

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra organické a bioorganické chemie



**Syntéza a hodnocení potenciálních antimikrobiálních
sloučenin**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Adéla Šimková

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením doc. PharmDr. Mgr. Martina Krátkého, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych tímto poděkovat všem lidem, díky kterým mohla tato bakalářská práce vzniknout, a to především mému vedoucímu práce, doc. PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D., za trpělivé a důkladné vedení mé práce, paní Idě Dufkové za změřením biologické aktivity (antibakteriální, antifungální) a za možnost vyzkoušení testování některých látek a také bych chtěla poděkovat panu PharmDr. Ondřeji Jandourkovi, Ph.D., za otestování antimykobakteriální aktivity.

Práce byla podpořena grantem Grantové agentury ČR č. 20-19638Y (Design a studium nových antimikrobních látek účinných na rezistentní a biofilm-produkující gram-pozitivní bakterie).

OBSAH

ABSTRAKT	6
Abstract	7
Seznam použitých zkratk.....	8
1 ÚVOD	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1 Bakteriální rezistence u Gram-pozitivních kmenů	13
2.1.1 Methicilin-rezistentní Staphylococcus aureus (MRSA)	13
2.1.2 Současná léčba MRSA infekcí	15
2.1.2.1 Glykopeptidy	15
2.1.2.1.1 Vankomycin.....	15
2.1.2.1.2 Teikoplanin.....	16
2.1.2.2 Daptomycin	17
2.1.2.3 Ceftarolin.....	18
2.1.2.4 Oxazolidinony.....	19
2.1.2.4.1 Linezolid	19
2.1.2.4.2 Tedizolid	20
2.1.2.5 Tigecyklin.....	21
2.1.2.6 Kyselina fusidová	22
2.1.2.7 Mupirocin	22
2.1.2.8 Kotrimoxazol	24
2.1.2.9 Trimethoprim	24
2.1.3 Staphylococcus aureus rezistentní vůči vankomycinu (VISA a VRSA)	25
2.1.4 Současná léčba VRSA/VISA infekcí	26
2.1.4.1 Telavancin.....	26
2.1.4.2 Chinupristin/dalfopristin	27
2.1.5 Vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE).....	29
2.1.6 Léčba VRE infekcí.....	30
2.1.6.1 Ampicilin.....	30
2.1.6.2 Nitrofurantoin	31

2.1.6.3	Fosfomicin	32
2.1.6.4	Chloramfenikol	33
2.2	Design cílových molekul	35
2.2.1	Mafenid	35
2.2.2	Schiffovy báze odvozené od salicylaldehydů	36
2.2.3	Schiffovy báze odvozené od 5-nitrovaných pětičlenných heterocyklů	36
2.2.4	Antimikrobiální látky odvozené od isatinu	37
3	Cíl práce	38
4	Experimentální část	39
4.1	Chemie	39
4.1.1	Obecné metody	39
4.1.2	Příprava cílových sloučenin	40
4.1.2.1	Obecný postup přípravy	40
4.1.2.2	Přípravy a charakterizace jednotlivých připravených sloučenin	42
4.2	Biologie	55
4.2.1	Antibakteriální aktivita	55
4.2.2	Antimykobakteriální aktivita	56
4.2.3	Antifungální aktivita	57
5	Výsledky a diskuze	59
6	Závěr	64
7	Seznam obrázků	65
8	Použitá literatura	66
	Příloha – IR spektra	70

ABSTRAKT

Tématem této bakalářské práce je problematika získané rezistence u methicilin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomycin-rezistentního *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* se sníženou citlivostí k vankomycinu a vankomycin-rezistentních enterokoků, současných možností léčby infekcí způsobených těmito kmeny, přípravou a hodnocením antimikrobních sloučenin potenciálně účinných nejen vůči těmto rezistentním Gram-pozitivním patogenům.

Antibiotická rezistence je globální problém, a proto je nutné vyvíjet stále nová léčiva. Základem všech nově připravených sloučenin je mafenid, což je molekula využívaná k léčbě lokálních infekcí způsobených Gram-pozitivními i Gram-negativními bakteriemi. Jeho cílové iminy byly připraveny z mafenid-acetátu a karbonylových sloučenin jedнокrokovou syntézou. Většina těchto nově syntetizovaných látek jsou deriváty salicylaldehydů, dále byly připraveny deriváty odvozené od 5-nitrothiofen-2-karbaldehydu a isatinu. Všech třináct sloučenin bylo připraveno v dostačujícím výtěžku (50-95 %) a byla u nich otestována antibakteriální (Gram-pozitivní i Gram-negativní bakterie včetně MRSA), antimykobakteriální a antifungální aktivita pomocí mikrodiluční bujónové metody. Nejnižší hodnoty MIC (minimální inhibiční koncentrace) v rámci antibakteriálního, antimykobakteriálního i antifungálního hodnocení vykazovaly (*E*)-4-{{(2-hydroxy-3,5-dijodbenzyliden)amino}methyl}benzensulfonamid, (*E*)-4-{{(5-chlor-2-hydroxy-3-jodbenzyliden)amino}methyl}benzensulfonamid a (*E*)-4-{{(5-nitrothiofen-2-yl)methylen}amino}methyl}benzensulfonamid. Nejnižší zjištěné hodnoty MIC byly 7,8 μmol/l pro bakterie včetně MRSA, 3,9 μmol/l pro houby a 3,9 μg/ml pro mykobakterie. Výhodnou se ukázala zejména substituce těžšími halogeny a přítomnost dvou halogenů v molekule. Všechny nové deriváty zároveň vykazovaly vyšší *in vitro* antimikrobiální účinek než výchozí mafenid, některé z nich byly stejně účinné či lepší než standardy použité ke srovnání.

ABSTRACT

The topic of this bachelor thesis is an alarming global problem of acquired resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-intermediate susceptible *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci strains, their limited current treatment options for infections caused by these pathogens, synthesis and evaluation of potential antimicrobial compounds active also against these resistant Gram-positive strains.

The development of novel drugs against drug-resistant pathogens is challenging. Designed compounds are based on sulfa drug mafenide, which is used in the treatment of topical infections caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria. The targeted imines were prepared from mafenide acetate and carbonyl compounds in one step. Most of these novel compounds are derivatives of salicylaldehyde, furthermore, derivatives of 5-nitrothiophene-2-carbaldehyde and isatin were also synthesized. Thirteen compounds were prepared with good yields (50-95%). All these compounds were tested against Gram-positive (including MRSA) and Gram-negative bacteria, mycobacteria, and fungi by the broth microdilution method. The lowest minimum inhibitory concentration (MIC) values against bacteria, fungi as well as the highest antimycobacterial activity were found for (*E*)-4-[[2-(2-hydroxy-3,5-diiodobenzylidene)amino]methyl]benzenesulfonamide, (*E*)-4-[[5-chloro-2-hydroxy-3-iodobenzylidene)amino]methyl]benzenesulfonamide and (*E*)-4-[[5-nitrothiophene-2-yl)methylene]amino]methyl]benzenesulfonamide. The lowest MIC values reached were 7.8 $\mu\text{mol/L}$ for bacteria including MRSA, 3.9 $\mu\text{mol/L}$ for fungi and 3.9 $\mu\text{g/mL}$ for mycobacteria, respectively. The substitution by heavier halogens as well as halogen disubstitution are beneficial. In general, all the novel derivatives showed a higher *in vitro* antimicrobial effect than the parent molecule of mafenide and some of the were comparable or even superior to standards used for a comparison.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC	<i>Absidia corymbifera</i>
ACI	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AFla	<i>Aspergillus flavus</i>
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	zeslabená úplná reflektance (attenuated total reflectance)
BAC	bacitracin
CA	<i>Candida albicans</i>
CK	<i>Candida krusei</i>
CP	<i>Candida parapsilosis</i>
CPX	ciprofloxacin
CT	<i>Candida tropicalis</i>
CA-MRSA	komunitní methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
CCM	Czech Collection of Microorganisms
DMSO	dimethylsulfoxid
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur)
EA	elementární analýza
EARS-net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
EC	<i>Escherichia coli</i>
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility
FLU	flukonazol
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

GIT	gastrointestinální trakt
HA-MRSA	nozokomiální (nemocniční) methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
HIV	lidský virus imunitní nedostatečnosti
IR	infračervená spektroskopie
INH	isoniazid
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LA-MRSA	zvířecí methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MAF	mafenid-acetát
MeOH	methanol
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	methicilin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>
NEO	neomycin
NMR	nukleární magnetická rezonance
NT	netestováno
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pABA	kyselina <i>para</i> -aminobenzoová
PBP	protein vázající penicilin
RIF	rifampicin
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
TI	<i>Trichophyton interdigitale</i>
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMP-SMX	trimethoprim-sulfamethoxazol
t-RNA	transferová RNA
VRE	vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus</i>

VRSA vankomycin-rezistentní *Staphylococcus aureus*
VISA *Staphylococcus aureus* se sníženou citlivostí k vankomycinu

1 ÚVOD

Antibiotika nepatří mezi „klasická“ léčiva, a proto by tak na ně mělo být také nahlíženo. Většina běžných léčiv působí na buňky tkání u všech lidí stejně nebo alespoň přibližně stejně, můžeme tedy předvídat jeho účinek. U antibiotika je žádoucí působení pouze na patogenní bakterie, které momentálně osidlují tkáň, a neovlivňování ostatních buněk dané tkáně. Záměrem podávání antibiotik je usmrcení cílových buněk, tzn. bakterií. Buňky se usmrcení brání svými obrannými mechanismy, které jim napomáhají přežít, mohou přitom měnit vlastnosti, ale zejména se stávají více a více rezistentními k tomuto antibiotiku.

Zavedení antibiotik do klinické praxe způsobilo doslova revoluci v léčbě infekčních onemocnění. Došlo totiž konečně k objevu léčiv, která byla účinná, cílená, také odstraňovala příčinu onemocnění a velmi významně snižovala mortalitu.

O objev a následné využití antibiotik se zasloužili vědci ze dvou na sobě nezávislých proudů, které se postupem času spojily, a to německo-židovská škola a na druhé straně francouzsko-anglická pozitivistická škola. Důležitost selektivního antibakteriálního účinku vědecky popsal jako první Paul Ehrlich. Do té doby se pro léčbu infekčních onemocnění využívaly jako léčiva sloučeniny síry, arsenu a rtuti, které však byly kvůli nespecificitě málo účinné a zejména toxické. Ehrlichovým cílem bylo zhotovení přípravku, který by zničil patogenní mikroby v lidském těle bez poškození okolní tkáně. Po dlouhém bádání objevil společně se svým žákem Sahachiro Hatou arsfenamin, který se v té době využíval zejména k léčbě syfilis. Gerhard Domagk o dvacet pět let později zavedl do praxe ještě účinnější sloučeniny – sulfonamidy. Zlom ovšem nastal v roce 1940, kdy vědci vycházející z práce Alexandra Fleminga dokázali z mikrobiálních kultur připravit první celkově použitelný antibakteriální lék přírodního původu – penicilin. Tímto objevem začala éra objevování podobných látek s antibakteriálním účinkem, které se označují jako antibiotika. Tento souhrnný název zavedl mikrobiolog Selman Abraham Waksman, mimo jiné objevitel streptomycinu. [1]

Naneštěstí s objevením nových antimikrobiálních látek se zde vyskytl velmi významný globální problém, a tím je bakteriální rezistence.

Rezistenci patogenních bakterií k antibiotikům lze vysvětlit jako schopnost dané bakteriální populace přežít účinky určité koncentrace příslušného antibiotika, což může později vést k nefunkční terapii. Mnoho bakteriálních kmenů je přirozeně rezistentních k určitým antibiotikům. Například všechny Gram-pozitivní bakterie jsou přirozeně rezistentní k aztreonamu, temocilinu či kyselině nalidixové a všechny Gram-negativní bakterie ke glykopeptidům či linezolidu. Přirozenou rezistenci lze rovněž pozorovat i konkrétních kmenů spadajících do výše popsaných skupin. Bohužel se u bakterií objevuje i rezistence získaná, která se u mnohých kmenů objevila po zavedení antibiotik jako účinných léčiv proti infekčním onemocněním. Mechanismů, které získanou rezistenci způsobují, bylo doposud popsáno sedm. Jedná se o enzymatickou inaktivaci antibiotika, zábranu přístupu antibiotika k cílové buňce, aktivní odstranění antibiotika z bakteriální buňky, zábranu aktivace daného antibiotika, přeměnu cílového místa, nahrazení zablokované metabolické dráhy a vytvoření nadbytku cílových míst. [1]

Ať už se jedná o rezistenci přirozenou či získanou, představuje obrovský globální problém zejména do budoucna. Proto je nutné neustále pracovat na výzkumu nových antibiotik, která by měla pozitivní účinek v terapii infekčních onemocnění.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Bakteriální rezistence u Gram-pozitivních kmenů

Jak již bylo zmíněno v úvodu, některé bakteriální kmeny jsou přirozeně rezistentní vůči určitému typu antibiotik, ale zároveň si rezistenci mohou vybudovat. Přispívajícími faktory ke vzniku rezistence jsou např. nadměrné užívání antibiotik či používání širokospektrých antibiotik. Tato práce je věnována zejména rezistenci u Gram-pozitivních koků, proto jsou následující kapitoly věnovány především jim.

2.1.1 Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA)

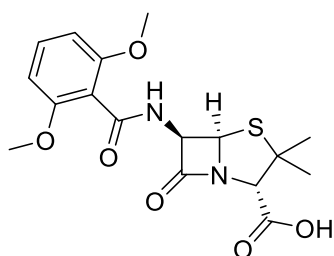
Staphylococcus aureus (Obr. 1) je Gram-pozitivní bakterie kulovitěho tvaru, která se vyskytuje v lidském organismu jako součást přirozené mikroflóry kůže, nosní sliznice či hltanu, méně často se vyskytuje v gastrointestinálním traktu, vagině či axilách. Běžně je *Staphylococcus aureus* označován jako zlatý stafylokok. Ačkoliv je součástí přirozené mikroflory, jedná se o velmi zásadní patogen. Přítomnost toho stafylokoka na nosní sliznici je trvalá zhruba u 30 % populace, u zbylých 70 % je přítomnost na sliznici pouze dočasná. Za vhodných podmínek se stává původcem infekce, spektrum těchto infekcí je široké, je schopný vyvolat např. bakteremii, sepsi, purulentní onemocnění měkkých tkání a kůže, artritidy, infekce močových cest nebo například infekční endokarditidu. Dále způsobuje hnisavé komplikace ran a popálenin, zejména u jedinců se slabší imunitou. [2]



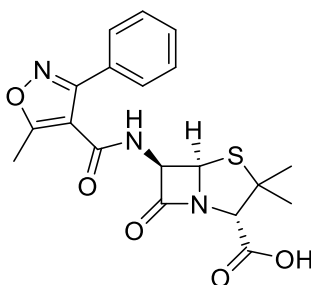
Obr. 1 Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

Zdroj obrázku: <https://microbenotes.com/wp-content/uploads/2018/12/Methicillin-Resistant-Staphylococcus-aureus-MRSA.jpg>

Po zavedení penicilinu do klinické praxe ve 40. letech minulého století se začaly objevovat rezistentní kmeny k tomuto antibiotiku, v r. 1946 už tvořily rezistentní kmeny tohoto druhu 60 %. Od 60. let minulého století došlo k šíření multirezistentních kmenů, včetně těch rezistentních k methicilinu (Obr. 2), vztaženo na Českou republiku k oxacilinu (Obr. 3). [3] Prvotní mechanismus rezistence na penicilin spočíval ve tvorbě β -laktamázy, jenž hydrolyzuje β -laktamový kruh léčiva. Produkci tohoto enzymu má na svědomí gen *bla*, který se nachází na plazmidu. Tento mobilní genetický element se velmi snadno šíří jak vertikálně, tak i horizontálně. V důsledku této skutečnosti se začaly vyvíjet tzv. protistafylokokové peniciliny (methicilin, oxacilin, nafcilin apod.), léčiva stabilní vůči působení β -laktamázy, jejichž zavedení do praxe bylo předpokladem k tomu, že se problém s narůstající rezistencí povede vyřešit. Naneštěstí se začala objevovat postupem času rezistence i k těmto antibiotikům. [2] Mechanismus této rezistence tkví v přítomnosti *mecA* genu. Jedná se o gen, který zodpovídá za přeměnu proteinu PBP2 na PBP2a. Protein PBP2 je enzym potřebný k tvorbě buněčné stěny, potažmo její složky peptidoglykanu, což je jedinečná prokaryotická struktura. PBP2a není rozpoznáván antibiotikem (oxacilin, ale současně i většina β -laktamových antibiotik) jako vazebné místo, tudíž se nenaváže a nedochází zde k žádnému účinku. [3]



Obr. 2 Vzorec methicilinu



Obr. 3 Vzorec oxacilinu

Předpokládá se, že MRSA pochází hned z několika úspěšných linií methicilin-rezistentního *Staphylococcus aureus*, u kterých se nezávisle na sobě vyskytla chromozomální *mec* kazeta s genem rezistence. Dle epidemiologického a genetického charakteru rozdělujeme kmeny MRSA na komunitní (CA-MRSA), nemocniční (HA-MRSA) a zvířecí (LA-MRSA). Nákaza kmenem HA-MRSA hrozí u zejména starších pacientů pobývajících v nemocnicích či léčebnách dlouhodobě nemocných. U těchto pacientů dochází k infekcím v krevním řečišti, katetrovým sepsím nebo například k infekcím

močového či respiračního systému. U HA-MRSA kmenů se často vyskytuje rezistence na více skupin antibiotik, zatímco infekce vyvolané kmenem CA-MRSA se vyskytují častěji u mladých zdravých lidí a objevuje se zde rezistence pouze na beta-laktamová antibiotika. CA-MRSA se v Evropě vyskytuje spíše ojediněle. Kmen LA-MRSA byl popsán v Nizozemí v roce 2004, objevuje se zejména u koní, prasat a turu. Pro LA-MRSA je charakteristická rezistence na tetracyklin, což je antibiotikum v minulosti hojně používané v rámci živočišné výroby. Tyto kmeny mají sice zvíře jako primárního hostitele, ale mohou však osidlovat i lidský organismus a za vhodných podmínek v něm vyvolat infekci. Tato skutečnost se týká zejména chovatelů nebo veterinářů. [3]

Podle průzkumu European Antimicrobial Resistance Network dochází k fluktuaci výskytu infekcí způsobených MRSA v jednotlivých státech Evropy mezi 1-50 %. Mezi země s nejvyšším výskytem patří středomořské státy, naopak severské státy patří k zemím s nejnižším výskytem. [3]

2.1.2 Současná léčba MRSA infekcí

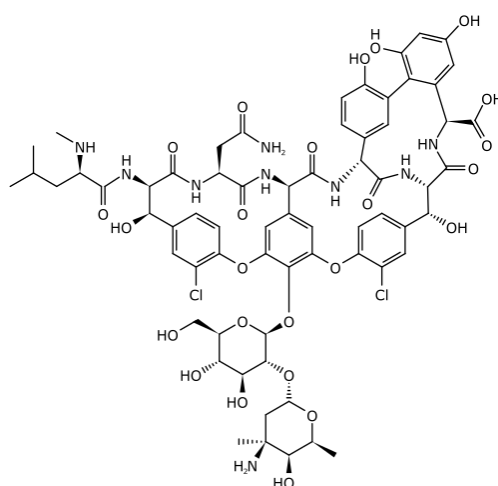
2.1.2.1 Glykopeptidy

Antibiotika patřící do této skupiny inhibují tvorbu peptidoglykanu podobně jako β -laktamová antibiotika, ale využívají k tomu jiný mechanismus. Glykopeptidy se vážou na konec pentapeptidu, což je jedna ze základních stavebních složek peptidoglykanu. Tato skupina antibiotik působí pouze proti Gram-pozitivním bakteriím, a proto se tato antibiotika označují jako úzkospektrá. Molekuly glykopeptidů jsou poměrně velké a obecně lze říci, že jsou tvořeny peptidovým řetězcem tvořeným sedmi aminokyselinami, pěti až sedmi propojenými aromatickými kruhy a dvěma až třemi cukry či aminocukry. Aromatické kruhy tvoří okolo peptidového skeletu cyklické formace a cukry se vyskytují po obvodu molekuly. Kromě vankomycinu a teikoplaninu patří do této skupiny i např. telavancin, dalbavancin nebo oritavancin. [1]

2.1.2.1.1 Vankomycin

Vankomycin (Obr. 4) řadíme mezi glykopeptidová antibiotika. Ačkoliv byl v padesátých letech minulého století zaveden do praxe, nebyl kvůli svým ototoxickým a nefrotoxickým účinkům tolik využíván, nicméně postupem času se díky purifikačním

postupům a dávkovacím schémátům povedlo se tyto nežádoucí účinky značně omezit. Vankomycin inhibuje tvorbu buněčné stěny, účinkuje zejména proti Gram-pozitivním bakteriím a některým anaerobům. Při léčbě MRSA infekcí se využívá jako antibiotikum první volby. Nevýhodou vankomycinu je skutečnost, že hůře proniká do plic kvůli svojí velké molekule a jak již bylo zmíněno, je nefrotoxický, proto není vhodný pro pacienty trpící renální insuficiencí; u těchto pacientů se jako varianta při léčbě podává linezolid. Podání vankomycinu by v ideálním případě mělo proběhnout prodlouženou infuzí. Naneštěstí rozsáhlé využívání vankomycinu způsobilo vznik nových rezistentních kmenů – VISA, VRSA a VRE. [2][3]

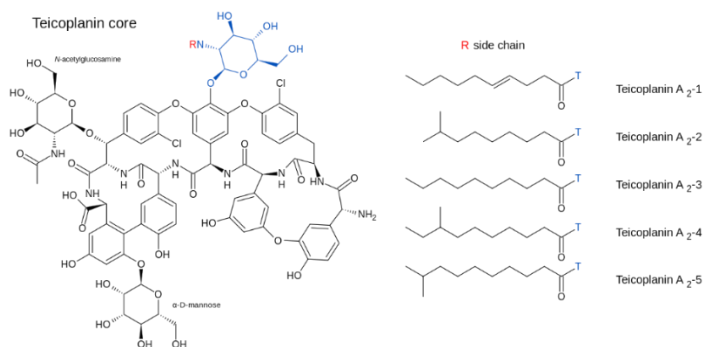


Obr. 4 Vzorec vankomycinu

2.1.2.1.2 Teikoplanin

Teikoplanin je svojí strukturou podobný vankomycinu, mají stejný mechanismus účinku i podobné spektrum působení, na rozdíl od vankomycinu je součástí molekuly teikoplaninu i postranní řetězec, který může mít pět variant, a proto se rozlišuje pět typů teikoplaninu (Obr. 5). V běžných léčivých přípravcích je použita směs těchto typů. Teikoplanin má přibližně dvakrát vyšší účinek proti streptokokům, enterokokům a pneumokokům oproti vankomycinu, nicméně proti druhu *Staphylococcus aureus* je účinek srovnatelný. Nevýhodou teikoplaninu oproti vankomycinu je pomalé nasycování organismu, z čehož plyne pomalý nástup účinku a nemožnost monitorování jeho sérových koncentrací v plazmě kvůli jeho nehomogenosti. Nehodí se proto pro léčbu

prudce probíhající infekcí a k léčbě u pacientů na jednotkách intenzivní péče. Nicméně oproti vankomycinu zde pozorujeme dlouhý poločas, který umožňuje podávat toto antibiotikum jednou denně. Také je zde lepší snášenlivost, menší výskyt nežádoucích účinků a možnost podání intramuskulární injekcí nebo pomalou nitrožilní injekcí. Proto je teikoplanin vhodný k léčbě dlouhodobých infekcí. [1]



Obr. 5 Vzorec teikoplaninu

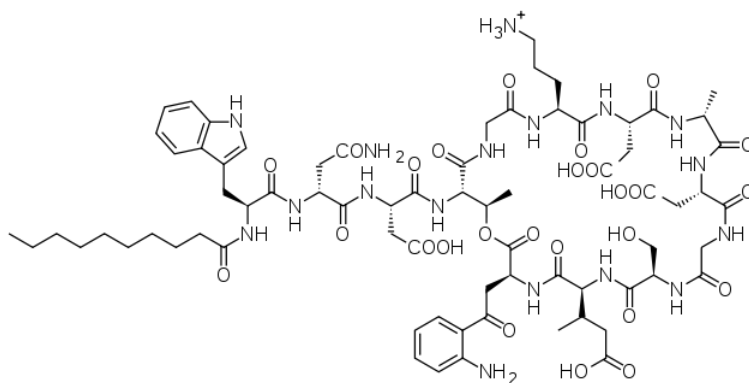
Zdroj obrázku:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c9/Teicoplanin_core_and_major_components.svg/1920px-Teicoplanin_core_and_major_components.svg.png

2.1.2.2 Daptomycin

Z hlediska systematiky řadíme daptomycin (Obr. 6) mezi cyklická lipopeptidová antibiotika. Jeho účinek se vztahuje pouze na Gram-pozitivní bakterie, mezi které zahrnujeme MRSA i stafylokoky se sníženou citlivostí k vankomycinu (VISA). Jeho mechanismus účinku spočívá ve vazbě na cytoplazmatickou membránu, kde inaktivuje některé metabolické funkce bez toho, aniž by musel proniknout do buňky. Vniká do lipidové dvojvrstvy, vytvoří v ní kanál, jímž unikají malé vodíkové a draselné kationty ven, čím dochází k depolarizaci membrány a následné buněčné smrti. Působení tohoto antibiotika je rychlé, v klidovém stádiu ochotně proniká do biofilmu. Vznik rezistence je poměrně vzácný a bývá spojován se spontánními mutacemi. Daptomycin je doporučeným antibiotikem v léčbě stafylokokové infekční endokarditidy, infekcí kostí a kloubů, sepsí apod., nicméně není příliš vhodný pro léčbu pneumonie, jelikož ho surfaktant inaktivuje. Není vhodný ani pro léčbu infekcí centrální nervové soustavy, jelikož špatně proniká skrz hematoencefalickou bariéru. Při podávání daptomycinu je nutné sledovat hladiny kreatinkinázy, jelikož nejvýznamnějším negativním účinkem bývá

myopatie, svalová slabost, ve výjimečných případech rhabdomyolýza, periferní neuropatie, léková horečka nebo eozinofilní pneumonie. Myopatie bývá vratná a odeznívá po vysazení během několika dnů nebo týdnů. Tyto nežádoucí účinky závisí spíše na frekvenci podávání než na množství antibiotika. V praxi se nejedná o antibiotikum první volby, ale využívá se jako cenný rezervní lék, pokud antibiotikum první volby selže nebo nemůže být použito. [1][2][3]

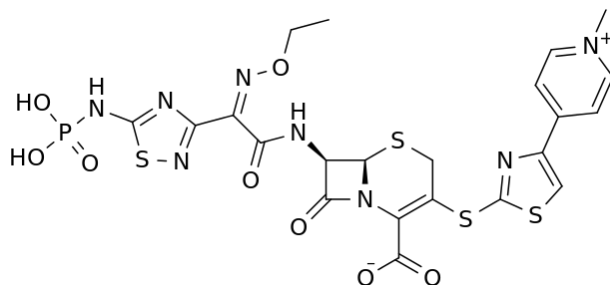


Obr. 6 Vzorec daptomycinu

2.1.2.3 Ceftarolin

Ceftarolin (Obr. 7) se vyznačuje zvýšeným účinkem proti Gram-pozitivním bakteriím, řadí se do 5. generace cefalosporinů a do jeho spektra působení spadají i kmeny MRSA, které jsou k přípravkům 1.-4. generace (i jiným β -laktamům) rezistentní. Účinek proti MRSA je podmíněný afinitou ceftarolinu k PBP2a, způsobí zde změnu konformace aktivních molekul a inhibuje aktivitu enzymů. V České republice je ceftarolin jediným β -laktamovým antibiotikem, které lze použít proti infekcím způsobených MRSA, což je jeho hlavním potenciálem v terapii. Jedná se o antibiotikum s rychlým baktericidním účinkem, které je zároveň netoxické a je minimálně náchylné k rozvoji lékových interakcí. Využívá se pro léčbu komunitních pneumonie a komplikované infekce kůže a měkkých tkání, dále je možné ho využít k léčbě smíšených infekcí, které jsou kromě MRSA způsobené i jinými Gram-pozitivními a Gram-negativními bakteriemi. Ceftarolin nepůsobí proti nefermentujícím Gram-negativním tyčinkám, jako jsou např. pseudomonády, ale ani proti *Bacteroides fragilis*. Je vcelku pravděpodobné, že v zemích s vysokým výskytem penicilin-rezistentních pneumokoků bude toto antibiotikum využito v léčbě pneumokokových infekcí. [1][2][3]

Dalším zástupcem 5. generace cefalosporinů s účinností vůči MRSA díky afinitě k PBP2a je ceftobiprol, který má potenciál i v léčbě VRSA a VRE infekcí. [5]



Obr. 7 Vzorec proléčiva ceftarolinu (ceftarolin fosamilu)

Zdroj obrázku: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2d/Ceftaroline_fosamil2DCSD.svg

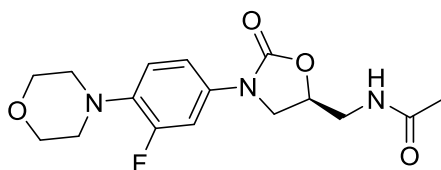
2.1.2.4 Oxazolidinony

Jedná se o poměrně „mladou“ skupinu antibiotik. Oxazolidinony byly připraveny až koncem 80. let minulého století, jedná se o látky vyrobené čistě chemickou cestou. Jejich mechanismus účinku je založen na inhibici proteosyntézy, ovšem odlišným způsobem, než využívají ostatní antibiotika s touto vlastností. Kromě linezolidu a tedizolidu do této skupiny patří také např. posizolid, radezolid nebo sutezolid. [1]

2.1.2.4.1 Linezolid

Systematicky řadíme linezolid do skupiny oxazolidinonů. Linezolid (Obr. 8) je v současné době prvním a také prozatím jediným zástupcem oxazolidinonů s častým využitím. Primárně se u něj neobjevuje zkřížená rezistence s jinými skupinami antibiotik, díky tomu setrvává účinný proti většině multirezistentním stafylokoků, enterokokům či pneumokokům (působí proti MRSA, VISA, VRSA, VRE a dalším), ale také mykobakteriím. Mechanismus účinku spočívá v inhibici proteosyntézy jiným způsobem, než běžně využívá většina antibiotik zasahujících ribozomy. Váže se primárně na 50S podjednotku v místě A, čím zabrání ribozomu ve funkčním uspořádání všech jeho částí. Paralelně s tímto je blokován přísun t-RNA nesoucí aminokyseliny pro stavbu peptidového řetězce. Dále je inhibována translokace řetězce z místa A do místa P, což vede k celkovému zablokování proteosyntézy a ovlivnění produkce bakteriálních toxinů. Tento způsob zastavení proteosyntézy představuje nejefektivnější způsob, jak dostat infekci

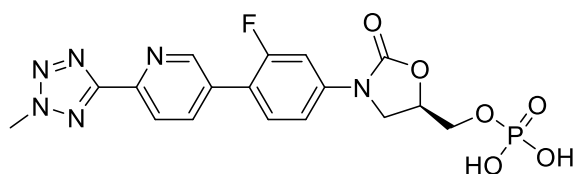
pod kontrolu. Linezolid se vyznačuje dobrým průnikem do měkkých tkání, centrální nervové soustavy a plicního parenchymu. Další kladnou vlastností linezolidu je jeho téměř dokonalé vstřebávání z GIT. Využívá se jako antibiotikum první volby v léčbě nekrotizující pneumonie vyvolané bakteriemi produkujícími Pantonův-Valentinův leukocidin. Dále se využívá v léčbě infekcí kůže a podkoží nebo např. kostí a kloubů, není však příliš vhodný pro léčbu Gram-pozitivní sepse, infekční endokarditidy či pneumokokové meningitidy; u těchto onemocnění zůstává linezolid záložním antibiotikem. Linezolid může být podáván i pacientům s významnou renální insuficiencí. Jako nežádoucí účinky tohoto antibiotika se často objevují bolesti hlavy, nevolnost, průjem či dysmikrobie. Závažnější nežádoucí účinky postihují hematopoetické buňky kostní dřeně, metabolismus či nervovou soustavu, původ těchto účinků zřejmě spočívá v poškození mitochondrií a zároveň predispozicí mohou být již dříve probíhající onemocnění jako např. diabetes, epilepsie či anemie. [1][2][3]



Obr. 8 Vzorec linezolidu

2.1.2.4.2 Tedizolid

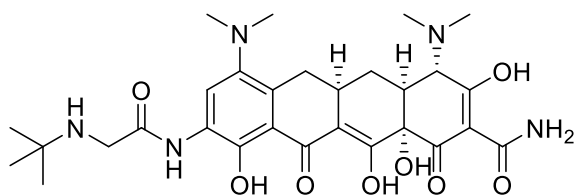
Tedizolid (Obr. 9) vznikl odvozením od linezolidu, obsahuje větší substituent (místo původní morfolinové struktury obsažené v linezolidu) a fosfátovou skupinu na druhém konci molekuly. V České republice je tedizolid schválený jako antibiotikum pro léčbu závažných infekcí kůže a měkkých tkání. Jeho spektrum účinku je velmi podobné jako u linezolidu, účinkuje zejména proti streptokokům, stafylokokům a enterokokům. Oproti linezolidu je tedizolid minimálně 4× váhově efektivnější, dále má i delší biologický poločas. Prozatím nejsou s tímto antibiotikem velké zkušenosti v klinické praxi, tudíž neexistuje mnoho informací o účinnosti a bezpečnosti léčby. Tedizolid by do budoucna mohl představovat efektivní léčbu stafylokokových či pneumokokových pneumonií, infekcí kostí, kloubů nebo i cévního řečiště, nicméně v tomto případě bude zřejmě zapotřebí podávat dlouhodobě vyšší dávky. [1][2][3]



Obr. 9 Vzorec tedizolidu

2.1.2.5 Tigecyklin

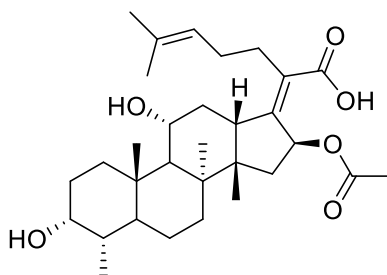
Tigecyklin (Obr. 10) spadá systematicky do skupiny tetracyklinů, konkrétně glycylycyklinů. Vznikl odvozením z minocyklinu, ke kterému byl připojen postranní řetězec na první aromatický kruh tetracyklinového jádra. Součástí tohoto postranního řetězce je glycin, který dal název celé skupině antibiotik. Molekula tigecyklinu má strukturu odolnou vůči efluxu a ochraně ribozomů, což jsou hlavní mechanismy rezistence proti tetracyklinům. Tigecyklin je obtížně transportovatelný pomocí efluxních pump, které využívají např. enterobakterie nebo stafylokoky. Dále má daleko větší afinitu k bakteriálním ribozomům než zbytek tetracyklinů a ochranné bílkoviny proti němu neplní efektivně svojí funkci. Díky těmto vlastnostem působí tigecyklin proti mnoha patogenním bakteriím, u kterých se vyvinula rezistence vůči β -laktamovým antibiotikům i jiným často využívaným antibiotikům včetně klasických tetracyklinů. Tigecyklin typicky inhibuje MRSA, VRE, ale i VISA či VRSA. Nicméně použití při léčbě MRSA není zdaleka tak jednoduché, jelikož při standardní dávce dosahuje tigecyklin nízkých sérových koncentrací. Proto je dané použití poněkud kontroverzní. Toto antibiotikum na rozdíl od tetracyklinů 1.a 2. generace musí být podáváno nitrožilně kvůli nízkému vstřebávání z GIT. Léčebný potenciál tigecyklinu je velký, avšak v současnosti je registrován jen pro léčbu infekcí kůže, měkkých tkání a těžkých intraabdominálních infekcí, a jelikož se jedná o bakteriostatické antibiotikum, není vhodný pro léčbu akutní těžké sepse ani empirickou léčbu těžkých infekcí. [1][2][3]



Obr. 10 Vzorec tigecyklinu

2.1.2.6 Kyselina fusidová

Kyselina fusidová (Obr. 11) se v současné době začíná opět častěji využívat v souvislosti s narůstající rezistencí. Jedná se o přirozený produkt houby *Fusidium coccineum*. Tato sloučenina má steroidní jádro, nicméně nemá hormonální aktivitu. Jedná se o jediného zástupce steroidních antibiotik, jelikož se doposud nepodařilo vyvinout strukturálně podobnou molekulu se srovnatelnou biologickou aktivitou. Kyselina fusidová má biologickou aktivitu zejména proti stafylokokům, na citlivé bakterie působí staticky, nicméně vůči velmi citlivých kmenům může působit až baktericidně. Mechanismus účinku spočívá v inhibici elongačního faktoru G, tento faktor je součástí ribozomů a podílí se na proteosyntéze. Nedoporučuje se podávat kyselinu fusidovou samostatně, jelikož zde hrozí riziko snadného vzniku rezistence, nejčastěji je podávána v kombinaci s rifampicinem. Tato kombinace se ukázala být úspěšnou v léčbě MRSA infekcí. Kyselina fusidová velmi ochotně proniká do tkání, a proto je vhodná pro stafylokokových hnisavých infekcí a infekcí kostí a kloubů, lokálně se podává např. při léčbě impetiga nebo povrchových infekcí v ranném stádiu. V České republice jsou zatím registrovány pouze lokálně podávané přípravky. [1]



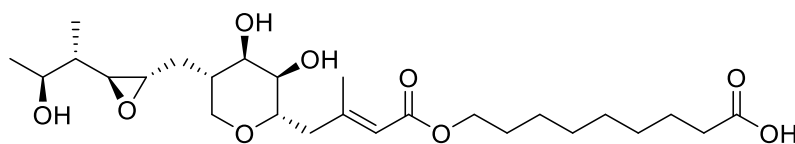
Obr. 11 Vzorec kyseliny fusidové

2.1.2.7 Mupirocin

Tato látka je přirozeným produktem bakterie *Pseudomonas fluorescens*. V současné době je znám fakt, že tento kmen tvoří čtyři antibakteriální látky, v angličtině

se označují souhrnně jako „pseudomonic acids“. Mupirocin (Obr. 12) neboli „pseudomonic acid A“, je z této skupiny látek nejúčinnější. Má naprosto unikátní strukturu, jeho mechanismus účinku spočívá v navázání se na aktivní centrum bakteriální izoleucyl-t-RNA-syntetázy jako falešný substrát. Tento enzym je jiný než lidský, a proto toto antibiotikum působí selektivně na bakteriální buňky. Izoleucyl-t-RNA-syntetáza spojuje izoleucin s kompatibilní t-RNA, což je jedna z klíčových reakcí pro správný průběh proteosyntézy. Díky unikátnímu mechanismu účinku se u mupirocinu neobjevuje žádná zkřížená rezistence s ostatními léčivy. Intenzita účinku závisí na koncentraci, např. při lokálním podání je koncentrace natolik vysoká, že působí baktericidně. Účinek závisí ale i na pH, při poklesu pH se účinek zvyšuje, díky této vlastnosti působí lépe na povrchu kůže či sliznice než v krvi. Využívá se při léčbě běžných kožních a slizničních infekcí, působí efektivně na patogeny, ale přitom nehubí přirozenou mikroflóru. Dále se využívá k topické dekolonizaci MRSA, ale také MSSA na nosní sliznici, což je významné např. pro předoperační přípravu před některými zákroky, kde by výskyt těchto bakterií v dýchacích cestách byl pro pacienta značně rizikový. Dále se využívá při léčbě drobných traumat nebo malých chirurgických výkonů na kůži, kde došlo ke zmnožení bakterií. [1]

Mupirocin je vyráběn zejména v podobě masti, není ale příliš vhodné ho podávat dlouhodobě či opakovaně s kratšími pauzami, jelikož by to mohlo vést k selekci rezistence. Získaná rezistence se u tohoto antibiotika vyskytuje dvojího typu a spočívá ve změně cílového enzymu. U prvního typu dochází k bodovým mutacím příslušného genu, což následně vede k nízkému stupni rezistence, která se dá překonat zvýšenou koncentrací antibiotika. Ve druhém případě existují zmutované geny, které zapříčiní vznik enzymů s velmi malou afinitou k antibiotiku. Tyto geny mohou být přenášeny pomocí transposonů či plazmidů, nicméně jejich výskyt je prozatím ojedinělý. [2]

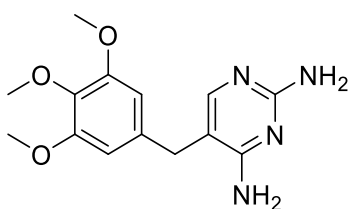


Obr. 12 Vzorec mupirocinu

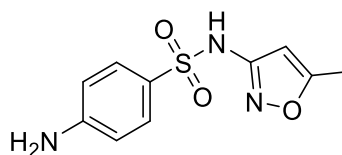
2.1.2.8 Kotrimoxazol

Kotrimoxazol (TMP-SMX) je kombinovaný sulfonamidový přípravek, který obsahuje diaminopyrimidin trimethoprim (Obr. 13) a sulfonamid sulfamethoxazol (Obr. 14) ve váhovém poměru 1:5. Tato kombinace způsobuje inhibici dvou souvisejících/navazujících metabolických pochodů syntézy kyseliny listové u bakterií; kyselina listová je klíčovým prekurzorem při tvorbě nukleotidů. Navíc trimethoprim a sulfamethoxazol společně působí synergicky, což znamená, že k zastavení množení bakterie postačí nižší koncentrace antibiotika, než kdybychom tyto látky podávali samostatně. Jinými slovy, jestliže každou látku podáme samostatně, bude jejich účinek bakteriostatický, ale pokud se látky spojí, působí baktericidně. Dále kombinace těchto látek snižuje vznik a selekci rezistence k oběma složkám. Kotrimoxazol je vhodný k dlouhodobé léčbě MRSA infekcí, dále se využívá k léčbě akutních infekcí ledvin, močových cest a prostaty, GIT infekcí, stafylokokových infekcí kůže, sliznic a pojivových tkání, infekcí dýchacího systému, infekcí pohlavních orgánů, ale i k léčbě vzácnějších bakteriálních infekcí. Ve vysokých dávkách se využívá v terapii pneumocystové pneumonie nebo ho lze využít jako alternativu s nižším účinkem u toxoplazmózy. Naopak je kotrimoxazol kontraindikován v těhotenství, nesmí být podán ani novorozencům nebo při těžkých funkčních poruchách jater a ledvin. Není příliš vhodný pro polymorbidní osoby, u kterých by mohlo docházet k lékovým interakcím, dále pro alkoholiky, kde hrozí komplexní metabolické poruchy, či jedince náchylné k alergickým reakcím, u kterých by mohlo dojít např. k toxické epidermální nekrolýze.

[1][2][3]



Obr. 13 Vzorec trimethoprimu



Obr. 14 Vzorec sulfamethoxazolu

2.1.2.9 Trimethoprim

Trimethoprim (Obr. 13) se řadí do skupiny diaminopyrimidinů, což jsou bakteriostatická antibiotika s poměrně širokým spektrem účinku, nicméně se u nich

naneštěstí vyskytuje získaná rezistence. Využívají se více v kombinaci se sulfonamidy, jejich samostatné použití je méně časté. Trimethoprim je z této skupiny nejvýznamnější, je registrovaný a využíváný jako samostatné léčivo, ale využívá se především v kombinaci se sulfamethoxazolem, se kterým tvoří antibiotikum kotrimoxazol. Trimethoprim je zároveň jediným zástupcem skupiny, který je registrovaný v České republice. Do jeho spektra působení spadají enterobakterie, zejména *Escherichia coli*, ale také stafylokoky, konkrétně *Staphylococcus aureus*. Trimethoprim je primárně využíváný k léčbě infekcí močových cest, ale jelikož se objevuje vůči tomuto antibiotiku rezistence, využívá se pouze pro cílenou léčbu těchto onemocnění. Dále je toto antibiotikum vhodné použít v rámci jednorázové profylaxe při ambulantních výkonech na močových cestách a prostatě u pacientů přicházejících z komunity, např. při diagnostické punkci prostaty či katetrizaci měchýře. Trimethoprim není příliš vhodný k dlouhodobé léčbě ani k léčbě závažnějších infekcí či chronické prostatitidy. Vyskytují se zde kontraindikace při poruchách krvetvorby, těžších anémiích, žloutence či těžkých poruchách jater a ledvin. Dalšími případy, kdy se nesmí toto léčivo podávat, jsou těhotenství nebo protinádorová terapie. [1][7]

2.1.3 *Staphylococcus aureus* rezistentní vůči vankomycinu (VISA a VRSA)

Jelikož se v posledních letech stal vankomycin antibiotikem první volby v terapii MRSA infekcí, začala se u toho druhu objevovat vůči tomuto antibiotiku rezistence. První případ byl zaznamenán a popsán v Japonsku v r. 1997, konkrétně se jednalo o výskyt *Staphylococcus aureus* s intermediární rezistencí vůči vankomycinu (VISA). Zvyšování minimální inhibiční koncentrace je v tomto případě spojeno s mutacemi, které se vyvinuly během prodloužené léčby. Nálezy VISA jsou popisovány celosvětově a podrobnějším zkoumáním populace byla zjištěna heterogenní citlivost k β -laktamovým antibiotikům. Mechanismus rezistence tkví ve zmožnění buněčné stěny, přes kterou nemohou účinně procházet velké molekuly antibiotik do buňky. Další mechanismus rezistence by mohl spočívat ve zvýšení syntézy D-alanyl-D-alaninu v buněčné stěně, což má za následek vyvazování vankomycinu. [2][7]

První výskyt vankomycin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (VRSA) byl zaznamenán v roce 2002 v USA. Šlo v tomto případě o izolát, který byl nalezen současně s izolátem vankomycin-rezistentního enterokoka (VRE). Po prozkoumání genomu VRSA bylo zjištěno, že obsahuje nejen gen *mecA* způsobující rezistenci vůči β -laktamovým antibiotikům, ale také gen *vanA* podmiňující rezistenci na vankomycin u rodu *Enterococcus*. Toto zjištění vede k předpokladu, že zde dochází k přenosu rezistence mezi druhy, jelikož byla současně prokázána identičnost DNA obou genů pomocí sekvenace. [2][7]

Z epidemiologického hlediska jsou kmeny VISA menší hrozbou než VRSA, jelikož u VISA byly popsány nepřenosné mechanismy rezistence, které mizí v momentě, kdy vankomycin není v prostředí přítomný, protože jsou pro buňku velmi energeticky náročné. Nicméně i přes výskyt rezistence zůstává vankomycin antibiotikem první volby v léčbě MRSA infekcí, zejména endokarditidy a bakteriémie. [2][7]

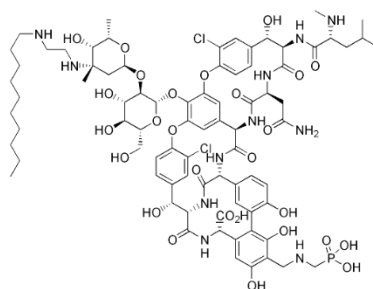
2.1.4 Současná léčba VRSA/VISA infekcí

U VISA kmenů se objevuje poměrně velká variabilita ohledně rezistence k určitým antibiotikům, není proto žádné uniformní doporučení pro to, které léčivo v terapii použít. Pro léčbu VISA infekcí může být použito např. chinupristin-dalfopristin, linezolid, TMP-SMX, tigecyklin nebo daptomycin. Tato léčiva mohou být v rámci terapie podávána samostatně, ale i v kombinaci s ostatními léčivy proti VISA infekcím. U telavancinu, antibiotika ze skupiny glykopeptidů, byl zaznamenán účinek proti VISA, nicméně vůči VRSA je jeho aktivita slabá, zatímco u antibiotika ceftarolinu byl zaznamenán *in vitro* účinek jak proti VISA, tak proti VRSA. [7]

2.1.4.1 Telavancin

Struktura telavancinu (Obr. 15) připomíná strukturu vankomycinu, liší se však tím, že obsahuje navíc dva postranní řetězce, z nichž je jeden hydrofobní a jeho funkcí je napojení léčiva na bakteriální membránu, jeho další vlastností je schopnost poškodit strukturu membrány, pokud dojde k vklínění většího počtu molekul antibiotika, a tím způsobit smrt buňky. Telavancin má tedy rychlý baktericidní účinek, ale na druhou stranu má také dlouhý postantibiotický účinek. Vykazuje tak duální účinek a můžeme ho

zařadit mezi antibiotika inhibující tvorbu peptidoglykanu, ale i mezi antibiotika, která destruuji membrány bakterií. Druhý postranní řetězec tvoří fosfomethylová skupina, je tudíž hydrofilní a díky tomuto řetězci dochází k relativně rychlému vylučování antibiotika renální cestou, ale zřejmě se podílí i na řadě nežádoucích účinků, mezi které patří např. pachůť v ústech, nauzea, nespavost, závratě, zácpa nebo průjem. Objevuje se zde i alergie, která může být zkřížená s alergií na vankomycin. Telavancin může být potenciálně nefrotoxický a ototoxický, u některých osob může přispívat k rozvoji arytmie. V zemích Evropské unie byl zaregistrován pro terapii nozokomiálních pneumonií u dospělých pacientů, jejichž původcem je MRSA. Nicméně mohl by najít uplatnění i v terapii infekcí způsobenými multirezistentními Gram-pozitivními bakteriemi, např. i proti VISA, jak bylo již uvedeno výše. Z epidemiologického pohledu má telavancin poměrně vysoký výskyt nežádoucích účinků, které brání jeho širšímu využití. [1][7]



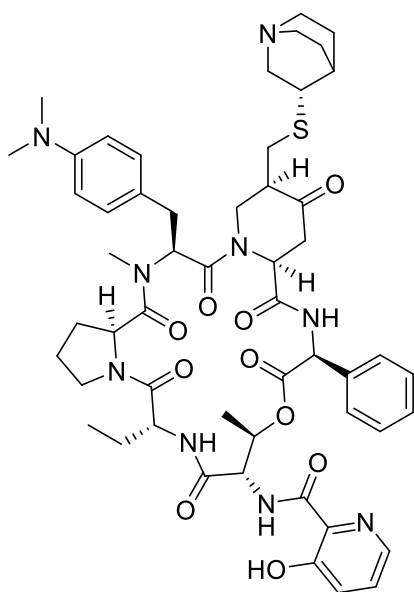
Obr. 15 Vzorec telavancinu

2.1.4.2 Chinupristin/dalfopristin

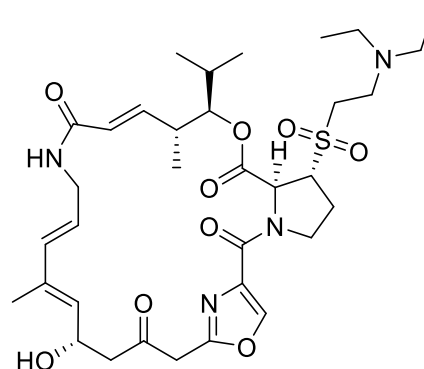
Chinupristin/dalfopristin se řadí mezi streptograminy. Tato skupina antibiotik má podobnou strukturu i mechanismus účinku jako makrolidová antibiotika. Každé antibiotikum spadající do této skupiny se skládá ze dvou částí, obě tyto části působí na ribozomy a navzájem se doplňují. První složka (Obr. 16) je tvořena nenasyceným makrocyclickým laktonem a váže se na peptidyl-transferázu obsaženou v ribozomech, čím způsobí změnu prostorového uspořádání ribozomu a umožňuje snadnější navázání druhé složky. Druhá složka (Obr. 17) je tvořena cyklickým hexadepsipeptidem a jejím úkolem je stabilizace „nového“ uspořádání ribozomu, což vede k trvalému poškození funkce ribozomu a dále k uvolnění nedokončeného peptidového řetězce z ribozomu, který se následně v cytoplazmě jeví jako nefunkční bílkovina. Samostatné účinky obou

složek jsou vratné a působí bakteriostaticky, nicméně spojení účinků obou těchto složek již působí baktericidně. Chinupristin/dalfopristin je v současné době jediným antibiotikem z této skupiny, které je využíváno v humánní medicíně. Toto léčivo je účinné především proti stafylokokům, jinak je to úzkospektré antibiotikum spolehlivě působící jen proti Gram-positivním bakteriím. Další nevýhodou tohoto léčiva je omezený průnik do tkání, proto jeho podávání musí probíhat pouze přes centrální žilní katétr, což do značné míry omezuje jeho využití v praxi. Chinupristin/dalfopristin byl registrován za účelem léčby komplikovaných infekcí měkkých tkání a kůže, ale jeho hlavní využití spočívá v léčbě infekcí způsobenými multirezistentními bakteriemi, zejména rezistentními stafylokoky jako jsou VISA a VRSA. Ačkoliv působí proti těmto kmenům efektivně, najde se v praxi málo vhodných situací pro využití tohoto léčiva, jelikož je zatím možné využívat v terapii stafylokokových infekcí i řadu jiných účinných antibiotik.

[1][7]



Obr. 16 Vzorec chinupristinu



Obr. 17 Vzorec dalfopristinu

2.1.5 Vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE)

Enterokoky byly původně zařazovány mezi streptokoky, jelikož se u nich vyskytuje skupinově specifický antigen D, nicméně díky jejich výrazně odlišným vlastnostem byly nakonec zařazeny do svého vlastního rodu *Enterococcus*. Z hlediska barvení podle Grama je zařazujeme mezi Gram-pozitivní bakterie. Jedná se o fakultativně anaerobní koky vyskytující se jednotlivě nebo tvořící krátké řetízky. Enterokoky jsou poměrně nenáročné na kultivaci, vyrůstají na základních kultivačních půdách, tzn. nepotřebují krev a jiné speciální látky, také jsou schopny nárůstu v širokém rozmezí pH a jsou odolné i vůči řadě chemických a fyzikálních vlivů. [8]

Díky těmto vlastnostem dokážou přežít v podstatě všude, což je předurčuje k roli významných původců různých infekcí. Způsobují komunitní i nozokomiální infekce, jsou původci infekcí močového ústrojí, břicha, respiračního traktu, vzácněji mohou být původci subakutních endokarditid. Mohou osidlovat i chirurgické rány a krevní řečiště. [8][9][10]

Do rodu *Enterococcus* patří mnoho druhů, ale klinicky nejvýznamnější jsou jednoznačně druhy *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*. [8] Původcem většiny enterokokových nákaz je druh *Enterococcus faecalis*, u kterého byla zaznamenána poměrně dobrá citlivost k aminopenicilinům, naneštěstí se objevila u některých izolátů rezistence vůči této skupině antibiotik, v takových případech terapie spočívá v podávání glykopeptidů, zejména vankomycinu nebo teikoplaninu. [9][10] V 80. letech minulého století došlo i u druhu *Enterococcus faecium* k významnému rozšíření fenotypu s vysokou rezistencí vůči ampicilinu. Tato rezistence byla podmíněna transpeptidázou PBP5, nicméně tento nárůst rezistence byl řešitelný, a to konkrétně terapií glykopeptidy, které blokují syntézu peptidoglykanů a tím i stavbu buněčné stěny. Naneštěstí došlo k rozvoji rezistence i vůči glykopeptidům, jelikož se začaly šířit vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE) a nastal tím významný terapeutický problém. [8][10]

Výskyt VRE byl poprvé popsán v roce 1988 v Anglii, principem rezistence je změna terminální struktury D-alanyl-D-alanyl v peptidoglykanu na D-alanyl-D-laktát nebo D-alanyl-D-serin. Geny, které kódují tyto přeměny, jsou obsaženy v přenosných genetických elementech, při jejichž transportu dochází ke snadnému šíření rezistence,

zejména k šíření fenotypů VanA a VanB. Nyní je známo celkem pět fenotypů u enterokoků rezistentních k vankomycinu. Jsou to fenotypy A, B, C, D a E. V České republice byl první výskyt VRE popsán v roce 1997. Je pravděpodobné, že VRE v rámci Evropy pocházejí z hospodářských zvířat a k rozšíření došlo díky využívání avoparcinu, antibiotika patřícího mezi glykopeptidy, jehož používání bylo v Evropě zakázáno právě v roce 1997. Dle dostupných dat z databáze EARS-net činilo v roce 2017 procento *Enterococcus faecium* rezistentního k vankomycinu v České republice 4-13 %. [8][10]

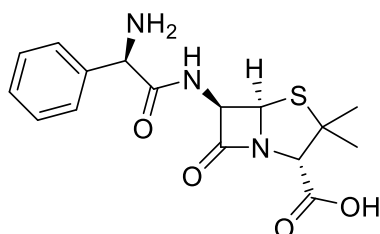
2.1.6 Léčba VRE infekcí

Antibiotická léčba infekcí způsobenými vankomycin-rezistentními enterokoky závisí na typu infekce, ale i na citlivosti organismu k danému antibiotiku. Mnohdy musí být antibiotikum vybrané „na míru“. Zahájení cílené léčby VRE by mělo proběhnout, v případě důvodného podezření, že se jedná o VRE infekci nebo pokud selže předchozí terapie. Jak již bylo uvedeno v kapitole 4.1.3, valnou většinu infekcí způsobuje druh *Enterococcus faecalis*, který má tendenci být citlivý k β -laktamům a aminoglykosidům. U nediferencovaných *E. faecalis* je častější rezistence k vankomycinu než k aminopenicilinům a je kladen důraz na to, aby k β -laktamová antibiotika zůstávala první volbou u většiny těchto infekcí. U *Enterococcus faecium* se zase naopak objevuje vysoká rezistence vůči β -laktamům a aminoglykosidům. Obecně lze říci, že pokud je enterokok rezistentní k vankomycinu, využívají se pro léčbu rezervní antibiotika linezolid a daptomycin. Dalšími antibiotiky, která lze v terapii využívat, jsou ampicilin, nitrofurantoin, fosfomycin nebo např. chloramfenikol. [9]

2.1.6.1 Ampicilin

Ampicilin (Obr. 18) se řadí mezi aminopeniciliny, stejně jako jemu strukturně velmi podobná látka amoxicilin. Jediným rozdílem ve struktuře těchto látek je ten, že u amoxicilinu je přítomná jedna hydroxylová skupina na benzenovém jádře navíc, což napomáhá lepšímu vstřebávání z trávicího ústrojí i v přítomnosti potravy, zatímco pro dobré vstřebávání ampicilinu je nutno lačnit. Obě tyto látky mají shodné spektrum účinku s penicilinem G a navíc působí na Gram-negativní tyčky. V případě *Enterococcus faecalis* vykazují aminopeniciliny dokonce lepší účinnost než penicilin G. Aminopeniciliny

podléhají působení β -laktamáz, což je i důvodem výskytu získané rezistence vůči nim. V praxi se využívají přípravky, které kombinují tato antibiotika s inhibitory β -laktamáz. Nicméně pro terapii infekcí způsobených *Enterococcus faecalis* se využívají přípravky bez těchto inhibitorů, jelikož tento druh β -laktamázu neprodukuje. Mechanismus účinku ampicilinu spočívá v inhibici stavby buněčné stěny pomocí blokády proteinů, které vážou penicilin (PBP, transpeptidázy), tudíž ampicilin působí baktericidně blokadou výstavy buněčné stěny. Aminopeniciliny se mohou předepisovat také v případě infekcí, které by se mohly léčit i pomocí penicilinu, nicméně aminopeniciliny se jeví jako výhodnější volba právě díky jejich dobrému vstřebávání z trávicího traktu. Jedná se o infekce způsobené streptokoky, pneumokoky, spirochetami či aktinomycetami. Na druhou stranu není vhodné podávat tato léčiva pacientům právě trpícím infekční mononukleózou. [1][9]

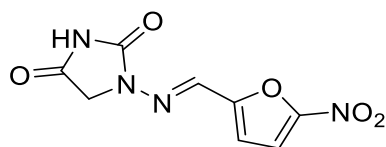


Obr. 18 Vzorec ampicilinu

2.1.6.2 Nitrofurantoin

Řadí se do skupiny nitrofuranů, což je skupina poměrně starých antibiotik, které vykazují nízkou účinnost, nepříliš výhodnou farmakokinetiku i omezenou snášenlivost, ale jejichž velmi významnou výhodou je vzácný výskyt rezistence vůči nim. Nitrofurany mají převážně bakteriostatický účinek a jejich mechanismus účinku je založen na působení enzymů uvnitř buňky na nitroskupinu léčiva, která se redukuje. Díky redukci molekula léčiva produkuje velmi reaktivní radikály, které se navážou na struktury v okolí, např. ribozomy, nukleové kyseliny i na enzymy, které jsou součástí metabolismu. Nitrofurantoin (Obr. 19) je známý ve dvou formách, a to v mikrokrystalické a makrokrystalické. V současné době se využívají přípravky, které kombinují obě tyto formy nebo obsahují pouze makrokrystaly. Nitrofurantoin našel uplatnění v terapii infekcí dolních močových cest, nicméně nikoliv infekcí ledvin či prostaty. Spolu s fosfomycinem je nitrofurantoin jediným antibiotikem u nás, které je možné využít v rámci spolehlivé terapie nekomplikované komunitní urocystitidy za předpokladu, že

neznáme citlivost původce infekce. Využívá se i dlouhodobě k prevenci recidiv u urocystitid, jelikož vývoj rezistence je v těchto podmínkách (oproti trimethoprimu nebo kotrimoxazolu) obtížný. [1][9]

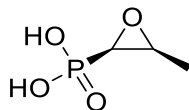


Obr. 19 Vzorec nitrofurantoinu

2.1.6.3 Fosfomycin

Fosfomycin (Obr. 20) tvoří v podstatě sám „skupinu“ mezi ostatními antibiotiky, která inhibují syntézu peptidoglykanů. Působí totiž na úrovni prvních reakcí tvořících peptidoglykanové prekurzory v bakteriální cytoplasmě. Jedná se o přirozený produkt bakterie *Streptomyces fradiae*. Fosfomycin má poměrně jednoduchou strukturu, kterou tvoří tři uhlíky, na které jsou napojeny epoxidový kyslík a fosfonátová skupina. Vyznačuje se baktericidním účinkem, který v porovnání s β -laktamy nastupuje pomaleji. Nevykazuje zkříženou rezistenci s ostatními antibiotiky, jelikož působí na unikátní místo v bakterii. Jeho působení využívá podobnosti s fosfoenolpyruvát, který se v buňce bakterie připojuje na *N*-acetylglukosamin za vzniku *N*-acetylmuranové kyseliny, která je jednou ze základních složek pro tvorbu peptidoglykanu. Fosfomycin zastává funkci falešného substrátu, který se váže na aktivní centrum enzymu zprostředkovávajícího vazbu fosfoenolpyruvátu na *N*-acetylglukosamin a tím znemožňuje tvorbu stavebních složek peptidoglykanu. Do jeho spektra účinku spadají zejména enterobakterie, stafylokoky a *Enterococcus faecalis*. Vzhledem k jedinečnému mechanismu působení byl u něj zaznamenán i účinek proti bakteriím rezistentním na běžná antibiotika včetně MRSA. Ačkoliv je fosfomycin účinný proti *Enterococcus faecalis*, tak u druhu *Enterococcus faecium* se objevuje vůči tomuto antibiotiku získaná rezistence. Je vhodný pro léčbu infekcí močových cest. Nevýhodami jsou nízká váhová účinnost, kvůli které se fosfomycin podává v poměrně vysokých dávkách, a snadno vznikající rezistence. Z důvodu rizika rezistence se fosfomycin nepoužívá jako antibiotikum první volby, ale

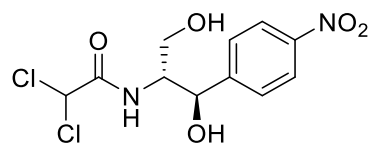
spíše jako záložní léčivo, např. u pacientů, kteří nemohou být léčeni nitrofurantoinem. [1][9]



Obr. 20 Vzorec fosfomicinu

2.1.6.4 Chloramfenikol

Chloramfenikol (Obr. 21) se řadí do skupiny amfenikolů. Antibiotika z této skupiny se vyznačují širokým spektrem působení, dále výborně pronikají do tkání, nicméně velká nevýhoda spočívá v toxicitě vůči krvetvorným buňkám v kostní dřeni. Chloramfenikol pochází z bakterie *Streptomyces venezuelae*. Po poměrně krátké době, kdy byl využíván k léčebným účelům, byla odhalena jeho myelotoxicita, a na základě tohoto zjištění se (neúspěšně) hledala látka, která by byla bezpečnější, ale přitom stejně účinná. Jedná se o malou lipofilní molekulu, která snadno proniká přes fyziologické bariéry v organismu, což společně se širokým spektrem účinku patří mezi hlavní výhody tohoto antibiotika. Mechanismus účinku spočívá v reverzibilní vazbě chloramfenikolu na 50S ribozomovou podjednotku a následné inhibici proteosyntézy. Díky tomuto mechanismu působí primárně bakteriostaticky, ovšem vůči některým druhům jako např. *Neisseria meningitidis* nebo *Streptococcus pneumoniae* může působit až baktericidně. Chloramfenikol způsobuje jak nespecifické nežádoucí účinky jako nauzea, cefalea, alergické reakce či dysmikrobie, tak i závažnější neurologické projevy, které mohou vést až k parézám. Kvůli nežádoucím účinkům se chloramfenikol využívá pouze v případě závažných infekcí, které jsou jinak neléčitelné. Momentálně bývají důvodem podání chloramfenikolu polymikrobiální komunitní infekce, u kterých se předpokládá účast anaerobů. Díky skvělému průniku tkáněmi se chloramfenikol využívá v terapii infekcí vznikajících na místech špatně přístupných pro jiná antibiotika, ale i chirurgický zásah. S výhodou se toto léčivo používá u léčby mozkového abscesu či aspirační pneumonie. Dále je ho možno využít v terapii těžkých infekcí, které způsobují atypické bakterie, příkladem takové infekce je skvrnitý tyfus nebo Q-horečka. Chloramfenikol může být efektivně využit i za bioteroristického útoku, kde je potřeba postižené jedince chránit současně před tularemíí, antraxem, morem a jinými bakteriálními nákazami. [1][9]



Obr. 21 Vzorec chloramfenikolu

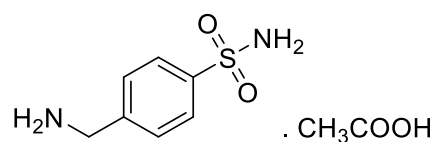
2.2 Design cílových molekul

Při syntéze nových látek byl využit jako předlohouvá struktura mafenid a dále Schiffovy baze odvozené od salicylaldehydů a dalších aldehydů. Tyto látky byly vybrány na základě jejich biologických aktivit vůči bakteriím, mykobakteriím a houbám.

2.2.1 Mafenid

Mafenid (MAF), často používaný jako mafenid-acetát (Obr. 22), je syntetická látka, strukturně podobná sulfonamidům stejně jako kyselině *p*-aminobenzoové (pABA). Chemicky se jedná o 4-(aminomethyl)benzensulfonamid. Od „klasických“ sulfonamidů se liší tím, že má na benzenovém jádře v pozici *para* aminomethyl skupinu namísto nesubstituované aminoskupiny. Tato molekula vykazuje bakteriostatický účinek vůči širokému spektru Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií, zejména pak *Pseudomonas aeruginosa*, a také u ní byla prokázána u několika druhů antifungální aktivita. [11] Byl představen poprvé v 60. letech minulého století. Dalo by se předpokládat, že mechanismus účinku bude stejný jako u sulfonamidů, které jsou strukturními analogy pABA a soutěží s ní o vazebné místo na dihydropteroát syntáze, čímž přímo zasahují do syntézy kyseliny dihydropteroové, která je prekurzorem pro kyselinu tetrahydrofolovou – koenzymatickou aktivní formu kyseliny listové. Nicméně na základě určitých nepřímých pozorování lze říci, že se mechanismus účinku mafenidu liší od mechanismu účinku sulfonamidů, spočívá totiž v inhibici enzymu karboanhydrázy a popsána byla i inhibice biosyntézy nukleotidů. [12] Inhibiční účinek mafenidu není antagonizován pABA, sérem, hnisem či tkáňovými exsudáty, a tudíž zde neexistuje žádná korelace mezi bakteriální citlivostí vůči mafenidu a sulfonamidům. [13] Další výhodou této látky je biologická aktivita vůči rezistentním kmenům. [12]

Bylo prokázáno, že MAF je schopen pronikat do tkání a strupů, čímž se liší od řady ostatních léčiv podávaných lokálně. Díky této vlastnosti se hojně využívá pro léčbu těžkých popálenin, jelikož umožňuje hojení i velmi hlubokých ran. Dále se využívá v doplňující léčbě jako profylaktikum snižující bakteriální zátěž. [14] Mafenid je kontraindikován u pacientů s poruchou funkce ledvin nebo přecitlivělých na sulfonamidy. Může také potenciálně vést k metabolické acidóze, právě kvůli inhibici karboanhydrázy. [15]

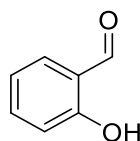


Obr. 22 Vzorec mafenid-acetátu

2.2.2 Schiffovy báze odvozené od salicylaldehydů

Obecně se jedná o sloučeniny, které vznikly jako kondenzační produkty primárních aromatických aminů s karbonylovými sloučeninami a nesoucí azomethinovou část $-CR=N-$, která je stěžejní pro biologickou aktivitu. Ať už se jedná o látky přírodního původu či uměle připravené, vykazují široké spektrum působení. Uplatňují se mj. jako potenciální antibakteriální, antituberkulotická i antifungální činidla a jedná se o poměrně hojně využívané struktury v medicíně. Schiffovy báze odvozené salicylaldehydu (Obr. 23) jsou známy jak ve formě ligandu, kdy tvoří komplexy s kovy, tak ve volné formě. Byla popsána celá řada biologicky aktivních Schiffových bází odvozených od sulfonamidů. [16][17]

K antibakteriálnímu a antifungálnímu působení přispívá i vazba jednoho či více halogenových atomů na aromatickém kruhu. Chlor, brom a zejména jod v malé organické molekule mění rozložení náboje, což molekule umožňuje další interakce. Dále přítomnost halogenů může zlepšovat průchod membránami a jinými biologickými bariérami, čím je umožněna mj. lepší absorpce po perorálním podání nebo zvýšení prostupnosti hematoencefalickou bariérou. [18]



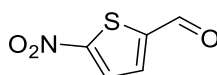
Obr. 23 Vzorec salicylaldehydu

2.2.3 Schiffovy báze odvozené od 5-nitrovaných pětičlenných heterocyklů

U pětičlenných heterocyklů bývá jejich chemoterapeutická aktivita spojována s vazbou nitroskupiny na pátém uhlíku jejich kruhu. U sloučenin obsahujících strukturu 5-nitrothiofenu zasazenou do různých heterocyklických systémů byla prokázána

antifungální aktivita např. vůči *Candida* sp. či *Cryptococcus neoformans* [19], ale také aktivita antibakteriální či antiprotozoální. [20]

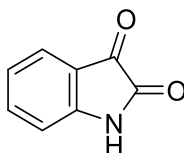
Schiffovy báze odvozené od 5-nitrovaných pětičlenných heterocyklů vykazují také biologickou aktivitu vůči mykobakteriím. Ať už se jedná o látky, jejichž základem je thiofen nebo furan, spektrum účinku je u nich v podstatě stejné. Při porovnávání těchto nitrovaných derivátů s jejich nenitrovanými ekvivalenty bylo zjištěno, že nitrované Schiffovy báze vykazují lepší antimykobakteriální účinek než látky bez nitro skupiny. [21]



Obr. 24 Vzorec 5-nitrothiofen-2-karbaldehydu

2.2.4 Antimikrobiální látky odvozené od isatinu

Isatinová struktura (1*H*-indol-2,3-dion; Obr. 25) je v přírodě všudypřítomná. Deriváty odvozené od isatinu mají různé farmakologické vlastnosti, působí např. proti malárii, HIV, karcinomům, ale také mají antituberkulotickou a antibakteriální aktivitu. Některé sloučeniny na bázi isatinu jako např. semaxanib a indirubin byly studovány jako potenciální léčiva a postoupily do klinické fáze vývoje. Deriváty isatinu jsou strukturně velmi rozmanité a jejich chemická diverzita vedla k jejich rozsáhlému využití při syntézách biologicky aktivních látek. Například hybridní látky vycházející ze struktury isatinu a hydrazonů, potažmo semikarbazonů, mají široké spektrum účinků a byla u nich prokázána vynikající biologická aktivita vůči Gram-pozitivním bakteriím včetně VRE a MRSA. [22][23]



Obr. 25 Vzorec isatinu

3 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce je shrnutí základních poznatků o problematice antibiotické rezistence zejména u Gram-pozitivních koků a současných možností léčby infekcí, které způsobují.

Cílem praktické části je syntéza celkem třinácti nových Schiffových bází, které vychází se struktury mafenid-acetátu a dále ve své molekule obsahují fragment odvozený od salicylaldehydu, halogenovaného salicylaldehydu, 5-nitrothiofen-2-karbaldehydu a isatinu. Tyto karbonylové sloučeniny byly vybrány na základě známé biologické aktivity jejich derivátů a jejich vzájemnou kombinací do jedné molekuly sledujeme zvýšení antimikrobní aktivity a účinnost i proti rezistentním Gram-pozitivním kokům. Všechny připravené sloučeniny budou charakterizovány a bude otestována aktivita vůči Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriím, mykobakteriím a patogenním houbám a výsledky budou porovnány s mafenidem. Očekáváme, že látky vykazující biologickou aktivitu vůči Gram-pozitivním kokům by měly vykazovat účinek proti mykobakteriím.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemie

4.1.1 Obecné metody

Při syntézách byly použity komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla od firem Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Německo), Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) a Penta Chemicals (Praha, Česká republika), které byly dále použity bez dalšího čištění, výjimkou byl hexan, který byl přečištěn destilací.

Průběh všech reakcí byl pravidelně monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Jako stacionární fáze byly použity destičky s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F254 od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Jako mobilní fáze byla používána soustava dichlormethan/methanol/hexan v poměru 4:1:1 (v/v/v), detekce byla prováděna UV lampou (A. Krüss Optronic, Hamburk, Německo) při vlnových délkách 254 a 366 nm.

Teploty tání byly stanoveny v otevřené kapiláře v přístroji Melting Point Machine B-540 (Büchi, Flawil, Švýcarsko) a nejsou korigovány.

Infračervená spektra byla změřena technikou ATR (attenuated total reflectance; Ge krystal) spektrofotometrem Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) v rozmezí 650-4000 cm^{-1} . Měření probíhala na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (paní Iva Vencovská).

NMR spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, CSc. Měření probíhala při laboratorní teplotě na přístrojích Varian VNMR S500 (500 MHz pro ^1H a 126 MHz pro ^{13}C ; Varian Comp., Palo Alto, CA, USA) a JNM-ECZ 600R (600 MHz pro ^1H a 151 MHz pro ^{13}C ; JEOL, Tokio, Japonsko). Jako rozpouštědlo byl použit deuterovaný dimethylsulfoxid ($\text{DMSO-}d_6$) a aceton ($\text{aceton-}d_6$). Hodnoty chemického posunu δ (v ppm) v protonových spektrech jsou vztaženy k tetramethylsilanu jakožto vnitřnímu standardu, uhlíkové posuny byly stanoveny podle centrální linie signálu rozpouštědla ($\text{DMSO-}d_6$ při $\delta = 39.5$ ppm, $\text{aceton-}d_6$ při $\delta = 29.8$ a 206.3 ppm). Interakční

konstanta (J) je uvedena v Hz. NMR spektra byla vyhodnocena pomocí programu MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španělsko).

Elementární analýza (C, H, N) byla provedena na přístroji Vario MICRO Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, Hanau, Německo) na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Vypočtené i změřené hodnoty jsou udány v procentech.

Chemické vzorce a reakční schémata byly vytvořeny a chemické názvy byly zkontrolovány pomocí programu ChemDraw Ultra 20.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

Čistota připravených sloučenin byla ověřena pomocí TLC, NMR spektroskopie, teploty tání a elementární analýzy.

4.1.2 Příprava cílových sloučenin

4.1.2.1 Obecný postup přípravy

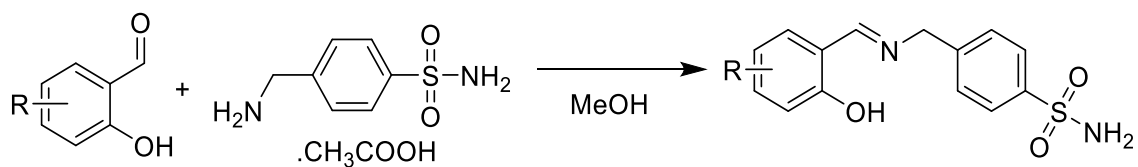
Deriváty odvozené od salicylaldehydů a 5-nitrothiofen-2-karbaldehydu byly syntetizovány dle následujícího obecného postupu přípravy (Obr. 26 a Obr. 27): 0,001 mol mafenid-acetátu (246,3 mg) bylo rozpuštěno v 8 ml methanolu a za stálého míchání bylo přidáno v jednom podílu 1,1 ekvivalentu (0,0011 mol) aldehydu. Reakční směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem a zahřívána za teploty varu rozpouštědla 2-3 hodiny, pak ponechána zchladnout a následně ponechána 12 hod při teplotě +8 °C. Reakční směs byla následně zfiltrována, krystaly byly promyty na filtru malým množstvím vody a diethyletheru a následně vysušeny.

Pro syntézu derivátu isatinu (Obr. 28) byl využit následující postup:

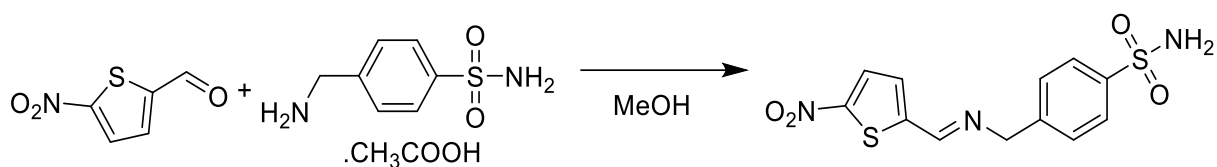
1,1 ekvivalentu isatinu (167,1 mg) bylo suspendováno ve 12 ml destilované vody, přidány byly tři kapky kyseliny octové a isatin byl následně za varu rozpuštěn. Následně byl přidán 1 ekvivalent mafenid-acetátu (246,3 mg) a reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu varu rozpouštědla po dobu 6 hodin. Poté byl přidán octan sodný (2 ekvivalenty, 161,1 mg) a směs byla zahřívána dále 30 minut, následně ponechána zchladnout a míchána za laboratorní teploty po dobu 12 hodin. Vzniklé

krystaly byly odfiltrovány, promyty malým množstvím vody, poté diethyletherem a vysušeny.

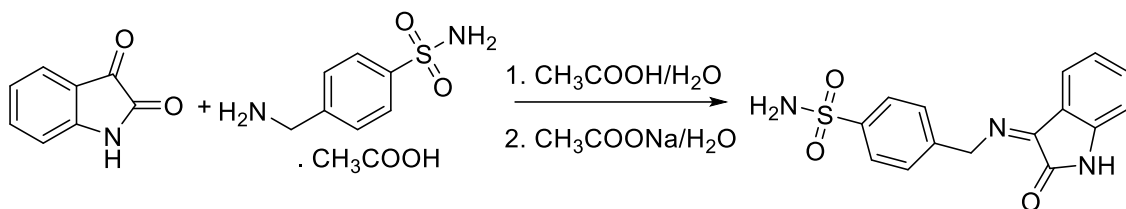
Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR, IR spekter (viz Příloha IR spekter), teploty tání a hodnot R_f .



Obr. 26 Schéma syntézy derivátů odvozených od salicylaldehydu



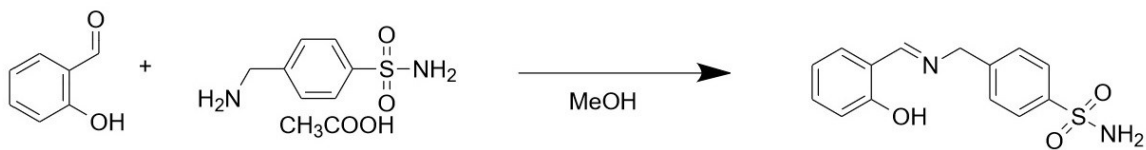
Obr. 27 Schéma syntézy derivátu odvozeného od 5-nitrothiofen-2-karbaldehydu



Obr. 28 Schéma syntézy derivátu odvozeného od isatinu

4.1.2.2 Přípravy a charakterizace jednotlivých připravených sloučenin

(*E*)-4-[[2-hydroxybenzyliden)amino]methyl}benzensulfonamid [A 1]



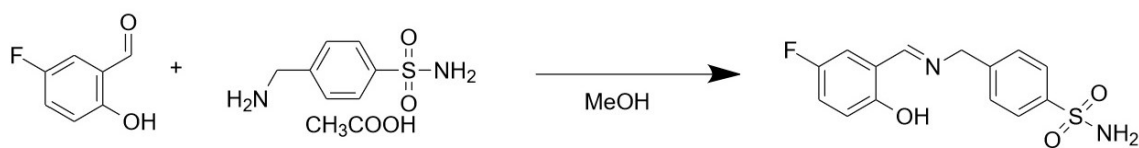
Sumární vzorec:	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₃ S
Relativní molekulová hmotnost:	290,34
Popis:	velmi světle žluté krystaly
Výtěžek:	66 %
Teplota tání:	158,4 °C (lit. 162 °C) [24]
R _f :	0,82

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.26 (1H, s, OH), 8.75 (1H, s, N=CH), 7.84-7.81 (2H, m, H₂, H₆), 7.54-7.51 (2H, m, H₃, H₅), 7.50 (1H, dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, H₆'), 7.38-7.33 (3H, m, SO₂NH₂, H₄'), 6.93 (1H, td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, H₅'), 6.89 (1H, dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, H₃'), 4.88 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 167.39, 160.56, 143.18, 142.88, 132.76, 132.01, 128.36, 126.17, 118.96, 118.89, 116.65, 61.64.

EA: vypočteno: C, 57.92; H, 4.86; N, 9.65, nalezeno: C, 58.01; H, 4.83; N, 9.69.

(E)-4-[[[(5-fluor-2-hydroxybenzyliden)amino]methyl]benzensulfonamid [A 2]



Sumární vzorec: $C_{14}H_{13}FN_2O_3S$

Relativní molekulová hmotnost: 308,33

Popis: žluté krystaly

Výtěžek: 92 %

Teplota tání: 141,1 °C

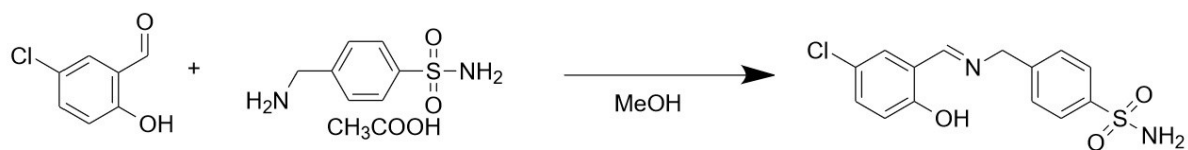
R_f: 0,87

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ 12.90 (1H, s, OH), 8.68 (1H, s, N=CH), 7.81-7.78 (2H, m, H₂, H₆), 7.51-7.48 (2H, m, H₃, H₅), 7.35 (1H, dd, J = 9.0, 3.3 Hz, H₆'), 7.20-7.16 (1H, m, H₄'), 7.31 (2H, s, SO₂NH₂), 6.88 (1H, d, J = 9.0, 4.5 Hz, H₃'), 4.86 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO): δ 166.40, 157.09, 155.30 (d, J = 234.1 Hz), 143.59, 143.05, 128.77, 126.54, 120.04 (d, J = 23.2 Hz), 119.42 (d, J = 7.3 Hz), 118.33 (d, J = 8.1 Hz), 117.20 (d, J = 23.4 Hz), 62.10.

EA: vypočteno: C, 54.54; H, 4.25; N, 9.09, nalezeno: C, 54.59; H, 4.30; N, 9.16.

(E)-4-[[[(5-chlor-2-hydroxybenzyliden)amino]methyl]benzensulfonamid [A 3]



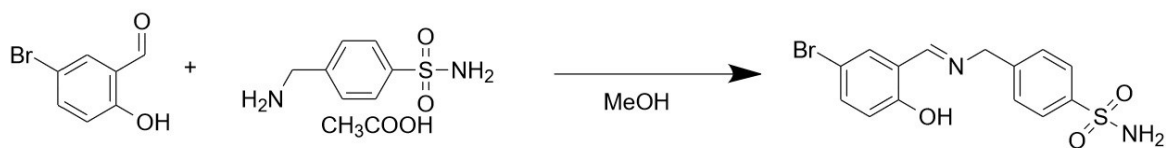
Sumární vzorec:	C ₁₄ H ₁₃ ClN ₂ O ₃ S
Relativní molekulová hmotnost:	324,78
Popis:	světle žluté krystaly
Výtěžek:	85 %
Teplota tání:	162,5 °C (lit. 161 °C) [25]
R _f :	0,78

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.28 (1H, s, OH), 8.73 (1H, s, N=CH), 7.84-7.81 (2H, m, H₂, H₆), 7.61 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H₆'), 7.55-7.51 (2H, m, H₃, H₅), 7.38 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.7 Hz, H₄'), 7.34 (2H, s, SO₂NH₂), 6.92 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H₃'), 4.89 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 166.00, 159.41, 143.24, 142.56, 132.37, 130.76, 128.40, 126.17, 122.28, 120.05, 118.73, 61.57.

EA: vypočteno: C, 51.77; H, 4.03; N, 8.63, nalezeno: C, 51.81; H, 3.99; N, 8.67.

(E)-4-[[[(5-brom-2-hydroxybenzyliden)amino]methyl]benzensulfonamid **[A 4]**



Sumární vzorec: $C_{14}H_{13}BrN_2O_3S$

Relativní molekulová hmotnost: 369,23

Popis: světle žluté krystaly

Výtěžek: 62 %

Teplota tání: 171,5 °C (lit. 173 °C) [25]

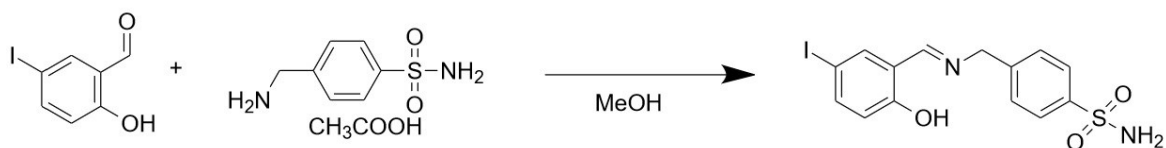
R_f: 0,64

1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.27 (1H, s, OH), 8.69 (1H, s, N=CH), 7.80-7.77 (2H, m, H₂, H₆), 7.69 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H₆'), 7.51-7.48 (2H, m, H₃, H₅), 7.45 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, H₄'), 7.30 (2H, s, SO₂NH₂), 6.84 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H₃'), 4.85 (2H, s, CH₂).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 166.32, 160.23, 143.63, 142.92, 135.52, 134.07, 128.77, 126.54, 121.05, 119.56, 109.96, 61.91.

EA: vypočteno: C, 45.54; H, 3.55; N, 7.59, nalezeno: C, 45.58; H, 3.56; N, 7.62.

(E)-4-[[[(2-hydroxy-5-iodobenzylidene)amino]methyl]benzensulfonamid **[A 5]**



Sumární vzorec: $C_{14}H_{13}IN_2O_3S$

Relativní molekulová hmotnost: 416,23

Popis: sytě žluté krystaly

Výtěžek: 70 %

Teplota tání: 172 °C

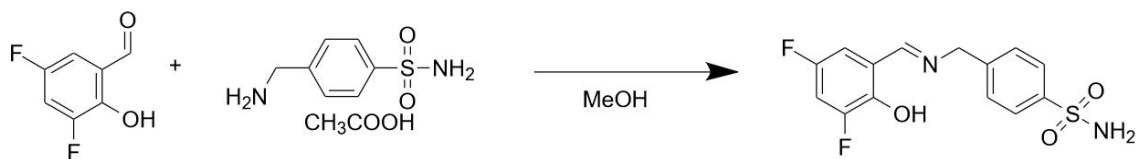
R_f: 0,64

1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.28 (1H, s, OH), 8.67 (1H, s, N=CH), 7.82 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H6'), 7.80-7.75 (2H, m, H2, H6), 7.58 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, H4'), 7.50-7.47 (2H, m, H3, H5), 7.30 (2H, s, SO₂NH₂), 6.71 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H3'), 4.84 (2H, s, CH₂).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 166.34, 160.80, 143.61, 142.94, 141.16, 140.03, 128.77, 126.54, 121.71, 119.93, 80.55, 61.89.

EA: vypočteno: C, 40.40; H, 3.15; N, 6.73, nalezeno: C, 40.38; H, 3.14; N, 6.65.

(E)-4-[[[(3,5-difluor-2-hydroxybenzylidene)amino]methyl]benzensulfonamid [A 6]



Sumární vzorec: $C_{14}H_{12}F_2N_2O_3S$

Relativní molekulová hmotnost: 326,32

Popis: žluté krystaly

Výtěžek: 89 %

Teplota tání: 218,3 °C

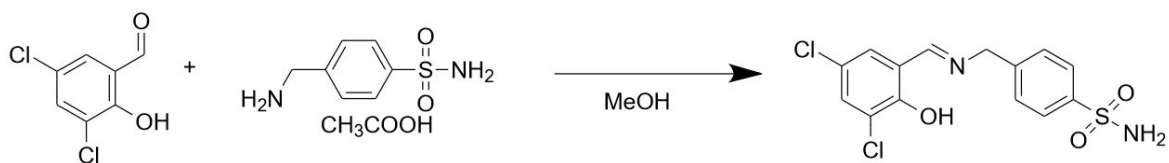
R_f: 0,84

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 13.56 (1H, s, OH), 8.72 (1H, s, N=CH), 7.81-7.78 (2H, m, H2, H6), 7.52-7.48 (2H, m, H3, H5), 7.41-7.36 (1H, m, H6'), 7.32 (2H, s, SO₂NH₂), 7.24-7.21 (1H, m, H4'), 4.89 (2H, s, CH₂).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 166.50, 153.34 (dd, $J = 236.1, 10.8$ Hz), 150.93 (dd, $J = 246.2, 12.1$ Hz), 147.50 (d, $J = 13.6$ Hz), 143.73, 142.53, 128.83, 126.58, 119.86 (dd, $J = 8.9, 5.6$ Hz), 112.58 (dd, $J = 24.9, 3.7$ Hz), 108.38 (dd, $J = 27.9, 22.0$ Hz), 61.15.

EA: vypočteno: C, 51.53; H, 3.71; N, 8.58, nalezeno: C, 51.48; H, 3.74; N, 8.61.

(E)-4-[[[(3,5-dichlor-2-hydroxybenzyliden)amino]methyl]benzensulfonamid [A 7]



Sumární vzorec: $C_{14}H_{12}Cl_2N_2O_3S$

Relativní molekulová hmotnost: 359,22

Popis: sytě žluté krystaly

Výtěžek: 64 %

Teplota tání: 206 °C (lit. 199 °C) [25]

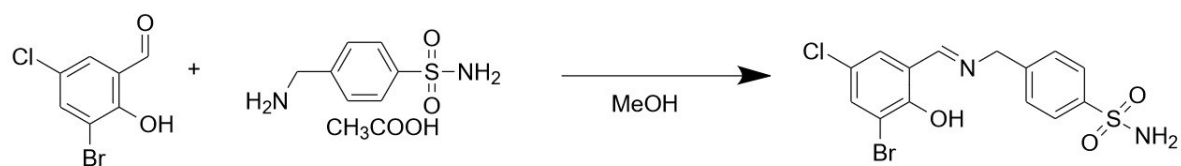
R_f: 0,67

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 14.74 (1H, s, OH), 8.75 (1H, s, N=CH), 7.85-7.82 (2H, m, H2, H6), 7.64 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H6'), 7.58-7.53 (3H, m, H3, H5, H4'), 7.36 (2H, s, SO₂NH₂), 4.94 (2H, s, CH₂).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 166.49, 159.92, 143.56, 141.52, 132.65, 130.46, 128.52, 126.27, 123.23, 119.70, 118.58, 58.76.

EA: vypočteno: C, 46.81; H, 3.37; N, 7.80, nalezeno: C, 46.85; H, 3.40; N, 7.76.

(E)-4-[[[(3-brom-5-chlor-2-hydroxybenzyliden)amino]methyl]benzensulfonamid **[A 8]**



Sumární vzorec: $C_{14}H_{12}BrClN_2O_3S$

Relativní molekulová hmotnost: 403,67

Popis: žluté krystaly

Výtěžek: 89 %

Teplota tání: 232 °C

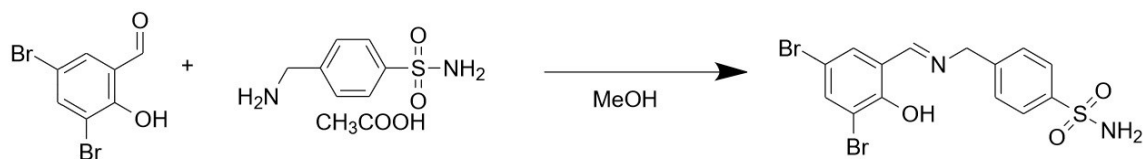
R_f: 0,64

1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.67 (1H, s, OH), 8.69 (1H, s, N=CH), 7.82-7.79 (2H, m, H₂, H₆), 7.72 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H_{6'}), 7.55-7.51 (3H, m, H₃, H₅, H_{4'}), 7.32 (2H, s, SO₂NH₂), 4.91 (2H, s, CH₂).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 166.78, 161.06, 143.92, 141.87, 135.82, 131.46, 128.88, 126.63, 120.51, 118.67, 113.60, 59.06.

EA: vypočteno: C, 41.66; H, 3.00; N, 6.94, nalezeno: C, 41.70; H, 3.06; N, 7.00.

(E)-4-[[[(3,5-dibrom-2-hydroxybenzyliden)amino]methyl]benzensulfonamid **[A 9]**



Sumární vzorec: $C_{14}H_{12}Br_2N_2O_3S$

Relativní molekulová hmotnost: 448,13

Popis: žluté krystaly

Výtěžek: 92 %

Teplota tání: 211 °C (lit. 198 °C) [25]

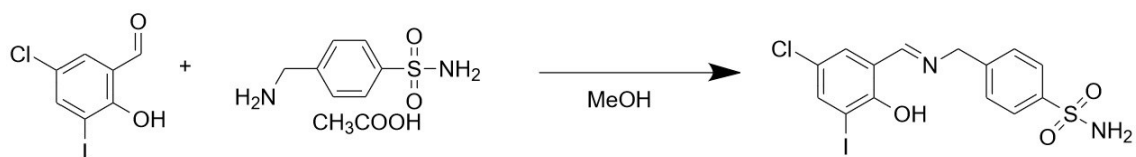
R_f: 0,57

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.69 (1H, s, OH), 8.68 (1H, s, N=CH), 7.82-7.78 (3H, m, H₂, H₆, H_{6'}), 7.65 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H_{4'}), 7.54-7.51 (2H, m, H₃, H₅), 7.32 (2H, s, SO₂NH₂), 4.90 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO): δ 166.75, 161.74, 143.94, 141.81, 138.30, 134.51, 128.89, 126.63, 119.32, 114.17, 107.10, 58.84.

EA: vypočteno: C, 37.52; H, 2.70; N, 6.25, nalezeno: C, 37.47; H, 2.67; N, 6.34.

(E)-4-[[[(5-chlor-2-hydroxy-3-jodbenzyliden)amino]methyl]benzensulfonamid [A 10]



Sumární vzorec: $C_{14}H_{12}ClIN_2O_3S$

Relativní molekulová hmotnost: 450,67

Popis: sytě žluté drobné krystaly

Výtěžek: 94 %

Teplota tání: 231 °C

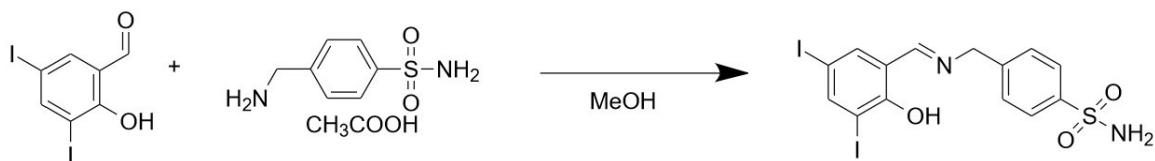
R_f: 0,71

1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.72 (1H, s, OH), 8.66 (1H, s, N=CH), 7.88 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H6'), 7.85-7.82 (2H, m, H2, H6), 7.58 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H4'), 7.57-7.54 (2H, m, H3, H5), 7.36 (2H, s, SO₂NH₂), 4.93 (2H, s, CH₂).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 166.27, 162.80, 143.53, 141.61, 141.08, 131.78, 128.56, 126.27, 120.87, 117.07, 90.24, 58.73.

EA: vypočteno: C, 37.31; H, 2.68; N, 6.22, nalezeno: C, 37.38; H, 2.72; N, 6.29.

(E)-4-[[[2-hydroxy-3,5-dijodbenzyliden)amino]methyl]benzensulfonamid [A 11]



Sumární vzorec: $C_{14}H_{12}I_2N_2O_3S$

Relativní molekulová hmotnost: 544,13

Popis: tmavě žluté krystaly

Výtěžek: 95 %

Teplota tání: 218 °C

R_f: 0,82

1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.68 (1H, s, OH), 8.63 (1H, s, N=CH), 8.05 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H6'), 7.85-7.82 (2H, m, H2, H6), 7.79 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H4'), 7.56-7.52 (2H, m, H3, H5), 7.35 (2H, s, SO₂NH₂), 4.92 (2H, s, CH₂).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 166.14, 163.95, 148.63, 143.53, 141.51, 140.88, 128.52, 126.25, 118.80, 91.74, 77.88, 58.40.

EA: vypočteno: C, 31.02; H, 2.23; N, 5.17, nalezeno: C, 30.95; H, 2.18; N, 5.25.

(E)-4-({[(5-nitrothiophen-2-yl)methylen]amino}methyl)benzensulfonamid [A 12]



Sumární vzorec: $C_{12}H_{11}N_3O_4S_2$

Relativní molekulová hmotnost: 325,02

Popis: hnědé krystaly

Výtěžek: 65 %

Teplota tání: 152,2 °C

R_f: 0,70

1H NMR (600 MHz, aceton- d_6): δ 8.68 (1H, s, N=CH), 8.01 (1H, d, J = 4.2 Hz, H4'), 7.86 (2H, d, J = 8.4 Hz, H2, H6), 7.55-7.50 (3H, m, H3, H5, H3'), 6.52 (2H, s, SO₂NH₂), 4.91 (2H, s, CH₂).

^{13}C NMR (151 MHz, aceton): δ 155.99, 155.88, 148.61, 143.30, 143.14, 129.93, 129.30, 128.38, 126.35, 63.13.

EA: vypočteno: C, 44.30; H, 3.41; N, 12.92, nalezeno: C, 40.27; H, 3.49; N, 12.99.

(E)-4-[[[(2-oxoindolin-3-ylidene)amino]methyl]benzyl]benzenesulfonamid [A 13]



Sumární vzorec: $C_{15}H_{13}N_3O_3S$

Relativní molekulová hmotnost: 315,35

Popis: tmavě oranžové až hnědé krystaly

Výtěžek: 50 %

Teplota tání: 217 °C

R_f: 0,80

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 11.38 (1H, s, CONH), 7.81-7.78 (2H, m, H2, H6), 7.71 (H, dd, $J = 7.6, 1.2$ Hz, H4'), 7.51-7.47 (2H, m, H3, H5), 7.38 (1H, td, $J = 7.7, 1.3$ Hz, H6'), 7.32 (2H, s, SO₂NH₂), 7.09 (1H, td, $J = 7.6, 0.9$ Hz, H5'), 6.96 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H7'), 4.93 (2H, s, CH₂).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 162.13, 143.80, 143.13, 142.84, 137.23, 132.32, 128.52, 126.00, 122.63, 121.88, 119.77, 111.39, 61.57.

EA: vypočteno: C, 57.13; H, 4.16; N, 13.33, nalezeno: C, 57.21; H, 4.22; N, 13.40.

4.2 Biologie

4.2.1 Antibakteriální aktivita

Antibakteriální aktivita byla hodnocena proti čtyřem Gram-pozitivním a čtyřem Gram-negativním kmenům, které jsou z klinického hlediska velmi významné. Konkrétně se jednalo o kmeny *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 29213, CCM (Czech Collection of Microorganisms) 4223, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, CCM 4750, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, CCM 4418, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, CCM 4224, *Escherichia coli* ATCC 25922, CCM 3954, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, CCM 4415, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, DSM 30007, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, CCM 3955. Tyto kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms, CCM, Brno, Česká republika) nebo se jednalo o klinické izoláty z Ústavu klinické mikrobiologie (Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Česká republika). Mikrodiluční bujónová metoda byla provedena podle EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) instrukcí (2006). [26]

Kultivace byla provedena v Mueller-Hintonově bujónu s upravenou koncentrací kationtů (CAMHB, M-H 2 Broth, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) při 32 ± 2 °C. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a tím byly vytvořeny zásobní roztoky. Konečná koncentrace DMSO nepřesáhla 1 % (v/v) celkového složení roztoku a neovlivnila růst bakterií. Do každého testu byly zahrnuty pozitivní (pouze mikroby) a negativní (kultivační médium a DMSO) kontroly a vnitřní standardy. Antibakteriální aktivita je vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC, udávaná v $\mu\text{mol/l}$) po 24 a 48 hodinách statické inkubace v temné a zvlhčené atmosféře při 35 ± 2 °C. Experimenty byly prováděny v duplikátech. Pro platnost výsledků nesmí být rozdíl v MIC stanové ze dvou paralelních měření větší než jeden díl na stupnici měření. Stupnice pro stanovení MIC začala od 0,49 $\mu\text{mol/l}$. Výsledky byly analyzovány vizuálně. Jako referenční sloučeniny byl použit výchozí mafenid-acetát společně s topickými antibiotiky bacitracinem (aktivní zejména proti Gram-pozitivním druhům včetně MRSA) a neomycinem (aminoglykosid aktivní hlavně proti Gram-negativním kmenům). [17]

4.2.2 Antimykobakteriální aktivita

Antimykobakteriální testování bylo provedeno s rychle rostoucími druhy mykobakterií: *Mycobacterium smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607), *Mycobacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366) z Německé kolekce mikroorganismů a buněčných kultur (DSM, Braunschweig, Německo) a s avirulentním kmenem *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra ITM-M006710 (ATCC 9431) z Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms. Technikou pro stanovení biologické aktivity byla mikrodiluční bujónová metoda pomocí 96 jamkových mikrotitračních destiček. Jako kultivační médium byl použit Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) obohacený o 0,4 % glycerolu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a 10 % růstového doplňku Middlebrook OADC (Himedia, Mumbai, Indie). Mykobakteriální kmeny byly kultivovány na agaru Middlebrook 7H9 a suspenze byly připraveny v bujónu Middlebrook 7H9. Konečná hustota byla upravena na hodnotu 1,0 podle McFarlandovy stupnice a zředěna v poměru 1:20 (pro rychle rostoucí mykobakterie) nebo 1:10 (pro *M. tuberculosis*) bujónem. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO, poté byl přidán Middlebrook bujón, aby byla získána koncentrace 2000 µg/ml. Standardy používané pro stanovení aktivity byly isoniazid (INH), rifampicin (RIF) a ciprofloxacin (CPX; Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Finálních koncentrací bylo dosaženo binárním ředěním a přidáním mykobakteriální suspenze a byly u testovaných látek nastaveny na 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,81 a 3,91 µg/ml podle konečné MIC. Konečná koncentrace DMSO nepřesáhla 2,5 % (v/v) a neovlivnila růst testovaných kmenů. Byly zahrnuty pozitivní (bujón, DMSO, bakterie) a negativní (bujón, DMSO) kontroly. Destičky byly utěsněny polyesterovým adhezivním filmem a inkubovány staticky ve tmě při 37 °C. 0,01% Roztok sodné soli resazurinu byl přidán po 48 hodinách inkubace pro *M. smegmatis*, 72 hodinách inkubace pro *M. aurum* a po 120 hodinách inkubace v případě *M. tuberculosis*. Barvivo bylo připraveno rozpuštěním sodné soli resazurinu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) v deionizované vodě za vzniku 0,02% roztoku. Poté byl připraven 10% vodný roztok Tween 80 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Obě kapaliny byly smíchány za použití stejných objemů a přefiltrovány přes membránový filtr. Mikrotitrační destičky byly poté inkubovány další 2,5 hodiny pro stanovení aktivity proti *M. smegmatis*, 4 hodiny pro *M. aurum* a 24 hodin pro *M. tuberculosis*.

Antimykobakteriální aktivita byla vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) a hodnota byla odečtena na základě změny barvy jamek (modrá barva – aktivní sloučenina; růžová barva – neaktivní sloučenina, resp. koncentrace). Všechny experimenty byly prováděny v duplikátech, hodnocen byl také výchozí mafenid-acetát. [27][28][29]

4.2.3 Antifungální aktivita

Antifungální aktivita byla hodnocena proti čtyřem kvasinkovým kmenům: *Candida albicans* ATCC 24433, CCM 8320, *Candida krusei* ATCC 6258, CCM 8271, *Candida parapsilosis* ATCC22019, CCM 8260, *Candida tropicalis* ATCC 750, CCM 8264 a čtyřem kmenům vláknitých hub: *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, *Aspergillus flavus* CCM 8363, *Absidia (Lichtheimia) corymbifera* CCM 8077 a *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533, CCM 8377. Mikrodiluční bujónová metoda byla provedena podle modifikovaných EUCAST instrukcí (EUCAST 7.3.1 a 9.3.1, 2017). [28][29]

Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a zředěny dvojkovým ředěním RPMI-1640 médiem s L-glutaminem, doplněným 2 % glukózy (w/v) a pufovány na pH 7 pomocí 3-(*N*-morfolin)propan-1-sulfonovou kyselinou (všechny komponenty byly zakoupeny od Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Finální koncentrace DMSO v testovaném médiu nepřesáhla 1 % (v/v) celkového složení roztoku a bylo potvrzeno, že tato koncentrace neinhibuje růst hub. Statická inkubace probíhala v temné vlhčené atmosféře, při 35±2 °C po dobu 24 a 48 hodin (72 a 120 hodin pro *Trichophyton interdigitale*). Pozitivní kontroly byly tvořeny pouze testovanými houbami, zatímco negativní kontroly byly tvořeny médiem a DMSO. Zahrnuta byla také vnitřní kontrola kvality. Hodnocení MIC bylo provedeno vizuálně a stanovení byla vždy prováděna v duplikátech. Pro platnost výsledků nesmí být rozdíl hodnot MIC stanovený ze dvou paralelních měření větší než jeden díl na stupnici ředění. Stupnice pro stanovení MIC začala od 0,49 μmol/l.

Jako referenční sloučeniny pro srovnání byly mafenid-acetát a flukonazol. Mafenid byl hodnocen stejně jako testované sloučeniny. Hodnoty MIC flukonazolu znamenají střední hodnoty MIC₅₀, tj. nejnižší koncentraci léčiva, která způsobuje 50% inhibici růstu oproti kontrole bez léčiva. Výsledky byly odečteny po 24 hodinách (kvasinky) nebo 48 hodinách (plísně) statické kultivace na mikrodilučních deskách při 35±2 °C

ve zvlhčené atmosféře. Výsledky byly odečteny pomocí čtečky mikrodilučních destiček (SynergyTM HTX, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) při vlnové délce 530 nm.

[17]

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Nově nasyntetizované sloučeniny vznikly kombinací mafenid-acetátu, (halogen)salicylaldehydů, 5-nitrothiofen-2-karbaldehydu a isatinu za vzniku iminů. Tyto prekursory byly zvoleny na základě vlastní biologické aktivity (MAF) či aktivity jejich derivátů, které totiž vykazují antibakteriální, antimykobakteriální a antifungální účinky a byly tudíž vhodnými adepty pro syntézu nových derivátů spojujících tyto fragmenty. Předpokládali jsme, že kombinací těchto látek by mohly vzniknout nové molekuly s lepší antimikrobiální aktivitou, než mají původní látky, a je zde tudíž velký potenciál pro překonání antibiotické rezistence.

Jednokrokovými syntézami prováděnými obdobným postupem bylo připraveno celkem třináct nových látek v dostatečném výtěžku (50-95 %). Nejnižší výtěžek (50 %) byl zaznamenán u derivátu odvozeného od isatinu (**A 13**), který byl připravován mírně odlišným postupem, naopak nejvyšší výtěžek byl dosažen u nejlipofilnější diiodované látky s označením **A 11** (95 %). Všechny produkty jsou odvozeny od mafenid-acetátu, deset z nich vzniklo reakcí s halogensalicylaldehydy, zbylé tři reakcí s nesubstituovaným salicylaldehydem, 5-nitrothiofen-2-karbaldehydem, potažmo jediným ketonem isatinem. Mafenid-acetát s nadbytkem halogensalicylaldehydu/salicylaldehydu/5-nitrothiofen-2-karbaldehydu/isatinu byly rozpuštěny v methanolu a roztok byl přiveden k varu. Po 2-3 hodinách byla směs zchlazena a ponechána krystalizovat minimálně 12 hodin při +8 °C. Vzniklé krystaly byly následně zfiltrvány a promyty malým množstvím diethyletheru a destilované vody, rekrystalizace nebyla zapotřebí. Z hlediska reakčního mechanismu se jedná o nukleofilní kondenzaci a všechny vzniklé deriváty lze označit také jako iminy či Schiffovy báze. Připravené sloučeniny byly charakterizovány spektrálními a fyzikálními metodami a byla ověřena jejich čistota, která byla dostatečná pro biologické hodnocení.

U všech nově nasyntetizovaných látek byla otestována jejich biologická aktivita – antibakteriální, antimykobakteriální a antifungální aktivita, a to pomocí mikrodiluční bujónové metody. Výsledky byly vždy srovnány s výchozím mafenidem a standardy.

Výsledky testování antibakteriální aktivity jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 1). Látky byly otestovány na čtyřech Gram-pozitivních kmenech: *Staphylococcus aureus* (SA, citlivý k

methicilinu), methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* (SE), *Enterococcus faecalis* (EF) a čtyřech Gram-negativních kmenech – *Escherichia coli* (EC), *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Acinetobacter baumannii* (ACI) a *Pseudomonas aeruginosa* (PA). V prvním sloupci tabulky jsou zaznamenány hodnoty výchozího mafenid-acetátu. V posledních dvou sloupcích jsou zaznamenány hodnoty MIC pro standardy bacitracin a neomycin, neomycin nebyl testován proti Gram-pozitivním kmenům. Je patrné, že všechny nově připravené deriváty vykazují vyšší aktivitu než mafenid-acetát, ale nižší biologickou aktivitu než standardy, výjimkou je 3,5-dijodovaný derivát s označením **A 11**, jehož antibakteriální aktivita je srovnatelná s bacitracinem. Většina nově syntetizovaných látek vykazuje inhibici bakterií v rozsahu MIC 125-500 $\mu\text{mol/l}$, s výjimkou výrazně účinnějších iminů s označením **A 10** (odvozený od 5-chlor-3-jodsalicylaldehydu; MIC od 31,25 $\mu\text{mol/l}$), thiofen **A 12** ($\geq 62,5$ $\mu\text{mol/l}$) a zejména dijod derivát **A 11** (MIC $\geq 7,81$ $\mu\text{mol/l}$). Z tabulky 1 je patrné, že Gram-pozitivní bakterie reagují citlivěji než Gram-negativní bakterie. Dále stojí za zmínku fakt, že MRSA má obdobnou citlivost jako MSSA, není zde tedy zkřížená rezistence k methicilinu. Nejvyšší aktivity byly zaznamenány u derivátů obsahujících jód a také zde platí, že více halogenových substituentů na aromatickém kruhu přispívá ke zvyšování biologické aktivity.

Tabulka 1 Výsledky testování antibakteriální aktivity

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₉₅ ($\mu\text{mol/l}$)							
(kód)		MAF	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7
SA	24 h	>500	>500	250	>500	500	500	500	250
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	500
MRSA	24 h	>500	>500	>500	>500	500	500	500	500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	500
SE	24 h	>500	250	250	>500	125	250	250	250
	48 h	>500	250	>500	>500	250	500	>500	500
EF	24 h	>500	>500	500	>500	>500	500	>500	500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	500
EC	24 h	>500	>500	>500	500	500	500	>500	500
	48 h	>500	>500	>500	500	500	500	>500	>500
KP	24 h	>500	>500	>500	500	500	500	>500	500
	48 h	>500	>500	>500	500	500	500	>500	500
ACI	24 h	>500	>500	>500	>500	500	500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	500	500	>500	>500

PA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₉₅ (μmol/l)							
(kód)		A 8	A 9	A 10	A 11	A 12	A 13	BAC	NEO
SA	24 h	250	125	62,5	7,81	62,5	500	7,81	NT
	48 h	250	250	125	15,62	62,5	500	15,62	NT
MRSA	24 h	250	125	125	31,25	62,5	250	15,62	NT
	48 h	250	250	125	31,25	125	500	15,62	NT
SE	24 h	250	125	31,25	7,81	62,5	125	15,62	NT
	48 h	250	500	125	15,62	125	250	31,25	NT
EF	24 h	500	250	250	62,5	500	>500	62,5	NT
	48 h	500	250	250	125	500	>500	>500	NT
EC	24 h	500	500	500	>125	125	>500	>500	3,9
	48 h	500	500	500	>125	125	>500	>500	3,9
KP	24 h	500	250	500	62,5	250	>500	>500	1,95
	48 h	500	>500	500	62,5	250	>500	>500	1,95
ACI	24 h	>500	>500	>500	>125	62,5	>500	>500	3,9
	48 h	>500	>500	>500	>125	125	>500	>500	3,9
PA	24 h	>500	>500	>500	>125	500	>500	>500	7,81
	48 h	>500	>500	>500	>125	500	>500	>500	15,62

NT: netestováno. BAC: bacitracin. NEO: neomycin.

Výsledky antimykobakteriální aktivity jsou shrnuty v další tabulce (Tabulka 2), kde je uvedena opět také aktivita mafenid-acetátu. Aktivity byly otestovány na rychle rostoucích *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium aurum* a avirulentním kmenu *Mycobacterium tuberculosis*. Nejnižší hodnoty MIC vykazovaly dihalogenované iminy s označením **A 10** (5-Cl-3-I; 31,25-62,5 μg/ml), **A 11** (3,5-I₂, 31,25-62,5 μg/ml) a nitrothiofen **A 12** (15,625 μg/ml pro *M. smegmatis* a *M. aurum*, 3,91 μg/ml pro *M. tbc.*) a, stejně jako v případě antibakteriální aktivity, ale také další sloučeniny substituované dvěma halogeny (**A 7**, **A 8** a **A 9**; 31,25-62,5 μg/ml). Z výsledků testování je patrné, že všechny nové molekuly mají vyšší antimykobakteriální aktivitu než původní mafenid-acetát, případně srovnatelnou (nehalogenovaný imin **A 1**, 5-fluorderivát **A 2**). V tabulce jsou dále zaznamenány hodnoty MIC pro standardy isoniazid, rifampicin a ciprofloxacin. V porovnání se standardy vykazují nové iminy nižší biologickou aktivitu, derivát **A 12** je srovnatelný s INH vůči *M. smegmatis*. Nejnižší hodnoty MIC byly zaznamenány u sloučenin obsahujících jód navázaný na aromatickém kruhu, nicméně deriváty obsahující brom dosáhly také poměrně nízkých hodnot MIC, dále je patrné, že více

navázaných atomů halogenů zvyšuje antimykobakteriální aktivitu. Nejúčinnější se však ukázal být 5-nitrothiofenový derivát s označením **A 12**.

Tabulka 2 Výsledky testování antimykobakteriální aktivity

Označení	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (µg/ml)								
	MAF	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	-
<i>M. smegmatis</i>	≥500	250	250	125	125	125	250	62,5	-
<i>M. aurum</i>	125	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	-
<i>M. tbc.</i> H ₃₇ Ra	250	125	125	62,5	31,25	62,5	62,5	31,25	-
Označení	A 8	A 9	A 10	A 11	A 12	A 13	INH	RIF	CPX
<i>M. smegmatis</i>	62,5	62,5	62,5	62,5	15,625	NT	15,625	6,25	0,25
<i>M. aurum</i>	31,25	31,25	31,25	31,25	15,625	NT	3,91	0,39	0,03125
<i>M. tbc.</i> H ₃₇ Ra	31,25	31,25	31,25	31,25	3,91	NT	0,25	0,0015625	0,25

INH: isoniazid; RIF: rifampicin; CPX: ciprofloxacin; NT: netestováno.

Výsledky antifungální aktivity jsou zaznamenány v poslední tabulce (Tabulka 3), dále jsou zde uvedeny MIC výchozího mafenid-acetátu a flukonazolu jako standardu. Aktivita byla testována vůči čtyřem druhům kvasinek: *Candida albicans* (CA), *Candida krusei* (CK), *Candida parapsilosis* (CP), *Candida tropicalis* (CT) a čtyřem kmenům vláknitých hub: *Aspergillus fumigatus* (AF), *Aspergillus flavus* (AFla), *Absidia corymbifera* (AC) a *Trichophyton interdigitale* (TI). Nejnižších hodnot MIC dosáhly opět **A 11** (od 3,9 µmol/l), **A 10** a **A 9** (≥7,81 µmol/l), dále též **A 8** (≥15,62 µmol/l). I v tomto případě všechny nově připravené látky, s výjimkou **A 1**, **A 13** (derivát isatinu) a **A 3** (5-chlor derivát), vykazovaly vyšší biologickou aktivitu než výchozí mafenid-acetát. Opět je zde patrné, že deriváty obsahující jód a brom vykazují velmi dobré účinky a také platí, že čím více navázaných halogenových atomů, tím je sloučenina *in vitro* antimykoticky účinnější. V porovnání se standardem flukonazolem byla u derivátů **A 9**, **A 10** a **A 11** zaznamenána srovnatelná či vyšší biologická aktivita, zejména u některých kvasinek a *Trichophyton interdigitale*. Z tabulky je patrné, že nově připravené molekuly obecně vykazují výraznější účinek proti kvasinkám, zatímco proti vláknitým houbám s výjimkou *Trichophyton interdigitale* příliš účinné nejsou. Širokospektrální antifungální účinek vůči všem kmenům vykazují sloučeniny **A 5**, **A 7**, **A 8**, **A 9**, **A 10** a **A 12**.

Tabulka 3 Výsledky testování antifungální aktivity

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (μmol/l)							
(kód)		MAF	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	-
CA	24 h	>500	>500	>500	>500	125	125	500	-
	48 h	>500	>500	>500	>500	250	125	>500	-
CK	24 h	>500	>500	>500	>500	250	125	>500	-
	48 h	>500	>500	>500	>500	500	125	>500	-
CP	24 h	>500	>500	500	>500	125	62,5	250	-
	48 h	>500	>500	>500	>500	250	125	250	-
CT	24 h	>500	>500	500	>500	125	125	125	-
	48 h	>500	>500	>500	>500	250	125	250	-
AF	24 h	>500	>500	>500	>500	500	125	500	-
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	-
AF1a	24 h	>500	>500	>500	>500	500	250	>500	-
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	-
AC	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	-
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	-
TI	72 h	>500	>500	250	>500	125	62,5	125	-
	120 h	>500	>500	250	>500	250	62,5	125	-
KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (μmol/l)							
(kód)		A 7	A 8	A 9	A 10	A 11	A 12	A 13	FLU
CA	24 h	62,5	15,62	15,62	7,81	3,9	62,5	>500	6,5
	48 h	125	31,25	15,62	15,62	7,81	125	>500	6,5
CK	24 h	125	31,25	31,25	31,25	31,25	62,5	>500	>104,5
	48 h	125	31,25	31,25	31,25	31,25	125	>500	>104,5
CP	24 h	125	15,62	7,81	31,25	31,25	62,5	>500	3,3
	48 h	125	15,62	15,62	62,5	31,25	62,5	>500	3,3
CT	24 h	125	62,5	31,25	15,62	31,25	62,5	>500	6,5
	48 h	125	125	125	31,25	62,5	125	>500	6,5
AF	24 h	500	250	250	250	125	500	>500	>104,5
	48 h	500	500	500	250	>125	>500	>500	>104,5
AF1a	24 h	500	500	250	250	>125	500	>500	>104,5
	48 h	>500	500	500	500	>125	500	>500	>104,5
AC	24 h	500	500	500	500	>125	500	>500	>104,5
	48 h	500	500	500	500	>125	500	>500	>104,5
TI	72 h	125	125	62,5	125	15,62	125	>500	52,2
	120 h	125	125	62,5	125	31,25	125	>500	52,2

FLU: flukonazol.

6 ZÁVĚR

Antibiotická rezistence je stále narůstající globální problém, a proto je stále nutné vyvíjet nová léčiva. Mezi nejvýznamnější kmeny, co se týče získané antibiotické rezistence, patří bezesporu MRSA, VRSA/VISA a VRE.

V rámci této práce bylo připraveno celkem třináct nových látek odvozených od mafenid-acetátu reakcí s halogenovanými salicylaldehydy, nesubstituovaným salicylaldehydem, 5-nitrothiofen-2-karbaldehydem a isatinem v dobrých výtěžcích. Tyto látky byly zvoleny pro jejich známou biologickou aktivitu vůči bakteriálním, mykobakteriálním a fungálním kmenům. Všechny připravené sloučeniny byly otestovány pomocí mikrodiluční bujónové metody, a to částečně i autorkou práce.

Získané výsledky biologické aktivity byly následně porovnávány se standardy a výchozím mafenid-acetátem. Všechny deriváty byly *in vitro* účinnější než mafenid-acetát a obecně vykazují antibakteriální (včetně MRSA), antifungální a antimykobakteriální aktivitu. Nejúčinnější se ukázaly být deriváty substituované jódem, dále sloučeniny obsahující více halogenů obecně a také derivát obsahující strukturu 5-nitrothiofenu. Dále byl prokázán předpoklad, že látky účinné proti Gram-pozitivním kokům vykazují antimykobakteriální aktivitu. V plánu je testování vůči rezistentním klinickým izolátům a stanovení toxicity pro eukaryotické buňky.

7 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>	13
Obr. 2 Vzorec methicilinu.....	14
Obr. 3 Vzorec oxacilinu.....	14
Obr. 4 Vzorec vankomycinu	16
Obr. 5 Vzorec teikoplaninu.....	17
Obr. 6 Vzorec daptomycinu.....	18
Obr. 7 Vzorec proléčiva ceftarolinu (ceftarolin fosamilu).....	19
Obr. 8 Vzorec linezolidu	20
Obr. 9 Vzorec tedizolidu.....	21
Obr. 10 Vzorec tigecyklinu	22
Obr. 11 Vzorec kyseliny fusidové	22
Obr. 12 Vzorec mupirocinu	23
Obr. 13 Vzorec trimethoprimu.....	25
Obr. 14 Vzorec sulfamethoxazolu.....	24
Obr. 15 Vzorec telavancinu	27
Obr. 16 Vzorec chinupristinu	30
Obr. 17 Vzorec dalfopristinu.....	30
Obr. 18 Vzorec ampicilinu	31
Obr. 19 Vzorec nitrofurantoinu.....	32
Obr. 20 Vzorec fosfomycinu	33
Obr. 21 Vzorec chloramfenikolu	34
Obr. 22 Vzorec mafenid-acetátu	36
Obr. 23 Vzorec salicylaldehydu	36
Obr. 24 Vzorec 5-nitrothiofen-2-karbaldehydu	37
Obr. 25 Vzorec isatinu	37
Obr. 26 Schéma syntézy derivátů odvozených od salicylaldehydu.....	41
Obr. 27 Schéma syntézy derivátu odvozeného od 5-nitrothiofen-2-karbaldehydu	41
Obr. 28 Schéma syntézy derivátu odvozeného od isatinu	41

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] BENEŠ, Jiří. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0636-3.
- [2] HABALOVÁ, Kateřina a Helena ŽEMLIČKOVÁ. Meticilin-rezistentní stafylokoky: přehled terapie a antibiotická rezistence. *Remedia*. 2017, **27**(5), 502-505.
- [3] KOLÁŘ, Milan. Nebezpečné multirezistentní bakterie "superbugs" v současné medicíně. *Interní Medicína*. 2019, **21**(3), 142-148.
- [4] Dopad nadužívání antibiotik na stav bakteriální rezistence a potřeba vývoje antibiotik nových. *Farmakoterapeutické informace: Měsíčník pro lékaře a farmaceuty*. Praha, 2020, **2020**(9), 1-4. ISSN 1211-0647.
- [5] Dopad nadužívání antibiotik na stav bakteriální rezistence a potřeba vývoje antibiotik nových. *Farmakoterapeutické informace: Měsíčník pro lékaře a farmaceuty*. Praha, 2011, **2011**(5), 1-3. ISSN 1211-0647.
- [6] ŽEMLIČKOVÁ, Helena. Antibiotická rezistence u původců komunitních infekcí. *Pediatric pro praxi*. 2020, **16**(5), 296-2998.
- [7] MAZZULI, Tony. Vancomycin Resistant *Staphylococcus Aureus* (VRSA). *Canadian Antimicrobial Resistance Alliance (CARA)* [online]. [cit. 2021-02-28]. Dostupné z: <http://www.can-r.com/mediaResources/VRSA.pdf>
- [8] KOLÁŘOVÁ, Libuše et al. *Obecná a klinická mikrobiologie*. 1. Praha: Galén, 2020. ISBN 978-80-7492-477-4.
- [9] LEVITUS, Matthew, REWANE, Ayesan, PERERA, Thomas B. Vancomycin-Resistant Enterococci. [Updated 2020 Jul 21]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513233/>
- [10] VÁGNEROVÁ, Iva a Milan KOLÁŘ. Možnosti terapie infekcí způsobených vankomycin-rezistentními enterokoky. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2003, **17**(3), 170-173. ISSN 1212-7973.

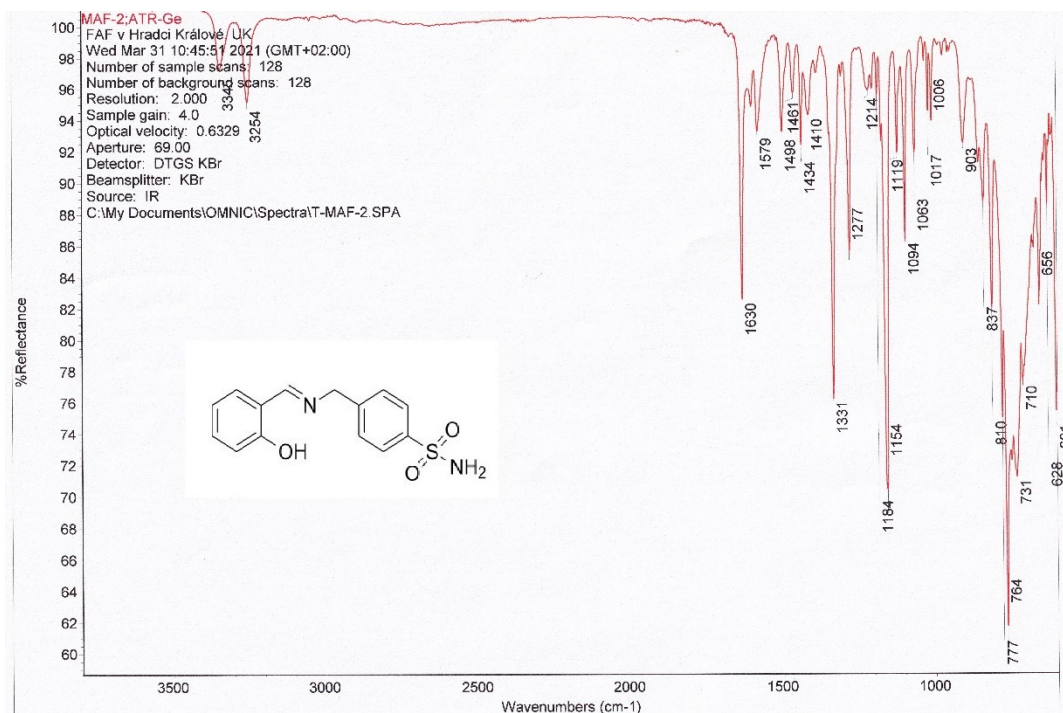
- [11] BARSOUMIAN, Alice, Carlos J. SANCHEZ, Katrin MENDE, Charla C. TULLY, Miriam L. BECKIUS, Kevin S. AKERS, Joseph C. WENKE a Clinton K. MURRAY. *In Vitro Toxicity and Activity of Dakin's Solution, Mafenide Acetate, and Amphotericin B on Filamentous Fungi and Human Cells. Journal of Orthopaedic Trauma* [online]. 2013, **27**(8), 428-436 [cit. 2021-05-03]. ISSN 0890-5339. Dostupné z: doi:10.1097/BOT.0b013e3182830bf9
- [12] NEELY, Alice N., Jason GARDNER, Paula DURKEE, et al. Are Topical Antimicrobials Effective Against Bacteria That are Highly Resistant to Systemic Antibiotics? *Journal of Burn Care & Research* [online]. 2009, **30**(1), 19-29 [cit. 2021-05-03]. ISSN 1559-047X. Dostupné z: doi:10.1097/BCR.0b013e3181921eed
- [13] EAGON, Robert G. a Albert T. MCMANUS. The effect of mafenide on dihydropteroate synthase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1990, **25**(1), 25-29. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/25.1.25
- [14] AFSHARI, Ashkan, Lyly NGUYEN, Steven A. KAHN, Amelia C. MONTGOMERY, Takashi SHINHA, Charles STRATTON a Blair SUMMITT. The Effective Duration of Antimicrobial Activity of Mafenide Acetate After Reconstitution. *Journal of Burn Care & Research* [online] 2018, **39**(5), 736-738. ISSN 1559-047X. Dostupné z: doi:10.1093/jbcr/irx029
- [15] SIUDA, Jerome F. a Carole D. CIHONSKI. New compounds: Carbamate Derivatives of Mafenide (Homosulfanilamide). *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1972, **61**(11), 1856-1857 [cit. 2021-5-3]. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.2600611143
- [16] KRÁTKÝ, Martin, Magdaléna DZURKOVÁ, Jiří JANOUŠEK, Klára KONEČNÁ, František TREJTNAR, Jiřina STOLARÍKOVÁ a Jarmila VINŠOVÁ. Sulfadiazine Salicylaldehyde-Based Schiff Bases: Synthesis, Antimicrobial Activity and Cytotoxicity. *Molecules* [online]. 2017, **22**(9), 1573 [cit. 2021-03-15]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22091573
- [17] KRÁTKÝ, Martin, Klára KONEČNÁ, Kateřina BROKEŠOVÁ, Jana MAIXNEROVÁ, František TREJTNAR a Jarmila VINŠOVÁ. Optimizing the structure of (salicylideneamino)benzoic acids: Towards selective antifungal and anti-

staphylococcal agents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2021, **159**, 105732 [cit. 2021-03-15]. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2021.105732

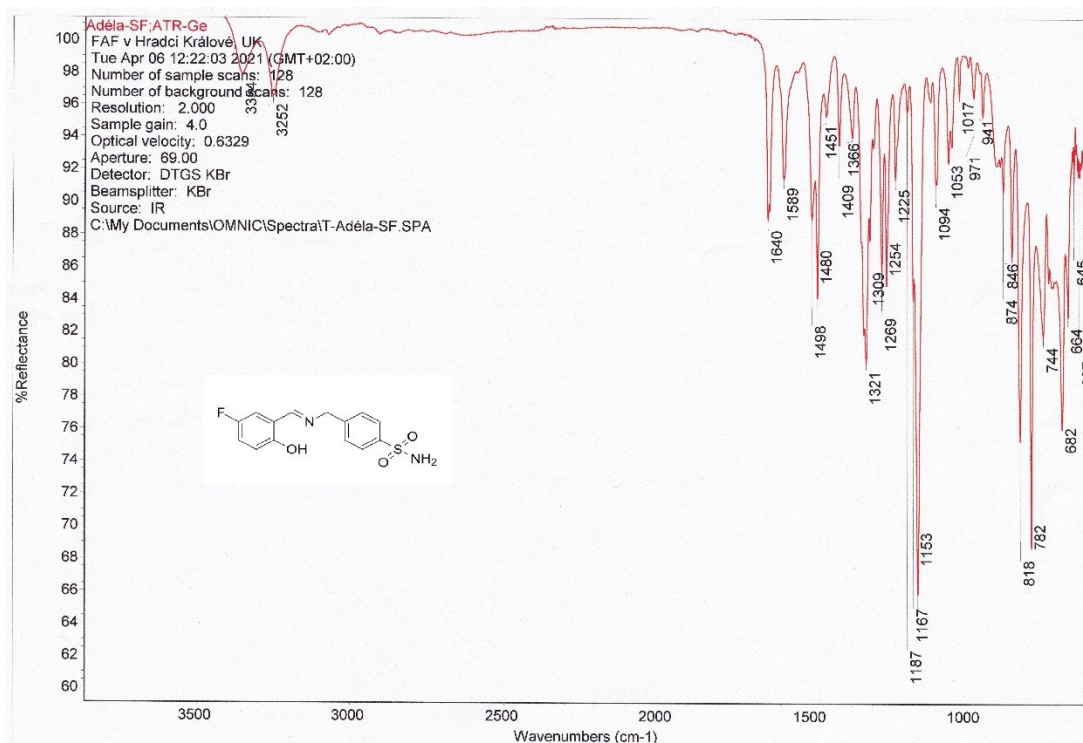
- [18] XU, Suo-Ping, Peng-Cheng LV, Lei SHI a Hai-Liang ZHU. Design, Synthesis, and Pharmacological Investigation of Iodined Salicylimines, New Prototypes of Antimicrobial Drug Candidates. *Archiv der Pharmazie* [online]. 2010, **343**, 282-290 [cit. 2021-03-15]. ISSN 03656233. Dostupné z: doi:10.1002/ardp.200900129
- [19] DE ARAÚJO NETO, Luiz Nascimento, Maria DO CARMO ALVES DE LIMA, Jamerson Ferreira DE OLIVEIRA, et al. Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2017, **272**, 172-181 [cit. 2021-03-15]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2017.05.005
- [20] MASUNARI, Andrea a Leoberto Costa TAVARES. A new class of nifuroxazide analogues: Synthesis of 5-nitrothiophene derivatives with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2007, **15**(12), 4229-4236 [cit. 2021-03-15]. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2007.03.068
- [21] KRÁTKÝ, Martin a Jarmila VINŠOVÁ. Sulphur-Containing Heterocycles as Antimycobacterial Agents: Recent Advances in Thiophene and Thiadiazole Derivatives. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2016, **16**(26), 2921-2952. ISSN 15680266. Dostupné z: doi:10.2174/1568026616666160506131118
- [22] CHOCHAN, Zahid H., Humayun PERVEZ, A. RAUF, Khalid M. KHAN a Claudiu T. SUPURAN. Isatin-derived Antibacterial and Antifungal Compounds and their Transition Metal Complexes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2008, **19**(5), 417-423 [cit. 2021-04-12]. ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:10.1080/14756360410001710383
- [23] GUO, Hua. Isatin derivatives and their anti-bacterial activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2019, **164**, 678-688 [cit. 2021-04-21]. ISSN 02235234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2018.12.017
- [24] Winthrop Chem. Co. Benzenesulphonamide compounds. US2288531, 1940, A.

- [25] TSUKAMOTO, Takeo a Kennosuke YUHI. Studies on Halogenosalicylaldehyde. I: Halogenosalicylaldehyde as Reagent for Primary Amines. *Yakugaku Zasshi* [online]. 1958, **78**(7), 706-709 [cit. 2021-05-03]. ISSN 1347-5231. Dostupné z: doi: https://doi.org/10.1248/yakushi1947.78.7_706
- [26] KAHLMETER, G., D.F.J. BROWN, F.W. GOLDSTEIN, et al. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2006, **12**(6), 501-503 [cit. 2021-5-3]. ISSN 1198743X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01454.x
- [27] KRÁTKÝ, Martin, Ondřej JANĎOUREK, Zsuzsa BARANYAI, Eva NOVOTNÁ, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Szilvia BŐSZE a Jarmila VINŠOVÁ. Phenolic *N*-monosubstituted carbamates: Antitubercular and toxicity evaluation of multi-targeting compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2019, **181**, 11578 [cit. 2021-04-21]. ISSN 02235234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2019.111578
- [28] EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT EDEF 7.3.1. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7_3_1_Yeast_testing__definitive.pdf [cit. 2021-05-03]
- [29] EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3.1. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_9_3_1_Mould_testing__definitive.pdf [cit. 2021-05-03]

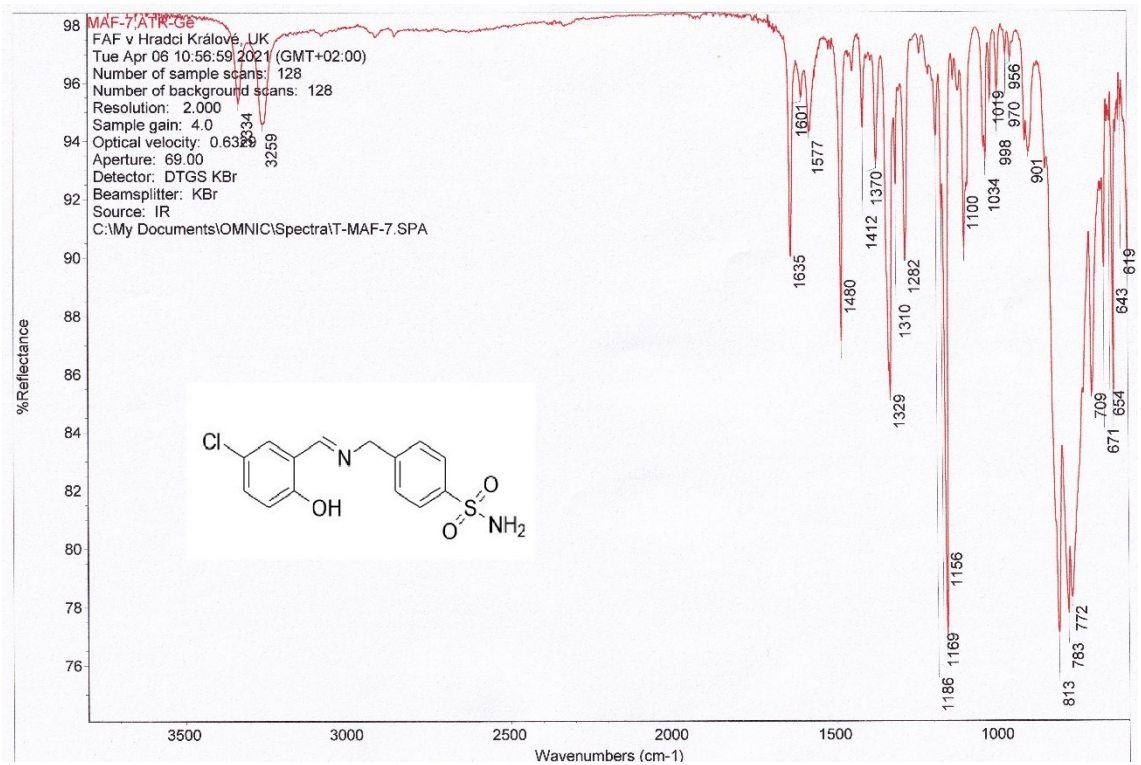
PŘÍLOHA – IR SPEKTRA



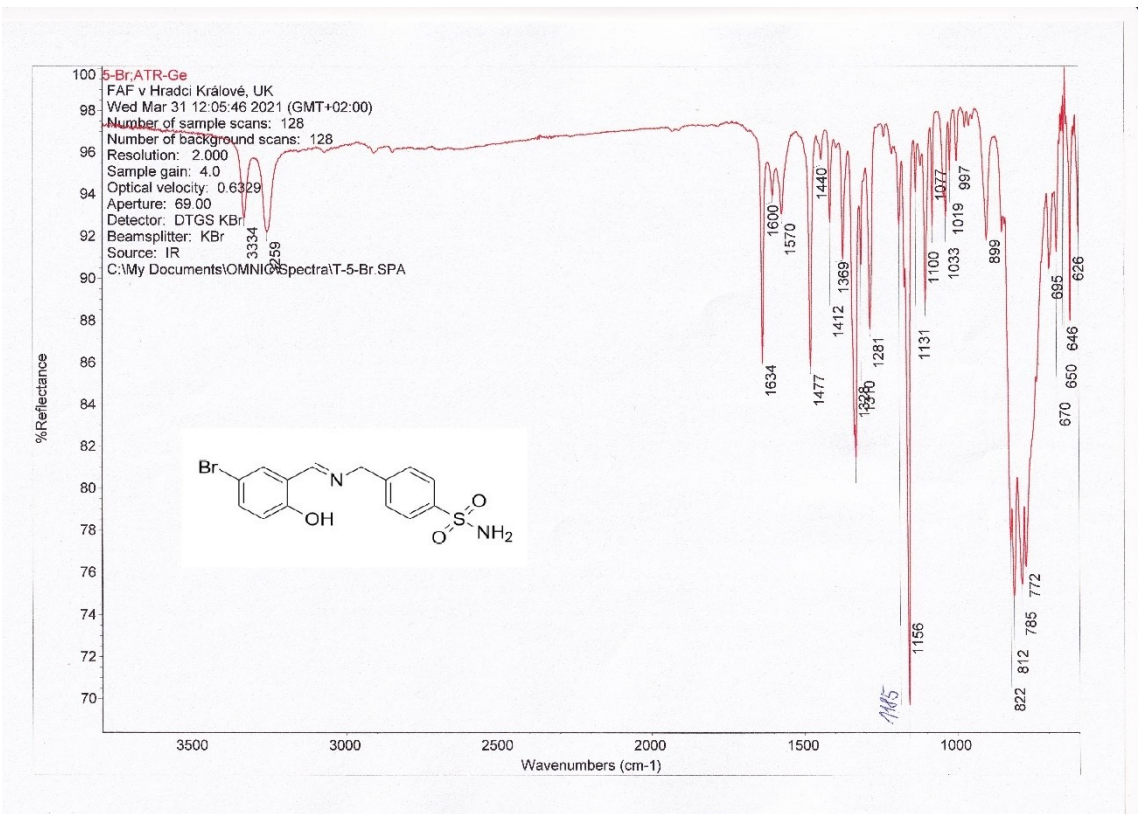
IR spektrum A 1



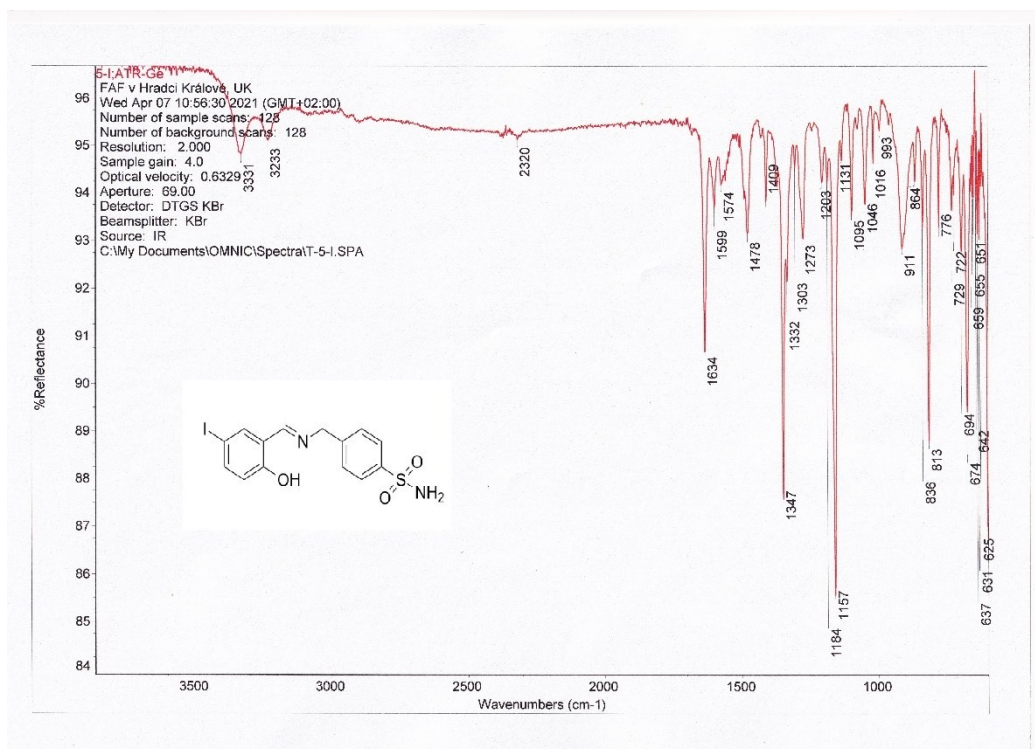
IR spektrum A 2



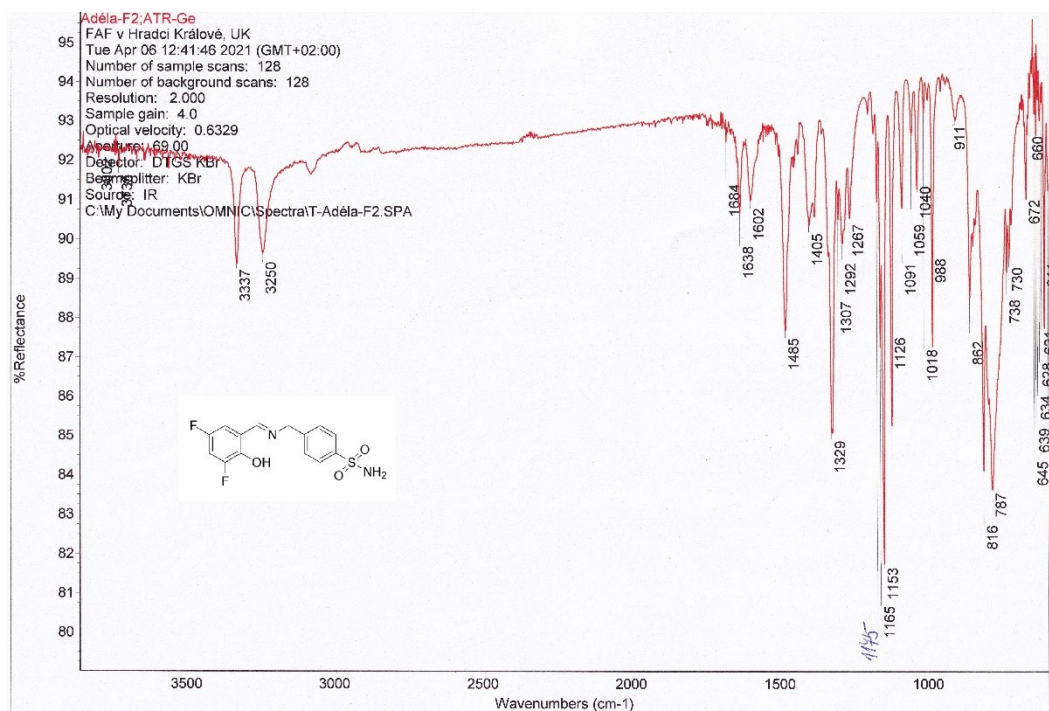
IR spektrum A 3



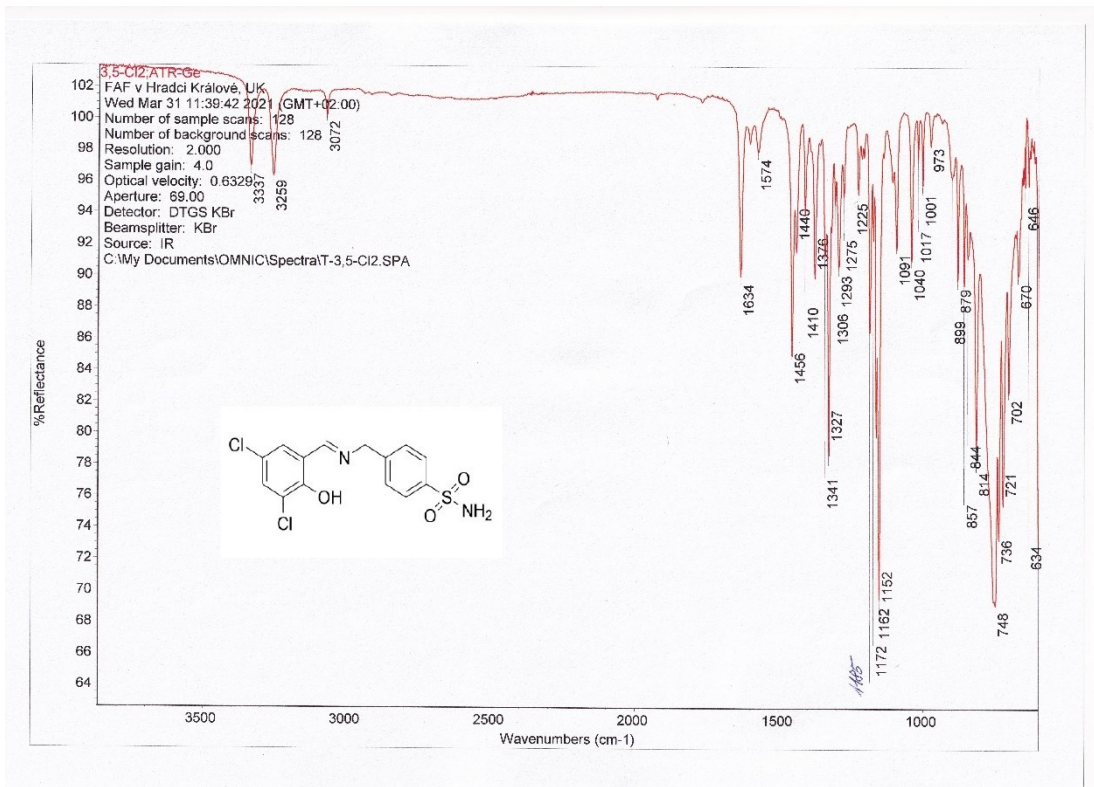
IR spektrum A 4



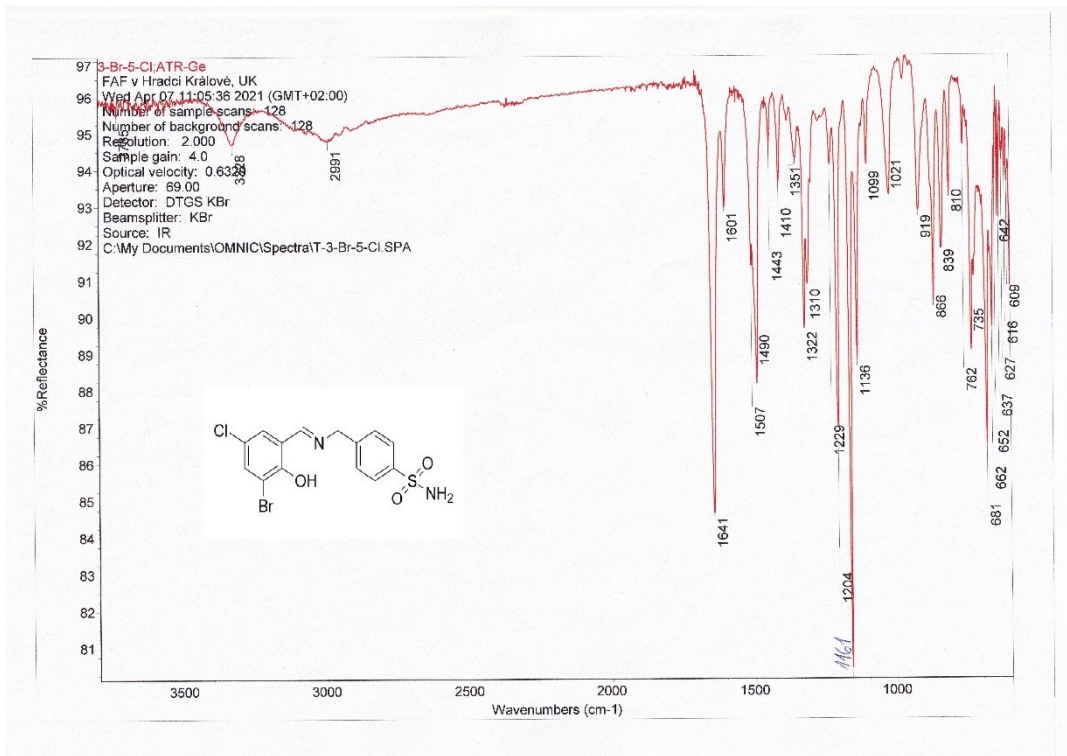
IR spektrum A 5



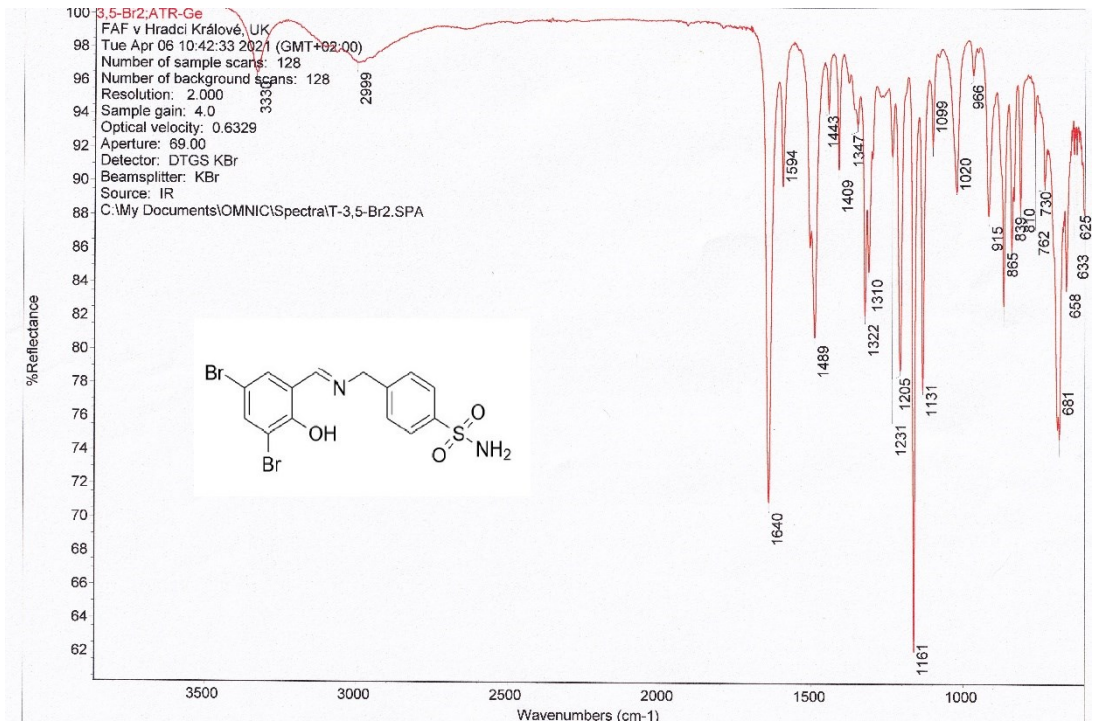
IR spektrum A 6



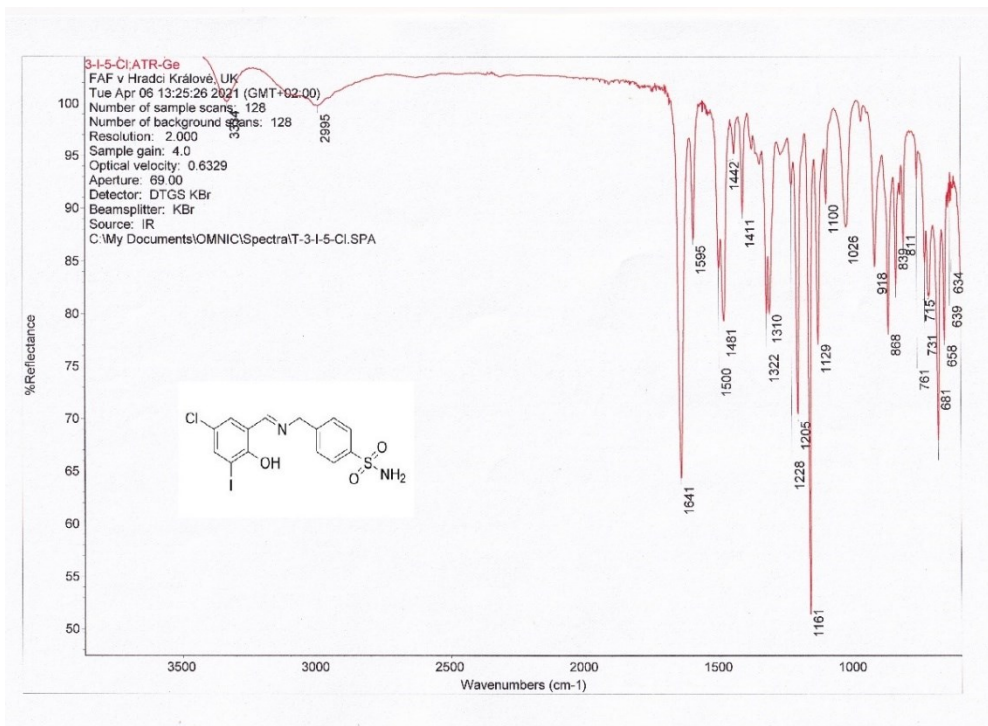
IR spektrum A 7



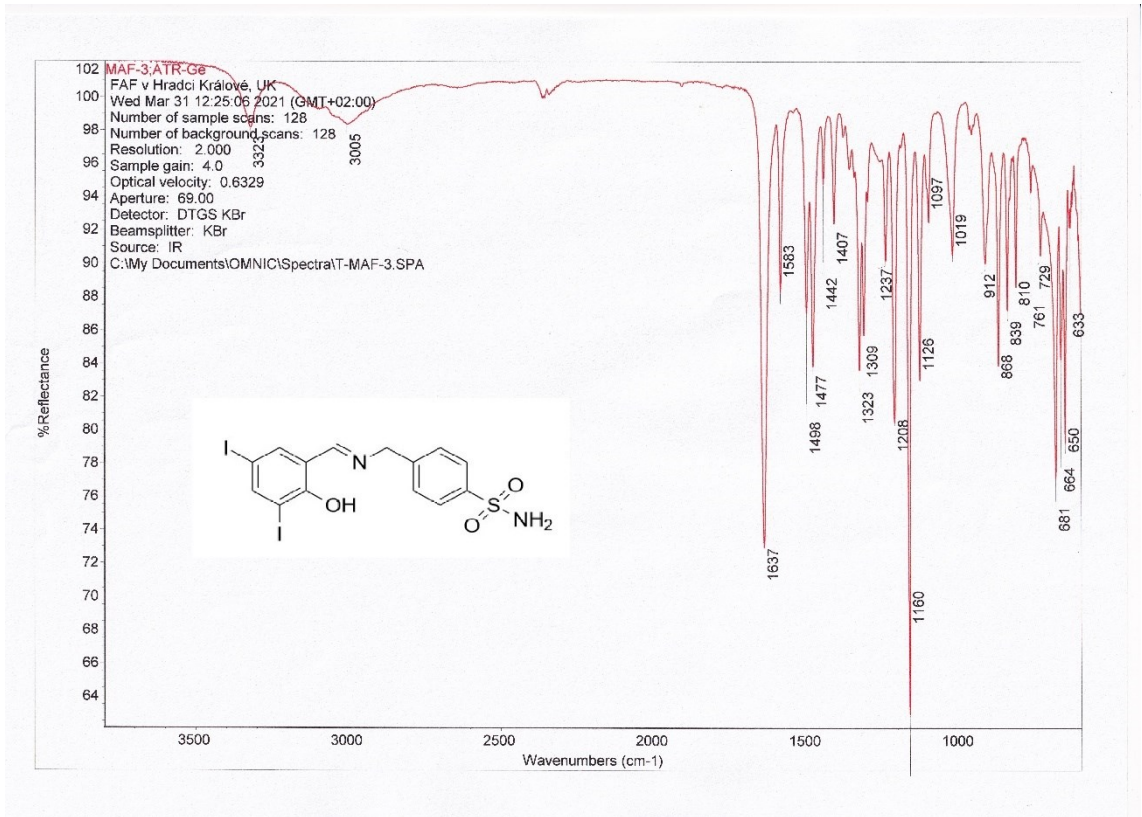
IR spektrum A 8



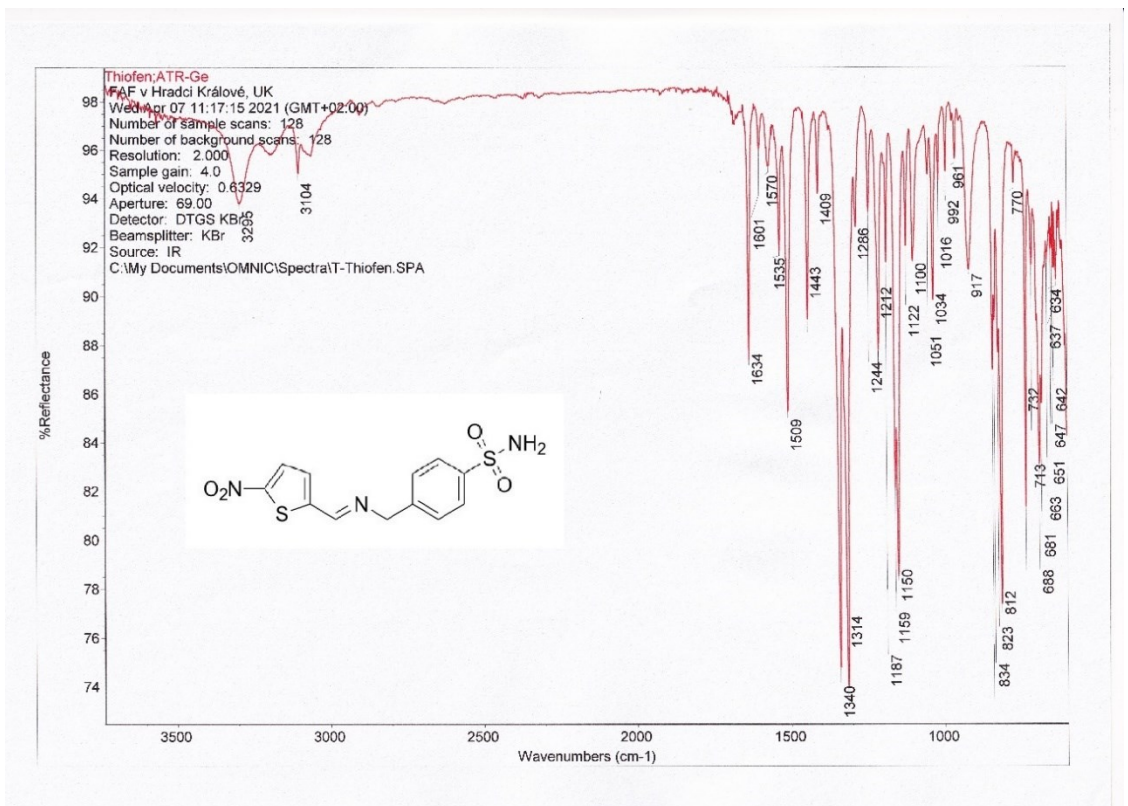
IR spektrum A 9



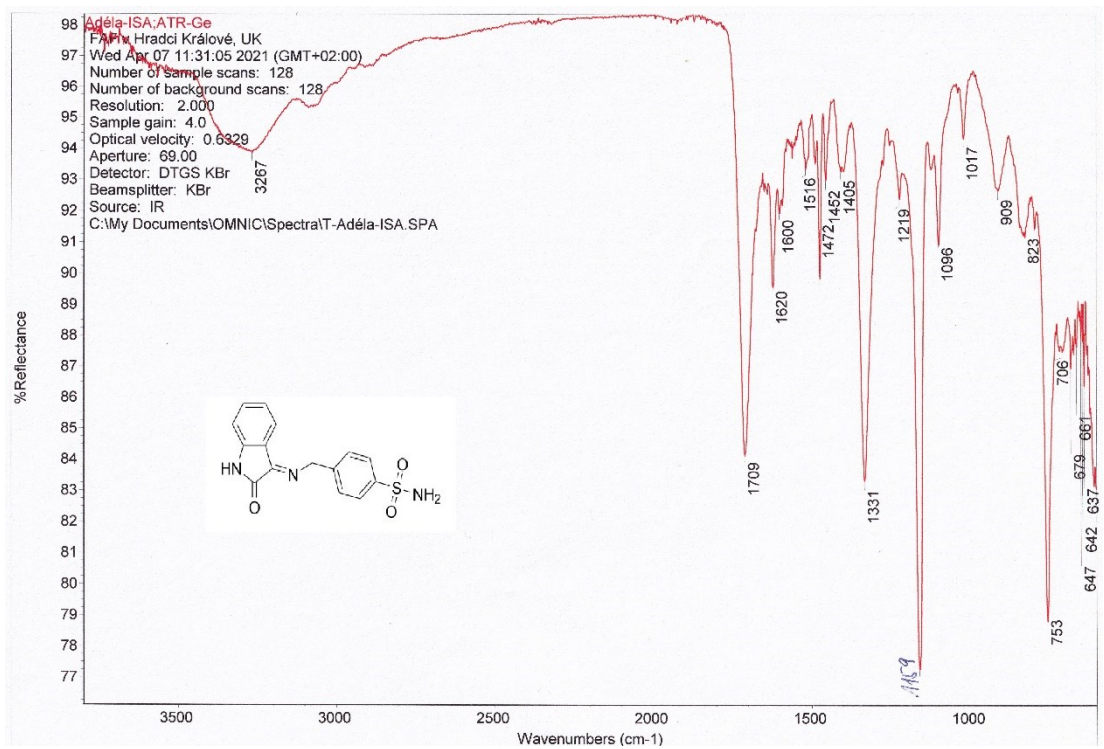
IR spektrum A 10



IR spektrum A 11



IR spektrum A 12



IR spektrum A 13