutiny, 100 mg dispergovatelné tablety. (WHO, 2019)

Rifampicin

Chemicky patří mezi rifamyciny, semisyntetická antibiotika získaná z mikroorganismů *Ammycolatopsis mediterranei* a *Streptomyces mediterranei*. (Scholar a Pratt, 2000)



rifampicin

Rifampicin je velmi efektivní při léčbě tuberkulózy. Inhibuje syntézu RNA vazbou na beta podjednotku DNA-dependentní RNA polymerázy. Dojde k blokaci RNA transkripce. Rifampicin musí být vždy podáván spolu s jiným léčivem proti TBC, aby se zabránilo případné rezistenci. Rifampicin je velmi dobře vstřebáván v GIT. Je metabolizován v játrech deacetylací. (Scholar a Pratt, 2000)

Rifampicin je obvykle dobře snášen. Ovšem jeho nežádoucími účinky mohou být nechutenství, průjem, bolesti žaludku. Tyto účinky mohou být zmírněny, když se lék užije spolu s jídlem či bezprostředně po jídle. Dalším nežádoucím účinkem může být načervenalá barva moči, potu, sputa, slin a slz. (Pubchem)

Dávkování je 20 mg/ml ve formě perorální tekutiny nebo 150-300 mg ve formě tuhých perorálních přípravků. (WHO, 2019)

Rifabutin a rifapentin

Tato léčiva se řadí mezi nové rifamyciny/ansamyciny a považují se tak za antituberkulotika 1. linie.

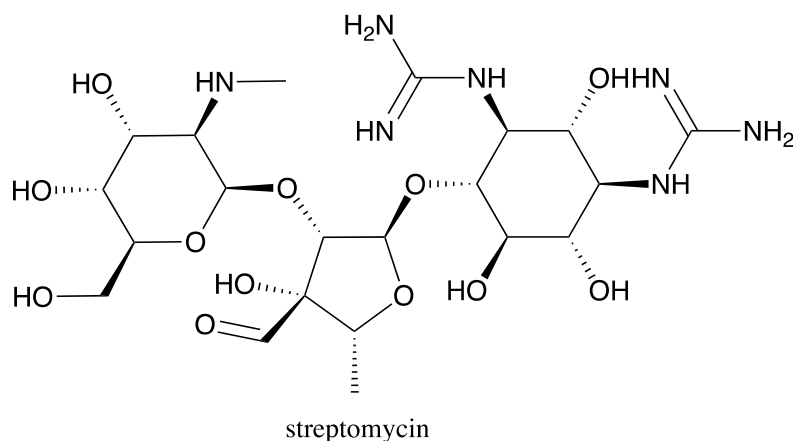
Užití rifabutinu se indikuje u pacientů s HIV infekcí, kteří současně užívají taky antivirotické léky, a tím je u nich snížen potenciační účinek v inhibici enzymu CYP450. Rifapentin spolu s isoniazidem užívají někteří pacienti v pokračovací fázi léčby TBC. (Solovič, 2019)

Dávkování pro rifabutin je ve formě tuhého perorálního přípravku 150 mg, a to pouze pro HIV pozitivní pacienty, kteří užívají inhibitory proteázy. (WHO, 2019)

Dávkování pro rifapentin je 150 mg ve formě tablety. Je určen pouze pro léčbu latentní TBC. (WHO, 2019)

Streptomycin

Streptomycin se řadí mezi širokospektrá aminoglykosidová ATB. Je získáván z aktinomycet *Streptomyces griseus*. Působí baktericidně. Jeho účinek je způsoben tím, že se váže na 30S ribozomální podjednotku a narušuje iniciační a elongační fázi při proteosyntéze. (Drugbank.ca; Pubchem)



Nežádoucím účinkem může být ototoxicita. Po podání může následovat vestibulární i sluchová dysfunkce. Tomuto lze předejít vhodným monitorováním terapeutických hladin léčiva. Dále je nutno dávat pozor na nefrotoxicitu (proteinurie, albuminurie) a sledovat funkci ledvin. (Solovič a Vašáková, 2019)

Dávkování je 1 g prášku na injekční podání (per os podání není možné, jelikož se tak streptomycin špatně vstřebává). (Solovič a Vašáková, 2019; WHO, 2019)

3.4.2 Antituberkulóza 2. linie

Léčiva 2. linie nejsou tak účinná jako AT 1. linie nebo jsou toxičtější. Řadíme mezi ně: aminoglykosidová injekční antibiotika (amikacin, kanamycin), polypeptidová antibiotika (kapreomycin, viomycin, enviomycin), fluorochinolony (moxifloxacin, levofloxacin, ciprofloxacin), cykloserin, paraaminosalicylovou kyselinu. (Martínková, 2018)

Amikacin, kanamycin

Amikacin a kanamycin se řadí mezi aminoglykosidová antibiotika a využívají se jako léčiva 2. linie k léčbě TBC. Aplikují se intravenózně a nejčastěji jsou využity při léčbě multirezistentní TBC. Tyto léky se váží na 16S rRNA v 30S malé ribozomální podjednotce a inhibují syntézu proteinů u mykobakterií. (Sowajassatakul *et al.*, 2014)

U mykobakterií může nastat mutace v *rss* genu kódující 16s RNA a to může být příčinou možné lékové rezistence. Nežádoucími účinky mohou být nefrotoxicita, ototoxicita. (Sowajassatakul *et al.*, 2014)

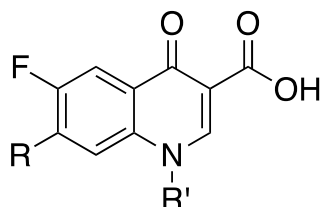
Dávkování amikacinu je 100 mg-1 g pro injekční podání. (WHO, 2019)

Kapreomycin, viomycin, enviomycin

Kapreomycin je cyklické, širokospektré, polypeptidové antibiotikum izolované z bakterie *Streptomyces capreolus*. Využívá se jako sekundární léčivo v terapii rezistentní TBC vždy v kombinaci s INH, EMB, RFM, PZA. Mechanismus účinku je inhibice syntézy proteinů. Je spíše bakteriostatický než bakteriocidní. Aplikace může být intravenózní či intramuskulární. Typická dávka bývá 15 mg/kg/den po dobu 2 až 4 měsíců. Vedlejšími účinky mohou být ototoxicita, nefrotoxicita. V současné době se využívá méně, místo něj se volí spíše streptomycin. (LiverTox: Capreomycin, 2014; Akbergenov, Shcherbakov, Böttger, 2011)

Kapreomycinu jsou strukturálně i mechanismem působení podobné viomycin a enviomycin. (Akbergenov, Shcherbakov, Böttger, 2011)

Fluorochinolony

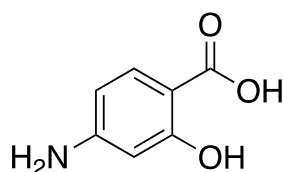


fluorochinolony

Fluorochinolonová antibiotika jsou velice významnou skupinou léčiv používaných k léčbě TBC. Řadí se sem: ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, sitafloxacin. Novější generace gatifloxacin a moxifloxacin má nižší minimální inhibiční koncentraci (MIC), než starší levofloxacin, ciprofloxacin a ofloxacin. (Ginsburg, 2003) Novodobým širokospektrým fluorochinolonem je sitafloxacin, který zastavuje růst i těch mykobakterií, které jsou k ostatním fluorochinolonům rezistentní. (Krátký a Vinšová, 2010)

Mechanismem účinku fluorochinolonů je inhibice replikace a transkripce DNA mykobakterií přes topoizomerázu IV a DNA gyrázu (topoizomerázu II). Aplikace těchto ATB může být perorální či intravenózní. Možnými nežádoucími účinky mohou být GIT obtíže, bolesti hlavy, závratě, synkopa, ospalost, zánět šlachy. (Ginsburg, Grosset, Bishai, 2003)

Paraaminosalicylová kyselina



paraaminosalicylová kyselina

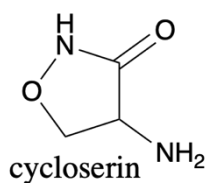
Paraaminosalicylová kyselina (PAS) se využívá k léčbě TBC více než 60 let. Zpočátku byla PAS zařazena mezi AT 1. linie, ale po zavedení nových AT se dostala do 2. linie a využívá se v případech rezistence *M. tuberculosis*. (Donald a Diacon, 2015)

PAS působí bakteriostaticky a funguje jako proléčivo, které se aktivuje pomocí enzymů dihydrofolátsyntázy a dihydropteroátsyntázy konvertující PAS na antimetabolit hydroxyl-dihydrofolát. Ten poté inhibuje dihydrofolátreduktázu. (Zheng *et al.*, 2013)

Možné nežádoucí účinky mohou být GIT obtíže, hepatitida, hypofunkce štítné žlázy.

PAS je jedním z posledních zbývajících dostupných léků k léčbě extenzivně-rezistentní tuberkulózy (XDR-TBC). Významně pozitivní výsledky nese léčba PAS spolu se streptomycinem. V současných léčebných režimech XDR-TBC je doporučeno dávkování 8-12 g 2-3x denně. Lék je ve formě granulí k perorálnímu použití. Nyní se nově využívá léková forma s postupným uvolňováním, a proto je možné změnit dávku na jednu denně. (Donald a Diacon, 2015)

Cykloserin



Cykloserin byl objeven jako sekundární metabolit *Streptomyces orchidaceus* v roce 1954. Cykloserin patří k AT 2. linie, jehož hlavní úlohou je léčba multirezistentní TBC. Mechanismus účinku je inhibice syntézy peptidoglykanu.

U cykloserinu je nebezpečným nežádoucím účinkem neuropsychická toxicita, s níž se setkává až 50 % pacientů. (Deshpande *et al.*, 2018)

Dávkování cykloserinu je 125-250 mg ve formě pevného perorálního přípravku (WHO, 2019)

3.4.3 Nově zavedená antituberkulotika

Bedachilin

Bedachilin byl vyvinut při výzkumu léčiv proti MDR-TB. Bedachilin patří do nové skupiny ATB tzv. diarylchinolinů. V Evropě získal osvědčení v roce 2014. Stále však probíhají studie III. fáze testování, výsledky jsou očekávány v roce 2020. (Beneš, 2018; WHO, 2019)

Molekula léčiva obsahuje několik aromatických kruhů. Mechanismus jeho účinku spočívá v blokaci mykobakteriálního enzymu, který vytváří ATP (ATP syntáza). Působí tak baktericidně na replikující se mykobakterie či na nereplikující se klidové formy. Bedachilin je účinné léčivo i na netuberkulózní mykobakterie včetně *M. leprae*. (Součková a Ruzsíková, 2016; Beneš, 2018)

100 mg bedachilinu ve formě tablet se užívá od 6 let věku. (WHO, 2019)

Delamanid

Delamanid jako derivát dihydronitroimidazoxazolu patří do skupiny nitroimidazolových ATB. Tento nový lék pro dospělé pacienty s MDR-TB byl v Evropě podmíněně schválen v roce 2014 na základě výsledku studie II. fáze. Nyní stále probíhají studie III. fáze, a to především perorálního podávání delamanidu a léčby dětských pacientů. V neposlední řadě se plánují studie, které se zabývají použitím delamanidu jako prevence při kontaktu s osobami s MDR-TB. (Xavier a Lakshmanan, 2014; WHO, 2019)

Mechanismus jeho účinku je inhibice syntézy kyseliny methoxy-mykolové a kyseliny keto-mykolové. Obě tyto složky jsou přítomné v buněčné stěně mykobakterií. Delamanid je proléčivo, které se aktivuje enzymem deazaflavin-dependentní nitroreduktázou. Reaktivní meziproductový metabolit, vytvořený mezi delamanidovým a desnitroimidazooxazolovým derivátem, má důležitou roli při inhibici produkce kyseliny mykolové.

Preklinické a klinické studie ukazují, že delamanid má vysokou účinnost, nízké riziko lékových interakcí a dobrou snášenlivost. Na rozdíl od léčiv 1. linie je doporučeno užívat delamanid s jídlem. (Xavier a Lakshmanan, 2014)

50 mg delamanidu ve formě tablet se užívá od 6 let věku. (WHO, 2019)

Pretomanid

Pretomanid (PA-824) patří mezi nitroimidazoxazinová antimykobakteriální léčiva. Využívá se v kombinaci s bedachilinem a linezolidem při terapii latentní TBC, MDR-TB i XDR-TB. Tento léčebný režim nese název BPaL. Je významný pro specifickou populaci dospělých pacientů. (Ramandeep *et al.*, 2008; tballiance.org, 2019)

Sám pretomanid působí baktericidně. Nereplikující se *M. tuberculosis* usmrtí pomocí uvolňování intracelulárního NO. (Ramandeep *et al.*, 2008)

Možné nežádoucí účinky mohou být periferní neuropatie, akné, anémie, nauzea, zvracení, bolest hlavy, zvýšení jaterních enzymů, hypoglykémie.

Při použití pretomanidu s bedachilinem a linezolidem došlo k hlášení poškození jater. Je nutno sledovat jaterní enzymy a příznaky. Pokud by došlo ke zvýšení hodnot či poškození, je důležité tento léčebný režim přerušit. (tballiance.org, 2019)

3.4.4 Vývoj nových léčiv

V dnešní době léčebné režimy TBC vyžadují kombinaci více léků najednou, léčba je dlouhá a poměrně složitá. Objevují se toxické vedlejší účinky, je omezená dostupnost AT 2. linie a AT pro dětské pacienty. Komplikovaná je rovněž léčba pacientů s HIV infekcí, u nichž mohou nastat lékové interakce mezi AT a antiretrovirovými léčivy. Může dojít ke kumulaci toxických účinků a vzniku zánětlivého syndromu imunitní rekonstituce. U těchto pacientů s HIV je naléhavá potřeba nových léčiv, které jsou účinnější, cenově dostupnější a s nižší toxicitou. (Yuan a Sampson, 2018)

3.4.4.1 Historie vývoje nových léčiv

S dostupností celého genomu *M. tuberculosis* v roce 1998 byl vývoj nových antituberkulotik na vzestupu. Vývoj se začal zaměřovat na výběr vhodných inhibitorů, které by blokovaly aktivitu důležitých enzymů v metabolismu *M. tuberculosis*. Proteinové cíle byly purifikovány a krystalizovány a poté byla identifikována vazebná místa. Na základě toho se navrhovaly inhibitory. Nicméně enzymatické testy testovaly pouze inhibici *in vitro* izolovaných cílových proteinů. Tudiž nebyly zohledňovány základní faktory jako je propustnost buněčné stěny, metabolická stabilita atd. Při objevování nové sloučeniny bylo obtížné zahrnout tyto vlastnosti tak, aby byla zachována inhibiční účinnost.

Poté se vývoj nových antituberkulotik zaměřil na fenotypové celobuněčné screeniny. Využívalo se testování založené na celých buňkách *M. tuberculosis* nebo alternativách *M. tuberculosis* v tekutém médiu *in vitro*. Nicméně cíle inhibované v kapalném médiu nemusí být inhibované i v podmínkách *in vivo*. Proto byly navrženy nové kultivační modely na základě současného porozumění mechanismům *in vivo* infekce *M. tuberculosis*. Napodobování prostředí, ve kterém se *M. tuberculosis* vyskytuje, povede k větší úspěšnosti při objevování nových potenciálních sloučenin. (Yuan a Sampson, 2018)

3.4.4.2 *Nové molekuly ve vývoji*

Proces vývoje nového léčiva až po jeho registraci trvá v průměru 12-15 let. V současné době se v klinických studiích fáze I., II., a III. nachází 23 nových antituberkulotik. (WHO, 2019)

Klinické hodnocení vývoje nového léčiva probíhá zpravidla ve IV. fázích. (Součková, Kostková, Demlová, 2015)

V **I. fázi** je léčivo podáváno pouze zdravým dobrovolníkům. Sleduje se tolerance organismu na sloučeninu, její farmakokinetika. V I. fázi se obvykle nehodnotí účinnost studovaného léčiva, ale zjišťují se možné nežádoucí účinky. Zpočátku jsou podávány velmi nízké dávky, později dochází ke zvyšování.

Ve **II. fázi** je lék podáván malému množství přesně definovaných nemocných pacientů, kterým je léčivo indikováno. Jsou prokazovány léčebné účinky. Zjišťuje se vhodná dávka a bezpečnost léku. Sleduje se to, jakým způsobem onemocnění ovlivní chování léčiva v organismu.

Ve **III. fázi** je zapojeno větší množství pacientů (stovky až tisíce), kdy má být na takto vysokém počtu pacientů prokázána účinnost léku a bezpečnost. Studie III. fáze bývají zpravidla:

- kontrolované: efekt studovaného léčiva je srovnáván s podáváním tzv. placebo, které je upraveno do stejné léčivé formy jako hodnocené léčivo, ale neobsazuje účinnou látku.
- randomizované: výběr pacientů do experimentální či kontrolní skupiny je přiřazován pomocí metody náhodného výběru.
- zaslepené: pacient neví, zda dostává účinné léčivo, či placebo. Při dvojitě zalepených studiích, není informován pacient ani lékař.

Po úspěšném ukončení studií I.-III. fáze dochází k registraci nového léčiva.

Ve **IV. fázi** se pozorně sledují nežádoucí účinky, které vznikly při dlouhodobém užívání léku. Jedná se o peregistrační klinické hodnocení. Zároveň se sledují možné lékové interakce. Eventuálně se realizují další klinická testování III.b fáze, kdy se zkouší další indikace léku, nové léčebné režimy. (SÚKL; Součková, Kostková, Demlová, 2015)

Tabulka 3 Nové molekuly a léčebné režimy ve vývoji k srpnu 2019

I. fáze	II. fáze	III. fáze
BTZ-043	Telacebec (Q203)	Bedachilin
Macozinon	Delpazolid (LCB01-0371)	Delamanid
GSK-3036656	SQ109	Pretomanid
OPC-167832	Sutezolid	Klofazimin
TBA-7371	Linezolid (rozmezí dávky)	Vyšší dávka rifampicinu
SPR720	Nitazoxanid	Bedachilin + delamanid + linezolid + levofloxacin + klofazimin (léčba 6 měsíců per os) nebo bedachilin + delamanid + linezolid + klofazimin (léčba 6-9 měsíců per os pro pre-XDR a XDR-TB (test BEAT TB))
Contezolid	Bedachilin + delamanid	Bedachilin+ pretomanid + moxifloxacin + pyrazinamid
TBI-166	Delamanid + linezolid + levofloxacin + pyrazinamid pro MDR-TB citlivou na chinolony	Bedachilin + pretomanid + linezolid (NiX-TB trial)
TBI-223	Čtyřměsíční léčba TB	Bedachilin + pretomanid + linezolid (ZeNix trial): optimalizace linezolidu

(Zdroj: WHO, 2019)

BTZ-043

BTZ-043 patří mezi benzothiazinony. Mechanismem působení této látky je inhibice enzymu, který je důležitý při syntéze D-arabinofuranózy. D-arabinofuranóza je složka, která je přítomna v buněčné stěně *M. tuberculosis*. V roce 2019 byla dokončena I. fáze testování. (WHO, 2019)

Telacebec (Q203)

Q203 je imidazopyridin, který byl identifikován přes infikovaný makrofág pomocí celobuněčného screeningu. Q203 inhibuje komplex cytochromu bc1 a narušuje transportní řetězec pro transport elektronu pro ATP syntézu. Vykazuje silnou inhibici replikujících se mykobakterií. Nyní je ve II. fázi testování. (Yuan, *et al*, 2018)

SQ109

SQ109 spadá do třídy léčiv známých jako ethylendiaminy. Byl objeven v USA společností Sequella. Mechanismem jeho účinku je inhibice membránového transportéru MmpL3. Tím nedochází k přenosu monomykolátu trehalózy do prostoru buněčné stěny, kde by se měl spojit s arabinogalaktanem. Syntéza buněčné stěny mykobakterií je narušena a dochází k akumulaci trehalózového monomykolátu. (Tahlan, 2012)

V roce 2017 byly dokončeny studie a léčivo bylo přidáno do standardního režimu v léčbě MDR-TB v Rusku. V USA je stále ve II. fázi testování. (WHO, 2019)

Contezolid (MRX-4/MRX-1)

MRX-4 je proléčivo contezolidu, nyní je testováno v I. fázi v USA. MRX-1 je oxazolidinové antibiotikum (chemicky podobné s linezolidem) účinné proti grampozitivním patogenům. (WHO, 2019)

Delpazolid (LCB01-0371)

Delpazolid patří také mezi oxazolidinony. Látka byla vyvinutá společností LegoChem BioSciences. V roce 2017 vstoupila do II. fáze testování v Koreji. (WHO, 2019)

GSK-3036656

GSK-3036656 patří do skupiny oxaborolu. Látku vyvinula společnost GlaxoSmithKline a v roce 2017 začala I. fáze testování. (WHO, 2019)

Macozinon

Macozinon (PBTZ169) je benzothiazinon vyvinutý společností Nearmedic Plus. Ve Švýcarsku bylo dokončeno testování I. fáze. (WHO, 2019)

OPC-167832

OPC-167832 je derivát karbostyrlu. Působí baktericidně proti rostoucím, intracelulárním mykobakteriím. Byl prokázán velmi příznivý antituberkulotický účinek OPC-167832 v kombinaci s delamanidem. (WHO, 2019)

SPR720

SPR720 je perorální léčivo vyvinuté pro léčbu plicních netuberkulózních mykobakteriálních infekcí (komplex *M. avium* a *M. abscessus*). Potenciální léčivo je v I. fázi testování. (WHO, 2019)

Linezolid

Linezolid patří mezi oxazolidinony a má silnou antituberkulózní aktivitu. Byl využíván od roku 2006 při léčbě MDR-TBC i XDR-TBC. Linezolid má však úzké terapeutické okno a optimální strategie užívání není dosud známá. Kromě toho byly hlášeny vážné nežádoucí účinky, jako například neuropatie, hematologické problémy. (Agyeman a Ofori-Asenso, 2016)

Bylo provedeno testování II. fáze, aby se vyhodnotila baktericidní aktivita, bezpečnost, snášenlivost a především farmakokinetika. (WHO, 2019)

Sutezolid (PNU-100480)

Sutezolid patří mezi oxazolidinony. Je analogem linezolidu. Studie prokazují baktericidní aktivitu. Při testování na myších sutezolid oproti linezolidu zkracuje standardní léčbu o jeden měsíc. Stejně jako linezolid není ovlivněn mutacemi, které udělují rezistenci ke standardním lékům TBC. (WHO, 2019)

TBA-7371

TBA-7371 působí jako inhibitor enzymu DrpE1, který je důležitý při syntéze komponentů v buněčné stěně mykobakterií. Ukázalo se, že toto léčivo je účinné proti kmenům rezistentním na známá AT. Zatím je v I. fázi testování. (WHO, 2019)

TBI-166

TBI-166 je riminofenazinová sloučenina. Její účinnost je podobná klofaziminu. I. fáze testování začala v roce 2018 v Číně. (WHO, 2019)

TBI-223

TBI-223 je oxazolidinová sloučenina. Funguje jako inhibitor syntézy proteinů. V USA probíhá I. fáze testování. (WHO, 2019)

Nitazoxanid

Nitazoxanid (NTZ) je syntetický derivát nitrothiazolyl-salicylamidu. Tento lék je používán při léčbě střevních protozoálních infekcí. Je levný, dostupný, dobře tolerovaný. Mechanismus účinku NTZ proti *M. tuberculosis* spočívá v narušení membránového potenciálu a homeostázy. Cílí přesně proti mykobakteriím a zároveň posiluje imunitní reakci hostitele. Zatím se nachází ve II. fázi testování. (Harausz *et al.*, 2016)

Klofazimin

Klofazimin je fenazinové (červené) barvivo. Je to silně hydrofobní látka, která se používá při léčbě lepry. Nicméně vykazuje také potenciál při léčbě multirezistentní TBC. Klofazimin je nyní ve III. fázi klinických studií. (WHO, 2019)

3.5 Lékové rezistence

Přírozená rezistence se týká schopnosti biologického agens odolávat aktivitě konkrétního léčiva prostřednictvím vlastních struktur či funkčních charakteristik. *M. tuberculosis* má přirozeně specificky složenou buněčnou stěnu, která omezuje propustnost, produkuje betalaktamázové enzymy a je schopna efluxu některých ATB.

Získaná rezistence vzniká, když mikroorganismus získá schopnost odolávat léčivu, na které bylo dříve citlivé. U *M. tuberculosis* je způsobena především spontánními mutacemi genů. (Kolyva a Karakousis, 2012)

Nové dostupné informace, získané díky molekulární biologii a přečtením kompletního genomu *M. tuberculosis*, rozšířily významně znalosti ohledně mechanismů vzniku rezistence na nejpoužívanější antituberkulotika. Specifické genové mutace jsou spojené s lékovou rezistencí. Každý rok se vyskytne nejméně 500 tisíc nových MDR-TB

případů, z části se vyvine XDR-TB. Znalost molekulárních mechanismů má významný vliv na rychlou detekci rezistence a zároveň na výzkum nových cílů léčiv ve vývoji.

Rezistence na rifampicin je způsobena mutací *rpoB* genu, který kóduje β -podjednotku DNA-dependentní RNA-polymerázy, zodpovědnou za syntézu nukleových kyselin mykobakterií.

Rezistence na isoniazid je způsobená mutací ve více genech zároveň. Jednou z nich je mutace *katG* genu, který kóduje enzym kataláza-peroxidázu, který aktivuje isoniazid na účinnou látku. Některé druhy vykazují mutaci v genu *inhA*, který kóduje NADH enoyl-carrier-protein-reduktázu, jenž je zapojená do syntézy mykolových kyselin.

Rezistence na ethambutol je nejčastěji v mutaci genu *embB*, který kóduje enzym arabinosyl transferázu, čímž dochází k blokaci syntézy arabinogalaktanu, který se nachází v buněčné stěně *M. tuberculosis*.

Rezistence na fluorochinolony je způsobená mutací v *gyrA* a *gyrB* genech, které ovlivňují enzym DNA gyrázu, na kterou fluorochinolony působí.

Kanamycin a amikacin jsou antibiotika patřící mezi aminoglykosidy. Jejich rezistence je způsobena mutací ve změně struktury ribozomální podjednotky 16S RNA genu *rrs*, na kterou cílí tyto aminoglykosidy a inhibují tak proteosyntézu u mykobakterií. (Solovič a Vašáková, 2019)

3.5.1 Multirezistentní tuberkulóza (MDR-TB)

V posledních desetiletích se neustále zvyšuje počet pacientů infikovaných multirezistentní *M. tuberculosis*. MDR-TB je vyvolaná kmenem z *Mycobacterium tuberculosis* komplexu rezistentnímu nejméně ke dvěma nejúčinnějším antituberkulotikům – isoniazidu a rifampicinu. Poprvé byla popsána v roce 1970. Globálně je touto multirezistentní formou TBC nakaženo 4,6 % pacientů. V některých zemích jako Kazachstán, Moldavsko, Ukrajina zaujímá MDR-TB 25 % nemocných TBC. (Lange *et al.*, 2019)

Hlavním důvodem, proč tato rezistence vznikla, byla nevhodná volba léků (např. užívání pouze jednoho léku, špatné skladovací podmínky léku), chybná compliance pacienta (např. předčasné přerušování léčby, nedodržení správného dávkování). Jiným důvodem mohla být genetická mutace mykobakterií. V poslední době je pro šíření rezistentních forem hrozbou také zvýšená migrace obyvatelstva. (WHO, 2018)

Léčba těchto pacientů je prodloužena (1 rok až několik let). K léčbě se využívají nové léky, např. bedachilin nebo se znovu využívá léčba linezolidem, klofaziminem, meropenemem. Velmi důležitou roli zde hraje testování citlivosti na léčiva. (Lange *et al.*, 2019)

V některých zemích je léčba MDR-TB velice složitá. Možnosti léčby jsou finančně náročné a omezené. V některých případech se pak může rozvinout ještě závažnější TBC rezistence. WHO má za cíl urychlit testování rezistence na AT a zavést kratší a levnější léčebné režimy (WHO, 2018)

3.5.2 Rifampicin rezistentní tuberkulóza (RR-TB)

TBC rezistentní vůči rifampicinu (RR-TB) se vyskytuje nejčastěji v zemích bývalého Sovětského svazu, Číně a Indii. Léčba RR-TB, stejně jako léčba MDR-TB, bývá delší, nákladnější a zpravidla mnohem toxičtější. V roce 2018 bylo přibližně okolo půl milionu nových případů RR-TB, z nichž 78 % bylo MDR-TB. (WHO, 2019)

3.5.3 Extenzivně rezistentní tuberkulóza (XDR-TB)

Jde o závažný typ rezistence, kdy mykobakterie nejsou citlivé na nejučinnější antituberkulotika z 1. linie (rifampicin a isoniazid) a navíc nejsou citlivé ani na jedno ze tří intravenózně aplikovaných antituberkulotik 2. linie (amikacin, kanamycin, kapreomycin) a jedno z fluorochinolonových antituberkulotik. Udává se, že XDR-TB tvořilo v roce 2018 6,2 % všech nemocných MDR-TB. Léčba nakažených XDR-TB je ještě náročnější a nákladnější než terapie MDR-TB, vyléčit se dokáže zhruba 40 % nakažených. Pro dobrou prognózu je důležité zachování citlivosti kmene na kapreomycin. V kombinaci s HIV infekcí se jedná o smrtelné onemocnění. (Homolka, 2016; Bártů, 2007, WHO, 2019)

3.5.4 Totálně rezistentní tuberkulóza (TDR-TB)

TDR-TB byla poprvé popsána v roce 2009. Mykobakterie prokázaly rezistenci *in vitro* na všechna AT první i druhé linie. Byly zahájeny studie, které zkoumaly na buněčné a molekulární úrovni izoláty mykobakterií TDR-TB. První výsledky potvrdily morfologickou variabilitu mykobakterií. Značná část mykobakterií byla kulatého (35 %) nebo oválného (15 %) charakteru, či několikanásobně větvené. Buněčná stěna byla výrazně silnější než u izolátu MDR-TB. (Velayati, Farnia, Masjedi, 2013)

WHO v současnosti pojem TDR-TB neuznává. Pojem totálně rezistentní TBC je obecně srozumitelný, ale v klinické praxi je *in vitro* testování citlivosti na všechna antituberkulotika technicky náročné. Konvenční testy citlivosti, které definují MDR-TB a XDR-TB byly důkladně prostudovány, určeny vhodné metody a minimální inhibiční koncentrace, které definují rezistenci. Zároveň se zavedením nových léčiv na rezistentní mykobakterie (bedachilin, delamanid) byla u kmenů TDR-TB zjištěna citlivost. (WHO, Totally drug-resistant TB FAQ)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

In vitro testování potenciálních antimykobakteriálně účinných sloučenin na rychle rostoucích kmenech rodu *Mycobacterium* probíhalo na Katedře biologických a lékařských věd na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové. Potenciální sloučeniny byly testovány pomocí mikrodiluční bujónové metody v mikrotitračních destičkách na základě standardů CLSI a EUCAST. Organizace pro standardizaci CLSI i EUCAST jsou celosvětově akceptované instituce s vysokou autoritou.

4.1 Mikrodiluční bujónová metoda

Mikrodiluční bujónová metoda patří ke kvantitativním metodám stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám. Slouží ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Hodnota MIC je definována jako nejnižší koncentrace v $\mu\text{g/ml}$ testované látky v bujónu, která viditelně inhibuje růst mykobakterií. Breakpoint (hraniční bod) v $\mu\text{g/ml}$ kategorizuje, zda je mikroorganismus citlivý či rezistentní. (Melter a Malmgren, 2014)

Metodu lze plně automatizovat a standardizovat. Touto metodou lze otestovat citlivost jednoho kmene k více antimikrobiálním látkám současně anebo více kmenů k jedné látce. Nevýhodou může být případná bakteriální kontaminace.

EUCAST zavedla tři kategorie, v nichž kmen je klinicky:

- citlivý: potenciální látka je účinná a je zde pravděpodobnost úspěchu léčby
- rezistentní: potenciální látka je neúčinná a poskytuje vysokou pravděpodobnost selhání léčby
- intermediárně rezistentní: úspěch léčby potenciální látkou s danou aktivitou nejistý. (Urbášková, Žemličková, Hrabák, 2010)

Testování probíhá v mikrotitrační destičce, která obsahuje 96 jamek. K odhalení případné kontaminace růstového média musí být přítomna negativní kontrola, která obsahuje pouze bujón a nedochází zde k růstu mikroorganismu. Dále je přítomna pozitivní kontrola bez testovaných antimikrobiálních látek a slouží ke kontrole růstu kmene. Do ostatních jamek se přidává růstové médium a testované látky v různých koncentracích. Testované látky jsou ředěny geometrickou řadou (dvojkové ředění).

4.2 Testované kmeny

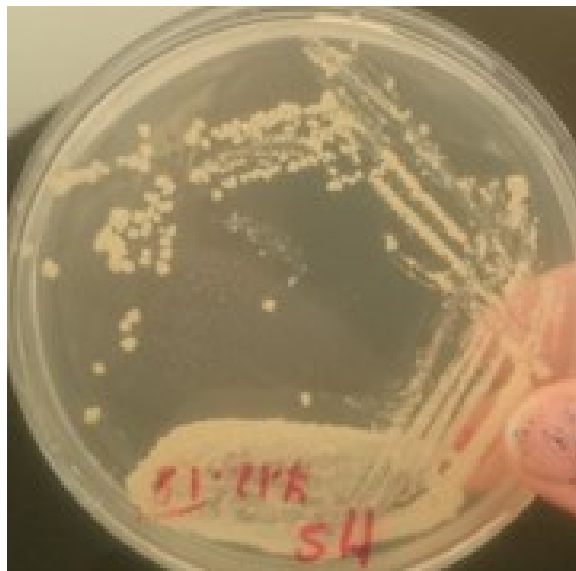
Pro testování byly využity kmeny *Mycobacterium smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607) a *Mycobacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366) z německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DSM, Braunschweig, Německo).

4.2.1 *Mycobacterium smegmatis*

M. smegmatis je acidorezistentní, aerobní, rychle rostoucí, nepatogenní nebo zřídka patogenní mykobakterie. Nejčastěji se vyskytuje ve formě biofilmu v půdě, ve vodě a na rostlinách. Rovněž ji můžeme najít běžně v okolním prostředí a během zpracování a testování vzorků může docházet ke vzniku kontaminace. (Xu *et al.*, 2013; Etienne *et al.*, 2005)

M. smegmatis představuje výborný modelový organismus pro studium mykobakterií, především z hlediska nepatogenity, růstových vlastností a genetické výbavy. Široce se využívá pro testování antituberkulotik a jejich rezistence. (Hentschel, 2017)

U imunosuprimovaných pacientů může *M. smegmatis* vyvolat infekce kůže, např. chronickou celulitidu s tvorbou píštěle. (Xu *et al.*, 2013)



Obrázek 17 Růst *M. smegmatis* na agaru Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich)

M. smegmatis tvoří kolonie zpravidla drsnější, kruhové bez pigmentace.

(Zdroj: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.)

4.2.2 *Mycobacterium aurum*

M. aurum je acidorezistentní, rychle rostoucí mykobakterie, která se obvykle vyskytuje ve vlhkém prostředí a velmi zřídka způsobuje infekce u člověka. (Phelan *et al.*, 2015)

Na rozdíl od jiných rychle rostoucích mykobakterií je *M. aurum* schopná přežít v makrofázích, a proto se využívá pro intracelulární screening léčiv. Umožňuje nám tak posoudit schopnost sloučenin pronikat přes buněčnou membránu a sledovat jejich stabilitu uvnitř buňky. Za účelem pochopení molekulárního základu rezistence léčiv byl zmapován genom *M. aurum*. (Phelan *et al.*, 2015)

Buněčná stěna *M. aurum* obsahuje mykolové kyseliny, které se rovněž vyskytují u *M. tuberculosis*, proto mezi nimi existuje podobnost v citlivosti na antimikrobiální látky. Z důvodu rychlého růstu a nízké patogenity se *M. aurum* s velkou oblibou používá jako náhrada za vysoce patogenní *M. tuberculosis* při testování antimikrobiální aktivity. (Phelan *et al.*, 2015)



Obrázek 18 Růst *M. aurum* na agaru Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich)

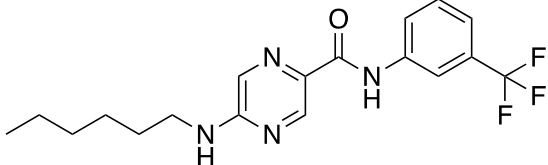
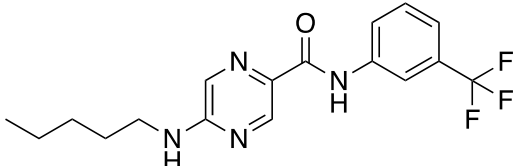
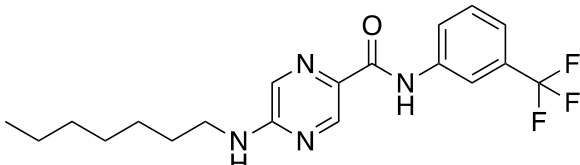
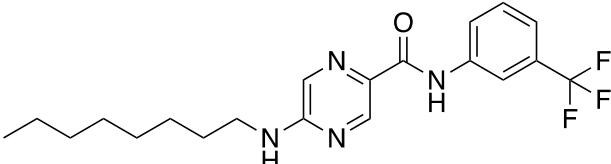
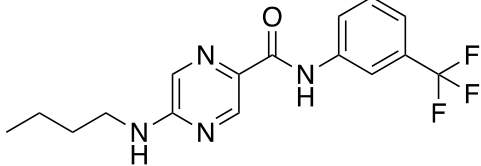
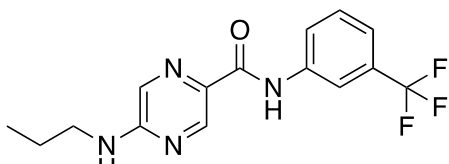
Kolonie *M. aurum* bývají hladké a oranžově pigmentové.

(Zdroj: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.)

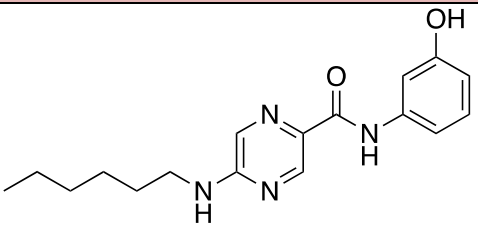
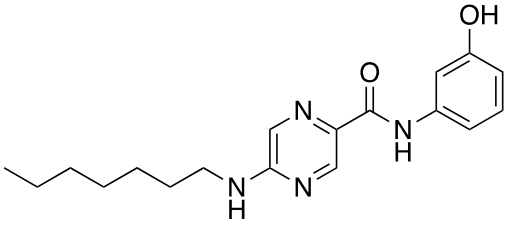
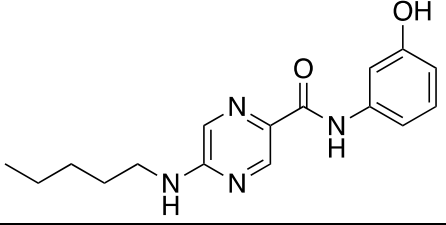
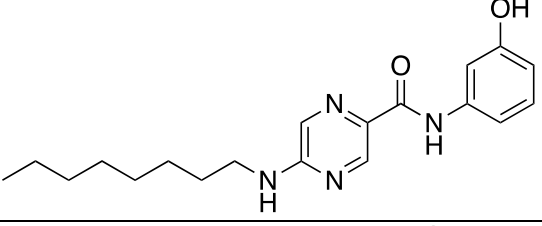
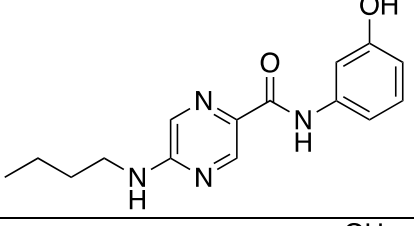
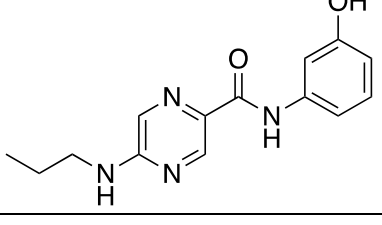
4.3 Testované sloučeniny

Z Katedry Farmaceutické chemie a Farmaceutické analýzy na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové byly do laboratoře dodány testované sloučeniny v pevné, krystalické podobě. Dle pracovního postupu (viz níže) byly navážené látky rozpuštěny.

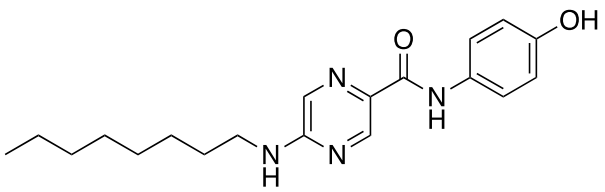
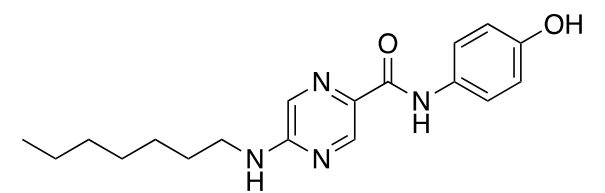
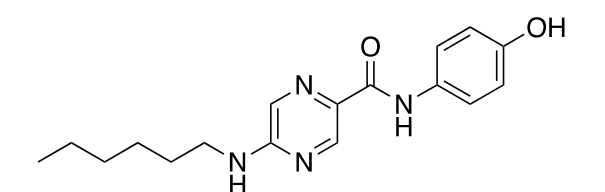
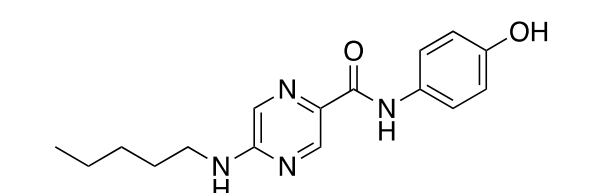
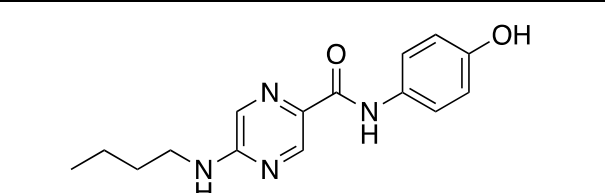
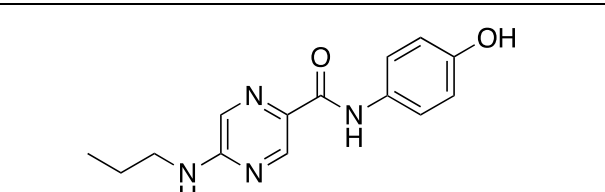
**Tabulka 4 1. skupina testovaných látek –
5-alkylamino-*N*-(3-trifluormethyl)fenylpyrazin-2-karboxamidy**

Kód látky	Vzorec	Název
WA_14		5-(hexylamino)- <i>N</i> -(3-(trifluormethyl)fenyl)pyrazin-2-karboxamid
WA_15		5-(pentylamino)- <i>N</i> -(3-(trifluormethyl)fenyl)pyrazin-2-karboxamid
WA_16		5-(heptylamino)- <i>N</i> -(3-(trifluormethyl)fenyl)pyrazin-2-karboxamid
WA_17		5-(oktylamino)- <i>N</i> -(3-(trifluormethyl)fenyl)pyrazin-2-karboxamid
WA_18		5-(butylamino)- <i>N</i> -(3-(trifluormethyl)fenyl)pyrazin-2-karboxamid
WA_19		5-(propylamino)- <i>N</i> -(3-(trifluormethyl)fenyl)pyrazin-2-karboxamid

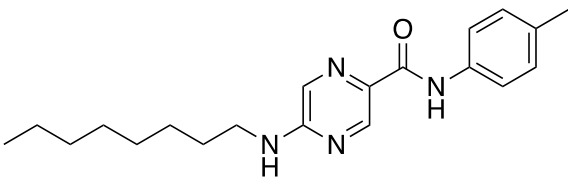
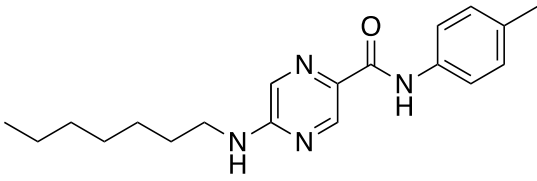
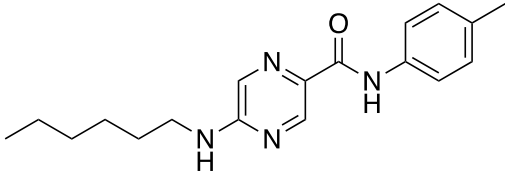
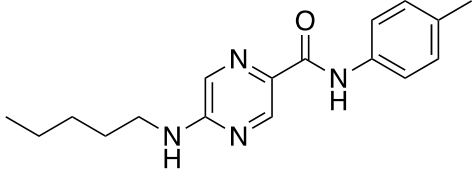
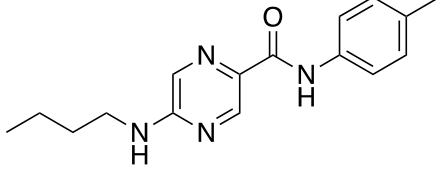
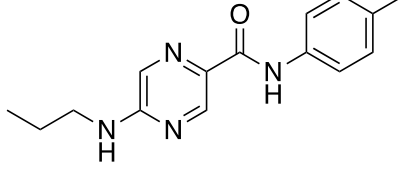
**Tabulka 5 2. skupina testovaných látek –
5-alkylamino-*N*-(3-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy**

Kód látky	Vzorec	Název
WA_20		5-(hexylamino)- <i>N</i> -(3-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid
WA_21		5-(heptylamino)- <i>N</i> -(3-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid
WA_22		<i>N</i> -(3-hydroxyfenyl)-5-(pentylamino)pyrazin-2-karboxamid
WA_23		<i>N</i> -(3-hydroxyfenyl)-5-(oktylamino)pyrazin-2-karboxamid
WA_24		5-(butylamino)- <i>N</i> -(3-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid
WA_25		<i>N</i> -(3-hydroxyfenyl)-5-(propylamino)pyrazin-2-karboxamid

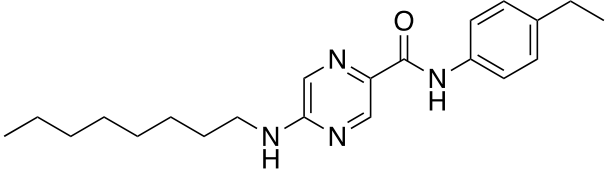
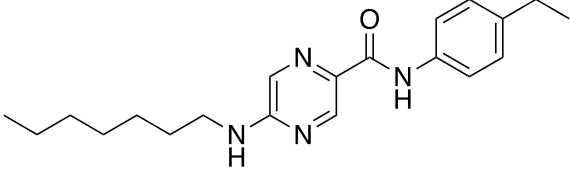
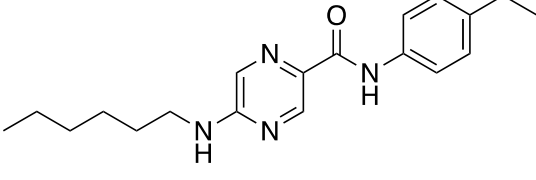
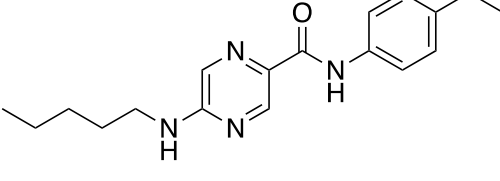
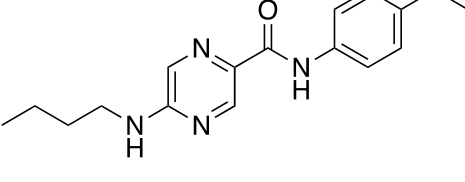
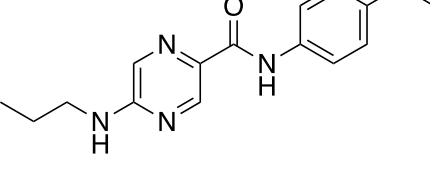
**Tabulka 6 3. skupina testovaných látek –
5-alkylamino-*N*-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy**

Kód látky	Vzorec	Název
WA_31		<i>N</i> -(4-hydroxyfenyl)- 5-(oktylamino)pyrazin- 2-karboxamid
WA_32		5-(heptylamino)- <i>N</i> - (4-hydroxyfenyl)pyrazin- 2-karboxamid
WA_33		5-(hexylamino)- <i>N</i> - (4-hydroxyfenyl)pyrazin- 2-karboxamid
WA_34		<i>N</i> -(4-hydroxyfenyl)- 5-(pentylamino)pyrazin- 2-karboxamid
WA_35		5-(butylamino)- <i>N</i> - (4-hydroxyfenyl)pyrazin- 2-karboxamid
WA_36		<i>N</i> -(4-hydroxyfenyl)- 5-propylamino)pyrazin- 2-karboxamid

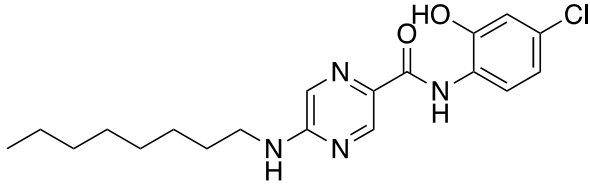
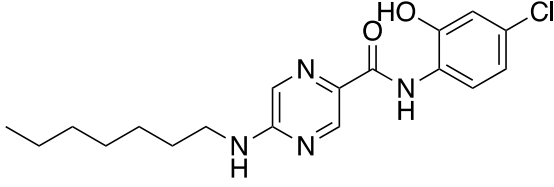
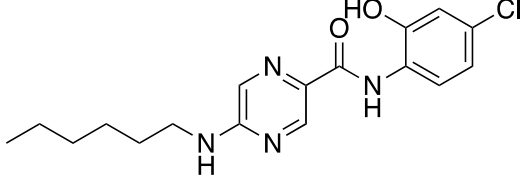
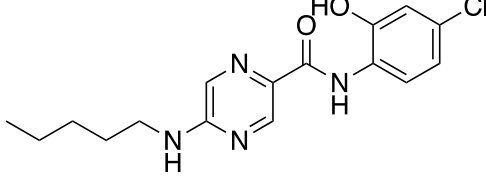
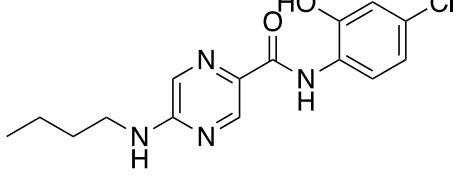
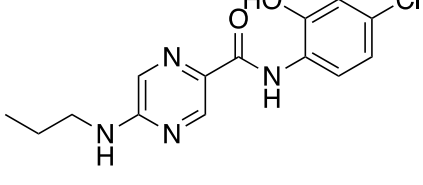
**Tabulka 7 4. skupina testovaných látek –
5-alkylamino-*N*-(*p*-tolyl)pyrazin-2-karboxamidy**

Kód látky	Vzorec	Název
WA_37		5-(oktylamino)- <i>N</i> -(<i>p</i> -tolyl)pyrazin-2-karboxamid
WA_38		5-(heptylamino)- <i>N</i> -(<i>p</i> -tolyl)pyrazin-2-karboxamid
WA_39		5-(hexylamino)- <i>N</i> -(<i>p</i> -tolyl)pyrazin-2-karboxamid
WA_40		5-(pentylamino)- <i>N</i> -(<i>p</i> -tolyl)pyrazin-2-karboxamid
WA_41		5-(butylamino)- <i>N</i> -(<i>p</i> -tolyl)pyrazin-2-karboxamid
WA_42		5-(propylamino)- <i>N</i> -(<i>p</i> -tolyl)pyrazin-2-karboxamid

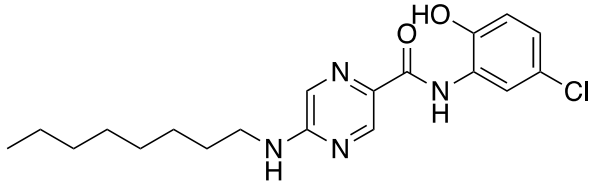
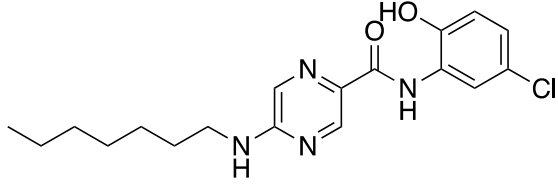
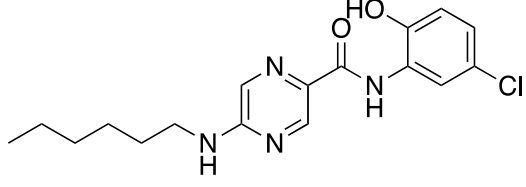
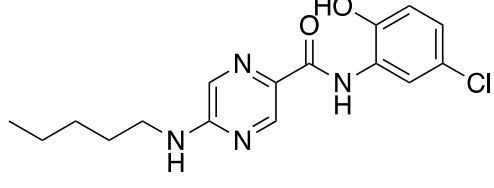
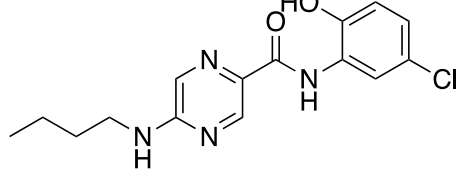
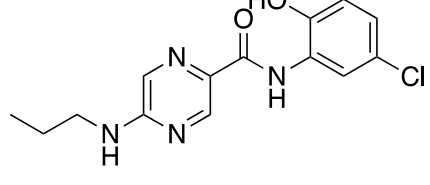
**Tabulka 8 5. skupina testovaných látek –
5-alkylamino-*N*-(4-ethylfenyl)pyrazin-2-karboxamidy**

Kód látky	Vzorec	Název
WA_43		<i>N</i> -(4-ethylfenyl)- 5-(oktylamino)pyrazin- 2-karboxamid
WA_44		<i>N</i> -(4-ethylfenyl)- 5-(heptylamino)pyrazin- 2-karboxamid
WA_45		<i>N</i> -(4-ethylfenyl)- 5-(hexylamino)pyrazin- 2-karboxamid
WA_46		<i>N</i> -(4-ethylfenyl)- 5-(pentylamino)pyrazin- 2-karboxamid
WA_47		5-(butylamino)- <i>N</i> -(4-ethylfenyl)pyrazin- 2-karboxamid
WA_48		<i>N</i> -(4-ethylfenyl)- 5-(propylamino)pyrazin- 2-karboxamid

**Tabulka 9 6. skupina testovaných látek –
5-alkylamino-N-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy**

Kód látky	Vzorec	Název
WA_49		N-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-(oktylamino)pyrazin-2-karboxamid
WA_50		N-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-(heptylamino)pyrazin-2-karboxamid
WA_51		N-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-(hexylamino)pyrazin-2-karboxamid
WA_52		N-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-(pentylamino)pyrazin-2-karboxamid
WA_53		5-(butylamino)-N-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid
WA_54		N-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-(propylamino)pyrazin-2-karboxamid

**Tabulka 10 7. skupina testovaných látek –
5-alkylamino-N-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy**

Kód	Vzorec	Název
WA_55		N-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-(oktylamino)pyrazin-2-karboxamid
WA_56		N-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-(heptylamino)pyrazin-2-karboxamid
WA_57		N-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-(hexylamino)pyrazin-2-karboxamid
WA_58		N-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-(pentylamino)pyrazin-2-karboxamid
WA_59		5-(butylamino)-N-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid
WA_60		N-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-(propylamino)pyrazin-2-karboxamid

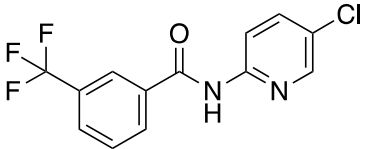
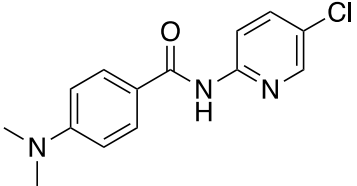
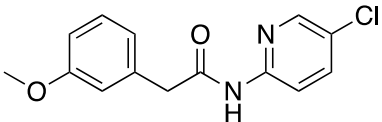
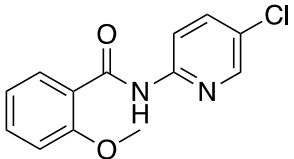
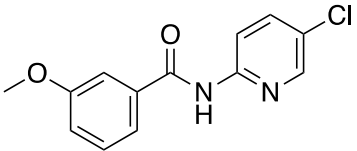
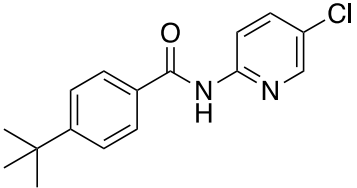
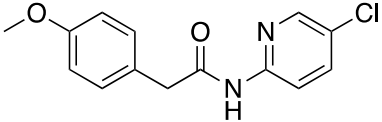
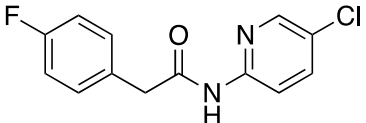
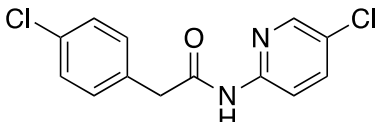
**Tabulka 11 8. skupina testovaných látek –
aminokyselinami N-substituované pyrazin-2-karboxamidy**

Kód látky	Vzorec	Název
PC-DCS		(S)-N-(3-oxoisoxazolidin-4-yl)pyrazin-2-karboxamid
PC-DL-Ala-Me		methyl (pyrazin-2-karbonyl)alaninát
PC-D-Ala-Et		ethyl (pyrazin-2-karbonyl)-D-alaninát
PC-L-Ala-Et		ethyl (pyrazin-2-karbonyl)-L-alaninát
PC-D-Asp-diMe		dimethyl (pyrazin-2-karbonyl)-D-aspartát
PC-L-SBz-Cys		S-benzyl-N-(pyrazin-2-karbonyl)-L-cystein
PC-D-Glu-diMe		dimethyl (pyrazin-2-karbonyl)-D-glutamát

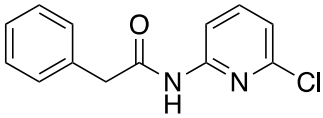
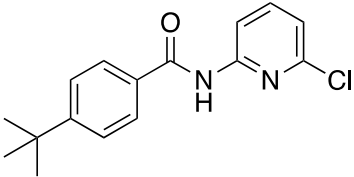
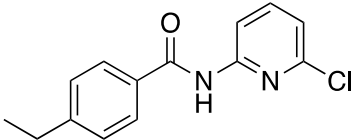
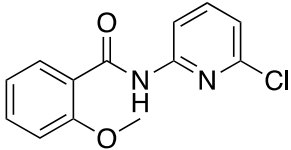
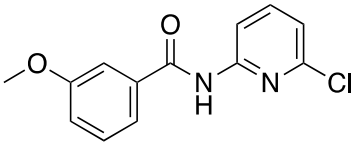
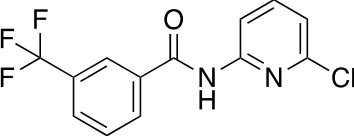
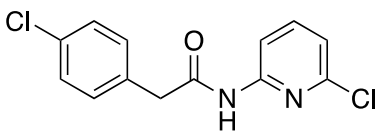
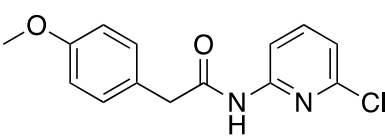
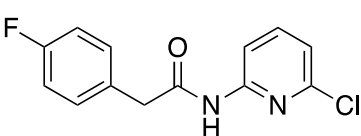
PC-L-Glu-diEt		diethyl (pyrazin-2-karbonyl)-L-glutamat
PC-D-Ile-Me		methyl (pyrazin-2-karbonyl)-D-isoleucinát
PC-L-Ile-Me		methyl (pyrazin-2-karbonyl)-L-isoleucinát
PC-L-Met-Me		methyl (pyrazin-2-karbonyl)-L-methioninát
PC-D-Thr-Me		methyl (pyrazin-2-karbonyl)-D-threoninát
PC-L-Thr-Me		methyl (pyrazin-2-karbonyl)-L-threoninát
PC-D-OtBu-Thr-Me		methyl <i>O</i> -(tert-butyl)- <i>N</i> -(pyrazin-2-karbonyl)-D-threoninát

PC-L-Trp-Et		ethyl (pyrazin-2-karbonyl)-L-tryptofanát
PC-D-Tyr-Me		methyl (pyrazin-2-karbonyl)-D-tyrosinát
PC-L-Tyr-Et		ethyl (pyrazin-2-karbonyl)-L-tyrosinát
PC-Obu-Ser-Me		<i>O</i> -benzyl- <i>N</i> -(pyrazin-2-karbonyl)-L-serin
PC-Obz-L-Ser		methyl <i>O</i> -benzyl- <i>N</i> -(pyrazin-2-karbonyl)-L-serinát

**Tabulka 12 9. skupina testovaných látek –
N-(5-chlorpyridin-2-yl) deriváty acetamidů a benzamidů**

Kód látky	Vzorec	Název
D.A1		N-(5-chloropyridin-2-yl)-3-(trifluormethyl)benzamid
D.AC		N-(5-chloropyridin-2-yl)-4-(dimethylamino)benzamid
D.AE		N-(5-chloropyridin-2-yl)-2-(3-methoxyfenyl)acetamid
D.B1		N-(5-chloropyridin-2-yl)-2-methoxybenzamid
D.Q1		N-(5-chloropyridin-2-yl)-3-methoxybenzamid
D.R		4-(<i>tert</i> -butyl)-N-(5-chloropyridin-2-yl)benzamid
D.S1		N-(5-chloropyridin-2-yl)-2-(4-methoxyfenyl)acetamid
D.T		N-(5-chloropyridin-2-yl)-2-(4-fluorofenyl)acetamid
D.X		N-(5-chloropyridin-2-yl)-2-(4-chlorofenyl)acetamid

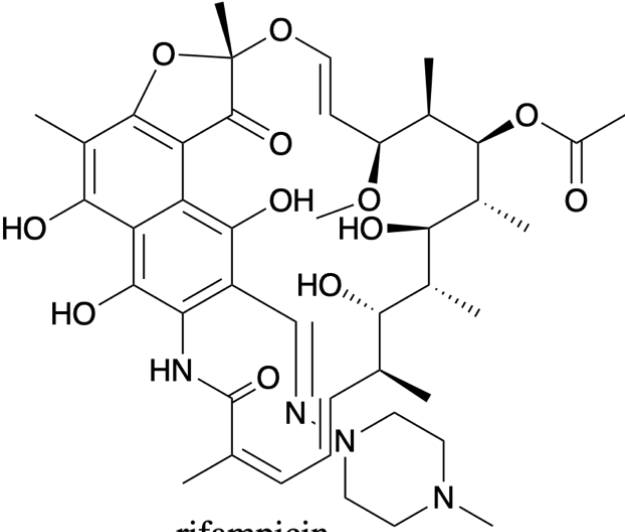
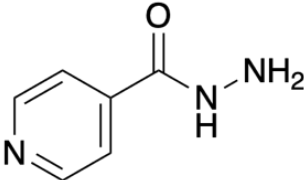
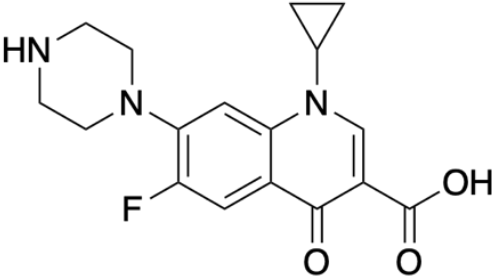
**Tabulka 13 10. skupina testovaných látek –
N-(6-chlorpyridin-2-yl) deriváty acetamidů a benzamidů**

Kód látky	Vzorec	Název
D.AA		N-(6-chloropyridin-2-yl)-2-fenylacetamid
D.AB		4-(<i>tert</i> -butyl)-N-(6-chloropyridin-2-yl)benzamid
D.C1		N-(6-chloropyridin-2-yl)-4-ethylbenzamid
D.E1		N-(6-chloropyridin-2-yl)-2-methoxybenzamid
D.G1		N-(6-chloropyridin-2-yl)-3-methoxybenzamid
D.H1		N-(6-chloropyridin-2-yl)-3-(trifluormethyl)benzamid
D.W		N-(6-chloropyridin-2-yl)-2-(4-chlorfenyl)acetamid
D.Y		N-(6-chloropyridin-2-yl)-2-(4-methoxyfenyl)acetamid
D.Z		N-(6-chloropyridin-2-yl)-2-(4-fluorfenyl)acetamid

4.4 Standardy antituberkulotik

Pro testování byly využity standardy: rifampicin, isoniazid a ciprofloxacin.

Tabulka 14 Přehled standardů

Standard	Vzorec
RFM	 <p>The chemical structure of rifampicin is a complex polycyclic molecule. It features a central naphthalene-like ring system with two hydroxyl groups at the 2 and 3 positions. This is fused to a dihydroquinoline ring, which is further fused to a piperazine ring. A side chain containing a piperazine ring and a methyl group is attached to the dihydroquinoline ring. Another side chain, containing a piperazine ring and a methyl group, is attached to the naphthalene ring. The name "rifampicin" is written below the structure.</p> <p>rifampicin</p>
INH	 <p>The chemical structure of isoniazid consists of a pyridine ring with a hydrazide group (-CONHNH₂) attached at the 4-position. The name "isoniazid" is written below the structure.</p> <p>isoniazid</p>
CIP	 <p>The chemical structure of ciprofloxacin is a quinolone derivative. It features a central quinolone ring system with a fluorine atom at the 6-position and a cyclopropyl group at the 8-position. A piperazine ring is attached to the 4-position, and a carboxylic acid group (-COOH) is attached to the 3-position. The name "ciprofloxacin" is written below the structure.</p> <p>ciprofloxacin</p>

4.5 Pracovní materiál

- **Technické pomůcky**
 - mikropipety (Eppendorf, Hamburk, Německo; Socorex, Ecublens, Švýcarsko)
 - multikanálové pipety (Eppendorf, Hamburk, Německo)
 - laboratorní špičky (Eppendorf, Hamburk, Německo)
 - mikrotitrační destičky (Gamedium, Jesenice, Česká republika)
 - eppendorfky (Brandt, Wertheim, Německo)
 - zkumavky (Gamedium, Jesenice, Česká republika)
 - stojánky na zkumavky a eppendorfky
 - korýtka
- **Přístrojové vybavení**
 - laminární box (ESCO, Pensylvánie, USA)
 - analytické váhy (Kern, Balingen, Německo)
 - centrifuga (Hettich Rotanta, Německo)
 - denzitometr (Biosan Ltd., Riga, Lotyšsko)
 - termostat (Binder, Tuttlingen, Německo)
 - vortex (IKA, Staufen, Německo)
- **Chemikálie**
 - bujón Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, Co., Steinheim, Německo)
 - OADC suplement (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Bombaj, Indie)
 - glycerol (Sigma-Aldrich, Co., Steinheim, Německo)
 - ciprofloxacín (Sigma-Aldrich, Co., Steinheim, Německo)
 - rifampicin (Sigma-Aldrich, Co., Steinheim, Německo)
 - isoniazid (Sigma-Aldrich, Co., Steinheim, Německo)
 - sterilní H₂O (Ardeapharma, a.s., Ševětín, Česká republika)
 - sodná sůl resazurinu (Acros Organics, Geel, Belgie)
 - dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Co., Steinheim, Německo)
 - Tween 80 (Sigma-Aldrich, Co., Steinheim, Německo)

4.6 Postup testování

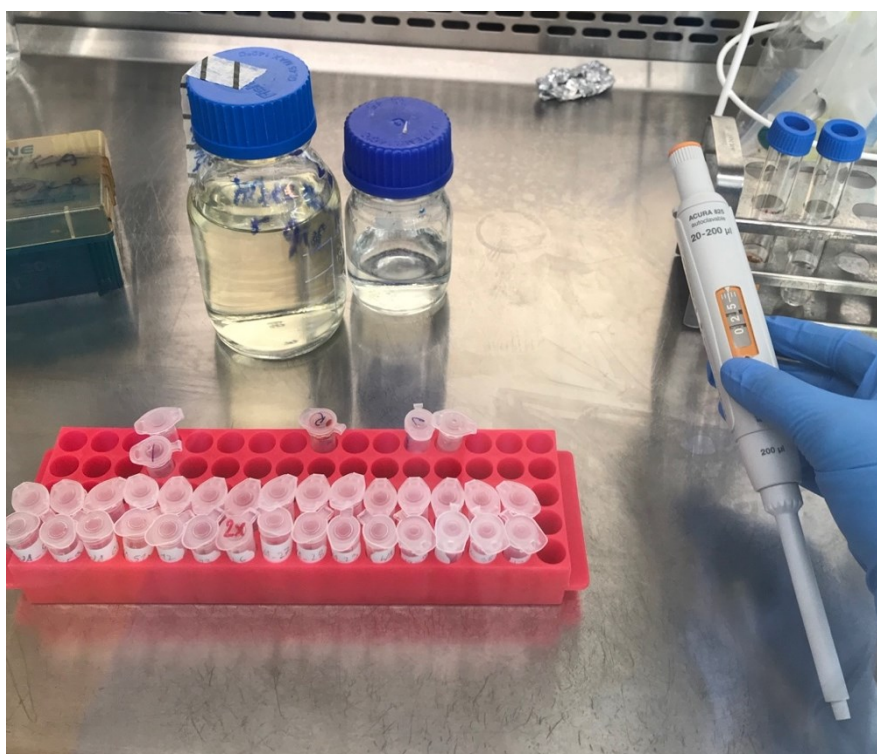
4.6.1 Příprava látek

Chemické látky s potenciální antituberkulotickou aktivitou dodané z Katedry Farmaceutické chemie a Farmaceutické analýzy s uvedenou navázkou se rozpustí ve vypočítaném množství DMSO, podle vztahu tak, abychom dosáhli koncentrace 20 mg/ml:

$$\text{hmotnost látky (mg)} \times 50 = ? \mu\text{l DMSO}$$

Takto vzniklý roztok se důkladně promíchá na vortexu do úplného rozpuštění, případně do vzniku homogenní suspenze. Jestliže jsou potíže s rozpuštěním, látku naředíme znovu stejným objemem DMSO. Výsledná koncentrace látky však bude o polovinu nižší (z 500 na 250, z 250 na 125 $\mu\text{g/ml}$). Toto ředění v případě nerozpustnosti můžeme opakovat dále. Takto připravené sloučeniny lze uchovávat v lednici po delší dobu či při pokojové teplotě cca týden (např. pro opakování u účinných látek).

Stejným způsobem se ředí i standardy pro testování, které je třeba připravovat vždy čerstvé pro každé testování. Navážka se pohybuje okolo 5 mg.



Obrázek 19 Příprava látek
(Zdroj: autor práce)

4.6.2 Příprava roztoků v bujónu

Z připravených roztoků potenciálně antimykobakteriálně účinných látek v DMSO se odebere 50 μ l a přidá se k 450 μ l bujónu. Bujón Middlebrook 7H9 se připravuje rozpuštěním práškového základu bujónu v destilované/deionizované vodě a přidáním 0,4 % glycerolu. Po sterilizaci se asepticky přidá 10 % OADC suplementu.

Pro standard isoniazid se rovněž odebere 50 μ l a doředí se 450 μ l bujónu. Pro standardy ciprofloxacin a rifampicin se aplikuje větší ředění z důvodu nižší MIC.

- RFM – 25 μ l naředěného roztoku + 2,475 ml bujónu
- CIP – 20 μ l naředěného roztoku + 980 μ l DMSO \rightarrow 25 μ l naředěného roztoku + 2,475 ml bujónu.

Takto naředěné roztoky se musí důkladně promíchat na vortexu. Ciprofloxacin se v dané koncentraci v DMSO nerozpouští, a proto se používá ve formě homogenní suspenze.

4.6.3 Příprava destičky

Příprava destičky začíná napipetováním 250 μ l sterilní vody do obvodových jamek, aby nedocházelo během inkubace k vysychání. Do sloupců 2-9 a 11 se napipetuje 100 μ l bujónu Middlebrook 7H9 a do sloupce 10, který slouží jako negativní kontrola, se napipetuje 200 μ l téhož bujónu.

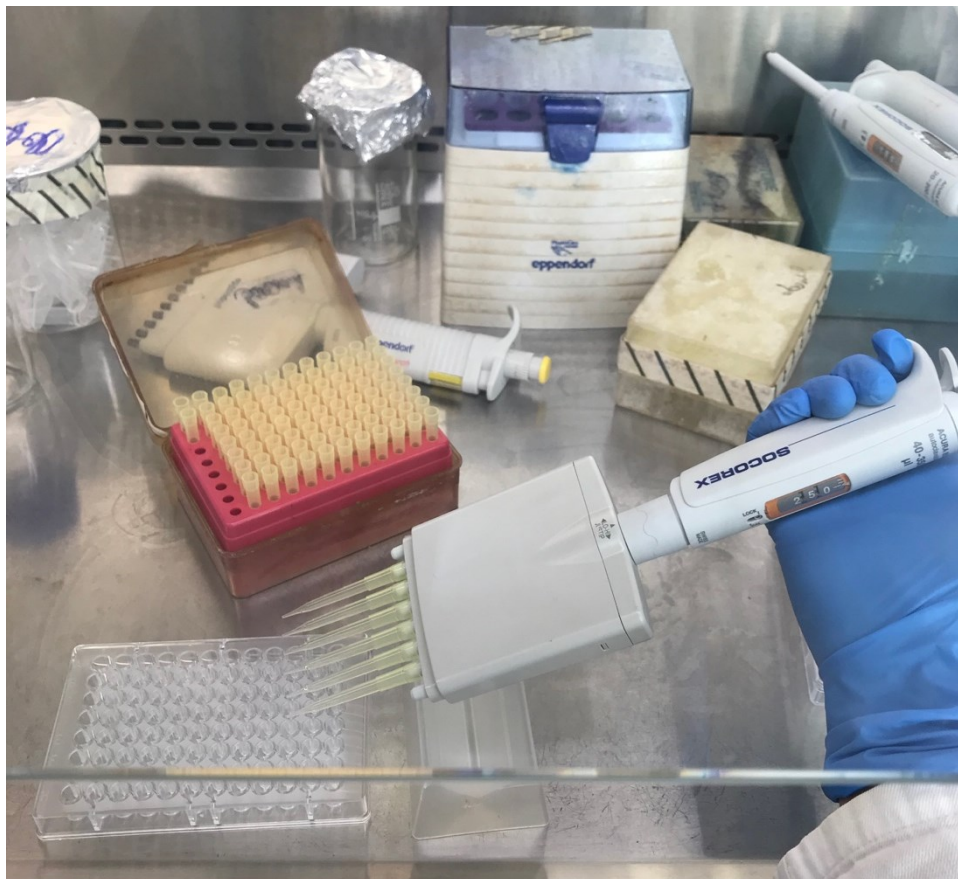
Destičku je nutno řádně popsat typem testovaných látek, označit pozitivní a negativní kontrolu a vpravo do dolního rohu napsat kmen, který jsme použili na danou destičku. V případě testování většího počtu sloučenin ve vícero dnech je nutné doplnit i datum testování.

4.6.4 Pipetování látek

Testované sloučeniny a standardy rozpuštěné v DMSO, následně zředěné bujónem, jsou v duplikátu napipetovány v objemu 100 μ l do druhého sloupce na destičce. Na jedné destičce jsou tedy testovány tři látky.

Následně je využito dvojkového ředění: napipetované látky jsou důkladně promíchány s bujónem již připraveným v destičce. Poté je odebráno 100 μ l, které se

přenesou do dalšího sloupce. Stejným způsobem se pokračuje až do sloupce 9. Z tohoto sloupce se po promíchání 100 μ l odebere do odpadu.



Obrázek 20 Příprava mikrotitrační destičky
(Zdroj: autor práce)

4.6.5 Příprava suspenze

Suspenze je vytvořena inokulací příslušného mykobakteriálního kmene vykultivovaného na agaru Middlebrook 7H9 do bujónu a inkubací při $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 4 dnů. Takto vzniklá suspenze je dále zcentrifugována. Bujón se slije a suspenze se resuspenduje v cca 4 ml čerstvého bujónu.

Dále je změřena optická denzita na denzitometru. Požadována je hodnota 1,0 dle McFarlanda (0,6 bujónu a 1,0 suspenze \rightarrow 1,6 výsledná hodnota). V případě nutnosti se suspenze dále ředí pomocí bujónu.

Pracovní suspenze se připraví naředěním předchozí suspenze bujónem v poměru 1:20. Pro testování se připravuje 42 ml mykobakteriální suspenze.

Do každého sloupce mikrotitrační destičky obsahujícího bujón se napipetuje 100 μl suspenze kromě sloupce číslo 10, kde je negativní kontrola. Po přidání suspenze s mykobakteriemi dojde k vytvoření finálních koncentrací testovaných sloučenin, a to 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81 a 3,91 $\mu\text{g/ml}$.

Tabulka 15 Schéma mikrotitrační destičky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
B	H ₂ O	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK	PK	H ₂ O
C	H ₂ O	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK	PK	H ₂ O
D	H ₂ O	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK	PK	H ₂ O
E	H ₂ O	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK	PK	H ₂ O
F	H ₂ O	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK	PK	H ₂ O
G	H ₂ O	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	NK	PK	H ₂ O
H	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

H₂O – sterilní voda, NK – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola, jamky 2-9: testované látky ve finálních koncentracích od 500 $\mu\text{g/ml}$ do 3,91 $\mu\text{g/ml}$.

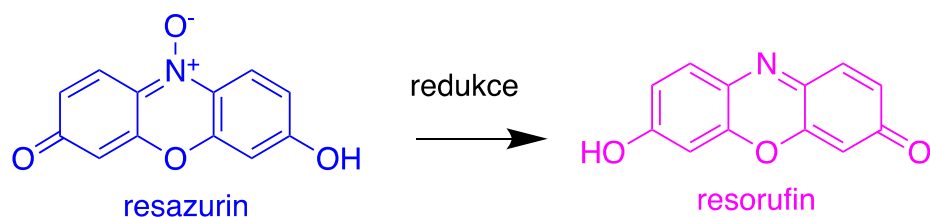
4.6.6 Inkubace

Mikrotitrační destičky se důkladně zalepí průhlednou fólií.

Vloží se do termostatu, kde se ve tmě inkubují při 36 °C \pm 1 °C. Doba kultivace byla určena nárůstem mykobakterií v kontrolní jamce. Inkubace destiček s *M. smegmatis* trvá 2 dny a s *M. aurum* 3 dny.

4.6.7 Vyhodnocení

Vyhodnocení testování probíhá po uplynutí inkubační doby. Jednou z možností je vizuální odečet, kdy se odečítá poslední jamka bez zákalu, resp. první jamka se zákalem (hodnota MIC se vyskytuje někde v tomto rozmezí). Další možností hodnocení je využití indikátoru Alamar blue (sodná sůl resazurinu). Alamar blue je netoxické, redukční barvivo, které indikuje životaschopnost buněk. Využívá přirozenou redukční schopnost živých buněk měnit resazurin (modré nefluorescenční barvivo) na resorufin (růžové, fluorescenční barvivo). (thermofisher.com)



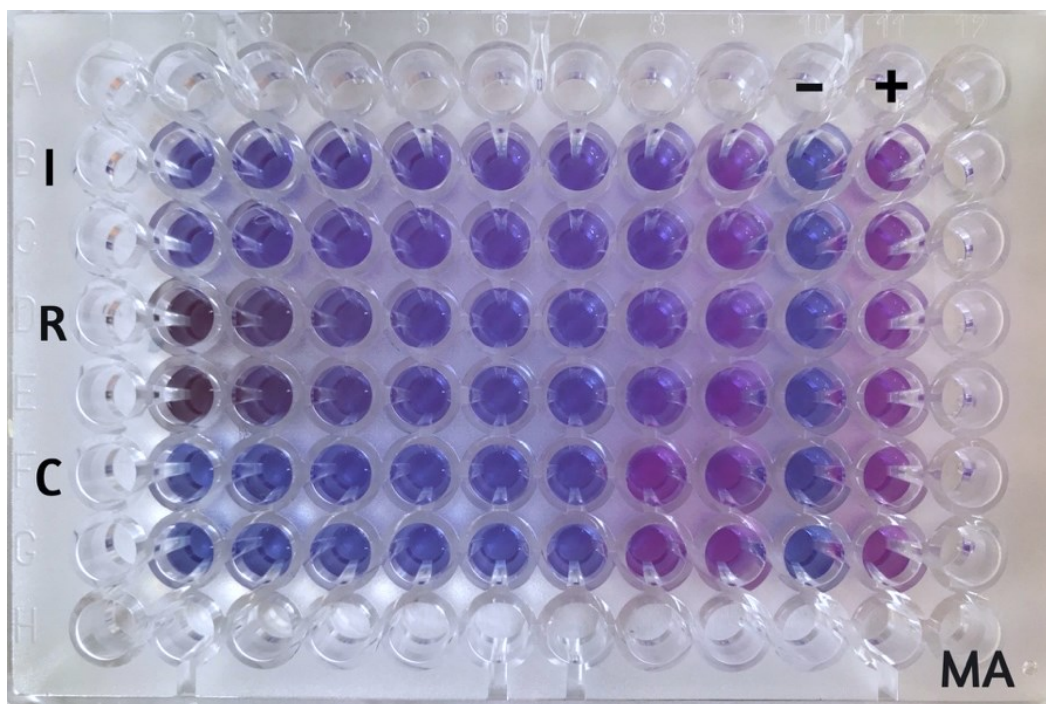
Obrázek 21 přeměna resazurinu na resorufin

- *M. smegmatis*

Po 2 dnech inkubace se destičky zakapou indikátorem Alamar blue (jedná se o 0,1% vodný roztok resazurinu s přidavkem 5 % Tweenu 80). Alamar blue se přidá v objemu 20 µl do každé jamky kromě jamek s vodou. Po 2,5 hodinách se odečítá MIC vizuálně a spektrofotometricky. Vizuálně i spektrofotometricky je jako hodnota MIC považována první jamka, kde dojde ke změně modrého zbarvení na růžovofialové.

- *M. aurum*

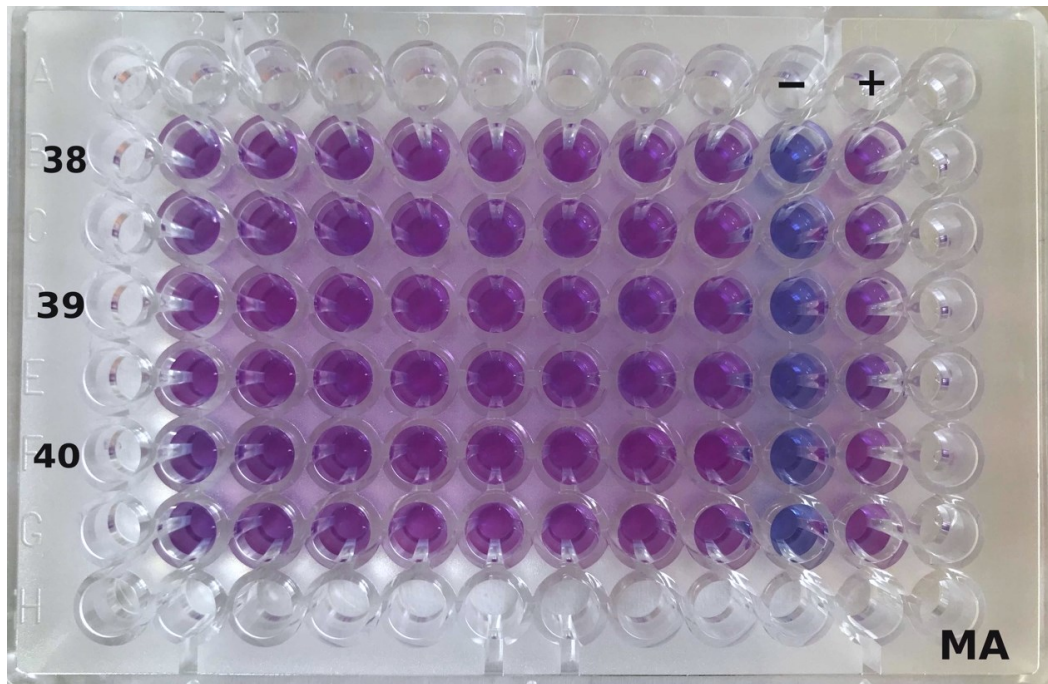
Po 3 dnech inkubace se destičky zakapou 20 µl Alamar blue. Po 3-4 hodinách se odečítá MIC vizuálně a spektrofotometricky. Vizuálně i spektrofotometricky je jako hodnota MIC považována první jamka, kde dojde ke změně modrého zbarvení na růžovofialové.



Obrázek 22 Ukázka antimykobakteriálního testování pro standardy

Výsledky testování standardů – INH, RFM, CIP.

Mikrotitrační destička inkubovaná s *M. aurum*. Využití indikátoru Alamar Blue.
(Zdroj: autor práce)



Obrázek 23 Ukázka antimykobakteriálního testování pro látky
Výsledky testování látek WA_38, WA_39, WA_40.
Mikrotitrační destička inkubovaná s *M. aurum*. Využití indikátoru Alamar Blue.
(Zdroj: autor práce)

5. VÝSLEDKY

Bylo otestováno 79 látek. Výsledky testování jsou shrnuty v tabulkách č. **16-25**. V tabulce č. **26** je uvedeno testování standardů, které probíhalo vždy současně s každou sérií látek.

Látky byly ředěny dvojkovým ředěním. Jejich výsledná koncentrace v mikrotitrační destičce byla standardně od 500 µg/ml do 3,91 µg/ml. U některých látek byl problém s rozpustností, tudíž se látky musely dále ředit v DMSO a výsledné koncentrace se změnily. Případná nutnost ředění je uvedena v tabulkách v poznámce.

Hodnota MIC označená „≥“ znamená, že daná látka neprokazuje žádný antimykobakteriální účinek ani ve své nejvyšší koncentraci.

**Tabulka 16 Výsledky 1. skupiny testovaných látek -
5-alkylamino-N-(3-trifluormethyl)fenylpyrazin-2-karboxamidy**

Označení	WA_14	WA_15	WA_16	WA_17	WA_18	WA_19
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	≥ 500	1,56	≥ 500	≥ 500	3,125	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	< 3,91	3,125	62,5	≥ 500	6,25	≥ 500
poznámka		od 50 µg/ml			od 50 µg/ml	

V tabulce č. **16** jsou uvedeny výsledky **1. skupiny** testovaných látek: 5-alkylamino-N-(3-trifluormethyl)fenylpyrazin-2-karboxamidy. Látky s označením WA_17 a WA_19 neprokázaly antimykobakteriální účinnost. Látka WA_14 byla neúčinná v testování s *M. smegmatis*, ale u *M. aurum* látka vykazovala účinnost v koncentraci menší než 3,91 µg/ml, bylo by tedy vhodné použít nižší ředění a testování zopakovat. Látky WA_15 a WA_18 byly více naředěné a začínalo se s nejvyšší koncentrací 50 µg/ml, jelikož se jednalo už o druhé testování s těmito látkami (v prvním testování vyšla MIC mimo rámeček ředící řady <3,91 µg/ml). Látka WA_15 prokazovala účinnost u obou kmenů a WA_18 také. U látky WA_16 byla prokázána účinnost při MIC 62,5 µg/ml u *M. aurum*. U *M. smegmatis* byla látka WA_16 neúčinná.

**Tabulka 17 Výsledky 2. skupiny testovaných látek -
5-alkylamino-N-(3-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy**

Označení	WA_20	WA_21	WA_22	WA_23	WA_24	WA_25
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	≥ 500	250	≥ 500	250	≥ 500	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500

V tabulce č. 17 je uvedena 2. skupina testovaných látek: 5-alkylamino-*N*-(3-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy. Látky s označením WA_20, WA_22, WA_24 a WA_25 neprokázaly antimykobakteriální účinnost u obou kmenů. Látky WA_21 a WA_23 prokázaly slabou účinnost u *M. smegmatis*, při hodnotě MIC 250 µg/ml.

Tabulka 18 Výsledky 3. skupiny testovaných látek - 5-alkylamino-*N*-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy

Označení	WA_31	WA_32	WA_33	WA_34	WA_35	WA_36
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	≥ 250	31,25	250	31,25	≥ 500	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 250	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500
poznámka	2x řed.					

V tabulce č. 18 jsou uvedeny výsledky 3. skupiny testovaných látek: 5-alkylamino-*N*-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy. Jako antimykobakteriálně účinné se jeví látky WA_32 a WA_34 u kmene *M. smegmatis* s hodnotou MIC 31,25 µg/ml, u *M. aurum* neprokazují účinnost. Látka WA_33 je slabě účinná v testování vůči *M. smegmatis* s MIC 250 µg/ml, u *M. aurum* vykazuje neúčinnost. Žádný účinek neprokázaly látky WA_31, WA_35, WA_36. Sloučenina WA_31 byla z důvodu horší rozpustnosti naředěna 2x.

Tabulka 19 Výsledky 4. skupiny testovaných látek - 5-alkylamino-*N*-(*p*-tolyl)pyrazin-2-karboxamidy

Označení	WA_37	WA_38	WA_39	WA_40	WA_41	WA_42
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	≥ 250	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 250	31,25
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 250	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 250	≥ 500
poznámka	2x řed.				2x řed.	

V tabulce č. 19 je uvedena 4. skupina testovaných látek: 5-alkylamino-*N*-(*p*-tolyl)pyrazin-2-karboxamidy. Látka WA_42 je účinná při MIC 31,25 µg/ml v testování s *M. smegmatis*, s *M. aurum* nejeví účinnost. Látky s označením WA_37, WA_38, WA_39, WA_40, WA_41 neprokázaly antimykobakteriální účinnost u obou kmenů.

Tabulka 20 Výsledky 5. skupiny testovaných látek - 5-alkylamino-*N*-(4-ethylfenyl)pyrazin-2-karboxamidy

Označení	WA_43	WA_44	WA_45	WA_46	WA_47	WA_48
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	250	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	7,81
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500

V tabulce č. 20 je uvedena **5. skupina** testovaných látek: 5-alkylamino-*N*-(4-ethylfenyl)pyrazin-2-karboxamidy. Látka WA_43 prokazuje slabou účinnost u *M. smegmatis*. Látka WA_48 prokazuje účinnost při MIC 7,81 µg/ml u kmene *M. smegmatis*, u *M. aurum* je tato látka neúčinná. Látky s označením WA_44, WA_45, WA_46, WA_47 neprokázaly antimykobakteriální účinnost u obou kmenů.

Tabulka 21 Výsledky 6. skupiny testovaných látek - 5-alkylamino-*N*-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy

Označení	WA_49	WA_50	WA_51	WA_52	WA_53	WA_54
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	7,81	≥ 500	< 3,91	< 3,91	< 3,91	< 3,91
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	31,25	≥ 500	≥ 500	500

V tabulce č. 21 je uvedena **6. skupina** testovaných látek: 5-alkylamino-*N*-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy. Látka WA_49 prokazuje účinek u *M. smegmatis* při MIC 7,81 µg/ml, u *M. aurum* neprokazuje žádný účinek. Látka WA_51 se je účinná při testování obou kmenů. U látek WA_51, WA_52, WA_53, WA_54 je zaznamenána účinnost při MIC menší než 3,91 µg/ml v testování s *M. smegmatis*, bylo by třeba měření zopakovat s více naředěnými látkami. S *M. aurum* jsou látky WA_52, WA_53, WA_54 neúčinné.

Tabulka 22 Výsledky 7. skupiny testovaných látek - 5-alkylamino-*N*-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy

Označení	WA_55	WA_56	WA_57	WA_58	WA_59	WA_60
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	250	31,25	≥ 500	≥ 500	3,91	< 3,91
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500

V tabulce č. 22 jsou uvedeny výsledky **7. skupiny** testovaných látek: 5-alkylamino-*N*-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy. Látky WA_55, WA_56 a WA_59 vykazují účinnost při testování vůči *M. smegmatis* při hodnotách MIC 250 µg/ml, 31,25 µg/ml a 3,91 µg/ml, vůči *M. aurum* jsou neúčinné. Látka WA_60 je účinná s MIC menší než 3,91 µg/ml v testování s *M. smegmatis*, bylo by třeba měření opakovat s více naředěnou látkou. Antimykobakteriální účinek nebyl zaznamenán u látek s označením WA_57, WA_58.

Tabulka 23 Výsledky 8. skupiny testovaných látek - aminokyselinami N-substituované pyrazin-2-karboxamidy

Označení	PC-DCS	PC-DL-Ala-Me	PC-D-Ala-Et	PC-L-Ala-Et	PC-D-Asp-diMe	PC-L-SBz-Cys
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 125	≥ 250
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 125	≥ 250
poznámka					4x řed.	2x řed.
Označení	PC-D-Glu-diMe	PC-L-Glu-diEt	PC-D-Ile-Me	PC-L-Ile-Me	PC-L-Met-Me	PC-D-Thr-Me
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500
Označení	PC-L-Thr-Me	PC-D-OtBu-Thr-Me	PC-L-Trp-Et	PC-D-Tyr-Me	PC-L-Tyr-Et	PC-Obu-Ser-Me
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	250	≥ 500	≥ 500	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	125	≥ 500	≥ 500	≥ 500
Označení	PC-Obz-L-Ser					
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	≥ 500					
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500					

V tabulce č. 23 je uvedena **8. skupina** testovaných látek: aminokyselinami N-substituované pyrazin-2-karboxamidy. V této skupině prokazuje antimykobakteriální účinek pouze látka PC-L-Trp-Et při hodnotách MIC 250 µg/ml u *M. smegmatis* a MIC 125 µg/ml u *M. aurum*. Nicméně tento účinek je ve srovnání se standardy příliš slabý.

Ostatní látky z této skupiny nevykazují účinek. Sloučenina PC-D-Asp-diMe byla velmi špatně rozpustná a bylo třeba ji naředit čtyřnásobně. Podobně i sloučeninu PC-L-SBz-Cys bylo třeba naředit dvojnásobně.

**Tabulka 24 Výsledky 9. skupiny testovaných látek -
N-(5-chlorpyridin-2-yl) deriváty acetamidů a benzamidů**

Označení	D.A1	D.AC	D.AE	D.B1	D.Q1	D.R
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 500	15,625	15,625	≥ 500
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	31,25	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500
Označení	D.S1	D.T	D.X			
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 500			
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	≥ 500	≥ 500	≥ 500			

V tabulce č. 24 je uvedena **9. skupina** testovaných látek: N-(5-chlorpyridin-2-yl) deriváty acetamidů a benzamidů. Látka D.A1 prokazuje účinek u *M. aurum* při hodnotě MIC 31,25 µg/ml. Látky D.B1 a D.Q1 prokazují účinek u *M. smegmatis* s MIC 15,625 µg/ml. Látky D.AC, D.AE, D.R, D.S1, D.T, D.X nejsou antimykobakteriálně aktivní u obou kmenů.

**Tabulka 25 Výsledky 10. skupiny testovaných látek -
N-(6-chlorpyridin-2-yl) deriváty acetamidů a benzamidů**

Označení	D.AA	D.AB	D.C1	D.E1	D.G1	D.H1
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	31,25	3,125	125	62,5	62,5	15,625
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	62,5	≥ 50	125	62,5	62,5	31,25
poznámka		Od 50 µg/ml				
Označení	D.W	D.Y	D.Z			
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	15,625	≥ 500	≥ 500			
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	31,25	≥ 500	250			

V tabulce č. 25 je uvedena **10. skupina** testovaných látek: N-(6-chlorpyridin-2-yl) deriváty benzamidů a acetamidů. Nejúčinnější látky z 11. skupiny jsou D.H1 a D.W. Vykazují antimykobakteriální aktivitu u obou kmenů, která je srovnatelná se standardy. Účinek byl zaznamenán také u látek D.AA, D.C1, D.E1, D.G1. Látka D.AB má antimykobakteriální účinek v testování s *M. smegmatis*, u *M. aurum* je neúčinná. Látka D.Z prokazuje slabou účinnost pouze u *M. aurum*. Látka D.Y je neúčinná.

Tabulka 26 Výsledky testování standardů

Testování	1.	2.	3.	4.	5.
Označení	INH	INH	INH	INH	INH
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	7,81	15,625	15,625	7,81	7,81
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	3,91	3,91	3,91	3,91	7,81
Označení	RFM	RFM	RFM	RFM	RFM
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	12,5	12,5	6,25	6,25	6,25
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	0,39	0,78	0,78	0,78	0,78
Označení	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP
MIC <i>M. smegm.</i> (µg/ml)	0,0625	0,125	0,125	0,0625	0,0625
MIC <i>M. aurum</i> (µg/ml)	0,03125	0,03125	0,03125	0,0625	0,0625

V tabulce č. 26 je uvedeno testování standardů: INH, RFM a CIP. Standardy slouží ke kontrole správnosti testování. Zároveň slouží i k porovnání účinnosti námi testovaných sloučenin a těchto standardů.

Finální koncentrace standardů při testování byla pro INH v rozmezí od 500 do 3,91 µg/ml, RFM byl nařazen v koncentracích 50 až 0,39 µg/ml a CIP od 1 do 0,0078 µg/ml.

Testování standardů probíhalo vždy současně s testováním potenciálně antimykobakteriálně účinných látek. V tabulce pozorujeme výsledné hodnoty standardů, které se liší maximálně o 1 jamku, což je v rámci tolerance a ukazuje to na stabilitu systému.

6. DISKUSE

Tuberkulóza je infekční onemocnění způsobené mykobakteriemi ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex. Každoročně na celém světě onemocní TBC okolo 10 miliónů lidí a přes 1 milion jich zemře. TBC se proto řadí dle WHO mezi 10 hlavních příčin úmrtí.

Největším problémem léčby TBC je narůstající vznik rezistence na současně užívaná antituberkulotika. Každoročně se na světě vyskytne přes 500 tisíc nových případů MDR-TB (rezistence na isoniazid a rifampicin). Se vznikem rezistence jsou spojeny především genové mutace *M. tuberculosis*. Léčba rezistentních forem TBC je zdlouhavá, finančně náročná a není dostupná ve všech oblastech světa. Proto v současné době dochází k usilovnému vývoji nových antituberkulotik.

Objev nového antituberkulotika začíná screeningem antimykobakteriální aktivity u neznámých látek na celých mykobakteriích. Tento screening se provádí *in vitro* za předem definovaných podmínek. Proces vývoje nového léčiva až po jeho registraci trvá v průměru 12-15 let. V současné době se 23 nových léčiv proti TBC nachází v různých fázích klinických studií.

V rámci experimentální části mé diplomové práce bylo pomocí mikrodiluční bujónové metody otestováno celkem 79 látek s potenciálním antimykobakteriálním účinkem.

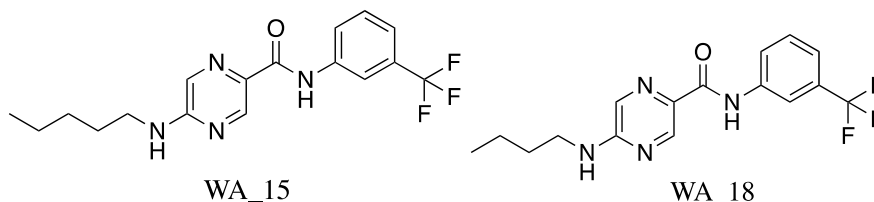
Chemické sloučeniny byly do laboratoře dodány v pevné, krystalické podobě z Katedry Farmaceutické chemie a Farmaceutické analýzy na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové. Z chemického hlediska se jednalo o deriváty pyrazinu a deriváty pyridinu. Pro lepší orientaci byly testované látky rozděleny dle podobnosti chemické struktury do 10 skupin.

K testování byly použity dva kmeny rychle rostoucích mykobakterií: *M. smegmatis* a *M. aurum*. Jedná se o alternativní modelové organismy, které jsou oproti *M. tuberculosis* obecně nepatogenní a mají kratší generační dobu.

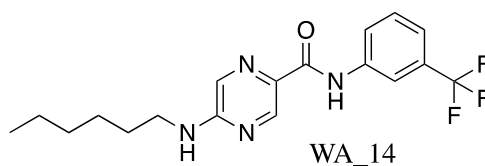
Při testování celkově 22 látek z 79 prokázalo významnou antimykobakteriální aktivitu. Za významnou účinnost byla považována hodnota MIC 31,25 µg/ml a níže. Žádný účinek neprokázalo 47 látek. Ostatní sloučeniny měly antimykobakteriální účinek mnohem slabší ve srovnání se standardy.

Dílčím cílem mé diplomové práce byl pokus o predikci vztahů mezi strukturou a aktivitou (SAR) testovaných látek a antimykobakteriální aktivitou. O SAR se pokouším v následujících odstavcích.

Do **1. skupiny** testovaných látek patří 5-alkylamino-*N*-(3-trifluormethyl)fenylpyrazin-2-karboxamidy. Tyto látky spojuje substituent trifluormethyl v poloze 3- na benzenovém jádře a navzájem se odlišují délkou postranního alkylového řetězce v poloze 5- na pyrazinovém kruhu (propyl- až oktyl-). Mezi účinné látky v testování s oběma kmeny patří látka WA_15 (5-(pentylamino)-*N*-(3-(trifluormethyl)fenyl)pyrazin-2-karboxamid) s MIC 1,56 µg/ml u *M. smegmatis* a 3,125 µg/ml u *M. aurum* a WA_18 (5-(butylamino)-*N*-(3-(trifluormethyl)fenyl)pyrazin-2-karboxamid) s MIC 3,125 µg/ml u *M. smegmatis* a 6,25 µg/ml u *M. aurum*.



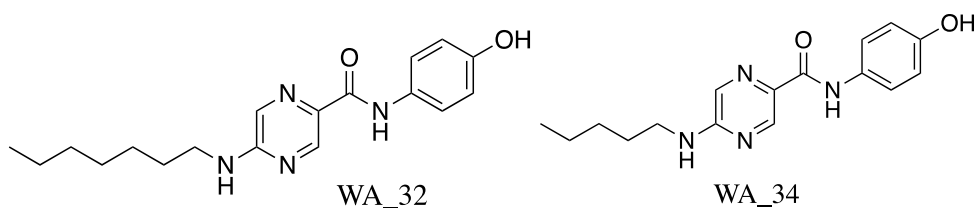
Antimykobakteriální aktivitu v testování vůči *M. aurum* prokázala i látka WA_14 (5-(hexylamino)-*N*-(3-(trifluormethyl)fenyl)pyrazin-2-karboxamid). Tento účinek nejspíš souvisí se zvýšením lipofility díky hexylovému řetězci. MIC však bylo menší než <3,91 µg/ml. Mělo by se přejít k dalšímu testování s více naředěnou látkou, abychom znali přesnou hodnotu MIC.



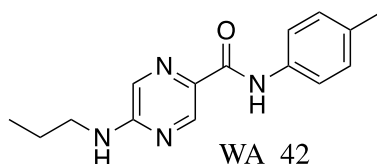
Obecně se trifluormethylová skupina považuje za substituent, který zvyšuje aktivitu sloučenin. S tím se také ale často zvyšuje toxicita, i když to nemusí být vždy 100%. (Krátký *et al.*, 2013). V této skupině se projevil i vliv délky postranního alkylového řetězce. Aktivita rostla se vzrůstajícím počtem uhlíků a pravděpodobně eskalovala s hexylovým řetězcem. Poté už aktivita zaznamenána nebyla. Toto chování je obecně známé a souvisí s lipofilitou, rozpustností a prostupem přes membrány, případně to může souviset i s aktivním místem, kde by tyto látky mohly působit. Pokud by se jednalo např. o uzavřené aktivní místo enzymu, tak dlouhé řetězce mohou být naopak překážkou. Tyto úvahy by se však mohly potvrdit až v případě známého mechanismu účinku.

Do **2. skupiny** testovaných látek patří 5-alkylamino-*N*-(3-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy. Látky mají v poloze 3- na benzenovém jádře navázanou -OH skupinu a různě dlouhý aminoalkylový řetězec (propylamino- až oktylamino-) v poloze 5- na pyrazinovém kruhu. Látky prokazují velmi malou nebo žádnou antimykobakteriální aktivitu. Z toho může vyplývat, že hydroxy skupina v poloze 3- není vhodnou substitucí.

Do **3. skupiny** testovaných látek patří 5-alkylamino-*N*-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy. Oproti 2. skupině zde došlo ke změně navázání -OH skupiny z polohy 3- do polohy 4- na benzenovém jádře. Rovněž tyto látky mají různě dlouhý aminoalkylový řetězec (propylamino- až oktylamino-) v poloze 5- na pyrazinovém kruhu. Látky jsou antimykobakteriálně účinnější než 2. skupina. Za účinné se dají považovat sloučeniny WA_32 (5-(heptylamino)-*N*-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid) a WA_34 (*N*-(4-hydroxyfenyl)-5-(pentylamino)pyrazin-2-karboxamid) s MIC 31,25 µg/ml v testování s *M. smegmatis*. V testování s *M. aurum* žádná látka z této skupiny nebyla antimykobakteriálně aktivní. Lze tedy usoudit, že změna polohy hydroxylové skupiny (a potažmo elektronových vlastností) zvýšila antimykobakteriální účinek. Délka alkylového řetězce se jeví jako méně důležitá, výhodný může být lichý počet uhlíků.

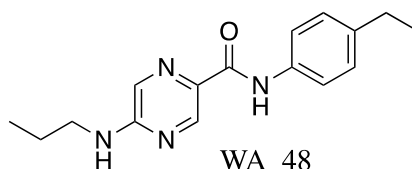


Do **4. skupiny** testovaných látek patří 5-alkylamino-*N*-(*p*-tolyl)pyrazin-2-karboxamidy. Látky obsahují methylovou skupinu v poloze 4- na benzenovém jádře a různou délku aminoalkylového řetězce (-propylamino až -oktylamino) v poloze 5- na pyrazinovém kruhu. Jako antimykobakteriálně účinná při MIC 31,25 µg/ml se jeví látka WA_42 (5-(propylamino)-*N*-(*p*-tolyl)pyrazin-2-karboxamid) v testování s *M. smegmatis*. Ostatní látky jsou neúčinné.

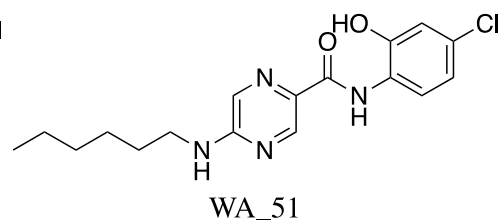
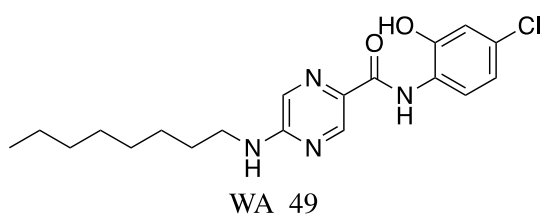


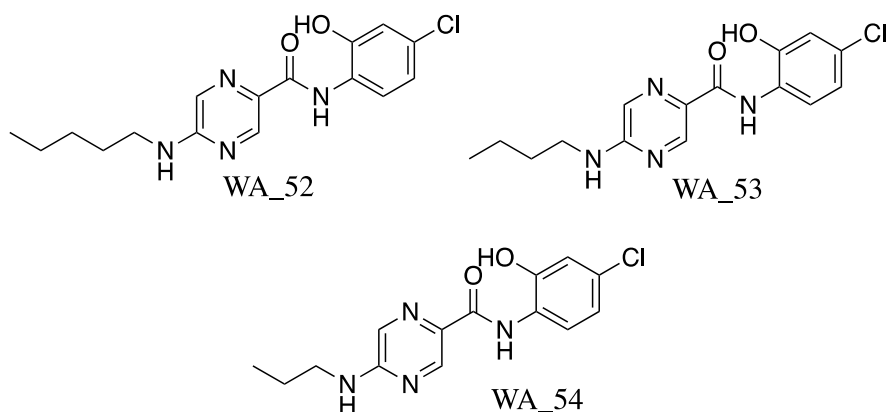
Do **5. skupiny** se řadí testované látky 5-alkylamino-*N*-(4-ethylfenyl)pyrazin-2-karboxamidy. Navázání ethylu v poloze 4- na benzenovém jádře se zdá být úspěšné v kombinaci s 5-propylamino řetězcem na pyrazinové kruhu. Látka WA_48 jako jediná

z této skupiny prokázala antimykobakteriální účinek v testování s *M. smegmatis* (MIC = 7,81 µg/ml). Při srovnání této a předchozí skupiny látek se zdá výhodné umístění druhého alkylového řetězce v poloze 4- benzenového jádra. Prodloužení o 1 uhlík vedlo ke zvýšení aktivity 4x. Může to být opět dáno vyšší lipofilitou či lepším možným umístěním do aktivního místa případného enzymu.

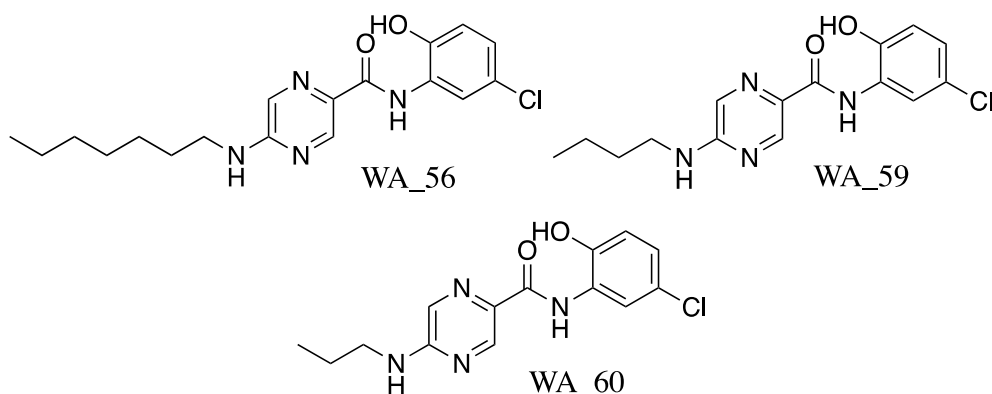


Do **6. skupiny** testovaných látek patří 5-alkylamino-*N*-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy. Látky mají ve 4- poloze navázán chlor a v 2- poloze -OH skupinu na benzenovém jádře a různě dlouhý aminoalkylový řetězec v poloze 5- na pyrazinovém kruhu. Použití těchto substituentů benzenového jádra se dle našich výsledků jeví jako úspěšné. Antimykobakteriální aktivitu prokázalo 5 látek z 6, ale pouze u kmene *M. smegmatis*. U *M. aurum* účinnost prokázala jen látka WA_51 s hexylaminovým řetězcem. Účinné v testování s *M. smegmatis* byly látky s oktylamino-, hexylamino-, pentylamino-, butylamino-, propylamino- řetězcem. U látek s hexylamino-, pentylamino-, butylamino-, propylamino- řetězcem byla MIC nižší než 3,91 µg/ml, tudíž by se mělo přejít k novému testování s více naředěnou látkou, abychom znali přesnou hodnotu MIC. Jediný *N*-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-(heptylamino)pyrazin-2-karboxamid nejevil antimykobakteriální aktivitu. Z výše uvedeného vyplývá, že substituce 2-OH, 4-Cl je velice výhodná. Atom chloru zvyšuje lipofilitu, hydroxy skupina umístěná v ortho poloze má možnost tvořit vodíkové vazby se sousedící amidovou skupinou. I zde se očekává vliv délky alkylového řetězce, s rostoucí délkou (tím pádem i lipofilitou) roste účinek sloučenin. Pro lepší predikci by bylo vhodné určit přesné MIC jak bylo zmíněno výše. Testování by se mělo zopakovat i pro sloučeninu s heptylovým zbytkem, jelikož je nezvyklé, že by u jedné látky účinek nebyl žádný.





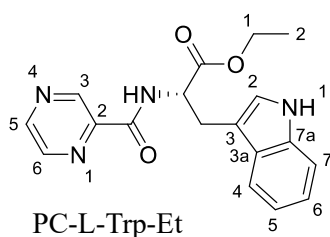
Do 7. skupiny testovaných látek patří 5-alkylamino-*N*-(5-chloro-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy. Látky obsahují také substituci chlorem, ale na rozdíl od 6. skupiny ho mají navázaný v poloze 5- na benzenovém jádře. Antimykobakteriálně aktivní byly látky s propylamino- a butylamino- řetězcem v testování s *M. smegmatis*. Sloučenina s propylaminovým řetězcem měla rovněž MIC <3,91 µg/ml, tudíž by se mělo přejít k novému testování s více naředěnou látkou, abychom znali přesnou hodnotu MIC. Účinek při MIC 31,25 µg/ml vykazovala látka s heptylamino- řetězcem. Tyto výsledky ukazují, že i zde je substituce výhodná. Změna polohy chloru však aktivitu mírně snížila, což může být spojeno se sterickými vlivy, které toto uspořádání může způsobovat.



Při shrnutí výsledků 5-alkylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů je patrné, že tyto látky byly více účinné při testování s kmenem *M. smegmatis* oproti *M. aurum*. *M. aurum* vykazovala citlivost jen při testování s látkami, které měly na svém benzenovém jádře navázaný trifluormethyl. Což je obecně substituent zvyšující aktivitu, ale je třeba brát v potaz i možnou toxicitu. Mezi skupinu s nejvýznamnější antimykobakteriální aktivitou patří sloučeniny obsahující ve své molekule chlor a -OH skupinu, ideálně v uspořádání 4-Cl, 2-OH. Při dodatečném testování by bylo možno zhodnotit také vliv délky alkylaminového řetězce.

Syntéza těchto látek byla letos publikována v odborném článku. (Ambrožkiewicz *et al.*, 2020). Látky byly v rámci této studie otestovány také s avirulentním kmenem *M. tuberculosis* (Mtb H37Ra). Antimykobakteriálně aktivní vůči *M. tuberculosis* byly látky: WA_15, WA_18, WA_19, WA_24, WA_25, WA_31, WA_32, WA_33, WA_34, WA_35, WA_36, WA_38, WA_39, WA_42, WA_48, WA_51. Z těchto výsledků vyplývá, že vůči *M. tuberculosis* byly nejvíce účinné látky ze skupiny 5-alkylamino-*N*-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidů, 5-alkylamino-*N*-(3-trifluormethyl)fenylpyrazin-2-karboxamidů, 5-alkylamino-*N*-(*p*-tolyl)pyrazin-2-karboxamidů. V testování můžeme vidět rozdíly mezi kmeny, jelikož některé tyto látky nebyly až tak účinné v testování s rychle rostoucími kmeny *M. aurum* a *M. smegmatis* (především sloučeniny s 4-OH a 4-CH₃ substitucí). Dále byla stanovena také cytotoxicita u některých z těchto látek na buněčné linii HepG2 (buňky karcinomu jater). Vysokou cytotoxicitu prokazovaly látky: WA_17, WA_32, WA_33 a WA_52. Látka WA_34 byla relativně netoxická a látky WA_35, WA_36 prokazovaly nízkou cytotoxicitu. Porovnání však není součástí této diplomové práce a bližší výsledky lze dohledat v uvedené publikaci.

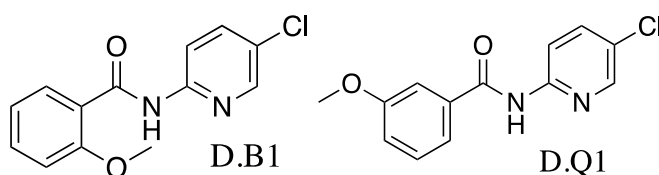
Do **8. skupiny** testovaných látek patří aminokyselinami *N*-substituované pyrazin-2-karboxamidy. Většina těchto látek neprokazovala antimykobakteriální účinnost u obou kmenů. Pouze látka ethyl-(pyrazin-2-karboxyl)-*L*-tryptofanát prokazuje slabou účinnost u *M. smegmatis* při MIC 250 µg/ml, u *M. aurum* je látka účinná při MIC 125 µg/ml. Nicméně účinek je, ve srovnání s účinky standardů, zanedbatelný.



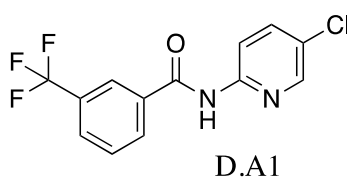
Syntéza těchto látek byla tento rok publikována v odborném článku (Juhás *et al.*, 2020). V této studii bylo popsáno, jak hodnota pH ovlivňuje MIC těchto látek. Lepší antimykobakteriální účinnost těchto látek byla u testování s *M. tuberculosis* (Mtb H37Ra) při pH 6,0 než při pH 6,6, jak je požadováno při standardním *in vitro* testování aktivity PZA/POA. Hodnota pH 6,0 se také nachází v makrofázích, kde se patogen *M. tuberculosis* při infekci nachází, což testování více přibližuje reálným podmínkám v organismu. Tento výsledek byl očekávatelný, jelikož tyto látky by po své aktivaci uvnitř makrofágů měly uvolňovat aktivní látku POA. To je i jedním se základních mechanismů

účinků PZA, kde aktivita PZA roste s klesajícím pH a to klidně i o tři řády. U rychle rostoucích kmenů byl vliv pH na účinek testovaných látek zanedbatelný.

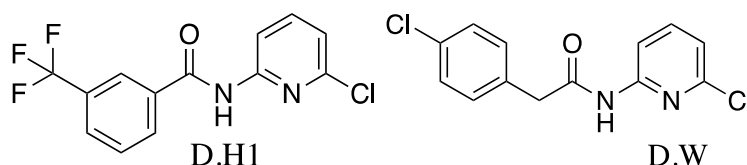
Do **9. skupiny** testovaných látek patří *N*-(5-chlorpyridin-2-yl) deriváty acetamidů a benzamidů. Z této skupiny byly účinné v testování s *M. smegmatis* při MIC 15,625 μg/ml látky D.B1 (*N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-2-methoxybenzamid) a D.Q1 (*N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-3-methoxybenzamid). Obě tyto látky mají ve své molekule substituci methoxy skupinou na fenylovém jádře, což může podpořit antimykobakteriální účinek. I atom chloru by mohl mít pozitivní vliv na antimykobakteriální účinek (viz předchozí sloučeniny).



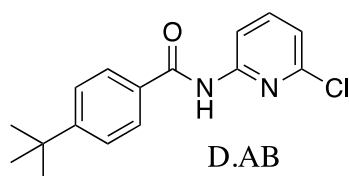
V testování s *M. aurum* byla antimykobakteriálně účinná (MIC 31,25 μg/ml) látka D.A1 (*N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-3-(trifluormethyl)benzamid), která má ve své molekule trifluormethyl v poloze 3- na fenylovém jádře.



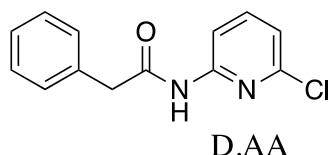
Do **10. skupiny** testovaných látek patří *N*-(6-chlorpyridin-2-yl) deriváty acetamidů a benzamidů. Přítomnost 6-chlorpyridinu-2-yl má nejspíše významný vliv na antimykobakteriální účinek těchto sloučenin. Látky byly u obou kmenů přibližně stejně účinné. Nejúčinnější látky z této skupiny jsou D.H1 (*N*-(6-chlorpyridin-2-yl)-3-(trifluormethyl)benzamid) a D.W. (*N*-(6-chlorpyridin-2-yl)-2-(4-chlorfenyl)acetamid) s MIC 15,625 μg/ml u *M. smegmatis* a MIC 31,25 μg/ml u *M. aurum*.



Látka D.AB (4-*tert*-butyl)-*N*-(6-chlorpyridin-2-yl)benzamid prokázala významný účinek (MIC 3,125 μg/ml) v testování s kmenem *M. smegmatis*.



Slabší účinek prokázala také látka D.AA (*N*-(6-chloropyridin-2-yl)-2-fenylacetamid) s MIC 31,25 $\mu\text{g/ml}$ u *M. smegmatis* a 62,5 $\mu\text{g/ml}$ u *M. aurum*.



U ostatních látek z této 10. skupiny (D.C1, D.E1, D.G1) byl také prokázán antimykobakteriální účinek, ale ve srovnání s účinky standardů je příliš slabý.

Zdá se, že pro celou skupinu amidů a benzamidů není důležitá délka spojovacího řetězce mezi fenylovým a pyridinovým jádrem. Pro aktivitu jsou výhodné substituce chlorem, trifluormethylovou skupinou, příp. *tert*-butylovou skupinou.

Na závěr tedy můžeme získané poznatky shrnout s tím, že důležitým faktorem pro účinek je chemická struktura a další fyzikálně-chemické parametry, jako je například lipofilita. Čím je látka více lipofilní, tím lépe proniká přes buněčnou membránu mykobakterií. Jako nejvýhodnější substituent se jeví chlor (zvyšuje lipofilitu, je zde patrný vliv pozice), trifluormethylová skupina (obecně známá zvyšováním aktivity) a případně hydroxy skupina (podílí se na tvorbě vodíkových můstků – inter i intra molekulárních). Další vliv může mít i délka alkylového řetězce, která může ovlivnit lipofilitu a zároveň sterické vlivy pro umístění do aktivního místa např. enzymu.

Z výsledků testování je patrná odlišná citlivost kmenů *M. smegmatis* a *M. aurum* k testovaným látkám. K testovaným látkám byl citlivější spíše kmen *M. smegmatis*.

Dále by bylo vhodné brát na vědomí, že testování sloučenin proběhlo pouze jednou. Abychom vyloučili chyby lidského faktoru či dalších vnějších vlivů, bylo by vhodné testování ještě jednou zopakovat.

Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové se poměrně intenzivně věnuje syntéze nových sloučenin a studiu jejich antimykobakteriálního, antibakteriálního a antifungálního působení. A tato diplomová práce malým dílem přispívá k těmto novým poznatkům.

7. ZÁVĚR

- V teoretické části mé diplomové práci byly přehledně prezentovány aktuální informace a znalosti o mykobakteriích, tuberkulóze a antituberkuloticích.
- Pomocí mikrodiluční bujónové metody bylo otestováno 79 potenciálně antimykobakteriálně účinných látek na rychlerostoucích kmenech *M. aurum* a *M. smegmatis*.
- Z 79 látek prokazovalo významný antimykobakteriální účinek 22 látek.
- Antimykobakteriální účinek neprokázalo 47 látek.
- Testované látky byly dle chemické struktury rozděleny do 10 skupin. Z nich byla nejúčinnější skupina, která obsahovala 5-alkylamino-*N*-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid jako základ své struktury. Nejméně účinnou skupinou byly aminokyselinami *N*-substituované pyrazin-2-karboxamidy.
- Nejvýhodnějšími substituenty, které zvyšují antimykobakteriální aktivitu sloučenin, se zdají být chlor, trifluormethyl a případně hydroxy skupina.
- Testované látky byly citlivější spíše k *M. smegmatis* než k *M. aurum*.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

AT	antituberkulotikum
ATP	adenosintrifosfát
ATB	antibiotikum
BCG	Bacillus Calmette-Guérin (vakcína proti TBC)
CIP	ciprofloxacín
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CT	počítačová tomografie
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EMB, E	etambutol
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAS	Fatty Acid Synthase (syntáza mastných kyselin)
FDC	fixed-dose combination
GIT	gastrointestinální trakt
IFN- γ	interferon gama
IGRA	Interferon Gamma Release Assay
INH, H	isoniazid
MALDI	matrix assisted laser desorption/ionization
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MDR-TB	multi-lékově rezistentní forma tuberkulózy
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MTD	Mycobacterium Tuberculosis Direct
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
(NF)- κ B	nukleární faktor kappa B
NTM	netuberkulózní mykobakterie

NTZ	nitazoxanid
OSN	Organizace spojených národů
PAS	paraaminosalicylová kyselina
POA	kyselina pyrazinkarboxylová
PCR	polymerázová řetězová reakce
PPD	purified protein derivatives
PZA, Z	pyrazinamid
RFM, R	rifampicin
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RR-TB	rifampicin rezistentní tuberkulóza
RTG	rentgen, rentgenový
SAR	structure-activity relationships, vztahy mezi strukturou a aktivitou
STM, S	streptomycin
TBC	tuberkulóza
TDR-TB	totálně rezistentní tuberkulóza
TLR	toll-like receptory
TOF	time of flight (analyzátor doby letu)
UK	Univerzita Karlova
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
XDR-TB	extenzivně lékově rezistentní forma tuberkulózy

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled druhů mykobakterií dle rychlosti růstu	12
Tabulka 2 Svět bez TBC.....	15
Tabulka 3 Nové molekuly a léčebné režimy ve vývoji k srpnu 2019	44
Tabulka 4 1. skupina testovaných látek – 5-alkylamino- <i>N</i> -(3-trifluormethyl)fenylpyrazin-2-karboxamidy	54
Tabulka 5 2. skupina testovaných látek – 5-alkylamino- <i>N</i> -(3-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy.....	55
Tabulka 6 3. skupina testovaných látek – 5-alkylamino- <i>N</i> -(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy.....	56
Tabulka 7 4. skupina testovaných látek – 5-alkylamino- <i>N</i> -(<i>p</i> -tolyl)pyrazin-2-karboxamidy	57
Tabulka 8 5. skupina testovaných látek – 5-alkylamino- <i>N</i> -(4-ethylfenyl)pyrazin-2-karboxamidy.....	58
Tabulka 9 6. skupina testovaných látek – 5-alkylamino- <i>N</i> -(4-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy	59
Tabulka 10 7. skupina testovaných látek – 5-alkylamino- <i>N</i> -(5-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy	60
Tabulka 11 8. skupina testovaných látek – aminokyselinami <i>N</i> -substituovaný pyrazin-2-karboxamid	61
Tabulka 12 9. skupina testovaných látek – <i>N</i> -(5-chlorpyridin-2-yl) deriváty acetamidů a benzamidů	64
Tabulka 13 10. skupina testovaných látek – <i>N</i> -(6-chlorpyridin-2-yl) deriváty acetamidů a benzamidů	65
Tabulka 14 Přehled standardů.....	66
Tabulka 15 Schéma mikrotitrační destičky	71
Tabulka 16 Výsledky 1. skupiny testovaných látek – 5-alkylamino- <i>N</i> -(3-trifluormethyl)fenylpyrazin-2-karboxamidy	74
Tabulka 17 Výsledky 2. skupiny testovaných látek – 5-alkylamino- <i>N</i> -(3-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy.....	74
Tabulka 18 Výsledky 3. skupiny testovaných látek – 5-alkylamino- <i>N</i> -(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy.....	75
Tabulka 19 Výsledky 4. skupiny testovaných látek – 5-alkylamino- <i>N</i> -(<i>p</i> -tolyl)pyrazin-2-karboxamidy	75
Tabulka 20 Výsledky 5. skupiny testovaných látek – 5-alkylamino- <i>N</i> -(4-ethylfenyl)pyrazin-2-karboxamidy.....	75
Tabulka 21 Výsledky 6. skupiny testovaných látek – 5-alkylamino- <i>N</i> -(4-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy	76
Tabulka 22 Výsledky 7. skupiny testovaných látek – 5-alkylamino- <i>N</i> -(5-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamidy	76

Tabulka 23 Výsledky 8. skupiny testovaných látek – aminokyselinami <i>N</i> -substituované pyrazin-2-karboxamidy	77
Tabulka 24 Výsledky 9. skupiny testovaných látek – <i>N</i> -(5-chlorpyridin-2-yl) deriváty acetamidů a benzamidů	78
Tabulka 25 Výsledky 10. skupiny testovaných látek – <i>N</i> -(6-chlorpyridin-2-yl) deriváty acetamidů a benzamidů	78
Tabulka 26 Výsledky testování standardů.....	79

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Fotochromogenní mykobakterie – <i>M. marinum</i>	11
Obrázek 2 Spletené provazce <i>M. tuberculosis</i> , Cord-faktor.....	13
Obrázek 3 Buněčná stěna <i>M. tuberculosis</i>	13
Obrázek 4 Odhadovaná incidence TBC v roce 2018	16
Obrázek 5 Mykobakterie obarveny dle Ziehl-Neelsena, zvětšení 1000x.....	21
Obrázek 6 Mykobakterie pod fluorescenčním mikroskopem, zvětšení 400x.....	22
Obrázek 7 Růst <i>M. tuberculosis</i> na Löwenstein-Jensenově půdě.....	23
Obrázek 8 Bactec 960 MGIT	24
Obrázek 9 Vykultivované kolonie	24
Obrázek 10 MALDI spektra A) <i>M. abscessus</i> ; (B) <i>M. kansasii</i> ; (C) <i>M. tuberculosis</i>	25
Obrázek 11 Mikrotitrační destičky využívané při testování mikrodiluční bujónovou metodou.....	26
Obrázek 12 RTG hrudíku (A).....	27
Obrázek 13 RTG hrudníku (B)	27
Obrázek 14 Aplikace tuberkulinu do dorsální strany předloktí.....	28
Obrázek 15 Porovnání testů QuantiFERON-TB Gold a T-SPOT.TB	29
Obrázek 16 Mechanismus účinku PZA.....	35
Obrázek 17 Růst <i>M. smegmatis</i> na agaru Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich)	52
Obrázek 18 Růst <i>M. aurum</i> na agaru Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich).....	53
Obrázek 19 Příprava látek	68
Obrázek 20 Příprava mikrotitrační destičky	70
Obrázek 21 přeměna resazurinu na resorufin	72
Obrázek 22 Ukázka antimykobakteriálního testování pro standardy.....	72
Obrázek 23 Ukázka antimykobakteriálního testování pro látky.....	73

11. POUŽITÁ LITERATURA

1. AGYEMAN, A. A.; OFORI-ASENSO, R. Efficacy and safety profile of linezolid in the treatment of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, **2016**, vol. 15, n. 1. doi: 10.1186/s12941-016-0156-y
2. AHMAD, S. New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. *Respiratory Research*, **2010**, vol. 11, n. 1. doi: 10.1186/1465-9921-11-169. ISSN 1465-993X.
3. AHSAN, M. J. Recent advances in the development of vaccines for tuberculosis. *Therapeutic Advances in Vaccines*, **2015**, vol. 3, n. 3. doi: 10.1177/2051013615593891. ISSN 2051-0144
4. AKBERGENOV, R.; SHCHERBAKOV, D.; BÖTTGER, E. C. Molecular Basis for the Selectivity of Antituberculosis Compounds Capreomycin and Viomycin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **2011**, vol. 55, n. 10. doi: 10.1128/AAC.00628-11.
5. ALEXANDER, K. A.; LAVER, P. N.; MICHEL, A. L.; WILLIAMS, M.; VAN HELDEN, P. D.; WARREN, R. M.; VAN PITTIUS, N. C. G. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerging infectious diseases*, **2010**, vol. 16, n. 8. doi:10.3201/eid1608.100314.
6. AMBROŹKIEWICZ, W.; KUČEROVÁ-CHLUPÁČOVÁ, M.; JANĎOUREK, O.; KONEČNÁ, K.; PATEROVÁ, P.; BÁRTA, P.; VINŠOVÁ, J.; DOLEŽAL, M.; ZITKO, J. 5-Alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides: Design, Preparation, and Antimycobacterial Evaluation. *Molecules*. **2020**, vol. 25, n. 7. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25071561>
7. AUBRY, A.; MOUGARI, F.; REIBEL, F.; CAMBAU, E. *Mycobacterium marinum*. *Microbiology Spectrum*. **2017**, vol. 5, n. 2. doi: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0038-2016. ISSN 2165-0497
8. BANULS, A. L.; SANOU, A.; ANH, N.T.; GODREUIL, S. *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of Medical Microbiology*, **2015**, vol. 64, n. 11. doi: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000171>.

9. BÁRTŮ, V. Tuberkulóza a její rezistentní formy. *Interní medicína pro praxi* [online]. Praha: Pneumologická klinika, Thomayerova nemocnice v Praze, **2007**, vol. 9, n. 9. [cit. 10.1.2020]. Dostupné z https://www.internimediceina.cz/artkey/int-200709-0002_Tuberkuloza_a_jeji_rezistentni_formy.php
10. BENEŠ, J. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. 1. vydání. Praha: Grada, **2018**. ISBN 978-80-271-0636-3.
11. BERNEY, M.; BERNEY-MEYER, L. *Mycobacterium tuberculosis* in the Face of Host-Imposed Nutrient Limitation. *Microbiology spectrum*, **2017**, vol. 5, n. 3. doi: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0030-2016.
12. CATANZANO, T. M. Primary Tuberculosis Imaging [online] *Medscape*. 2016. [cit. 14.4.2020]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/358610-overview#a2>
13. DESHPANDE, D.; ALFFENAAR, J. C.; KÖSER, C. U.; DHEDA, K.; CHAPAGAIN, M. L.; SIMBAR, N.; SCHÖN, T.; STURKENBOOM, M. G. G.; MCILLERON, H.; LEE, P. S.; KOEUTH, T.; MPAGAMA, S. G.; BANU, S.; FOONGLADDA, S.; OGARKOV, O.; PHOLWAT, S.; HOUP, E. R.; HEYSELL, S. K.; GUMBO, T. D-Cycloserine Pharmacokinetics/Pharmacodynamics, Susceptibility, and Dosing Implications in Multidrug-resistant Tuberculosis: A Faustian Deal. *Clinical Infectious Diseases*, **2018**, vol. 67. doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciy624>.
14. DONALD, P. R.; DIACON, A. H. Para-aminosalicylic acid: the return of an old friend. *Lancet Infectious Diseases*, **2015**, vol. 15, n. 9. doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00263-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00263-7).
15. ETIENNE, G.; LAVAL, F.; VILLENEUVE, CH.; DINADAYALA, P.; ABOUWARDA, A.; ZERBIB, D.; GALAMBA, A.; DAFFÉ, M. The cell envelope structure and properties of *Mycobacterium smegmatis* mc2155: is there a clue for the unique transformability of the strain? *Microbiology*. **2005**, vol. 151, n. 6. doi: 10.1099/mic.0.27869-0. ISSN 1350-0872.

16. FARVER, C. F.; JAGIRDAR, J. A. volume: Mycobacterial Diseases in Pulmonary Pathology [online], 2nd edition, **2018**, ScienceDirect. [cit. 10.1.2020]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/kinyoun-stain>
17. Gamedium.cz. Mikrotitrační destičky U. [online], [cit. 14.4.2020]. Dostupné z: <https://www.gamedium.cz/katalog/mikrotitracni-desticka-u>
18. GHAZAEI, C. *Mycobacterium tuberculosis* and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *Journal of research in medical science*, **2018**, vol. 23, n. 63. doi:10.4103/jrms.JRMS_904_17.
19. GINSBURG, A.S.; GROSSET, J.H.; BISHAI, W.R. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, **2003**, vol. 3, n. 7. doi:10.1016/s1473-3099(03)00671-6.
20. GIRI, D. Mantoux Test: Principle, Procedure, Interpretation and Limitations. Laboratory tests.org [online]. **2019**. [cit. 4.4.2020]. Dostupné z: <http://laboratorytests.org/mantoux-test/>
21. GREENWOOD, D.; SLACK, R.C.B.; PEUTHERER J.F. *Lékařská mikrobiologie*. 1 vydání. Praha: Grada, **1999**. ISBN 80-7169-365-0.
22. HARAUSZ, E. P.; CHERVENAK, K. A.; GOOD, C. E.; JACOBS, M. R.; WALLIS, R. S; SANCHEZ-FELIX, M.; BOOM, W. H. Activity of Nitazoxanide and Tizoxanide against *Mycobacterium tuberculosis in vitro* and in whole blood culture. *Tuberculosis (Edinb)*, **2016**, vol. 98. doi: 10.1016/j.tube.2016.03.002.
23. HENTSCHEL, J. The Complete Structure of the *Mycobacterium smegmatis* 70S Ribosome. *Cell reports*, **2017**, vol. 20, n. 1. doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.029>.
24. HOMOLKA, J. *Tuberkulóza*. 5. upravené vydání. Praha: Karolinum, **2016**. ISBN 978-80-246-3476-0.
25. CHMELAŘ, D. *Lékařská mikrobiologie v kostce (pro zdravotní laboranty a mediky)*. 1. vydání. Ostrava: Ostravská univerzita, **2013**. ISBN 978-80-7464-216-6

26. JUHÁS, M.; KUČEROVÁ, L.; HORÁČEK, O.; JANĎOUREK, O.; KUBÍČEK, V.; KONEČNÁ, K.; KUČERA, R.; BÁRTA, P.; JANOUŠEK, J.; PATEROVÁ, P.; KUNEŠ, J.; DOLEŽAL, M.; ZITKO, J. *N*-Pyrazinoyl Substituted Amino Acids as Potential Antimycobacterial Agents - the Synthesis and Biological Evaluation of Enantiomers. *Molecules*, **2020**, vol. 25, n. 7. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25071518>
27. KEILER, K.C. Biology of *trans*-translation. *Annual Review of Microbiology*, **2008**, vol. 62. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162948>.
28. KRÁTKÝ, M.; VINŠOVÁ J. Pokroky ve vývoji antituberkulotik působících na multilékově rezistentní kmeny – suplement. *Chemické. Listy*, **2010**, vol. 104.
29. KRÁTKÝ, M.; VINŠOVÁ, J.; NOVOTNÁ, E.; MANDÍKOVÁ, J.; TREJTAR, F.; STOLARÍKOVÁ, J. Antibacterial activity of salicylanilide 4-(trifluoromethyl)-benzoates. *Molecules*, **2013**, vol. 18, n. 4. 3674-3688.
30. KOLYVA, A. S.; KARAKOUSIS P. C. Old and New TB Drugs: Mechanisms of Action and Resistance. In book: Understanding Tuberculosis-New Approaches to Fighting Against Drug Resistance. CARDONA, P.J. InTechOpen, **2012**. doi: 10.5772/30992. ISBN 978-953-307-948-6.
31. LaboratoryInfo.com. Ziehl-Neelsen Stain (ZN-Stain): Principle, Procedure, Reporting and Modifications. **2020**. [online], [cit. 13.4.2020]. Dostupné z: <https://laboratoryinfo.com/zn-stain/>
32. LANGE, C.; DHEDA, K.; CHESOV, D.; MANDALAKAS, A.M.; UDWADIA, Z.; HORSBURGH, C.R. Management of drug-resistant tuberculosis. *Tuberculosis 2019*, **2019**, vol. 394, n. 10202. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31882-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31882-3).
33. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. Capreomycin. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, [online]. **2012**, upraveno 2019. [cit. 27.11.2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548641/>
34. MACELA, A. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*. 1. vydání. Praha: Grada, **2006**. ISBN 80-247-0664-4.

35. MAČÁK, J.; MAČÁKOVÁ, J.; DVOŘÁČKOVÁ J. *Patologie*. 2. doplněné vydání. Praha: Grada, **2012**. ISBN 978-80-247-3530-6.
36. MAHON, C. R.; LEHMAN, D. C. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6. vydání. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, **2019**. ISBN 978-0-323-48218-9
37. MARTINEK, J.; LOCHMANOVÁ, A.; ULMAN, V.; NOVÁK, V. IGRA (Interferon- γ Release Assays) v rutinní laboratorní praxi. Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě. [online]. [cit. 25.3.2020]. Dostupné z: https://www.solen.cz/incpdfs/inf-990000-7500_10_13.pdf
38. MARQUES, S. S. H.; MESQUITA, M. C.; LIMAA, K. V. B.; NEPOMUCENO, L. G. C. L.; MONTEIROBAT M. C. Mechanism of Resistance of Some Neglected Diseases. In book: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. MÉNDEZ, V.A. 4. edition. Formatex Research Center, **2013**. ISBN 978-84- 939843-9-7.
39. MARTÍNKOVÁ, J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 2. vydání. Praha: Grada, **2018**. ISBN 978–80–247–4157–4.
40. MELTER, O.; MALMGREN, A. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. 1. vydání. Praha: Karolinum, **2014**. ISBN 9788024625454.
41. Ministerstvo zdravotnictví České republiky [online], Seznam států TBC-aktualizace leden 2019, **2019**. [cit. 29.10.2019]. Dostupné z: https://www.mzcr.cz/Verejne/dokumenty/seznam-statu-s-vyssim-vyskytem-tbc-aktualizace-leden-2019_16724_2465_5.html
42. NAVRÁTIL, L. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory*. 2. zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, **2017**. ISBN 978-80-271-0210-5.
43. PALOMINO, J. C.; MARTIN, A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics (Basel)*, **2014**, vol. 3, n. 3. doi: 10.3390/antibiotics3030317.
44. PEÑA, J. A.; FERRARO, M. J.; HOFFMAN, C. G.; BRANDA, J. A. Growth Detection Failures by the Nonradiometric Bactec MGIT 960 Mycobacterial Culture System. *Journal of Clinical Microbiology*. **2012**, vol. 50, n. 6, 2092-2095. doi: 10.1128/JCM.00108-12. ISSN 0095-1137.

45. PHELAN, J.; MAITRA, A.; MCNERNEY, R; NAIR, M.; GUPTA, A.; COLL, F.; PAIN, A.; BHAKTA, S.; CLARK, T. The draft genome of *Mycobacterium aurum*, a potential model organism for investigating drugs against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. *International Journal of Mycobacteriology*, **2015**, vol. 4, n. 3. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.05.001>.
46. Poliklinika Děčín. *Kalmetizace – očkování proti tuberkulóze*, Poliklinika Děčín [online], [cit. 29.10.2019]. Dostupné z: <https://www.poliklinikadecin.cz/kalmetizace>
47. PRASAD C. S. B. R.; NARASIMHA, A.; KUMAR, H. M. L. Negative staining of mycobacteria - A clue to the diagnosis in cytological aspirates: Two case reports. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, **2011**, vol. 4., n. 2. ISSN 1755-6783, doi: 10.4103/1755-6783.85763.
48. PTÁKOVÁ, M. Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterióz. *Medicína pro praxi* [online], 2011, vol. 8, n. 11. [cit. 13. 3. 2020]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/11/06.pdf>
49. PubChem Database. National Center for Biotechnology Information. Ethambutol hydrochlorid. [online], [cit. 15.11. 2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14052>
50. PubChem Database. National Center for Biotechnology Information. Isoniazid [online], [cit. 15.11.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3767>
51. PubChem Database. National Center for Biotechnology Information. Pyrazinamide [online], [cit.15.11.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1046>
52. PubChem Database. National Center for Biotechnology Information. Rifampicin [online], [cit.15.11.2019] Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rifampicin>
53. PubChem Database. National Center for Biotechnology Information. Streptomycin [online], [cit. 21.11.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Streptomycin>

54. RAY, S.; TALUKDAR. A.; KUNDU, S.; KHANRA, D.; SONTHALIA, N. Diagnosis and management of miliary tuberculosis: current state and future perspectives. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, **2013**, vol 9. doi: 10.2147/TCRM.S29179.
55. ROZSYPAL, H. Antibiotické minimum VIII. Antitubekulotika [online], **2011** (citováno dne: 27.10.2019). Dostupné z: <https://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/Atb2011/antibio10.htm>
56. SCHAAF, S. H. *Tuberculosis E-Book: A Comprehensive Clinical Reference* [online]. Saunders, **2009**. [cit. 2019-11-27]. ISBN 978-1416039884.
57. SCHOLAR, E. M.; PRATT W. B. *The Antimicrobial Drugs*. 2. vydání. New York: Oxford University Press, **2000**. ISBN 9780195125290.
58. RAMANDEEP, S.; MANJUNATH, U.; BOSHOFF, H. I. M.; HWAN H.; NIYOMRATTANAKIT, P.; LEDWIDGE, R.; DOWD, C. S.; LEE, Y.; PILHO, K.; ZHANG, L.; KANG, S.; KELLER, T. H.; JIRICEK, J.; BARRY, C. E. PA-824 Kills Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by Intracellular NO Release. *Science*, **2008**, vol. 322, n. 5906. doi: 10.1126/science.1164571. ISSN 0036-8075.
59. SALEEB P. G.; DRAKE, S. K.; MURRAY P. R.; ZELAZNY A. M. Identification of *Mycobacteria* in Solid-Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, **2011**, vol. 49, n. 5. doi: 10.1128/JCM.02135-10.
60. SelectScience. BD BACTECT™ MGIT™ Automated Mycobacterial Detection System by BD Life Sciences:Diagnostics, [online], [cit. 8. 3. 2020]. Dostupné z: <https://www.selectscience.net/products/bd-bactec-mgit-automated-mycobacterial-detection-system/?prodID=208747>
61. SOLOVIČ, I.; VAŠÁKOVÁ, M. *Tuberkulóza ve faktech i obrazech*. 1. vydání. Praha: Maxdorf, **2019**. ISBN 978-80-7345-613-9.
62. SOMOSKOVI, A.; PARSONS, L.M.; SALFINGER, M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respiratory Research*, **2001**, vol. 2, n. 3. doi: 10.1186/rr54.

63. SOWAJASSATAKUL, A.; PRAMMANANAN, T.; CHAIPRASERT, A.; PHUNPRUCH, S. Molecular characterization of amikacin, kanamycin and capreomycin resistance in M/XDR-TB strains isolated in Thailand. *BMC microbiology*, **2014**, vol. 14, n. 165. doi: 10.1186/1471-2180-14-165.
64. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Klinické hodnocení léků. SÚKL [online],[cit. 20.3.2020]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/klinicke-hodnoceni-leku>
65. Státní zdravotní ústav. *Tuberkulóza (TBC)*, Oddělení epidemiologie infekčních nemocí, CEM, SZÚ, Praha; **2019** [online], [cit. 4.11.2019]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Infekce_zakladni_informace/TBC_zakladni_informace.pdf
66. Streptomycin, Drugbank.ca[online], [cit. 21.11.2019], Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01082>
67. SOUČEK, M. *Vnitřní lékařství*: 1. vydání. Praha: Grada, **2011**. ISBN 978-80-247-2110-1.
68. SOUČKOVÁ, L.; KOSTKOVÁ, H.; DEMLOVÁ, R. Jak se vyvíjí nový lék. *Praktické lékařství*. **2015**, vol. 11, n. 4. 144-147
69. SOUČKOVÁ, L.; RUZSÍKOVÁ, A. Nová antibiotika v klinické praxi a výzkumu. *Klinická Farmakologie a Farmacie*. **2016**, vol. 30, n. 3, 23-28.
70. TAHLAN, K.; WILSON, R.; KASTRINSKY, D. B.; ARORA, K.; NAIR, V.; FISCHER, E.; BARNES, S. W.; WALKER, J. R.; ALLAND, D.; BARRY, C. E.; BOSHOFF, H. I. SQ109 Targets MmpL3, a Membrane Transporter of Trehalose Monomycolate Involved in Mycolic Acid Donation to the Cell Wall Core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **2012**, vol. 56, n. 4. doi: 10.1128/AAC.05708-11.
71. Tballiance.org. FDA Approves New Treatment for Highly Drug-Resistant Forms of Tuberculosis, **2019**. [online], [cit. 15.1.2020]. Dostupné z: <https://www.tballiance.org/news/fda-approves-new-treatment-highly-drug-resistant-forms-tuberculosis>
72. Tbfacts. Information about tuberculosis. TB Drugs [online], [cit. 26.10.2019]. Dostupné z: <http://www.tbfacts.org/tb-drugs/>

73. Thermofisher.com. AlamarBlue HS and alamarBlue Assays for Cell Viability. [online]. [cit. 4.4. 2020]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorescence-microplate-assays/microplate-assays-cell-viability/alamarblue-assay-cell-viability>
74. URBÁŠKOVÁ, P., ŽEMLIČKOVÁ, H., HRABÁK, J.: Jaké breakpointy používat pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti bakterií k antibiotikům? Zprávy epidemiologie a mikrobiologie. SZÚ Praha, **2010**, vol. 19, n. 9.
75. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, *Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v roce 2018*, ÚZIS, **2018** [online], [cit. 15.1.2020]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=record&id=8271>
76. VELAYATI, A. A.; FARNIA, P.; MASJEDI, M.Z. The totally drug resistant tuberculosis (TDR-TB). *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2013, vol. 6, n. 4.
77. VOTAVA M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1 vydání. Brno: Neptun, **2003**. ISBN 80-902896-6-5.
78. Vyhláška MZ ČR č. 299/2010 Sb., kterou se mění vyhláška č.537/2006 Sb., očkování proti infekčním nemocem, **2010**. [online], [cit.10. 2. 2020]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2010-299>
79. WHO. Global Tuberculosis Report 2019, **2019**. [online], Geneva: World Health Organization, [cit.27.10.2019]. Dostupné z: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. ISBN: 978-92-4-156571-4.
80. WHO. Global Tuberculosis Report 2011, **2011**. [online], Geneva: World Health Organization, [cit.20.3.2020]. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44728>. ISBN: 9789241564380.
81. WHO. Model Lists of Essential Medicines, **2019**. [online], Geneva: World Health Organization, [cit. 2.3.2020]. Dostupné z: <https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>

82. WHO. What is multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and how do we control it?, **2018**. [online], Geneva: World Health Organization. [cit. 21.11. 2019]. Dostupné z: <https://www.who.int/features/qa/79/en/>
83. WHO. BCG vaccine. [online], Geneva: World Health Organization. [cit. 14. 2. 2020]. Dostupné z: <https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/bcg/en/>
84. WHO. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis, **2018** [online], Geneva: World Health Organization. [cit. 4.4. 2020]. Dostupné z: https://www.who.int/tb/publications/2018/WHO_technical_drug_susceptibility_testing/en/ ISBN 978-92-4-151484-2
85. WHO. Drug-resistant TB: Totally drug-resistant TB FAQ. [online]. Geneva: World Health Organization. [cit. 4.4.2020]. Dostupné z: <https://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/totally-drug-resistant-tb-faq/en/>
86. WALLENFELS, J.; VAŠÁKOVÁ, M.; SOLOVIČ, I. Aktuální farmakoterapie tuberkulózy. *Klinická farmakologie a farmacie*, **2018**. [online]. [cit. 13.3: 2020] vol. 32, n. 4. Dostupné z: https://klinickafarmakologie.cz/artkey/far-201804-0002_Aktualni_farmakoterapie_tuberkulozy.php
87. WANG, M. H.; LIU, X.; SHEN, B. Disseminated Tuberculosis in a Patient Taking Anti-TNF Therapy for Crohn's Disease. *ACG Case Reports Journal*. **2015**, vol. 3, n.1, 45-48. doi: 10.14309/crj.2015.97. ISSN 2326-3253.
88. XAVIER, A. S.; LAKSHMANAN, M. Delamanid: A new armor in combating drug-resistant tuberculosis. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. **2014**, vol. 5, n. 3. doi: 10.4103/0976-500X.136121. ISSN 0976-500X.
89. XU, Z.; LU, D.; ZHANG, X.; HAIJING, L.; MENG, S.; PAN, Y. S.; BOYD, A. S.; MA, L. *Mycobacterium smegmatis* in Skin Biopsy Specimens from Patients with Suppurative Granulomatous Inflammation. *Journal of Clinical Microbiology*, **2013**, vol. 51, n. 3. doi: 10.1128/JCM.03421-12. ISSN 0095-1137.
90. YUAN, T.; SAMPSON, N. S. Hit Generation in TB Drug Discovery: From Genome to Granuloma. *Chemical reviews*, **2018**, vol. 118, n. 4. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00602.

91. ZÁRUBA, R.; KRÁLOVÁ, M. Posouzení účinnosti automatického kultivačního systému pro záchyt mykobakterií BACTEC MGIT 960 ve srovnání s klasickou kultivační metodou. Zkušenosti po jednoročním provozu. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. **2002**, n. 2, 66-70.
92. ZHANG, Y.; SHI, W.; ZHANG, W.; MITCHISON, D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiology Spectrum*. **2013**, vol. 2, n. 4. doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013.
93. ZHENG, J.; RUBIN, E. J.; BIFANI, P.; MATHYS, V.; LIM, V.; AU, M.; JANG, J.; NAM, J.; DICK, T.; WALKER, J. R.; PETHE, K.; CAMACHO, L. R. Discovery of the Mechanism of Action of a Critical Tuberculosis Drug. *Journal of Biological Chemistry*, **2013**, vol. 288, n. 32. doi: 10.1074/jbc.P113.475798. ISSN 0021-9258.