

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

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

Hradec Králové 2021

Mgr. Marie Molnárová

Prohlášení

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

Hradec Králové 2021

Mgr. Marie Molnárová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat prof. PharmDr. Martinu Doležalovi, PhD. za povzbuzení si po absolvování studia napsat rigorózní práci, za pomoc se sepsáním práce a konzultace.

Dále děkuji PharmDr. Ondřeji Jand'ourkovi, Ph.D. za rady a pomoc při praktické části a za vedení, trpělivost a pružnou komunikaci při sepisování práce, za vyhodnocení IČ.

Děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za vyhodnocení NMR.

Dále děkuji za podporu své rodině, především manželovi.

Tato rigorózní práce byla součástí fakulního specifického vysokoškolského výzkumu.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Studentka: Mgr. Marie Molnárová

Školitel: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

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

Název rigorózní práce: Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva

Tuberkulóza je infekční onemocnění vyvolané bakterií *Mycobacterium tuberculosis*. Jde o celosvětový problém, kdy se jedná o nejčastější příčinu úmrtí na infekční onemocnění u lidí. Komplikací léčby je výskyt multirezistentních a extrémně rezistentních kmenů. Syntéza nových látek se zaměřuje na získání bezpečnějších a účinnějších léčiv.

Práce je věnována syntéze derivátů pyrazinu, kdy se využívá obměna pyrazinového cyklu pomocí různých substituentů. Tato práce navazuje na výzkum, kterým se zabývá Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové dlouhodobě.

Pyrazinamid je antituberkulotikem 1. linie. Předchozí studie ukázaly, že obměna pyrazinového cyklu nebo substituce pyrazinu chlorem může zvýšit antituberkulotickou a/nebo antifungální aktivitu. V práci se využívá aminodehalogenační reakce, kdy se nechá reagovat výchozí látka 2-chlorpyrazin se substituovaným benzylaminem v mikrovlnném reaktoru. Získají se tak finální produkty typu substituovaných *N*-benzylpyrazin-2-aminů.

K syntéze vybraných derivátů byl využit mikrovlnný reaktor. K separaci vzniklých látek se použil preparativní chromatograf, přístroj CombiFlash. Pevný produkt byl získán pomocí vakuové odparky. Totožnost nově nasyntetizovaných derivátů byla ověřena pomocí NMR spektroskopie na Katedře organické a bioorganické chemie. Látky byly poté testovány na antibakteriální, antifungální a v neposlední řadě na antimykobakteriální aktivitu na Katedře biologických a lékařských věd (antibakteriální a antifungální) a ve FN Hradec Králové, Ústav klinické mikrobiologie (antimykobakteriální).

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical analysis

Student: Mgr. Marie Molnárová

Supervisor: Prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Co-advisor: PharmDr. Ondřej Jandourek, Ph.D.

Title of rigorous work: Pyrazine derivatives as a potential drugs

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis is a global problem because it is the most common cause of death among infectious diseases. The complication of therapy is the rise of multiresistant and extremely resistant strains. The synthesis of novel substances is focused to gain safer and active drugs.

This work is focused on the synthesis of pyrazine derivatives in which substitution of pyrazine cycle with various substituents is used. It follows up the research which is established at the Department of Pharmaceutical Chemistry, Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové.

The pyrazinamide is the first line antituberculous drug. The previous studies proved that substitution of pyrazine ring with various substituents can increase the antituberculous and/or antifungal activity. In this work it is used aminodehalogenation reaction, the 2-chloropyrazine, as a starting substance, reacts with ring-substituted benzylamine in microwave reactor. In this way the products like *N*-benzylpyrazine-2-amine are gained.

The microwave reactor for the synthesis of substances was used. For separation it was used preparative chromatography, CombiFlash. The solids were gained by recrystallization in vacuum evaporator. The identity of new synthesized derivatives was proved by NMR spectroscopy on the Department of Organic and Bioorganic chemistry. The substances were tested on their antibacterial, antifungal and antimycobacterial activity on the Department of Biological and Medical Sciences (antibacterial and antifungal activity) and in the Faculty Hospital in Hradec Králové, the Department of Clinical Microbiology (antimycobacterial activity).

Obsah

Abstrakt	7
Abstract	9
Seznam použitých zkratek	12
1 Úvod	15
2 Teoretická část.....	18
2.1 Tuberkulóza	18
2.2 Historie tuberkulózy v České republice.....	20
2.3 Původce tuberkulózy	20
2.3.1 Charakteristika <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
2.3.2 Stavba bakteriální buňky <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
2.3.3 Dělení mykobakterií	23
2.3.4 Výskyt TBC a mykobakteriálních kmenů v České republice	24
2.4 Patologický obraz tuberkulózy.....	24
2.5 Šíření tuberkulózy	26
2.6 Dělení tuberkulózy	26
2.7 Rizikové faktory	27
2.8 Symptomy.....	28
2.9 Diagnostika	28
2.9.1 Laboratorní diagnostika.....	29
2.9.2 Další metody diagnostiky	30
2.10 Léčba	31
2.11 Očkování	31
2.12 Rezistence	33
2.12.1 Primární rezistence.....	33
2.12.2 Sekundární rezistence	33
2.13 Antituberkulotika první linie	35

2.14	Antituberkulotika druhé linie.....	38
2.15	Pyrazinamid.....	41
2.15.1	Mechanismus účinku.....	42
2.15.2	Nežádoucí účinky.....	43
2.16	Obměny pyrazinového cyklu.....	43
2.17	Nová léčiva a léčebné režimy v léčbě TBC.....	43
2.17.1	Nové sloučeniny.....	44
2.17.2	Schválené léky, které se testují pro nové účely.....	49
2.17.3	Léčebné režimy.....	52
3	Cíl práce.....	53
4	Experimentální část.....	54
4.1	Použité přístroje a látky.....	54
4.2	Postup práce.....	55
4.3	Přehled získaných látek.....	56
4.4	Analytická data nasyntetizovaných sloučenin.....	62
5	Výsledky.....	67
5.1	Výsledky antibakteriálního testování.....	67
5.2	Výsledky antifungálního testování.....	70
5.3	Výsledky antimykobakteriálního testování.....	72
6	Diskuze.....	75
7	Závěr.....	77
8	Protokoly.....	78
9	Literatura.....	80
	Seznam obrázků.....	85
	Seznam tabulek.....	86
	Seznam protokolů.....	87

Seznam použitých zkratek

AC	<i>Absidia corymbifera</i>
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AIDS	angl. Acquired Immuno-Defficiency Syndrome, syndrom získané nedostatečné imunity
BCG vakcína	Bacillus Calmette-Guérin, očkovací vakcína proti tuberkulóze
CA	<i>Candida albicans</i>
CG	<i>Candida glabrata</i>
CK	<i>Candida krusei</i>
CT	<i>Candida tropicalis</i>
ČR	Česká republika
DMSO	dimethylsulfoxid
EC	<i>Escherichia coli</i>
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
EMA	European Medicines Agency, Evropská agentura pro léčivé přípravky
EU	Evropská unie
FAS	Fatty Acid Synthase, enzym syntáza mastných kyselin
FDA	Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
HIV	angl. Human Immunodeficiency Virus, virus lidské imunodeficiency
IČ	infračervená spektroskopie
KLP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KP-E	<i>Klebsiella pneumoniae ESBL pozitivní</i>
MDR	angl. multi-drug resistant, multirezistence, rezistentní na více léčiv
MDR-TB	multi-drug resistant tuberculosis, multi-lékově rezistentní (polyrezistentní) tuberkulóza
MIC	Minimální Inhibiční Koncentrace
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> methicilin rezistentní
NMR	nukleární magnetická rezonance
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermis</i>

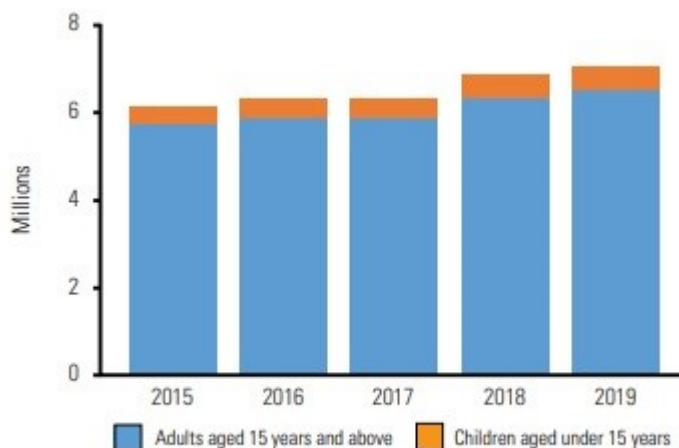
TA	<i>Trichosporon asahii</i>
TBC	tuberkulóza
TDR-TB	angl. totally drug-resistant tuberculosis, kompletně rezistentní tuberkulóza
TLC	thin-layer chromatography, tenkovrstvá chromatografie
TI	<i>Trichophyton interdigitale</i>
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace
XDR	angl. extensively-drug resistant, extenzivně lékově rezistentní
XDR-TB	extensively drug-resistant tuberculosis, extenzivně lékově rezistentní tuberkulóza

1 Úvod

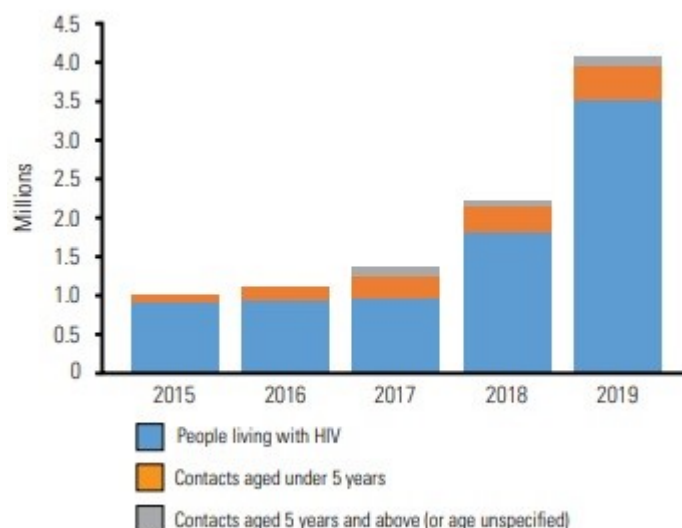
Tuberkulóza (TBC) je nejčastější příčinou úmrtí na infekční onemocnění u lidí (Global TB report 2020). Nejčastějším původcem TBC je *Mycobacterium tuberculosis* (Global TB report 2015). V posledních letech se světová prevalence zhoršila a to kvůli tzv. multi-lékově rezistentním (multi-drug resistant MDR) a extenzivně lékově rezistentním kmenům (extensively-drug resistant XDR) současně při koinfekci HIV (Jand'ourek et al., 2017; Tang 2016).

Odhadované množství lidí, kteří onemocněli TBC v r. 2019, bylo přibližně 10 milionů (rozsah 8,9 - 11 milionů), (Global TB report 2020).

Počet osob, které se léčily na TBC, ročně roste (Obr. 1). Z přibližně 6 milionů v roce 2015 se počet zvýšil na 7 milionů v roce 2018 a 7,1 milionu v roce 2019. Dostupnost preventivní péče TBC se též zvýšila, z 1 milionu v roce 2015 na 2,2 milionu v roce 2018 a 4,1 milionu v roce 2019 (Obr. 2), (Global TB report 2020).



Obr. 1: Celkový počet lidí, u kterých byla léčena TBC v letech 2015 – 2019 (zdroj: Global TB report 2020; 6. 2. 2021)



Obr. 2: Celkový počet lidí, kterým byla poskytnuta preventivní léčba TBC v letech 2015 – 2019 (zdroj: Global TB report 2020; 6. 2. 2021)

Nejčastěji se TBC projevuje u dospělých, častěji u mužů než u žen. Třicet nejvíce postižených zemí každoročně zahrne 90 % nově nakažených. TBC je nemoc chudoby, ekonomické krize, lidí žijících v náročných podmínkách a diskriminovaných (Global TB report 2020).

Boj s TBC současně není jen o zajištění poskytování zdravotních služeb, ale je též spojen s bráněním lidských práv. Nemoc má největší dopad právě na lidi v oblastech, kde jsou lidská práva a důstojnost nejvíce ohrožené. Úsilí o vymýcení TBC musí jít tedy ruku v ruce s posilováním sociálních jistot, zmírněním nerovností a extrémní chudoby a v posílení zdravotního pojištění (Global TB report 2020).

TBC se dá léčit a dá se jí předcházet. Přibližně 85 % pacientů, kteří onemocní TBC, mohou být vyléčeni pomocí šestiměsíčního léčebného režimu. Léčba má tu výhodu, že omezí další přenos infekce (Global TB report 2020).

Pandemie COVID-19 měla na poskytování léčby TBC negativní dopad. Během roku 2020 došlo ke snížení hlášení nových případů TBC ze zemí vysoce postižených TBC. Data WHO ukazují, že tento pokles v odhalování nových případů TBC, může vyústit až ve 400 000 úmrtí navíc v tomto roce (Global TB report 2020).

Při syntéze nových látek je cílem studií získání nových více bezpečných a účinných látek. Tato práce je zaměřena konkrétně na deriváty pyrazinu.

Obměnou pyrazinového cyklu různými substituenty a syntézou nových derivátů pyrazinu jako potenciálních léčiv se zabývá Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy.

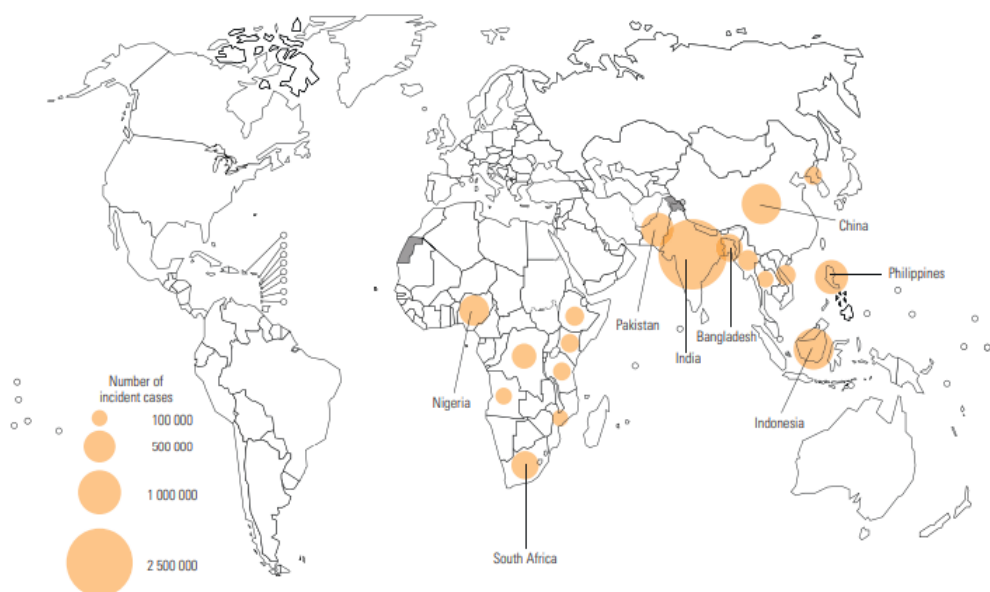
2 Teoretická část

2.1 Tuberkulóza

TBC je historicky velmi stará choroba. Studium lidských koster nám ukazuje, že je zde TBC už tisíce let. Do roku 1882 byl její původce neznámý. Objev bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, zodpovědné za rozvoj TBC, se datuje na 24. března 1882. Za jejím objevem stojí doktor Robert Koch. Nemoc se šíří vzduchem prostřednictvím kapének šířených nemocnými lidmi. Nejčastěji postihuje plíce (plicní TBC), ale může napadnout i jiné orgány (mimoplicní TBC). U relativně malého procenta (5 – 10 %) přibližně 2 bilionů nakažených lidí se během jejich života rozvine onemocnění TBC. Pravděpodobnost rozvoje TBC je ale mnohem vyšší u lidí s HIV, podvyživených, s diabetem mellitus, kuřáků a alkoholiků (Global TB report 2020).

K eliminaci TBC vydala Světová zdravotnická organizace (WHO) Strategii k ukončení TBC (End TB Strategy). Ukončení TBC do roku 2030 patří mezi zdravotnické cíle programu OSN, Cíle udržitelného rozvoje (Sustainable Development Goals), (Fernandová et al.; 2019).

S TBC se můžeme setkat po celém světě (Global TB report 2020; Imramovský et al., 2007). Nejvíce nemocných TBC v roce 2019 bylo v Jihovýchodní Asii (44 %), Africe (25 %) a v západním Pacifiku (18 %). Osm zemí pokrylo 2/3 nemocných celosvětově, a to Indie (26 %), Indonésie (8,5 %), Čína (8,4 %), Filipíny (6 %), Pákistán (5,7 %), Nigérie (4,4 %), Bangladéš (3,6 %) a Jihoafrická republika (3,6 %). Dalších 22 zemí z celkového počtu 30 nejvíce TBC postižených zemí ze seznamu WHO pokrylo celkem 21 % (Global TB report 2020).



Obr. 3: Země s minimálně 100 000 případy TBC v roce 2019
 Osm zemí s nejvyšším výskytem TBC a současně tvořících 2/3 všech nových případů TBC celosvětově (zdroj: Global TB report 2020; 6. 2. 2021)

Asi třetina světové populace má latentní formu TBC, což znamená, že jsou bakterií infikováni, ale nemoc se zatím neprojevila, a tak ji nepřenáší. Ve stáří nebo při oslabení organismu nemocemi dochází asi u 5 – 10 % lidí k manifestaci TBC, tzv. postprimární tuberkulózy. Větší riziko mají pacienti léčení glukokortikoidy, imunosupresivy, cytostatiky, diabetici, alkoholici, nemocní s AIDS (Global TB report 2016; Homolka, 2016).

Závažným formám TBC se u dětí dá předejít pomocí očkování oslabeným kmenem mykobakterií bovinního typu (BCG vakcína), (Homolka, 2016).

BCG vakcinace je imunizace mykobakteriemi se sníženou virulencí. Chrání proti nákaze při pozdějším kontaktu s virulentními kmeny (Homolka, 2016). BCG vakcinace se prováděla injekční aplikací jedné dávky do levé paže. V místě vpichu vznikla zánětlivá reakce (vrádek), který se během 2 – 3 měsíců zhojil jizvou (Šťásek, 2020). Vzhledem k nízké incidenci TBC v České republice se od roku 2010 očkují pouze rizikovní jedinci (Homolka, 2016).

2.2 Historie tuberkulózy v České republice

TBC je sociální chorobou. V roce 1918 po I. světové válce byla mortalita v České republice 360 na 100 000 obyvatel. Mezi světovými válkami se na léčbu nemoci a její prevenci podílela charitativní organizace, Masarykova liga proti tuberkulóze. V roce 1940 byla úmrtnost 140 na 100 000 obyvatel. V březnu v roce 1948 se kvůli zjišťování rozsahu epidemie TBC uzákonilo povinné hlášení TBC a nastal počátek chemoterapie. Nemocným se podával streptomycin a kyselina *p*-aminosalicylová. Povinné očkování bylo zavedeno v roce 1953. Díky němu došlo k redukci počtu závažných forem TBC u dětí, na které umíraly. Od roku 1960, kdy započala cílená likvidace TBC u skotu vyvolané kmenem *Mycobacterium bovis*, došlo k poklesu nemocných a v roce 1968 k úspěšné eradikaci. K léčbě TBC se po 12 měsících podávala trojkombinace léčiv (streptomycin, isoniazid a kyselina *p*-aminosalicylová). Od 80. let 20. století byl do léčby zaveden rifampicin. Délka chemoterapie se začíná zkracovat a do praxe se zavádí krátkodobé režimy se čtyřkombinací antituberkulotik. K lepšímu dohledu nad TBC v rámci ČR vzniká Registr tuberkulózy a Informační systém bacilární tuberkulózy (ISBT). V důsledku zlepšující se epidemiologické situace dochází ke zrušení BCG revakcinace u 11letých dětí (1. 4. 2009) a byla zavedena selektivní BCG vakcinace rizikových novorozenců (25. 10. 2010).

V ČR je nízká incidence TBC, kterou je ale nutno sledovat v důsledku migračních vln lidí ze zemí jako je Sýrie, Afghánistán, Irák, apod. (Homolka, 2016).

2.3 Původce tuberkulózy

TBC je infekční onemocnění, které je způsobeno bakterií *Mycobacterium tuberculosis*, popřípadě dalšími mykobakteriemi jako *M. bovis* apod. (Hartl et al., 2012).

Mezi typické znaky mykobakterií patří pomalý růst, intracelulární patogenezé, dlouhé období vegetačního klidu, genetická stejnorodost (Cole et al., 1998), dále acidorezistence. Buněčná stěna je tvořena převážně lipofilními látkami. Obsahuje dlouhé rozvětvené mastné kyseliny (mykolové

kyseliny) a disacharid trehalózu. Díky komplikované struktuře má buněčná stěna mykobakterií nízkou permeabilitu, což ztěžuje průnik léčiv (Hartl et al., 2012; Cole et al., 1998).

Mycobacterium tuberculosis je nejčastějším původcem TBC v ČR (Svobodová, 2013). Období vegetačního klidu, kdy se sama bakterie v infikované tkáni neprojevuje, se může projevovat slábnoucí imunitou. Samotná nemoc může vypuknout za několik let od prvotní infekce (Cole et al., 1998).

2.3.1 Charakteristika *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis je aerobní bakterie, tyčinkovitého tvaru, rovná nebo zahnutá, velikosti 1,5 – 5 µm. Bakterie žije častěji ve shlucích, ideální teplota pro její růst je okolo 37–38 °C (Homolka, 2016). *Mycobacterium tuberculosis* je intracelulární patogen, který je schopný infikovat člověka a přežít v organismu i několik let (Kalscheuer et al., 2019). Generační doba je dlouhá, asi 20–30 hodin (ostatní mikrobi přibližně 20–30 minut) a tak kultivace na tuhých půdách trvá i několik týdnů (Homolka, 2016). Mykobakterie jsou acidorezistentní bakterie a přežívají díky lipidům a polysacharidům v buněčné stěně (Kalscheuer et al., 2019). Přežívají intracelulárně i extracelulárně v kaseózním materiálu. Při běžných podmínkách přežívají mykobakterie po dobu 1–2 hodin, za slunečního svitu a při teplotách vyšších než 60 °C hynou. Dají se spolehlivě zničit sterilizací v autoklávu (Homolka, 2016).

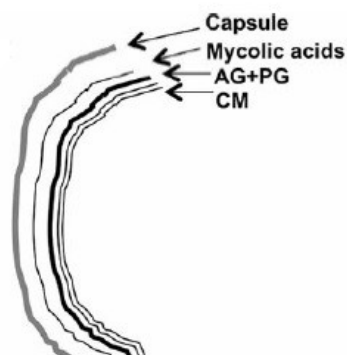
2.3.2 Stavba bakteriální buňky *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis je tvořeno převážně vodou (60 %) a anorganickými a organickými látkami (lipidy, proteiny, polysacharidy). Polysacharidy jsou tvořeny z arabinózy, galaktózy, manózy a glukanu. Lipidy z mykolové kyseliny, fosfolipidů, vosku D, glykolipidů. Lipidy jsou pro hostitele toxické, snižují mykobaktericidní aktivitu alveolárních makrofágů (Homolka, 2016).

Hlavním glykolipidem buněčné stěny je tzv. cord-faktor, dimykolát trehalózy (Hansen et al., 2019). Je přítomen u všech druhů mykobakterií (Lee

et al., 2017). Jedná se o potenciální virulentní faktor, který aktivuje makrofágy k prozánětlivé sekreci cytokinů a tvorbě granulomů (Ehrt et al., 2018; Lee et al., 2017).

Díky komplikovanému složení buněčné stěny má stěna nízkou propustnost. Skládá se ze čtyř hlavních vrstev: vnitřní (cytoplazmatická) membrána, vrstva s komplexem peptidoglykanu a arabinogalaktanu, membrána s mykolovými kyselinami a vnější obal (viz Obr. 4), (Kalscheuer et al., 2019).



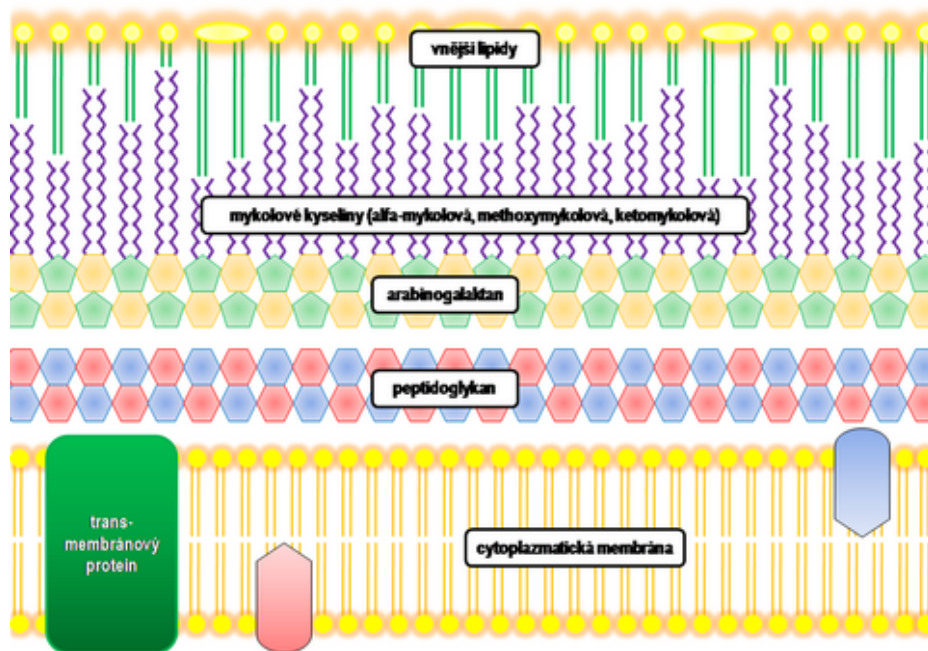
Obr. 4: Složení povrchové membrány mykobakterií:
(zdroj: Kalscheuer et al., 2019; 11. 2. 2021)

Capsule – vnější obal (lipidový)

Mycolic acids – membrána s mykolovými kyselinami

AG + PG – vrstva s komplexem peptidoglykanu a arabinogalaktanu

CM – vnitřní (cytoplazmatická) membrána



Obr. 5: Stavba buněčné stěny *Mycobacterium* sp.
(zdroj: <http://mikrobiologie.xf.cz/files/imgs/mykobakterie.png>; 14. 2. 2021)

2.3.3 Dělení mykobakterií

Pod rod *Mycobacterium* v současnosti spadá 245 druhů a 24 poddruhů (Euzéby, 1997). Tato čísla rok od roku rostou v závislosti na využití metody molekulární sekvenace (Parrish, 2019).

Druhy se dělí na rychle rostoucí ne-tuberkulózní mykobakterie, pomalu rostoucí ne-tuberkulózní mykobakterie a na členy *Mycobacterium tuberculosis* komplex (Tortolli, 2014).

TBC je způsobena *Mycobacterium tuberculosis*. Infekce se v populaci šíří hlavně inhalací kontaminovaného aerosolu od pacientů s aktivní plicní nemocí (Gopaldaswamy et al., 2020). Další nemoci, způsobené tzv. non-tuberkulózními mykobakteriemi, se mohou projevit jako povrchové infekce kůže nebo i jako plicní či rozšířené infekce u lidí s oslabenou imunitou (Parrish, 2019). Plicní formy non-tuberkulózních mykobakterií jsou většinou způsobeny druhem *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium abscessus* (Gopaldaswamy et al., 2020).

Většina nových druhů jsou ne-tuberkulózní mykobakterie, které se nacházejí v okolním prostředí (především ve vodě). Jejich patogenita je mírnější (Tortoli, 2014).

2.3.4 Výskyt TBC a mykobakteriálních kmenů v České republice

Od 60. let se v České republice (ČR) konstantně snižuje počet případů TBC. Tuto snižující se křivku lze pozorovat po celé Evropské unii (EU). V r. 2005 klesl počet nových případů TBC poprvé pod 1 000 (Fernandová et al.; 2019). Podle Registru tuberkulózy bylo v roce 2019 v ČR hlášeno 464 nových případů TBC. Nemoc se častěji projevuje u mužů (více jak 70 %) než u žen. Obecně je nejvíce nakažených lidí ve věku 45 – 64 let. Z celkových 464 případů TBC byla diagnostikována plicní forma u 425 případů (91,6 %), ostatní případy mimoplicní TBC čítaly 39 případů (ÚZIS ČR, 2020). Nejčastěji jsou postiženy periferní lymfatické uzliny, kosti a klouby a močové cesty. Z dlouhodobého hlediska je nejvíce novými případy TBC zasažena Praha a Střední Čechy, nejméně Jižní Čechy a Jižní Morava (Fernandová et al.; 2019).

Nejčastějším původcem TBC v ČR je *Mycobacterium tuberculosis* (Svobodová, 2013). V roce 2019 bylo nahlášeno celkem 103 případů onemocnění jinou mykobakteriózou než TBC. Nejčastější případy byly způsobeny *M. avium* (51 případů) a *M. kansasii* (16 případů). Dále bylo zachyceno *M. intracellulare* (4 případy), *M. avium-intracellulare* (1 případ), *M. xenopi* (11 případů) a jiné mykobakterie (20 případů), (ÚZIS ČR, 2020). Prvním případem nákazy *M. africanum* v ČR byl v roce 2011 nález u 29leté HIV pozitivní ženy z Nigérie. *M. africanum* je častým původcem TBC v Africe (Svobodová, 2013). *M. bovis* způsobuje TBC u skotu. Je přenosná na člověka, ale dnes je její výskyt v ČR raritní. V rozvojových zemích se ale vyskytuje běžně (Svobodová, 2013).

2.4 Patologický obraz tuberkulózy

Při vstupu mykobakterií do plic jsou mykobakterie po ingesci makrofágy zaneseny do lymfatických uzlin plicního hilu. Vlivem makrofágů a lymfocytů (T i B) dojde k buněčné imunitní odpovědi, kdy dochází k uvolnění mediátorů

zánětu (interleukinů, interferonu gama, tumor nekrotizujícího faktoru apod.) a tím se aktivuje buněčná obranná reakce a dochází ke tvorbě ložisek – granulomů. Granulom spolu s infikovanou lymfatickou uzlinou jsou označovány jako primární komplex. Pomocí lymfatických cest se odtud mykobakterie šíří dál (klouby, kosti, meningy, urogenitální systém, kůže,...) a vznikají zde granulomy sekundární. Vlivem nekrotizace granulomu dochází posléze k jeho rozpadu, tzv. kaseifikaci (zesýrovatění). Mykobakterie z malých granulomů jsou vlivem imunitní reakce organismu zničeny. Velké granulomy se ale opouzdří a kalcifikují. Tím jsou mykobakterie pro buňky imunitního systému nepřístupné a mohou zůstat v organismu různě dlouhou dobu v dormantní formě. Při oslabené imunitě může dojít k reaktivaci onemocnění. Mykobakterie se krevním řečištěm (miliární rozsev) dostávají do všech orgánů, kde dochází k tvorbě nových granulomů. Dojde ke generalizaci infekce (Ptáková, 2011).

Konkrétní změny na plicích se liší u primární a postprimární TBC. Jsou typické pro daný typ TBC.

U primární TBC se postižení může objevit v kterékoliv části plic. Je pro ni typické zvětšení paratracheálních lymfatických uzlin, častěji jednostranné. Může se objevit obstrukční emfyzém nebo komprese bronchů ze zanícených lymfatických uzlin, který často předchází atelektáze (pozn. atelektáza je kolaps průdušky a uzávěr části dýchacích cest v plíci, což způsobí nevzdušnost dané části plíce). Pravá plíce bývá postižena dvakrát častěji. Někdy může být jediným projevem primární TBC pouze izolovaný pleurální výpotek (Lyon et al., 2017).

Postprimární TBC se může projevit v kterékoliv části plic. Nejčastěji ale bývá postižen vrchní a zadní segment horních laloků nebo vrchní segment spodních laloků plic. Zvětšení lymfatických uzlin se objevuje zřídka. Léze jsou ohraničené a nepravidelných tvarů. Fibróza vede ke ztrátě objemu dané plíce. Zánět, fibróza a kalcifikace vykazují granulomatózní onemocnění, tuberkulózu (Lyon et al., 2017).

Aktivní TBC má charakter chronické nemoci. Zvýšená pozornost by se měla věnovat nemocným při projevech dlouhodobé únavy, subfebriliích, nočních poceních, při hubnutí, při dlouhodobém kašli zprvu bez sputa, poté produktivním (Ptáková, 2011).

2.5 Šíření tuberkulózy

Zdrojem bývá nemocný člověk, méně často zvíře (skot, kozy, vepř, psi,...). K přenosu dochází inhalační cestou (kapénková forma), kdy dochází k vdechnutí mykobakterií při kontaktu s nemocnou osobou. Mykobakterie jsou na kapičkách bronchiálního sekretu. Nebo může dojít k vdechnutí mykobakterií, které jsou ve vzduchu, kdy není nemocný přítomen.

Další možností přenosu nákazy je přímý kontakt. Tyto nákazy jsou spíše ojedinělé a často profesionálního původu, např. veterinární pracovníci, apod. Branou vstupu do těla člověka jsou plíce (85 – 90 %), (Homolka, 2016).

2.6 Dělení tuberkulózy

Z infikovaných lidí onemocní 5 – 10 % tuberkulózou. TBC dělíme na primární a postprimární.

Primární TBC

Jde o první kontakt člověka s mykobakteriální infekcí. Infekce se inhalací dostává do plic. Dochází k pomnožení mykobakterií (během 4 – 8 týdnů po infekci). Nespecifická alveolitida se poté během 10 dní mění na tuberkulózní specifický fokus – infekt. Ten obsahuje centrální nekrózu ohraničenou granulační tkání. Během pár hodin dochází k šíření mykobakterií přes lymfatický systém do regionálních uzlin. Dochází k jejich zvětšení. Zvětšené uzliny a zánět v plicích tvoří primární tuberkulózní komplex.

Primární TBC postihuje především děti, ojediněle dospělé. Z 90 % se primární TBC spontánně zhojí díky buněčné imunitě. Při pokračujícím zánětu dochází v plicích ke kaseifikaci a k plynulému šíření TBC do okolí. Po primární infekci dochází k šíření mykobakterií krví do dalších míst v plicích a do jiných orgánů (hematogenní šíření). Klinicky se nemusí manifestovat nebo se projeví ve formě meningitidy (Homolka, 2016).

Postprimární TBC

Projevuje se po několika letech u osob dříve infikovaných. Spouštěčem může být inhalace nových mykobakterií, progresse nebo reaktivace primární

TBC, tzn. reaktivace plicních nebo uzlinových komplexů nebo vznik extrapulmonální TBC v orgánech postižených při hematogenní infekci.

Postprimární TBC se objevuje u dospělých (Homolka, 2016).

2.7 Rizikové faktory

Mezi faktory, které mohou ovlivnit vznik a průběh TBC řadíme věk, pohlaví, dobu expozice, iatrogenní vlivy, přidružené nemoci (Homolka, 2016).

Věk

Nejčastěji se TBC projevuje u dětí do 5 let, kdy je riziko generalizované TBC a ve stáří, kdy je to dáno vlivem poklesu imunity (Homolka, 2016).

Pohlaví

Do 30 let častěji onemocní ženy, muži převažují ve středním a vyšším věku (Homolka, 2016).

Expozice

Nákazu ovlivňuje trvání a intenzita. Protrahovaná expozice je častá u některých profesí, kdy se TBC projeví jako nemoc z povolání (patologové, stomatologové, veterinární pracovníci,...) nebo jako TBC, která se objeví v rodině nemocného. Nahodilá (jednorázová) expozice je riziková pokud dojde k masivní mykobakteriální expozici (pacient s otevřenou formou TBC). Inkubační doba mezi nákazou a propuknutím onemocnění TBC je různá, může být v rozsahu 4 týdnů až 2 let (Homolka, 2016).

Iatrogenní vlivy

Jedná se především o léky snižující buněčnou imunitu jako glukokortikoidy, imunosupresiva, cytostatika a další. Řadíme je mezi rizikové faktory (Homolka, 2016).

Přidružené nemoci

Nemoci mohou zvýšit riziko nákazy nebo vyvolat reaktivaci TBC. Vliv mohou mít akutní virové infekce, malnutrice, nedostatek vitamínu D, chronická jaterní a ledvinná onemocnění, hematologické malignity, diabetes mellitus.

Další rizikové faktory mohou být vředová choroba žaludku, alkoholismus. Nejzávažnější je v současné době kombinace TBC a HIV infekce (Homolka, 2016).

Zvýšené riziko je u lidí se špatnými socioekonomickými podmínkami, jako jsou bezdomovci, nezaměstnaní, vězni, drogově závislí (Homolka, 2016).

2.8 Symptomy

Tuberkulóza plic může být asymptomatická. Je náhodně objevena při rentgenu hrudníku, mykobakteriologickém vyšetření sputa z jiných příčin, při zvratu tuberkulinové reakce (Homolka, 2016).

Asi u 3/4 nemocných se TBC projevuje příznaky, jako jsou nápadná únava, pokles fyzického i intelektuálního výkonu, nechutenství, hubnutí, zvýšená teplota, pocení ve spánku. Významný je kašel, zpočátku suchý, později produktivní, sputum, někdy s příměsí krve (hemoptýza), dušnost, pleurální bolest (Homolka, 2016, Global TB report 2015).

2.9 Diagnostika

Při diagnostice TBC pacient nejprve podstoupí klinické vyšetření prováděné lékařem (Ptáková, 2011) a dále rentgen hrudníku (Homolka, 2016).

Další formou je laboratorní diagnostika. Ta využívá mykobakteriologické vyšetření sputa, kdy jsou bakterie pozorovány ve vzorcích sputa, bronchiálního sekretu nebo jiných materiálů a určovány pod mikroskopem (Global TB report 2015, Homolka, 2016). Spadá sem mikroskopické a kulturační vyšetření, automatizované kulturační systémy a molekulárně biologické metody. Pomocí těchto metod lze prokázat mykobakterie z biologického materiálu během několika hodin nebo identifikovat již narostlé mykobakterie (Ptáková, 2011).

Komplikovaná je diagnostika TBC u starých lidí. Je to dáno přítomností chronických onemocnění, poruchou kognitivity, mentální zmateností, problémy v komunikaci, ztrátou sluchu apod. (Fernandová et al.; 2019).

2.9.1 Laboratorní diagnostika

Důležité je správné odebrání biologického materiálu (při podezření na TBC jsou odebrány různé biologické materiály) a jeho doprava do laboratoře. U plicních forem se odebírá sputum, bronchoalveolární laváž, pleurální výpotek, méně laryngální výtěr. U mimoplicních forem se odebírá mozkomíšní mok, moč, žaludeční obsah, stolice, stěry z hnisavých procesů apod. (Ptáková, 2011).

Laboratorní diagnostika zahrnuje mikroskopický a kultivační průkaz mykobakterií (Ptáková, 2011).

Mikroskopická diagnostika mykobakterií

Mikroskopie sputa je nejrychlejší (v řádu minut až několika hodin), ale též nejméně citlivou metodou (Homolka, 2016; Ptáková, 2011).

Mykobakterie jsou acidorezistentní tyčinky. Nález je možný, pouze pokud je v 1 ml sputa minimálně 50 000 – 100 000 mykobakterií (Homolka, 2016).

Vzorek se barví dvěma způsoby. Prvním způsobem je barvení fluorochromy, které jsou poté vyšetřeny fluorescenčním mikroskopem. Acidorezistentní tyčinky se projeví jako zářící žlutozelené až stříbřité tyčinky na temně červeném pozadí (Homolka, 2016).

Dalším způsobem je barvení kyselým karbolfuchsinem podle Ziehl-Neelsena. Acidorezistentní tyčinky jsou poté červené na zeleném nebo modrém pozadí (Homolka, 2016).

Fluorescenční metoda je rychlejší a citlivější než metoda dle Ziehl-Neelsena (Homolka, 2016). Je dosti využívána (Ptáková, 2011).

Kultivační diagnostika mykobakterií

Kultivační metoda je asi 1 000x citlivější, ale trvá přibližně 6 týdnů (Homolka, 2016). Umožňuje průkaz živých mykobakterií (Ptáková, 2011). Pokud se kultivací prokáže *Mycobacterium tuberculosis* komplex, je diagnóza nezpochybnitelná (Homolka, 2016).

Nejprve je nutné provést dekontaminaci vzorku, který nebyl sterilně získán (sputum, moč, bronchiální a žaludeční aspirát). Tento proces je nutný

kvůli dlouhé generační době mykobakterií. Na půdách jsou mykobakterie rychle přerostlé jinou bakteriální flórou, která může potlačovat či maskovat jejich růst.

Dekontaminace se provádí pomocí laurylsulfátu sodného nebo modifikovanou metodou dle Petroffa za použití louhu. Centrifugací získaný sediment se očkuje na kultivační půdu (Homolka, 2016).

Pro kultivaci se používají půdy s vaječnou emulzí jako je Lowenstein-Jensen medium nebo pevný agar, jako je Middlebrook medium (Moore et al., 2020). Půdy se dávají do termostatu při teplotě 37 °C s cirkulací vzduchu a vhodnou vlhkostí. Kultury se kontrolují po 3, 6 a 9 týdnech (Homolka, 2016).

2.9.2 Další metody diagnostiky

Nové metody rychlé kultivace jsou založeny na detekci metabolických produktů rostoucích mykobakterií v uzavřených systémech (BacT/ALERT) nebo na detekci spotřeby kyslíku během jejich růstu (Bactec), (Ptáková, 2011).

Mezi další moderní molekulárně biologické metody diagnostiky zahrnujeme detekci specifických úseků nukleových kyselin, které jsou typické pro konkrétní mykobakterie. Trvají několik hodin a přímo ze vzorku lze prokázat přítomnost mykobakterií (Ptáková, 2011). Patří sem *Mycobacterium tuberculosis* Direct test, polymerázová řetězová reakce, dále DNA fingerprinting (Homolka, 2016). WHO doporučuje Test Gene Xpert MTB/RIF, který umožňuje zjistit původce TBC a rezistenci na rifampicin (Wallenfels et al., 2018).

Nepřímé diagnostické metody jsou založeny na zjišťování stavu buněčné imunity pacienta. IGRA testy prokazují v krvi přítomnost interferonu gama. Ten je produkován specifickými lymfocyty, pokud již byly v kontaktu s *Mycobacterium tuberculosis*. Dále tuberkulinový test, kdy se hodnotí kožní reakce pozdní přecitlivělosti. Po 72 hod. od aplikace se měří velikost indurace. Pokud je větší než 5 mm, považuje se výsledek za pozitivní. Pozitivní výsledek se též získá i u osob očkovaných BCG vakcínou. Zde velikost indurace určuje, zda se jedná o postvakcinační nebo postinfekční imunitu (Ptáková, 2011).

2.10 Léčba

Vhodná léčba, která zahrnuje počet, dávku a délku působení léčiv, by měla být založena na zjištěné citlivosti mykobakterie, dostupnosti léčiva a závažnosti nemoci (Albanna et al., 2011). Taky včasná identifikace vzniku rezistence pomůže celosvětově minimalizovat použití potenciálně neúčinných látek (Köser et al., 2015).

Základem léčby TBC je kombinace antituberkulotik po dobu 6–12 měsíců. Dle rozsahu onemocnění TBC, přítomnosti dalších onemocnění, kombinace antituberkulotik se odvíjí i délka léčby. Antituberkulotika se podávají buď v denním nebo intermitentním režimu (3x týdně). Kvůli heterogenitě mykobakterií a primárně rezistentním kmenům je výhodné dlouhodobé a kombinované podávání antituberkulotik (Homolka, 2016).

Onemocnění je léčitelné a dá se mu předcházet. Šíří se vzduchem pomocí kapénkové infekce. Bez léčby je úmrtnost na TBC vysoká (Global TB report 2015). Část mykobakterií je v granulomech, abscesech nebo kavitách, kam se antituberkulotika hůře dostávají. Čím déle je tedy pacient bez léčby, tím více je v něm spících mykobakterií a vyšší riziko recidiv TBC (Wallenfels et al., 2018).

Cílem léčby je zničení mykobakterií a sterilizace tuberkulózních lézí. Jednotlivá antituberkulotika mají různý mykobaktericidní a sterilizační účinek. Mykobaktericidní účinek mají isoniazid (nejvyšší), rifampicin a streptomycin. Sterilizační účinek, který umožňuje usmrtit semidormantní mykobakterie, má pyrazinamid (nejvyšší) a rifampicin, nižší má isoniazid (Homolka, 2016; Wallenfels et al., 2018).

K léčbě TBC se používají látky, které řadíme mezi antituberkulotika. Jedná se o látky chemicky rozdílné. Mohou být syntetické, polosyntetické nebo látky přírodního původu. Pro úspěšnou léčbu je nutná kombinace látek s různými mechanismy účinku, aby nedošlo ke vzniku rezistence (Hartl et al., 2012).

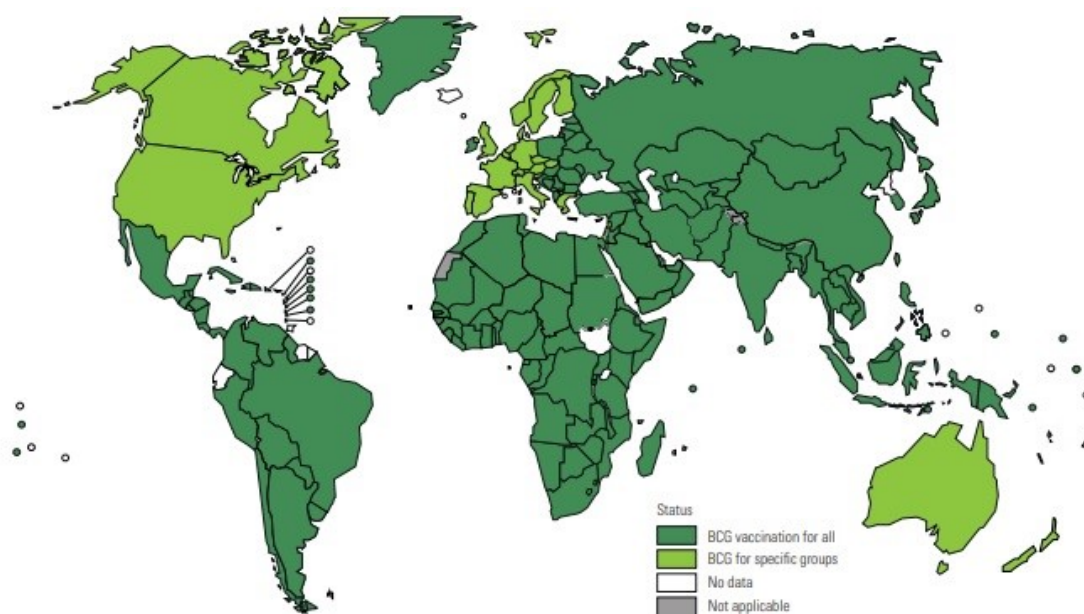
2.11 Očkování

Povinné očkování oslabeným kmenem mykobakterie bovinního typu (Bacillus Calmette-Guérin-BCG) u nás probíhalo od roku 1953 do roku 2010

(Homolka, 2016). Vakcína byla vytvořena z oslabeného živého kmene *M. bovis* dvěma francouzskými vědci, Albertem Calmettem a Camillem Guérinem (Tang et al., 2016).

I když byla vyvinuta přibližně před sto lety, je v současnosti jedinou vakcínou k prevenci vzniku TBC. Očkování chrání před šířením vážných forem TBC u dětí a současně působí preventivně před plicním onemocněním u dětí a dospělých (Sia et al., 2019).

WHO doporučuje zemím s vysokou incidencí TBC, aby byla BCG vakcína poskytnuta všem dětem co nejdříve po narození, jako součást imunizačního programu. V zemích s nízkou incidencí TBC je vakcinace doporučena novorozencům a dětem z rizikových skupin nebo dětem, které mají negativní kožní test na TBC (Global TB report 2020).



Obr. 6: BCG vakcinace ve světě
(zdroj: Global TB report 2020; 6. 2. 2021)

V roce 2019 byla podána zpráva o zkoušené vakcíně M72/AS01E proti TBC, která je ve fázi výzkumu. Po 3 letech sledování byla účinnost vakcíny stanovena na 50 %. Pokud se tyto výsledky potvrdí v širší studii, mohlo by to změnit přístup v prevenci TBC. Boj s TBC bude potřebovat více než jen jeden typ vakcíny. Vakcíny, které budou fungovat odlišným způsobem. Jedna, která

ochrání před infekcí (před expozicí) a dále vakcína, která zabrání progresi onemocnění (po expozici), (Global TB report 2020).

2.12 Rezistence

Rezistenci můžeme dělit na primární a sekundární (Homolka, 2016). Aby se předešlo vzniku rezistence, využívá se k léčbě TBC kombinace alespoň tří léčiv. Rezistence může být též způsobena nevhodnou preskripcí nebo délkou působení účinných látek, dále non-adherencí k léčbě nebo nedostatečnou koncentrací látky v krvi kvůli interakci léčiv nebo malabsorpci, zvláště při koinfekci HIV (Albanna et al., 2011).

2.12.1 Primární rezistence

Tato rezistence mykobakterií na léčiva je přirozená, tzv. primární rezistence. Je dána genetickou vlastností mykobakterií. *Mycobacterium* nereaguje na léčbu antituberkulotiky u člověka, který do té doby nebyl léčen. V ČR není příliš častá (Homolka, 2016).

2.12.2 Sekundární rezistence

Sekundární rezistence nastane, pokud se mykobakterie v průběhu léčby staly rezistentní na antituberkulotika, vůči kterým byly původně citlivé. Jde o výsledek nesprávně vedené léčby TBC (Homolka, 2016). Rezistence může vzniknout na jedno nebo více léčiv (drug-resistant tuberculosis DR-TBC), (Albanna et al., 2011)

Multirezistentní tuberkulóza

V případě rezistence vůči dvěma nejúčinnějším antituberkulotikům, isoniazidu a rifampicinu, mluvíme o multirezistenci (multi-drug resistant tuberculosis MDR-TB), (Albanna et al., 2011; Homolka, 2016).

Vzniká při nedodržování zásad chemoterapie TBC. Nemocný se musí léčit kombinací antituberkulotik první a druhé linie a dalšími léky. Léky mimo první linii jsou nejen dražší, ale taky méně účinné a toxičtější. Je nutno stanovit citlivost mykobakteriálního kmene na antituberkulotika. Poté je léčebný režim

sestaven z kombinace 4 léků, na které je kmen citlivý. Léčba je nákladná a dlouhá (Homolka, 2016). V případě MDR-TB se léčba prodlouží na minimálně 20 měsíců, oproti TBC bez rezistence, která se dá vyléčit za 6 měsíců (Gama et al., 2016). Podaří se vyléčit přibližně 40 – 80 % nemocných (Homolka, 2016).

Extenzivně rezistentní tuberkulóza

Dalším stupněm rezistence je extenzivně rezistentní tuberkulóza (XDR-TB), kdy včetně rezistence na isoniazid a rifampicin nejsou mykobakterie navíc rezistentní vůči jednomu ze tří injekčních antituberkulotik 2. řady, amikacin, kapreomycin a kanamycin, a jedno fluorochinolonové antibiotikum (Albanna et al., 2011; Gandhi et al., 2010; Homolka, 2016; Jandourek et al., 2014).

XDR-TB vzniká jako důsledek nevhodně léčené MDR-TB (při nedodržení kontrovaného léčebného režimu), (Homolka, 2016). XDR-TB je spojena s vysokou mortalitou a u pacientů s touto formou rezistence je požadováno dlouhodobější trvání léčby (Albanna et al., 2011). Léčba je ještě nákladnější než u MDR-TB. Podaří se vyléčit asi 40 % případů (Homolka, 2016).

Totální léková rezistence

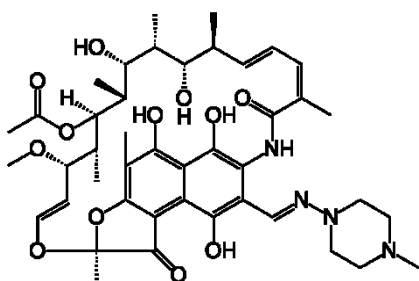
Totální léková rezistence je charakterizována jako rezistence na všechny antituberkulotika 1. i 2. linie. Jedná se především o isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, streptomycin, ethambutol, dále ethionamid, kyselina *p*-aminosalicylová, amikacin, cykloserin, ofloxacin, kapreomycin, kanamycin, ciprofloxacin atd. WHO zatím oficiálně nepodpořila termín totální léková rezistence TBC a definice, kterých léčiv se přesně týká, stále není úplně dána. Se schválením nových léků bedachilinu, delamanidu a linezolidu americkou FDA a evropskou EMA však existuje naděje na vznik řešení pro TDR-TB. Musí se stanovit citlivost těchto léků na kmeny způsobující TDR-TB (Parida et al., 2015).

2.13 Antituberkulotika první linie

Mezi antituberkulotika první linie, tzn. léčiva, která se užívají v prvních měsících léčby, řadíme (Wallenfels et al., 2018):

rifampicin	(RIF)
pyrazinamid	(PZA)
isoniazid	(INH)
ethambutol	(ETH)
streptomycin	(STR)

Rifampicin



Vlastnosti

Patří do skupiny ansamycinových antibiotik izolovaných z *Nocardia mediteranei*. Jedná se o polosyntetický derivát a léčivo první volby v terapii TBC (Hartl et al., 2012). Má mykobaktericidní účinek (Homolka, 2016). Při léčbě TBC se rifampicin podává perorálně s isoniazidem, ethambutolem nebo jiným antituberkulotikem (Katzung, 1995). Prostupuje do všech tělesných tkání a tekutin (Homolka, 2016). Časté jsou lékové interakce s perorálními antidiabetiky, kontraceptivy, antikoagulancii, digoxinem a glukokortikoidy (Homolka, 2016). Lze jej podávat těhotným ženám. Je dobře snášen (Homolka, 2016).

Nevýhodou je vysoká cena, kvůli čemuž je málo podáván v rozvojových zemích (Homolka, 2016).

Mechanismus účinku

Působí inhibičně na DNA-dependentní RNA polymerázu mykobakterií (Homolka, 2016; Katzung, 1995).

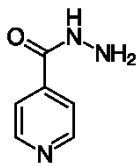
Nežádoucí účinky

Zbarvuje pot, moč, sputum, slzy a další tělesné tekutiny do oranžova. Mezi další nežádoucí účinky patří vyrážky, poruchy jaterních funkcí, zažívací potíže (nauzea, zvracení, bolesti a křeče v břiše, průjem). Může vyvolávat chřipkové potíže, tzv. flu-like syndrom (Katzung, 1995; Lüllmann, 2004).

Pyrazinamid

Antituberkulotikum první linie (Homolka, 2016). Více se mu věnuji v části 2.15. Pyrazinamid.

Isoniazid



Vlastnosti

Při citlivosti mykobakterií a toleranci pacienta je isoniazid nejúčinnějším antituberkulotikem. Je strukturním analogem pyridoxinu, proto by se při léčbě isoniazidem měl podávat pyridoxin jako prevence vzniku neuritidy. Dobře se vstřebává po perorálním podání, ale lze ho podat i parenterálně. Při léčbě se podává společně s dalšími antituberkulotiky (např. rifampicinem, ethambutolem aj.), (Katzung, 1995; Lüllmann, 2004).

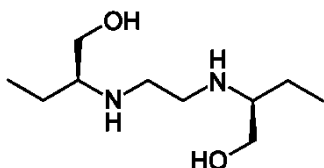
Mechanismus účinku

Působí selektivně a baktericidně na rostoucí *Mycobacterium tuberculosis*, na neaktivní formy působí bakteriostaticky (Wallenfels et al., 2018). Jeho mechanismus účinku je inhibice syntézy mykolových kyselin v buněčné stěně mykobakterií (Vilchère et al., 2019).

Nežádoucí účinky

Nežádoucí účinky, které se mohou projevit, závisí na délce a dávce isoniazidu. Patří sem horečka, kožní vyrážky, hepatitida, dále toxické projevy na nervový systém projevující se jako periferní neuritida, nespavost, závratě, bolesti hlavy, neklid, svalové záškuby apod. Zmíněným nervovým potížím lze předejít podáváním pyridoxinu (Katzung, 1995; Lüllmann, 2004).

Ethambutol



Vlastnosti

Jedná se o syntetickou látku. Jeho účinek je mykobakteriostatický. Má minimum nežádoucích účinků. Dobře se vstřebává po perorálním podání (Homolka, 2016). Rychle se u něj při monoterapii rozvíjí rezistence, proto se používá v kombinaci s dalšími antituberkulotiky (Katzung, 1995; Lüllmann, 2004).

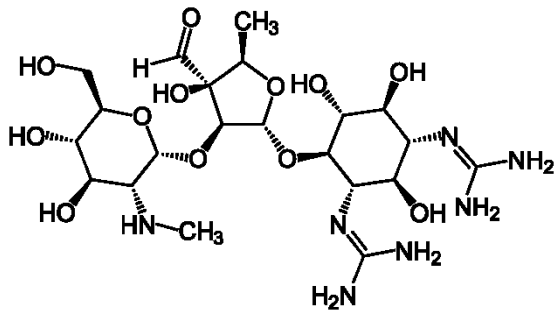
Mechanismus účinku

Mechanismem účinku je inhibice enzymu arabinosyl transferázy, který je nutný pro syntézu arabinogalaktanu v buněčné stěně mykobakterií (Mahedra et al., 2016; Zhu et al., 2018).

Nežádoucí účinky

Nežádoucí účinky jsou vzácné, např. alergické reakce, leukopenie, poškození ledvin, dále se mohou projevit poruchy vidění, které po vysazení ethambutolu mizí (Katzung, 1995; Lüllmann, 2004). U nemocných s poruchou funkce ledvin je nutno redukovat dávky (Homolka, 2016).

Streptomycin



Vlastnosti

Streptomycin byl první lék proti TBC (Homolka, 2016). Jedná se o aminoglykosid izolovaný z kmene *Streptomyces griseus*. Působí baktericidně. (Katzung, 1995; Lüllmann, 2004). Dnes je jeho využití hlavně při léčbě recidiv TBC (Wallenfels et al., 2018). Používá se pouze v kombinaci s dalšími antituberkulotiky, protože na něj vzniká rychle rezistence. Z trávicího traktu se pro svou vysokou polaritu téměř nevstřebává a podává se intramuskulárně, popř. intratekálně (Katzung, 1995; Lüllmann, 2004).

Nežádoucí účinky

Nežádoucí účinky se projevují hlavně při dlouhodobé léčbě jako horečka, kožní vyrážky, apod. Mezi toxické projevy můžeme zařadit ototoxicitu, vertigo a ztrátu rovnováhy (Katzung, 1995; Lüllmann, 2004). Má nefrotoxický účinek, je tedy třeba při léčbě kontrolovat renální funkce nemocného. Při nedostatečné funkci ledvin je nutno dávku redukovat a prodloužit dávkovací interval. Jeho účinek je teratogenní a nesmí se podávat těhotným (Homolka, 2016).

2.14 Antituberkulotika druhé linie

Spadají sem látky, které se používají v případě rezistence na antituberkulotika první linie nebo při nedostatečném účinku při léčbě antituberkulotiky první linie. Antituberkulotika druhé linie se vyznačují větší toxicitou (Katzung, 1995).

Řadíme sem např. (dle Mahedra et al., 2016):

kapreomycin

cykloserin

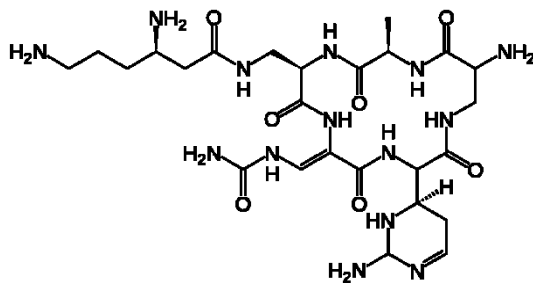
kyselina *p*-aminosalicylová

ethionamid

amikacin, kanamycin

a další (fluorochinolony jako moxifloxacin, ofloxacin)

Kapreomycin



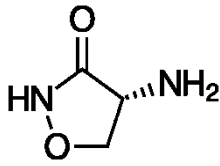
Vlastnosti

Kapreomycin je aminoglykosidovým antibiotikem izolovaným ze *Streptomyces capreolus*. Má mykobaktericidní účinek. Podává se intramuskulárně (Homolka, 2016; Katzung, 1995).

Nežádoucí účinky

Toxicita kapreomycinu spočívá v poškození ledvin, poškození osmého nervu, což vyvolává hluchotu (Katzung, 1995).

Cykloserin



Vlastnosti

Antibiotikum tvořené plísní *Streptomyces orchidaceus*. Působí bakteriostaticky. (Homolka, Tuberkulóza 2016). Vstřebává se po perorálním podání (Katzung, 1995).

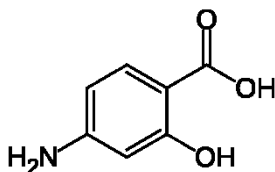
Mechanismus účinku

Inhibuje syntézu buněčné stěny (Homolka, 2016). Konkrétně inhibuje enzym alaninracemázu a tím dochází k inhibici syntézy peptidoglykanu v buněčné stěně (Katzung, 1995).

Nežádoucí účinky

Mezi jeho toxické reakce patří poškození centrální nervové soustavy spojené s bolestí hlavy, tremorem, dále křeče nebo psychotické reakce (Katzung, 1995).

Kyselina *p*-aminosalicylová



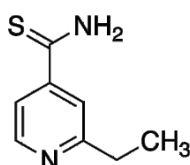
Vlastnosti

Kyselina *p*-aminosalicylová se dobře vstřebává po perorálním podání. Při dlouhodobé terapii se používala v kombinaci s isoniazidem anebo streptomycinem. Pro své nežádoucí účinky se již používá méně (Katzung, 1995).

Nežádoucí účinky

Např. gastrointestinální potíže jako nauzea, anorexie, průjem, bolest a pálení epigastria, dále poruchy ledvin a jater, léková horečka, bolesti kloubů, vyrážky apod. (Katzung, 1995).

Ethionamid



Vlastnosti

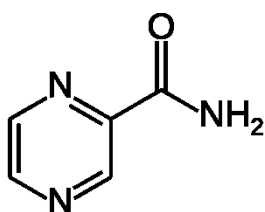
Chemicky je příbuzný isoniazidu. Vzniká na něj rychle rezistence (Katzung, 1995). Má mykobakteriostatický účinek. Podává se perorálně. Do ČR se nedováží (Homolka, 2016).

Nežádoucí účinky

Silně dráždí žaludek a tím vyvolává neurologické poruchy (Katzung, 1995).

2.15 Pyrazinamid

Řadí se mezi antituberkulotika první linie (Homolka, 2016).



2.15.1. Vlastnosti

Pyrazinamid (PZA), amid kyseliny pyrazin-2-karboxylové. Působí pouze na intracelulární mykobakterie v kyselém prostředí, při neutrálním pH je inaktivní. Má baktericidní účinek a současně i sterilizační (v kyselém prostředí makrofágu a akutním zánětu). Jeho účinnost je nejvyšší v počátečních stádiích

zánětu. Při postupném zvyšování pH se snižuje i jeho baktericidní aktivita (SUKL). Po perorálním podání se dobře vstřebává (Homolka, 2016; Katzung, 1995; Lüllmann, 2004).

Dokáže usmrtit dormantní formy mykobakterií (Jand'ourek et al., 2017). Je proto podáván v prvních 2 měsících léčby a tak dokáže zkrátit délku trvání léčby na 4–6 měsíců (Homolka, 2016). Současně snižuje četnost recidiv (Katzung, 1995; Lüllmann, 2004).

Je to lék první volby u krátkodobého režimu (Homolka, 2016).

2.15.1 Mechanismus účinku

PZA samotný je proléčivo, pro účinek je nutná jeho transformace přes mykobakteriální enzym na pyrazinovou kyselinu, aktivní formu PZA. I když přesný mechanismus účinku PZA není znám, předpokládá se, že u něj existuje více mechanismů účinku (Anthony et al., 2016).

Jedním z nich je jeho aktivace přes enzym pyrazinamidázu na pyrazin-2-karboxylovou kyselinu, která je aktivním metabolitem. Tato látka snižuje pH v mykobakteriálních buňkách, což způsobí inhibici membránového transportu a vede k buněčné smrti mykobakterie. Mutace genu *pncA*, který kóduje tento enzym, způsobuje rezistenci mykobakterií na PZA (Jand'ourek et al., 2017; Jand'ourek et al., 2014).

Další možný mechanismus účinku je spojen s enzymem syntázou mastných kyselin typ 1 (fatty acid synthase I - FAS I). Inhibice enzymu FAS I vede k nedostatku mykolové kyseliny a k narušení funkce mykobakteriální buněčné membrány. Buněčná membrána je esenciální pro mykobakterie a při jejím narušení dochází k jejich smrti. Tento mechanismus PZA je odmítán, protože inhibice není dostatečně silná. Ovšem u některých derivátů PZA, jako je 5-chlorpyrazinamid, byl prokázán tento mechanismus účinku (Jand'ourek et al., 2017; Jand'ourek et al., 2014).

Jeden z výzkumů (Zhang, X.) navrhuje jako možný mechanismus účinku PZA inhibici *trans*-translace. Ta je důležitá pro přežití a virulenci mykobakterií a její inhibice vede k zablokování proteosyntetického aparátu v ribozomech a k buněčné smrti (Jand'ourek et al., 2014; Jand'ourek et al., 2017). Ovšem

studie autorů Dillon et al. (2017) pozorovala, že pyrazinamid nepůsobí v inhibici *trans*-translace. Vyslovili však domněnku, že jeho mechanismus účinku souvisí s metabolismem koenzymu A (Dillon et al., 2017). Ve studii autorů Gopal et al. (2017) ověřili, že aktivní forma PZA, kyselina pyrazin-2-karboxylová, inhibuje bakteriální syntézu koenzymu A, esenciální kofaktor mnoha metabolických dějů, vazbou na aspartát dekarboxylázu *panD* (Gopal et al., 2017).

2.15.2 Nežádoucí účinky

Mezi nežádoucí účinky PZA patří hepatotoxicita, zvláště při vyšších dávkách, dále zvracení, nevolnosti, léková horečka (Katzung, 1995; Lüllmann, 2004). Snižuje tubulární sekreci kyseliny močové a tím vyvolává dnu. Může vyvolat kožní alergický exantém. Nesmí se podávat u lidí s poruchou funkce jater (Homolka, 2016).

2.16 Obměny pyrazinového cyklu

Vzhledem k neúspěšným pokusům při léčbě TBC kvůli rezistentním kmenům je snaha o získání nových více bezpečných a účinných látek v léčbě TBC. Jsou dva způsoby, jak tohoto docílit. Jedním je neobvyklá molekulární diverzita a druhým je syntetická obměna původní látky (Doležal et al., 2008).

Ve své práci se zaměřuji na deriváty pyrazinu. Při obměnách pyrazinového jádra se osvědčila substituce, tzn. alkylace nebo halogenace (Hartl et al., 2012). Předchozí studie ukázaly, že alkylace, amidace nebo aroylace pyrazinového cyklu nebo substituce pyrazinu chlorem může zvýšit antituberkulotickou anebo antifungální aktivitu v řadě funkčních derivátů pyrazinkarboxylové kyseliny (Doležal et al., 2008).

2.17 Nová léčiva a léčebné režimy v léčbě TBC

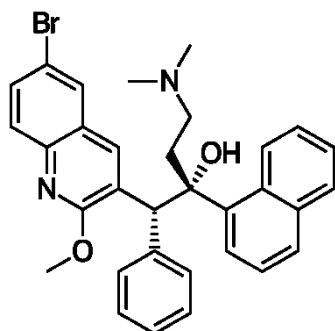
Současné léčebné režimy TBC požadují kombinaci několika léčiv, které se budou používat v rozmezí 6 měsíců u TBC citlivé na daná léčiva a 6–20 měsíců u rezistentní TBC (MDR-TB). Hlavní výzvou v léčbě TBC je délka a složitost léčebných režimů, toxicita (hlavně u antituberkulotik 2. linie, které se používají u lékově-rezistentní TBC) a omezená dostupnost pediatricky

uzpůsobených léků (především antituberkulotika 2. linie). Důvody pro špatnou dostupnost pediatrických léků jsou komplexní. Roli hraje nedostatek tržní síly, váhavost zahrnout do klinických studií děti a těhotné ženy a nedostatečné financování pediatrického výzkumu.

Léčba TBC u lidí HIV pozitivních je mnohem komplikovanější v lékových interakcích mezi antituberkulotiky a antiretrovirotiky. Je vyvíjen tlak na režimy, které jsou efektivnější, levnější a netoxické a které zkracují délku trvání léčby, zvláště u lékově-rezistentní TBC (Global TB report 2020).

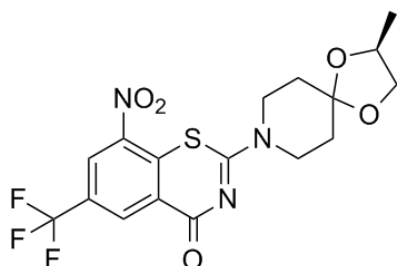
2.17.1 Nové sloučeniny

Bedachilin



Bedachilin se používá u MDR-TB dospělých u dlouhodobého léčebného režimu (9–12 měsíců), (Global TB report 2020). Jedná se o inhibitor ATP syntázy (Ehrt et al., 2018). Vždy se podává se 4 dalšími antituberkulotiky. Jeho nevýhodou je vysoká cena (Wallenfels et al., 2018).

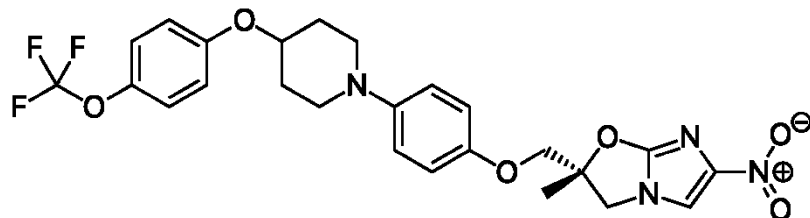
BTZ-043



BTZ-043 je sloučenina benzothiazinu, jejíž mechanismus účinku spočívá v inhibici enzymu DprE1, který je nutný pro syntézu D-arabinofuranózy v buněčné stěně *Mycobacterium tuberculosis*. Studie, která hodnotí

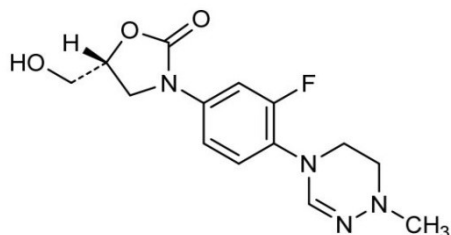
bezpečnost, toleranci, bakteriální aktivitu a farmakokinetiku opakovaných perorálních dávek, probíhá v Jižní Africe (Global TB report 2020).

Delamanid



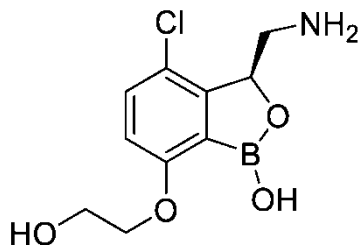
Delamanid se stejně jako bedachilin používá u perorálních léčebných režimů (WHO report 2020) u MDR-TB dospělých, kde byla prokázána rezistence nebo intolerance léků (Wallenfels et al., 2018). Existují výzkumy zabývající se použitím delamanidu u dětí pod 6 let (Global TB report 2020). Nevýhodou je vysoká cena (Wallenfels et al., 2018).

Delpazolid



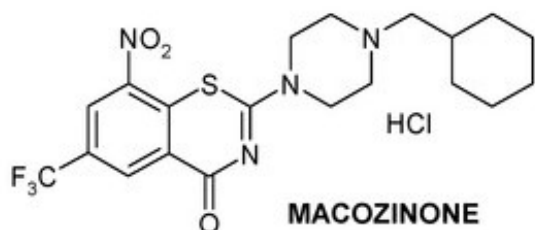
Delpazolid (LCB01–0371) je nový oxazolidinon (Global TB report 2020).

GSK-3036656



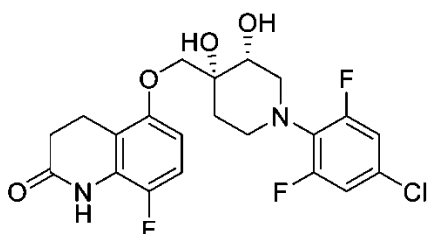
GSK-3036656 patří do nové chemické třídy oxaborolových sloučenin vyvinutých firmou GaxoSmithKline (Global TB report 2020).

Macozinone



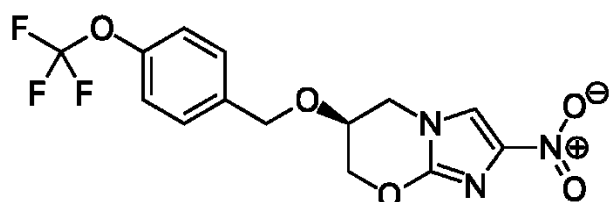
Macozinone (dříve PBTZ169) je benzothiazinon (Global TB report 2020).

OPC-167832



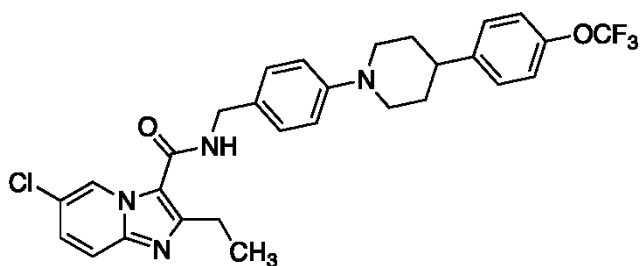
OPC-167832 je látka, která má baktericidní účinek na rostoucí i intracelulární bakterie (Global TB report 2020).

Pretomanid



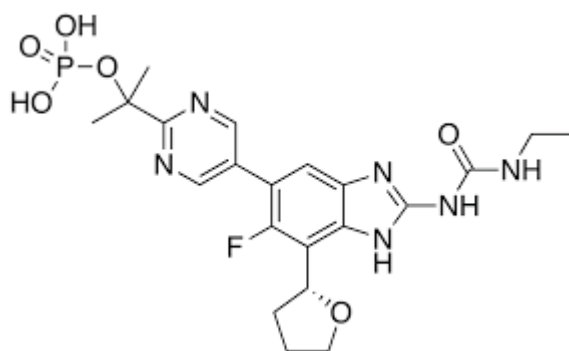
Pretomanid je nitroimidazol. Byl nedávno doporučen WHO k léčbě fluorochinolonově rezistentní MDR-TB (v kombinaci s bedachilinem a linezolidem). V současnosti probíhá testování na TBC a na lékově rezistentní TBC (Global TB report 2020).

Telacebec (Q203)



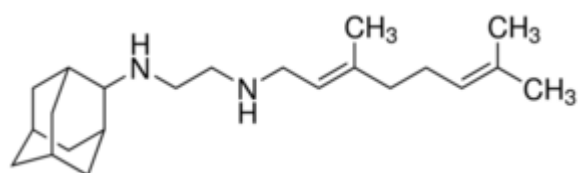
Telacebec (Q203) je imidazopyridin (Global TB report 2020).

SPR720



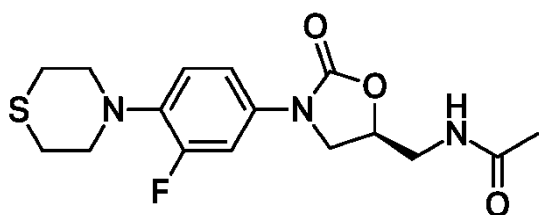
SPR720 je perorálně podávané antibiotikum, které bylo původně vyvinuto k léčbě plicní netuberkulotické mykobakteriální infekce (Global TB report 2020).

SQ109



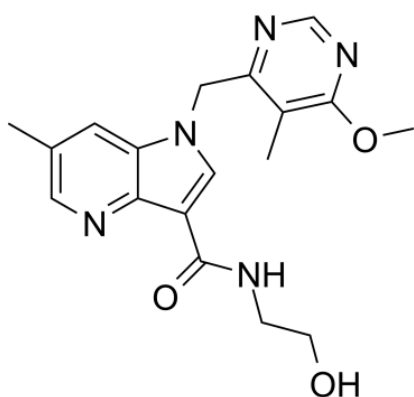
SQ109 je nové léčivo. Tisková zpráva z roku 2017 poukazuje na jeho bezpečnost, účinnost a snášenlivost. Jsou plánované další studie tohoto léčiva (Global TB report 2020).

Sutezolid



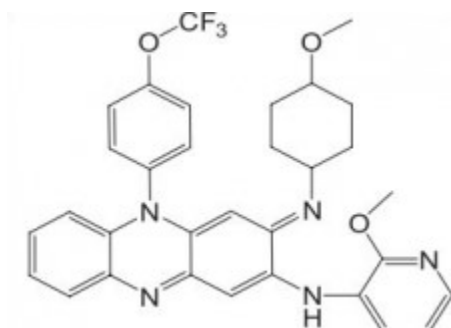
Sutezolid (PNU-100480) je oxazolidinon a analog linezolidu (Global TB report 2020).

TBA-7371



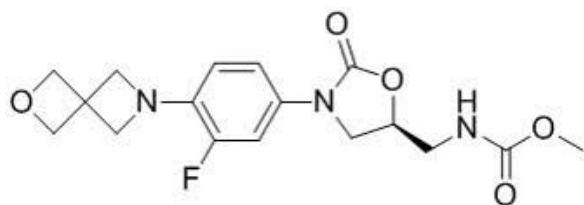
Látka TBA-7371 je inhibitor enzymu DrpE1, který je nutný pro syntézu částí buněčné stěny mykobakterií. Je účinný proti kmenům *Mycobacterium tuberculosis*, které jsou rezistentní na známé antituberkulotika (Global TB report 2020).

TBI-166



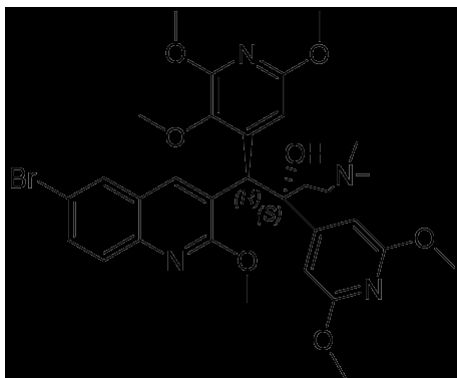
TBI-166 je látka, která patří do stejné třídy jako klofazimin a má podobnou účinnost (Global TB report 2020).

TBI-223



Látka TBI-223 je sloučenina oxazolidinonu a inhibuje syntézu bílkovin. Ve svém mechanismu účinku cílí na krok, kdy se *N*-formylmethionyl-tRNA váže na ribozom (Global TB report 2020).

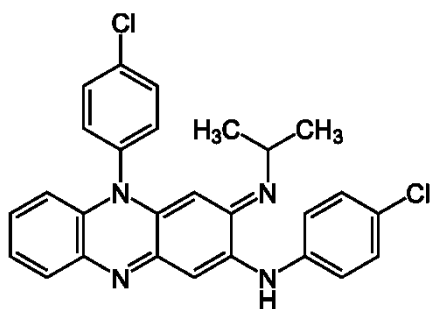
TBAJ-876



TBAJ-876 je látka, která vykazuje potenciální aktivitu proti TBC za použití nižší klinické dávky s bezpečnějším profilem (v porovnání s bedachilinem), (Global TB report 2020).

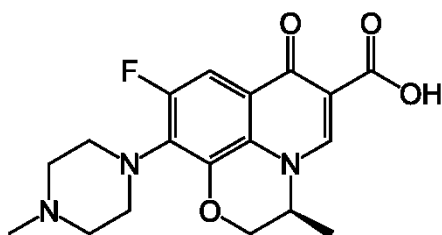
2.17.2 Schválené léky, které se testují pro nové účely

Klofazimin



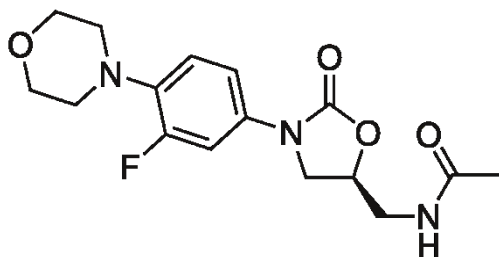
Klofazimin je lék, který se používá k léčbě lepry a je též doporučován k léčbě MDR-TB. Studie jeho použití probíhají (Global TB report 2020).

Levofloxacin



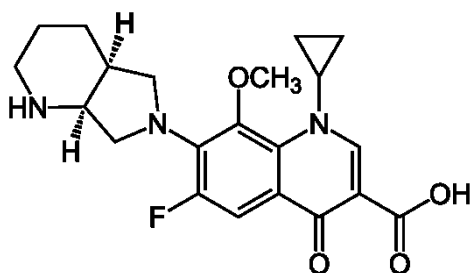
Levofloxacin je doporučován k léčbě isoniazid-rezistentní TBC. Je jeden z hlavních léků u dlouhodobých lékových režimů u MDR-TB. Další výzkumy jeho použití (různé dávky, použití u lékově rezistentní TBC, plicní TBC) pokračují (Global TB report 2020).

Linezolid



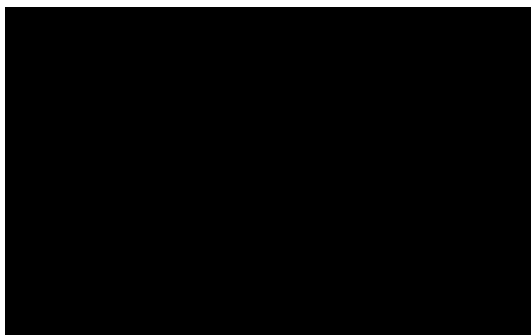
Linezolid je lék s potenciální aktivitou proti TBC. Je též jeden z hlavních léků u dlouhodobých léčebných režimů u MDR-TB. Další studie jsou v procesu (Global TB report 2020).

Moxifloxacin



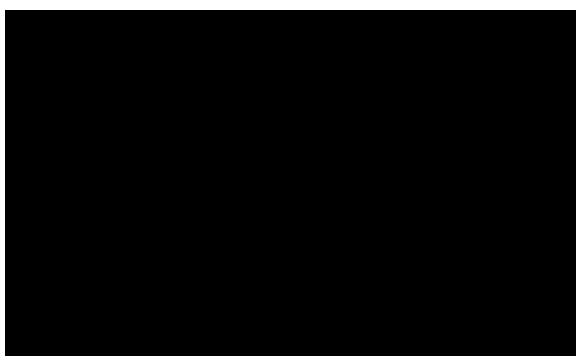
Moxifloxacin je jedním z hlavních léků u dlouhodobých režimů u MDR-TB. Studie jeho použití u TBC citlivé na léky a lékově rezistentní TBC dále pokračují (Global TB report 2020).

Rifampicin (vysoká dávka)



Poznatky ze studie Multi-ARM, Multi-Stage TBC (publikované v roce 2017) informují o tom, že dávka 35 mg/kg rifampicinu, podávaná déle než 12 týdnů, je bezpečná a zkracuje dobu potřebnou ke konverzi pozitivních bakteriálních kultur na negativní a to z 68 dnů na 42 dnů. Jiná klinická hodnocení posuzují různé kombinace dávek 10 mg/kg nebo 20 mg/kg rifampicinu, moxifloxacinu a SQ109. Ty ale nedosáhly značného zlepšení v porovnání s kontrolní klinickou studií. Pokud by se tyto poznatky promítly do klinické studie, v níž by se rifampicin podával v dávce 35 mg/kg v délce 12 týdnů, daly by se očekávat lepší léčebné výsledky. Tato metoda byla úspěšně použita na několika místech v zemích s vysokou incidencí TBC. Jiná studie (RIFASHORT) vyhodnocuje výhody a bezpečnost podání vyšších dávek rifampicinu u pacientů s TBC (Global TB report 2020).

Rifapentin



Efektivní použití rifapentinu v léčbě TBC bylo hodnoceno několika studiemi. Bylo např. hodnoceno jeho použití s a bez moxifloxacinu ke zkrácení léčby plicní TBC na 4 měsíce (Global TB report 2020).

2.17.3 Léčebné režimy

Režimy léčby TBC se stanovují dle toho, zda se jedná o nově vzniklé onemocnění, recidivu nebo rezistentní formu TBC. Využívá se kombinovaných léčebných režimů, jejichž vhodnost je dána i tím, že některá antituberkulotika působí na rychle se dělící bakterie (baktericidní účinek) a některá na perzistující (sterilizující účinek), (Wallenfels et al., 2018).

Nově nemocnému pacientovi je podávána 2 měsíce čtyřkombinace isoniazidu, rifampicinu, pyrazinamidu a ethambutolu, poté následuje 4 měsíční pokračovací fáze s dvojkombinací isoniazidu a rifampicinu. V České republice je pacient obvykle první 2 měsíce hospitalizován a zbylé 4 měsíce je léčen většinou ambulantně (Wallenfels et al., 2018).

U recidiv TBC je situace složitější. Je nutné stanovit MDR-TB (pomocí molekulárních testů jako PCRGeneXpert). Léčba základními antituberkulotiky je prakticky nemožná, kvůli neúčinnosti a růstu rezistence. Dle doporučení WHO se doporučují léčiva 2. linie. Léčebný režim se stanovuje po vyšetření pacienta a jeho citlivosti k antituberkulotikům. Nové režimy jsou dle doporučení WHO perorální a bez aminoglykosidů. Příkladem je pětikombinace moxifloxacinu, bedachilinu, linezolidu, cykloserinu a klofaziminu po dobu 14 měsíců. Někdy je nutný i chirurgický zákrok k odstranění perzistujících kaveren (Wallenfels et al., 2018).

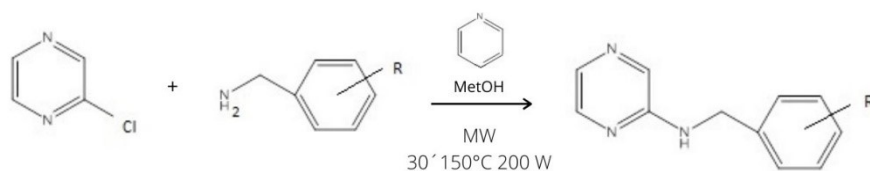
3 Cíl práce

Cíle mé práce byly:

- a. obměna pyrazinového jádra benzylaminem s různými substituenty a získání derivátů pyrazinu
- b. příprava a hodnocení vztahu mezi strukturou a účinkem u pyrazinových derivátů na bakteriální, fungální a mykobakteriální kmeny

4 Experimentální část

V této práci se využívá aminodehalogenační reakce, kdy reaguje 2-chlorpyrazin se substituovaným benzylaminem v mikrovlnném reaktoru. Získá se sloučenina obecného vzorce:



4.1 Použité přístroje a látky

Použité přístroje

Mikrovlnný reaktor CEM Discover (30', 150 °C, 200 W)

software CEM's Synergy

CombiFlash Rf chromatograf

TLC (vyvíjecí soustava ethylacetát - benzin = 1:1)

UV lampa (vlnová délka 254 nm)

vakuová odparka

bodotávek Stuart Scientific (t_r)

Použité výchozí látky a rozpouštědla

2-chlorpyrazin

substituovaný benzylamin

methanol - rozpouštědlo

pyridin - vychytávání vzniklého chlorovodíku

4.2 Postup práce

V mikrovlnném reaktoru se nechaly reagovat výchozí látky 2-chlorpyrazin a substituovaný benzylamin. Rozpouštědlem byl methanol, pyridin sloužil k vychytávání vzniklého chlorovodíku. Délka reakce byla 30 min, teplota 150 °C a výkon 200 W. Tyto podmínky byly zvoleny na základě zkušeností z již provedených syntéz derivátů pyrazinu, které se na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy provádí. Výhodami mikrovlnného reaktoru jsou větší výtěžek a kratší reakční doba. Reakce probíhají za vyšší teploty než je běžná teplota varu a za vyššího tlaku. Podmínkou je ale použití polárních rozpouštědel (Jandourek et al., 2014).

Po syntéze se k ověření průběhu reakce provedla TLC (Thin Layer Chromatography). K separaci vzniklých látek se použil přístroj CombiFlash. Jedná se o preparativní chromatograf. Pevným základem byl silikagel a mobilní fází/rozpouštědlem hexan a ethylacetát. Pomocí tlaku prochází vzorek kolonou a rozděluje se, v tomto případě se využila gradientová eluce (Jandourek, 2011).

Pevný produkt byl získán použitím vakuové odparky. Jeho vznik se ověřil opět pomocí TLC metody pod UV světlem (vlnová délka 254 nm), kdy za standart byla zvolena výchozí látka, 2-chlorpyrazin.

Teploty tání byly změřeny v kapiláře. Elementární analýza byla provedena na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, infračervená spektra (IČ) a NMR-spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie.

Antibakteriální, antifungální a antimykobakteriální testování bylo provedeno na Katedře biologických a lékařských věd a ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, Ústavu klinické mikrobiologie.

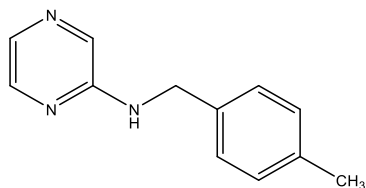
4.3 Přehled získaných látek

Různou obměnou substituentů na pyrazinovém jádře jsme získali látky (Tab. 1):

Tab. 1: Přehled získaných látek

Název	Označení
<i>N</i> -(4-methylbenzyl)pyrazin-2-amin	OJMB1
<i>N</i> -(4-chlorbenzyl)pyrazin-2-amin	OJMB2
<i>N</i> -(3,4-dichlorbenzyl)pyrazin-2-amin	OJMB3
<i>N</i> -(3-(trifluormethyl)benzyl)pyrazin-2-amin	OJMB4
<i>N</i> -(3-chlorbenzyl)pyrazin-2-amin	OJMB5
<i>N</i> -(4-(trifluormethyl)benzyl)pyrazin-2-amin	OJMB6
<i>N</i> -benzylpyrazin-2-amin	OJMB7
<i>N</i> -(2-chlorbenzyl)pyrazin-2-amin	OJMB8
<i>N</i> -(2-fluorbenzyl)pyrazin-2-amin	OJMB9
<i>N</i> -(4-fluorbenzyl)pyrazin-2-amin	OJMB10

N-(4-methylbenzyl)pyrazin-2-amin



označení látky: OJMB1

sumární vzorec: $C_{12}H_{13}N_3$

popis: světlá krystalická látka

reakční podmínky: MW 30' 150 °C, 200 W, bez rozpouštědla

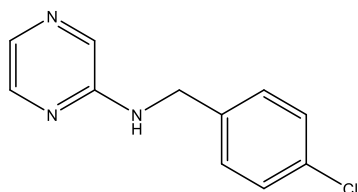
Mh = 199,26

$t_f = 81,7-83$ °C

teoretický výtěžek 690 mg

výtěžek reakce 49 mg ~ 7,1 %

N-(4-chlorbenzyl)pyrazin-2-amin



označení látky: OJMB2

sumární vzorec: $C_{11}H_{10}ClN_3$

popis: světlá krystalická látka

reakční podmínky: MW 30' 150 °C, 200 W, bez rozpouštědla

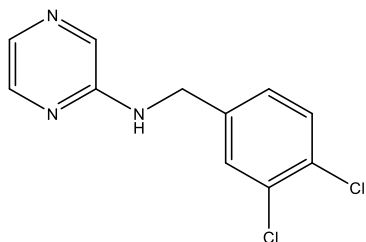
Mh = 219,67

$t_f = 85,9-87,4$ °C

teoretický výtěžek: 760 mg

výtěžek reakce: 160 mg ~ 21,4 %

***N*-(3,4-dichlorbenzyl)pyrazin-2-amin**



označení látky: OJMB3

sumární vzorec: $C_{11}H_9Cl_2N_3$

popis: světlá krystalická látka

reakční podmínky: MW 30' 150 °C, 200 W

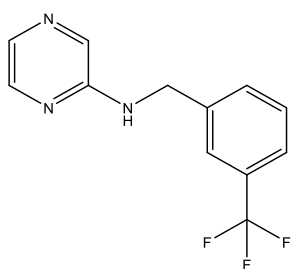
Mh = 254,11

t_f = 48,0–49,9 °C

teoretický výtěžek: 889 mg

výtěžek reakce: 178 mg ~ 20,0 %

***N*-(3-(trifluormethyl)benzyl)pyrazin-2-amin**



označení látky: OJMB4

sumární vzorec: $C_{12}H_{10}F_3N_3$

popis: rychle tající látka

reakční podmínky: MW 30' 150 °C, 200 W

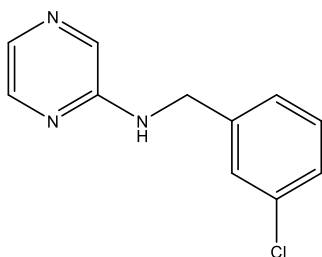
Mh = 253,23

t_f = nižší než laboratorní teplota (< 23 °C)

teoretický výtěžek: 1 730 mg

výtěžek reakce: 323 mg ~ 18,7 %

***N*-(3-chlorbenzyl)pyrazin-2-amin**



označení látky: OJMB5

sumární vzorec: $C_{11}H_{10}ClN_3$

popis: světlá krystalická látka

reakční podmínky: MW 30' 150 °C, 200 W

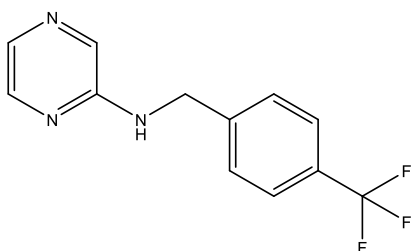
Mh = 219,67

$t_f = 56,9\text{--}58,8\text{ °C}$

teoretický výtěžek: 776 mg

výtěžek reakce: 75 mg ~ 9,64 %

***N*-(4-(trifluormethyl)benzyl)pyrazin-2-amin**



označení látky: OJMB6

sumární vzorec: $C_{12}H_{10}F_3N_3$

popis: světlá krystalická látka

reakční podmínky: MW 30' 150 °C, 200 W

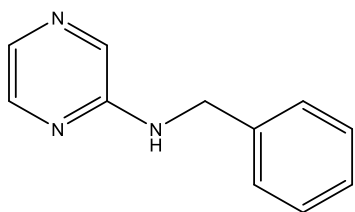
Mh = 253,23

$t_f = 78,4\text{--}80,9\text{ °C}$

teoretický výtěžek: 870 mg

výtěžek reakce: 75 mg ~ 8,7 %

N-benzylpyrazin-2-amin



označení látky: OJMB7

sumární vzorec: $C_{11}H_{11}N_3$

popis: světlá krystalická látka

reakční podmínky: MW 30' 150 °C, 200 W

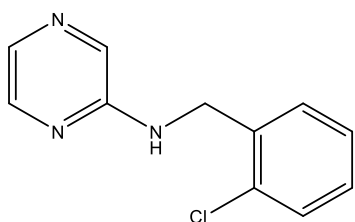
Mh = 185,23

$t_f = 64,9-67,4$ °C

teoretický výtěžek: 648 mg

výtěžek reakce: 113 mg ~ 17,44 %

N-(2-chlorbenzyl)pyrazin-2-amin



označení látky: OJMB8

sumární vzorec: $C_{11}H_{10}ClN_3$

popis: světlá krystalická látka

reakční podmínky: MW 30' 150 °C, 200 W

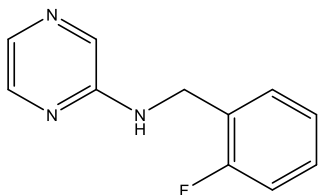
Mh = 219,67

$t_f = 81,5-83,5$ °C

teoretický výtěžek: 1 550 mg

výtěžek reakce: 287 mg ~ 18,54 %

***N*-(2-fluorbenzyl)pyrazin-2-amin**



označení látky: OJMB9

sumární vzorec: C₁₁H₁₀FN₃

popis: světlá krystalická látka

reakční podmínky: MW 30' 150 °C, 200 W

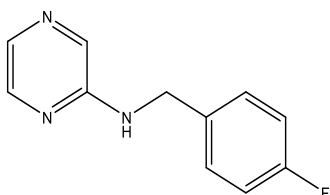
Mh = 203,22

t_t = 78,3–80,6 °C

teoretický výtěžek: 1 070 mg

výtěžek reakce: 55 mg ~ 5,1 %

***N*-(4-fluorbenzyl)pyrazin-2-amin**



označení látky: OJMB10

sumární vzorec: C₁₁H₁₀FN₃

popis: světlá krystalická látka

reakční podmínky: MW 30' 150 °C, 200 W

Mh = 203,22

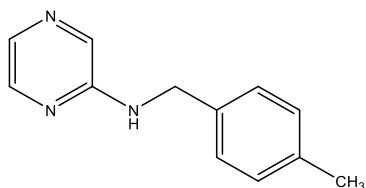
t_t = 76,4–78,6 °C

teoretický výtěžek: 710 mg

výtěžek reakce: 35,5 mg ~ 5,0 %

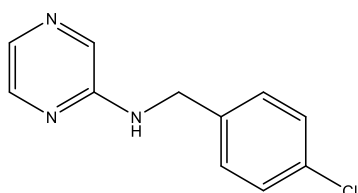
4.4 Analytická data nasyntetizovaných sloučenin

OJMB1 *N*-(4-methylbenzyl)pyrazin-2-amin



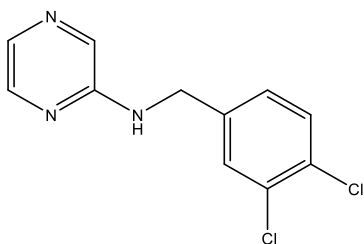
Výtěžek: teor: 690 mg, získaný: 49 mg ~ 7,1 %, $t_f = 81,7-83\text{ }^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 7.98-7.93 (m, 1H), 7.91-7.88 (m, 1H), 7.51 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.25-7.16 (m, AA', BB', 2H), 7.15-7.06 (m, AA', BB', 2H), 4.41 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.25 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO) δ 155.1, 141.7, 136.8, 136.0, 133.4, 131.4, 129.0, 127.5, 43.5, 20.9; IČ (ATR-Ge, cm^{-1}): 3221 (-NH-), 2922 (-CH₂-), 2855 (-CH₃), 1584, 1566, 1514, 1494, 1455, 1433 (arom.); Elem. analýza: teoretická C₁₂H₁₃N₃ (Mh = 199,26): 72,33% C, 6,58% H, 21,09% N; zjištěná: 72,10% C, 6,72% H, 19,24% N.

OJMB2 *N*-(4-chlorbenzyl)pyrazin-2-amin



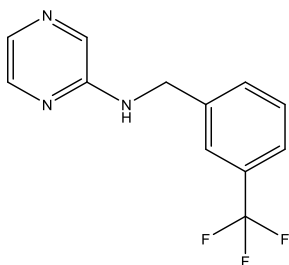
Výtěžek: teor: 760 mg, získaný: 160 mg ~ 21,4 %, $t_f = 85,9-87,4\text{ }^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl₃) δ 8.00 (dd, $J = 2.8$, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.39-7.20 (m, 4H), 5.17 (bs, 1H), 4.54 (s, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl₃) δ 154.2, 141.8, 136.9, 133.2, 132.9, 132.0, 128.8, 128.8, 44.8; IČ (ATR-Ge, cm^{-1}): 3241 (-NH-), 2942 (-CH₂-), 1585, 1554, 1491, 1456, 1431 (arom.), 794 (-Cl); Elem. analýza: teoretická C₁₁H₁₀ClN₃ (Mh = 219,67): 60,14% C, 4,59% H, 19,13% N; zjištěná: 60,43% C, 4,68% H, 18,88% N.

OJMB3 *N*-(3,4-dichlorbenzyl)pyrazin-2-amin



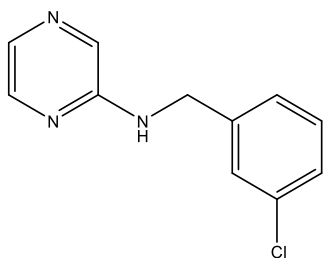
Výtěžek: teor: 889 mg, získaný: 178 mg ~ 20,0 %, $t_f = 48,0\text{--}49,9\text{ }^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J = 2.8$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.65 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.30 (dd, $J = 9.0$ Hz, 2.5 Hz, 1H), 4.47 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO) δ 154.7, 141.7, 141.5, 133.6, 131.8, 131.0, 130.6, 129.3, 127.7, 42.7; IČ (ATR-Ge, cm^{-1}): 3231 (-NH-), 2926 (-CH₂-), 1594, 1543, 1518, 1467, 1397 (arom.), 829, 813 (-Cl); Elem. analýza: teoretická C₁₁H₉Cl₂N₃ (Mh = 254,11): 51,99% C, 3,57% H, 16,54% N; zjištěná: 52,48% C, 3,89% H, 16,05% N.

OJMB4 *N*-(3-(trifluormethyl)benzyl)pyrazin-2-amin



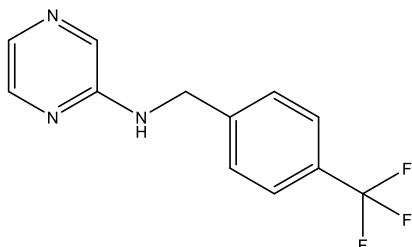
Výtěžek: teor: 1 730 mg, získaný: 323 mg ~ 18,7 %, $t_f =$ nižší než laboratorní teplota ($< 23\text{ }^\circ\text{C}$); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl₃) δ 8.07-7.98 (m, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.82 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.55-7.51 (m, 2H), 7.44 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 5.35 (bs, 1H), 4.64 (s, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl₃) δ 154.2, 142.0, 139.7, 132.9, 132.1, 131.0 (q, $J = 32.7$ Hz), 130.8 (q, $J = 1.3$ Hz), 129.2, 124.0 (q, $J = 272.8$ Hz), 124.3 (q, $J = 3,8$ Hz), 124.2 (q, $J = 3,8$ Hz), 44.9; IČ (ATR-Ge, cm^{-1}): 3245 (-NH-), 2944 (-CH₂-), 1594, 1519, 1471, 1450 (arom.), 1326 (-CF₃); Elem. analýza: teoretická C₁₂H₁₀F₃N₃ (Mh = 253,23): 56,92% C, 3,98% H, 16,59% N; zjištěná: 57,18% C, 2,98% H, 16,70% N.

OJMB5 *N*-(3-chlorbenzyl)pyrazin-2-amin



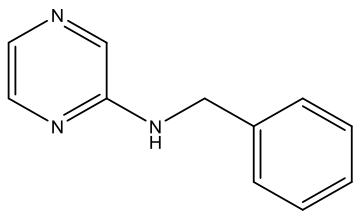
Výtěžek: teor: 776 mg, získaný: 75 mg ~ 9,64 %, $t_f = 56,9\text{--}58,8\text{ }^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J = 2.9, J = 1.5$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 7.62 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.40-7.24 (m, 4H), 4.48 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO) δ 154.9, 142.8, 141.7, 133.5, 133.2, 131.7, 130.4, 127.2, 126.8, 126.1, 43.2; IČ (ATR-Ge, cm^{-1}): 3264 (-NH-), 3059 (-CH₂-), 1599, 1575, 1525, 1471, 1424, 1392 (arom.), 773 (-Cl); Elem. analýza: teoretická C₁₁H₁₀ClN₃ (Mh = 219,67): 60,14% C, 4,59% H, 19,13% N; zjištěná: 60,58% C, 4,59% H, 18,77% N.

OJMB6 *N*-(4-(trifluormethyl)benzyl)pyrazin-2-amin



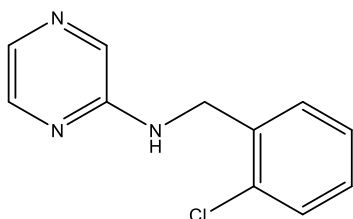
Výtěžek: teor: 870 mg, získaný: 75 mg ~ 8,7 %, $t_f = 78,4\text{--}80,9\text{ }^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl₃) δ 8.00 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.86-7.82 (m, 1H), 7.65-7.55 (m, 2H), 7.51-7.41 (m, 2H), 5.22 (bs, 1H), 4.65 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl₃) δ 154.2, 142.8, 141.9, 133.4, 132.2, 129.7 (q, $J = 32.7$ Hz), 127.6, 125.6 (q, $J = 3.8$ Hz), 124.1 (q, $J = 272.8$ Hz), 44.9; IČ (ATR-Ge, cm^{-1}): 3251 (-NH-), 2966 (-CH₂-), 1618, 1575, 1457, 1433 (arom.), 1111 (-CF₃); Elem. analýza: teoretická C₁₂H₁₀F₃N₃ (Mh = 253,23): 56,92% C, 3,98% H, 16,59% N; zjištěná: 52,83% C, 3,05% H, 12,41% N.

OJMB7 *N*-benzylpyrazin-2-amin



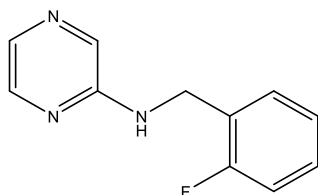
Výtěžek: teor: 648 mg, získaný: 113 mg ~ 17,44 %, $t_f = 64,9\text{--}67,4\text{ }^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.99 (dd, $J = 2.8, J=1.5$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.41-7.22 (m, 5H), 5.13 (bs, 1H), 4.56 (d, $J=4.3$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 154.3, 141.8, 138.3, 132.9, 132.0, 128.7, 128.7, 127.5, 45.5; IČ (ATR-Ge, cm^{-1}): 3229 (-NH-), 2945 (-CH₂-), 1581, 1564, 1519, 1494, 1428 (arom.); Elem. analýza: teoretická $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3$ (Mh = 185,23): 71,33% C, 5,99% H, 22,69% N; zjištěná: 70,38% C, 6,11% H, 21,86% N.

OJMB8 *N*-(2-chlorbenzyl)pyrazin-2-amin



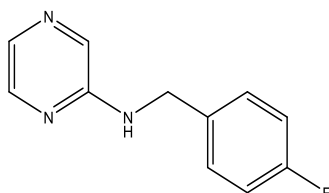
Výtěžek: teor: 1 550 mg, získaný: 287 mg ~ 18,54 %, $t_f = 81,5\text{--}83,5\text{ }^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.99 (dd, $J = 2.8, J=1.5$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.44-7.33 (m, 2H), 7.27-7.17 (m, 2H), 5.19 (bs, 1H), 4.67 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 154.2, 141.8, 135.8, 133.6, 133.1, 132.2, 129.6, 129.5, 128.8, 127.0, 43.2; IČ (ATR-Ge, cm^{-1}): 3265 (-NH-), 2965 (-CH₂-), 1603, 1523, 1466, 1442, 1414 (arom.), 755 (-Cl); Elem. analýza: teoretická $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{ClN}_3$ (Mh = 219,67): 60,14% C, 4,59% H, 19,13% N; zjištěná: 60,00% C, 5,09% H, 18,13% N.

OJMB9 *N*-(2-fluorbenzyl)pyrazin-2-amin



Výtěžek: teor: 1 070 mg, získaný: 55 mg ~ 5,1 %, $t_f = 78,3-80,6$ °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.02-7.97 (m, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.80 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.42-7.32 (m, 1H), 7.31-7.21 (m, 1H), 7.14-7.01 (m, 2H), 5.24 (bs, 1H), 4.63 (s, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 161.0 (d, $J=246.0$ Hz), 154.2, 141.8, 132.7, 132.1, 129.8 (d, $J=4.5$ Hz), 129.2 (d, $J=8.3$ Hz), 125.4 (d, $J=14.3$ Hz), 124.2 (d, $J=3.8$ Hz), 115.5 (d, $J=21.1$ Hz), 39.3 (d, $J=4.5$ Hz); IČ (ATR-Ge, cm^{-1}): 3269 (-NH-), 2938 (-CH₂-), 1602, 1587, 1527, 1485, 1455, 1433 (arom.), 1146 (-F); Elem. analýza: teoretická $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{FN}_3$ (Mh = 203,22): 65,01% C, 4,96% H, 20,68% N; zjištěná: 63,61% C, 4,96% H, 18,69% N.

OJMB10 *N*-(4-fluorbenzyl)pyrazin-2-amin



Výtěžek: teor: 710 mg, získaný: 35,5 mg ~ 5,0 %, $t_f = 76,4-78,6$ °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.99 (dd, $J = 2.8$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.38-7.15 (m, 2H), 7.11-6.95 (m, 2H), 5.05 (bs, 1H), 4.52 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 162.1 (d, $J=246.0$ Hz), 154.3, 141.9, 134.2 (d, $J=3.8$ Hz), 133.2, 132.12, 129.2 (d, $J=8.3$ Hz), 115.5 (d, $J=21.9$ Hz), 44.7; IČ (ATR-Ge, cm^{-1}): 3221 (-NH-), 2935 (-CH₂-), 1594, 1543, 1519, 1508, 1469, (arom.), 1221 (-F); Elem. analýza: teoretická $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{FN}_3$ (Mh = 203,22): 65,01% C, 4,96% H, 20,68% N; zjištěná: 62,91% C, 3,16% H, 18,66% N.

5 Výsledky

Antibakteriální, antifungální a antimykobakteriální působení látek bylo testováno na Katedře biologických a lékařských věd a ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, Ústavu klinické mikrobiologie.

Po uplynutí doby inkubace, za 24 a 48 hodin (výjimka *Trichophyton interdigitale* po 72 a 120 hod.) se stanovila minimální inhibiční koncentrace (MIC; $\mu\text{mol.l}^{-1}$).

U antimykobakteriálního testování probíhala inkubace 14 dnů (výjimka *M. kansasii* 6 dnů) v tmavém vlhkém prostředí při teplotě 37 °C a pH 6,2. Výsledky antimykobakteriálního působení byly stanoveny jako MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$). Jako standard byl použit isoniazid (INH).

5.1 Výsledky antibakteriálního testování

Testování antibakteriálního působení (Tab. 2) probíhalo *in vitro* pomocí mikrodiluční bujónové metody. Inkubace probíhala 24–48 hod. při teplotě 35 °C \pm 2 °C. Poté bylo provedeno vizuální hodnocení (Protokol č. 1).

Testovalo se působení na kmenech:

<i>Staphylococcus aureus</i>	(SA)
<i>Staphylococcus aureus</i> methicilin rezistentní	(MRSA)
<i>Staphylococcus epidermis</i>	(SE)
<i>Enterococcus faecalis</i>	(EF)
<i>Escherichia coli</i>	(EC)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(KLP)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL pozitivní	(KP-E)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(PA)

Tab. 2: Výsledky antibakteriálního působení

Kmen		Testovaná látka (označení) – MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)									
		OJMB1	OJMB2	OJMB3	OJMB4	OJMB5	OJMB6	OJMB7	OJMB8	OJMB9	OJMB10
SA	24h	>500	>500	250	>500	125	125	>500	500	500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	500	125	>500	500	>500	>500
MRSA	24h	>500	>500	250	>500	500	250	>500	>500	500	>500
	48h	>500	>500	500	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500
SE	24h	500	500	125	500	125	62,5	>500	>500	>500	>500
	48h	500	500	125	500	250	250	>500	>500	>500	>500
EF	24h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP-E	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
PA	24h	500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Z derivátů pyrazinu se u menšiny z nich projevilo antibakteriální působení na testované bakterie.

Svou antibakteriální aktivitu projevil derivát OJMB1 u SE při koncentraci $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a to jak za 24 hod., tak za 48 hod. Dále působil na PA při koncentraci $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ za 24 hod., po 48 hod. aktivitu už neprojevil.

OJMB2 působil též na SE při koncentraci $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a to jak za 24 hod., tak za 48 hod. a na PA při koncentraci $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ za 24 hod.

Látka OJMB3 působila na SA při koncentraci $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod., na MRSA při $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod. a při koncentraci $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 48 hod. Dále na SE při koncentraci $125 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a to jak po 24 hod., tak po 48 hod. Na PA působila při $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod.

OJMB4 působila pouze na SE při koncentraci $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 i 48 hod.

Látka OJMB5 působila na SA při koncentraci $125 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod. a při koncentraci $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 48 hod. Na MRSA působila při koncentraci $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod. Na SE při koncentraci $125 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod. a $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 48 hod.

Látka OJMB6 působila při koncentraci $125 \mu\text{mol.l}^{-1}$ na SA a to jak po 24 hod., tak po 48 hod. Na MRSA působila koncentrací $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod. a $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 48 hod. Na SE měla vliv koncentrace $62,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod. a $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 48 hod.

Látka OJMB8 působila pouze na SA při koncentraci $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 i po 48 hod.

Látka OJMB9 působila při koncentraci $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ na SA a MRSA, v obou případech po 24 hod.

Látky OJMB7 a OJMB10 neprojevíly antibakteriální aktivitu.

5.2 Výsledky antifungálního testování

Testování antifungálního působení (Tab. 3) probíhalo *in vitro* pomocí mikrodiluční bujónové metody. Inkubace probíhala 24–48 hod. při teplotě 35 °C ± 2 °C (výjimka *Trichophyton interdigitale* 72–120 hod.). Poté bylo provedeno vizuální hodnocení (Protokol č. 2).

Testovalo se působení na kmenech:

<i>Candida albicans</i>	(CA)
<i>Candida tropicalis</i>	(CT)
<i>Candida krusei</i>	(CK)
<i>Candida glabrata</i>	(CG)
<i>Trichosporon asahii</i>	(TA)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	(AF)
<i>Absidia corymbifera</i>	(AC)
<i>Trichophyton interdigitale</i>	(TI)

Tab. 3: Výsledky antifungálního působení

Kmen		Testovaná látka (označení) – MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)									
		OJMB1	OJMB2	OJMB3	OJMB4	OJMB5	OJMB6	OJMB7	OJMB8	OJMB9	OJMB10
CA	24h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24h	>500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24h	500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CG	24h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TA	24h	500	500	500	>500	500	>500	>500	500	>500	>500
	48h	>500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24h	>500	500	500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500
	48h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500
AC	24h	>500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TI	72h	500	500	62,5	125	125	250	>500	125	500	500
	120h	500	500	62,5	125	125	250	>500	125	500	500

Z derivátů pyrazinu bylo antifungální působení výraznější v porovnání s antibakteriálním.

Látka OJBM1 působila na CK při koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 i po 48 hod. Na TA působila při 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod. a na TI při koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 i po 48 hod.

Látka OJMB2 působila na CT, CK, AF a AC při koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ vždy po 24 hod. Na TA působila při koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 i po 48 hod. Na TI působila koncentrace 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 72 i po 120 hod.

Látka OJMB3 působila vždy při koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod. i po 48 hod. u kmenů hub CA, CT, CK, CG, TA, AF. U AC působila při 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ pouze po 24 hod. U TI při koncentraci 62,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 72 i po 120 hod.

Látka OJMB4 působila pouze na TI koncentrací 125 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 72 i po 120 hod.

Látka OJMB5 působila na TA při koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod. Při koncentraci 125 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ působila na TI po 72 i po 120 hod.

Látky OJMB6 působila pouze na TI při koncentraci 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 72 i po 120 hod.

Látky OJMB8 působila při koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ na TA po 24 hod. Na AF při koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 i po 48 hod. Na TI při koncentraci 125 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ jak po 72 hod., tak i po 120 hod.

Látky OJMB9 a OJMB10 působily v obou případech pouze na TI při koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 72 i po 120 hod.

Látka OJMB7 neprojevila žádné antifungální působení.

5.3 Výsledky antimykobakteriálního testování

Testování antimykobakteriálního působení probíhalo ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, Ústavu klinické mikrobiologie.

Testování (Tab. 4) probíhalo *in vitro* pomocí mikrodiluční bujonové metody v mikrotitrační destičce. Inkubace probíhala v Middlebrook médiu o pH 6,2. Testované látky byly rozpuštěné v dimethylsulfoxidu (DMSO). Inkubace probíhala 14 dnů (výjimka *M. kansasii* 6 dnů) v tmavém vlhkém prostředí při teplotě 37 °C. Výsledky antimykobakteriálního působení MIC

($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) byly odečteny pomocí metabolického indikátoru (Alamar Blue). Jako standard byl použit isoniazid (INH).

Testovalo se na kmenech:

Mycobacterium tuberculosis H37Rv

Mycobacterium kansasii My 235/80

Mycobacterium avium ssp. avium My 80/72

Tab. 4: Výsledky antimykobakteriálního působení

Kmen	Standard	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)				
	INH	OJMB1	OJMB2	OJMB3	OJMB4	OJMB5
<i>Mycobacterium tbc</i> H37Rv	0,2	100	50	50	50	50
<i>Mycobacterium kansasii</i> My 235/80	12,5	100	50	25	100	100
<i>Mycobacterium avium ssp. avium</i> My 80/72	12,5	>100	>100	100	>100	>100
Kmen	INH	OJMB6	OJMB7	OJMB8	OJMB9	OJMB10
<i>Mycobacterium tbc</i> H37Rv	0,2	>100	>100	100	>100	>100
<i>Mycobacterium kansasii</i> 235/80	6,25	50	>100	100	>100	>100
<i>Mycobacterium avium ssp. avium</i> My 80/72	25	>100	>100	>100	>100	>100

V porovnání se standardem antituberkulotika 1. linie, isoniazidem, se svojí antimykobakteriální aktivitou nejvíce projevila látka OJMB3 svým působením na *Mycobacterium kansasii* (při koncentraci $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Za zmínku stojí ještě látky OJMB2 a OJMB6, které působily opět na *Mycobacterium kansasii* při koncentraci 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Ostatní látky mají aktivitu mírnou nebo žádnou (ve většině případů koncentrace $>100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

6 Diskuze

V této práci jsem se věnovala syntéze derivátů pyrazinu. Připravili jsme celkem 10 derivátů. Volba substituentů byla vedena dle předchozích zkušeností a studií (Doležal et al., 2008), kdy jsme se řídili doporučením, že antituberkulotickou aktivitu může zvýšit substituce chlorem, alkylace, amidace nebo navázání aromatického zbytku na pyrazinový kruh. Po ověření totožnosti jsme s těmito 10 deriváty nadále pracovali a nechali otestovat jejich aktivitu antibakteriální, antifungální a antimykobakteriální.

Antibakteriální aktivita našich látek byla zanedbatelná. Obdobně tomu bylo i ve studii Jandourek et al. (2014), kdy testovali deriváty pyrazinu s obdobnými substituenty jako v této práci.

V případě antimykotické aktivity se u nás potvrdilo zjištění z předchozích studií (Doležal et al., 2008), kdy se nejvýraznější antimykotická aktivita projevila u kmene *Trichophyton interdigitale*. Tento kmen byl nejcitlivějším testovaným kmenem. V našem případě jeho růst nejvíce inhiboval derivát *N*-(3,4-dichlorbenzyl)pyrazin-2-amin (OJMB3). Tento derivát se v rámci testovaných látek projevil jako nejvíce účinný vůči všem testovaným fungálním kmenům.

Mykobakteriální aktivita byla testována u tří mykobakteriálních kmenů, *M. tuberculosis*, *M. kansasii* a *M. avium ssp. avium*. Jako standard byla zvolena látka isoniazid. V porovnání se standardem se žádná z testovaných látek neprojevila jako účinná vůči *M. tuberculosis*. Jejich MIC byla v porovnání s INH více než 100 násobně vyšší. Za zmínku snad stojí opět látka substituovaná dvěma chlory, *N*-(3,4-dichlorbenzyl)pyrazin-2-amin (OJMB3), jejíž aktivita (MIC 25 µg/ml) byla nejbližší standardu (MIC 6,25 µg/ml), a to v případě *M. kansasii*. I ve studii Jandourek et al. (2014), se jako jedny z neúčinnějších látek projevily právě deriváty substituované chlorem. V této studii účinnost porovnávali nejen s INH ale i s PZA. Možná by bylo zajímavé vidět naše výsledky antimykobakteriálního působení i v porovnání právě s PZA. U dalších našich látek se aktivita neprojevila.

Zajímavý je poznatek, že lipofilita pyrazinových derivátů může hrát roli v jejich antituberkulotické aktivitě (Doležal et al., 2008). Ve studii zjistili, že obecně zvyšující se lipofilita daných látek může vést ke snížení

antimykobakteriální aktivity. Současně ale zmiňují, že biologická aktivita látek nezávisí výhradně na jejich lipofilitě. Stálo by jistě za zvážení, v případě optimističtějších výsledků, připojit a zohlednit i vliv lipofility u námi syntetizovaných derivátů. V této práci se ale parametrem lipofility látek nezabývám.

Na základě rešerše v databázi Scifinder, jsem zjistila, že prakticky všechny připravené sloučeniny jsou komerčně dostupné, resp. figurují v nabídkách katalogů zakázkových firem. Lze najít nabídku např. na přípravu *N*-(3,4-dichlorbenzyl)pyrazin-2-amin (OJMB3), kterou lze objednat u firmy AA Blocks LLC (USA), 1 mg za 152 USD, 20 mg za 230 USD; popř. u ABCR GmbH (Germany) 500 mg za 639.60 €. V odborné literatuře, ani v patentech nejsou studované sloučeniny popsány.

7 Závěr

Jedním z cílů mé práce bylo obměnit jádro pyrazinu benzylaminem s různými substituenty a získat deriváty pyrazinu. Bylo připraveno deset derivátů, u nichž jsme jako substituenty využili fluor, chlor, methyl. Substituenty byly navázány v různých polohách cyklu. Výběr substituentů byl řízen dle předchozích zkušeností z výzkumu na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy.

Byly získány zadané deriváty pyrazinu. Totožnost látek byla ověřena na Katedře organické a bioorganické chemie pomocí NMR spektroskopie.

Dále jsme hodnotili antibakteriální, antifungální a antimykobakteriální aktivitu.

Na základě získaných výsledků můžeme říci, že antibakteriální účinnost testovaných látek je nízká a pro další výzkum tedy nevýznamná.

Antifungální aktivita našich látek byla výraznější, ale i tak nejsou výsledky příliš významné. Nejčastěji se objevila aktivita proti houbě *Trichophyton interdigitale*, kdy tento kmen nejvíce inhibovala látka OJMB3, *N*-(3,4-dichlorbenzyl)pyrazin-2-amin. Tento derivát, substituovaný dvěma atomy chloru, projevil antifungální účinnost u všech testovaných kmenů a nejvýraznější byla právě u houby *Trichophyton interdigitale*.

Antimykobakteriální účinek našich látek byl velmi mírný nebo téměř žádný. Největší účinek konkrétně na *Mycobacterium kansasii* měl opět již zmíněný derivát OJMB3, *N*-(3,4-dichlorbenzyl)pyrazin-2-amin. Ostatní látky neměly téměř žádnou antimykobakteriální aktivitu.

Je třeba dalších syntéz derivátů pyrazinu k získání vhodnějších látek s antibakteriální, antifungální a antimykobakteriální aktivitou.

8 Protokoly

Protokoly antibakteriálního a antifungálního testování byly zpracovány na Katedře biologických a lékařských věd.

Protokol 1: Protokol antibakteriálního testování

Testované látky											
Generický název (skupinový):											
Číslo, kód (sumární vzorec / substituent) m.h.						m.h.					
1. OJMB1	199,26	6. OJMB6	253,23								
2. OJMB2	219,67	7. OJMB7	185,23								
3. OJMB3	254,11	8. OJMB8	219,67								
4. OJMB4	253,23	9. OJMB9	203,22								
5. OJMB5	219,67	10. OJMB10	203,22								
Metoda - mikrodiluční bujónová v destičkách – (200 μ l media + 10 μ l suspenze inokula)											
Médium: Mueller Hintonův bujon (MHB) pH 7,4						Inokulum: 0.5 McFarlandovy stup.					
Délka inkubace: 24 - 48h						Teplota: 35°C \pm 2°C					
Způsob inkubace: statický, ve tmě, humidní atmosféra											
Odečítání: vizuální						MIC					
Testované kmeny (kód, číslo)											
1. SA <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516/08											
2. MRSA <i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08 Methicilin rezistentní											
3. SE <i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966/08											
4. EF <i>Enterococcus faecalis</i> J 14365/08											
5. EC <i>Escherichia coli</i> CCM4517											
6. KP <i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08											
7. KP-E <i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08 ESBL pozitivní											
8. PA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961											
Výsledky											
KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC (μ mol.l ⁻¹)									
		OJMB1	OJMB2	OJMB3	OJMB4	OJMB5	OJMB6	OJMB7	OJMB8	OJMB9	OJMB10
SA	24h	>500	>500	250	>500	125	125	>500	500	500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	500	125	>500	500	>500	>500
MRSA	24h	>500	>500	250	>500	500	250	>500	>500	500	>500
	48h	>500	>500	500	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500
SE	24h	500	500	125	500	125	62,5	>500	>500	>500	>500
	48h	500	500	125	500	250	250	>500	>500	>500	>500
EF	24h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP-E	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
PA	24h	500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Protokol 2: Protokol antifungálního testování

Testované látky											
Generický název (skupinový):											
Číslo, kód (sumární vzorec / substituent) m.h.										m.h.	
1. OJMB1	199,26	6. OJMB6	253,23								
2. OJMB2	219,67	7. OJMB7	185,23								
3. OJMB3	254,11	8. OJMB8	219,67								
4. OJMB4	253,23	9. OJMB9	203,22								
5. OJMB5	219,67	10.OJMB10	203,22								
Metoda - mikrodiluční bujónová v destičkách – (200µl media + 10µl suspenze inokula)											
Médium: RPMI 1640 s glutaminem						pH / pufr: 7,0 / MOPS (0,165M)					
Délka inkubace: 24 - 48h (u TI 72h-120h)						Teplota: 35°C ± 2°C					
Způsob inkubace: statický, ve tmě, humidní atmosféra						Inokulum: 5 × 10 ³ ± 0.2 cfu.ml ⁻¹					
Odečítání: vizuální MIC											
Testované kmeny (kód, číslo)											
1. CA1 - <i>Candida albicans</i> ATCC 44859											
2. CT - <i>Candida tropicalis</i> 156											
3. CK2 - <i>Candida krusei</i> E28											
4. CG - <i>Candida glabrata</i> 20/I											
5. TA - <i>Trichosporon asahii</i> 1188											
6. AF - <i>Aspergillus fumigatus</i> 231											
7. AC - <i>Absidia corymbifera</i> 272											
8. TI - <i>Trichophyton interdigitale</i> 445											
Výsledky											
KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC (µmol.l ⁻¹)									
		OJMB1	OJMB2	OJMB3	OJMB4	OJMB5	OJMB6	OJMB7	OJMB8	OJMB9	OJMB10
CA	24h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24h	>500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24h	500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CG	24h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TA	24h	500	500	500	>500	500	>500	>500	500	>500	>500
	48h	>500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24h	>500	500	500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500
	48h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500
AC	24h	>500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TI	72h	500	250	62,5	125	125	250	>500	125	500	500
	120h	500	250	62,5	125	125	250	>500	125	500	500

9 Literatura

Albanna, Amr S.; Menzies, D. Drug-Resistant Tuberculosis. *Drugs*, **2011**, vol. 71, no. 7, 815 – 825. <https://doi.org/10.2165/11585440-000000000-00000>.

Anthony, R. M.; Hertog, A. den, Mansjo, M.; Werngren, J. New insights into the mechanism of action of pyrazinamide, implications for susceptibility testing, and future regimens. *International Journal of Mycobacteriology*, **2016**, vol. 5, 71 – 72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.08.009>.

Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **1998**, vol. 393, 537 – 544. <https://doi.org/10.1038/31159>.

Dillon, N. A.; Peterson, N. D.; Feaga, H. A.; et al. Anti-tubercular Activity of Pyrazinamide is Independent of *trans*-Translation and RpsA. *Scientific Reports*, **2017**, vol. 7, no. 6135, 1 – 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06415-5>.

Doležal, M.; Čmedlová, P.; Palek, L.; et al. Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted Pyrazinecarboxamides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, vol. 43, no. 5, 1105 – 1113. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.07.013>.

Ehrt, S.; Schnappinger, D.; Rhee, K. Y.; Metabolic principles of persistence and pathogenicity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, **2018**, vol. 16, no. 8, 496 – 507. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0013-4>.

Euzéby, J. P. *LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* [online]. c 1997. [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=mycobacterium>.

Fernandová, E.; Bielaková, K.; Matějovská-Kubešová, H.; Tuberculosis in elderly in the Czech Republic. *Epidemiology, Microbiology, Immunology*, **2019**, vol. 68, no. 4, 184 – 190.

Gama, E.; Madan, J.; Langley, I.; et al. Economic evaluation of a shortened standardised treatment regimen of antituberculosis drugs for patients with

multidrug-resistant tuberculosis (STREAM): study protocol. *BMJ Open*, **2016**, no. 6, <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2016-014386>.

Gandhi, N. R.; Nunn, P.; Dheda, K.; et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet*, **2010**, vol. 375, no. 9728, 1830 – 1843.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60410-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60410-2).

Gopal, P.; Nartey, W.; Ragunathan, P.; et al. Pyrazinoic Acid Inhibits Mycobacterial Coenzyma A Biosynthesis by Binding to Aspartate Decarboxylase PanD. *ACS Infectious Diseases*, **2017**, vol. 3, no. 11, 807 – 819.
<https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00079>.

Gopaldaswamy, R.; Shanmugam, S.; Mondal, R.; et al. Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections – a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. *Journal of Biomedical Science*, **2020**, vol. 27, no. 74.
<https://doi.org/10.1186/s12929-020-00667-6>.

Hansen, M.; Peltier, J.; Killy, B.; et al. Macrophage Phosphoproteome Analysis Reveals MINCLE-dependent and –independent Mycobacterial Cord Factor Signaling. *Molecular & Cellular Proteomics*, **2019**, vol. 18, no. 4, 669 – 685.
<https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.000929>.

Hartl, Jiří; Doležal, Martin; Miletín, Miroslav; Opletalová, Veronika; Zimčík, Petr. *Farmaceutická chemie IV*. 2. vydání. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2012. 166 s. ISBN 978-880-246-2129-6.

Homolka, J. (2016). *Tuberkulóza*. ProQuest Ebook Central
<https://ebookcentral.proquest.com>

Imramovský, A.; Polanc, S.; Vinšová, J.; et al. A new modification of anti-tubercular active molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2007**, vol. 15, no. 7, 2551 – 2559. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.051>.

Jand'ourek, Ondřej. Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva VII.: Diplomová práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, 2011. 75 s. Vedoucí diplomové práce: Martin Doležal.

Jandourek, O.; Doležal, M.; Páterová, P.; et al. *N*-Substituted 5-Amino-6-methylpyrazine-2,3-dicarbonitriles: Microwave-Assisted Synthesis and Biological Properties. *Molecules*, **2014**, vol. 19, no. 1, 651 – 671.
<https://doi.org/10.3390/molecules19010651>.

Jandourek, O.; Tauchmann, M.; Páterová, P.; et al. Synthesis of Novel Pyrazinamide Derivatives Based 2 on 3-Chloropyrazine-2-carboxamide and Their Antimicrobial Evaluation. *Molecules*, **2017**, vol. 22, no. 2.
<https://doi.org/10.3390/molecules22020223>.

Kalscheuer, R.; Palacios, A.; Anso, I.; et al. The *Mycobacterium tuberculosis* capsule: a cell structure with key implications in pathogenesis. *Biochemical Journal*, **2019**, vol. 476, no. 14, 1995 – 2016.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20190324>.

Katzung, Bertram G. *Základní a klinická farmakologie*, 2. vydání, Jinočany: H+H, 1995. 1072 s., ISBN 80-85787-35-0.

Köser, C. U.; Javid, B.; Liddell, K.; et al. Drug-resistance mechanisms and tuberculosis drugs. *Lancet*, **2015**, vol. 385, no. 9965, 305 – 307.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62450-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62450-8).

Lee, W. B., Yan, J. J.; Chung, S., et al. Mycobacterial cord factor enhances migration of neutrophil-like HL-60 cells by prolonging AKT phosphorylation. *Microbiology and Immunology*, **2017**, vol. 61, no. 12, 523 – 530.
<https://doi.org/10.1111/1348-0421.12544>

Lüllmann, Heinz; Mohr, Klaus; Wehling, Martin. *Farmakologie a toxikologie*, 2. vydání, Praha: Grada, 2004. 728 s., ISBN 80-247-0836-1.

Lyon, S.; Rossman, M. D.; Pulmonary Tuberculosis. *Microbiology Spectrum*, **2017**, vol. 5, no. 1, doi:10.1128/microbiolspec.TNMI7-0032-2016.

Mahedra, S.; Sharma, A.; Jaiswal, S.; et al. Insights into the pharmacokinetic properties of antitubercular drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **2016**, vol. 12, no. 7, 765 – 778.
<http://dx.doi.org/10.1080/17425255.2016.1183643>.

Moore, J. E.; Millar, B. Ch.; Comparison of Four Agar Media for the Enumeration of the *Mycobacterium abscessus* Complex. *International Journal of Mycobacteriology*, **2020**, vol. 9, no. 3, 289 – 292.

doi: 10.4103/ijmy.ijmy_110_20.

Parida, S. K.; Axelsson-Robertson, R.; Rao, M. V.; et al. Totally drug-resistant tuberculosis and adjunct therapies. *Journal of Internal Medicine*, **2015**, vol. 277, no. 4, 388 – 405. <https://doi.org/10.1111/joim.12264>.

Parrish, N.; An Uptade on Mycobacterial Taxonomy, 2016 – 2017. *Journal of Clinical Microbiology*, **2019**, vol. 57, no. 5.

<https://doi.org/10.1128/JCM.01408-18>.

Ptáková, M.; Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterióz. *Solen*, 2011, vol. 8, no. 11, 466 – 468.

Sia, J. K.; Rengarajan, J.; Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbiology Spectrum*, **2019**, vol. 7, no. 4.

doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018.

SUKL. *pyrazinamid-krka-spc* [online]. c2010, [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0231976&tab=texts>.

Svobodová, J.; Případy tuberkulózy v ČR v letech 2009–2012 vyvolané neobvyklými druhy komplexu *Mycobacterium tuberculosis*. *Zprávy centra Epidemiologie a Mikrobiologie* (SZÚ, Praha), **2013**, vol. 22, no. 1, 12 – 14.

Šťásek, P. www.nemtru.cz [online], [cit. 26. 10. 2020]. Dostupné z:

<https://www.nemtru.cz/bcg-vakcinace>.

Tang, J.; Yam, W. CH.; Chen, Z.; *Mycobacterium tuberculosis* infection and vaccine development. *Tuberculosis*, **2016**, vol. 98, 30 – 41.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2016.02.005>.

Tortolli, E.; Microbiological Features and Clinical Relevance of New Species of the Genus *Mycobacterium*, *Clinical Microbiology Reviews*, **2014**, vol. 27, no. 4, 727 – 752. doi: 10.1128/CMR.00035-14.

Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, www.uzis.cz [online]. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2019, [cit. 22. 2. 2021]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008314/tbc2019-cz.pdf>.

Vilchèze, C.; Jacobs Jr., W. R.; The Isoniazid Paradigm of Killing, Resistance, and Persistence in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Molecular Biology*, 2019, vol. 431, no. 18, 3450 – 3461. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.02.016>.

Wallenfels, J.; Vašáková, M.; Solovič, I.; Aktuální farmakoterapie tuberkulózy. *Klinická Farmakologie a Farmacie*, **2018**, vol. 32, no. 4, 10 – 14.

World Health Organization, *Global TB report 2015* [online], World Health Organization, 2015, [cit. 22. 9. 2016]. Dostupné z: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports>.

World Health Organization, *Global TB report 2016* [online], World Health Organization, 2016, [cit. 2. 11. 2016]. Dostupné z: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports>.

World Health Organization, *Global TB report 2020* [online], World Health Organization, 2020, [cit. 6. 2. 2021]. Dostupné z: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports>.

Zhu, Ch.; Liu, Y.; Hu, L.; et al. Molecular mechanism of the synergistic activity of ethambutol and isoniazid against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, **2018**, vol. 293, no. 43, 16741 – 16750.

Seznam obrázků

Obr. 1: Celkový počet lidí, u kterých byla léčena TBC v letech 2015 – 2019	15
Obr. 2: Celkový počet lidí, kterým byla poskytnuta preventivní léčba TBC v letech 2015 – 2019	16
Obr. 3: Země s minimálně 100 000 případy TBC v roce 2019	19
Obr. 4: Složení povrchové membrány mykobakterií.....	22
Obr. 5: Stavba buněčné stěny <i>Mycobacterium sp.</i>	23
Obr. 6: BCG vakcinace ve světě	32

Seznam tabulek

Tab. 1: Přehled získaných látek.....	56
Tab. 2: Výsledky antibakteriálního působení	68
Tab. 3: Výsledky antifungálního působení.....	71
Tab. 4: Výsledky antimykobakteriálního působení.....	73

Seznam protokolů

Protokol 1: Protokol antibakteriálního testování	78
Protokol 2: Protokol antifungálního testování	79